



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

# **Wpływ sumoilacji na reakcje kontrolowane przez fototropiny**

Dominika Jagiełło-Flasińska

*praca doktorska*

*wykonana w Zakładzie Biotechnologii Roślin*

*Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ*

*pod opieką*

*prof. dr hab. Haliny Gabryś*

Kraków 2019

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Pani Prof. dr hab. Halinie Gabryś za opiekę i poświęcony czas, za cierpliwość i życzliwość. Szczególnie dziękuję za przyjęcie mnie do Zakładu i umożliwienie mi realizacji niniejszej pracy.*

*Bardzo dziękuję dr Justynie Łabuz, za wsparcie na każdym etapie wykonywanej pracy, cenne wskazówki, pomoc w eksperymentach i korektę pracy.*

*Dziękuję dr Kasi Banaś za wsparcie, pomoc w doświadczeniach i za cenne nauki.*

*Dziękuję dr Pawłowi Hermanowiczowi za pomoc przy opracowaniu statystycznym wyników i pomoc w eksperymentach z mikroskopią konfokalną.*

*Dziękuję Carolinie Borghetti i Piotrowi Zgłobickiemu za ogromne wsparcie podczas wykonywanej pracy i za naszą przyjaźń.*

*Dziękuję Ewie Kowalskiej, Klaudii Arciszewskiej, Filipowi Bartnickiemu, Anecie Bażant, Ani Kozłowskiej, Oli Gizie, Weronice Krzeszowiec-Jeleń i Wojtkowi Strzałce za wszelką pomoc, współpracę i miło spędzony czas.*

*Dziękuję mojemu Mężowi za wielką cierpliwość, duże wsparcie, pokłady wiary we mnie oraz motywację do działania. Dziękuję mojej Marysi Krüger za dodawanie mi sił i podnoszenie mnie za każdym razem, kiedy byłam bliska upadku.*

*Dziękuję mojemu obecnemu przełożonemu, Balazsowi Nemethowi za niezwykle wyrozumiałość podczas pisania pracy, duże wsparcie oraz stworzenie komfortowych warunków pracy w tym niełatwym czasie.*

*Dziękuję Jankowi Rajczykowi, Krisztynie Bali, Gosi (Głazczce) Podgórskiej, Lidce Wardzińskiej za wyrozumiałość i dobre słowa podczas finalizowania pracy.*

# Spis treści

<b>WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....</b>	<b>6</b>
<b>STRESZCZENIE.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
1. Wstęp.....	14
1.1. Fotoreceptory roślin.....	14
1.2. Budowa, lokalizacja wewnątrzkomórkowa i regulacja ilości fototropin.....	17
1.2.1. Budowa i fosforylacja fototropin.....	17
1.2.2. Lokalizacja fototropin.....	19
1.2.3. Regulacja ekspresji fototropin.....	20
1.3. Przekaz sygnału w wybranych odpowiedziach fototropinowych.....	21
1.3.1. Regulacja otwierania aparatów szparkowych.....	21
1.3.2. Ruchy chloroplastów.....	22
1.3.3. Fototropizm.....	27
1.4. Sumoilacja.....	29
1.4.1. Etapy i przebieg procesu. ....	32
1.4.2. Białka modyfikowane przez SUMO oraz wpływ sumoilacji na ścieżkę przekazu sygnału świetlnego w roślinach wyższych.....	35
2. Cele pracy.....	37
3. Materiały i metody.....	38
3.1. Materiały.....	38
3.1.1. Materiał roślinny.....	38
3.1.2. Selekcja homozygotycznych linii mutantów <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	38
3.1.3. Szczepy bakteryjne.....	39
3.2. Metody.....	39
3.2.1. Hodowla roślin.....	39
3.2.2. Sterylizacja nasion <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	40
3.2.3. Naświetlania roślin.....	40
3.2.4. Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja.....	40
3.2.5. PCR w czasie rzeczywistym.....	41
3.2.6. Izolacja białek.....	41
3.2.7. Analiza Western Blot.....	41
3.2.8. Analizy bioinformatyczne.....	43
3.2.9. Rekonstrukcja systemu sumoilacji w systemie bakteryjnym.....	44

3.2.10. Metoda oczyszczania białek.....	45
3.2.11. Metoda dwucząsteczkowej komplementacji fluorescencji i transformacja <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	45
3.2.12. Mikroskopia konfokalna.....	47
3.2.13. Pomiary ruchów chloroplastów metodą fotometryczną.....	48
3.2.14. Fototropizm.....	49
4. Wyniki.....	51
4.1. Przewidywanie potencjalnych miejsc sumoilacji fototropiny1 metodami bioinformatycznymi.....	51
4.2. Rekonstrukcja procesu sumoilacji fototropiny1 w komórkach bakteryjnych.....	54
4.3. Analiza oddziaływań elementów szlaku sumoilacji z fototropiną1 metodą komplementacji fluorescencji.....	56
4.4. Ekspresja białek fototropin w mutantach szlaku sumoilacji.....	62
4.5. Ekspresja genów fototropin w mutantach szlaku sumoilacji.....	65
4.6. Ruchy chloroplastów w mutantach szlaku sumoilacji oraz w mutantach podwójnych - fototropinowych i ligaz SUMO.....	67
4.7. Analiza fototropizmu w mutantach szlaku sumoilacji oraz w mutantach podwójnych - fototropin i ligaz SUMO.....	74
5. Dyskusja.....	85
5.1. Fototropina1 jest substratem w procesie sumoilacji według programów bioinformatycznych i jest modyfikowana przez SUMO w systemie <i>in vitro</i> .....	85
5.2. Fototropina1 oddziałuje z elementami szlaku sumoilacji.....	87
5.3. Brak poszczególnych elementów szlaku sumoilacji zmienia poziom i stabilność fototropin w <i>Arabidopsis</i> .....	89
5.4. Elementy szlaku sumoilacji wpływają na reakcje fizjologiczne kontrolowane przez fototropiny:.....	92
5.4.1. Wpływ elementów szlaku sumoilacji na ruch chloroplastów.....	92
5.4.2. Wpływ elementów szlaku sumoilacji na fototropizm.....	94
6. Podsumowanie.....	98
7. Dodatek.....	100
7.1. Ukompetentnianie bakterii <i>Escherichia coli</i> .....	104
7.2. Transformacja komórek kompetentnych <i>Escherichia coli</i> .....	104
7.3. Ukompetentnianie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	104
7.4. Transformacja komórek kompetentnych <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	105
7.5. Regeneracja kolumn MobiSpin służących do oczyszczania białka.....	105

7.6. Elektroforeza RNA i DNA.....	106
8. Literatura.....	107

## Wykaz stosowanych skrótów

- A - amplituda reakcji akumulacji/ucieczki chloroplastów
- APS - nadsiarczan amonu (*Ammonium Persulfate*)
- ABCB - podrodzina B transporterów ABC (ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY)
- ABCB19 - białko z podrodziny B transporterów ABC
- ABA - kwas abscysynowy (*Abscisic Acid*)
- ABI5 - czynnik transkrypcyjny (ABA INSENSITIVE 5)
- ADH1 - białko regulowane przez ABA (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1)
- AUX/LAX - białka przenośnikowe (AUXIN1/LIKE-AUX1)
- BiFC - dwucząsteczkowa komplementacja fluorescencji (*Bimolecular Fluorescence Complementation*)
- CCD - matryca kamery (*Charge-Coupled Device*)
- CCT - domena kryptochromowa (CRYPTOCHROME C-TERMINUS)
- cDNA - DNA kodujący (*Coding DNA*)
- CES - czynnik transkrypcyjny (CESTA)
- CHUP1 - białko wiążące aktynę (CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING 1)
- Col-0 - *Columbia*, ekotyp *Arabidopsis thaliana*
- COP1 - białko konstytutywna fotomorfogeneza 1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS1)
- CRL3 - ligaza ubikwityny ((CUL3-CULLIN3-BASED LIGASE) – RING E3 UBIQUITIN LIGASE)
- CRY - kryptochrom (CRYPTOCHROME)
- CUL3 - ligaza ubikwityny (CUL3- CULLIN3-BASED LIGASE)
- DNA - kwas deoksyrybonukleinowy
- dNTPs - trifosforany deoksyrybonukleotydów (*Deoxynucleotide Triphosphates*)
- EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
- EXPA - białka zaangażowane w elongację hipokotyła (EXPANSIN ALPHA)
- FMN - mononukleotyd flawinowy (FLAVIN MONONUCLEOTIDE)
- EST - krótka sekwencja cDNA (*Expressed Sequence Tags*)
- GFP - białko zielonej fluorescencji (GREEN FLUORESCENT PROTEIN)
- HY5 - czynnik transkrypcyjny (ELONGATED HYPOCOTYL 5)
- ICE1 - czynnik transkrypcyjny (INDUCER OF CBP EXPRESSION 1)
- IPTG - izopropyl β-D-1-tiogalaktopiranozyd
- JAC1 - białko zaangażowane w reorganizację cytoszkieletu cp-aktynowego (J-DOMAIN)

PROTEIN REQUIRED FOR CHLOROPLAST ACCUMULATION RESPONSE1)

KAC - białko biorące udział w tworzeniu filamentów cp-aktyny (KINESIN-LIKE PROTEIN FOR ACTIN-BASED CHLOROPLAST MOVEMENT)

LAT-B - latrunkulina B, inhibitor polimeryzacji aktyny

LB - pożywka bakteryjna (*Lysogeny Broth*)

LOV - domena regulowana światłem, tlenem i napięciem (LIGHT, OXYGEN, VOLTAGE REGULATED)

MMS21/HPY2 - wrażliwość na MMS 21/ wysoka ploidalność 2 (METHYL METHANE SULFONATE SENSIVITY 21/HIGH PLOIDY2)

mRNA - matrycowy RNA (*messenger RNA*)

MS - spektrometria mas (*Mass Spectrometry*)

MSG2 - czynnik transkrypcyjny (MASSUGU2)

NDSM - motyw sumoilacji zależny od ujemnie naładowanych aminokwasów (*Negatively Charged Amino Acid Dependent Sumoylation*)

NPH - niefototropiczny hipokotyl (NON PHOTOTROPIC HYPOCOTYL)

PBS - buforowany roztwór soli fizjologicznej (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (*Polymerase Chain Reaction*)

PDF - podjednostka fosfatazy białkowej 2A

PDSM - motyw sumoilacji zależny od fosforylacji (*Phosphorylation Dependent Sumoylation Motif*)

PHOT1 - fototropina1 (PHOTOTROPIN1)

PHOT2 - fototropina2 (PHOTOTROPIN2)

PHY - fitochrom (PHYTOCHROME)

PIAL1 - białko z domeną SP-RING (PROTEIN INHIBITOR OF ACTIVATED STAT LIKE1)

PIAL2 - białko z domeną SP-RING (PROTEIN INHIBITOR OF ACTIVATED STAT LIKE2)

PIN - rodzina transporterów auksyn (PIN-FORMED)

PKS4 - białko zaangażowane w fototropizm (PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE)

PLC - fosfolipaza C (PHOSPHOLIPASE C)

PMSF - fenylometylosulfonofluorek (*Phenylmethanesulfonyl Fluoride*)

PMI1 - białko stabilizujące filamenty cp-aktyny (PLASTID MOVEMENT IMPAIRED 1)

PVDF - poli(fluorek winylidenu) (*Polyvinylidene Fluoride*)

qPCR - reakcja PCR w czasie rzeczywistym (*Quantitative PCR*)

RAB18 - białko regulowane przez ABA (RAB GTPASE HOMOLOG B18)

RPT2 - białko zaangażowane w fototropizm (ROOT PHOTOTROPISM 2)

RNA - kwas rybonukleinowy

SAE - enzym aktywujący SUMO (SUMO ACTIVATING ENZYME) SAE1a/b i SAE2  
(SUMO ACTIVATING ENZYMES1 A/B i 2)

SAND - białko z rodziny białek SAND (*SAND Protein Family Member*)

SCE - enzym koniugujący SUMO (SUMO CONJUGATING ENZYME)

SC-SUMO - motyw synergetycznej kontroli sumoilacji (*Synergy Control - SUMO*)

SDS - dodecylsulfian sodu (*Sodium Dodecyl Sulphate*)

SDS-PAGE - elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (SDS –  
*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SIM - motyw interakcji z białkami SUMO (*SUMO Interaction Motif*)

SIZ1 - białko zawierające domeny SAP i MIZ (SAP NAD MIZ-FINGER-CONTAINING  
PROTEIN1)

STUbLs - ligazy ubikwityny kierowane przez SUMO (SUMO-TARGETED UBIQUITIN  
LIGASES)

SUMO - małe białko podobne do ubikwityny (SMALL UBIQUITIN -RELATED  
MODIFIER)

TAE - bufor (*Tris-Acetate-EDTA*)

TAIR - The *Arabidopsis* Information Resource

TEMED - N,N,N',N,' tetrametylonodiamina

THR1 - białko związane z ruchem chloroplastów (THRUMIN 1)

UBC - enzym przyłączający ubikwitynę (UBIQUITIN -CONJUGATING ENZYME)

UBL - rodzina białek podobnych do ubikwityny (UBIQUITIN LIKE PROTEIN)

UBQ - poliubikwityna (POLYUBIQUITIN 10)

ULP - proteaza białek podobnych do ubikwityny (UBIQUITIN LIKE PROTEIN-SPECIFIC  
PROTEASE)

ULP/SEN1 - rodzina proteaz (UBIQUITIN LIKE PROTEIN-Sentrin/SUMO)

UV - światło ultrafioletowe (*Ultra Violet*)

UV-A - światło ultrafioletowe z zakresu 320-400 nm

UV-B światło ultrafioletowe z zakresu 280–315 nm

UV-C - światło ultrafioletowe z zakresu 220-290 nm

UVR-8 - fotoreceptor UV (UV RESISTANCE LOCUS 8)

V - szybkość zmiany transmitancji

WEB1 - białko związane z ruchem chloroplastów (WEAK CHLOROPLAST MOVEMENT  
UNDER BLUE LIGHT 1)

WT - dziki typ (*Wild Type*)

YEB - pożywka bakteryjna (*Yeast Extract Broth*)



ZTL - rodzina białek ZEITLUPE zaangażowanych w regulację rytmu okołodobowego  
(*Zeitlupe*)

## Streszczenie

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 N-końcowej 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 ciągle, 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.

## **Abstract**

Light plays an important role in plant's growth and development. Plants perceive light through specialized proteins called photoreceptors. Phototropins perceive blue and UVA light. Two genes have been identified in the *Arabidopsis* genome: *PHOT1* and *PHOT2*. Phototropins are involved in phototropic bending, stomatal opening, leaf positioning and chloroplast movements. In weak blue light, chloroplasts move to periclinal walls in order to optimize light absorption. This is called the chloroplast accumulation response. In strong blue light, the avoidance response is observed as chloroplasts move away to the anticlinal walls in order to minimize damage of photosynthetic apparatus. Both phototropins control chloroplast accumulation response, but only phot2 regulates the avoidance response.

Sumoylation is a posttranslational modification which results in a reversible attachment of a small SUMO (SMALL UBIQUITIN RELATED PROTEIN) protein to target proteins. Sumoylation can block or activate other proteins through changing their localization and interactions. Stress conditions result in SUMO conjugates formation. The importance of this modification is only partially discovered. Sumoylation regulates plant development, flowering and root structure. 8 SUMO isoforms are encoded in the *Arabidopsis* genome. Only isoforms SUMO1, SUMO2, SUMO3, SUMO5 are investigated, since their EST (*Expressed Sequence Tags*) have already been identified. Both isoforms SUMO1 and 2 are crucial for plant's life. The double *Atsum1sum2* mutant is lethal. Isoforms SUMO1 and SUMO2 are responsible for heat and salt stress responses in plants. Four SUMO ligases have been identified in the *Arabidopsis* genome so far: SIZ1 (SAP AND MIZ1), MMS21 (METHYL METHANE SULFONATE SENSITIVITY 21), PIAL1 and PIAL2 (PROTEIN INHIBITOR OF ACTIVATED STAT LIKE1 and 2). It has been demonstrated that phytochrome B – a red light receptor is sumoylated by SUMO1. In our laboratory it has been shown that the N-terminus of phototropin2 is also sumoylated.

The main objective of experiments performed in this thesis was to verify whether phototropin1 interacts with the SUMO protein family and SUMO ligases. The second part of the study focused on physiological responses controlled by phototropins. Bioinformatic

analysis confirmed the occurrence of amino acid sequences with a high probability of sumoylation within PHOT1. Interactions between phototropin1 and proteins involved in the sumoylation pathway were characterized using the Bimolecular Fluorescence Complementation technique. In this work the nuclear localization of phototropin1 promoted by the interaction with SIZ1 was shown for the first time. It was also confirmed that the N-terminus of phototropin1 is modified by SUMO proteins using a sumoylation system reconstituted in *E. coli*. The levels of phototropin proteins were tested in mature leaves of wild-type *Arabidopsis* and the following mutants: *Atsum1*, *Atsum2*, *Atsum3*, *Atsum5*, *Atsiz1*, *Atmms21*, *Atpial1* and *Atpial2*. Except for *Atpial2*, all tested mutants revealed lower levels of PHOT1 in comparison to the wild type, in both light and dark. The *Atmms21* mutant exhibited higher PHOT2 levels, whereas the *Atsiz1* mutant showed lower levels of PHOT2 in comparison with *AtWT*. Higher levels of both phototropins were found in the *Atsum5* mutant. In order to determine the physiological role of phototropin sumoylation, light induced chloroplast movements and phototropism were investigated. Both responses are phototropin controlled. Experiments were performed using sumoylation pathway mutants and double - phototropin and ligase mutants (*Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*, *Atphot2mms21*, *Atphot2siz1*). Weaker responses of chloroplasts to short blue light pulses were observed in the *Atphot1mms21* mutant and stronger responses in *Atphot1siz1*, both in comparison to *Atphot1*. The conclusion is that ligases may influence phot2 controlled reactions. Both *Atphot2mms21* and *Atphot2siz1* mutants showed weaker accumulation in response to continuous blue light in comparison to *Atphot2*. This suggests that ligases may influence phot1 controlled responses. Phototropic curvature analysis showed weaker phototropism in mutants: *Atmms21*, *Atsiz1* and *Atpial1* under low light intensity ( $0,01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) than in wild type plants. This can be related to lower levels of PHOT1 observed in these mutants. The *Atpial2* mutant exhibits stronger phototropism than *AtWT* in weak light, which may be related to higher PHOT1 levels in this mutant under light. *Atphot1mms21* and *Atphot1siz1* mutants showed weaker phototropism in higher light intensities ( $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) than wild type plants or single ligase mutants. This suggests that the reaction controlled by phot2 is weaker in the absence of MMS21 or SIZ1 ligases.

Experiments performed in this thesis enable to conclude that phot1 is modified by members of the SUMO protein family. PHOT1 can localize in the nucleus as a result of the interaction with SIZ1. Proteins involved in the sumoylation pathway influence the level of phototropin proteins in both dark and light. SUMO proteins and SUMO ligases regulate (directly or indirectly) physiological responses controlled by phototropins, especially phototropism.

# 1. Wstęp

## 1.1. Fotoreceptory roślin.

Rośliny są zdolne do analizy natężenia i własności spektralnych światła dzięki obecności pięciu klas wyspecjalizowanych białek, które noszą nazwę fotoreceptorów. Są to fitochromy odpowiadające za percepcję światła czerwonego i dalekiej czerwieni oraz trzy grupy receptorów absorbujących światło niebieskie/UV-A: kryptochromy, rodzina białek Zeitlupe (ZTL) i fototropiny (Zhu et al., 2008). Reakcje w UV-B kontroluje fotoreceptor - UVR-8 (Rizzini et al., 2011).

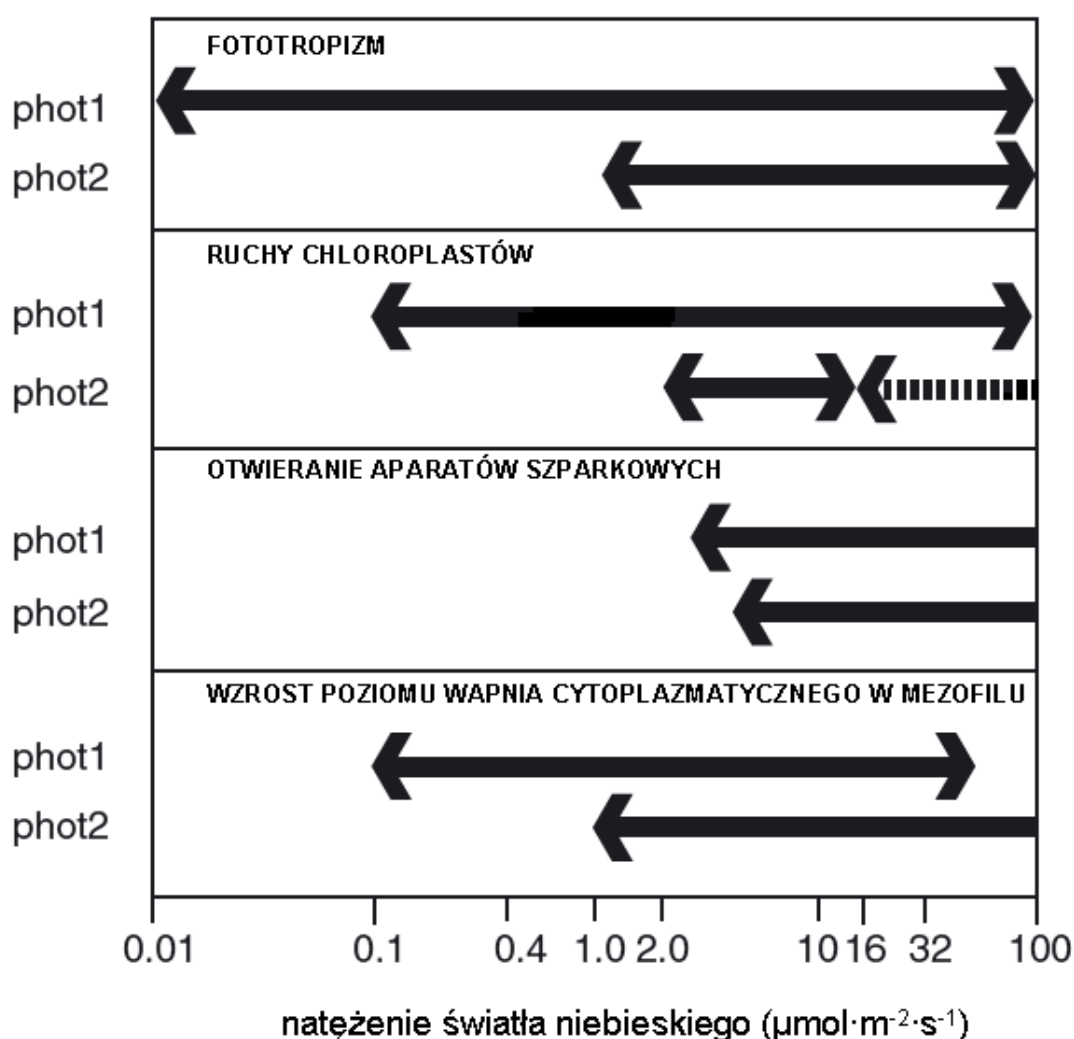
Fitochromy absorbują światło o długości fali od 600 nm do 800 nm. W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano 5 genów kodujących fitochromy: światłolabilny fitochromA (*PHYA*) oraz światłostabilne *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* i *PHE*. Fitochromy zbudowane są z N-końcowej części fotosensorycznej oraz C-końcowej części regulatorowej, zawierającej kinazę histydynową (Rockwell et al., 2006). Fitochromy sterują odpowiedziami fotomorfogenetycznymi, działając poprzez modulację transkrypcji i odpowiadają w dużej mierze za kiełkowanie.

Kryptochromy odpowiadają za percepcję światła niebieskiego i UV-A (długość fali: 320 nm do 500 nm) (Christie, 2015). W genomie *Arabidopsis* obecne są 3 geny kodujące kryptochromy – *CRY1*, *CRY2*, *CRY3* (Jeong et al., 2010). Kryptochromy zawierają domenę sensoryczną PHR (PHOTOLYASE HOMOLOGY REGION), *CRY1* i *CRY2* posiadają również sygnałową C-końcową domenę kryptochromową (CCT - CRYPTOCHROME C-TERMINUS) (Christie et al., 2015). Podobnie do fitochromów, regulują fotomorfogenezę (Christie, 2007), odpowiadają za deetiologację siewek oraz w dużym stopniu regulują ekspresję genów indukowanych światłem niebieskim (Kang et al., 2008).

Fotoreceptorami światła niebieskiego są także białka z rodziny Zeitlupe (Kong et al., 2013). Biorą one udział w koordynacji cyklu okołodobowego *Arabidopsis* oraz metabolizmu związanego z cyklem dnia i nocy. Białka te zawierają domenę LOV (*LIGHT, OXYGEN, VOLTAGE regulated*), domenę F-box oraz 6 powtórzeń typu Kelch (domenę F-box i powtórzenia Kelch opisano w pracach: Craig i Tyers, 1999 oraz Xue i Cooley, 1993). Motyw F-box spotykany jest w białkach, które kierują inne białka do degradacji. Powtórzenia typu Kelch ułatwiają interakcję pomiędzy białkami (Sommers et al., 2000).

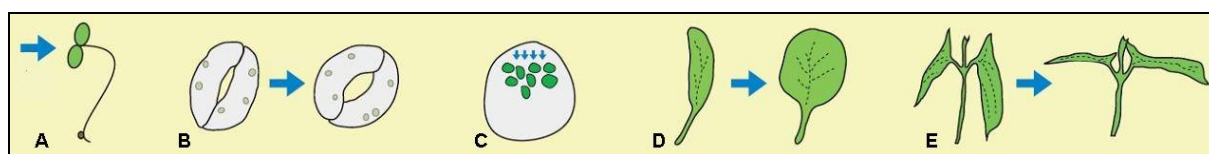
Fitochromy i kryptochromy kontrolują ekspresję genów w jądrze komórkowym (Sharrock i Clack, 2002). Ponadto fitochromy, kryptochromy i białka Zeitlupe wspólnie odpowiadają za rytmy okołodobowe i kwitnienie.

Badania mutantów *Arabidopsis thaliana* pozwoliły na zidentyfikowanie fototropin i ustalenie ich roli jako receptorów światła niebieskiego i UV-A. Fototropiny są zaangażowane w zależną od światła regulację wzrostu i optymalizację fotosyntezy (Christie, 2007). Biorą także udział w odpowiedzi roślin na UV-C (Mageroy et al., 2010). Liczba genów fototropin zależy od gatunku rośliny. W genomie *Arabidopsis* występują dwie fototropiny: *PHOT1* i *PHOT2* (Liscum i Briggs, 1995; Jarillo et al., 2001). Phot1 jest aktywna już w niskich natężeniach światła niebieskiego (od  $0.08 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), podczas gdy phot2 funkcjonuje w wyższych natężeniach światła niebieskiego (od  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Rys. 1.) (Kagawa i Wada, 2000; Sakai et al., 2001; Harada i Shimazaki, 2007).



**Rys. 1.** Poziom wrażliwości fototropiny1 i fototropiny2 w fizjologicznych odpowiedziach, które regulują. Przerwana strzałka oznacza zakres natężeń, w którym odbywa się ucieczka chloroplastów (Harada i Shimazaki, 2007).

Fototropiny wspólnie regulują otwieranie aparatów szparkowych, fototropizm i pozycjonowanie liści (Rys. 2.) (Inoue et al., 2008b). Odpowiadają również za rozwój liścieni i liści u *Arabidopsis* (Ohgishi et al., 2004; Salomon et al., 2003). Obie fototropiny zaangażowane są w reakcję akumulacji chloroplastów, a wyłącznie phot2 kontroluje reakcję ucieczki. Phot2 odpowiada za rozmieszczenie chloroplastów w ciemności w miększu palisadowym oraz za pozycjonowanie i indukowany światłem niebieskim ruch ucieczki jądra komórkowego (Iwabuchi et al., 2007). Fototropiny poprzez kontrolę wyżej wymienionych procesów wpływają na intensyfikację procesu fotosyntezy i rozwój roślin w warunkach słabego oświetlenia (Takemiya et al., 2005). Z kolei w warunkach silnego światła, reakcje sterowane przez phot2 pozwalają ochronić aparat fotosyntetyczny (Park et al., 1996; Kasahara et al., 2002; Sztatelman et al., 2010) i DNA jądrowe przed uszkodzeniami (Iwabuchi et al., 2007).



**Rys. 2.** Niektóre odpowiedzi fizjologiczne sterowane przez fototropiny u roślin: A - fototropizm, B - regulacja otwierania aparatów szparkowych, C - akumulacja chloroplastów, D - rozwój liści i liścieni, E - pozycjonowanie liści (za Christie, 2007).

W siewkach *Arabidopsis* phot1 jest niezbędna przy destabilizacji mRNA jądrowych i chloroplastowych genów: *Lhcb* i *rbcL* przy wysokich natężeniach światła niebieskiego (Folta i Kaufman, 2003; Christie, 2007). Analizy genetyczne wykazały jedynie niewielką rolę fototropin w regulacji transkrypcji. Około jedna trzecia genomu *Arabidopsis* jest regulowana światłem białym (Jiao et al., 2003). Kryptochromy są głównymi fotoreceptorami kontrolującymi ekspresję genów czynników transkrypcyjnych w świetle niebieskim, a fitochrom A - w dalekiej czerwieni. Jedynie ekspresja kilku genów jest regulowana przez fototropinę1 u *Arabidopsis* (Jiao et al., 2003; Chen et al., 2008, Lehmann et al., 2010).

Coraz więcej wiadomo na temat roli jonów wapnia jako wtórnego przekaźnika sygnału od fototropin. Badania przeprowadzone na siewkach dowodzą, że wzrost poziomu  $Ca^{2+}$  w cytozolu zależy od fototropiny1, gdyż mutant *Atphot1* wykazywał o połowę niższy poziom jonów wapnia niż typ dziki (Baum et al., 1999). Światło niebieskie aktywowało kanały wapniowe bramkowane napięciem w błonie komórkowej komórek mezofilu *Arabidopsis*. Przepływ  $Ca^{2+}$  przez te kanały był niewielki w mutancie *Atphot1*, a całkowicie zahamowany w mutancie podwójnym *Atphot1phot2* (Stoelzle et al., 2003). Phot1 pośredniczyła przy

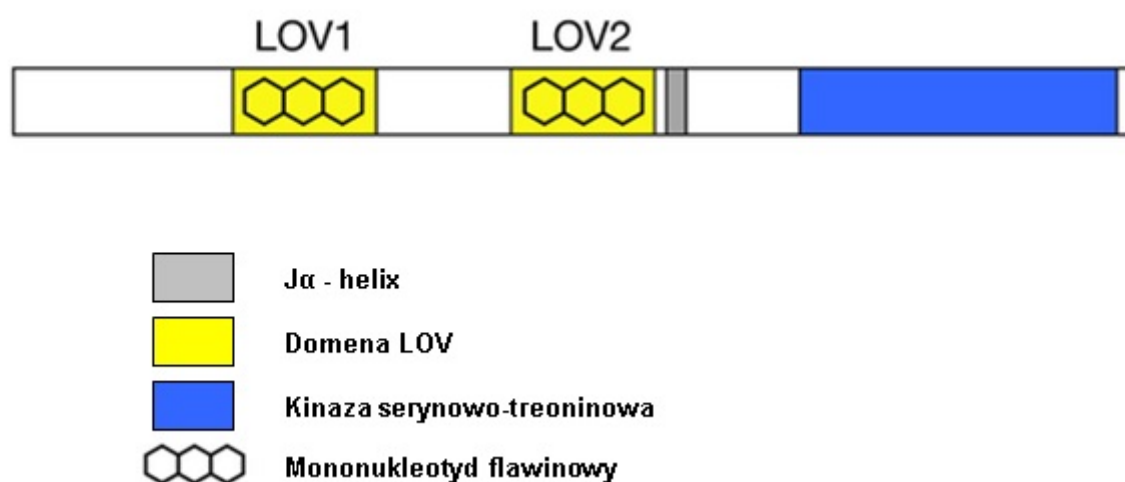


wzroście cytozolowego stężenia jonów wapnia przy niższych natężeniach światła ( $0,1 - 50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), a phot2 przy wyższych natężeniach ( $1-250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Ponadto inhibitory fosfolipazy C (PLC) hamowały zależny od światła niebieskiego wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w komórkach liści typu dzikiego i *Atphot1*. Efektu tego nie zaobserwowano w mutancie *Atphot2* (Harada et al., 2003).

## 1.2. Budowa, lokalizacja wewnątrzkomórkowa i regulacja ilości fototropin.

### 1.2.1. Budowa i fosforylacja fototropin.

Budowę cząsteczki fototropiny przedstawiono na rysunku (Rys. 3.). Fototropina składa się z dwóch części. Część N-końcowa zawiera domenę fotosensoryczną. Druga część to kinaza serynowo - treoninowa na C-końcu białka.



Rys. 3. Schemat budowy fototropiny (Christie, 2007).

N-końcowa część sensoryczna fototropin determinuje poziom wrażliwości fotoreceptora na światło (Kasahara et al., 2002). Zawiera ona dwie podobne domeny, o długości  $\approx 110$  aminokwasów, o nazwie LOV1 i LOV2 (Huala et al., 1997). W ciemności domeny LOV są niekwalencyjnie zasocjowane z chromoforem - mononukleotydem flawinowym (FMN). Domena LOV2 oddziałuje z domeną kinazową (Matsuoka i Tokutomi, 2005) i warunkuje aktywność fotoreceptorową (Christie et al., 2002). Fotoreaktywność domen LOV2 jest niezbędna do aktywności kinazowej fototropin (Christie et al., 2002, Matsuoka i Tokutomi, 2005). Wzbudzenie fototropiny przez światło powoduje powstanie kowalencyjnego adduktu pomiędzy FMN i resztą cysteinową, co skutkuje zmianami konformacyjnymi w LOV2 i w

części helikalnej  $J\alpha$ -spirali (Harper et al., 2003). Oddziaływania pomiędzy LOV2 i domeną kinazową ulegają osłabieniu, co aktywuje kinazę i prowadzi do autofosforylacji receptora. Fototropina jest więc pierwszym substratem dla swojej kinazy (Christie et al., 1998; Sakai et al., 2001; Christie, 2007). Jest to początkowy etap transdukcji sygnału (Salomon et al., 2000). Reakcja ta jest odwracalna w ciemności. Eksperymenty z wykorzystaniem technik niskokątowego rozpraszania promieniowania roentgenowskiego (SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING) i chromatografii wykluczania (SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY) wykazały, że domena LOV1 może z kolei grać rolę w dimeryzacji fotoreceptorów (Salomon et al., 2004; Nakasako et al., 2004). Ponadto, LOV1 odpowiada za przedłużenie stanu aktywacji fotoreceptora i pełni rolę regulującą wobec LOV2 (Kagawa et al., 2004; Matsuoka i Tokutomi 2005, Kaiserli et al., 2009).

Domena kinazowa fototropiny klasyfikowana jest w rodzinie kinaz AGC, podrodzinie AGC-VIIIb (cAMP-zależne kinazy białkowe, cGMP-zależne kinazy białkowe i fosfolipido-zależne kinazy białkowe) (Galavan-Ampudia i Offringa, 2007; Bogre et al., 2003). Mapowanie miejsc autofosforylacji *in vitro* fototropiny1 owsa pozwoliło na identyfikację 8 miejsc (Salomon et al., 2003). Na N-końcu ustalono dwa miejsca przy Ser-27 i Ser-30, natomiast pozostałe miejsca leżą w regionie zawiasowym pomiędzy domenami LOV1 i LOV2: Ser-274, Ser-300, Ser-317, Ser-325, Ser-332 i Ser-349. Inoue i współpracownicy zidentyfikowali w fototropinie1 z *Arabidopsis* kolejne miejsca, które mogą potencjalnie ulegać fosforylacji. Są to w N-końcowej części białka: Ser-58, Ser-170, i Ser-185; w części zawiasowej: Ser-350 i Ser-376; w pętli aktywacyjnej Ser-849 i Ser-851 oraz w C-końcowej części Thr-993. Nie udało się stwierdzić czy seryny w pozycjach 849 i 851 mogą być fosforylowane jednocześnie, potwierdzono natomiast, że Ser-851 ulega fosforylacji. Fosforylacja Ser-851 zachodzi szybko w odpowiedzi na niebieskie światło, w ciemności następuje szybka defosforylacja seryny. Substytucja seryn: 849 i 851 kwasem asparaginowym skutkuje powstaniem białka, które w dalszym ciągu wymaga światła do swojej aktywacji (Inoue et al., 2008a). Choć w obrębie fototropin występuje wiele reszt Ser/Thr, które potencjalnie mogą być fosforylowane, to fosforylacja reszt Ser849 i Ser851 w phot1 oraz Ser761 i Ser763 w phot2 wydaje się najbardziej istotna w odniesieniu do percepcji światła i przekazu sygnału (Inoue et al., 2011). Podstawienie seryn Ser761 i Ser763 alaninami w fototropinie2 powoduje osłabienie odpowiedzi sterowanych przez phot2, jednakże nie prowadzi do ich kompletnego zaniku (Inoue et al., 2011).

Choć w białkach fototropin zidentyfikowano wiele miejsc ulegających fosforylacji, wciąż pozostaje nieznane miejsce fosforylacji odpowiadające za aktywność tych fotoreceptorów w reakcjach przez nie kontrolowanych.

### 1.2.2. Lokalizacja fototropin.

Obie fototropiny są zasocjowane z błoną komórkową w ciemności pomimo faktu, iż nie posiadają one żadnej domeny transbłonowej (Jarillo et al., 2001; Kagawa et al., 2001; Sakai et al., 2001). Specyficzną lokalizację fototropin w świetle niebieskim określa domena kinazowa na C-końcu (Sakamoto i Briggs, 2002).

Na świetle niewielka frakcja phot1 ulega internalizacji na drodze endocytozy, w zależności od aktywności kinazowej receptora. Wykorzystując *Arabidopsis* z ekspresją phot1-GFP pokazano, że frakcja phot1 jest uwalniana z błony do cytoplazmy w odpowiedzi na niebieskie światło (Sakamoto i Briggs, 2002). Badania przeprowadzone na etiolowanych siewkach wykazały, że we wszystkich komórkach z wyjątkiem komórek szparkowych, phot1 pod wpływem światła niebieskiego ulega przemieszczeniu z błony komórkowej do cytoplazmy i tworzy tzw. „mozaikowy wzór” w cytoplazmie (Wan et al., 2008). Fizjologiczne znaczenie internalizacji phot1 pod wpływem światła nie jest znane. Wiadomo jedynie, że zmiana ta nie prowadzi do osłabienia wrażliwości fotoreceptora (Preuten et al., 2015).

W świetle niebieskim phot2 ulega internalizacji i jest kierowany do różnych przedziałów endosomalnych: do wczesnych endosomów, sieci trans aparatu Golgiego, endosomów późnych, oraz endosomów odpowiadających za powrót receptora do błony komórkowej (Irani i Russinova, 2009). Mechanizm i znaczenie zależnej od światła niebieskiego translokacji phot2 są wciąż nieznane (Aggarwal et al., 2014). Tak jak zaobserwowano dla phot1 (Sakamoto i Briggs, 2002), zdecydowana większość białka phot2-GFP jest związana z błoną komórkową, ale część puli jest relokowana do cytozolu w odpowiedzi na światło niebieskie (Kong et al., 2006). Frakcja cytoplazmatyczna phot2-GFP wykazuje „wzór mozaiki” po naświetlaniu światłem niebieskim (Kong i Nagatani, 2008; Kaiserli et al., 2009). Część fototropiny2 uwolnionej z błony komórkowej ulega stopniowej degradacji w ciemności. Degradacja ta wydaje się mieć szczególne znaczenie w usuwaniu aktywowanego światłem fotoreceptora, działając równolegle z defosforylacją prowadzącą do zahamowania aktywności kinazowej fototropiny.

Na funkcje fototropin wpływa w znacznym stopniu ilość fotoreceptora związanego z błoną komórkową. Endocytoza jest ważnym mechanizmem regulującym sygnalizację komórkową z błony komórki. Niewiele wiadomo na temat szlaku sekrecyjnego fototropin. Obie fototropiny łączą się z klatryną (Kaiserli et al., 2009; Roberts et al., 2011; Aggarwal et al., 2014). Indukowana światłem niebieskim internalizacja fototropin może być więc skutkiem klatryno-zależnej endocytozy. Wyniki badań z użyciem inhibitorów: tyrfostiny23 i wortmaniny są

zgodne z tą hipotezą dla phot1 (Roberts et al., 2011), ale nie dla phot2 (Aggarwal et al., 2014).

Wykazano, że frakcje phot2 oraz w mniejszym stopniu phot1 pozostają związane z zewnętrzną stroną otoczki chloroplastu (Kong et al., 2013b). Efekt ten obserwowano w silnym świetle niebieskim i stwierdzono, że ilość phot2 związanego z otoczką chloroplastu wpływa na wzmocnienie reakcji ucieczki (Kong et al., 2013b).

### 1.2.3. Regulacja ekspresji fototropin.

Poziom mRNA fototropin zmienia się w czasie, wskazując na znaczenie kontroli światła dla funkcjonowania tych fotoreceptorów. Ogólny wzór ekspresji fototropin wskazuje na zmniejszenie ilości *PHOT1* oraz na zwiększanie ilości *PHOT2* na świetle (Łabuz et al., 2012). Badania prowadzone na różnych etapach rozwoju *Arabidopsis* wykazują, że wzór ekspresji fototropin zmienia się wraz z rozwojem i dojrzewaniem liści. Prawdopodobnie odzwierciedla to regulację przez fototropiny funkcji takich jak: pozycjonowanie liści, otwieranie aparatów szparkowych oraz indukowane światłem niebieskim ruchy chloroplastów (Łabuz et al., 2012). Poziom ekspresji *PHOT2* jest wysoki w młodych liściach, a najwyższy w dojrzałych liściach *Arabidopsis* (Jarillo et al., 2001; Kagawa et al., 2001).

Badania nad regulacją ekspresji fototropin w liściach prowadzono z użyciem światła niebieskiego i czerwonego z wykorzystaniem mutantów kryptochromowych i fitochromowych *Arabidopsis*. Zaproponowano, że kryptochrom1 i fitochrom B są głównymi fotoreceptorami zaangażowanymi w regulację ekspresji *PHOT1* w liściach (Łabuz et al., 2012). Eksperymenty wykazały brak spadku transkrypty *PHOT1* po naświetlaniach światłem niebieskim w mutantach *Atcry1* oraz *Atcry1cry2*. Fitochromy A i B prawdopodobnie biorą udział w regulacji ilości *PHOT1*, gdyż zarówno *AphyB* jak i mutant podwójny *AphyAphyB* wykazują niski poziom ciemnościowy fototropiny1 (Łabuz et al., 2012).

Zarówno światło niebieskie jak i czerwone oraz UV-A zwiększają poziom ekspresji *PHOT2* w etiolowanych 4 i 6-dniowych siewkach (Jarillo et al., 2001; Kagawa et al., 2001; zreferowano w Łabuz et al., 2012). W liściach, poziom transkrypty *PHOT2* rośnie po naświetlaniach zarówno światłem niebieskim jak i czerwonym (Łabuz et al., 2012). Obserwowano zaburzoną regulację *PHOT2* w mutantach *Atcry1cry2* oraz *AphyA*, co wskazuje, że kryptochromy wraz z fitochromemA regulują ekspresję *PHOT2*.

Światło obniża zarówno ilość mRNA jak i białka PHOT1 (Roberts et al., 2011). Eksperymenty przeprowadzone na 2 i 3-dniowych siewkach *Arabidopsis* dzikiego typu traktowanych ciągłym światłem niebieskim wykazały obniżenie poziomu białka PHOT1

zarówno po 3, 6, jak również po 24 godzinach naświetlania. W ciemności ilość PHOT1 zmienia się w sposób nieznaczny (Sakamoto i Briggs, 2002; Kang et al., 2008). Dotychczas została poznana jedynie ścieżka zależnej od światła degradacji phot1 na drodze ubikwitynacji (Roberts et al., 2011). Phot1 ulega endocytozie klatryno-zależnej pod wpływem silnego światła niebieskiego (Kaiserli et al., 2009). Dodatkowo fotoreceptor ten oddziałuje z NPH3 (NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL3) – substratem dla ligazy ubikwityny CUL3 ((CUL3-CULLIN3-BASED LIGASE) – RING E3 UBIQUITIN LIGASE), która pośredniczy w jego ubikwitynacji (Roberts et al., 2011). W słabym świetle niebieskim CUL3 pośredniczy w mono- i multiubikwitynacji phot1, natomiast w silnym świetle niebieskim następuje zarówno mono/multi-, jak i poliubikwitynacja. W silnym świetle niebieskim phot1 oddziałuje z białkami NPH3 oraz CUL3, ulegając poliubikwitynacji, a następnie jest degradowana przez proteasom 26S, co prawdopodobnie służy desensytyzacji fotoreceptora phot1 (Roberts et al., 2011). Odpowiedzi sterowane przez fototropinę1 zależą od jej ilości w komórce. Dzięki wysokiej zawartości fototropiny1 w siewkach, mogą one reagować nawet na impuls światła o bardzo niskim natężeniu, co pozwala na rozwój fotomorfogenetyczny. Ponadto wykazano, że reakcje fototropizmu, otwierania aparatów szparkowych i akumulacji chloroplastów są zależne od poziomu phot1 w cytoplazmie (Doi et al., 2004).

Regulacja poziomu PHOT2 jest odmienna od PHOT1. Badania prowadzone na siewkach i na liściach wykazały, że poziom białka phot2 wzrasta po naświetlaniu światłem niebieskim (Kang et al., 2008; Aggarwal et al., 2014). Dotychczasowe badania nie dokumentują ścieżki degradacji PHOT2. Wiadomo, że zahamowanie syntezy białek skutkuje spadkiem ilości tego fotoreceptora, przy czym proces ten jest szybszy w ciemności (Aggarwal et al., 2014). W 2004, Kagawa i współpracownicy wysunęli hipotezę, że szybkość reakcji ucieczki chloroplastów zależy od poziomu phot2 w komórce (Kagawa i Wada, 2004). W 2009, Kimura potwierdził tę hipotezę, ale dowiódł, że szybkość reakcji ucieczki nie wzrasta proporcjonalnie do wzrostu ilości phot2 (Kimura i Kagawa, 2009). Wykazano, że podobnie jak phot1, phot2 oddziałuje z klatryną (Kaiserli et al., 2009). Nieznana jest rola jaką pełni oddziaływanie klatryny z fototropiną2. Nie ma również dowodów, że oddziaływanie to prowadzi do degradacji klatryno-zależnej.

### **1.3. Przekaz sygnału w wybranych odpowiedziach fototropinowych.**

#### **1.3.1. Regulacja otwierania aparatów szparkowych.**

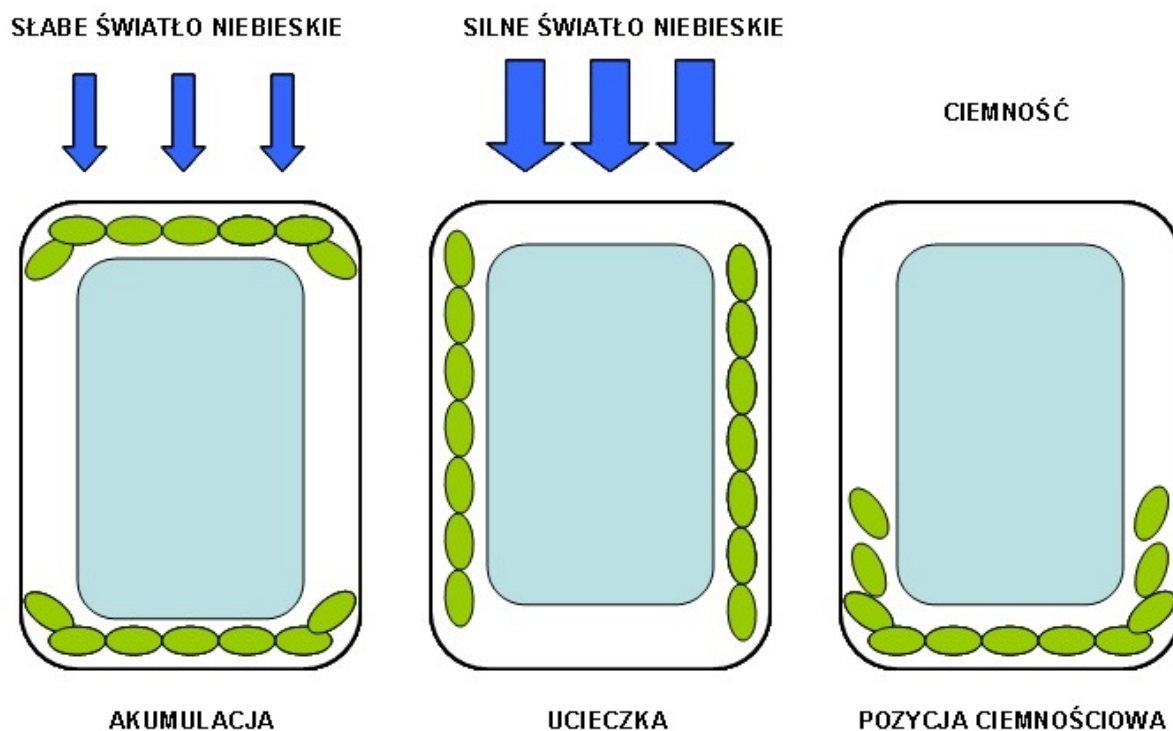
Otwieranie aparatów szparkowych jest reakcją kontrolowaną przez fototropiny. Aktywacja fototropin powoduje fosforylację pomp protonowych i wiązanie białek 14-3-3, które regulują szlaki sygnałowe w komórkach organizmów eukariotycznych (Ferl, 2004). Kluczowym

elementem mechanizmu tej reakcji jest wydzielanie protonów przez  $H^+$ -ATPazy zlokalizowane w błonie komórkowej komórek szparkowych, w odpowiedzi na światło. Jednocześnie następuje transport  $K^+$ , przez kanały jonowe, do wnętrza komórek szparkowych. Fototropiny ulegają autofosforylacji i wiążą się z białkami 14-3-3. Podwójny mutant *Atphot1phot2* niezdolny do wydzielania protonów w odpowiedzi na światło, wykazuje zaburzoną reakcję otwierania aparatów szparkowych (Dietrich et al., 2001; Kinoshita et al., 2001). Można spekulować, że wiązanie białek 14-3-3 ułatwia bezpośrednią interakcję pomiędzy fototropinami i  $H^+$ -ATPazami zlokalizowanymi w błonie komórkowej aparatów szparkowych (Kinoshita i Shimazaki, 2001).

### 1.3.2. Ruchy chloroplastów.

Ruch chloroplastów jest mechanizmem powszechnie występującym u roślin pozwalającym na szybkie reagowanie na zmieniające się warunki oświetlenia w środowisku (Banaś et al., 2012). Mechanizm ten występuje zarówno w zielonych glonach jak i w roślinach lądowych (Zurzycki, 1955, Haupt, 1959, Trojan i Gabryś, 1996; Wada, 2007). Fototropiny kontrolują przemieszczanie się chloroplastów w odpowiedzi na różne natężenia światła niebieskiego (Jarillo et al., 2011; Wada et al., 2003). Za rozmieszczenie chloroplastów w ciemności odpowiada phot2 i jest to odpowiedź zależna od warunków świetlnych podczas wzrostu i rozwoju rośliny (Suetsugu et al., 2005a; Trojan i Gabryś, 1996). W niskich natężeniach światła phot1 i phot2 indukują akumulację chloroplastów, które przemieszczają się pod ściany komórki leżące prostopadle do kierunku padania światła, aby zaabsorbować jak najwięcej światła potrzebnego do fotosyntezy (Rys. 1.3.2.1.) (Zurzycki, 1955). Phot2 wymaga wyższych dawek światła do aktywacji reakcji akumulacji chloroplastów ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) w porównaniu z phot1 ( $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Kagawa i Wada, 2000). W wysokich natężeniach światła niebieskiego aktywowana jest reakcja ucieczki chloroplastów (od  $16 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), czyli przemieszczenie chloroplastów w kierunku ścian komórki leżących równoległe do kierunku padania światła (Rys. 4.). Celem tej reakcji jest zapobieganie uszkodzeniom aparatu fotosyntetycznego i jest to reakcja kontrolowana przez fototropinę2 (Jarillo et al., 2001; Kagawa et al., 2001; Kasahara et al., 2002b; Sztatelman et al., 2010). Pokazuje to zdolność fototropiny2 do kontrolowania dwóch przeciwstawnych reakcji w zależności od natężenia światła, co czyni z niej unikatowy model badawczy. Reakcja ucieczki chloroplastów wywołana silnym światłem jest znacznie szybsza niż reakcja akumulacji w słabym świetle (Izutani et al., 1990; Sakai i Takagi, 2005). Należy zaznaczyć, że w mutancie *Atphot2*

zaobserwowano reakcję szczątkowej ucieczki chloroplastów, która jest zależna od phot1 (Luesse et al., 2010).



**Rys. 4.** Ułożenie chloroplastów w komórce miękiszu palisadowego w zależności od warunków świetlnych - widok z boku komórki. Centralne miejsce w komórce zajmuje wakuola (Wada, 2013 - zmodyfikowane).

Kryptochromy nie wpływają na ruch chloroplastów, natomiast receptory światła czerwonego - fitochromy jedynie modulują ich odpowiedzi (Ohgishi et al., 2004; DeBlasio et al., 2003). Analiza fotometryczna ruchów chloroplastów w mutantach fitochromowych *Arabidopsis* wykazała, że fitochromy: phyA, phyB i phyD nie są niezbędne do wystąpienia reakcji ruchowych chloroplastów pod wpływem światła niebieskiego. W mutantach pozbawionych funkcjonalnych genów *PHYA* i *PHYB* reakcja ucieczki chloroplastów była mocniejsza w porównaniu do typu dzikiego (DeBlasio et al., 2003). Wykazano, że fitochrom B odpowiada za hamowanie reakcji ucieczki pod wpływem silnego światła niebieskiego (Luesse et al., 2010). U *Arabidopsis* światło czerwone nie wywołuje reakcji ruchowych chloroplastów; badacze sugerowali natomiast, że równoczesne naświetlanie rośliny światłem niebieskim i czerwonym jest potrzebne do pełnej indukcji odpowiedzi chloroplastów (Kagawa i Wada, 2000). Wskazuje to na współdziałanie różnych klas fotoreceptorów (DeBlasio et al., 2003). Za ruchy chloroplastów odpowiada głównie cytoszkielet aktynowy. Eksperymenty przeprowadzone z zastosowaniem inhibitorów polimeryzacji aktyny - cytochalazyny D lub latrunkuliny B (LAT-B), wykazały, że związki te blokują ruchy chloroplastów. Z kolei

zastosowanie oryzaliny - inhibitora mikrotubul, nie wpływa na ruch chloroplastów (Kandasamy i Meagher, 1999; Augustynowicz et al., 2001; Krzeszowiec et al., 2007). Badania z użyciem przeciwciał specyficznych dla aktyny ujawniły dwa układy mikrofilamentów aktynowych w komórkach liści: podłużne, grube wiązki aktyny oraz związane z nimi, losowo zorientowane cienkie filamenty aktynowe (Kandasamy i Meagher, 1999). Chloroplasty są blisko związane z cienkimi włóknami, które tworzą wokół nich tzw. koszyki. Bardzo podobne obrazy cytoszkieletu aktynowego zarejestrowano w komórkach mezofilu *Nicotiana tabacum* transformowanych konstruktem plastyna-GFP (Anielska-Mazur et al., 2009). Użycie LAT-B zmieniło opisany powyżej wzór filamentów aktynowych i ich powiązanie z chloroplastami. Spowodowało również zahamowanie ruchów chloroplastów w mezofilu. Podwójne znakowanie komórek potraktowanych LAT-B przeciwciałami anty-aktynowymi i anty-tubulinowymi nie wykazało zmian w ułożeniu mikrotubul w badanych komórkach. Zastosowanie przeciwciał anty-tubulinowych ujawniło poprzeczne układy mikrotubul, które nie wykazywały wyraźnego związku z chloroplastami (Kandasamy i Meagher, 1999). Kluczowy zaś okazał się udział aktyny w pozycjonowaniu i w ruchu chloroplastów w komórkach liści. W doświadczeniach zwrócono uwagę na sposoby przemieszczania się chloroplastów, które ciągnięte są wzdłuż grubych wiązek przez cienkie włókna aktyny lub bezpośrednio wzdłuż grubych wiązek aktyny. Według autorów mikrofilamenty tworzące koszyki kotwiczą chloroplasty i umożliwiają w ten sposób kontrolę nad ich prawidłową trójwymiarową orientacją w stosunku do światła (Kandasamy i Meagher, 1999).

Istnieją dwie koncepcje dotyczące generowania siły motorycznej prowadzącej do ruchu chloroplastów. Pierwsza hipoteza odnosi się do krótkich filamentów aktynowych zlokalizowanych wzdłuż otoczki chloroplastu po stronie cytoplazmatycznej (Kadota et al., 2009). Filamenty te nazwano cp-aktyną od "chloroplastowa-aktyna". Włókna te związane są z otoczką chloroplastu i posiadają zdolność szybkiej rearanżacji. Działają w sposób zależny od białka CHUP1 (CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING 1), które znajduje się na powierzchni chloroplastów (Oikawa et al., 2003). W mutancie *Arabidopsis* nie posiadającym funkcjonalnego genu *CHUP1*, nie stwierdzono obecności filamentów cp-aktyny. Chloroplasty w tym mutancie przyjmują nietypowe położenie w komórce, są zagregowane i nie wykazują ruchów (Kadota et al., 2009). Różnice te sugerują, że CHUP1 pełni istotną funkcję w pozycjonowaniu i ruchu chloroplastów (Oikawa et al., 2003). Gen *CHUP1* koduje białko, którego domeny wiążą F-aktynę i G-aktynę oraz profilinę, która bierze udział w polimeryzacji aktyny (Schmidt von Braun i Schleiff, 2008). W ciemności filamenty cp-aktyny są równomiernie rozłokowane wokół chloroplastów. Słabe światło wywołuje reakcję akumulacji



chloroplastów, które przemieszczają się w kierunku naświetlanego obszaru i gromadzą się w nim. Filamenty cp-aktyny ulegają szybkiej rearanżacji, przyjmują ułożenie "spolaryzowane" i lokalizują się w przedniej części chloroplastów w kierunku naświetlanego obszaru. Kierunkowe sygnały powodują reorganizację filamentów poza strefą naświetlaną. Różnice w ilości włókien cp-aktyny są zależne od natężenia światła. Badania pojedynczych mutantów fototropinowych wykazały, że oba fotoreceptory wytwarzają sygnał kierunkowy dla reorganizacji cp-aktyny w reakcji akumulacji chloroplastów. W odpowiedzi na silne światło w dzikim typie wykazano przejściowy zanik cp-aktyny w przedniej części naświetlanych chloroplastów, które ulegały szybkim przemieszczeniom. Zanik cp-aktyny trwał do czasu rozpoczęcia reakcji ucieczki chloroplastów (Kadota et al., 2009).

Druga z hipotez zakłada zaangażowanie miozyny w ruch chloroplastów (Krzyszowicz i Gabryś, 2007). U *Arabidopsis* występują dwie klasy miozyn: VIII i XI. Miozyna VIII bierze udział we wzroście komórki, endocytozie i cytokinezie. Miozyna XI odpowiada za transport auksyn i ruch organelli wewnątrzkomórkowych (Holweg et al., 2004). Obie klasy miozyn występują na powierzchni chloroplastów, co zostało pokazane przy użyciu przeciwciał. Prawdopodobnie obie miozyny współpracują z układem aktynowym (Wang i Pesacreta, 2004; Wojtaszek et al., 2005). Zaangażowanie miozyn w ruchy chloroplastów potwierdzono w roślinach wodnych *Vallisneria* i *Lemna trisulca* wykorzystując inhibitor miozyn N-etylomaleimid. Po zastosowaniu inhibitora ruch chloroplastów został zahamowany (Malec et al., 1996). Badania na liściach *Arabidopsis*, wyznakowanych przeciwciałami antymiozynowymi, wykazały różnice w dystrybucji miozyn na powierzchni chloroplastów pod wpływem silnego światła niebieskiego powiązane z reakcją ucieczki chloroplastów. Różnice występowały w rozmieszczeniu miozyn pod wpływem słabego światła niebieskiego, z kolei nie zaobserwowano różnic w ich rozmieszczeniu pod wpływem światła czerwonego, a także w mutancie *Atphot2* (Krzyszowicz i Gabryś 2007).

Badania z wykorzystaniem mutantów *Arabidopsis* wykazujących zaburzenie ucieczki chloroplastów doprowadziły do odkrycia wielu białek biorących udział w reakcjach ruchowych chloroplastów. Część z nich oddziałuje z aktyną.

Białko PMI1 (PLASTID MOVEMENT IMPAIRED 1) stabilizuje filamenty cp-aktyny (Suetsugu et al., 2015). Obie reakcje chloroplastów w mutancie *Atpmi1* są zaburzone (DeBlasio et al., 2005). U mutantów pozostałych białek z tej rodziny (*Atpmi2*, *Atpmi15*) jedynie reakcja ucieczki jest osłabiona (Luesse et al., 2006; Christie, 2007).

Analiza siewek *Arabidopsis* traktowanych mutagenem pozwoliła zidentyfikować mutant o zmienionym wzorze akumulacji chloroplastów - JAC1 (J-DOMAIN PROTEIN REQUIRED FOR CHLOROPLAST ACCUMULATION RESPONSE1) (Suetsugu et al., 2005a). Jest to

białko występujące w cytoplazmie, którego biochemiczna funkcja nie została do końca wyjaśniona. Mutant nie wykazuje reakcji akumulacji, natomiast reakcja ucieczki chloroplastów nie odbiega od dzikiego typu (Suetsugu et al., 2005).

Na ruch chloroplastów wpływają również białka: KAC (KINESIN-LIKE PROTEIN FOR ACTIN-BASED CHLOROPLAST MOVEMENT) (Suetsugu et al., 2010), THR1 (THRUMIN 1) (Whippo et al., 2011) oraz WEB1 (WEAK CHLOROPLAST MOVEMENT UNDER BLUE LIGHT 1) (Kodama et al., 2010). Białko WEB1 wchodzi w interakcję z białkiem PMI2 (Kodama et al., 2010; Luesse et al., 2006). Są to białka cytoplazmatyczne, regulujące szybkość ruchów chloroplastów. Mutanty pojedyncze tych białek wykazują zaburzenie szybkości reakcji chloroplastów oraz osłabioną reakcję ucieczki. Zaproponowano, że oddziaływanie pomiędzy WEB1 i PMI2, wpływa hamująco na białko JAC1, co z kolei promuje reakcję ucieczki chloroplastów (Kodama et al., 2010).

Zgodnie z koncepcją ruchu chloroplastów z udziałem cp-aktyny wymienione białka biorą udział w ruchu poprzez oddziaływanie z filamentami aktynowymi. Białka CHUP1 i KAC są kluczowe dla tworzenia filamentów cp-aktyny (Kadota et al., 2009; Suetsugu et al., 2010; Kong et al., 2013). Mutant *Atkac1* wykazuje zahamowanie reakcji akumulacji i spowolnienie reakcji ucieczki, natomiast *Atkac2* nie wykazuje różnic w ruchach chloroplastów w porównaniu do dzikiego typu (Oikawa et al., 2003; Suetsugu et al., 2010). Także białko THR1 wydaje się być niezbędne do tworzenia filamentów cp-aktyny oraz przemieszczeń chloroplastów (Kong et al., 2013). Z kolei JAC1, WEB1, oraz PMI2 nie są kluczowe dla tworzenia filamentów, ale zaangażowane są w reorganizację cytoszkieletu cp-aktynowego pod wpływem światła niebieskiego (Kodama et al., 2010; Ichikawa et al., 2011).

Wymienione białka wpływają zatem bezpośrednio na ruch chloroplastów (CHUP1, KAC, THRUM1, PMI1) lub na transdukcję sygnału świetlnego (JAC1, WEB1 i PMI2). W mutantach białek wpływających na ruch filamenty cp-aktyny są wyraźnie zredukowane lub w ogóle ich nie wykryto. Z kolei w mutantach białek wpływających na transdukcję sygnału ilość filamentów aktynowych pozostaje bez zmian, natomiast częściowo zaburzony jest ruch chloroplastów. Zaobserwowano brak reakcji akumulacji w mutancie *Atjac1* lub osłabioną reakcję ucieczki (*Atweb1*, *Atpmi2*) (Suetsugu i Wada 2016).

### 1.3.3. Fototropizm.

Fototropizm jest ruchem wzrostowym roślin w kierunku światła niebieskiego (fototropizm pozytywny) lub w kierunku przeciwnym (negatywny) (Morrow et al., 2018). Fototropizm jest indukowany przez światło niebieskie i UV-A. Siewki wykazują fototropizm dodatni, a

korzenie wykazują fototropizm ujemny. Mutant *Atpot1* wykazuje osłabioną reakcję na jednostronne naświetlanie światłem niebieskim o niskim natężeniu. Obie fototropiny regulują fototropizm hipokotyła przy naświetlaniach jednostronnym światłem niebieskim o wysokim natężeniu (Liscum i Briggs, 1995; Sakai et al., 2001; Sakai et al., 2000). W przypadku fototropizmu u *Arabidopsis* wykazano, że kluczowa jest fotoreaktywność domeny LOV2 fototropiny1. Fotoreaktywność LOV1 jest niewystarczająca do zainicjowania wygięcia fototropicznego siewki (Kagawa et al., 2004).

Auksyna, hormon roślinny, bierze udział w reakcji fototropizmu u roślin (Blakeslee et al., 2004; Noh et al., 2004). Wygięcie fototropiczne siewki następuje poprzez akumulację auksyn w zacienionym fragmencie i wzrost elongacyjny w tym miejscu (Iino, 2001). Analizy genetyczne wskazują, że czynniki transkrypcyjne zależne od auksyny jak NPH4 (NON PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4) i MSG2 (MASSUGU2) są niezbędne do utrzymania prawidłowego fototropizmu. NPH4 zwiększa ekspresję genów *EXPA1* i *EXPA8* (EXPANSIN ALPHA 1 i 8), odpowiadających za zależną od fototropin elongację hipokotyła w *Brassica oleracea*. Są to geny z rodziny  $\alpha$ -expansyn, które są zaangażowane w rozbudowę ściany komórkowej. Transport auksyn jest niezbędny w odpowiedzi fototropicznej. Mutanty transporterów auksyn *Atpin1* i *Atpin3* (PIN-FORMED1 i 3) wykazywały zmieniony fototropizm siewek (Noh et al., 2003). Analiza ekspresji phot1-GFP w *Arabidopsis* wykazała, że phot1 jest związany z błoną komórkową głównie przy wierzchołkowych i podstawnych ścianach komórek korowych od zacienionej strony naświetlanego hipokotyłu. Białka PIN, powiązane z transportem auksyn, są zlokalizowane przy ścianach bocznych. Aktywacja phot1 może powodować zmiany w lokalizacji PIN1 w komórkach hipokotyła. Przypuszczalnie phot1 może brać udział w dystrybucji auksyn w komórce pod wpływem światła (Sakamoto i Briggs, 2002). Jak dotąd jedynymi fizjologicznymi substratami kinazy fototropinowej są transporter wypływu auksyn ABCB19 (ATP-BINDING CASSETTE B 19) oraz PKS4 (PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 4) (Christie et al., 2011; Demarsy et al., 2012). Ekspresja w układzie heterologicznym i analizy fizjologiczne wskazują, że fosforylacja ABCB19 przez phot1 hamuje aktywność transportera, zwiększając poziom auksyn w wierzchołku hipokotyła, co powstrzymuje wzrost pionowy. Auksyny stopniowo są transportowane przez białko PIN3 w strefę wzrostu elongacyjnego. Stanowi to potwierdzenie wpływu ABCB19 i PIN3 na kąt wygięcia fototropicznego siewek (Christie et al., 2011).

Zaobserwowano korelację pomiędzy fototropizmem w odpowiedzi na światło niebieskie a wzrostem poziomą fosforylacji w górnych częściach koleoptyli kukurydzy *Zea mays* (Palmer et al., 1993). Wykazano asymetryczną fosforylację białek pomiędzy stroną naświetlaną a zacienioną w koleoptylach owsa *Avena sativa*. Fosforylacja była trzykrotnie wyższa w

naświetlanych obszarach siewek, co pokazano za pomocą testów *in vitro* z detekcją metodą izotopową (Salomon et al., 1997). Białko NPH3 (NON PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3) oddziałuje z phot1 i odpowiada za boczne rozmieszczenie phot1 w hipokotylach. Białkiem homologicznym do NPH3 i oddziałującym z phot1 jest RPT2 (ROOT PHOTOTROPISM 2). RPT2 jest niezbędne przy odpowiedziach fototropinowych w świetle niebieskim – fototropizmie, otwieraniu aparatów szparkowych (Sakai et al., 2000, Christie, 2007), pozycjonowaniu liści i liścieni, a także w rozwoju blaszki liściowej (Harada et al., 2013). Światło niebieskie nie zmienia oddziaływania phot1 z RPT2, natomiast wpływa na fosforylację NPH3 (Inada et al., 2004; Christie, 2007). Wykazano, że NPH3 ulega fosforylacji w ciemności i jest defosforylowany w świetle niebieskim (Motchoulski et al., 1999). Innym białkiem zaangażowanym w kontrolę fototropizmu u *Arabidopsis* jest PKS (PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE) (Lariguet et al., 2006). PKS1 oddziałuje zarówno z fototropiną1, jak i z NPH3 (Lariguet et al., 2006). Białka PKS mogą także być elementami łącznikowymi pomiędzy fototropinami a fitochromami (Iino, 2006). W przypadku phot1 fosforylacja Ser851 wydaje się niezbędna dla reakcji fototropicznej (Inoue et al., 2008). Utrata miejsca fosforylacji w jednej lub obu konserwatywnych serynach w phot2: Ser761 i Ser763, nie prowadzi do zaniku reakcji fototropizmu. Wskazuje to na istnienie dodatkowego miejsca (miejsc) fosforylacji w obrębie cząsteczki phot2 (Inoue et al., 2011).

Należy również wspomnieć, że pod wpływem światła niebieskiego tworzone są nowe mikrotubule w komórkach hipokotyła (Lindeboom et al., 2013). Katanina1 jest białkiem niezbędnym do wydłużania mikrotubul. Dowiedziono, że mutanty nie posiadające tego białka wykazują osłabioną reakcję fototropizmu (Lindeboom et al., 2013).

Dowiedziono, że wcześniejsze traktowanie etiolowanych siewek światłem czerwonym może znacznie wpłynąć na wrażliwość fototropin i ich reakcję na światło niebieskie. Zmniejszenie wrażliwości fototropicznej na lateralne naświetlanie światłem niebieskim oraz zmniejszenie kątów wygięcia fototropicznego po traktowaniu światłem czerwonym, po raz pierwszy opisał u owsa Curry. Efekt ten został później potwierdzony u kukurydzy (cyt. za Han et al., 2008). Dodatek dalekiej czerwieni o niskim natężeniu może przywrócić wrażliwość fototropiczną. Z kolei wyższe natężenia światła z zakresu dalekiej czerwieni mogą wywoływać podobny efekt do światła czerwonego (cyt. za Han et al., 2008).

#### 1.4. Sumoilacja.

Sumoilacja jest dynamicznym procesem polegającym na odwracalnym, kowalencyjnym przyłączeniu białka SUMO (SMALL UBIQUITIN RELATED MODIFIER) do modyfikowanego białka. SUMO jest małym białkiem o masie około 12 kDa. Jest ono klasyfikowane jako białko z rodziny UBL (UBIQUITIN LIKE PROTEIN). Struktura trzeciorzędowa SUMO przypomina strukturę ubikwityny, mimo że jego sekwencja wykazuje mniej niż 20% homologii (Geiss-Friedlander i Melchior, 2007). Inaczej niż w przypadku ubikwityny, przyłączenie SUMO nie powoduje degradacji modyfikowanego białka, może natomiast wpływać na jego aktywność, poprzez szybkie zmiany jego właściwości biochemicznych (Beauclair et al., 2015). Sumoilacja może blokować lub aktywować enzymy i czynniki transkrypcyjne, zmieniać lokalizację oraz umożliwiać tworzenie nowych interakcji pomiędzy białkami (Kerscher, 2007). Może także osłaniać białka przed skierowaniem ich do degradacji. Jednym ze skutków warunków stresowych jest tworzenie koniugatów białek z białkami SUMO. Badania prowadzone na drożdżach i na ssakach wykazały, że odwracalna sumoilacja białek reguluje szeroki zakres procesów komórkowych (Song et al., 2004; Kerscher, 2007). SUMO modyfikują białka biorące udział w procesach zachodzących w jądrze komórkowym, takich jak regulacja transkrypcji, zmiana struktury chromatyny, biogeneza mRNA, transdukcja sygnału oraz naprawa DNA (Gareau i Lima, 2010; Mazur i van den Burg, 2012; Cubeñas-Potts i Matunis, 2013; Flotho i Melchior, 2013).

Białka docelowe mogą ulegać monosumoilacji, polisumoilacji lub multisumoilacji. Monosumoilacja to dołączenie pojedynczego białka SUMO do białka modyfikowanego, polisumoilacja to przyłączenie łańcucha kilku SUMO do białka, multisumoilacja to przyłączenie pojedynczych białek SUMO w kilku miejscach modyfikowanego białka (Hickey et al., 2012; Hendriks i Vertegaal, 2016).

W roślinach, podobnie jak w komórkach drożdżowych i ssaczych, istnieje ścieżka SUMOilacji i de-SUMOilacji białek (Hannich et al., 2005; Park et al., 2011). Większość prowadzonych obecnie badań dotyczy SUMO1, SUMO2, SUMO3 i SUMO5, ponieważ dla tych form zidentyfikowano EST (*EXPRESSED SEQUENCE TAGS*) (Kurepa et al. 2003). Wykazano, że w genomie *Arabidopsis thaliana* kodowanych jest osiem genów SUMO oraz jeden pseudogen, natomiast ekspresji ulegają izoformy *SUM1*, *SUM2*, *SUM3* i *SUM5* (Novatchkova et al., 2004; van den Burg et al., 2010). Uważa się, że geny *SUM4*, *SUM6*, *SUM7* i *SUM8* potencjalnie mogą ulegać ekspresji, jednak ich EST nie zostały dotychczas zidentyfikowane (Novatchkova et al., 2004). Korzystając ze strony TAIR

([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) oraz dostępnego na tej stronie narzędzia BAR eFP Browser (Klepikova et al., 2016) można uzyskać następujące informacje:

- *SUM1* ulega bardzo wysokiej ekspresji w nasionach, średniej w młodych i dojrzałych liściach, w sekwencji białka występuje motyw dwóch glicyn - GG;
- *SUM2* ulega bardzo wysokiej ekspresji w nasionach, dużej w młodych i dojrzałych liściach; wysoka ekspresja utrzymuje się podczas całego cyklu życiowego rośliny, posiada motyw GG w sekwencji białka;
- *SUM3* wysoka ekspresja w korzeniu 1-dniowej siewki, niewielka w liściach, ogólnie ulega bardzo niskiej ekspresji; motyw GG występuje w sekwencji białka;
- *SUM4* teoretycznie ulega ekspresji, duża ekspresja jedynie w pędzie kwiatowym, nie znaleziono EST (Novatchkova et al., 2004), w sekwencji białka brak motywu GG - występuje SG;
- *SUM5* wysoka ekspresja jedynie w kwiecie, poza tym ulega bardzo niskiej ekspresji, w liściach praktycznie nieobecny; występuje motyw GG w sekwencji białka;

Prawdopodobnie najważniejsze fizjologicznie są izoformy SUMO1 i SUMO2, gdyż podwójne mutanty *Atsum1sum2* są letalne (Saracco et al. 2007). Obie izoformy SUMO odpowiadają także za reakcję roślin na stres. Nadekspresja SUMO1 albo SUMO2 jest skorelowana z osłabieniem hamowania wzrostu przez ABA (kwas abscysynowy) (Lois et al., 2003; Saracco et al., 2007). SUMO3 odpowiada za mechanizmy obronne roślin (van den Burg et al., 2010). Poziom ekspresji SUMO3 jest natomiast niższy niż poziom ekspresji SUMO1 i SUMO2. Isoformy SUMO1 i SUMO2 mogą tworzyć łańcuchy - są zdolne do polisumoilacji, z kolei SUMO3 nie posiada takiej właściwości (Chosed et al., 2006, Colby et al., 2006). Dla izoformy SUMO4 nie poznano dotąd miejsca koniugacji, nie ma także żadnych dowodów eksperymentalnych, że modyfikacja przez SUMO4 zachodzi.

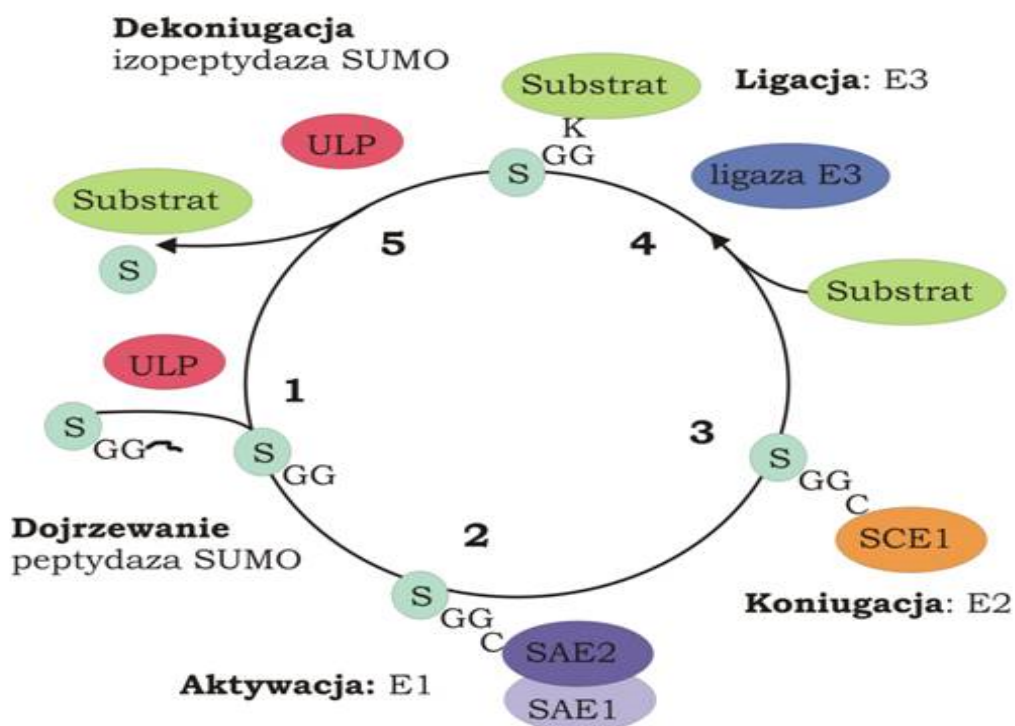
Specyficzność sumoilacji jest determinowana przez dużą liczbę proteaz SUMO, ULP (UBIQUITIN-LIKE PROTEIN-SPECIFIC PROTEASE). Proteazy SUMO, które należą do rodziny C48 proteaz cysteinowych, zostały sklasyfikowane jako specyficzne proteazy ubikwitynopodobne lub specyficzne proteazy Sentrin/SUMO (ULP/SEN) (van der Hoorn, 2008). Proteazy ULP podzielono na dwie grupy, ULP1 i ULP2, na podstawie ich homologii do proteaz drożdżowych ScULP1 i ScULP2. Proteazy cysteinowe ULP/SEN są opisywane jako heterogenna rodzina, która przyczynia się do złożoności maszynerii SUMO (Hickey et al., 2012). Proteazy działają jako modulatory sumoilacji poprzez dojrzewanie białek SUMO, usuwanie białek SUMO ze zmodyfikowanych białek docelowych oraz modyfikowanie łańcuchów SUMO (Castro et al., 2018). Wiedza na temat funkcji proteaz SUMO oraz ich

znaczenia dla fizjologii roślin jest niewielka, co więcej, wiele proteaz nie zostało jeszcze scharakteryzowanych. W genomie *Arabidopsis* kodowane jest osiem proteaz ULP, z czego 6 funkcjonuje jako proteazy SUMO *in vitro* (Chosed et al., 2006; Colby et al., 2006; Conti et al., 2008; Novatchkova et al., 2012; Kong et al., 2017; Liu et al., 2017a). W warunkach stresowych wzrasta znacznie ilość koniugatów z SUMO, a maleje ilość białek niezwiązanych z SUMO (Miller et al. 2013, Castro et al., 2018). Po zakończeniu ekspozycji na stres ilość koniugatów z SUMO powoli się zmniejsza w wyniku działania proteaz ULP, które mają fundamentalne znaczenie w regulacji koniugacji SUMO, co prowadzi do utrzymania równowagi w rozwoju roślin (Castro et al., 2018).

Dotychczas u roślin opisano przyłączanie białka SUMO do różnych białek w odpowiedzi na stres temperaturowy, solny, suszy, niedoboru fosforanów i infekcję patogenami (Kurepa et al. 2003). Sumoilacja moduluje szlak sygnałowy kwasu abscysynowego u roślin (Miura et al., 2009). Pośrednio wywiera też wpływ na rozwój, kwitnienie oraz strukturę korzeni, jednak szersze znaczenie tej modyfikacji pozostaje niewyjaśnione. Ponadto sumoilacja jest istotna dla rozwoju zarodkowego, wzrostu organów i regulacji hormonalnej (Elrouby, 2015).

#### 1.4.1. Etapy i przebieg procesu.

Sumoilacja przebiega podobnie do procesu ubikwitynacji i składa się z kilku etapów (Rys. 5.).



**Rys. 5.** Proces sumoilacji: 1 - dojrzwanie przy udziale białek ULP. 2 - aktywacja przy udziale E1. SAE1 i SAE2 są podjednostkami enzymu aktywującego E1. 3 - koniugacja z udziałem E2. SCE1 jest podjednostką E2. 4 - ligacja z udziałem ligaz E3. 5 - dekonjugacja przy udziale ULP (Miura et al. 2007, zmodyfikowane).

"Niedojrzała" forma białka SUMO posiada dodatkowe aminokwasy, które są w pierwszym etapie odcinane z C-końca białka przez proteazy, aby odsłonić znajdujące się tam dwie glicyny, które określają miejsce przyłączenia substratu. Kolejnym etapem jest aktywacja SUMO przy udziale enzymu aktywującego E1. Enzym E1 jest heterodimerem zbudowanym z dwóch podjednostek: SAE1a/b i SAE2 (SUMO ACTIVATING ENZYMES1 A/B i 2). W *Arabidopsis* mniejsza podjednostka SAE1 kodowana jest przez SAE1a i SAE1b. Różnią się one sekwencją aminokwasów, ale obie są w stanie aktywować SUMO. Nie wykazano pomiędzy nimi funkcjonalnych różnic. Większa podjednostka SAE2, która zawiera aktywne miejsce Cys, jest kodowana przez pojedynczy gen w *Arabidopsis* (Budhiraja et al., 2009). Kolejnym etapem modyfikacji jest koniugacja z udziałem enzymu koniugującego E2, posiadającego tylko jedną podjednostkę SCE1 (SUMO CONIUGATING ENZYME 1). Następnie dochodzi do ligacji z udziałem ligaz E3. Do niedawna u *Arabidopsis* znane były dwie ligazy - SIZ1 (SAP AND MIZ 1) oraz MMS21 (METHYL METHANE SULFONATE



SENSITIVITY 21) znana też pod nazwą HPY2 (HIGH PLOIDY 2) (Huang et al. 2009; Ishida et al. 2009). Obydwa enzymy posiadają domenę SP-RING (SIZ-PIAS-RING). W 2014 roku zidentyfikowano dwie nowe ligazy SUMO *Arabidopsis*: PIAL1 i PIAL2 (PROTEIN INHIBITOR OF ACTIVATED STAT LIKE 1 i 2). Białka te również posiadają domenę MIZ1-RING i funkcjonują jako ligazy E3 uczestniczące w formowaniu koniugatów z izoformą SUMO3 (Tomanov et al. 2014). Badania *in vitro* wykazały, że ligazy PIAL1 i PIAL2 odpowiadają za wydłużenie utworzonych łańcuchów SUMO. Jest to funkcja nieznaną w przypadku wcześniej poznanych ligaz, z tego powodu PIAL1 i PIAL2 nazywano ligazami E4 (Tomanov et al. 2014).

Dotychczas najlepiej scharakteryzowaną ligazą jest SIZ1. Jest to białko jądrowe. Zawiera miejsce wiązania SCE1 z domeną palca cynkowego SP-RING (Garcia-Dominguez et al., 2008; Suzuki et al., 2009). Mutanty *Atsiz1* wykazują silny, plejotropowy fenotyp - brak ligazy SIZ1 wpływa na wiele widocznych cech takich jak: karłowatość, przyspieszone kwitnienie (Jin i Hasegawa, 2008), zwiększona wrażliwość na stres (Chinnusamy et al., 2007), akumulacja antocyjanów (Li et al., 2013), przyspieszone starzenie (obserwacja własna). Większość tych zmian związana jest z reakcjami na stres (Miura et al., 2007a; Park et al., 2011). SIZ1 ułatwia sumoilację białek regulatorowych, takich jak czynniki transkrypcyjne ICE1 (INDUCER OF CBP EXPRESSION 1) czy ABI5 (ABA INSENSITIVE 5) (Catala et al., 2007, Miura et al., 2007b, 2009, Jin et al., 2008). Ligaza SIZ1 negatywnie reguluje przekaz sygnału od kwasu abscysynowego (ABA) poprzez czynnik transkrypcyjny ABI5 (Miura et al., 2009). Ekspresja genów regulowanych przez ABA na drodze zależnej od ABI5 ścieżki przekazu sygnału np. *RAB18* (RAB GTPASE HOMOLOG B18), *ADH1* (ALCOHOL DEHYDROGENASE1), była wyższa w mutantach *Atsiz1*. Wskazuje to na epistatyczną interakcję pomiędzy SIZ1 i ABI5. Badania wykazały, że zależna od SIZ1 sumoilacja ABI5 osłabia przekaz sygnału od ABA (Miura et al., 2009). SIZ1 jest także negatywnym regulatorem rozkładu auksyn w korzeniu w odpowiedzi na głód fosforanowy. Rośliny *Atsiz1* wykazywały zahamowanie wzrostu korzenia pierwotnego i rozrost korzeni bocznych w odpowiedzi na ograniczony dostęp fosforanów. Podobny fenotyp uzyskano w dzikim typie głodzonym fosforanami po dostarczeniu auksyny (Miura et al., 2010).

Ligaza SUMO MMS21 z *Arabidopsis* została zidentyfikowana niezależnie przez dwie grupy badawcze i nazwana MMS21 lub HPY2 (Huang et al., 2009, Ishida et al., 2009). MMS21 odgrywa rolę w metabolizmie DNA i regulacji proliferacji komórek w merystemie. Reguluje endoreduplikację i wpływa na rozwój korzeni. Homologi tego białka występują również u grzybów i zwierząt. U większości roślin MMS21 jest kodowana przez jeden gen (Novatchkova et al., 2012). Mutanty *Atmms21* wykazują podwyższoną tolerancję na stres

suszy. Stwierdzono również, że MMS21 może wpływać na ekspresję genów w ścieżce przekazu sygnału od kwasu abscysynowego (Zhang et al., 2013).

Dwa kolejne białka *Arabidopsis* PIAL1 i PIAL2 funkcjonujące jako ligazy sumoilacji, posiadają domenę MIZ-RING, która jest charakterystyczna dla ligaz SUMO (Novatchkova et al., 2004). Ekspresja *PIAL1* jest indukowana przez stres (Novatchkova et al., 2012).

Większość sumoilowanych białek zwierzęcych zawiera tetrapeptyd  $\Psi$ KXE/D (gdzie  $\Psi$  to reszta hydrofobowa, K - lizyna, X - dowolna reszta, E/D - reszta kwasu glutaminowego lub asparaginowego), w obrębie którego występuje wysokie prawdopodobieństwo sumoilacji substratu. Motyw  $\Psi$ KXE/D wykorzystuje się stosując analizy bioinformatyczne do poszukiwania potencjalnych miejsc sumoilacji białek również w komórkach roślinnych. Opisano jego rozszerzone warianty: motyw sumoilacji zależny od ujemnie naładowanych aminokwasów NDSM (NEGATIVELY CHARGED AMINO ACID-DEPENDENT SUMOYLATION) (Yang et al., 2006) oraz motyw sumoilacji zależnej od fosforylacji - PDSM (PHOSPHORYLATION-DEPENDENT SUMOYLATION), który znaleziono w sumoilowanym substracie zwierzęcym w obrębie domeny  $\Psi$ KXE/D. W obrębie domeny PDSM występuje motyw  $\Psi$ KXE/DxxSP, czyli sekwencja  $\Psi$ KXE/D z sumoilowaną lizyną, a także poprzedzona dwoma dowolnymi aminokwasami seryna, która jest potencjalnym miejscem fosforylacji, po której występuje prolina (Hietakangas et al. 2006). Wykazano również sumoilację odwróconego motywu konsensusowego ([E/D]XKW) zawierającego glutaminian, asparaginian, dowolny aminokwas, lizynę oraz tryptofan (Ivanov et al., 2007, Matic et al., 2010). Należy zauważyć, że nie każda sekwencja zawierająca motyw konsensusowy ulega modyfikacji przez białka SUMO. Na prawdopodobieństwo zajścia sumoilacji mogą mieć wpływ również zmiany konformacyjne aminokwasów sąsiadujących z lizyną, która jest celem SUMO (Pichler et al., 2005). Tetrapeptyd  $\Psi$ KXE/D posłużył do znalezienia potencjalnych miejsc sumoilacji czynnika transkrypcyjnego regulującego odpowiedzi na brassinosteroidy CES (CESTA) z *Arabidopsis*. Znaleziona domena (71-NKEE-74) wykazuje wiele analogii do tetrapeptydu  $\Psi$ KXE/D i umiejscowiona jest w pobliżu prawdopodobnych miejsc fosforylacji – seryny75 i seryny77. Dowiedziono, że fosforylacja CES przeciwdziała jego sumoilacji. Oba procesy wpływają tym samym na regulowany przez brassinosteroidy przekaz sygnału (Khan et al., 2015). Modyfikacja przez SUMO następuje również w sekwencjach białka, które nie posiadają motywu  $\Psi$ KXE/D. Dotyczy to wielu sumoilowanych białek, zidentyfikowanych przez grupę Vertegaal (Hendriks et al., 2014).

W części enzymów biorących udział w procesie sumoilacji oraz białkach docelowych zidentyfikowano krótki motyw oddziaływania SIM (SUMO INTERACTION MOTIF). Poprzez sekwencję SIM i SUMO może oddziaływać w sposób niekowalencyjny z białkami.

Sekwencja ta jest krótka i charakteryzuje się dużą zmiennością (Novatchkova et al., 2012). Większość motywów interakcji SIM ma luźną sekwencję konsensusową złożoną z trzech do czterech reszt alifatycznych często flankowanych kwasowymi i/lub fosforylowanymi aminokwasami (Kerscher, 2007). Charakteryzują się one występowaniem motywu WWxWDSE lub DSEWxWW, gdzie W oznacza hydrofobowe aminokwasy I, L, V, M lub F (izoleucyna, leucyna, walina, metionina lub fenyloalanina), x może oznaczać dowolny aminokwas, a D, S i E oznaczają asparaginian, serynę i glutaminian (Miteva et al., 2010). Sąsiadujące negatywnie naładowane reszty prawdopodobnie kontrolują powinowactwo, polaryzację i specyficzność interakcji SIM i SUMO (Chang et al., 2011).

Mapowanie miejsc koniugacji z białkami SUMO oraz miejsc interakcji SIM jest kluczowe do scharakteryzowania biologicznego znaczenia procesu sumoilacji. Badania proteomiczne wykorzystujące spektrometrię mas (MS) pozwoliły na identyfikację wielu białek z miejscami sumoilacji oraz z miejscami interakcji SIM (Blomster et al., 2009, Hendriks et al., 2014, Matic et al., 2010; Beauclair et al., 2015). Stosowanie tej metody jest ograniczone ze względu na dynamiczny charakter tej modyfikacji, niewielką frakcję danego białka, które ulega sumoilacji oraz trudności w identyfikacji rozgałęzionych peptydów. W sytuacji, gdy uzyskanie danych ze spektrometrii mas jest niemożliwe, użyteczne stają się programy komputerowe opracowane w celu analizowania struktury danego białka i przewidywania na ich podstawie miejsc sumoilacji oraz miejsc interakcji SIM. Programy komputerowe nie zastąpią jednak danych otrzymanych eksperymentalnie. Analiza bioinformatyczna pozwala na zawężenie liczby potencjalnych celów do następnej analizy eksperymentalnej, co czyni ją użytecznym narzędziem w nauce (Beauclair et al., 2015).

#### 1.4.2. Białka modyfikowane przez SUMO oraz wpływ sumoilacji na ścieżkę przekazu sygnału świetlnego w roślinach wyższych.

Fotomorfogeneza to indukowane światłem zmiany w rozwoju roślin. W fotomorfogenezie główną rolę odgrywają fotoreceptory roślinne, które uruchamiają kaskadę przekazu sygnału prowadzącą do zmian rozwojowych. Rozwój fotomorfogenetyczny umożliwia młodym siewkom uzyskanie aktywności fotosyntetycznych. Wiele genów nie ulega ekspresji w siewkach w ciemności, ale szybko ulegają one ekspresji gdy siewki po raz pierwszy dostają sygnał świetlny (Jang et al., 2019). COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1) jest ligazą ubikwityny E3 i głównym negatywnym regulatorem fotomorfogenezy. Sumoilacja zwiększa aktywność COP1 i jest zaangażowana w ścieżkę przekazu sygnału świetlnego poprzez modulację jego aktywności (Lin et al., 2016). COP1 jest zaangażowany w przekaz

sygnału świetlnego poprzez interakcję z fitochromami i kryptochromami. Mutanty *Atsiz1* wykazują słaby konstytutywny fenotyp fotomorfogenetyczny. SIZ1 oddziałuje z COP1 i pośredniczy w jego sumoilacji, a COP1 pośredniczy w ubikwitynacji i degradacji SIZ1. Aktywność COP1 jest zmniejszona w *Atsiz1*, a poziom HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5), czynnika transkrypcyjnego będącego celem ligazy COP1 wzrasta. Sumoilowana ligaza COP1 wykazuje wyższą aktywność ligacji ubikwityny do białek docelowych niż białko nie modyfikowane przez SUMO. Przedłużona ekspozycja na światło zmniejsza poziom sumoilacji COP1 (Lin et al., 2016). Wykazano, że w wyniku interakcji z COP1, fototropina2 przyjmuje lokalizację jądrową w odpowiedzi na infekcję wirusową (Jeong et al., 2010).

Jak dotąd sumoilacja fotoreceptorów roślinnych jest bardzo słabo poznana. Wykazano, że fitochrom B *Arabidopsis* jest w sposób odwracalny sumoilowany na świetle poprzez przyłączenie SUMO1. Ilość sumoilowanej frakcji phyB wzrasta przy naświetlaniu światłem czerwonym oraz białym. Fitochrom B jest sumoilowany na C-końcu, a sumoilacja białka przy Lys996 jest kluczowa dla tej modyfikacji. Podstawiając argininą krytyczne miejsce Lys996 wykazano, że sumoilowanych frakcji phyB jest mniej. Wzmacniało to wrażliwość na światło czerwone, co sugeruje, że sumoilacja hamuje działanie Phy B (Sadanandom et al. 2015).

Wyniki uzyskane w naszym laboratorium – Zakładzie Biotechnologii Roślin WBBiB UJ świadczą, że również fotoreceptor światła niebieskiego - fototropina2, jest substratem modyfikacji przez białka SUMO. Analizy bioinformatyczne wskazały wiele potencjalnych miejsc sumoilacji, niektóre o wysokim prawdopodobieństwie zajścia modyfikacji. Badania w systemie bakteryjnym dowiodły, że fototropina2 jest modyfikowana SUMO1, SUMO2, SUMO3 w obecności ligazy MMS21. W systemie bakteryjnym PHOT2 nie ulega modyfikacji przez SUMO5. Podbłonowa oraz cytoplazmatyczna lokalizacja oddziaływań PHOT2 z SUMO1 oraz SUMO3 zostały potwierdzone *in planta* metodą komplementacji fluorescencji (BIFC). Na podstawie badań fotometrycznych ruchów chloroplastów w mutantach ligaz sumo, oddziaływaniu SIZ1-PHOT2 przypisano fizjologiczną rolę. W mutancie *Atsiz1* zaobserwowano zwiększoną amplitudę akumulacji chloroplastów w odpowiedziach na krótkie impulsy silnego światła niebieskiego (Sztatelman, 2012).

## 2. Cele pracy

Celem niniejszej pracy była analiza sumoilacji fototropiny1 oraz zbadanie wpływu tej modyfikacji potranslacyjnej na wybrane reakcje fizjologiczne kontrolowane przez obie fototropiny. Badania są kontynuacją prac prowadzonych w Zakładzie Biotechnologii Roślin UJ nad sumoilacją fototropiny2. Głównym modelem doświadczalnym była roślina *Arabidopsis thaliana*, ze względu na dostępne mutanty szlaku sumoilacji i mutanty fototropinowe. Ponadto, jest to model dobrze scharakteryzowany pod względem ruchów chloroplastów.

Pierwsza część badań obejmowała eksperymenty mające na celu zweryfikowanie czy fototropina1 ulega modyfikacji przez białka z rodziny SUMO. W tym celu za pomocą programów bioinformatycznych zanalizowano, czy w obrębie fototropiny1 występują miejsca o wysokim prawdopodobieństwie sumoilacji. Metodą komplementacji fluorescencji sprawdzono czy izoformy SUMO1, SUMO2, SUMO3, SUMO5 oraz ligazy MMS21 i SIZ1 oddziałują z fototropiną1 *in planta*. Zbadano również lokalizację komórkową tych oddziaływań. Następnie zanalizowano sumoilację N-końcowego fragmentu fototropiny1 za pomocą systemu rekonstrukcji sumoilacji w bakteriach.

Drugą część pracy stanowiły eksperymenty, w których zbadano regulację ekspresji fototropin w celu zweryfikowania czy komponenty szlaku sumoilacji są zaangażowane w regulację ekspresji fototropin w ciemności i na świetle. Zanalizowano poziom białek fototropiny1 i fototropiny2, w ciemności i na świetle w mutantach szlaku sumoilacji: *Atsum1*, *Atsum2*, *Atsum3*, *Atsum5*, *Atsiz1*, *Atmms21*, *Atpial1*, *Atpial2*. Zbadano także poziom mRNA fototropin, aby stwierdzić czy sumoilacja zmienia poziom białka, czy reguluje ilość tych fotoreceptorów pośrednio wpływając na ich ekspresję. Eksperymenty te miały na celu uzyskanie odpowiedzi na pytanie, który z etapów szlaku sumoilacji ma największy wpływ na regulację ilości fototropin.

Ostatnia część pracy poświęcona była fenotypowaniu mutantów szlaku sumoilacji oraz mutantów podwójnych: *Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*, *Atphot2mms21*, *Atphot2siz1* pod kątem wybranych odpowiedzi kontrolowanych przez fototropiny. Głównym celem było zbadanie wpływu poszczególnych komponentów szlaku sumoilacji na odpowiedzi fizjologiczne kontrolowane przez fototropiny; ruch chloroplastów i fototropizm. Przygotowano i zbadano mutanty podwójne, aby określić w jaki sposób brak ligaz MMS21 lub SIZ1 wpływa na integrację sygnału świetlnego zależnego od danej fototropiny. Charakterystyka ruchów chloroplastów oraz reakcji fototropicznych mutantów szlaku sumoilacji miała na celu

stwierdzenie czy sumoilacja oraz poszczególne komponenty szlaku tej modyfikacji są istotne dla przekazu sygnału od fototropin.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Materiały.

##### 3.1.1. Materiał roślinny.

W eksperymentach wykorzystywano rośliny *Arabidopsis thaliana* (Rzodkiewnik pospolity) typu dzikiego oraz mutanty. Nasiona *Arabidopsis* typu dzikiego *Col-0* oraz nasiona mutantów: *Atsum1* SAIL\_296\_C12, *Atsum2* SALK\_129775C, *Atsum3* SALK\_123673C, *Atsum5* SALK\_085812C, *Atmms21-1* SAIL\_77\_G06 (Huang *et al.*, 2009), *Atsiz1-3* SALK\_034008, *Atpial1* SALK\_083748C, *Atpial2* SALK\_043892C, *phot1* SALK\_088841 (Lehmann *et al.*, 2011), *phot2 (npl1-1)* (Jarillo *et al.*, 2001) zostały zakupione w Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (Nottingham, Wielka Brytania) lub podarowane przez wskazanych autorów. Mutanty *Atsum2*, *Atsum3*, *Atsum5*, *Atpial1* i *Atpial2*, *Atphot1mms21* zostały wyselekcjonowane przez autorkę niniejszej pracy. Mutanty podwójne *Atphot1siz1-3*, *Atphot1mms21*, *Atphot2siz1-3* i *Atphot2mms21* zostały skrzyżowane i w większości wyselekcjonowane przez dr Olgę Sztatelman (IBB PAN, Warszawa). Nasiona *Nicotiana benthamiana* (Tytoń) pochodziły z kolekcji nasion Zakładu Biotechnologii Roślin UJ.

##### 3.1.2. Selekcja homozygotycznych linii mutantów *Arabidopsis thaliana*.

Kolekcje mutantów *Arabidopsis* posiadają insercje T-DNA w określonym miejscu genomu. Pierwszym etapem ich selekcji była izolacja DNA z liści przy użyciu zestawu do izolacji DNA roślinnego (A&A Biotechnology, Polska). Przeprowadzano reakcję PCR z trzema starterami For, Rev i LB1Sail dla mutantów SAIL lub LBa1 dla mutantów SALK. Sekwencje starterów zestawiono w Dodatku, w tabeli 9. Startery For i Rev przyłączają się do regionów położonych w danym genie, a startery LB1Sail i LBa1 przyłączają się do regionu położonego w fragmencie T-DNA, który uległ insercji. Dla roślin dzikiego typu stanowiących kontrolę, nie posiadających insercji T-DNA obserwowano pojedynczy produkt na elektroforezie o wielkości 900 - 1000 par zasad. Rośliny linii homozygotycznych, posiadające insercję w obu chromosomach wykazywały jeden produkt odpowiadający masie 410 par zasad dodatkowo powiększonej o wielkość zmienną (N), wynikającej z różnicy miejsca insercji i pozycji sekwencji flankującej. Dla roślin heterozygotycznych obserwowano oba opisane powyżej

produkty: 900-1000 par zasad i 410+N par zasad. We wszystkich przeprowadzonych reakcjach PCR stosowano kontrolę pozytywną, którą stanowiła mieszanina reakcyjna z DNA z rośliny typu dzikiego oraz kontrolę negatywną, z dodatkiem sterylnej wody, zamiast matrycy DNA. Następnie przeprowadzano elektroforezę DNA (Procedura 7.6. w Dodatku).

Skład mieszaniny reakcyjnej na jedną reakcję: matryca DNA 100 ng, 2xPCR MIX (A&A Biotechnology, Polska) 5  $\mu$ l, starter Forward 0,2  $\mu$ M, starter Reverse 0,2  $\mu$ M, H<sub>2</sub>O wolna od nukleaz do końcowej objętości 10  $\mu$ l

### 3.1.3. Szczepy bakteryjne.

Podczas eksperymentów wykorzystywano następujące szczepy bakteryjne pochodzące z kolekcji Zakładu Biotechnologii Roślin:

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , genotyp: *F*<sup>-</sup> *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(*r<sub>K</sub>*<sup>-</sup> *m<sub>K</sub>*<sup>+</sup>),  $\lambda$ <sup>-</sup>, szczep wykorzystywany do klonowania.*

*Escherichia coli* BL21 DE3, genotyp: *F*<sup>-</sup> *ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup> *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>)  $\lambda$ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]), szczep bakteryjny wykorzystywany do ekspresji białek.*

*Agrobacterium tumefaciens* C58, szczep wykorzystywany do transformacji przejściowej *Nicotiana benthamiana*.

## 3.2. Metody.

### 3.2.1. Hodowla roślin.

Nasiona roślin wysiewano do namoczonych wodą doniczek torfowych (Jiffy Products International AS, Norwegia). Nasiona *Arabidopsis* po wysianiu stratyfikowano przez 2 dni w temperaturze 4°C. Hodowlę roślin prowadzono w fitotronie (Sanyo MLR 350H i MLR 351H, Japonia) w fotoperiodzie 10 h światła i 14 h ciemności, w świetle o natężeniu 60–100  $\mu$ mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (Philips Master TL-D 36W/840, Osram L36 W/77 Fluora, Mitsubishi FL40SSW/37, Sylvania Gro-Lux F36W/GRO-T8), w temperaturze 23°C i wilgotności względnej 80%. W eksperymentach z użyciem *Arabidopsis* wykorzystywano rośliny w wieku 5-6 tygodni. Do transformacji przejściowej wykorzystywano rośliny *N. benthamiana* w wieku 6-9 tygodni. Do każdego eksperymentu rośliny hodowane były równocześnie, aby ograniczyć wpływ pór roku na otrzymane wyniki.

### 3.2.2 Sterylizacja nasion *Arabidopsis thaliana*.

Procedurę wykonywano w komorze laminarnej. Nasiona *Arabidopsis* inkubowano przez 5 min w sterylnej wodzie z kroplą detergentu Tween 20. Wodę odpipetowywano delikatnie, aby nie zaciągnąć nasion. Nasiona inkubowano mieszając w 70% roztworze etanolu przez 5 min, a następnie w 50% roztworze podchlorynu "Ace" przez 5 min. Nasiona płukano pięciokrotnie w sterylnej wodzie, po czym wysiewano na pożywkę B5 zestaloną 1% agarem.

### 3.2.3. Naświetlania roślin.

Eksperymenty prowadzone były o stałych porach dnia w celu uniknięcia wpływu zegara okołodobowego na wyniki. Wszystkie rośliny były adaptowane do ciemności przez 16 h przed doświadczeniami. Światło do eksperymentów mierzone było za każdym razem bezpośrednio przed eksperymentem miernikiem LI-250A (LiCor, USA).

Celem zbadania poziomu mRNA fototropin w mutantach szlaku sumoilacji, rośliny naświetlano przez 3 h światłem niebieskim o natężeniu  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Oświetlacz 470nm, Instytut Fotonowy, Kraków, Polska). Grupa kontrolna pozostawiona była w ciemności przez 3 h. Po tym czasie z obu grup pobierano liście i mrożono w ciekłym azocie.

W celu zweryfikowania poziomu białek fototropin w mutantach szlaku sumoilacji, rośliny naświetlano światłem białym o natężeniu  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Oświetlacz, Instytut Fotonowy, Kraków, Polska) lub pozostawiono w ciemności. Liście zbierano w następujących punktach czasowych: 1 h, 3 h, 5 h, 7 h i zamrażano w ciekłym azocie.

### 3.2.4. Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja.

Izolację RNA z zamrożonych liści wykonano wykorzystując zestaw do izolacji Spectrum Plant Total Kit (Sigma-Aldrich, USA). Stężenia RNA oraz współczynniki A280/A260 i A230/A260 oznaczono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop (ND Lite Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA). Następnie prowadzono elektroforezę w 2% żelu agarozowym w celu oceny jakości RNA (Procedura 7.6. Dodatek). Reakcja odwrotnej transkrypcji była przygotowywana za pomocą zestawu RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), stosując startery Oligo(dT)<sup>18</sup>. Do każdej reakcji używano 1  $\mu\text{g}$  niezdegradowanego RNA o wysokiej czystości i przeprowadzano ją w termocyklerze T100 (Biorad, USA). Otrzymane cDNA rozcieńczano dwukrotnie poprzez dodanie 20  $\mu\text{l}$  sterylnej, wolnej od RNAz wody destylowanej.



### 3.2.5. PCR w czasie rzeczywistym.

Eksperyment sprawdzający poziom ekspresji mRNA fototropin w mutantach szlaku sumoilacji został przeprowadzony w trzech powtórzeniach biologicznych. Liście zebrane w jednym eksperymencie z tych samych warunków łączono, natomiast reakcja była prowadzona w tryplikatach. Reakcję qPCR przeprowadzano używając zestawu SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma Aldrich, USA) i przygotowanego cDNA jako matrycy. Reakcja prowadzona była w termocyklerze Rotor Gene Q (Qiagen, Holandia). Warunki reakcji: 10 min/95°C; 40 cykli: 15 s/94°C, 15 s/51°C lub 56°C (zależnie od użytych starterów) i 20 s/72°C. Sekwencje starterów wraz z temperaturami ich przyłączenia zestawiono w tabeli 8., w części Dodatek. Względną ekspresję badanych genów określano używając jako odnośnika średnią wartość *Ct* (*threshold cycle*) dla wszystkich badanych liści. Otrzymane wyniki normalizowano za pomocą czynników normalizujących, obliczanych dla genów referencyjnych: *PDF*, *SAND* i *UBC* (Czechowski et al., 2005), przy użyciu programu geNorm v3.4 (Vandesompele et al., 2002). Wyniki analizowano za pomocą testu statystycznego Anova w programie RStudio (<https://www.rstudio.com/>).

### 3.2.6. Izolacja białek.

W celu określenia poziomu białek fototropin, zamrożone zaraz po eksperymencie liście ucierano na proszek mikrohomogenizatorem ręcznym. Proszek zawieszano w buforze ekstrakcyjnym i inkubowano przez 3 min w temperaturze 80°C. Następnie próbki wirowano przez 10 min, przy 16000 g w temperaturze 4°C. Nadsącz pobierano i mieszano z 5x stężonym buforem denaturującym, po czym inkubowano przez 5 min w temperaturze 97°C. Tak przygotowane ekstrakty białkowe nakładano na żel poliakrylamidowy.

Bufor ekstrakcyjny: 4% SDS, 2% β-merkaptopetanol, 2 mM PMSF, 100 mM TrisHCl

Bufor denaturujący 5x: 20% glicerol, 10% SDS, 10 mM β-merkaptopetanol, 200 mM Tris-HCl, 0,05% błękitu bromofenolowego, pH 6,8

### 3.2.7. Analiza metodą Western Blot.

Elektroforezę białkową prowadzono metodą Laemmliego (Laemmli, 1970), stosując 9% lub 10% żele poliakrylamidowe (Tabela 1.). Na każdy z żeli nakładano marker masowy dla białek - PageRuler Prestained Protein Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA). Do rozdzielania używano aparatów Mini-Protean Tetra Cell (Biorad, USA). Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 180 V przez ok. 55 min. Następnie przenoszono białka z żelu na membranę PVDF (Immobilon P, Merck Millipore, USA) prowadząc elektrotransfer metodą półsuchą za pomocą Trans Blot Turbo (Biorad, USA). Układ do transferu składał się z 3 warstw bibuły

Whatmana (3MM CHR, Whatman, GE Healthcare, USA), namoczonej w buforze anodowym 1; 6 warstw bibuły i membrany namoczonej w buforze anodowym 2; żelu oraz 6 warstw bibuły namoczonej w buforze katodowym. Transfer prowadzono 30 min przy natężeniu prądu  $0.5 \text{ A/cm}^2$  żelu. Po zakończeniu transferu, sprawdzano jego jakość poprzez wybarwienie membrany roztworem PonceauS i następną odplukanie barwnika wodą destylowaną. Wszystkie płukania i inkubacje odbywały się z użyciem kołyski laboratoryjnej. Membranę poddawano blokowaniu przez 30 min w roztworze PBS-TB. Następnie inkubowano ją przez całą noc w  $4^\circ\text{C}$  z przeciwciałami pierwszorzędowymi, zależnie od wykonywanego eksperymentu:

- anty-PHOT1: AS10 720, rozcieńczenie 1:200 w PBS-TB, oczyszczona frakcja, przeciwciało królicze;
- anty-PHOT2: AS10 721, rozcieńczenie 1:2 000 w PBS-TB, surowica, przeciwciało królicze.

Przeciwciała anty-PHOT1 i anty-PHOT2 zostały zaprojektowane i przygotowane przez dr Justynę Łabuz (Łabuz et al. 2015). Przeciwciała zamówiono w firmie Agrisera (Szwecja).

- anty-aktyna: AS16 3141, rozcieńczenie 1:2 500 w PBS-TB, przeciwciało mysie (Agrisera, Szwecja)
- anty-cMyc: MABE 282, rozcieńczenie 1:10 000 w PBS-TB, przeciwciało mysie (Merck, Niemcy)

Po całonocnej inkubacji membranę płukano trzykrotnie po 5 min PBS-TM, po czym inkubowano przez godzinę z przeciwciałem drugorzędowym. Zależnie od użytego wcześniej przeciwciała pierwszorzędowego było to:

- anty-królicze: kozie przeciwciało przeciwko króliczym IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową, rozcieńczenie 1:25 000 w PBS-TB (Agrisera, Szwecja);
- anty-mysie: 108K4785, kozie przeciwciało przeciwko mysim IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową, rozcieńczenie 1:10 000 w PBS-TB (Sigma-Aldrich, USA);

Membranę ponownie płukano trzy razy po 5 min PBS-TM i przepłukiwano trzykrotnie wodą destylowaną. Następnie na membranę nakładano substrat chemiluminescencyjny (Clarity Western ECL Blotting Substrates, Biorad, USA) i dokonywano detekcji sygnału za pomocą BioSpectrum MultiSpectral Imaging System (UVP, Ultra-Violet Products Ltd., USA). Membrany po akwizycji przepłukiwano PBS-T, po czym inkubowano je z buforem usuwającym związane przeciwciała z membran przez 9 min (Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer, thermo Fisher Scientific, USA). Po inkubacji, membrany płukano PBS-T i blokowano przez 30 min w PBS-TB. Tak przygotowana membrana była ponownie

inkubowana z przeciwciałem pierwszorzędowym i drugorzędowym w celu oznaczenia ilości aktywności w próbkach. Ilość białka w próbce normalizowano określając ilość aktywności. Analizę densytometryczną otrzymanych obrazów wykonano przy użyciu programu ImageJ, wybierając obrazy po 5 minutowym czasie akwizycji. Dla otrzymanych wyników wykonano test Anova w programie RStudio.

Bufor elektrodowy: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicyna, 0,1% SDS, pH 8,3

Bufor anodowy 1: 300 mM Tris-HCl, 20% metanol, pH 10,4

Bufor anodowy 2: 25 mM Tris-HCl, 20% metanol, pH 10,4

Bufor katodowy: 40 mM kwas 6-amino-kapronowy, 20% metanol, pH 7,2

Roztwór PonceauS: 0,5% PonceauS, 1% kwas octowy

PBS-T: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5% Tween20

PBS-TB: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5% Tween20, 5% mleko odtłuszczone "Gostyń"

Bufor zagęszczający 5x: 0,625 M Tris-HCl, 0,5% SDS, pH 6,8

Bufor rozdzielający 3x: 1,125 M Tris-HCl, 0,3% SDS, pH 8,8

**Tabela 1.** Stosowane żele poliakrylamidowe

	żel zagęszczający 100 ml	żel rozdzielający 100 ml	
stężenie akrylamidu	4%	9%	10%
40% roztwór akrylamidu	10 ml	22,5 ml	25 ml
bufor zagęszczający 5x	20 ml	-	-
bufor rozdzielający 3x	-	33,5 ml	33,5 ml
woda destylowana	70 ml	44 ml	41,5 ml
TEMED	250 µl	62,5 µl	62,5 µl
APS (10%)	1ml	250 µl	250 µl

### 3.2.8. Analizy bioinformatyczne.

Potencjalne miejsca sumoilacji fototropiny1 wyznaczono przy pomocy trzech programów: (GPS-SUMO Zhao et al., 2014) (<http://sumosp.biocuckoo.org/index.php>); Jassa<sub>v4</sub> (Beauchair et al., 2015) (<http://www.jassa.fr/>) oraz SUMOplot Analysis (Abgent, <http://www.abgent.com/sumoplot/>). W analizach używano sekwencji białkowej fototropiny1 (AT3G45780.1) pobranej ze strony [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org). Ustalano niskie wartości punktów

odcienia, aby programy wskazywały wszystkie potencjalne miejsca modyfikacji, nawet te o niskim prawdopodobieństwie.

### 3.2.9. Rekonstrukcja systemu sumoilacji w systemie bakteryjnym.

W celu weryfikacji sumoilacji fototropiny1 zastosowano system bakteryjny, w którym równoczesnej ekspresji ulegały białka szlaku sumoilacji i N-końcowy fragment fototropiny1 (Okada et al., 2009; Sztatelman 2012). Wektory zostały przygotowane przez dr Olę Sztatelman w ramach wykonywanych wcześniej eksperymentów. Procedurę przygotowania bakterii kompetentnych i transformacji *E. coli* opisano w pkt. 7.1. i 7.2., w części Dodatek. Stosowane plazmidy zestawiono w tabeli 10. Dodatku. Przygotowano bakterie szczepu ekspresyjnego *E. coli* BL21, transformowane następującymi wektorami:

- pCDFDuet zawierający wstawkę SUMO1GG, SUMO2GG, SUMO3GG lub SUMO5GG i enzym koniugujący SCE1; wektor posiada oporność na spektynomycynę; przygotowano również wektor;
- pCDFDuet zawierający wstawkę SUMO1AA, SUMO2AA, SUMO3AA lub SUMO5AA z enzymem koniugującym SCE1 również z genem oporności na spektynomycynę; Wektory zawierające wstawkę ze zmutowanymi glicynami (GG) do alanin (AA) stanowiły próbę kontrolną negatywną, teoretycznie pozbawioną miejsca przyłączenia do białka docelowego;
- pACYCDuet z sekwencjami kodującymi enzymy aktywujące SAE1b i SAE2; wektor posiada oporność na chloramfenikol;
- pET15 z sekwencją kodującą ligazę MMS21 lub wektor pMAL z sekwencją kodującą ligazę SIZ1; wektory posiadają oporność na ampicylicynę;
- pET28a z sekwencją kodującą N-końcowy fragment fototropiny1 wraz z epitopen cMyc w celu wykrycia phot1 za pomocą przeciwciał; wektor zawiera przed wstawioną sekwencją epitop 6xHis, co umożliwiała oczyszczanie wyprodukowanego białka, wektor posiada oporność na kanamycynę.

Bakterie zaszczepiano do 2 ml pożywki LB z antybiotykami w stężeniach: 50 µg/ml spektynomycyny, 25 µg/ml chloramfenikolu, 100 µg/ml ampicyliny i 50 µg/ml kanamycyny. Następnie hodowano je przez całą noc w temperaturze 37°C przy wytrząsaniu 190 rpm. Do 15 ml świeżej pożywki LB z antybiotykami zaszczepiano 600 µl całonocnej hodowli i wytrząsano w tych samych warunkach do uzyskania gęstości optycznej 0,5 - 0,7 przy długości fali 600 nm. Bakterie chłodzono przez 15 minutowe wytrząsanie w temperaturze 22°C i dodawano IPTG, do końcowego stężenia 200 µM. Wytrząsanie kontynuowano przez 14 h, po czym oczyszczano białka.

### 3.2.10. Metoda oczyszczania białek.

Całocną hodowlę bakterii wirowano przez minutę przy 7500 g, nadsącz zlewano, osad przepłukiwano buforem PBS i ponownie wirowano. Supernatant zlewano, osad zawieszano w 1 ml buforu lizującego z dodatkiem 10 µl koktajlu inhibitorów proteinaz (Roche, Szwajcaria) i 100 µl 1% roztworu lizozymu. Bakterie inkubowano na lodzie przez 30 minut. Następnie je sonikowano na lodzie przez 5 minut w trybie pulsacyjnym (20% mocy) z użyciem końcówki microtip 5 (Sonikator 4710, Cole-Parmer Instrument Co., USA). Po sonikacji bakterie były wirowane przy 25000 g przez 20 min w temperaturze 4°C (wirówka 3-30KS, Sigma, Niemcy). W tym czasie przygotowywano złożę poprzez dokładne wymieszanie agarozy NiNTA (NiNTA Agarose, Qiagen, Holandia) z wodą destylowaną w stosunku 1:1. Po zakończeniu wirowania supernatant przenoszono do probówek typu eppendorf zawierających 20 µl złoża. Inkubację prowadzono przez 1 h w 4°C na wytrząsarce obrotowej (PTR-25 Grant-bio, Grant Instruments, USA). Kolumny MobiSpin Column "F" (MoBiTec, Niemcy) przygotowywano poprzez nałożenie 500 µl buforu lizującego i wirowanie 1000 g przez 30 s (wirówka 5415R, Eppendorf, Niemcy). Po inkubacji roztwór bakterii ze złożem nawarstwiano na kolumnę i wirowano 30 s w 4°C przy 1000 g. Czynność powtarzano jednokrotnie. Złożę przepłukiwano 500 µl buforu lizującego, inkubowano 5 min i wirowano 1 min przy 1000 g w 4°C. Na kolumnę dodawano 20 µl buforu elucyjnego, inkubowano 5 min, po czym wirowano do czystej probówki zawierającej 2 µl buforu obciążającego. Po wirowaniu próbkę gotowano przez 5 min w 100°C. Procedurę regeneracji kolumny MobiSpin Column "F" opisano w pkt.7.5. w części Dodatek.

Bufor lizujący: 300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM imidazol, pH 8.0

Bufor elucyjny: 300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM imidazol, pH 8.0

### 3.2.11. Metoda dwucząsteczkowej komplementacji fluorescencji i transformacja

*N. benthamiana*.

W metodzie transformacji *Nicotiana benthamiana* wykorzystywana jest naturalna właściwość fitopatogennych bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Linie bakteryjne zawierające wybrane plazmidy szczepiono w 3 ml pożywki YEB z antybiotykami: 50 µg/ml spektynomycyny, 50 µg/ml rifampicyny i hodowano przez około 40 h w 30°C. Hodowle wirowano przy 3500 g przez 5 min w temperaturze pokojowej (342 MPW, Polska). Osad bakteryjny zawieszano w buforze do infiltracji do uzyskania gęstości optycznej o wartości 0,4-0,7 przy długości fali 600 nm. *Agrobacterium* transformowane następującymi plazmidami mieszano w stosunku 1:1:1:

- bakterie z wektorem zawierającym fragment cGFP lub nGFP na N- lub C- końcu PHOT1,

- bakterie z wektorem zawierającym fragment nGFP lub cGFP na N- lub C- końcu ligazy MMS21 lub SIZ1 lub bakterie z wektorem zawierających fragment nGFP na N-końcu poszczególnych białek z rodziny SUMO,
- bakterie z wektorem P19, który umożliwia wysoki poziom ekspresji oraz wycisza niespecyficzne oddziaływania (Voinnet et al., 2003).

Stosowane plazmidy zestawiono w tabeli 2.

Mieszaninę bakterii inkubowano 2-5 h z wytrząsaniem 120 rpm w temperaturze pokojowej. Po inkubacji mieszaniną infiltrowano epidermę dolną liścia *Nicotiana benthamiana* za pomocą strzykawki medycznej o pojemności 2 ml (Nipro Medical Corporation, Japonia). Oddziaływania obserwowane były pod mikroskopem konfokalnym po dwóch dniach od infiltracji. Procedury ukompetetnienia i transformacji *A. tumefaciens* opisano w części Dodatek 7.3. i 7.4.

YEB: 0,5% ekstrakt wołowy, 0,1% ekstrakt drożdżowy, 0,5% pepton, 0,5% sacharoza, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,2

Bufor do infiltracji: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES, 100 μM acetosyringon, pH 5,7

**Tabela 2.** Plazmidy stosowane do testów dwucząsteczkowej komplementacji fluorescencji (BiFC).

Nazwa używana w opisie wyników	Plazmid	Antybiotyk selekcyjny	Pochodzenie
PHOT1-CGFP	pK:P35S:PHOT1-CGFP:T35S	spektynomycyna	Marcin Nadzieja*
NGFP-PHOT1	pH: P35S:NGFP-PHOT1:T35S		Marcin Nadzieja*
PHOT1-NGFP	pH:P35S:PHOT1-NGFP:T35S		Marcin Nadzieja*
NGFP-MMS21	pH: P35S:NGFP-MMS21:T35S		Olga Sztatelman**
MMS21-CGFP	pK:P35S:MMS21-CGFP:T35S		
SIZ1-CGFP	pK:P35S:SIZ1-CGFP:T35S		
NGFP-SUM1	pH:P35S:NGFP-SUM1:T35S		Wojciech Strzałka *
NGFP-SUM3	pH:P35S:NGFP-SUM3:T35S		
NGFP-SUM2	pH:P35S:NGFP-SUM2:T35S		Agnieszka Katarzyna Banaś*
NGFP-SUM5	pH:P35S:NGFP-SUM5:T35S		Wojciech Strzałka *

\*Zakład Biotechnologii Roślin WBBiB UJ, Kraków

\*\*Instytut Biochemii i Biofizyki, PAN, Warszawa

### 3.2.12. Mikroskopia konfokalna.

Oddziaływania w epidermie dolnej *Nicotiana benthamiana* obserwowano za pomocą mikroskopu konfokalnego (LSM 880 Carl Zeiss, Niemcy). Używano obiektywu olejowego Plan Neofluar 1,3 NA 40x. Laser argonowy wykorzystywany był do wzbudzenia dwóch kanałów światłem o długości fali 488 nm. Zakres emisji światła rejestrowanego jako zielony

kanal wynosił 493 nm – 573 nm, a dla kanału oznaczonego kolorem magenta 651 nm – 721 nm. Trzeci kanał służył do obserwacji jasnego pola. Do obserwacji używano 2% mocy lasera z aperturą (pinhole) 90  $\mu\text{m}$ . Pojedyncze obrazy zarejestrowano przy użyciu programu ZEN (Carl Zeiss, Niemcy). Preparaty przygotowywano na szkiełkach High Precision (Marienfeld Superior, Niemcy). Obrazy z poszczególnych kanałów składano i obrabiano w programie ImageJ ([www.imagej.nih.gov/ij/](http://www.imagej.nih.gov/ij/)).

### 3.2.13. Pomiary ruchów chloroplastów metodą fotometryczną.

Do pomiarów ruchów chloroplastów indukowanych światłem niebieskim wykorzystano dwuwiązkowy fotometr (Walczak i Gabryś, 1980). Do pomiarów fotometrycznych stosowano dwie wiązki światła: czerwone światło pomiarowe (monochromatyczne o długości fali 660 nm i natężeniu  $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  modulowane z częstotliwością 800 Hz) oraz indukujące ruchy światło niebieskie (o długości fali 460 nm, emitowane przez diodę Luxeon Royal Blue LXHL-FR5C - Philips Lumiled Lighting Comp., USA). Fotometr rejestruje zmiany transmitancji światła czerwonego przez liść, powodowane przemieszczaniem się chloroplastów pod wpływem światła niebieskiego. W niniejszej pracy zostały zbadane ruchy chloroplastów w odpowiedzi na krótkie impulsy (0,1 s; 0,2 s; 1 s; 2 s; 10 s i 20 s) światła o natężeniu  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  oraz na światło ciągłe o wzrastającym natężeniu kolejno: 0,4; 1,6; 4; 20; 40; 80;  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ("dawka-efekt"). Standardowy pomiar odpowiedzi na impuls trwał 1 h, przy czym przez pierwsze 5 minut rejestrowano transmitancję ciemnościową. Impulsy światła o natężeniu  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  trwające 0,1 s; 0,2 s; 1 s i 2 s wywoływały przejściową reakcję akumulacji chloroplastów. Impulsy światła trwające 10 s i 20 s wywoływały przejściową reakcję ucieczki chloroplastów. Krzywą "dawka-efekt" rejestrowano przez 6 h, z czego pierwszy etap to 10-cio minutowy pomiar transmitancji ciemnościowej, następnie rozpoczynając od najslabszego natężenia tj:  $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  zmieniano natężenie światła co 50 minut aż do ostatniego etapu, czyli  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Dla pomiarów "dawka-efekt" przy natężeniach od  $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  do  $4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  obserwowano reakcję akumulacji, od  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  obserwowano reakcję ucieczki chloroplastów. Do pomiarów wybierano liście o zbliżonej wartości transmitancji ciemnościowej. Rośliny przed pomiarami adaptowano do ciemności przez 16 h. Na podstawie zarejestrowanych krzywych zmian transmitancji wyznaczono parametry ruchów chloroplastów:

- amplitudę (A,  $\Delta T$ ) – w przypadku reakcji akumulacji jest to różnica pomiędzy minimalną wartością transmitancji zarejestrowaną po rozpoczęciu naświetlania światłem niebieskim, a wartością transmitancji liścia bezpośrednio przed naświetlaniem; w przypadku reakcji



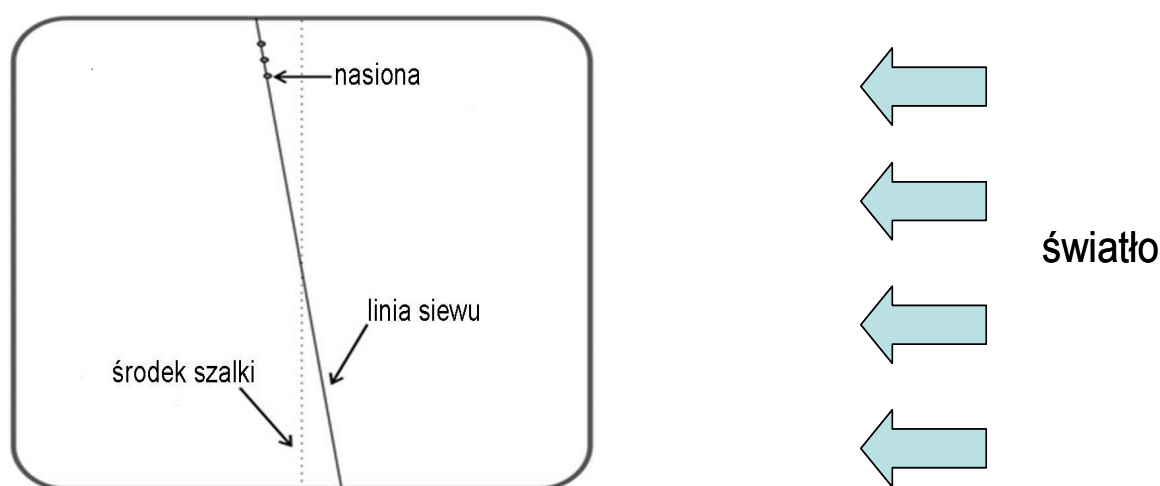
ucieczki jest to różnica pomiędzy maksymalną transmitancją zarejestrowaną po rozpoczęciu oświetlania liścia, a transmitancją zarejestrowaną bezpośrednio przed naświetlaniem.

- szybkość ( $V$ ,  $dT/dt$ ) – szybkość zmiany transmitancji.

Wyniki opracowano za pomocą skryptu komputerowego (autor: dr Paweł Hermanowicz) napisanego w programie Mathematica. Analizę statystyczną przeprowadzono testami Anova i Dunnett'a w programie RStudio.

#### 3.2.14. Fototropizm.

Eksperyment został przygotowany w oparciu o metodę opisaną w (Zeidler, 2016). Sterylne nasiona *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego i mutantów wysiewano na podłoże B5 zestalone 1% agarem (Rys. 6.).



**Rys. 6.** Sposób wysiewu nasion na szalkę kwadratową wzdłuż narysowanej linii oraz sposób naświetlania. Siew wg ukośnej linii zapobiega zachodzeniu na siebie korzeni kiełkujących nasion (Zeidler, 2016, zmodyfikowane).

Nasiona wysiane na szalkach poddawano stratyfikacji przez 3 dni w 4°C. Trzeciego dnia, zawsze o tej samej porze, szalki naświetlano przez 2 h światłem białym o natężeniu 80–100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , aby zapewnić równe kiełkowanie nasion. Następnie szalki zawijano szczelnie w podwójną folię aluminiową w pozycji wertykalnej i inkubowano w ciemności w 22°C przez 3 dni. Trzeciego dnia szalki naświetlano przez 12 h niebieskim światłem lateralnym o natężeniu 0,01  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  w celu aktywacji fototropiny1 lub niebieskim światłem lateralnym o natężeniu 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  w celu wykazania działania fototropiny2 w reakcji fototropizmu. Po 12 h naświetlania siewki fotografowano przy użyciu mikroskopu stereoskopowego z kamerą CCD (Delta Optical, Polska; QImaging, USA) i oprogramowania Image Pro Express (Media Cybernetics, USA). Kąt wygięcia fototropicznego siewek został

policzony w programie ImageJ. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Rstudio.

## 4. Wyniki

### 4.1. Przewidywanie potencjalnych miejsc sumoilacji fototropiny1 metodami bioinformatycznymi.

Analizę miejsc sumoilacji fototropiny1 przeprowadzono za pomocą trzech programów. Pierwszy, SUMOplot<sup>TM</sup>, wyszukuje w sekwencji badanego białka motyw sumoilacji  $\Psi$ KXE/D ( $\Psi$ - reszta hydrofobowa, K - lizyna, X - dowolna reszta, E/D - reszta kwasu glutaminowego/asparaginowego) oraz wylicza prawdopodobieństwo zajścia modyfikacji. Według tego programu w sekwencji fototropiny1 istnieje 16 miejsc, w których może zachodzić sumoilacja; aż 8 z nich to miejsca o wysokim prawdopodobieństwie modyfikacji (zaznaczono pogrubioną czcionką). Wyniki zestawiono w tabeli 3.

**Tabela 3.** Potencjalne miejsca sumoilacji wyznaczone przy użyciu programu SUMOplot<sup>TM</sup>. Na zielono zaznaczono sumoilowane reszty lizynowe. Pogrubioną czcionką oznaczono wyniki wskazujące na wysokie prawdopodobieństwo modyfikacji.

Lp.	Pozycja	Sekwencja	Wynik
1	K284	LTIA <b>P</b> IKDE SGKVL	<b>0,94</b>
2	K790	I <b>I</b> YRD L <b>K</b> PE NVLIQ	<b>0,91</b>
3	K761	Q <b>P</b> RV L <b>K</b> ED AVRFY	<b>0,91</b>
4	K125	EWGLV L <b>K</b> TD TKTGK	<b>0,91</b>
5	K344	ELVEA V <b>K</b> RP RALSE	<b>0,82</b>
6	K910	VLQKD L <b>K</b> FP ASIPA	<b>0,8</b>
7	K89	TSWMA L <b>K</b> DP SPETI	<b>0,8</b>
8	K595	IEETA V <b>K</b> EG EDLVK	<b>0,76</b>
9	K661	GEPIG L <b>K</b> HF KPVKP	0,56
10	K565	QPMRD Q <b>K</b> GE VQYFI	0,5
11	K369	ESDEL P <b>K</b> KP ARRMS	0,5
12	K419	FMGIK <b>K</b> KSE SLDES	0,48
13	K550	NYTKS G <b>K</b> KF WNIFH	0,32
14	K269	RILNY <b>K</b> KDG TSFWN	0,31
15	K899	RGKTR Q <b>K</b> TF TNVLQ	0,15
16	K475	TLERI E <b>K</b> NF VITDP	0,15

Program GPS-SUMO wskazuje potencjalne miejsca kowalencyjnej sumoilacji oraz niekowalencyjnych interakcji z SUMO (SIM - Sumo Interaction Motif). Miejsca kowalencyjnej modyfikacji przez SUMO zawierają motyw  $\Psi$ KXE/D. Wyniki analizy przedstawia tabela 4. Program wskazał 5 miejsc potencjalnej sumoilacji oraz 5 miejsc potencjalnej interakcji z SUMO w sekwencji fototropiny1. Punkty odcięcia w programie zostały tak ustalone, aby uzyskać wszystkie potencjalne miejsca sumoilacji i interakcji.

**Tabela 4.** Potencjalne miejsca sumoilacji i interakcji z białkami SUMO wskazane przez program GPS-SUMO. Na zielono zaznaczono sumoilowane reszty lizynowe, na czerwono zaznaczono motywy interakcji SUMO.

Lp.	Pozycja	Sekwencja	Typ
1	125	AEWGLVLKTDTKTGK	Sumoilacja
2	284	LLTIAPIKDESGKVL	Sumoilacja
3	595	VIEETAVKEGEDLVK	Sumoilacja
4	714 - 718	RARAERE ILDLL DHPFLPA	Interakcja SUMO
5	736 - 740	SFQTKTH ICLIT DYYPGGE	Interakcja SUMO
6	761	RQPRKVLKEDAVRFY	Sumoilacja
7	772 - 776	VRFYAAQ VVVAL EYLHCQG	Interakcja SUMO
8	790	GIIYRDLKPENVLIQ	Sumoilacja
9	819 - 823	LTSCKPQ LLIPS IDEKKKK	Interakcja SUMO
10	878 - 882	SAVDWWA LGILM YEMLYGY	Interakcja SUMO

Trzeci program to Jassa<sub>v4</sub>, identyfikujący motyw  $\Psi$ KXE/D wraz z dodatkowymi sekwencjami w pobliżu  $\Psi$ KXE/D, które mogą wywierać wpływ na sumoilację (wyniki zebrane w tabeli 5.). Program ten wskazuje również potencjalne miejsca sumoilacji w obrębie motywu odwróconego  $\Psi$ KXE/D (wyniki zebrane w tabeli 6.) oraz miejsca interakcji SIM (wyniki zebrane w tabeli 7.). Program zidentyfikował 6 miejsc zawierających motyw  $\Psi$ KXE/D, z czego tylko jedno o wysokim prawdopodobieństwie. Miejsce o wysokim prawdopodobieństwie (K284) leży w obrębie domeny SC-SUMO (ang. Synergy Control SUMO), która wzmacnia przyłączanie białek SUMO (Subramanian, 2003). Jedno ze zidentyfikowanych miejsc - lizyna 125 - położone jest przy sekwencji PDSM, czyli motywie sumoilacji zależnej od fosforylacji (ang. Phosphorylation Dependent Sumoylation Motif). Występowanie tej sekwencji w pobliżu motywu  $\Psi$ KXE/D zwiększa prawdopodobieństwo zachodzenia modyfikacji przez SUMO w tym miejscu (Hietakangas et al., 2006). Prawdopodobieństwo sumoilacji K125 zostało jednak przewidziane jako niskie. Program wskazał również 4 miejsca sumoilacji, przeszukując sekwencję fototropiny1 pod względem

odwróconego motywu sumoilacji  $\Psi$ KXE/D. Prawdopodobieństwo modyfikacji miejsca zawierającego lizynę 454 określono jako wysokie. Dodatkowo program przewidział 3 potencjalne miejsca interakcji z białkami SUMO, które należą do dwóch typów: pierwszego i  $\beta$ .

**Tabela 5.** Potencjalne miejsca sumoilacji zawierające motyw  $\Psi$ KXE/D z uwzględnieniem sekwencji sąsiadujących znalezione przez Jassa<sub>v4</sub>. P oznacza prawdopodobieństwo modyfikacji. Na niebiesko zaznaczono motywy  $\Psi$ KXE/D wraz z dodatkowymi sekwencjami, na zielono zaznaczono sumoilowane reszty lizynowe.

Lp.	Pozycja	Sekwencja	Motyw $\Psi$ KXE/D	
			Typ	P
1	K125	QRAAEWGLVL <b>KTDTKT</b> GKPQG	PDSM	niskie
2	K268	NNYCGRILNYK <b>K</b> DGTSFWNLL	$\Psi$ KXE/D	niskie
3	K284	FWNLLTIA <b>PIKDESG</b> KVLKFI	SC-SUMO	<b>wysokie</b>
4	K419	SSLSFMGIK <b>KK</b> SESLDESIDD	$\Psi$ KXE/D	niskie
5	K761	LLDRQPRKVL <b>K</b> EDAVRFYAAQ	$\Psi$ KXE/D	niskie
6	K790	HCQGIYRDL <b>K</b> PENVLIQGNG	$\Psi$ KXE/D	niskie

**Tabela 6.** Potencjalne miejsca sumoilacji z odwróconym motywem  $\Psi$ KXE/D wskazane przez program Jassa<sub>v4</sub>. P oznacza prawdopodobieństwo modyfikacji. Na szaro zaznaczono motyw odwróconego  $\Psi$ KXE/D.

Lp.	Pozycja	Sekwencja	Odwrócony $\Psi$ KXE/D	
			Typ	P
1	K454	RDERPESVDDKVRQKEMR <b>KGI</b>	silny $\Psi$ KXE/D	<b>wysokie</b>
2	K565	IFHLQPMRDQ <b>K</b> GEVQYFIGVQ	słaby $\Psi$ KXE/D	niskie
3	K910	TFTNVLQKDL <b>K</b> FPASIPASLQ	$\Psi$ KXE/D	niskie
4	K790	HCQGIYRDL <b>K</b> PENVLIQGNG	$\Psi$ KXE/D	niskie

**Tabela 7.** Potencjalne miejsca interakcji z SUMO przewidziane przez program Jassa<sub>v4</sub>. Na czerwono zaznaczono motywy potencjalnej interakcji z SUMO.

Lp.	Pozycja	Sekwencja	Typ
1	679-682	SGDTGSVH <b>LV</b> ELVGTDQLFA	SIM Typ 1
2	714-717	HRARAERE <b>ILD</b> LLDHPFLPA	SIM Typ 1
3	773-776	VRFYAAQ <b>VV</b> ALEYLHCQGI	SIM Typ $\beta$

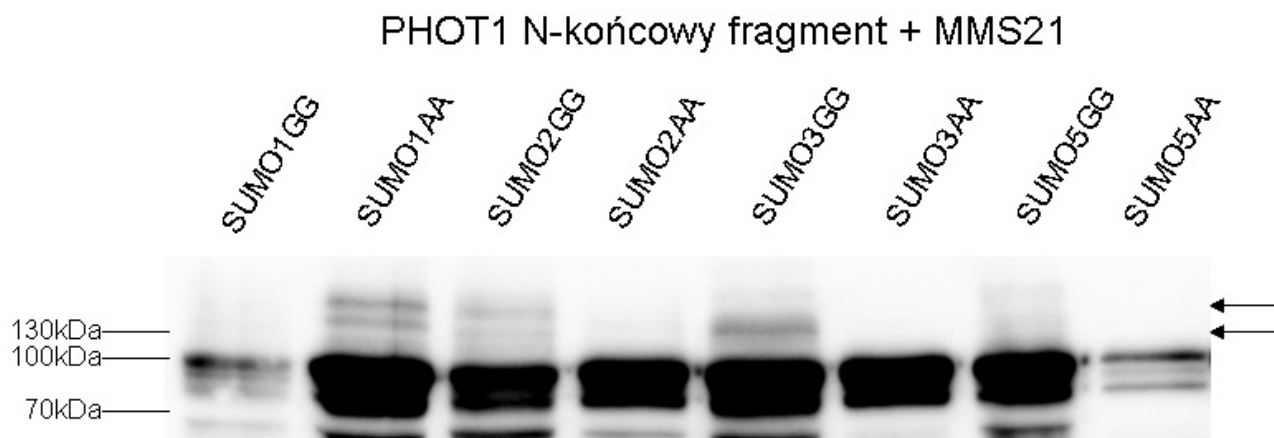
Podsumowując, wykorzystane programy wskazały sumarycznie 20 miejsc zgodnych z motywem ΨKXE/D, które mogą potencjalnie podlegać sumoilacji. Pierwszy z programów wskazał 16 miejsc potencjalnej sumoilacji, drugi wskazał pięć miejsc potencjalnie sumoilowanych oraz pięć prawdopodobnych miejsc interakcji SIM. Trzeci użyty program wskazał sześć miejsc potencjalnej sumoilacji. Cztery miejsca: K125, K284, K761 i K790 zostały zidentyfikowane przez wszystkie programy. SUMOplot<sup>TM</sup> i Jassa<sub>v4</sub> obliczyły wysokie prawdopodobieństwo sumoilacji wyłącznie dla lizyny w pozycji 284, prawdopodobieństwa sumoilacji pozostałych miejsc są niejednoznaczne. Sumoilację lizyny w pozycjach 268/269 i 419 z niskim prawdopodobieństwem wskazują programy SUMOplot<sup>TM</sup> i Jassa<sub>v4</sub>. Sumoilację lizyny 565 przewidują programy SUMOplot<sup>TM</sup> i GPS-SUMO. W przypadku motywów interakcji z SUMO, Jassa<sub>v4</sub> i GPS-SUMO wskazały 6 sekwencji, z czego dwie: 714 - 717, 773 - 776 (Jassa<sub>v4</sub>) i 714 - 718, 772 - 776 (GPS-SUMO) są przewidywane przez oba programy z różnicą jednego aminokwasu.

#### **4.2. Rekonstrukcja procesu sumoilacji fototropiny1 w komórkach bakteryjnych.**

W procesie sumoilacji w roślinach zaangażowanych jest relatywnie niewiele białek. Pozwala to na rekonstrukcję systemu sumoilacji w komórkach szczepu ekspresyjnego *E. coli* BL 21 poprzez równoczesną ekspresję enzymów aktywujących SAE1 i SAE2, SCE1, jednej z ligaz MMS21 lub SIZ1 oraz izoformy SUMO z dwiema glicynami na C-końcu, które są miejscem przyłączenia substratu, np. SUMO1GG (Okada et al., 2009).

Programy bioinformatyczne wskazały na większą liczbę miejsc potencjalnej modyfikacji oraz na wyższe prawdopodobieństwo jej wystąpienia w N-końcowym fragmencie fototropiny1. Badano zatem modyfikację N-końcowego fragmentu fototropiny1 (1-662 aa), który został wybrany według pracy Aihara et al., 2008. Fragment ten zawiera obie domeny LOV. Kontrolę negatywną stanowiły bakterie zawierające: enzym aktywujący, enzym koniugujący, jedną z ligaz, fragment N-końcowy fototropiny1 i izoformę SUMOAA, w której dwie ostatnie glicyny zmutowano do dwóch alanin. Wektor do którego wklonowano N-końcowy fragment fototropiny1 zawiera przed wstawianą sekwencją epitop cMyc, który umożliwia detekcję białka za pomocą przeciwciał anti-cMyc. Po rozdziale w 10% żelu poliakrylamidowym obserwowano prążki o masie większej niż badany fragment fototropiny.

N-końcowy fragment fototropiny1 w obecności ligazy MMS21 ulegał modyfikacji przez izoformy białka SUMO - SUMO2, SUMO3 i SUMO5 (Rys. 7.). Badany fragment fototropiny1 ulegał również modyfikacji przez białka z rodziny SUMO przy udziale ligazy SIZ1 (Rys. 8.). Stwierdzono modyfikację N-końcowego fragmentu PHOT1 przez izoformy SUMO1, SUMO2 i SUMO5 w obecności SIZ1. Dla białka SUMO3 nie zaobserwowano żadnych sumoilowanych produktów. Zarówno w obecności MMS21 i SIZ1 zaobserwowano modyfikację badanego fragmentu fototropiny przez kontrolę negatywną: SUMO1AA.



**Rys. 7.** Analiza sumoilacji N-końcowego fragmentu fototropiny1 w obecności ligazy MMS21. Próbkę rozdzielano w 10% żelu poliakrylamidowym. Strzałka wskazuje potencjalnie sumoilowane N-końcowe fragmenty białka PHOT1. Każda próbka zawierała enzymy aktywujące SAE1b, SAE2, SCE oraz poszczególne izoformy SUMO1, 2, 3, 5 (GG lub AA) oraz ligazę E3 MMS21. Z lewej strony zaznaczono pozycje markera masy [kDa]. Wyniki są reprezentatywne dla 3 powtórzeń biologicznych.



**Rys. 8.** Analiza sumoilacji N-końcowego fragmentu fototropiny1 w obecności ligazy SIZ1. Próbkę rozdzielano w 10% żelu poliakrylamidowym. Strzałki wskazują potencjalnie sumoilowane N-końcowe fragmenty białka PHOT1. Każda próbka zawierała enzymy aktywujące SAE1b, SAE2, SCE oraz poszczególne izoformy SUMO1, 2, 3, 5 (GG lub AA) oraz ligazę E3 SIZ1. Z lewej strony zaznaczono pozycje markera masy [kDa]. Wyniki są reprezentatywne dla 3 powtórzeń biologicznych.

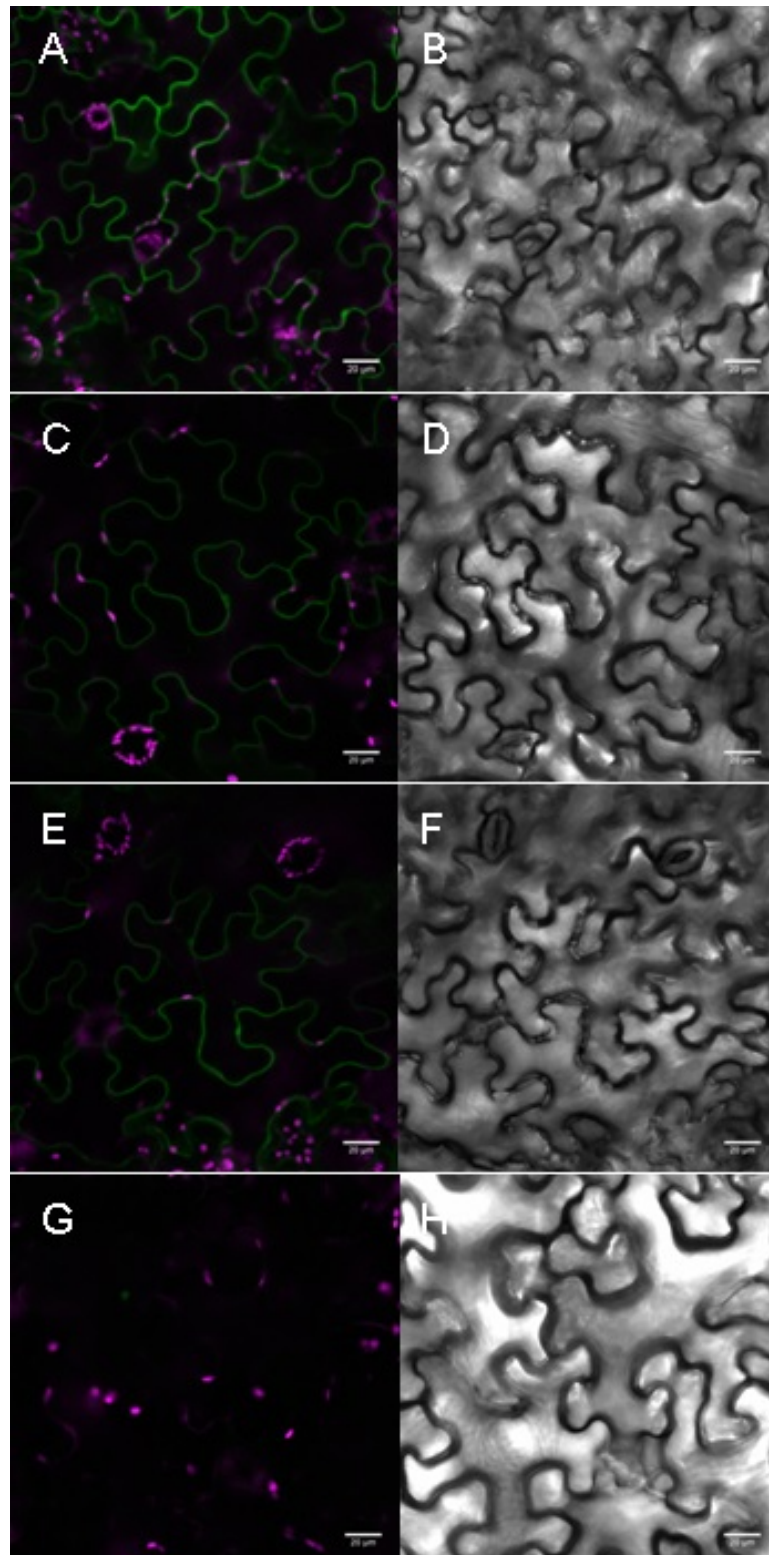
### 4.3. Analiza oddziaływań elementów szlaku sumoilacji z fototropiną 1 metodą komplementacji fluorescencji.

W celu zbadania oddziaływań pomiędzy fototropiną1, a poszczególnymi składnikami szlaku sumoilacji *in planta* wykorzystano metodę bimolekularnej komplementacji fluorescencji (BiFC). Eksperyment miał również na celu ustalenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji oddziaływań. Liście *Nicotiana benthamiana* zostały transformowane przejściowo mieszaniną bakterii *Agrobacterium tumefaciens* zawierających odpowiednie konstrukty. Mieszanina *Agrobacterium* zawierała bakterie ekspresjonujące plazmid z białkiem PHOT1 w fuzji z fragmentem cGFP lub nGFP oraz bakterie ekspresjonujące białka nGFPSUMO lub ligazy z fragmentem cGFP lub nGFP. Jeśli dwa badane białka oddziałują ze sobą, to fragment nGFP wraz z fragmentem cGFP odtworzy funkcjonalne białko GFP. W wyniku tego oddziaływania obserwuje się zieloną fluorescencję białka GFP. Fluorescencję obserwowano pod mikroskopem konfokalnym po dwóch dniach od infiltracji roślin. Przedstawione poniżej zdjęcia z mikroskopu są reprezentatywne dla co najmniej pięciu powtórzeń biologicznych.

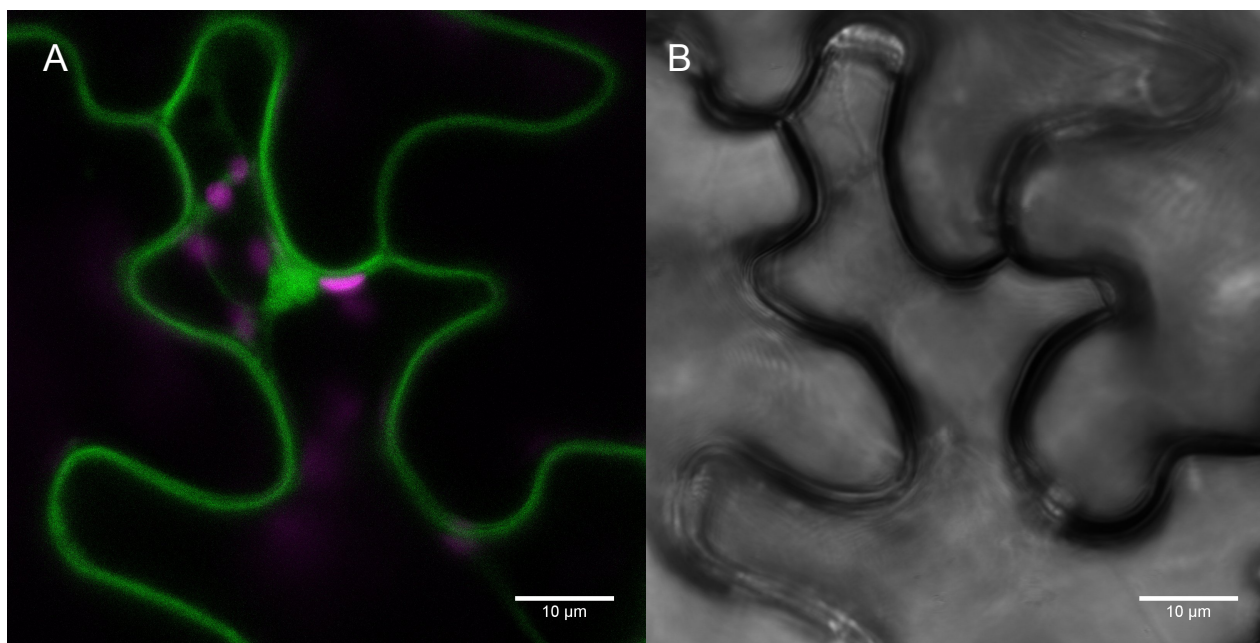
W pierwszej kolejności przeanalizowano oddziaływania pomiędzy PHOT1, a poszczególnymi izoformami SUMO. Białka SUMO1, SUMO2, SUMO3 i SUMO5 przygotowane były tylko z fragmentem nGFP na N-końcu białka (np. nGFPSUMO1), gdyż na C-końcu białek SUMO znajdują się dwie glicyny stanowiące miejsce przyłączenia substratu. W ten sposób uniknięto zablokowania tych reszt.

W epidermie liści transformowanych PHOT1 z fragmentem cGFP na C-końcu z nGFPSUMO1 fluorescencję GFP obserwowano podbłonowo (Rys. 9. A), jak również w pobliżu jądra komórkowego i przy otoczce jądrowej (Rys. 10. A). Wydajną rekonstrukcję funkcjonalnego białka GFP uzyskano również dla kombinacji nGFPSUMO2 i PHOT1cGFP, przy czym fluorescencję obserwowano wyłącznie podbłonowo (Rys. 9. C). Zarejestrowano także sygnał fluorescencyjny dla kombinacji PHOT1cGFP z nGFPSUMO3, zlokalizowany wyłącznie podbłonowo (Rys. 9. E). Nie odnotowano natomiast żadnej fluorescencji po kotransformacji PHOT1cGFP z konstruktem nGFPSUMO5 (Rys. 9. G).





**Rys. 9.** Zdjęcia epidermy dolnej liścia *Nicotiana benthamiana* współtransformowanej konstruktami: A, B: PHOT1cGFP oraz nGFPSUMO1; C, D: PHOT1cGFP oraz nGFPSUMO1; E, F: PHOT1cGFP oraz nGFPSUMO3; G, H: PHOT1cGFP oraz nGFPSUMO5. A, C, E, G: nałożenie kanałów fluorescencji zielonej i magenta; B, D, F, H: obraz jasnego pola dla obszarów A, C, E, G. Kolor zielony - fluorescencja zrekonstruowanego białka GFP, kolor magenta - autofluorescencja chlorofilu w chloroplastach. Długość skali 20 µm.

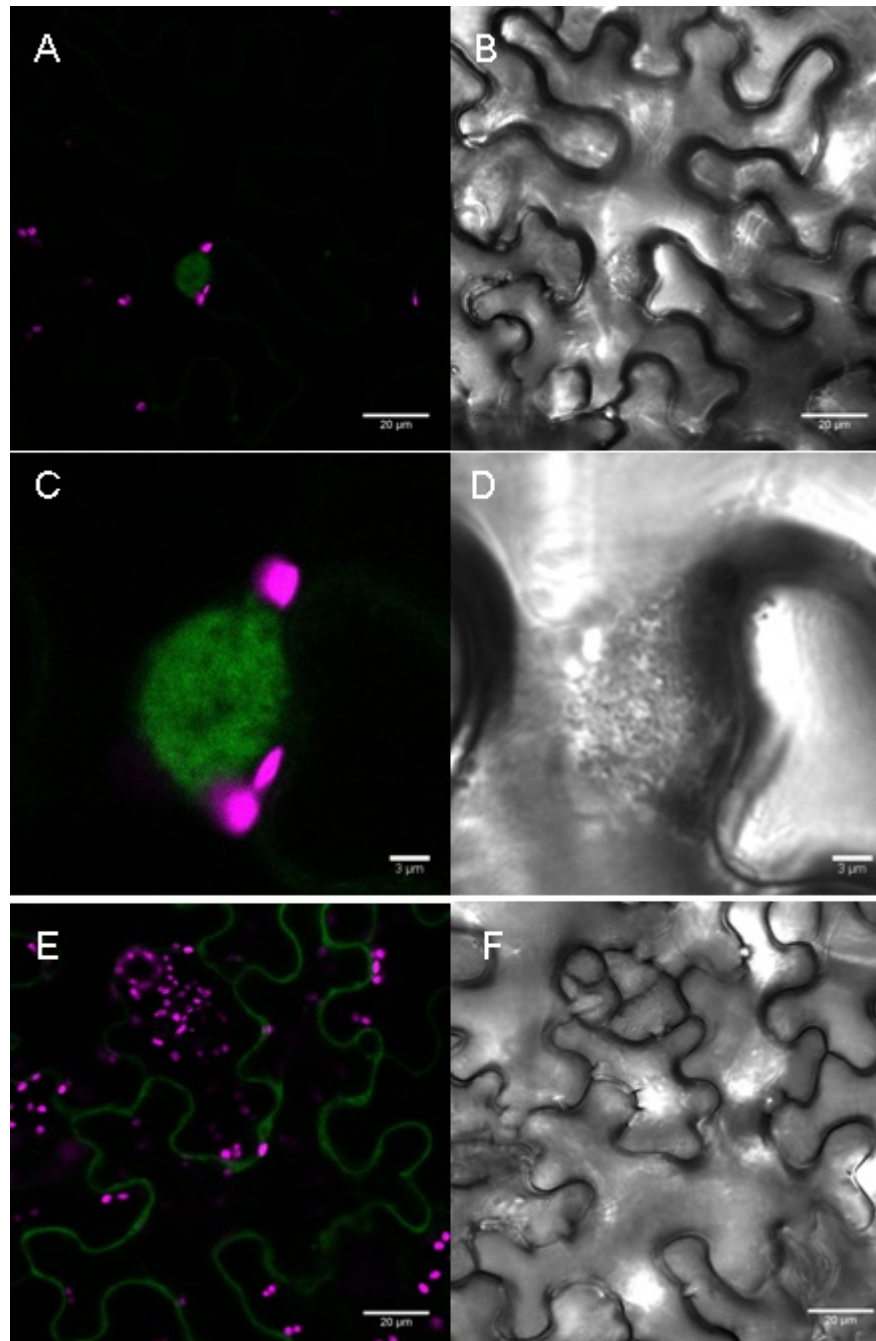


**Rys. 10.** Zdjęcia epidermy dolnej liścia *Nicotiana benthamiana* współtransformowanej konstruktami PHOT1cGFP oraz nGFPSUMO1; A: nałożenie kanałów fluorescencji zielonej i magenta; B: obraz jasnego pola dla obszarów A. Kolor zielony - fluorescencja zrekonstruowanego białka GFP, kolor magenta - autofluorescencja chlorofilu w chloroplastach. Długość skali 10 µm.

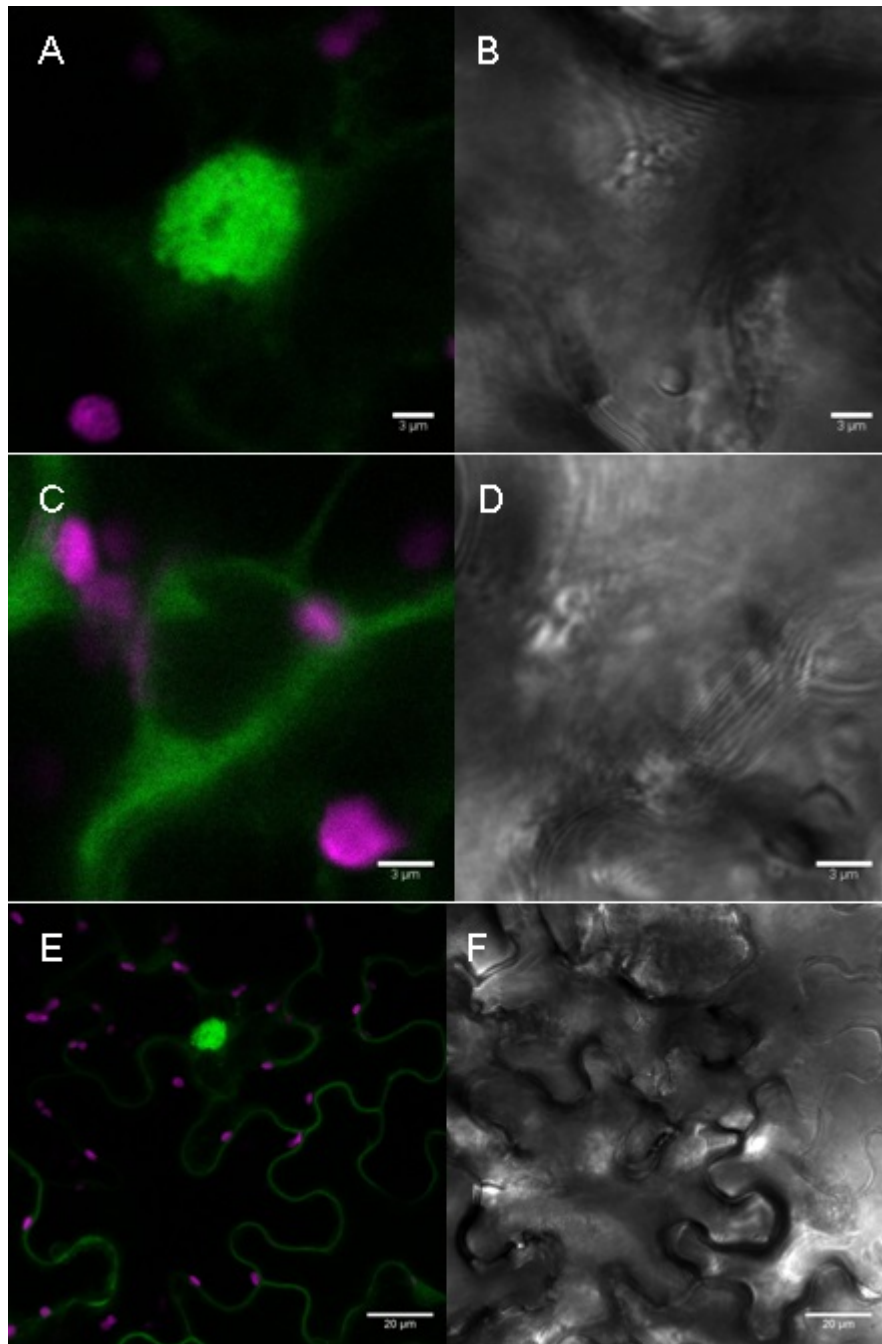
Sygnal fluorescencyjny w epidermie liścia ko-transformowanej mieszaniną bakteryjną zawierającą plazmidy ekspresyjne z fototropiną1 i ligazą MMS21 zaobserwowano dla trzech konfiguracji fuzji fragmentów białka GFP. W przypadku ko-transformacji cGFPMMS21 z nGFPPHOT1 fluorescencję obserwowano głównie w jądrze komórkowym, słaby sygnał zlokalizowany był podbłonowo (Rys. 11. A, C). Sygnal fluorescencyjny dla kombinacji nGFPMMS21 z PHOT1cGFP przybierał lokalizację wyłącznie podbłonową (Rys. 11. E).

Fluorescencję dla pary zawierającej MMScGFP i nGFPPHOT1 obserwowano w jądrze komórkowym, przy otoczce jądrowej i podbłonowo (Rys. 12.).

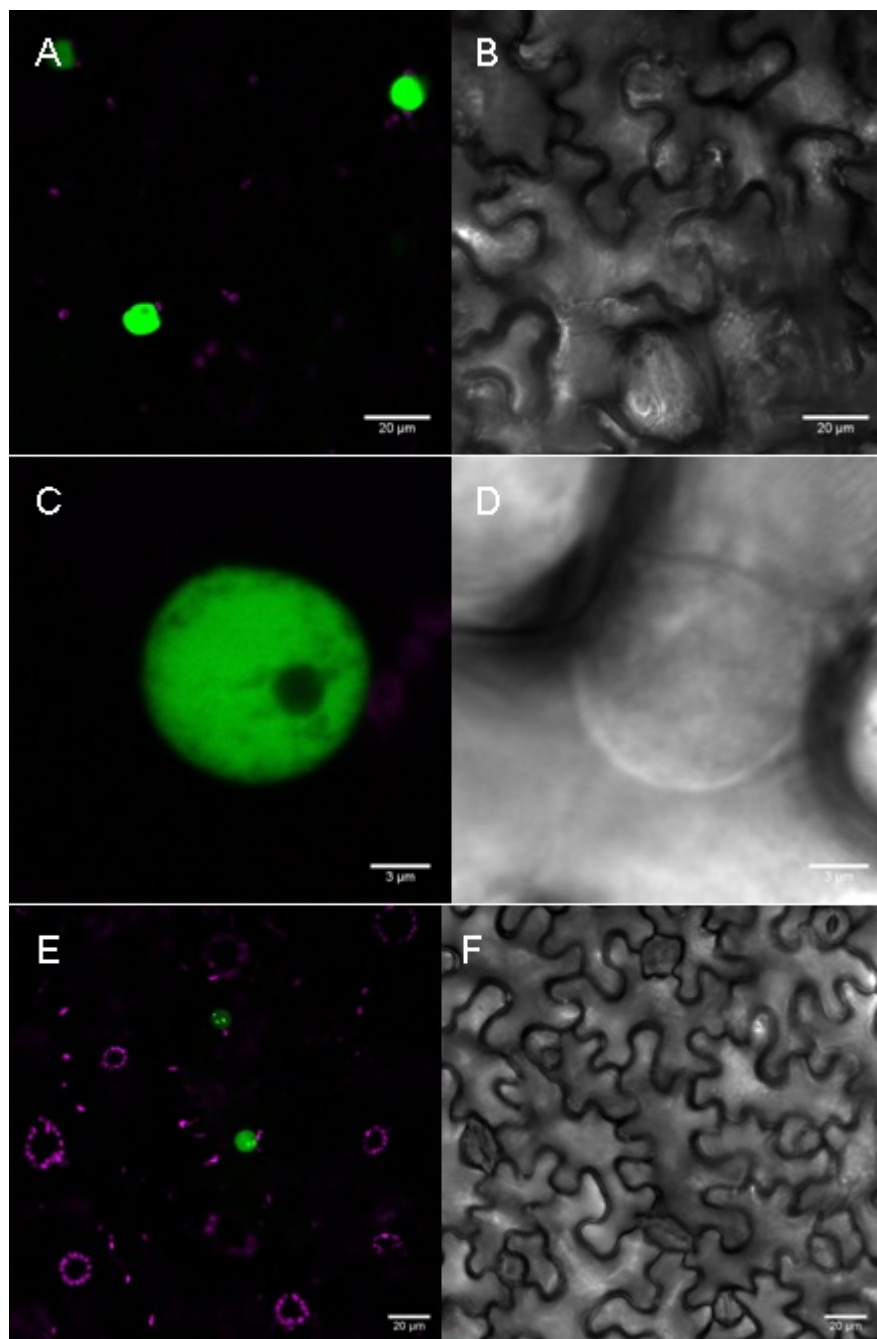
Obserwowano sygnal fluorescencyjny dla kombinacji SIZ1cGFP i nGFPPHOT1 (Rys. 13. A, C) oraz SIZ1cGFP i PHOT1nGFP (Rys. 13. E). W obu przypadkach obserwowana fluorescencja charakteryzowała się dużą intensywnością i przyjmowała wyłącznie lokalizację jądrową.



**Rys. 11.** Zdjęcia epidermy dolnej liścia *Nicotiana benthamiana* współtransformowanej konstrukcjami A, B, C, D: cGFPMMS21 i nGFPPHOT1; E, F: nGFPMMS21 i PHOT1cGFP. A, C, E: nałożenie kanałów fluorescencji zielonej i magenta; B, D, F: obraz jasnego pola dla obszarów A, C, E. Kolor magenta - autofluorescencja chlorofilu w chloroplastach. Długość skali A, B, E, F – 20  $\mu\text{m}$ ; C, D - 3  $\mu\text{m}$ .



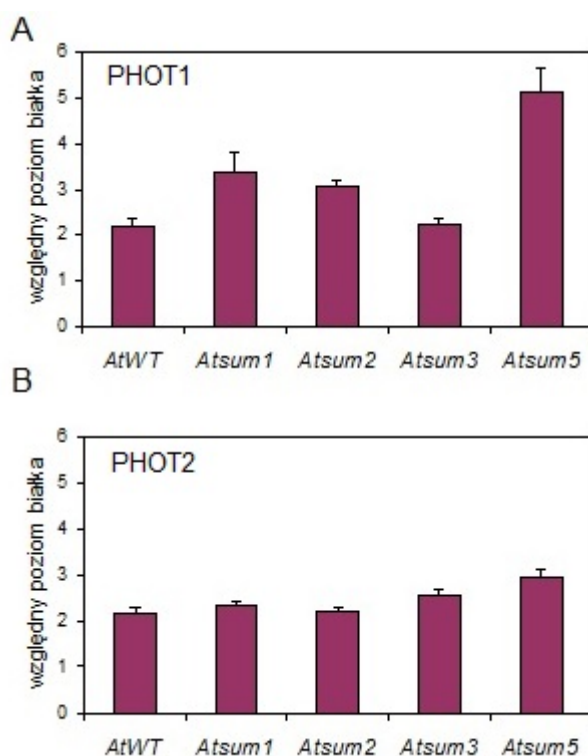
**Rys. 12.** Zdjęcia epidermy dolnej liścia *Nicotiana benthamiana* współtransformowanej konstrukcjami MMS21cGFP i nGFPPHOT1. A, C, E: nałożenie kanałów fluorescencji zielonej i magenta; B, D, F: obraz jasnego pola dla obszarów A, C, E. Kolor magenta - autofluorescencja chlorofilu w chloroplastach. Długość skali A, B, C, D – 3 μm; E, F - 20 μm.



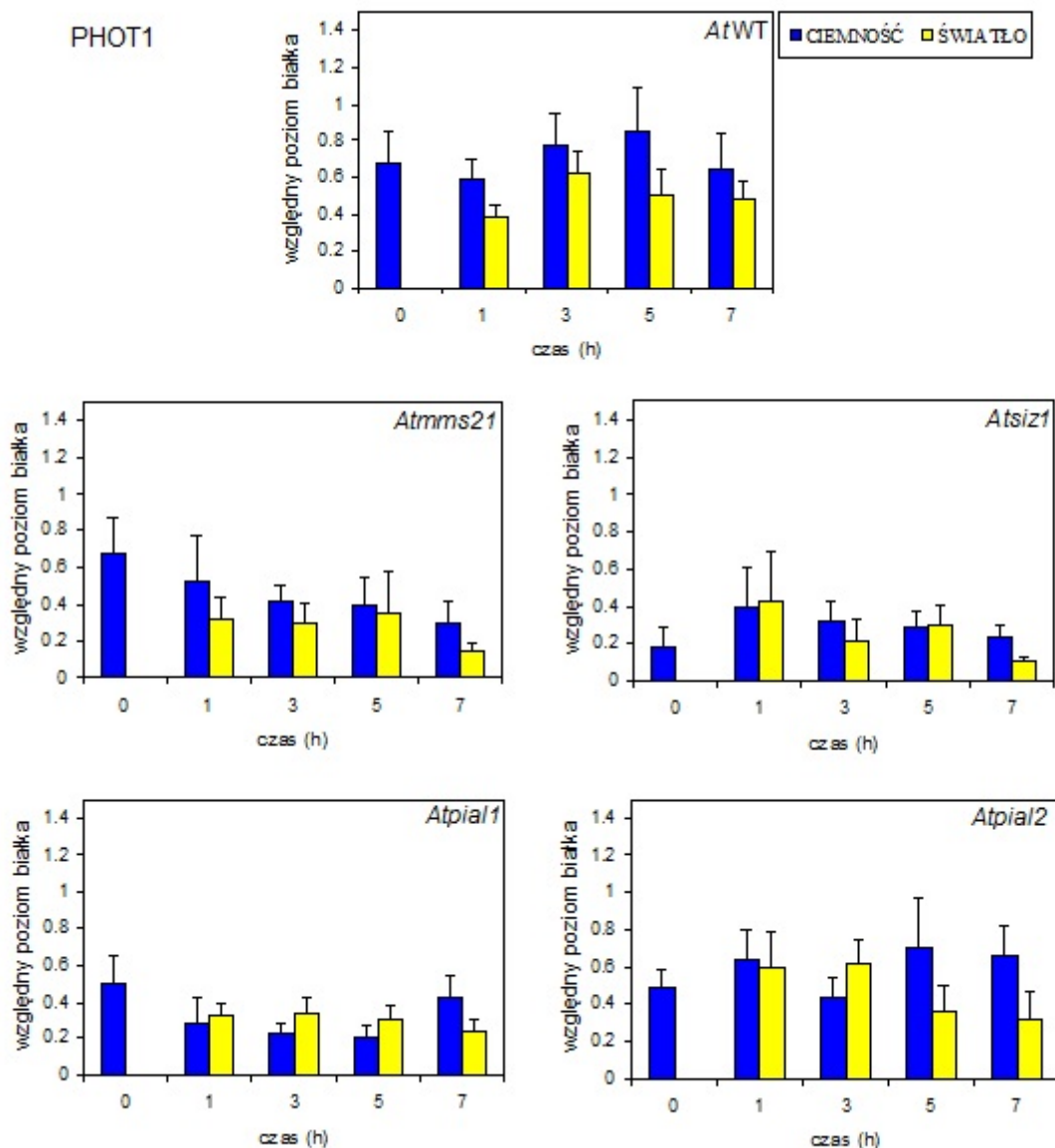
**Rys. 13.** Zdjęcia epidermy dolnej liścia *Nicotiana benthamiana* współtransformowanej kontryktami A, B, C, D: SIZ1cGFP i nGFPPHOT1; E, F: SIZ1cGFP i PHOT1nGFP. A, C, E: nałożenie kanałów fluorescencji zielonej i magenta; B, D, F: obraz jasnego pola dla obszarów A, C, E. Kolor magenta - autofluorescencja chlorofilu w chloroplastach. Długość skali A, B, E, F – 20 μm; C, D – 3 μm.

#### 4.4. Ekspresja białek fototropin w mutantach szlaku sumoilacji.

Sprawdzono, czy brak poszczególnych genów SUMO wpływa na poziom ekspresji białek fototropin. Poziom obu fototropin zanalizowano w liściach mutantów białek SUMO po 16 h adaptacji do ciemności (Rys. 14. A i B). Mutant *Atsum5* wykazuje dwukrotnie wyższą ilość białka PHOT1 w ciemności w porównaniu do typu dzikiego (Rys. 14. A). Mutanty *Atsum1* i *Atsum2* wykazują wyższy poziom ciemnościowy PHOT1 o około 30% w odniesieniu do typu dzikiego. Ilość białka fototropiny1 w *Atsum3* jest niezmienną w stosunku do dzikiego typu (Rys. 14. A). Różnice nie są istotne statystycznie. Względna ilość białka PHOT2 w mutantach *Atsum1* i *Atsum2* jest porównywalna z typem dzikim. Mutant *Atsum5* wykazuje podwyższony poziom PHOT2 w stosunku do *AtWT*, nie uzyskano różnic istotnych statystycznie (Rys. 14. B).



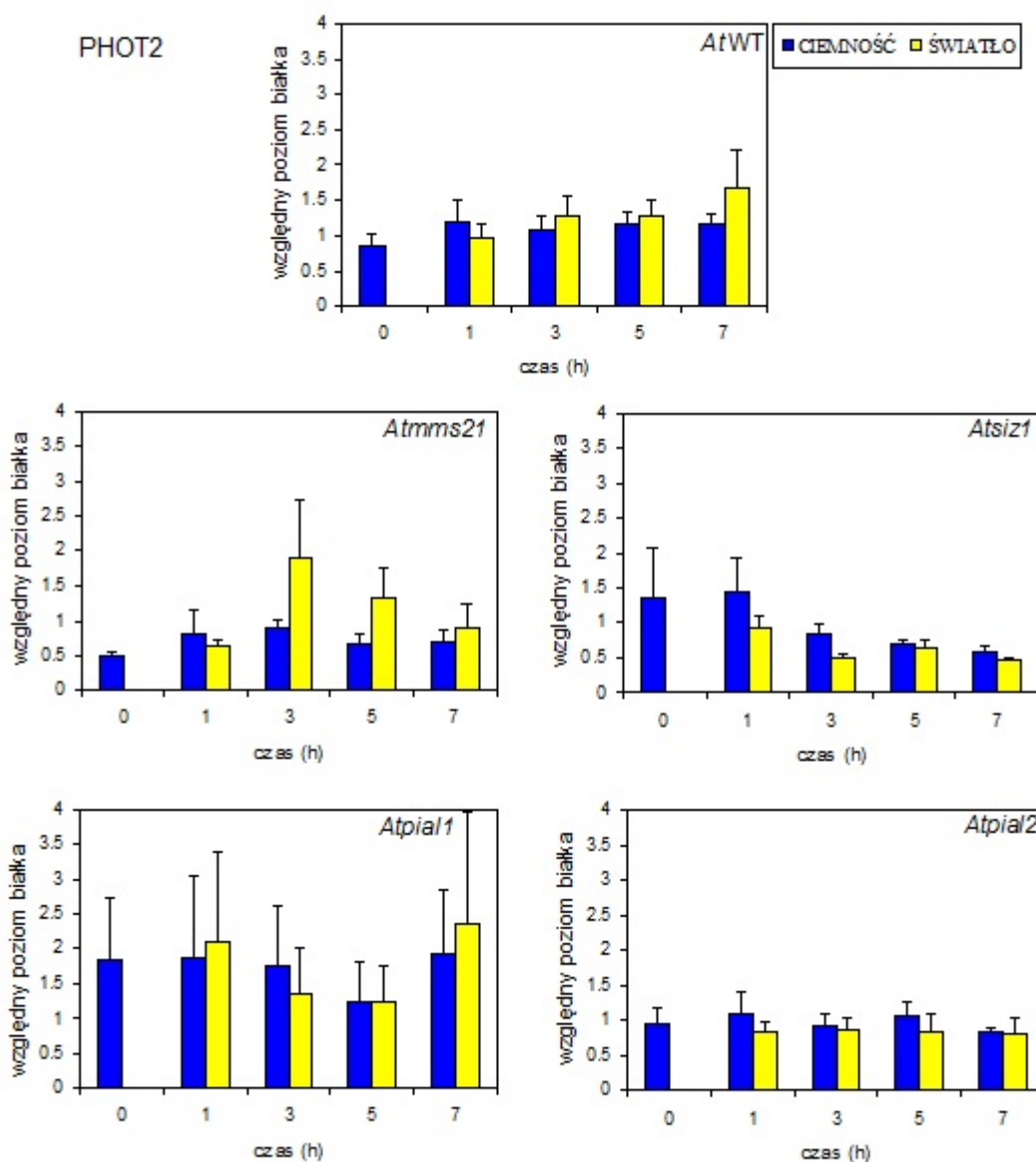
**Rys. 14.** Względny poziom białek: A: PHOT1; B: PHOT2 w zaciemnionych liściach *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego (*AtWT*) oraz w liściach mutantów *Atsum1*, *Atsum2*, *Atsum3* i *Atsum5*. Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Wyniki stanowią średnią z czterech powtórzeń biologicznych. Brak istotności statystycznej potwierdzony testem Anova.



**Rys. 15.** Względny poziom białka PHOT1 w liściach *AtWT* i liściach mutantów *Atmms21*, *Atsiz1*, *Atpial1*, *Atpial2* w punktach czasowych 0, 1, 3, 5, 7 h. Granatowe słupki przedstawiają poziom fototropiny1 w ciemności; żółte słupki przedstawiają poziom fototropiny1 po naświetlaniu światłem białym o natężeniu  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Wyniki stanowią średnią z co najmniej pięciu powtórzeń biologicznych. Brak istotności statystycznej potwierdzony testem Anova i testem Tukey'a.

Regulację poziomu białka PHOT1 w dzikim typie *Arabidopsis thaliana* (*AtWT*) w ciemności i po 1, 3, 5 i 7 godzinach naświetlania ( $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) przedstawiono na rysunku 15. Mutant *Atmms21* wykazał porównywalny do dzikiego typu poziom PHOT1 w czasie 0 i 1 h w ciemności i na świetle, natomiast w kolejnych punktach czasowych poziom ten obniżał się w porównaniu do *AtWT*. Obniżony o około 50% poziom PHOT1 w porównaniu do dzikiego typu w ciemności i na świetle można zauważyć w mutancie ligazy *Atsiz1*, z wyjątkiem punktu czasowego 1 h. W mutancie *Atpial1* we wszystkich punktach poziom białka PHOT1 jest

niższy niż w dzikim typie, a po 3, 5 i 7 godzinie naświetlania spada dwukrotnie w porównaniu do *AtWT*. Mutanty *Atsiz1*, *Atpia11* i *Atpia2* wykazują zmienioną regulację ilości białka PHOT1 przez światło w porównaniu z typem dzikim. W wymienionych mutantach poziom PHOT1 nie obniża się pod wpływem światła w stosunku do poziomu ciemnościowego w analizowanych punktach czasowych. Otrzymane różnice nie są jednak istotne statystycznie.



**Rys. 16.** Względny poziom białka PHOT2 w liściach *AtWT* i liściach mutantów *Atmms21*, *Atsiz1*, *Atpia11*, *Atpia2* w punktach czasowych 0, 1, 3, 5, 7 h. Granatowe słupki przedstawiają poziom fototropiny2 w ciemności; żółte słupki przedstawiają poziom fototropiny2 po naświetlaniu światłem białym o natężeniu  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Wyniki stanowią średnią z co najmniej pięciu powtórzeń biologicznych. Brak istotności statystycznej potwierdzony testem Anova i testem Tukey'a.



Regulację poziomu białka PHOT2 w dzikim typie *Arabidopsis thaliana* (*AtWT*) i mutantach, w ciemności i po 1, 3, 5 i 7 godzinach naświetlania ( $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) przedstawiono na rysunku 16. W dzikim typie na świetle poziom fototropiny wzrasta w kolejnych punktach czasowych w porównaniu do poziomu w ciemności. *Atmms21* wykazuje mniejszą ilość PHOT2 w ciemności w porównaniu do dzikiego typu. Widoczna jest regulacja poziomu białka przez światło prawie dla wszystkich punktów czasowych, jednak w czasie ilość białka na świetle spada, inaczej niż w *AtWT* (Rys. 16). W mutancie *Atsiz1* widać zaburzoną światłem regulację ilości PHOT2 w porównaniu do dzikiego typu, w każdym punkcie czasowym ilość PHOT2 na świetle jest mniejsza niż w ciemności. Ilość białka PHOT2 w czasie 0 i 1 h jest porównywalna z *AtWT*, natomiast jest znacznie niższa w kolejnych punktach czasowych. Mutant *Atpial* wykazuje częściowo zaburzoną regulację ilości PHOT2 światłem, wyniki te obarczone są jednak bardzo dużym błędem standardowym (Rys. 16). W mutancie *Atpial2* ilość fototropiny utrzymuje się w ciemności na poziomie zbliżonym do dzikiego typu. Widać zaburzoną regulację PHOT2 na świetle, gdyż poziom ekspresji w ciemności jest wyższy niż na świetle (Rys. 16). Różnice w ilościach białka PHOT2 w mutantach nie są istotne statystycznie.

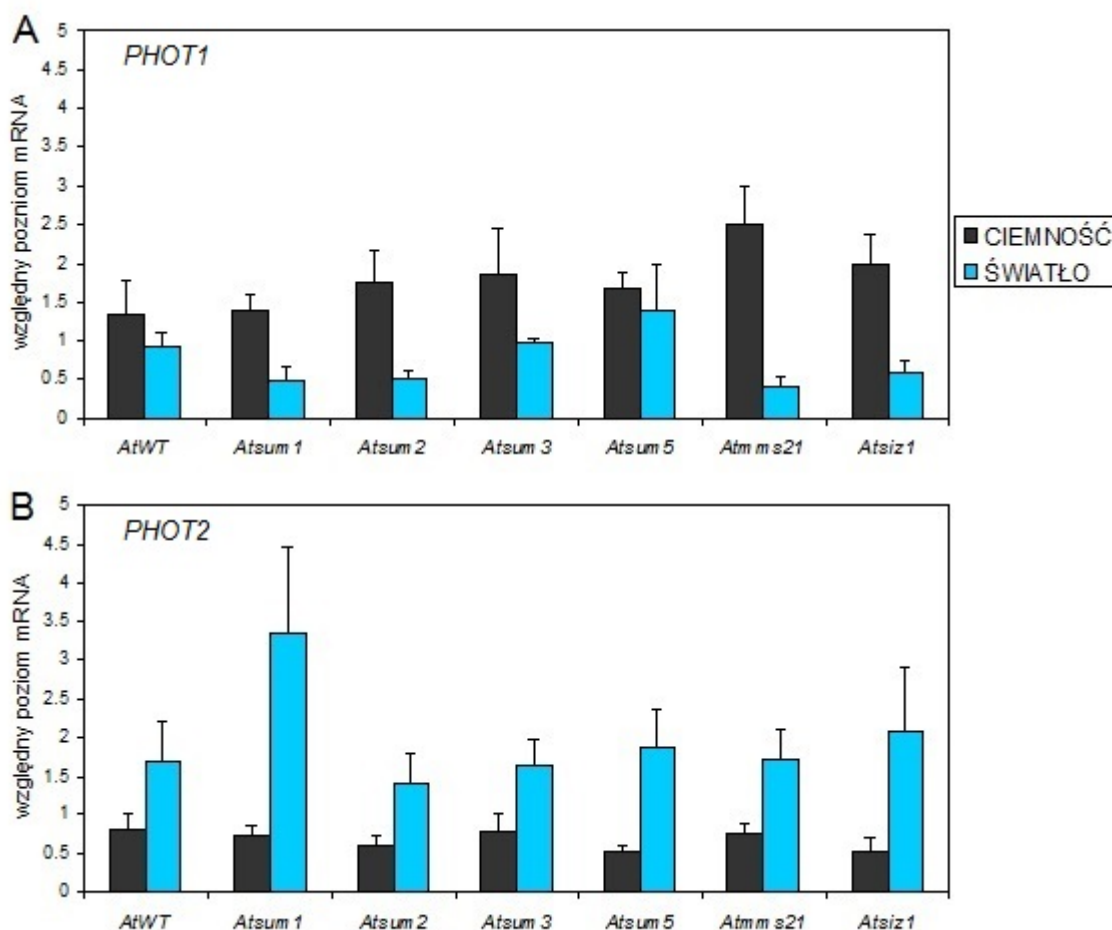
#### 4.5. Ekspresja genów fototropin w mutantach szlaku sumoilacji.

Doświadczenia mające na celu zbadanie poziomu białek fototropin w mutantach wskazały na zmieniony wzór regulacji ekspresji białek PHOT1 i PHOT2 w ciemności i pod wpływem światła w mutantach pozbawionych poszczególnych genów kodujących składowe systemu sumoilacji. Regulacja ekspresji fototropin przez sumoilację może zachodzić na dwa sposoby. Jeden z nich to bezpośredni wpływ sumoilacji fototropin na stabilność tych białek. Druga możliwość to pośrednia regulacja ekspresji fototropin poprzez modyfikację przez rodzinę SUMO czynników transkrypcyjnych, które regulują ekspresję fototropin. Dlatego też sprawdzono poziom mRNA fototropin w liściach adaptowanych do ciemności mutantów szlaku sumoilacji po trzech godzinach w ciemności i na świetle ( $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Na świetle poziom *PHOT1* maleje w liściach *AtWT* o około 30% (Rys. 17. A.). W mutantach białek SUMO i ligaz MMS21 i SIZ1 ekspresja tego genu w liściach również ulega obniżeniu. W mutantach *Atsum1*, *Atsum2* i *Atsum3* spadek ekspresji pod wpływem światła wynosi około 50%, a w mutantach *Atmms21* i *Atsiz1* spadek ten jest większy niż 50%. Mutanty *Atmms21* i *Atsiz1* cechuje wyższy poziom *PHOT1* w ciemności niż w typie dzikim (Rys. 17. A.). Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic.

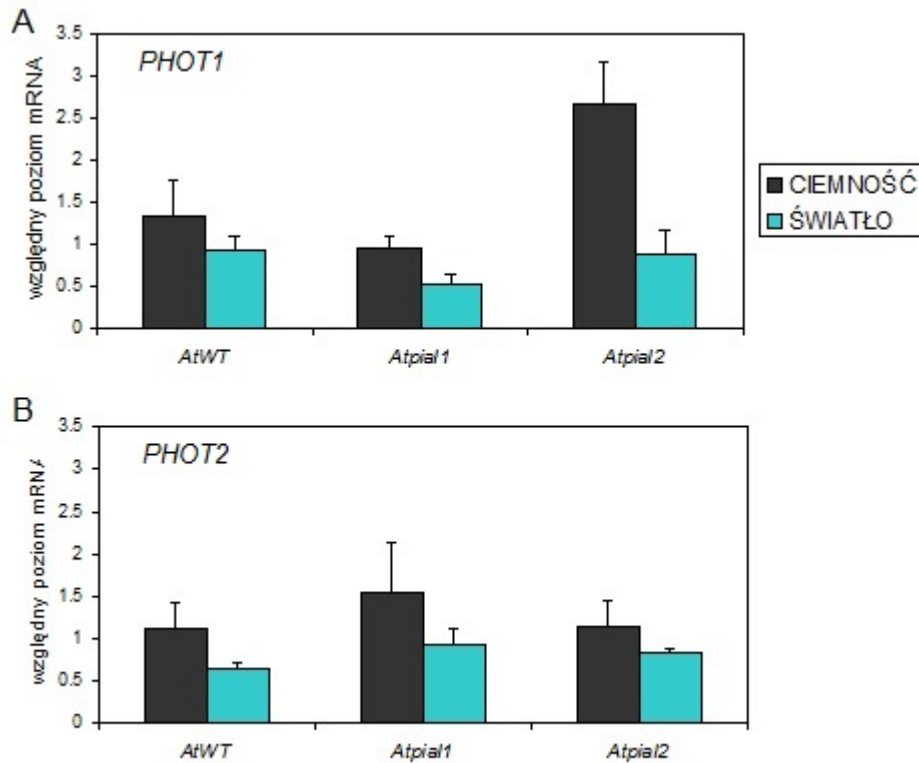
Ekspresja genu *PHOT2* w liściach *Arabidopsis* typu dzikiego wzrasta na świetle o około 50%

(Rys. 17. B.). Taka regulacja światłem występuje w liściach mutantów białek SUMO oraz ligaz MMS21 i SIZ1. W wymienionych mutantach poziomy *PHOT2* w ciemności i na świetle są porównywalne z typem dzikim. Podwyższony poziom *PHOT2* na świetle można zaobserwować w *Atsum1*, jednak wynik obarczony jest bardzo dużym błędem. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w tym eksperymencie.



**Rys. 17.** Względny poziom mRNA A: *PHOT1* i B: *PHOT2* w liściach *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego i w liściach mutantów *Atmms21*, *Atsiz1*, *Atsum1*, *Atsum2*, *Atsum3*, *Atsum5*. Czarne słupki przedstawiają względny poziom mRNA po 3 h w ciemności, niebieskie słupki przedstawiają względny poziom mRNA po 3 h naświetlania światłem niebieskim o natężeniu  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Brak istotności statystycznej potwierdzony testem Anova.

Regulacja światłem ekspresji *PHOT1* w liściach mutantów ligaz PIAL jest porównywalna do dzikiego typu. Na świetle poziom *PHOT1* obniża się. Wyższy poziom ekspresji *PHOT1* w ciemności wykazuje *Atpial2*, jednak nie jest to różnica istotna statystycznie (Rys. 18. A.). Wyniki ekspresji *PHOT2* mogą wskazywać, że silne światło niebieskie obniża ilość *PHOT2* w liściach mutantów ligaz PIAL (Rys. 18. B.).



**Rys. 18.** Względny poziom mRNA A: *PHOT1* i B: *PHOT2* w liściach *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego i w liściach mutantów *Atpia1* i *Atpia2*. Czarne słupki przedstawiają względny poziom mRNA po 3 h w ciemności, niebieskie słupki przedstawiają względny poziom mRNA po 3 h naświetlania światłem niebieskim o natężeniu  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Brak różnic istotnych statystycznie potwierdzony testem Anova.

#### 4.6. Ruchy chloroplastów w mutantach szlaku sumoilacji oraz w mutantach podwójnych - fototropinowych i ligaz SUMO.

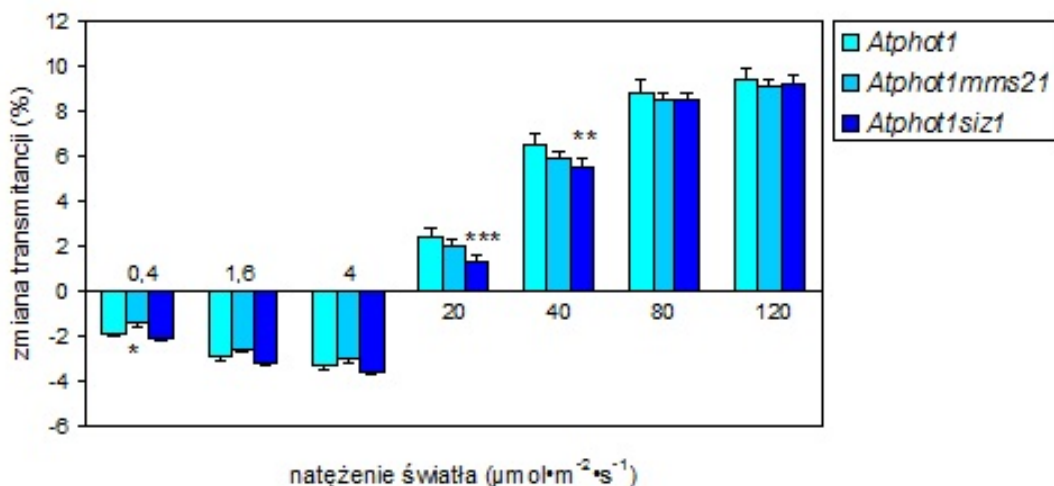
W celu sprawdzenia wpływu ligaz SUMO na fizjologiczne odpowiedzi sterowane przez fototropiny zmierzono ruchy chloroplastów w mutantach podwójnych - fototropinowych i ligazowych: *Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*, *Atphot2mms21* i *Atphot2siz1* oraz w pojedynczych ligazowych: *Atmms21*, *Atsiz1*, *Atpia1* i *Atpia2*. Badania na mutantach podwójnych pozwoliły na sprawdzenie czy brak ligazy MMS21 lub SIZ1 wpływa na funkcjonowanie każdej z fototropin z osobna. Dla wszystkich mutantów zbadano odpowiedzi chloroplastów na światło ciągle o stopniowo wzrastającym natężeniu: 0,4; 1,6; 4; 20; 40; 80;  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  oraz odpowiedzi na krótkie impulsy światła o natężeniu  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Dla mutantów podwójnych kontrolę stanowił pojedynczy mutant fototropinowy, natomiast dla pojedynczych mutantów ligazowych kontrolę stanowiły rośliny dzikiego typu. W roślinach typu dzikiego

światło o niskich natężeniach indukuje akumulację chloroplastów od  $0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  do ok.  $4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . W odpowiedzi na światło silne o natężeniach od  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  chloroplasty rozpoczynają reakcję ucieczki (Łabuz et al., 2015).

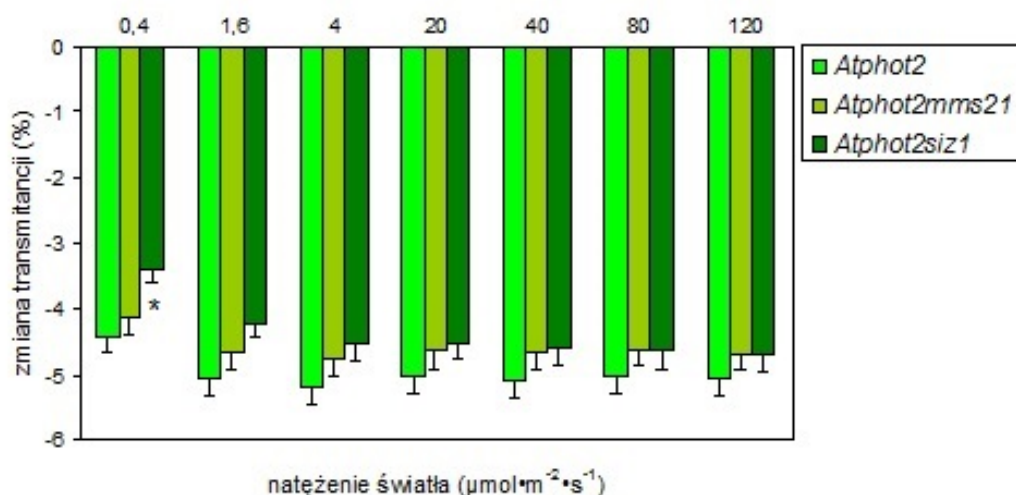
W mutancie podwójnym *Atphot1mms21* wystąpiły istotne różnice manifestujące się osłabieniem reakcji przy najniższym badanym natężeniu światła  $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  w porównaniu do kontroli *Atphot1*. Mutant *Atphot1siz1* wykazał istotne różnice polegające na osłabieniu reakcji przy natężeniach 20 i  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Rys.19.).

Wyniki dla mutantów podwójnych na tle genetycznym *Atphot2* przedstawia Rys. 20. Istotne różnice wystąpiły jedynie w mutancie *Atphot2siz1* w odpowiedzi chloroplastów przy natężeniu  $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  w porównaniu do *Atphot2*. Nie wykazano istotnych różnic dla mutantu podwójnego *Atphot2mms21*.

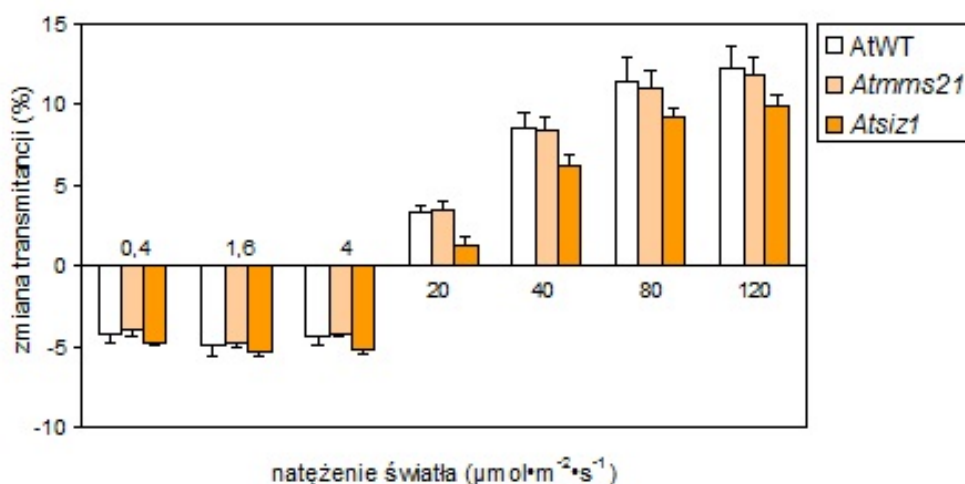
Odpowiedzi na światło ciągle pojedynczych mutantów ligazowych *Atmms21*, *Atsiz1*, *Atpial1* i *Atpial2* są zbliżone do typu dzikiego (Rys. 21. i Rys. 22.)



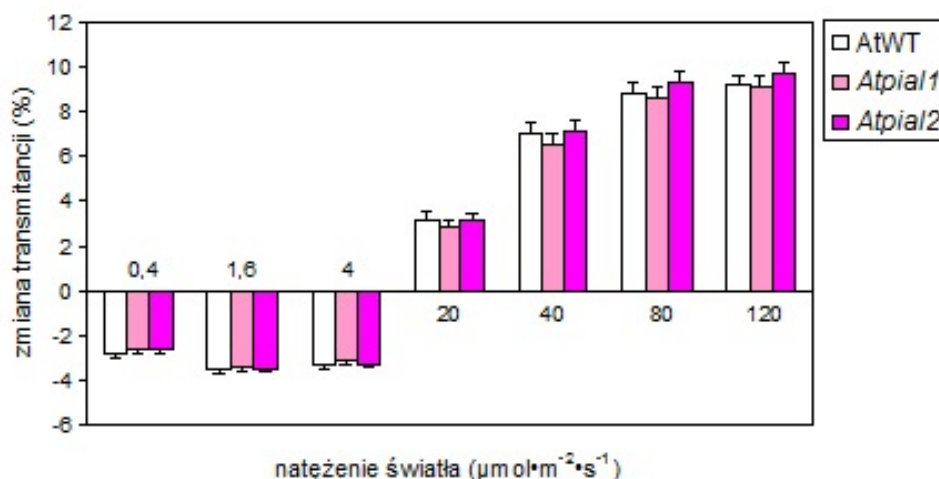
**Rys. 19.** Odpowiedzi chloroplastów na światło ciągle w mutantach z brakiem funkcjonalnej fototropiny1: *Atphot1*, *Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*. Zmiany transmitancji światła czerwonego przez liść pod wpływem ciągłego światła niebieskiego o natężeniach kolejno: 0,4; 1,6; 4; 20; 40; 80; 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Każdy słupek odpowiada średniej z minimum 10 pomiarów. Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Gwiazdki wskazują na istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantem *Atphot1* stanowiącym kontrolę, a badanymi mutantami podwójnymi: ‘\*\*\*’ 0.001, ‘\*\*’ 0.01, ‘\*’ 0.05. Istotność obliczona przy użyciu testów Anova i Dunnetta.



**Rys. 20.** Odpowiedzi chloroplastów na światło ciągłe w mutantach z brakiem funkcjonalnej fototropiny2: *Atphot2*, *Atphot2mms21*, *Atphot2siz1*. Zmiany transmitancji światła czerwonego przez badany liść pod wpływem ciągłego światła niebieskiego o natężeniach kolejno: 0,4; 1,6; 4; 20; 40; 80; 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Każdy słupek odpowiada średniej z minimum 10 pomiarów. Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Gwiazdka wskazuje na istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantem *Atphot2* stanowiącym kontrolę, a badanymi mutantami podwójnymi: ‘\*’ 0.05. Istotność obliczona przy użyciu testów Anova i Dunnetta.



**Rys. 21.** Odpowiedzi chloroplastów na światło ciągłe w dzikim typie i w mutantach *Atmms21*, *Atsiz1*. Zmiany transmitancji światła czerwonego przez liść pod wpływem ciągłego światła niebieskiego o natężeniach kolejno: 0,4; 1,6; 4; 20; 40; 80; 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Każdy słupek odpowiada średniej z minimum 10 pomiarów. Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Brak istotności statystycznej uzyskanych wyników obliczony przy użyciu testu Anova.



**Rys. 22.** Odpowiedzi chloroplastów na światło ciągłe w dzikim typie i w mutantach *Atpial1*, *Atpial2*. Zmiany transmitancji światła czerwonego przez badany liść pod wpływem ciągłego światła niebieskiego o natężeniach kolejno: 0,4; 1,6; 4; 20; 40; 80; 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Słupki przedstawiają średnią z minimum 10 pomiarów. Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Brak istotności statystycznej uzyskanych wyników obliczony przy użyciu testu Anova.

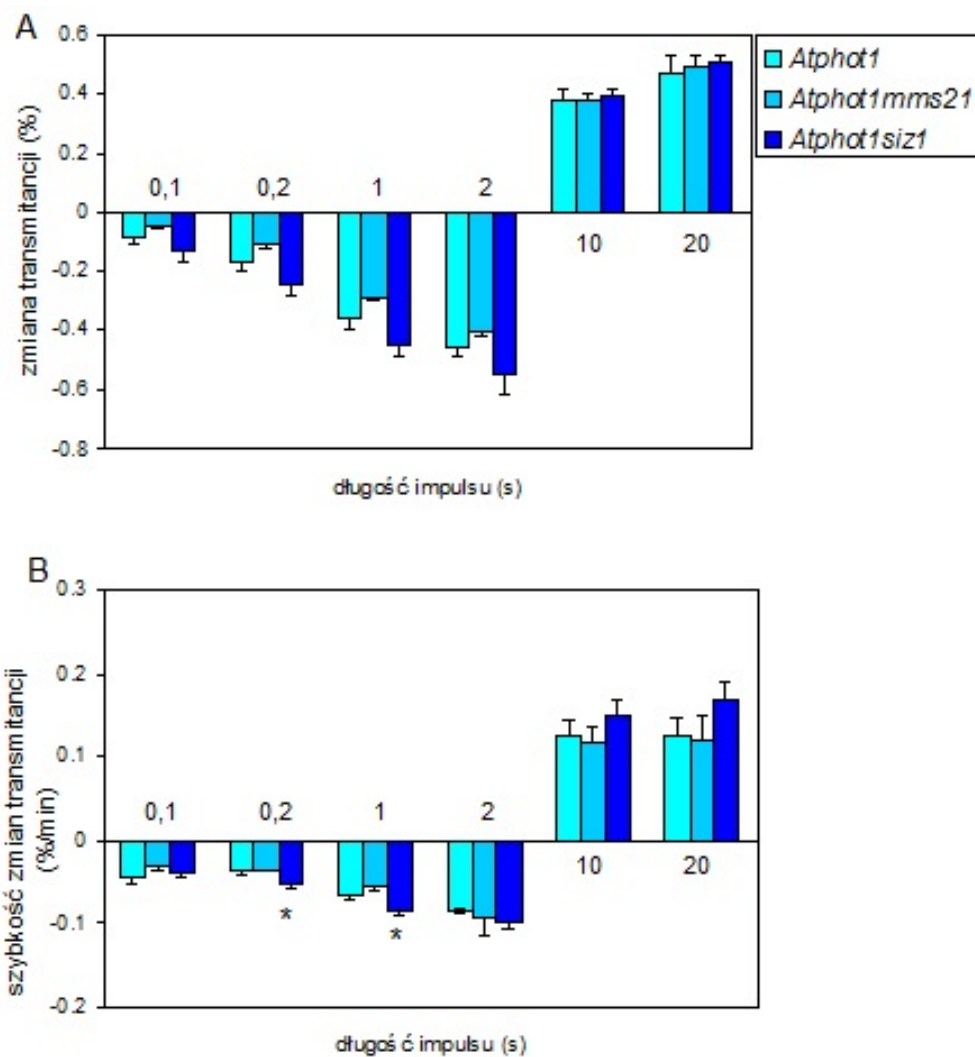
Zmierzono odpowiedzi na krótkie impulsy światła niebieskiego o natężeniu 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  w badanych roślinach. Dla mutantów podwójnych: *Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*, *Atphot2mms21*, *Atphot2siz1* zmierzono odpowiedzi na impulsy: 0,1; 0,2; 1; 2; 10; 20 s; dla mutantów białek PIAL zmierzono odpowiedzi na impulsy: 0,2; 2; 20 s. W roślinach typu dzikiego chloroplasty wykonują przejściowe reakcje akumulacji w odpowiedzi na krótkie impulsy silnego światła o czasie trwania: 0,1; 0,2; 1 i 2 s, przy czym wartość transmitancji światła przez liść spada. Dłuższe impulsy światła silnego: 10 s i 20 s skutkują reakcją ucieczki - wartość transmitancji światła przez liść przejściowo wzrasta, a następnie spada. Dla zmierzonych krzywych obliczono zmianę transmitancji oraz szybkość tej zmiany.

Wyniki dla mutantów podwójnych na tle genetycznym *Atphot1* wskazują (Rys. 23.), że odpowiedzi chloroplastów mutantu *Atphot1mms21* na badane impulsy światła są słabsze, a odpowiedzi chloroplastów *Atphot1siz1* silniejsze niż kontrola, jednak nie są to różnice istotne statystycznie. Stwierdzono istotne statystycznie różnice w prędkościach ruchów chloroplastów w odpowiedzi na impulsy światła trwające 0,2 s i 1 s w mutancie *Atphot1siz1*. Mutant *Atphot1siz1* wykazał zwiększone amplitudy transmitancji w tych punktach czasowych w porównaniu do mutantu kontrolnego *Atphot1*.

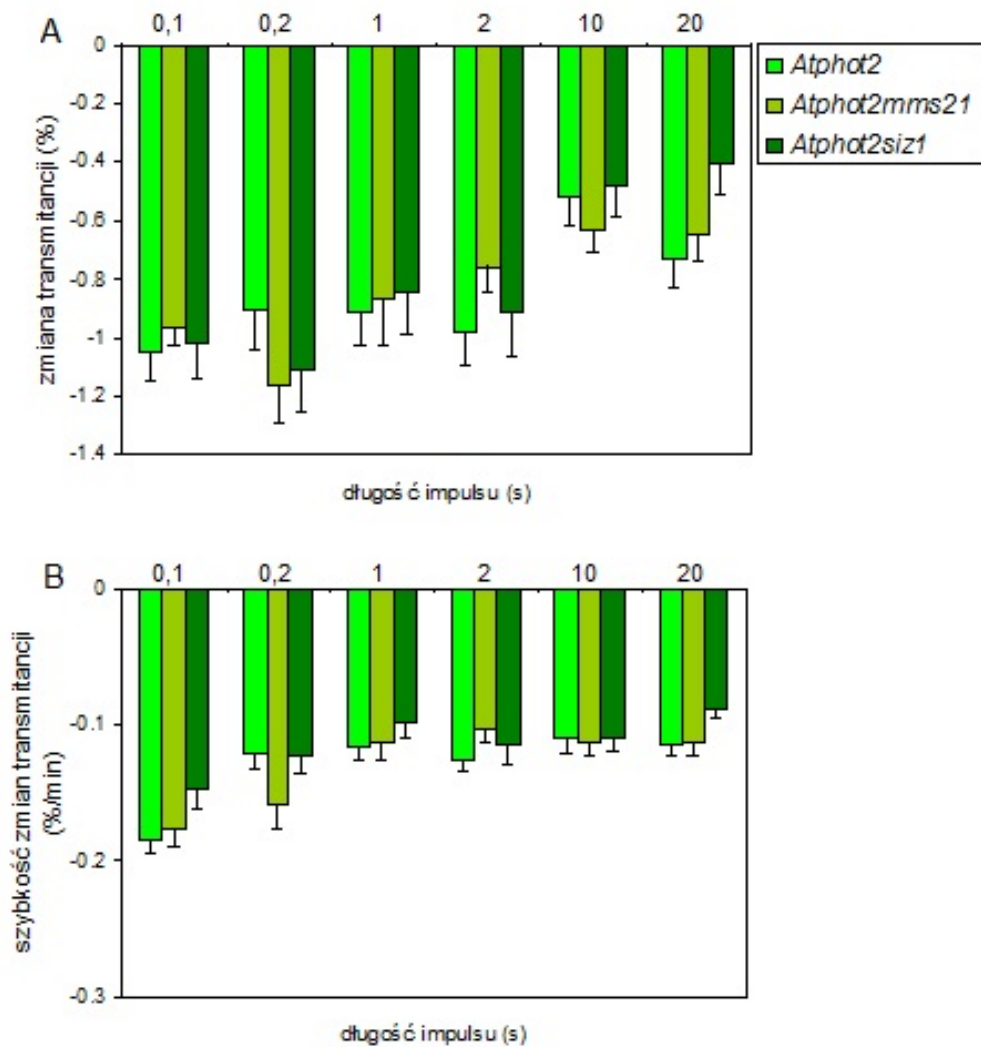
Z kolei odpowiedzi na impulsy światła zarejestrowane dla mutantów na tle genetycznym *Atphot2* (Rys. 24.) nie wykazały istotnych statystycznie różnic w stosunku do kontroli, ani w amplitudach transmitancji, ani w prędkościach ruchów chloroplastów. W mutancie *Atphot2mms21* dla impulsu trwającego 0,2 s można zauważyć zwiększoną amplitudę

transmitancji oraz prędkość, nie są to jednak różnice istotne statystycznie.

Mutant *Atpi11* wykazał wyższe amplitudy transmitancji niż dziki typ, jednak nie są to istotne różnice. Mutant *Atpi12* wykazywał odpowiedzi charakterystyczne dla dzikiego typu (Rys. 25.).

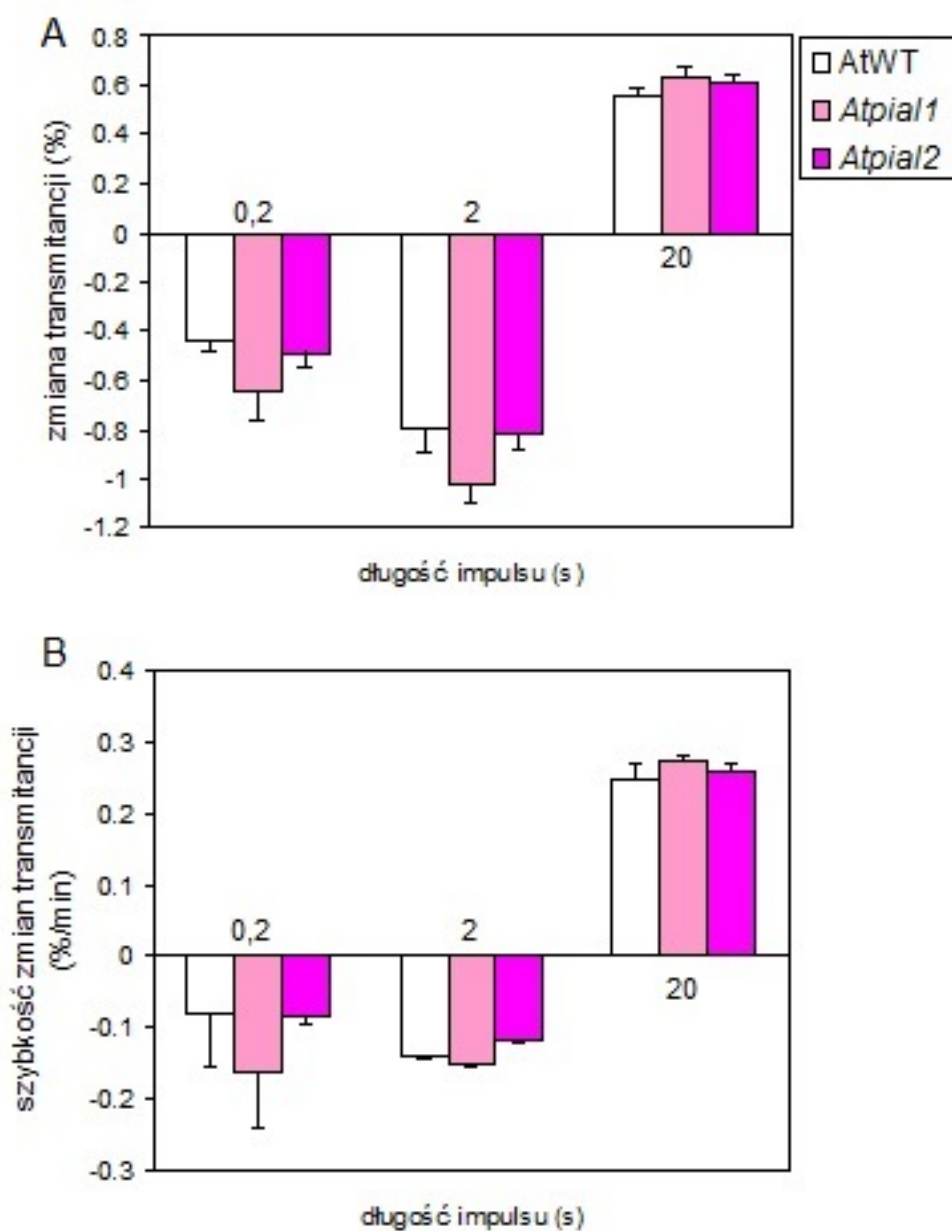


**Rys. 23.** Odpowiedzi chloroplastów na krótkie impulsy światła niebieskiego: 0,1; 0,2; 1; 2; 10; 20 s w mutantach z brakiem funkcjonalnej fototropiny1: *Atphot1*, *Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*. A: zmiana transmitancji światła czerwonego przez liść. B: początkowa szybkość zmiany transmitancji. Każdy słupek odpowiada średniej z minimum 10 pomiarów. Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Gwiazdki wskazują na istotność statystyczną różnic pomiędzy mutantem *Atphot1* stanowiącym kontrolę, a badanymi mutantami podwójnymi: ‘\*’ 0.05. Istotność obliczono przy użyciu testów Anova i Dunnetta.



**Rys. 24.** Odpowiedzi chloroplastów na krótkie impulsy światła niebieskiego: 0,1; 0,2; 1; 2; 10; 20 s w mutantach z brakiem funkcjonalnej fototropiny2: *Atphot2*, *Atphot2mms21*, *Atphot2siz1*. A: zmiana transmitancji światła czerwonego przez liść. B: początkowa szybkość zmiany transmitancji. Każdy słupek odpowiada średniej z minimum 10 pomiarów. Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Brak istotności statystycznej uzyskanych wyników obliczony przy użyciu testu Anova.





**Rys. 25.** Odpowiedzi chloroplastów na krótkie impulsy światła niebieskiego: 0,2; 2; 20 s w dzikim typie i mutantach *Atpial1* i *Atpial2*. A: zmiana transmitancji światła czerwonego przez liść. B: początkowa szybkość zmiany transmitancji. Słupki przedstawiają średnią z minimum 10 pomiarów. Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Brak istotności statystycznej uzyskanych wyników obliczony przy użyciu testu Anova.

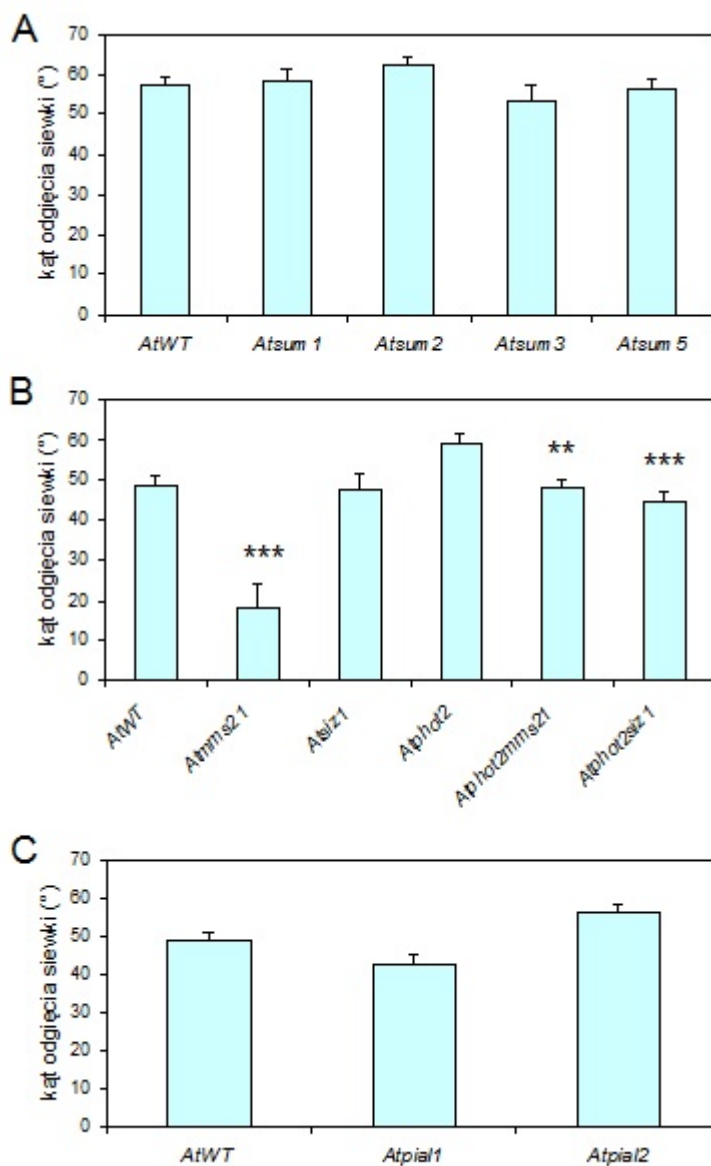
#### 4.7. Analiza fototropizmu w mutantach szlaku sumoilacji oraz w mutantach podwójnych - fototropin i ligaz SUMO.

Wpływ elementów szlaku sumoilacji na fototropizm był badany w etiolowanych siewkach. Reakcję fototropizmu analizowano w mutantach SUMO: *Atsum1*, *Atsum2*, *Atsum3* i *Atsum5*; mutantach podwójnych: *Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*, *Atphot2mms21* i *Atphot2siz1* oraz pojedynczych ligazowych: *Atmms21*, *Atsiz1*, *Atpial1*, *Atpial2*. Eksperyment przeprowadzono w dwóch ustawieniach z lateralnym oświetleniem niebieskim o natężeniu  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  oraz o natężeniu  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Niskie natężenie światła miało na celu wykazać różnice w reakcji fototropiny1, natomiast wyższe natężenie światła miało wykazać różnice w funkcjonowaniu fototropiny2. Dane literaturowe wskazują, że w siewkach fototropina2 kontroluje fototropizm przy świetle o natężeniu już od ok.  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Harada i Shimazaki 2007). Wyznaczano kąt wygięcia fototropicznego u minimum 50 siewek każdego rodzaju w danych warunkach świetlnych. Wyniki przedstawiono w formie średnich i histogramów dla poszczególnych linii.

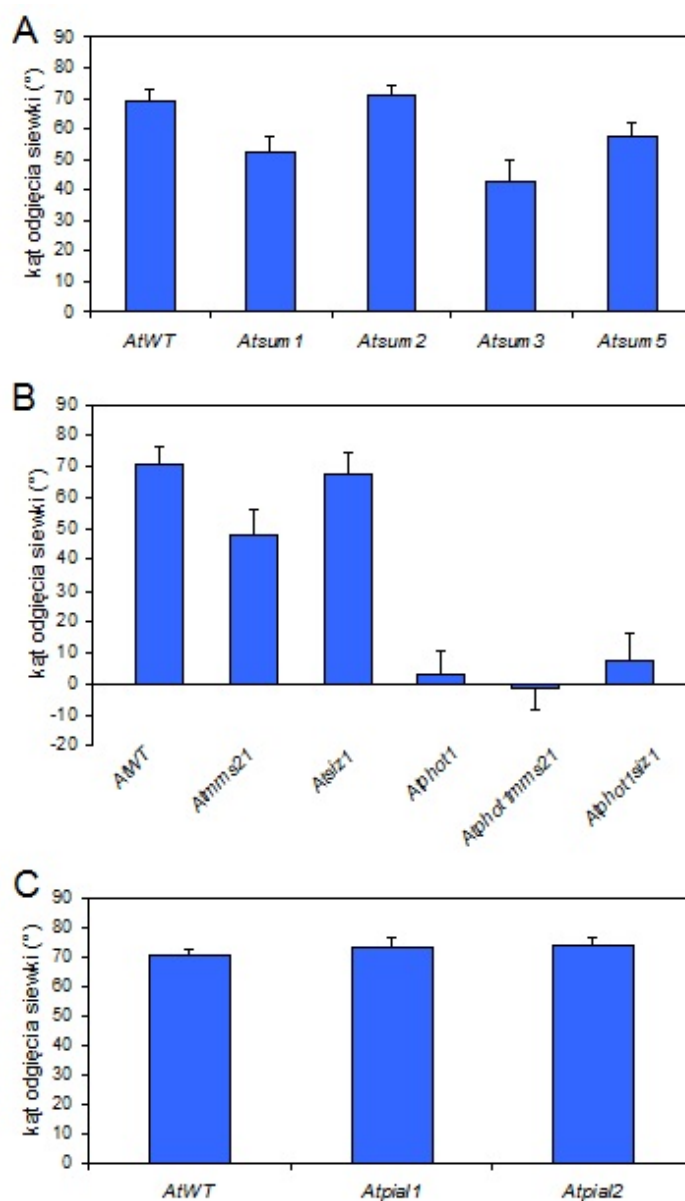
Siewki mutantów SUMO w odpowiedzi na światło o natężeniu  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  odginały się średnio o: *Atsum1* -  $58^\circ$ , *Atsum2* -  $62^\circ$ , *Atsum3* -  $54^\circ$ , *Atsum5* -  $56^\circ$ . Są to kąty odgięcia zbliżone do kąta dla dzikiego typu, który wyniósł  $57^\circ$ , nie wykazano różnic istotnych statystycznie (Rys. 26. A.). Siewki mutantów podwójnych *Atphot2mms21* i *Atphot2siz1* odginały się słabiej o ok.  $11^\circ$  w porównaniu do kontroli, czyli mutantu *Atphot2*, który odgiął się o  $59^\circ$  w odpowiedzi na światło o niskim natężeniu. Dla tych mutantów podwójnych - *Atphot2mms21* i *Atphot2siz1* wykazano różnice istotne statystycznie (Rys. 26. B.). Siewki mutantu ligazowego *Atmms21* odginały się średnio o  $30^\circ$  słabiej w świetle o niskim natężeniu w porównaniu do typu dzikiego, co stanowi reakcję słabszą o ponad 50% (Rys. 26. B.). Siewki mutantu *Atsiz1* odginały się średnio o takie same wartości, jak typ dziki, czyli o ok.  $48^\circ$  (Rys. 26. B.). Mutanty *Atpial1* i *Atpial2* nie wykazały różnic w odpowiedzi siewek na słabe światło w porównaniu do dzikiego typu (Rys. 26. C.).

Spośród mutantów SUMO, jedynie *Atsum2* wykazywał średnią wartość odgięcia fototropicznego siewki o wartość odpowiadającą dzikiemu typowi, czyli o  $71^\circ$ , po naświetlaniu światłem o natężeniu  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Rys. 27. A.). Pozostałe mutanty: *Atsum1*, *Atsum3* i *Atsum5* odginały się słabiej - kolejno o wartości kątów:  $53^\circ$ ,  $43^\circ$ ,  $58^\circ$ , jednak nie były to różnice istotne statystycznie (Rys. 27. A.). Mutanty podwójne odginały się: *Atphot1mms21* o  $2^\circ$  i *Atphot1siz1* o  $7^\circ$ . Były to wyniki porównywalne do kontroli *Atphot1* odginającej się o  $3^\circ$  w odpowiedzi na silniejsze światło, nie uzyskano w tym przypadku różnic istotnych statystycznie (Rys. 27. B.). Siewki mutantu *Atmms21* odginały się o ok.  $20^\circ$

słabiej niż typ dziki, nie były to jednak różnice istotne statystycznie (Rys. 27. B.). Mutanty *Atsiz1* oraz mutanty *Atpia11* i *Atpia2* odginały się o wartości charakterystyczne dla dzikiego typu, czyli o około 70° (Rys. 27. B i C.).



**Rys. 26.** Średni kąt odgięcia siewek *AtWT* i badanych mutantów po 12 h traktowania światłem niebieskim o natężeniu  $0,01 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  dla: A: *Atsum1*, *Atsum2*, *Atsum3*, *Atsum5*; B: *Atmms21*, *Atsiz1*, *Atphot2*, *Atphot2mms21*, *Atphot2siz1*; C: *Atpia11*, *Atpia2*. Słupki przedstawiają średnią z minimum 50 pomiarów. Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Gwiazdki wskazują na istotność statystyczną różnic pomiędzy dzikim typem i mutantem pojedynczym oraz pomiędzy mutantem *Atphot1* stanowiącym kontrolę, a badanymi mutantami podwójnymi: ‘\*\*\*’ 0.001, ‘\*\*’ 0.01, ‘\*’ 0.05. Istotność obliczona przy użyciu testów Anova i Dunnetta.

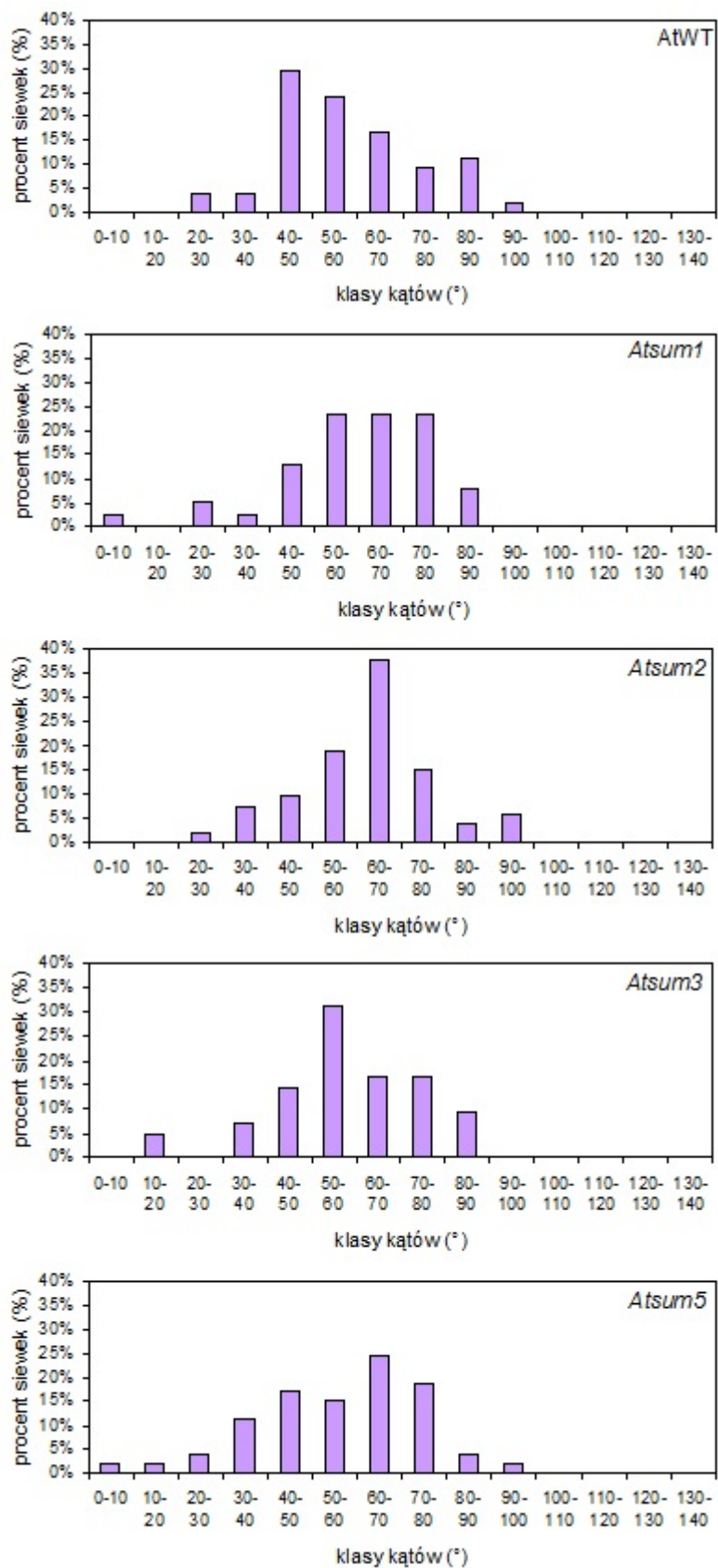


**Rys. 27.** Średni kąt odgięcia siewek *AtWT* i badanych mutantów po 12 h traktowania światłem niebieskim o natężeniu  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  dla A: *Atsum1*, *Atsum2*, *Atsum3*, *Atsum5*; B: *Atmms21*, *Atsiz1*, *Atphot1*, *Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*; C: *Atpial1*, *Atpial2*. Słupki przedstawiają średnią z minimum 50 pomiarów. Słupki błędów oznaczają błędy standardowe dla rozkładu wartości średniej. Brak istotności statystycznej obliczony przy użyciu testów Anova i Dunnetta.

Przedstawiając obliczone wartości kątów odgięcia siewek na histogramach i klasyfikując je w przedziały miar kątów (Zeidler et al., 2016) można uzyskać bardziej precyzyjne dane na temat reakcji siewek badanych mutantów.

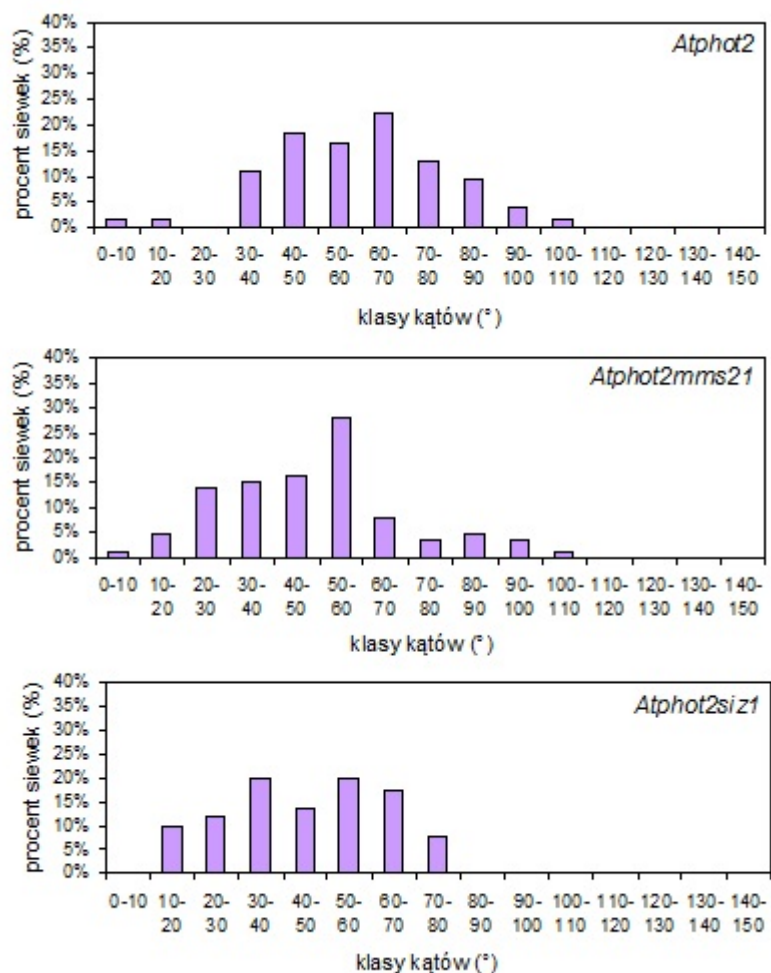
Siewki *AtWT* i mutantów białek SUMO wykazywały reakcje na światło o niskim natężeniu ( $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Rys. 28.). Siewki *AtWT*, odginały się o kąty w zakresie  $40^\circ - 90^\circ$ , mutant *Atsum1* odgiął się jak typ dziki, natomiast *Atsum2*, *Atsum3* i *Atsum5* w zakresie niższych miar kątów, pomiędzy  $30^\circ - 80^\circ$ . Pojedyncze siewki mutantanów *Atsum1* i *Atsum5*

odginały się o kąty o bardzo niskich miarach - poniżej 10°.



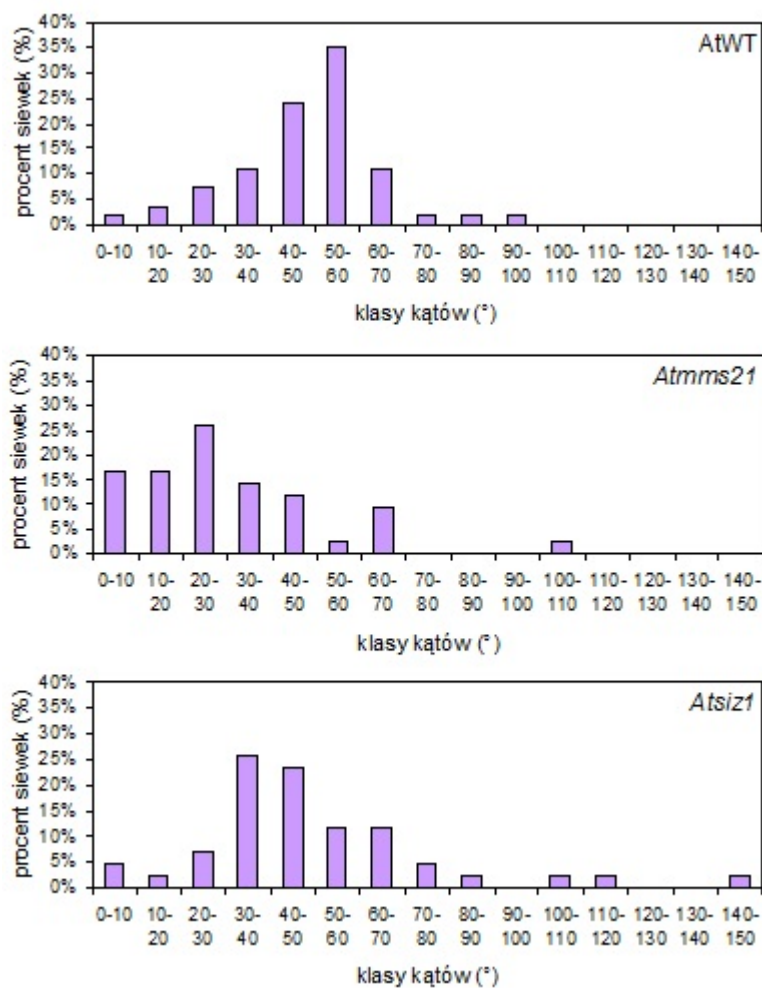
**Rys. 28.** Procent siewek w zależności od klas kątów odgięcia dla *AtWT*, *Atsum1*, *Atsum2*, *Atsum3*, *Atsum5* po 12 godzinach traktowania światłem niebieskim o natężeniu  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nie uwzględniono siewek odginających się w kierunku przeciwnym do kierunku padającego światła.

Mutant *Atphot2* odginał się w szerokim zakresie od 30° - 90° w reakcji na światło słabe (0,01  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Mutant podwójny *Atphot2mms21* charakteryzował się niższymi wartościami kątów odgięcia siewek niż *Atphot2*, w zakresie miar kątów: 20° - 70° (Rys. 29.). Siewki mutantu podwójnego *Atphot2siz1* również wykazywały fototropizm w niższym zakresie miar kątów: 10° - 80° niż mutant pojedynczy *Atphot2* (30° - 90°), wykazując tym samym podwyższoną wrażliwość na słabe światło (Rys. 29.).



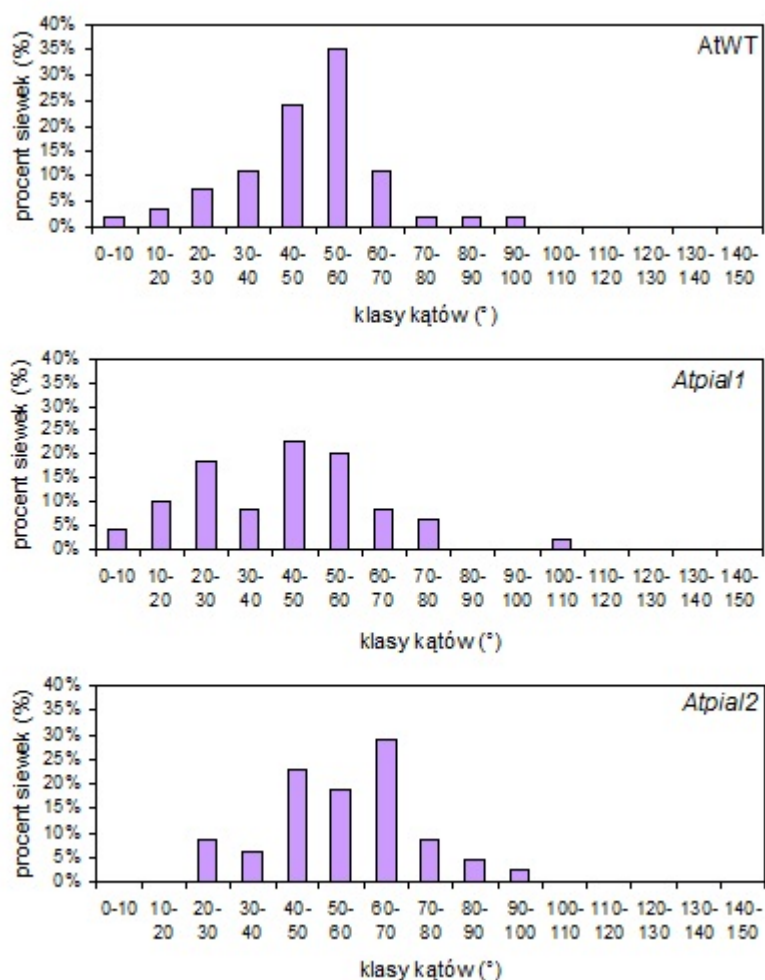
**Rys. 29.** Procent siewek w zależności od klas kątów odgięcia dla *Atphot2*, *Atphot2mms21* i *Atphot2siz1* po 12 godzinach traktowania światłem niebieskim o natężeniu 0,01  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nie uwzględniono siewek odginających się w kierunku przeciwnym do padającego światła.

Rośliny dzikiego typu odginały się najczęściej o kąt zawarty w przedziałach 20° - 70° w odpowiedzi na światło o niskim natężeniu ( $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Rys. 30.). Mutanty ligazowe *Atmms21*, *Atsiz1* odginały się słabiej niż typ dziki (Rys. 30.). Siewki mutantu *Atmms21* odginały się najczęściej o wartości kątów sklasyfikowanych w przedziałach 0°- 50°. Siewki *Atsiz1* odginały się w zakresie 20° - 70°, natomiast częściej o niższe miary kątów niż typ dziki. Pojedyncze siewki obu mutantów odginały się o kąty powyżej 100°, co nie było obserwowane w dzikim typie.



**Rys. 30.** Procent siewek w zależności od klas kątów odgięcia dla *AtWT*, *Atmms21* i *Atsiz1* po 12 godzinach traktowania światłem niebieskim o natężeniu  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nie uwzględniono siewek odginających się w kierunku przeciwnym do padającego światła.

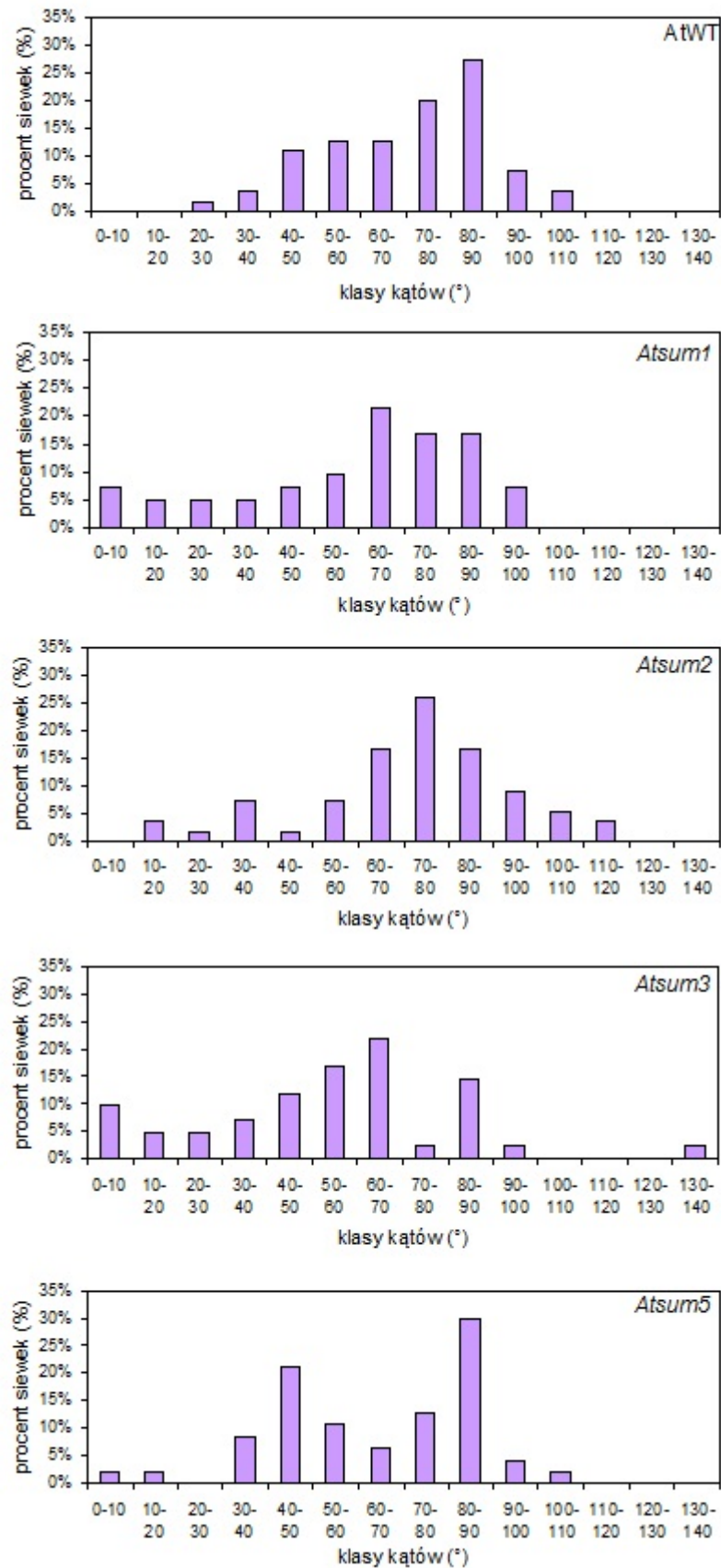
W odpowiedzi na światło o słabym natężeniu siewki dzikiego typu odginały się w zakresie  $20^{\circ}$  -  $70^{\circ}$ . Siewki *Atpial1* wykazały dwa maksima reakcji w zakresie miar kątów od  $10^{\circ}$  -  $40^{\circ}$  i  $40^{\circ}$  -  $80^{\circ}$ . Siewki *Atpial2* odginały się w zakresie szerszym o klasę kątów w porównaniu z dzikim typem:  $20^{\circ}$  -  $80^{\circ}$  (Rys. 31.).



**Rys. 31.** Procent siewek w zależności od klas kątów odgięcia dla *AtWT*, *Atpial1* i *Atpial2* po 12 godzinach traktowania światłem niebieskim o natężeniu  $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nie uwzględniono siewek odginających się w kierunku przeciwnym do padającego światła.

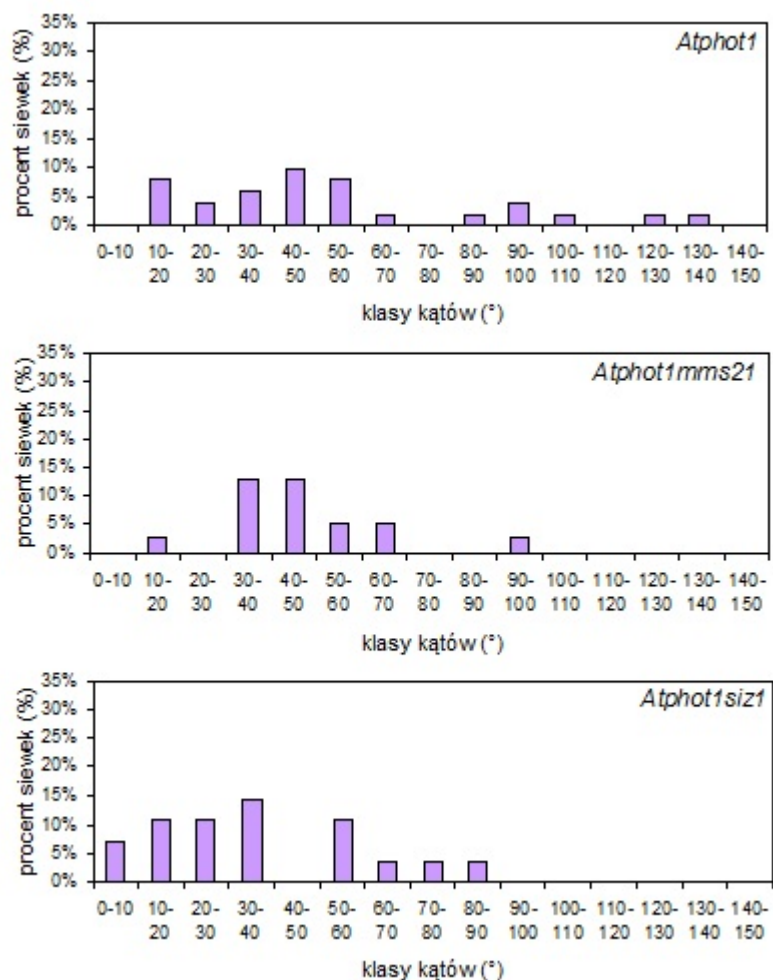
W odpowiedzi na światło o natężeniu  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  typ dziki odgiął się pomiędzy  $40^{\circ}$ , a  $100^{\circ}$  (Rys. 32.). Mutanty *Atsum1* i *Atsum3* odginały się słabiej niż typ dziki, rozpoczynając od najniższych miar kątów zawartych pomiędzy  $0^{\circ}$  -  $10^{\circ}$ . Mutant *Atsum2* odgiął się silniej w porównaniu do dzikiego typu, w zakresie  $50^{\circ}$  -  $100^{\circ}$ , niewielka część siewek odgięła się o miary kątów zawarte pomiędzy  $30^{\circ}$  -  $40^{\circ}$ . Mutant *Atsum5* wykazał dwa maksima reakcji w przedziałach:  $30^{\circ}$  -  $60^{\circ}$  i  $60^{\circ}$  -  $90^{\circ}$  (Rys. 32).





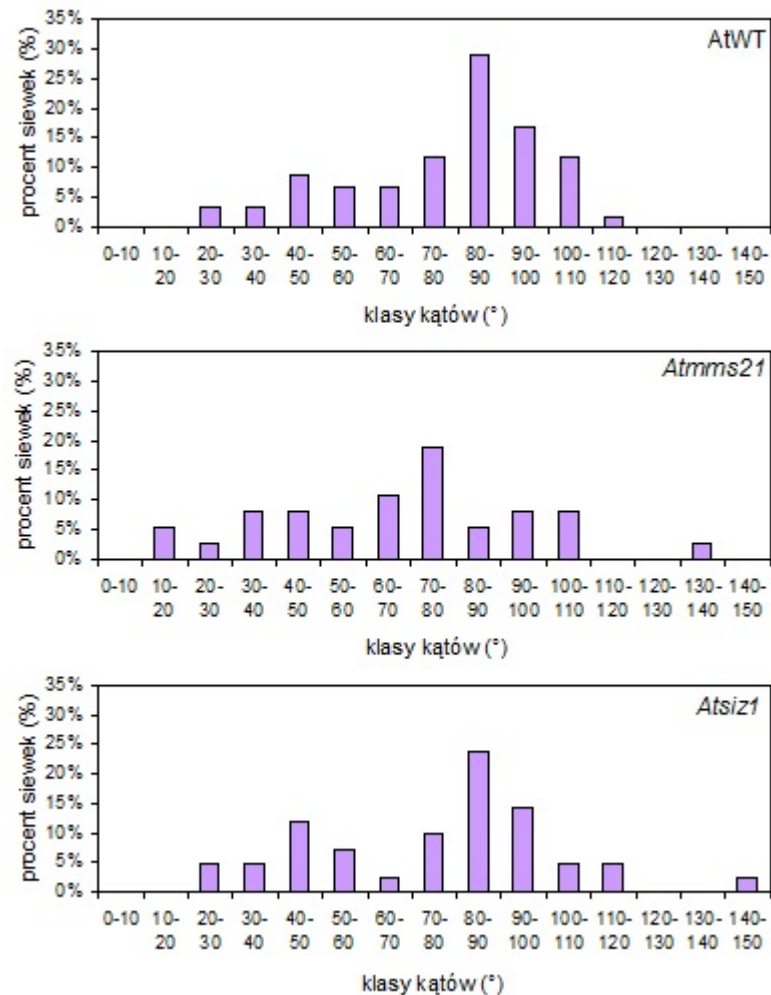
**Rys. 32.** Procent siewek w zależności od klas kątów odgięcia dla *AtWT*, *Atsum1*, *Atsum2*, *Atsum3*, *Atsum5* po 12 godzinach traktowania światłem niebieskim o natężeniu  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nie uwzględniono siewek odginających się w kierunku przeciwnym do padającego światła

W odpowiedzi na światło o natężeniu  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  *Atphot1* odginał się w bardzo szerokim zakresie  $10^\circ - 140^\circ$ , mutanty podwójne *Atphot1mms21* i *Atphot1siz1* odginały się bardzo słabo, zaczynając od kątów ok.  $10^\circ$  dla *Atphot1mms21* oraz od poniżej  $10^\circ$  dla *Atphot1siz1*. Oba mutanty nie odginały się jednak o kąty o dużych miarach – kąty leżały maksymalnie w klasach  $90^\circ - 100^\circ$  dla *Atphot1mms21* i  $80^\circ - 90^\circ$  dla *Atphot1siz1* (Rys. 33.)



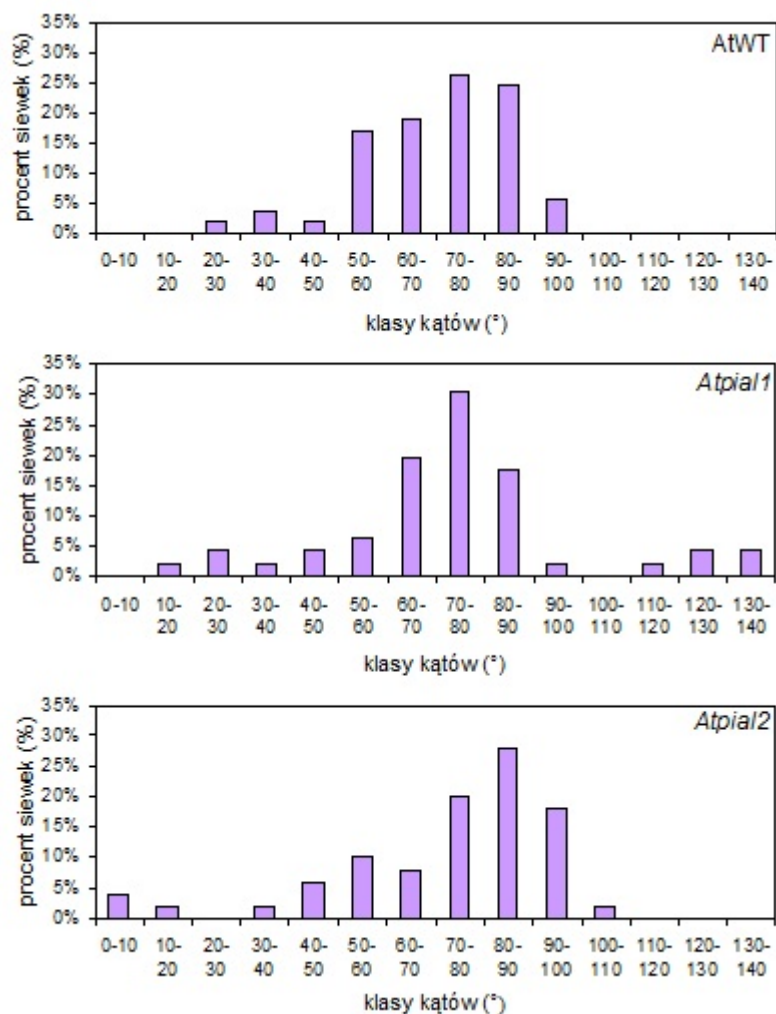
**Rys. 33.** Procent siewek w zależności od klas kątów odgięcia dla *Atphot1*, *Atphot1mms21* i *Atphot1siz1* po 12 godzinach traktowania światłem niebieskim o natężeniu  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nie uwzględniono siewek odginających się w kierunku przeciwnym do padającego światła.

Siewki typu dzikiego w odpowiedzi na światło o wyższym natężeniu ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) odginały się o kąty w zakresie około  $40^\circ$ - $110^\circ$ . Mutant *Atmms21* odginał się słabiej w porównaniu z dzikim typem, siewki odginały się w o kąty zawarte pomiędzy  $10^\circ$ - $110^\circ$ . W *Atsiz1* siewki odginały się w zakresie pomiędzy  $20^\circ$ -  $120^\circ$  (rys. 34).



**Rys. 34.** Procent siewek w zależności od klas kątów odgięcia dla *AtWT*, *Atmms21* i *Atsiz1* po 12 godzinach traktowania światłem niebieskim o natężeniu  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nie uwzględniono siewek odginających się w kierunku przeciwnym do padającego światła.

Siewki *AtWT* najczęściej reagowały na światło silniejszym odgięciem w przedziale 50° - 100°. Mutant *Atpia11* odgiął się w szerszym zakresie rozpoczynającym się o klasę niż niż typ dziki: 40° - 90°, występowały również siewki odginające się w zakresie niskim: 20° - 30° i w zakresie wyższym 120° - 140°, co nie miało miejsca w dzikim typie. *Atpia2* odgiął się w szerszym zakresie niż dziki typ 40° - 100° (Rys. 35.). Siewki w tym mutancie odgięły się w niewielkim stopniu o kąty pomiędzy: 0° - 20° oraz 40° - 50°, inaczej niż siewki dzikiego typu.



**Rys. 35.** Procent siewek w zależności od klas kątów odgięcia dla *AtWT*, *Atpia1* i *Atpia2* po 12 godzinach traktowania światłem niebieskim o natężeniu 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nie uwzględniono siewek odginających się w kierunku przeciwnym do padającego światła.

## 5. Dyskusja wyników

### 5.1. Fototropina1 jest substratem w procesie sumoilacji według programów bioinformatycznych i jest modyfikowana przez SUMO w systemie *in vitro*.

Analizy przeprowadzone z wykorzystaniem trzech programów bioinformatycznych wykazały, że fototropina1 może być substratem do modyfikacji przez białka z rodziny SUMO. Programy wskazywały potencjalne miejsca kowalencyjnej sumoilacji oraz miejsca niekowalencyjnej interakcji z białkami SUMO (Zhao et al., 2014). Większość ze zidentyfikowanych miejsc to znaleziony w sekwencji fototropiny1 motyw  $\Psi$ KXE/D lub motyw interakcji IVL. Miejsce o wysokim prawdopodobieństwie modyfikacji potwierdzone przez dwa programy to K284. Znajduje się w obrębie domeny LOV1. Biorąc pod uwagę, że lizyny K125, K790, K761 zostały również wskazane przez dwa niezależne programy, można wysunąć przypuszczenie, że sumoilacja w tych miejscach może zachodzić z dużym prawdopodobieństwem. Wymienione trzy lizyny leżą kolejno przed domeną LOV1, na N-końcu phot1 oraz w centrum aktywnym kinazy serynowo treoninowej. Miejsca potencjalnej interakcji SIM znajdowały się wyłącznie na C-końcu fototropiny1.

Potwierdzono, że N-końcowy fragment fototropiny1 może ulegać modyfikacji przez białka SUMO w systemie bakteryjnym. Badania N-końcowego fragmentu PHOT1 przeprowadzono w obecności enzymów niezbędnych w procesie sumoilacji, jednego z białek: SUMO1, SUMO2, SUMO3 i SUMO5 oraz jednej z ligaz: MMS21 lub SIZ1. Potwierdzono modyfikację N-końcowego fragmentu fototropiny1 z udziałem ligazy MMS21 przez izoformy SUMO2, SUMO3 i SUMO5. Uzyskane wyniki sugerują, że MMS21 wpływa na szereg reakcji kontrolowanych przez PHOT1 poprzez modyfikację przez wszystkie formy SUMO. Do funkcji ligazy MMS21 należy m.in.: regulacja podziałów komórkowych i cyklu komórkowego u *Arabidopsis* (Huang et al., 2009). Grzyb *Candida albicans* nie posiadający funkcjonalnego genu *mms21* nie ma zdolności do naprawy DNA po uszkodzeniach światłem UV lub nadtlakiem wodoru i wykazuje wysoką wrażliwość na stres temperaturowy (Islam et al., 2019). W przypadku modyfikacji z udziałem MMS21 obserwowano prawdopodobnie frakcje zarówno monosumoilowane oraz multi/polisumoilowane z udziałem SUMO2. Wniosek wysunięto na podstawie różnic w masie sumoilowanych produktów. Powyżej prążków o masie odpowiadającej badanemu fragmentowi fototropiny1 pojawiają się prążki o większej masie, co świadczy o związaniu się przeciwciał do frakcji N-końcowej PHOT1 zmodyfikowanej kowalencyjnie przez białka SUMO.

Modyfikacja N-końcowego fragmentu PHOT1 zachodziła przy udziale ligazy SIZ1 przez izoformy o najważniejszym znaczeniu fizjologicznym: SUMO1, SUMO2 oraz przez SUMO5 (Saracco et al. 2007). Biorąc pod uwagę silny fenotyp mutantu *Atsiz1* oraz udział ligazy SIZ1 w modyfikacji fototropiny1 przez SUMO1 i SUMO2 można spekulować, że ligaza ta bierze udział w ścieżce przekazu sygnału świetlnego u roślin.

W *Arabidopsis* izoformy SUMO1 i SUMO2 są względem siebie w dużym stopniu konserwatywne, a ich funkcje częściowo się nakładają. SUMO3 charakteryzuje mniejszy stopień podobieństwa do SUMO1 i SUMO2, natomiast forma SUMO5 uważana jest za najmniej konserwatywną w porównaniu do SUMO1, SUMO2 i SUMO3. Według danych literaturowych SUMO3 wykazuje słabszą koniugację do białek niż SUMO1 i 2, a SUMO5 cechuje najniższy poziom koniugacji. Ponadto SUMO3 i SUMO5 słabiej tworzą oddziaływania niekowalencyjne *in vitro*. Są to ważne różnice z punktu widzenia funkcjonalności tych białek (Castano-Miquel et al., 2011). SUMO są syntetyzowane jako niedojrzałe białka z C-końcowym fragmentem o zmiennej długości (około 2-11 aminokwasów). Na etapie dojrzewania, fragment ten jest odcinany celem odsłonięcia dwóch glicyn będących miejscem przyłączenia substratu. W eksperymencie z użyciem ligazy MMS21 zaobserwowano prążki odpowiadające modyfikacji N-końcowego fragmentu fototropiny1 w obecności SUMO1AA, czyli kontroli negatywnej, która zamiast dwóch glicyn na C-końcu posiadała dwie alaniny, teoretycznie uniemożliwiające przyłączenie SUMO do badanego białka. W eksperymencie z ligazą SIZ1 efekt ten również obserwowano dla SUMO1AA. Podobny wynik obserwowano w przypadku badań nad fototropiną2 w obecności ligazy MMS21. Sztatelman (2012) sugeruje, że u roślin motyw dwóch glicyn nie jest niezbędny do sumoilacji. Zarówno SUMO1, jak i SUMO3 wykazują powinowactwo do enzymu aktywującego SCE1 (Castaño-Miuel et al., 2011). Sformułowano hipotezę, że w obecności ligaz, które stabilizują oddziaływania SUMO z SCE1, może dochodzić do koniugacji nawet po zmianie istotnych aminokwasów (Sztatelman, 2012). Glicyna i alanina są podobnymi, chemicznie obojętnymi aminokwasami z niepolarnym łańcuchem bocznym i zbliżoną wartością promieni van der Waalsa, co może tłumaczyć przyłączanie się białek SUMO poprzez dwie alaniny. Jest to jedynie przypuszczenie, które nie zostało potwierdzone doświadczalnie.

Podsumowując, eksperyment z wykorzystaniem systemu bakteryjnego potwierdził przesłanki z analizy bioinformatycznej, że fototropina1 może ulegać sumoilacji w N-końcowej części.

## 5.2. Fototropina1 oddziałuje z elementami szlaku sumoilacji.

W kolejnym eksperymencie potwierdzono, że fototropina1 oddziałuje z białkami: SUMO1, SUMO2, SUMO3 oraz ligazami MMS21 i SIZ1. Wykorzystano metodę dwucząsteczkowej komplementacji fluorescencji (BIFC). Według danych literaturowych białka SUMO1, SUMO2 oraz ligaza MMS21 wykazują lokalizację jądrową i cytoplazmatyczną (Lois et al., 2003; Huang et al., 2009). SUMO3 lokalizuje się na otoczce jądrowej oraz w cytoplazmie (Strzałka et al., 2012). SIZ1 znajduje się wyłącznie w jądrze (Miura et al., 2005). Zbadano oddziaływanie fototropiny1 z białkami SUMO1, SUMO2, SUMO3 i SUMO5 oraz ligazami MMS21 i SIZ1. Przygotowane zostały konstrukty wyłącznie z N-końcowym fragmentem białka GFP na N-końcu SUMO. Na C-końcu białka SUMO znajdują się dwie glicyny, które są miejscem przyłączania substratu, więc nie należało tego miejsca blokować poprzez przyłączenie fragmentów GFP.

Silne oddziaływanie zaobserwowano pomiędzy fototropina1 i SUMO1 w cytoplazmie, podbłonowo oraz na powierzchni otoczki jądrowej. Oddziaływanie o średnim natężeniu wystąpiło pomiędzy PHOT1 i SUMO2 oraz PHOT1 i SUMO3. Interakcje te obserwowano wyłącznie pod błoną komórkową. Nie odnotowano oddziaływań pomiędzy fototropina1 i SUMO5. Wynik ten nie jest zaskakujący. Jak dotąd brakuje doniesień na temat fizjologicznego znaczenia białka SUMO5. Mutant *Atsum5* nie wykazuje w stosunku do dzikiego typu różnic fenotypowych, takich jak kształt i rozmiar liści, wielkość rozety czy przyspieszony lub opóźniony proces starzenia. Słabe oddziaływanie zlokalizowane wyłącznie w jądrze zaobserwowano pomiędzy cGFPMMS21 i nGFPPHOT1; silne oddziaływanie w jądrze oraz oddziaływanie o średnim natężeniu w cytoplazmie zarejestrowano dla kombinacji MMS21cGFP i nGFPPHOT1, natomiast oddziaływanie pomiędzy nGFPMMS21 i PHOT1cGFP występowały wyłącznie w cytoplazmie i charakteryzowały się średnim natężeniem. Oddziaływanie pomiędzy PHOT1 i ligazą SIZ1 wykazały wyłącznie lokalizację jądrową, przy czym w kombinacji SIZ1cGFP z nGFPPHOT1 obserwowano silny sygnał fluorescencyjny w całym jądrze, a w kombinacji SIZ1cGFP z PHOT1nGFP silny sygnał fluorescencyjny był zlokalizowany w jądrze, w pojedynczych punktach. W *Arabidopsis* ligaza SIZ1 odpowiada za przyłączanie izoform SUMO1 i 2 do białek docelowych (Miura et al., 2005). Mutanty *Atsum1sum2* są letalne, co dowodzi, że białka te są niezbędne w rozwoju roślin i regulacji funkcji fizjologicznych (Saracco et al., 2007). Wyniki otrzymane metodą BiFC, dotyczące interakcji fototropiny1 z białkami SUMO są zgodne z przewidywaniami otrzymanymi przy użyciu programów bioinformatycznych.

W eksperymencie dotyczącym oddziaływań pomiędzy fototropina1 i elementami szlaku

sumoilacji, rośliny nie były przed obserwacjami adaptowane do ciemności i pochodziły z fotoperiodu hodowlanego. Umożliwiło to obserwację wszystkich możliwych lokalizacji fototropiny1. Niezwykle ważny jest wynik pokazujący, że fototropina1 może przyjmować lokalizację jądrową. Fototropina1 w ciemności zasocjowana jest z błoną komórkową, na świetle niewielka jej frakcja ulega internalizacji na drodze endocytozy (Roberts et al., 2011; Preuten et al., 2015). Dotychczas nie potwierdzono doświadczalnie lokalizacji fototropiny1 w jądrze komórkowym. Możliwe, że w wyniku sumoilacji pewne frakcje phot1 lokalizują się także w jądrze. Uzyskane wyniki pozwoliły na wysunięcie wniosku, że fototropina1 może przyjmować lokalizację jądrową podczas oddziaływaniu z ligazą MMS21 lub SIZ1. Konsekwencje przyłączania SUMO do białka docelowego są różnorodne i obejmują regulację lokalizacji komórkowej (Castano-Miquel et al., 2011). W przypadku pierwszego potwierzonego substratu modyfikowanego przez SUMO - zwierzęcego RanGAP udowodniono, że poprzez sumoilację GTPaza ta jest w sposób odwracalny kierowana do jądra. Sumoilacja reguluje zatem zmianę lokalizacji pomiędzy formą jądrową białka a cytoplazmatyczną (cyt. za Saracco et al., 2007).

Za pomocą metody BiFC wykazano lokalizację jądrową fototropiny2 w przypadku jej koekspresji z ligazą ubikwityny COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1) podczas infekcji wirusowej (Jeong et al., 2010). COP1 jest wielofunkcyjną ligazą, działającą jako główny represor fotomorfogenezy, który odpowiada za kierowanie do degradacji fotoreceptorów phyA, cry2 oraz czynników transkrypcyjnych kontrolujących fotomorfogenezę (Joeng et al. 2010). SIZ1 również działa w roślinach jako wielofunkcyjna ligaza, regulująca odpowiedzi na szerokie spektrum czynników stresowych m.in. na stres temperaturowy lub niedobór fosforanów (Kurepa et al., 2003; Miura et al., 2007). Dowiedziono, że obie ligazy: COP1 i SIZ1 oddziałują ze sobą (Lin et al., 2016). SIZ1 pośredniczy w sumoilacji ligazy COP1, co wzmacnia aktywność COP1. Z tego powodu mutanty *Atsiz1* wykazują słaby fenotyp fotomorfogenetyczny. Sumoilowany COP1 charakteryzuje się podwyższoną zdolnością do ubikwitynacji innych białek, o czym świadczy podwyższony poziom białka HY5, które jest celem ligazy COP1 w mutancie *Atsiz1*. Prawdopodobnie mechanizm ten służy prawidłowemu rozwojowi fotomorfogenetycznemu w zmieniających się warunkach światła (Lin et al., 2016). Interakcja fototropiny2 z COP1 wskazuje, że fototropina2 może być regulowana w sposób pośredni poprzez sumoilację ligazy COP1.

Na funkcje fotoreceptorów wpływa w znacznym stopniu ilość fotoreceptora związanego z błoną komórkową. Endocytoza jest ważnym mechanizmem regulującym sygnalizację komórkową z błony komórki. Niewiele wiadomo na temat szlaku sekrecyjnego



fotoreceptorów. Zarówno phot1, jak i phot2 oddziałują z klatryną (Kaiserli et al., 2009; Roberts et al., 2011; Aggarwal et al., 2014) wskazując na możliwość, że indukowana światłem niebieskim internalizacja fototropin prowadzi do endocytozy zależnej od klatryny. Wyniki badań z zastosowaniem inhibitorów są zgodne z tą hipotezą dla phot1 (Roberts et al., 2011), ale nie dla phot2 (Aggarwal et al., 2014).

Interakcja PHOT1 z ligazami MMS21 i SIZ1 wskazuje na udział tych ligaz w regulacji odpowiedzi na światło niebieskie sterowanych przez phot1. Poziomy koniugatów białek z SUMO1 i SUMO2 zwiększają się pod wpływem stresu takiego jak szok termiczny, nadtlenek wodoru czy etanol (Kurepa et al., 2003). Zasugerowano, że proces sumoilacji, zwłaszcza kontrolowany przez ligazę SIZ1 odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi roślin na stres (Saracco et al., 2007). Należy podkreślić, że światło staje się czynnikiem stresowym dla roślin jeśli występuje w niedomiarze lub w nadmiarze. Nie można wykluczyć, że niektóre ligazy (COP1, MMS21, SIZ1) kierują fototropiny do jądra pod wpływem stresu. W przyszłości należałoby odpowiedzieć na pytanie czy pozostałe białka funkcjonujące jako ligazy SUMO jak: PIAL1 i PIAL2 wpływają na translokację fototropiny1 do jądra komórkowego.

### **5.3. Brak poszczególnych elementów szlaku sumoilacji zmienia poziom i stabilność fototropin w *Arabidopsis*.**

Po wstępnym potwierdzeniu sumoilacji fototropiny1, sprawdzono czy elementy szlaku sumoilacji wpływają na ilość białek PHOT1 i PHOT2 oraz na ich stabilność w ciemności i na świetle. Poziomy fototropin zbadano w dzikim typie i mutantach ligazowych: *Atmms21*, *Atsiz1*, *Atpial1*, *Atpial2* w ciemności po 0, 1, 3, 5 i 7 h oraz po naświetlaniu światłem białym ( $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) przez 1, 3, 5 i 7 h.

W mutancie *Atsiz1* poziom białka fototropiny1 jest o około połowę mniejszy w porównaniu do typu dzikiego. W pozostałych mutantach ligazowych poziom PHOT1 w ciemności jest podobny, uwzględniając duże wartości błędów standardowych. Mutanty *Atmms21* oraz *Atpial1* wykazywały zmniejszoną ilość białka fototropiny1 w porównaniu do typu dzikiego we wszystkich punktach czasowych tj: po 1, 3, 5 i 7 h zarówno w ciemności jak i na świetle. Ekspresja białka PHOT1 w mutancie *Atpial2* była zbliżona do rośliny WT w ciemności i na świetle. Według literatury w roślinach dzikiego typu ekspresja PHOT1 maleje na świetle (Sakamoto i Briggs, 2002). W tym eksperymencie można zauważyć, że poziom białka PHOT1 w czasie naświetlań obniżał się.

Ilość białka fototropiny2 w dzikim typie utrzymuje się na stałym poziomie w ciemności, a na świetle wzrasta. W mutantach *Atsiz1*, *Atpial1* i *Atpial2* nie odnotowano wzrostu ekspresji

PHOT2 na świetle w stosunku do jego poziomu w ciemności. Wskazuje to na zmienioną regulację ilości PHOT2 na świetle w wymienionych mutantach. Poziom PHOT2 w ciemności jest wyższy w mutancie *Atpial1* w porównaniu z dzikim typem. *Atmms21* wykazuje zmniejszony poziom PHOT2 w ciemności w porównaniu do typu dzikiego, natomiast mutant *Atpial2* wykazał poziom porównywalny z dzikim typem. W przypadku *Atsiz1* poziom PHOT2 zmniejszał się podczas naświetlań. W mutancie *Atpial2* ilość białka fototropiny2 utrzymywała się na względnie stałym poziomie w czasie trwania eksperymentu, zarówno w ciemności jak i na świetle, co wskazuje na brak regulacji ekspresji fotoreceptora. W mutancie *Atsiz1* poziom białka obniżał się z czasem, co również wskazuje na odmienną regulację ilości PHOT2 niż w typie dzikim.

W kolejnym eksperymencie zbadano poziom białek fototropin w ciemności dla mutantów *Atsum1*, *Atsum2*, *Atsum3* i *Atsum5*. Porównywalną ekspresję białka PHOT1 z dzikim typem zaobserwowano wyłącznie w mutancie *Atsum3*. Pozostałe mutanty wykazały zwiększony poziom białka fototropiny1 w porównaniu z WT. Mutant *Atsum5* wykazał dwukrotnie wyższy poziom PHOT1 niż typ dziki. W przypadku PHOT2 można stwierdzić, że mutanty najważniejszych fizjologicznie form SUMO, czyli *Atsum1* i *Atsum2* wykazują zbliżoną do typu dzikiego ilość PHOT2 w ciemności. Rośliny *Atsum3* i *Atsum5* wykazały wyższy poziom PHOT2 w porównaniu do dzikiego typu.

Eksperyment weryfikujący ekspresję białek fototropin był próbą znalezienia odpowiedzi na pytanie czy sumoilacja reguluje ilość fototropin w roślinach jako modyfikacja potranslacyjna. Szybkość reakcji ucieczki chloroplastów sterowanej przez fototropinę2 zależy od ilości tego fotoreceptora w komórce (Kimura i Kagawa, 2009). Reakcje kontrolowane przez fototropinę1 zależą od poziomu fotoreceptora (Doi et al., 2004). W niniejszej pracy nie zaobserwowano efektu zwiększenia szybkości lub amplitudy ruchów chloroplastów, które mogłyby być skorelowane z podwyższonym poziomem ciemnościowym białka PHOT1 w mutancie *Atsum5*.

Fototropiny charakteryzują się różną wrażliwością na światło niebieskie. Fototropina1 reguluje odpowiedzi w niższych natężeniach światła od  $0.08 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; a fototropina2 odpowiada za reakcje w przy wyższych natężeniach światła, od  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Ekspresja obu fototropin kształtuje się odmiennie i jest związana z ich reakcjami na różne natężenia światła. Na świetle zmniejsza się ekspresja *PHOT1*, natomiast zwiększa się ekspresja *PHOT2* jako przystosowanie do regulacji odpowiedzi w wyższych natężeniach światła (Kagawa et al., 2001; Łabuz et al., 2012). SUMO może brać udział w kontroli transkrypcji (Castro et al., 2012). Eksperyment sprawdzający poziomy mRNA fototropin przeprowadzono dla mutantów ligazowych i mutantów SUMO.

W roślinach typu dzikiego poziom *PHOT1* na świetle maleje w stosunku do wyjściowego poziomu fototropiny1 w ciemności (Łabuz et al., 2012). We wszystkich badanych mutantach, wzór regulacji ekspresji fototropiny1 na poziomie mRNA na świetle został zachowany. W każdym z badanych mutantów poziom transkryptu *PHOT1* zmniejszał się po 3-godzinym naświetlaniu. Należy zwrócić uwagę na ogólny wyższy poziom transkryptu *PHOT1* w mutantach ligazowych: *Atmms21*, *Atpial2* i *Atsiz1* w ciemności. Na świetle poziom transkryptu fototropiny2 wzrasta (Łabuz et al., 2012). W eksperymencie uzyskano taką regulację ekspresji *PHOT2* przez światło dla mutantów ligaz MMS21, SIZ1 oraz dla mutantów SUMO. W badanych mutantach regulacji tej nie zaobserwowano tylko w *Atpial1* i *Atpial2*. Mutanty białek PIAL wykazały odmienną regulację, poziom *PHOT2* obniżył się po trzech godzinach naświetlania. Jak dotąd nie udało się zidentyfikować czynników transkrypcyjnych biorących udział w regulacji ekspresji fototropin.

Poziom transkryptu oraz białka fototropiny1 malał po 3 godzinach naświetlania w dzikim typie. Ten sam wzór regulacji ekspresji genów światłem wykazuje *Atmms21* i *Atsiz1*. Warto jednak zwrócić uwagę, że są widoczne różnice w ekspresji fototropin na poziomie białka w porównaniu do poziomu mRNA. W przypadku mutantów ligaz PIAL zmniejszony poziom transkryptu *PHOT1*, a następnie zwiększony poziom białka w porównaniu do typu dzikiego może sugerować zaburzony proces degradacji fototropin. Różnice w ekspresji na poziomie białka w porównaniu do mRNA dostrzeżono także dla fototropiny2 w mutancie *Atsiz1* - ilość białka PHOT2 spadała na świetle, natomiast poziom mRNA ulegał zwiększeniu. Ekspozycja na światło o wysokim natężeniu mogła być dla roślin stresująca, a mutant nie wytwarzający ligazy SIZ1, charakteryzuje się zmienioną wrażliwością na stres (Saracco et al., 2007). Jedną z przypuszczalnych funkcji sumoilacji jest ochrona białek przed degradacją. Być może w warunkach stresowych, brak ligazy odpowiadającej za tworzenie koniugatów w warunkach stresu skutkuje zwiększeniem degradacji niektórych białek. W mutancie *Atsiz1* zaobserwowano obniżone ilości białek obu fototropin w porównaniu do WT, nie tylko na świetle. Brak ligazy SIZ1 może skutkować więc zwiększoną degradacją białek, gdyż poziomy transkryptów fototropin kształtowały się na zbliżonym poziomie do WT. Obniżenie ilości białka fototropiny1 na świetle jest prawdopodobnie związane z desensytyzacją receptora i zachodzi na poziomie białka poprzez poliubikwitynację i degradację w proteasomie 26S (Roberts et al., 2011).

Powyższe różnice wymagają przeprowadzenia bardziej szczegółowych badań. Można jednak przypuszczać, że na poziom fototropin w komórce ma wpływ ich sumoilacja. Należy także pamiętać, że sumoilacja reguluje inne białka i kontrolowane przez nie odpowiedzi, co może pośrednio wpływać na ekspresję fototropin. Modyfikacje fototropin przez sumoilację, a także

regulacja ilości fototropin poprzez inne ścieżki sygnałowe mogą zachodzić równocześnie.

#### **5.4. Elementy szlaku sumoilacji wpływają na reakcje fizjologiczne kontrolowane przez fototropiny:**

##### 5.4.1. Wpływ elementów szlaku sumoilacji na ruch chloroplastów.

Analiza ruchów chloroplastów w mutantach podwójnych - fototropinowych i ligazowych pozwoliła na ocenę wpływu braku danej ligazy na funkcjonowanie aktywnej fototropiny, z wykluczeniem wpływu drugiej z fototropin.

Badano odpowiedzi chloroplastów na światło ciągłe - krzywą "dawka-efekt" w mutantach *Atphot1*, *Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*, *Atphot2*, *Atphot2mms21* i *Atphot2siz1*. Mutant *Atphot1mms21* wykazał osłabioną reakcję akumulacji chloroplastów przy najniższym natężeniu światła  $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  w porównaniu do mutanta pojedynczego *Atphot1*. Reakcja akumulacji kontrolowana jest przez obie fototropiny, natomiast fototropina2 uaktywnia się w wyższych natężeniach światła (od  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Sakai et al., 2001). Wynik sugeruje wpływ ligazy MMS21 na regulację reakcji akumulacji chloroplastów, w sposób zależny od fototropiny2. Mutant *Atphot1siz1* wykazał słabszą reakcję ucieczki chloroplastów przy natężeniach światła 20 i  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  w porównaniu do *Atphot1*. Słabsza reakcja ucieczki w mutancie podwójnym wskazuje, że SIZ1 może regulować reakcje kontrolowane przez fototropinę2 lub ilość białka PHOT2. Na regulację ilości białka PHOT2 może wskazywać wynik uzyskany w niniejszej pracy pokazujący obniżający się w czasie poziom białka PHOT2 w ciemności i na świetle w mutancie *Atsiz1*. Osłabienie przy braku ligazy SIZ1 reakcji chloroplastów na wyższe natężenia światła, tj. reakcji które mają za zadanie chronić roślinę przed zbyt intensywnym oświetleniem, może być kolejnym argumentem na powiązanie aktywności tej ligazy z reakcjami roślin na stres, w tym przypadku na stres świetlny (Saracco et al., 2007). Badania przy użyciu mutantów *Atphot2mms21* i *Atphot2siz1* pozwoliły na ocenę wpływu ligaz na funkcjonowanie ścieżki przekazu sygnału prowadzącej od fototropiny1 do reakcji akumulacji chloroplastów. W obu mutantach ta reakcja jest słabsza niż w mutancie *Atphot2*. Efekt ten jest istotny dla *Atphot2siz1* przy najniższym natężeniu światła  $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Może on być powiązany z wykazanym w tej pracy niższym poziomem PHOT1 w ciemności przy braku ligazy SIZ1. Sumoilacja ochrania białka przed degradacją, a ligaza SIZ1 odpowiada za tworzenie koniugatów z białkami SUMO (Jentsch i Pyrowolakis 2000; Saracco et al., 2007).

Ruchy chloroplastów w świetle ciągłym analizowano także w mutantach pojedynczych ligaz

PIAL1 i PIAL2. Nie stwierdzono istotnych różnic w reakcjach akumulacji i ucieczki w stosunku do roślin dzikiego typu, co pozwala wnioskować, że ligazy te nie są istotne dla regulacji szlaku sygnałowego prowadzącego do ruchu chloroplastów.

Zmierzono także odpowiedzi chloroplastów na krótkie impulsy światła niebieskiego o natężeniu  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  w mutantach: *Atphot1*, *Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*, *Atphot2*, *Atphot2mms21*, *Atphot2siz1*, *Atpial1*, *Atpial2*. Mutanty pojedyncze *Atpial1* i *Atpial2* nie wykazały żadnych różnic w odpowiedziach na impulsy światła w porównaniu do dzikiego typu. Możliwe więc, że ligazy te nie wpływają na ruch chloroplastów lub ich funkcje nakładają się w dużym stopniu i jedna ligaza kompensuje brak drugiej. Stwierdzono osłabienie kinetyki reakcji akumulacji w mutancie *Atphot1siz1* w odpowiedzi na impulsy świetlne 0,2 s i 1 s w porównaniu do *Atphot1*. Stanowi to kolejne potwierdzenie, że SIZ1 bierze udział w regulacji odpowiedzi chloroplastów na światło poprzez wpływ na fototropinę2. W porównaniu z kontrolą, którą stanowił mutant *Atphot2*, mutanty podwójne *Atphot2mms21*, *Atphot2siz1* nie wykazały żadnych różnic w odpowiedziach na impulsy światła. Różnice odnotowywano wyłącznie w mutantach podwójnych przy braku fototropiny1. Można więc powiedzieć, że ligaza SIZ1 odgrywa niewielką rolę w regulacji ruchów chloroplastów kontrolowanych przez fototropinę2. Możliwe, że osłabienie ruchów chloroplastów wynika z wpływu komponentów szlaku sumoilacji na inne szlaki sygnałowe wpływające na ruch.

Ruchy chloroplastów są modulowane przez fitochromy (DeBlasio et al. 2003). FitochromB odgrywa rolę w zahamowaniu reakcji ucieczki, czyli pośrednio hamuje fototropinę2 (Luesse et al., 2010). Wykazano, że fitochromB jest sumoilowany na C-końcu (Sadanandom et al., 2012). Rośliny *Arabidopsis* zawierające fitochromB z lizyną zmutowaną do argininy w pozycji 966 czyli miejscu przyłączania SUMO (*AtphyBLys996Arg-YFP*) wykazywały zwiększoną wrażliwość na światło czerwone w porównaniu z WT, zatem sumoilacja negatywnie reguluje szlak sygnałowy zależny od fitochromuB (Sadanandom et al., 2012). Wskazuje to na możliwą pośrednią ścieżkę aktywności fototropiny2 przez sumoilację fitochromuB, który jest negatywnym regulatorem reakcji przez nią kontrolowanych.

W roślinach sumoilacja jest zaangażowana w reakcje na bodźce środowiskowe, w tym stres temperaturowy, suszy, solny, a także reguluje poziom kwasu abscysynowego i innych hormonów. Kwas abscysynowy (ABA) może wzmacniać odpowiedzi chloroplastów na silne światło, a także obniżać poziom mRNA *PHOT1* w ciemności (Eckstein et al., 2016). SIZ1 może wpływać na ruch chloroplastów poprzez regulację szlaku sygnałowego fototropin lub poprzez działanie na szlak sygnałowy ABA, który reguluje ruch chloroplastów. Udokumentowano sumoilację czynnika transkrypcyjnego ABI5 z udziałem ligazy SIZ1.

Mutanty *Atsiz1* wykazują zahamowanie wzrostu zależne od poziomu ABA. Geny regulowane poprzez ABI5 ulegają nadmiernej ekspresji w tym mutancie, wskazując na epistatyczną interakcję pomiędzy SIZ1 i ABI5 (Miura et al., 2011). Ponadto wykazano, że ligaza MMS21 odgrywa rolę w reakcji na stres suszy, prawdopodobnie poprzez regulację ekspresji genów indukowanych przez ABA (Zhang et al., 2013). Indukowana przez ABA akumulacja koniugatów białkowych z białkami SUMO została zablokowana w mutancie *Atmms21* (Zhang et al., 2013). Wyniki te wskazują na możliwość pośredniej regulacji fototropin poprzez sumoilację białek regulujących szlak ABA, który wpływa na poziom lub/i reakcje kontrolowane przez fototropiny (Eckstein et al., 2016).

Ligaza SIZ1 jest negatywnym regulatorem zawartości auksyn i kontroluje przebudowę korzenia w odpowiedzi na ograniczenie fosforanów. W mutancie *Atsiz1* w odpowiedzi na niedobór fosforanów zahamowaniu ulega wydłużenie korzenia pierwotnego, następuje natomiast rozrost korzeni bocznych. Taki fenotyp udało się uzyskać dla dzikiego typu podczas niedoboru fosforanów z równoczesną suplementacją auksynami. Dodatkowo analiza mikromacierzy wykazała w mutancie *Atsiz1* podniesiony poziom ekspresji genów regulowanych auksynami (Miura et al., 2011). Wyniki te wskazują, że sumoilacja wpływa na działanie auksyn oraz reakcje przez nie regulowane. Auksyny z kolei wpływają na strukturę i dynamikę cytoszkieletu aktynowego, który odpowiada za ruch chloroplastów kontrolowany przez fototropiny (Holweg et al., 2004). Zaburzenie homeostazy auksyn poprzez dekapitację pędu wpływa na obniżenie parametrów ruchów chloroplastów. Parametry te wracają do normy po dostarczeniu egzogennej auksyny (Eckstein et al., 2016b). Można spekulować, że wpływ sumoilacji na ruch chloroplastów może pośrednio wynikać z regulacji działania i ilości auksyn w roślinach. Nadal jednak istotną kwestią do rozwiązania pozostaje, czy sumoilacja reguluje ścieżkę przekazu sygnału od fototropin, aktywność fotoreceptora czy sam mechanizm ruchu.

#### 5.4.2. Wpływ elementów szlaku sumoilacji na fototropizm.

Fototropizm zbadano w mutantach SUMO, ligazowych: *Atmms21*, *Atsiz1*, *Atpial1* i *Atpial2* oraz mutantach podwójnych: *Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*, *Atphot2mms21* i *Atphot2siz1* przy dwóch natężeniach światła niebieskiego. Światło o niskim natężeniu ( $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) miało aktywować fototropinę1, światło o natężeniu  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  – fototropinę2.

Przy niskim natężeniu światła ( $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), siewki typu dzikiego odginały się średnio o kąt  $49^\circ$ . Siewki mutantu *Atmms21* odginały się średnio o  $31^\circ$  słabiej od siewek typu dzikiego, czyli o  $18^\circ$ . Wynik świadczy o tym, że ligaza MMS21 może regulować reakcję

fototropiczną siewek w sposób zależny od fototropiny1. Siewki mutantu *Atsiz1* odginały się średnio o 47° czyli średnia miara kątów była porównywalna z WT. Siewki mutantu *Atpi11* odginały się średnio o 42°. Jest to wartość niższa niż dla dzikiego typu, co znaczy, że brak ligazy PIAL1 wpływa na fototropizm siewek, jednak w dużo mniejszym stopniu niż MMS21. Wyższe wartości kąta zgięcia siewek uzyskano wyłącznie dla mutantu *Atpi2* - siewki odginały się średnio o 56°. Wynik ten pozwala na spekulację o potencjalnej negatywnej regulacji aktywności fototropiny1 przez ligazę PIAL2. Wymagałoby to najpierw przeprowadzenia eksperymentów weryfikujących czy zachodzi oddziaływanie PHOT1 z PIAL2. Uzyskane wyniki wskazują, że ligaza MMS21 jest zaangażowana w regulację fototropizmu kontrolowanego przez phot1. Nie wiadomo jednak czy regulacja ta zachodzi poprzez bezpośrednie oddziaływanie fototropiny1 z ligazą MMS21. Obliczono również kąty wygięcia fototropicznego pod wpływem słabego światła dla siewek mutantów podwójnych *Atphot2mms21* i *Atphot2siz1* i kontroli *Atphot2*. Mutant *Atphot2* odginał się średnio o 59°, silniej niż typ dziki, co wskazuje na hamujące działanie fototropiny2 względem fototropiny1. Mutant *Atphot2mms21* charakteryzował się niższą średnią wartością kąta fototropicznego niż *Atphot2*, siewki odginały się średnio o 48°. Jest to wynik porównywalny z typem dzikim, a jednocześnie jest to wartość pomiędzy kątami obserwowanymi w mutantach *Atphot2* i *Atmms21*. Wyniki sugerują, że brak ligazy MMS21, osłabiający zdolność do reakcji fototropicznej siewek był kompensowany przez brak fototropiny2. Natomiast *Atphot2siz1* wykazywał średnią wartość odgięcia siewek 44°. Oba mutanty podwójne: *Atphot2mms21* i *Atphot2siz1* odginały się o niższą, średnią wartość kąta niż pojedynczy mutant fototropinowy *Atphot2*. Mutant *Atphot2mms21* odginał się znacznie silniej niż mutant pojedynczy *Atmms21*, a *Atphot2siz1* odginał się słabiej niż *Atsiz1*. Fakt ten można tłumaczyć przeciwnym działaniem fototropiny2 względem fototropiny1 przy niektórych natężeniach światła (Sztatelman et al., 2016). Średnie wartości kątów w mutantach SUMO były porównywalne z wartościami kąta obserwowanego w typie dzikim.

W przypadku wyższego natężenia światła ( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) siewki roślin WT odginały się o średni kąt 71°. Mutant *Atphot1* posiadający funkcjonalną fototropinę2 wykazywał osłabioną odpowiedź fototropiczną, o średniej wartości kąta 3°, z kolei mutant podwójny *Atphot1mms21* wykazał ujemną wartość średniej kątów odgięcia -2°. Bardzo niska i ujemna wartość spowodowana była uwzględnieniem w liczonej średniej wszystkich wartości, które w przypadku *Atphot1* i *Atphot1mms21* były ujemne dla wielu pomiarów, gdyż siewki tych mutantów odginały się w kierunku przeciwnym do padającego światła. Podwójny mutant *Atphot1mms21* wykazywał słabszą reakcję fototropiczną niż pojedynczy *Atphot1*. Mutant *Atphot1siz1* odginał się średnio o 7°, czyli silniej niż kontrola *Atphot1*. Pojedyncze mutanty

tych ligaz wykazały wartości kątów odpowiednio: *Atmms21* 48° oraz *Atsiz1* 68°. Jest to kolejne potwierdzenie wpływu ligazy MMS21 na regulację fototropizmu u *Arabidopsis*. Wniosek jest podobny jak w układzie o niskim natężeniu światła - ligazy MMS21 i SIZ1 pośrednio lub bezpośrednio regulują działanie fototropin w reakcji fototropizmu. Oba mutanty ligazowe *Atpial1* i *Atpial2* wykazały średnią wartość kąta fototropicznego zbliżoną do WT w odpowiedzi na światło niebieskie o natężeniu  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Mutant *Atsum3* odginał się o 27° słabiej niż typ dziki, natomiast mutant *Atsum1* o 17. Według BAR eFP Browser SUMO3 ulega bardzo wysokiej ekspresji w korzeniu i hipokotylu 1-dniowej siewki. Brak funkcjonalnego genu SUMO3 mógłby potencjalnie zmienić odpowiedź fototropiczną siewek *Atsumo3* (Klepikova et al., 2016). W słabszym świetle brak ekspresji SUMO3 w mutancie *Atsumo3* nie wpływa na kąt wygięcia siewki, natomiast w świetle o wyższym natężeniu reakcja w tym mutancie była osłabiona w stosunku do dzikiego typu. Może to wskazywać na regulację fototropizmu przez SUMO3 przy wyższym natężeniu światła.

Powyższe eksperymenty wskazują na regulację fototropizmu przez składniki szlaku sumoilacji, zwłaszcza przez ligazę MMS21 oraz izoformy SUMO1 i SUMO3. Nie można jednak stwierdzić jaki jest charakter tej regulacji. Dotychczas zgromadzone dane na temat fototropizmu potwierdzają zaangażowanie białek NPH3, RPT2 i PKS4. NPH3 jest białkiem niezbędnym przy fototropizmie, które współdziała z PHOT1, PHOT2 i RPT2 (Motchoulski i Liscum 1999; de Carbonell et al., 2010; Inada et al., 2004). Z kolei białko RPT2 współdziała z PHOT1, ale nie z PHOT2 (Inada et al., 2004, Kaiserli i wsp. 2009). Białka zaangażowane w fototropizm, które są fosforylowane przez fototropinę1 to ABCB19 i PKS4 (Christie et al., 2011). Brakuje natomiast doniesień na temat potencjalnej sumoilacji tych białek.

Dane literaturowe wskazują na rolę auksyn w kontroli fototropizmu. Niebieskie światło działając poprzez fototropiny powoduje wytworzenie asymetrycznego gradientu auksyn wzdłuż hipokotyła, co stymuluje komórki do asymetrycznego wydłużania się i prowadzi do kierunkowego wzrostu. Polarny transport auksyn jest możliwy dzięki białkom przenośnikowym PIN (PIN-FORMED), AUX/LAX (AUXIN1/LIKE-AUX1) oraz białkom z rodziny ABCB (ATP-Binding Cassette Subfamily). Asymetryczny rozkład auksyn spowodowany bocznym naświetlaniem indukuje ekspresję genów kodujących  $\alpha$ -ekspansyny - regulujących wydłużanie ścian komórkowych, co skutkuje wygięciem fototropicznym siewki (Kimura i Kagawa, 2006; Stone et al., 2008). Auksyny zaangażowane są w fototropizm, a SIZ1 jest negatywnym regulatorem homeostazy auksynowej, co może skutkować osłabieniem wygięcia fototropicznego siewek w mutantach szlaku sumoilacji (Miura et al., 2011).

Fitochromy A, B i D biorą udział w regulacji fototropizmu (Whippo i Hangarter 2004). Potwierdzono, że fitochrom B jest sumoilowany przez SUMO1, co może mieć również



wpływ na otrzymane wyniki i być argumentem za występowaniem pośredniej regulacji fototropin przez sumoilację phyB (Sadanandom et al., 2015)

Za fototropizm odpowiada w głównej mierze PHOT1 (Sakai et al., 2001). Reakcje kontrolowane przez phot1 zależą od ilości tego fotoreceptora (Doi et al., 2004). Wrażliwość siewek na światło w reakcji fototropicznej określa również aktywność fototropiny1, a etiolowane siewki wykazują wysoki poziom ekspresji tego białka (Sakamoto i Briggs, 2002; Aihara et al., 2008). Z kolei poziom ekspresji białka fototropiny2 wpływa na szybkość reakcji ucieczki chloroplastów, ale również na stopień wygięcia fototropicznego siewek (Kimura i Kagawa, 2009). Upośledzenie reakcji kontrolowanych przez fototropiny może więc być powodowane przez niewłaściwą regulację ich ekspresji w mutantach szlaku sumoilacji. Uzyskane wyniki wskazują, że elementy szlaku sumoilacji, w szczególności ligazy MMS21, SIZ1 i PIAL1 wpływają na reakcję fototropizmu w roślinach. W niniejszej pracy dowiedziono, że poziom ekspresji białka fototropin w liściach mutantów ligaz MMS21, SIZ1 i PIAL1 jest niski, co może świadczyć o regulacji ilości fototropin przez te białka. Wyniki te mogą nasuwać przypuszczenie, że ligazy MMS21, SIZ1, PIAL1 poprzez regulację ilości fototropin wpływają na odpowiedź fototropiczną w siewkach. Należy jednak zaznaczyć, że w pracy ekspresja białek fototropin badana była w liściach dojrzałych roślin, a nie w siewkach.

## 6. Podsumowanie

Modyfikacje potranslacyjne stanowią istotny czynnik regulujący aktywność białek. Wraz z rozwojem badań wzrasta znaczenie sumoilacji w odpowiedzi na stres i w regulacji ścieżek sygnałowych. W dalszym ciągu niezbędna jest identyfikacja partnerów oraz głównego celu tej modyfikacji.

Eksperymenty dotyczące sumoilacji fototropin otwierają ważny rozdział dotyczący regulacji potranslacyjnej tych białek. W niniejszej pracy pokazano modyfikację fototropiny1 przez białka z rodziny SUMO metodami bioinformatycznymi oraz w systemie bakteryjnym. Metodą komplementacji fluorescencji wykazano zachodzenie oddziaływań pomiędzy fototropiną1, a składnikami szlaku sumoilacji. Badania w systemie bakteryjnym oraz metodą komplementacji fluorescencji wykazały udział ligaz MMS21 i SIZ1 w tej modyfikacji, jak również możliwość oddziaływania ligaz MMS21 i SIZ1 z fototropiną1. Bardzo ważny jest wynik pokazujący, że phot1 może przyjmować lokalizację jądrową oddziałując z ligazą MMS21 lub SIZ1. Jest to pierwsze doniesienie w literaturze pokazujące możliwą lokalizację fototropiny1 w jądrze. W pracy wykazano również wpływ poszczególnych elementów szlaku sumoilacji na regulację ekspresji białek obu fototropin. Uzyskane wyniki pozwoliły wstępnie stwierdzić, że brak składowych sumoilacji znajduje odzwierciedlenie w zaburzonych reakcjach fizjologicznych kontrolowanych przez fototropiny, takich jak ruchy chloroplastów oraz fototropizm. Otrzymane wyniki sugerują, że ligazy MMS21 i SIZ1 mogą mieć pośredni lub bezpośredni wpływ na regulację aktywności fototropin w roślinach.

Regulacja odpowiedzi fototropinowych przez sumoilację, w szczególności z udziałem ligazy SIZ1, może być też rozważana w kontekście odpowiedzi roślin na stres świetlny. Fototropiny zaangażowane są w odpowiedzi roślin na światło, będące kluczowym czynnikiem we wzroście i rozwoju. Stacjonarny tryb życia roślin wymaga, aby radziły sobie ze zmieniającym się ciągle środowiskiem. Przy niskich natężeniach światła ulega obniżeniu wydajność fotosyntezy, przy zbyt intensywnych dawkach dochodzi do uszkodzeń aparatu fotosyntetycznego (Takemiya et al., 2005; Christie et al., 2007; Banaś et al., 2012). Skuteczne reakcje adaptacyjne wymagają złożonych mechanizmów regulatorowych na poziomie potranslacyjnym i potranskrypcyjnym. Modyfikacja przez białka SUMO może pełnić istotną rolę w reakcjach adaptacyjnych. Koniugacja z SUMO w szybki sposób modyfikuje białka poprzez zmianę ich stabilności lub interakcji z innymi białkami. Ścieżka ta jest odwracalna dzięki proteazom, które zapewniają także specyficzność substratową procesu (van der Hoorn, 2008; Hickey et al., 2012). Sumoilacja wpływa na wiele szlaków przekazu sygnału u roślin, w

tym hormonalnych, wspomagających wzrost i obronę, co może pośrednio regulować reakcje kontrolowane przez fototropiny, takie jak fototropizm (Miura et al., 2011). Konieczne są dalsze badania w celu zintegrowania informacji o wpływie procesu sumoilacji na fototropiny i reakcje przez nie kontrolowane.

## 7. Dodatek

### Pozostałe odczynniki:

2xPCR Mix (A&A Biotechnology, Polska)  
Ace (Procter & Gamble, Polska)  
Acetosyrignon (Sigma-Aldrich, USA)  
Agar (BTL, Zakład Enzymów i Peptonów, Polska)  
Agaroza (Bioshop, USA)  
Akrylamid/N'N'-metylenobisakrylamid 29:1; roztwór 40% (Sigma-Aldrich, USA)  
APS (POCh, Polska)  
 $\beta$ -merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, USA)  
Błękit bromofenolowy (Sigma-Aldrich, USA )  
 $\text{CaCl}_2$  (POCh, Polska)  
DNA Generuler DNA Ladder D0428 (Thermo Fisher Scientific, USA )  
 $\text{EDTA MgCl}_2$  (POCh, Polska)  
Ekstrakt drożdżowy (BTL, Zakład Enzymów i Peptonów, Polska)  
Ekstrakt wołowy (ICN Biomedicals, USA)  
Etanol (POCh, Polska)  
Gliceryna bezwodna (POCh, Polska)  
Glicyna (Bioshop, USA)  
HCl (POCh, Polska)  
Imidazol (POCh, Polska)  
KCl (POCh, Polska)  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (POCh, Polska)  
Koktajl inhibitorów proteinaz (Complete Tab, Roche, Szwajcaria),  
Kwas 6-amino-kapronowy (Honeywell - Fluka, USA)  
Kwas octowy (POCh, Polska)  
Lizozym (Sigma-Aldrich, USA)  
Medium B5 (Sigma-Aldrich, USA)  
Medium LB (BTL, Zakład Enzymów i Peptonów, Polska)  
 $\text{MgCl}_2$  (POCh, Polska)  
NaCl (POCh, Polska)  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (POCh, Polska)  
MES bufor (Bioshop, USA)  
Metanol (POCh, Polska)

Mleko odtłuszczone (Spółdzielnia mleczarska Gostyń, Polska)  
 Pepton (BTL, Zakład Enzymów i Peptonów, Polska)  
 PIPES (Sigma-Aldrich, USA)  
 PMSF (Serva, Niemcy)  
 Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA)  
 Sacharoza (POCh, Polska)  
 SDS (POCh, Polska)  
 TEMED - 99% roztwór N,N,N',N'-Tetrametyloetylenediaminy (Sigma-Aldrich, USA)  
 Tris (POCh, Polska)  
 Tween20 (Sigma-Aldrich, USA)  
 Witaminy do medium B5 (Sigma-Aldrich, USA)  
 Zestawy do izolacji DNA plazmidowego z bakterii (Thermo Fisher Scientific, USA)  
 Zestaw do izolacji DNA roślinnego (A&A Biotechnology, Polska)

**Tabela 8.** Sekwencje starterów używanych do real-time PCR.

Starter	Sekwencja 5' - 3'	Temperatura przyłączenia startera
RTphot1For	CACTGATCCTAGGCTTCCCG	56°C
RTphot1Rev	GTGGTTAGATCAGTCTCTGGACC	56°C
RTphot2For	GCTACCACTCTTGAGCGCATAGA G	56°C
RTphot2Rev	CCTCGCGTGAATACTCTGTC	56°C
SANDFor	AACTCTATGCAGCATTGATCCA CT	51°C
SANDRev	TGATTGCATATCTTTATCGCCAT C	51°C
PDF2For	TAACGTGGCCAAAATGATGC	51°C
PDF2Rev	GTTCTCCACAACCGCTTGGT	51°C
UBCFor	CTGCGACTCAGGGAATCTTCTAA	51°C
UBCRev	TTGTGCCATTGAATTGAACCC	51°C

**Tabela 9.** Sekwencje starterów używanych do selekcji mutantów *Arabidopsis thaliana*.

Starter	Sekwencja 5'- 3'
SUM1For	TTTCGTGTAGCTGCGATTAGG
SUM1Rev	TTATCTTTGCTCGCCATTAGC
LB1SAIL	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
SUM2For	GTCGGA GAATCG GATTTC TTC
SUM2Rev	TGAGGG TGTGTA TTGGTG GAG
SUM3For	CGATCT GCGATA TAAGCG AAG
SUM3Rev	AAAGCG CTCCAC TTAAAA AGC
SUM5For	AGCCTA ATCTGT TTATCC CGC
SUM5Rev	TTCGAA TCATCC AATCTC CAG
PIAL1For	AAGAAT ATGCCC CAGCTT CAC
PIAL1Rev	GAGAAG AATGGT TATTCC GGC
PIAL2For	TGGTAG TGCCAC CTGAAA AAC
PIAL2Rev	TCAAGT GCGATC ACATCA GAG
PHOT1For	GAGTTT GTACAA AAAAGC AGGC
PHOT1Rev	TGGGTC AAAAAA CATTG TTTGCAG
PHOT2For	GACGCT ACACAG CCTCAC TGTC
PHOT2Rev	TCCCAA CTGTCC CTCTGC CCTATT
SIZ1For	TCCCTC GTAGAC ATCTGA TGG
SIZ1Rev	AAAGAG AGAGTG AGCGAA GGG
MMS21For	AGTTCG CAGGTA CAATGG ATG
MMS21Rev	CTAAAT GCAGAG AATGCG GAC
LBa1	TGGTTC ACGTAG TGGGCC ATCG

Wszystkie startery były zamawiane w firmie Genomed (Polska).

**Tabela 10.** Plazmidy stosowane w systemie rekonstrukcji sumoilacji w bakteriach.

Plazmid	Antybiotyk selekcyjny	Pochodzenie
pET28a c-Myc-6xHis-PHOT1aa	kanamycyna	Olga Sztatelman**
pET15b:MMS21	ampicylina	Wojciech Strzałka*
pMAL:SIZ1	ampicylina	Nam-Hai Chua, The Rockefeller University, New York, USA
pACYCDuet:SAE1b:SAE2	chloramfenikol	Katsunori Tanaka, Kwansei Gakuin University, Gakuen, Japonia (Okada et al., 2009)
pCDFDuet:SUMO1G G:SCE1a	spektynomycyna	
pCDFDuet:SUMO2G G:SCE1a		
pCDFDuet:SUMO3G G:SCE1a		
pCDFDuet:SUMO5G G:SCE1a		
pCDFDuet:SUMO1A A: SCE1a		
pCDFDuet:SUMO2A A: SCE1a		
pCDFDuet:SUMO3A A: SCE1a		
pCDFDuet:SUMO5A A:SCE1a		

### 7.1. Ukompetentnianie bakterii *Escherichia coli*.

W celu przygotowania komórek kompetentnych, bakterie *E. coli* zaszczepiano w 5 ml pożywki LB na całą noc w 37°C z wytrząsaniem ok 190 rpm. Przygotowywano 100 ml świeżej pożywki LB w kolbie o objętości 500 ml, aby zapewnić napowietrzanie. Zaszczepiano 2 ml całonocnej hodowli do świeżej pożywki i prowadzono hodowlę w 37°C z wytrząsaniem, aż do uzyskania gęstości optycznej ok. 0,5 przy 600 nm. Bakterie chłodzono na lodzie 10 min, a następnie wirowano w probówkach typu Falcon przez 40 min w 4°C przy 4000 g (wirówka MPW-350R, MPW, Polska). Po wirowaniu zlewano supernatant, a powstały osad rozpipetowywano delikatnie w 50 ml zimnego buforu do ukompetentniania. Po trwającej 10 min inkubacji na lodzie, bakterie ponownie wirowano, usuwano supernatant, a zwirowany osad bakteryjny rozpipetowywano delikatnie w 5 ml schłodzonego buforu do transformacji. Bakterie porcjowano po 100 µl do inkubowanych na lodzie probówek typu Eppendorf i zamrażano w ciekłym azocie. Tak przygotowane bakterie do transformacji przechowywano w temp. -80°C.

Bufor do ukompetentniania: 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM PIPES, pH 7,0

Bufor do transformacji: 15% glicerol, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM PIPES, pH 7,0

### 7.2. Transformacja komórek kompetentnych *Escherichia coli*.

Kompetentne bakterie *E. coli*, rozmrażano na lodzie. Dodawano 10 ng jednego lub kilku plazmidów, aby objętość dodawanego plazmidu nie przekroczyła 10% objętości komórek kompetentnych (do 10 µl). Delikatnie mieszano i inkubowano do 30 min na lodzie. Następnie, probówki z bakteriami umieszczano w termobloku, w temp. 42°C na 90 s, po czym inkubowano je na łaźni lodowej przez 2 min. Po tym czasie do bakterii dodawano 1 ml pożywki LB i inkubowano przez 1 h w temp. 37°C z wytrząsaniem 180 rpm. Po inkubacji bakterie wirowano przez 1 min przy 7000 rpm i wysiewano na szalkę z pożywką stałą LB z dodatkiem 1% agarozы, z odpowiednimi antybiotykami, aby wyselekcjonować pozytywne kolonie. Szalkę hodowano w 37°C przez całą noc.

Skład pożywki LB: 0,5% ekstrakt drożdżowy, 1% trypton, 1% NaCl, pH 7,2.

### 7.3. Ukompetentnianie *Agrobacterium tumefaciens*.

Celem przygotowania kompetentnych *A.tumefaciens*, bakterie zaszczepiano w 3 ml pożywki YEB z ryfampicyną o stężeniu 50 µg/ml. Bakterie hodowano w 30°C z wytrząsaniem



180 rpm. Po ok. 40 h, 2 ml hodowli zaszczepiano w 100 ml świeżej pożywki YEB z antybiotykiem w kolbie o objętości 500 ml. Bakterie hodowano do uzyskania gęstości optycznej ok. 0,5-1,0. Hodowlę chłodzono na lodzie przez 10 min, po czym wirowano w probówkach typu Falcon przez 20 min w 4°C przy 3000 g (wirówka MPW-350R, MPW, Polska). Zlewano supernatant, a powstały osad delikatnie zawieszano w 50 ml uprzednio schłodzonego buforu TE, po czym bakterie ponownie wirowano. Osad zawieszano w 20 ml schłodzonego buforu TE i wirowano. Powstały osad delikatnie rozpipetowywano w 10 ml schłodzonej pożywce YEB. Bakterie porcjowano po 200 µl do schłodzonych probówek typu Eppendorf i zamrażano w ciekłym azocie. Bakterie przechowywano w -80°C.

TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5

YEB: 0,5 % ekstrakt wołowy, 0,1% ekstrakt drożdżowy, 0,5% pepton, 0,5% sacharoza, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,0

#### 7.4. Transformacja komórek kompetentnych *Agrobacterium tumefaciens*.

W celu stransformowania komórek kompetentnych *A. tumefaciens*, bakterie rozmrażano na lodzie. Do bakterii dodawano 1 µg plazmidu, mieszano i inkubowano na lodzie przez 5 min. Następnie bakterie inkubowano przez 5 min w ciekłym azocie, po czym przenoszono na 5 min do termobloku o temperaturze 37°C. Po tym czasie do bakterii dodawano 1 ml pożywki YEB i prowadzono inkubację w temperaturze 30°C przez 2–5 h z wytrząsaniem 120 rpm. Po inkubacji bakterie wirowano przez 1 min przy 7000 rpm. 100 µl wysiewano na szalkę z pożywką stałą z odpowiednimi antybiotykami w celu selekcji kolonii. Szalkę hodowano w temperaturze 30°C przez 48 h.

#### 7.5. Regeneracja kolumn MobiSpin służących do oczyszczania białka.

Po użyciu, kolumny umieszczano w 20% roztworze podchlorynu "Ace" z dodatkiem płynu do mycia naczyń "Ludwik". Po 24–48 h kolumny płukano dwukrotnie wodą bieżącą, a następnie dwukrotnie wodą destylowaną. Kolumny suszono przez krótkie wirowanie w wirówce Mini Spin. Na kolumny nakładano 500 µl 8 M roztworu mocznika pH 7,5 i inkubowano w temperaturze 95°C przez 7 min. Kolumny wirowano (1 min, 1000 g, Mini Spin) usuwano przesączony roztwór i ponownie nakładano 500 µl roztworu mocznika, po czym ponownie inkubowano 7 minut w termobloku w 95°C. Kolumny wirowano ponownie, zlewano przesączony roztwór, po czym czterokrotnie płukano wodą destylowaną. Po płukaniu kolumnę suszono przez krótkie wirowanie, nakładano 500 µl wody destylowanej i ponownie

wirowano. Przesączoną wodę usuwano, kolumny suszono jak w poprzednim kroku i osuszano ręcznikiem papierowym.

#### 7.6. Elektroforeza RNA i DNA.

Elektroforezę RNA i DNA przeprowadzano w 1% żelu agarozowym, w buforze TAE z dodatkiem barwnika Midori Green o stężeniu 0,002 % (Nippon Genetics, Niemcy) z użyciem markera masy (GeneRuler DNA Marker MIX, Thermo Fisher Scientific, USA). Do każdej próbki zawierającej RNA dodawano 1/2 jej objętości 2x stężonego buforu obciążającego, do próbek zawierających DNA dodawano 1/5 ich objętości 6x stężonego buforu obciążającego (2x RNA GLD, 6x DNA GLD; Thermo Fisher Scientific, USA). Rozdział przeprowadzano w systemie do elektroforezy Mini Sub Cell GT (Biorad, USA) pod napięciem 5 V/cm przez 30 minut.

Bufor TAE: 40 mM Tris, 0,15% kwas octowy, 1 mM EDTA, pH 7,6

## 8. Literatura

- Aggarwal C, Banaś AK, Kasprowicz-Maluśki A, Borghetti C, Łabuz J, Dobrucki J, Gabryś H. (2014) Blue-light-activated phototropin2 trafficking from the cytoplasm to Golgi/post-Golgi vesicles. *J Exp Bot* 65: 3263–3276.
- Aihara Y, Tabata R, Suzuki T, Shimazaki KI, Nagatani A. (2008) Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2. *The Plant J* 56: 364–375.
- Anielska-Mazur A, Bernaś T, Gabryś H. (2009) *In vivo* reorganization of the actin cytoskeleton in leaves of *Nicotiana tabacum* L. transformed with plastin-GFP. Correlation with light-activated chloroplast responses. *Plant Biol* 9:64.
- Augustynowicz J, Lekka M, Burda K, Gabryś H. (2001) Correlation between chloroplast motility and elastic properties of tobacco mesophyll protoplasts. *Acta Physiologiae Plantarum* 23: 291-302.
- Banas AK, Aggarwal C, Łabuz J, Sztatelman O, Gabryś H. (2012) Blue light signalling in chloroplast movements. *J Exp Bot* 63: 1559–1574.
- Baum G, Long JC, Jenkins GI, Trewavas AJ. (1999) Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *PNAS* 23: 12554-13559.
- Beauclair G, Bridier-Nahmias A, Zagury JF, Zamborlini A. (2015) JASSA: a comprehensive tool for prediction of SUMOylation sites and SIMs, 31: 3483–3491.
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, PeerWA, Makam SN, Murphy AS. (2004) Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses. *Plant Physiol* 134:28–31.
- Blomster H, Hietakangas V, Wu J, Kouvonen P, Hautaniemi S, Sistonen L. (2009) Novel Proteomics Strategy Brings Insight into the Prevalence of SUMO-2 Target Sites. *Mol Cell Proteomics* 8: 1382-1390.
- Bogre L, Okresz L, Henrigues R, Anthony RG. (2003) Growth signalling pathways in *Arabidopsis* and the AGC protein kinases. *Trends in Plant Sci* 8: 424-431.
- Budhiraja R, Hermkes R, Müller S, Schmidt J, Colby T, Panigrahi K, Coupland G, Bachmair A. (2009) Substrates Related to Chromatin and to RNA-Dependent Processes Are Modified by Arabidopsis SUMO Isoforms That Differ in a Conserved Residue with Influence on Desumoylation. *Plant Physiol* : <https://doi.org/10.1104/pp.108.135053>

- Castano-Miquel L, Segui J, Lois LM. (2011) Distinctive properties of *Arabidopsis* SUMO paralogues support the in vivo predominant role of AtSUMO1/2 isoforms. *Biochem J* 436: 581-590.
- Castro PH, Tavares RM, Bejarano RB, Azevedo H. (2012) SUMO, a heavyweight player in plant abiotic stress responses. *Cell Mol Life Sci* 69: 3269–3283.
- Castro PH, Santos MA, Freitas S, Cana-Quijada P, Lourenço T, Rodrigues MAA, Fonseca F, Ruiz-Albert J, Azevedo JE, Tavares RM, Castillo AG, Bejarano ER, Azevedo H. (2018) *Arabidopsis thaliana* SPF1 and SPF2 are nuclear-located ULP2-like SUMO proteases that act downstream of SIZ1 in plant development. *J Exp Bot* 69: 4633–4649.
- Catala R, Ouyang J, Abreu IA, Hu Y, Seo H, Zhang X, Chua NH. (2007) The *Arabidopsis* E3 SUMO Ligase SIZ1 Regulates Plant Growth and Drought Responses. *Plant Cell*: <https://doi.org/10.1105/tpc.106.049981>
- Chang C, Naik MT, Huang YS, Jeng JC, Liao PH, Kuo HY, Ho CH, Hsieh Y, Lin CH, Naik NM, Kung CH, Lin AY, Chen RH, Chang KS, Huang TH, Shih HM. (2011) Structural and Functional Roles of Daxx SIM Phosphorylation in SUMO Paralog-Selective Binding and Apoptosis Modulation. *Mol Cell* 42: 62-74.
- Chen X, Lin WH, Wang Y, Luan S, Xue HW, (2008) An inositol polyphosphate 5-phosphatase functions in PHOTOTROPIN1 signaling in *Arabidopsis* by altering cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *The Plant Cell* 20: 353-366.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plants Sci* 12: 441-451.
- Chosed R, Mukherjee S, Lois LM, Orth K. (2006) Evolution of a signalling system that incorporates both redundancy and diversity: *Arabidopsis* SUMOylation, *Biochem J* 3: 521-529.
- Christie JM. (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol* 58:21–45.
- Christie JM, Blackwood L, Petersen J, Sullivan S. (2015) Plant Flavoprotein Photoreceptors. *Plant Cell Physiol* 56: 401–413.
- Christie JM, Reymond P, Powell GK, Bernasconi P, Raibekas AA, Liscum, E, Briggs WR. (1998) *Arabidopsis* NPH1: A Flavoprotein with the Properties of a Photoreceptor for Phototropism. *Science* 282: 1698–1701.

- Christie JM, Swartz TE, Bogomolni RA, Briggs WR. (2002) Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J* 32: 205-219
- Christie JM, Yang H, Richter GL, Sullivan S, Thomson CE, Lin J, Titapiwatanakun B, Ennis M, Kaiserli E, Lee OR, Adamec J, Peer WA, Murphy AS. (2011) phot1 inhibition of ABCB19 primes lateral auxin fluxes in the shoot apex required for phototropism. *PLOS Biology* 9: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001076>
- Colby T, Mattha A, Boeckelmann A, Stuinle HP. (2006) SUMO-Conjugating and SUMO-Deconjugating Enzymes from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*: <https://doi.org/10.1104/pp.106.085415>
- Conti L, Price G, O'Donnell E, Schwessinger B, Dominy P, Sadanandom A. (2008) Small Ubiquitin-Like Modifier Proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 Regulate Salt Stress Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*: <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058669>
- Craig KL, Tyers M. (1999) The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Prog Biophys Mol Biol* 72: 299–328.
- Cubeñas-Potts C, Matunis MJ. (2013) SUMO: A Multifaceted Modifier of Chromatin Structure and Function. *Dev Cell* 24:1-12.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. (2005) Genomewide identification and testing of superior reference genes for transcript normalisation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139: 5-17.
- DeBlasio SL, Luesse DL, Hangarter RP. (2005) A plant-specific protein essential for blue-light-induced chloroplast movements. *Plant Physiol* 139:101
- DeBlasio SL, Mullen JL, Luesse DR, Hangarter RP. (2003) Phytochrome modulation of blue light-induced chloroplast movements in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133: 1471-1479.
- de Carbonnel M, Davis P, Roelfsema MRG, Inoue S, Schepens S, Lariguet P, Geisler M, Shimazaki K, Hangarter R, Fankhauser C. (2010) The *Arabidopsis* PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE2 protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning. *Plant Physiol* 152: 1391–1405.
- Demarsy E, Schepens I, Okajima K, Hersch K, Bergmann S, Christie J, Shimazaki KI, Tokutomi S, Fankhauser C. (2012) Phytochrome Kinase Substrate 4 is phosphorylated by the phototropin 1 photoreceptor. *EMBO J* 31: 3457-3467.

- Dietrich P, Sanders D, Hedrich R. (2001) The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. *J Exp Bot* 52: 1959–67.
- Doi M, Shigenaga A, Emi T, Kinoshita T, Shimazaki KI. (2004) A transgene encoding a blue light receptor, phot1, restores blue light responses in the *Arabidopsis* phot1 phot2 double mutant. *J Exp Bot* 55: 517-523.
- Eckstein A, Krzeszowiec W, Banas AK, Jankowiak F, Gabrys H. (2016) Abscisic acid and blue light signaling pathways in chloroplast movements in *Arabidopsis* mesophyll. *Acta Biochim Pol* 64: 3.
- Eckstein A, Krzeszowiec W, Waligórski P, Gabryś H. (2016b) Auxin and chloroplast movements. *Physiol Plant* 156: 351-366.
- Elrouby N. (2015) Analysis of Small Ubiquitin-Like Modifier (SUMO) Targets Reflects the Essential Nature of Protein SUMOylation and Provides Insight to Elucidate the Role of SUMO in Plant Development. *Plant Physiol*: <https://doi.org/10.1104/pp.15.01014>
- Ferl RJ. (2004) 14-3-3 proteins: regulation of signal-induced events. *Physiol Plant* 120: 173–78.
- Flotho A, Melchior F. (2013) Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease. *Annu Rev Biochem* 82: 357-385.
- Folta KM, Kaufman LS. (2003) Phototropin 1 is required for high-fluence blue-light-mediated mRNA destabilization. *Plant Mol Biol* 51: 609–18.
- Galavan-Ampudia CS, Offringa R. (2007) Plant evolution: AGC kinases tell the auxin tale. *Trends Plant Sci* 12: 541-547.
- Garcia-Dominguez M, March-Diaz R, Reyes JC. (2008) THE PHD DOMAIN OF PLANT PIAS PROTEINS MEDIATES SUMOYLATION OF BROMODOMAIN GTE PROTEINS. *J Biol Chem*: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M708176200>
- Gareau JR, and Lima CD. (2011) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 861–871.
- Geiss-Friedlander R., Melchior F. (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 947–956.
- Han IS, Tseng TS, Eisinger W, Briggs WR. (2008) Phytochrome A regulates the intracellular distribution of phototropin 1–Green Fluorescent Protein in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 20: 2835-2847.

- Hannich JT, Lewis A, Kroetz MB, Li AJ, Heide H, Emili A, Hochstrasser M. (2005) Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280: 4102–4110.
- Harada A, Sakai T, Okada K. (2003) Phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> differently in *Arabidopsis* leaves. *PNAS USA* 100: 8583-8588.
- Harada A, Shimazaki K. (2007) Phototropins and blue light-dependent calcium signaling in higher plants. *Photochem and Photobiol* 83: 102-111.
- Harada A, Takemiya A, Inoue A, Sakai T, Shimazaki K. (2013) Role of RPT2 in Leaf Positioning and Flattening and Possible Inhibition of phot2 Signaling by phot1. *Plant Cell Physiol* 54: 36–47.
- Harper SM, Neil LC, Gardner KH. (2003) Structural basis of a phototropin light switch. *Science* 301: 1541-1544.
- Haupt W. (1959) Die Chloroplastendrehung bei *Mougeotia*. Über den quantitativen und qualitativen Lichtbedarf der Schwachlichtbewegung. *Planta* 53: 484-501.
- Hendriks IA, Souza RCJ, Yang B, de Vries MV, Mann M, Vertegaal ACO. (2014) Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nat Struct Mol Biol* 21: 927–936.
- Hendriks I, Vertegaal ACO. (2016) A comprehensive compilation of SUMO proteomics *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 581–595.
- Hickey Ch, Wilson NR, Hochstrasser. (2012) Function and regulation of SUMO proteases *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 755–766.
- Hietakangas V, Anckar J, Blomster H. A, Fujimoto M, Palvimo J.J, Nakai A, Sistonen L. (2006 ) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *PNAS USA* 103: 45–5.
- Holweg C, Nick P. (2004) *Arabidopsis* myosin XI mutant is defective in organelle movement and polar auxin transport. *PNAS* 28: 10488-10493.
- Huang L, Yang S, Zhang S, Liu M, Lai J, Qi Y, Shi S, Wang J, Wang Y, Xie Q, et al. (2009) The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase AtMMS21, a homologue of NSE2/MMS21, regulates cell proliferation in the root. *Plant J* 60: 666–678.
- Huala E, Oeller PW, Liscum E, Han IS, Larsen E, Briggs WR. (1997) *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278: 2120–23.
- Ichikawa S, Yamada N, Suetsugu N, Wada M, Kadota A. (2011) Red light, phot1 and JAC1 modulate phot2-dependent reorganization of chloroplast actin filaments and

- chloroplast avoidance movement. *Plant Cell Physiol* 52: 1422-1432.
- Iino M. (2001) Phototropism in higher plants. *Comprehensive Series in Photosciences* 1: 659–811.
  - Iino M. (2006) Toward understanding the ecological functions of tropisms: interactions among and effects of light on tropisms. *Curr Opin Plant Biol* 9:89–93
  - Inada S, Ohgishi M, Mayama T, Okada K, Sakai T. (2004) RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16:887–96.
  - Inoue SI, Kinoshita T, Matsumoto M, Nakayama KI, Doi M, Shimazaki KI. (2008a) Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *PNAS USA* 105: 5626–5631.
  - Inoue SI, Kinoshita T, Takemiya A, Doi M, Shimazaki KI. (2008b) Leaf positioning of *Arabidopsis* in response to blue light. *Molecular Plant* 1: 15–26.
  - Inoue SI, Matsushita T, Tomokiyo Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Kinoshita T, Shimazaki KI. (2011) Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156: 117–128.
  - Irani NG, Russinova E. (2009) Receptor endocytosis and signaling in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12: 653–659.
  - Ishida T, Fujiwara S, Miura K, Stacey N, Yoshimura M, Schneider K, Adachi S, Minamisawa K, Umeda M, Sugimoto K. (2009) SUMO E3 ligase HIGH PLOIDY2 regulates endocycle onset and meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 2284–2297.
  - Islam A, Tebbji F, Mallick J, Regan H, Dumeaux V, Omran RP, Whiteaway M. (2019) Mms21: A Putative SUMO E3 Ligase in *Candida albicans* That Negatively Regulates Invasiveness and Filamentation, and Is Required for the Genotoxic and Cellular Stress Response. *Genetics* 211: 579-595.
  - Ivanov AV, Peng H, Yurchenko V, Yap KL, Negorev DG, Schultz DC, Psulkowski EC, Fredericks WJ, White DE, Maul GG, Sadofsky MJ, Zhou MM, Rauscher FJ. (2007) PHD Domain-Mediated E3 Ligase Activity Directs Intramolecular Sumoylation of an Adjacent Bromodomain Required for Gene Silencing. *Mol Cell* 28: 823-837.
  - Iwabuchi K, Tatsuya S, Takagi S. (2007) Blue light-dependent nuclear positioning in *Arabidopsis thaliana* leaf cells. *Plant Cell Physiol* 48: 1291-1298.



- Izutani Y, Takagi S, Nagai R. (1990) Orientation movements of chloroplasts in *Vallisneria* epidermal cells: different effects of light at low and high-fluence rate. *Photochem Photobiol* 51: 105–111.
- Jang GN, Yang JY, Hsieh HL, Wu SH. (2019) Processing bodies control the selective translation for optimal development of *Arabidopsis* young seedlings. *PNAS* 116: 6451-6456.
- Jarillo JA, Gabrys H, Capel J, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR. (2001) Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* 410: 952–54.
- Jentsch, S, Pyrowolakis G. (2000) Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol* 10: 335–342.
- Jeong RD, Kachroo A, Kachroo P. (2010) Blue light photoreceptors are required for the stability and function of a resistance protein mediating viral defense in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 5: 1504-1509.
- Jiao Y, Yang H, Ma L, Sun N, Yu H, Liu T, Gao Y, Gu H, Chen Z, Wada M, Gerstein M, Zhao H, Qu LJ, Deng XW. (2003) A genome-wide analysis of blue-light regulation of *Arabidopsis* transcription factor gene expression during seedling development. *Plant Physiol* 133: 1480-1493.
- Jin JB, Hasegawa PM. (2008) Flowering time regulation by the SUMO E3 Ligase SIZ1. *Plant Signal Behav* 10: 891-892.
- Jin JB, Jin YH, Lee J, Miura K, Yoo ChY, Kim WY, Van Oosten M, Hyun Y, Somers DE, Lee I, Yun DJ, Bressan RA, Hasegawa PM. (2008) The SUMO E3 ligase, AtSIZ1, regulates flowering by controlling a salicylic acid - mediated floral promotion pathway and through affects on FLC chromatin structure. *Plant J* 53: 530-540.
- Kadota A, Yamada N, Suetsugu N, Hirose M, Saito C, Shoda K, Ichikawa S, Kagawa T, Nakano A, Wada M. (2009) Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in *Arabidopsis*. *PNAS* 106: 13106-13111.
- Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K. (2001) *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* 291: 2138–41.
- Kagawa T, Wada M. (2004) Velocity of chloroplast avoidance movement is fluence rate dependent *Photoch Photobio Sci* 3: 592-595.

- Kagawa T, Wada M. (2000) Blue light-induced chloroplast relocation in *Arabidopsis thaliana* as analyzed by microbeam irradiation. *Plant Cell Physiol* 41: 84 – 93.
- Kaiserli E, Sullivan S, Jones MA, Feeney KA, Christie JM. (2009) Domain Swapping to Assess the Mechanistic Basis of *Arabidopsis* Phototropin 1 Receptor Kinase Activation and Endocytosis by Blue Light. *Plant Cell* 21: 3226–3244.
- Kandasamy MK, Meagher RB. (1999) Actin-organelle interaction: association with chloroplast in *Arabidopsis* leaf mesophyll cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 44: 110-118.
- Kang B, Grancher N, Koyffmann V, Lardemer D, Burney S, Ahmad M. (2008) Multiple interactions between cryptochrome and phototropin blue-light signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 227: 1091-1099.
- Kasahara M, Kagawa T, Oikawa K, Suetsugu N, Miyao M, Wada M. (2002b) Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* 420: 829–32.
- Kasahara M, Swartz TE, Olney MA, Onodera A, Mochizuki N, Fukuzawa H, Asamizu E, Tabata S, Kanegae H, Takano M, Christie JM, Nagatani A, Briggs WR. (2002) Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from *Arabidopsis*, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 129: 762–773.
- Kerscher O. (2007) SUMO junction-what's your function? New insights through SUMOinteracting motifs. *EMBO Rep* 8: 550–555.
- Khan M, Rozhon W, Unterholzner S.J, Chen T, Eremina M, Wurzinger B, Bachmair A, Teige M, Sieberer T, Isono E, Poppenberger B. (2015) Interplay between phosphorylation and SUMOylation events determines CESTA protein fate in brassinosteroid signaling. *Nat Commun*: doi:10.1038/ncomms5687
- Kimura M, Kagawa T. (2009) Blue Light-induced Chloroplast Avoidance and Phototropic Responses Exhibit Distinct Dose Dependency of PHOTOTROPIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *Photochem and Photobiol* 5: 1260-1264.
- Kimura M, Kagawa T, (2006) Phototropin and light-signaling in phototropism. *Curr Opin Plant Biol* 9: 503-508.
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K. (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414: 656–60.
- Kinoshita T, Shimazaki K. (2001) Analysis of the phosphorylation level in guard-cell plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in response to fusicoccin. *Plant Cell Physiol* 42: 424-432.

- Klepikova AV, Kasianov AS, Gerasimov ES, Logacheva MD, Penin AA. (2016) A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant J* 88:1058-1070.
- Kodama Y, Suetsugu N, Kong SG, Wada M. (2010) Two interacting coiled-coil proteins, WEB1 and PMI2, maintain the chloroplast photorelocation movement velocity in *Arabidopsis*. *PNAS USA* 107: 19591-19596.
- Kong SG, Kagawa T, Wada M, Nagatani A (2013) A C-Terminal Membrane Association Domain of Phototropin 2 is Necessary for Chloroplast Movement. *Plant Cell Physiol* 54: 57–68.
- Kong X, Luo X, Qu GP, Liu P. (2017) *Arabidopsis* SUMO protease ASP1 positively regulates flowering time partially through regulating FLC stability *J Integr Plant Biol*: <https://doi.org/10.1111/jipb.12509>
- Kong SG, Nagatani A. (2008) Where and how does phototropin transduce light signals in the cell? *Plant Signal. Behav* 3: 275–277.
- Kong SG, Suetsugu N, Kikuchi S, Nakai M, Nagatani A, Wada M. (2013b) Both Phototropin 1 and 2 Localize on the Chloroplast Outer Membrane with Distinct Localization Activity. *Plant Cell Physiol* 54: 80-92.
- Kong SG, Suzuki T, Tamura K, Mochizuki N, Hara-Nishimura I, Nagatani A. (2006) Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *The Plant J* 45: 994–1005.
- Krzeszowiec W, Gabrys H. (2007) Phototropin mediated relocation of myosins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 2: 333–336.
- Krzeszowiec W, Rajwa B, Dobrucki J, Gabrys H. (2007) Research article Actin cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* under blue and red light. *Biol Cell*: doi:10.1042/BC20060077
- Kurepa J, Walker JM, Smalle J, Gosink MM, Davis SJ, Durham TL, Sung DY, Vierstra RD, (2003) The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J Biol Chem* 278: 6862–6872.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lariguet P, Schepens I, Hodgson D, Pedmale UV, Trevisan M, Kami C, de Carbonnel M, Alonsko JM, Ecker JR, Liscum E, Fankhauser C. (2006) PHYTOCHROME

KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:10134–39.

- Lehmann P, Nothen J, Schmidt von Braun S, Bohnsack MT, Mirus O, Schleiff E. (2011) Transitions of gene expression induced by short-term blue light. *Plant Biology* 13: 349-361.
- Li Z, Hu Q, Zhou M, Vandenbrink J, Li D, Menchyk N, Reighard S, Norris A, Liu H, Sun D, Luo H. (2013) Heterologous expression of OsSIZ1, a rice SUMO E3 ligase, enhances broad abiotic stress tolerance in transgenic creeping bentgrass. *Plant Biotechnol J* 11: 432-445.
- Lin XL, Niu D, Hu ZL, Kim DH, Jin YH, Cai B, Liu P, Miura K, Kim WY, Lin R, Jin JB. (2016) An *Arabidopsis* SUMO E3 Ligase, SIZ1, Negatively Regulates Photomorphogenesis by Promoting COP1 Activity. *PLoS Genet* <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006016>
- Lindeboom JJ, Nakamura M, Hibbel A, Shundyak K, Gutierrez R, Ketelaar T, Emons AMC, Mulder BM, Kirik V, Ehrhardt DW. (2013) Mechanism for Reorientation of Cortical Microtubule Arrays Driven by Microtubule Severing. *Science* 342: DOI:10.1126/science.1245533
- Liscum E, Briggs WR (1995) Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* 7:473–85.
- Liu L, Yan X, Kong X, Zhao Y, Gong Z, Jin JB, Guo Y. (2017) Transcriptional Gene Silencing Maintained by OTS1 SUMO Protease Requires a DNA-Dependent Polymerase V-Dependent Pathway. *Plant Physiol*: <https://doi.org/10.1104/pp.16.01365>
- Lois LM, Lima CD, Chua NH. (2003) Small Ubiquitin-Like Modifier Modulates Abscisic Acid Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*: <https://doi.org/10.1105/tpc.009902>
- Luesse DR, DeBlasio SL, Hangarter RP. (2006) Plastid Movement Impaired 2, a new gene involved in normal blue-light-induced chloroplast movements in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 141: 1328-1337.
- Luesse DR, DeBlasio SL, Hangarter RP. (2010) Integration of phot1, phot2, and PhyB signalling in light-induced chloroplast movement. *J Exp Bot* 61: 4387-4397.
- Łabuz J, Hermanowicz P, Gabryś H. (2015) The impact of temperature on blue light induced chloroplast movements in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 239: 238-249.

- Łabuz J, Sztatelman O, Banaś AK, Gabryś H. (2012) The expression of phototropins in *Arabidopsis* leaves: developmental and light regulation. *J Exp Bot* 63: 1763-1771.
- Magerøy MH, Kowalik EH, Folta KM, Shinkle J. (2010) Evidence of physiological phototropin1 (phot1) action in response to UV-C illumination. *Plant Signal Behav* 5: 1204-1210.
- Malec P, Rinaldi RA, Gabryś H. (1996) Light- induced chloroplast movements in *Lemna trisulca*: Identification of the motile system. *Plant Sci* 120:127- 37.
- Matic I, Schimmel J, Hendricks IA, Santen M, Rijke F, Dam H, Gnad F, Mann M. (2010) Site-Specific Identification of SUMO-2 Targets in Cells Reveals an Inverted SUMOylation Motif and a Hydrophobic Cluster SUMOylation Motif. *Mol Cell* 39: 641-652.
- Matsuoka D, Tokutomi S. (2005) Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. *PNAS* 102: 13337-13342.
- Mazur M, van den Burg H. (2012) Global SUMO proteome responses guide gene regulation, mRNA biogenesis, and plant stress responses. *Front Plant Sci* doi.org/10.3389/fpls.2012.00215
- Miller MJ, Scalf M, Rytz TC, Hubler SL, Smith LM, Vierstra RD. (2013) Quantitative Proteomics Reveals Factors Regulating RNA Biology as Dynamic Targets of Stress-induced SUMOylation in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics* 12: 449-463.
- Miteva M, Keusekotten K, Hofmann K, Praefcke GJK, Dohmen RJ. (2010) Sumoylation as a Signal for Polyubiquitylation and Proteasomal Degradation. *Subcell Biochem* 54: 195-214.
- Miura K, Jin J.B, Hasegawa P.M. (2007) Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. *Curr Opin Plant Biol* 10: 495–502.
- Miura K, Lee J, Gong Q, Ma S, Jin JB, Yoo CY, Miura T, Sato A, Bohnert HJ, Hasegawa PM. (2011) SIZ1 Regulation of Phosphate Starvation-Induced Root Architecture Remodeling Involves the Control of Auxin Accumulation. *Plant Physiol* 155: 1000-1012.
- Miura K, Lee J, Jin JB, Yoo CY, Miura T, Hasegawa PM. (2009) Sumoylation of ABI5 by the *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. *PNAS* 13: 5418-5423
- Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama KG, Baek D, Koo YD, Jin JB, Bressan RA, Yun DJ, and Hasegawa PM. (2005) The *Arabidopsis*

SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *P Natl Acad Sci USA* 102: 7760–7765.

- Morrow J, Willenburg KT, Liscum E. (2018) Phototropism in land plants: Molecules and mechanism from light perception to response. *Front Biol* 5: 342–357.
- Motchoulski A, Liscum E. (1999) *Arabidopsis* NPH3: NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science* 286:961–64.
- Nakasako M, Iwata T, Matsuoka D, Tokutomi S. (2004) Light-induced structural changes of LOV domain-containing polypeptides from *Arabidopsis* phototropin 1 and 2 studied by small-angle X-ray scattering. *Biochemistry* 43: 14881–90.
- Noh B, Bandyopadhyay A, PeerWA, Spalding EP, Murphy AS. (2003) Enhanced graviand phototropism in plant mdr mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* 423: 999–100.
- Novatchkova M, Budhiraja R, Coupland G, Eisenhaber F, Bachmair A. (2004) SUMO conjugation in plants. *Planta* 220: 1-8.
- Novatchkova M, Tomanov K, Hofmann K, Stuible HP, Bachmair A. (2012) Update on sumoylation: defining core components of the plant SUMO conjugation system by phylogenetic comparison. *New Phytologist* 195: 23–31.
- Ohgishi M, Saji K, Okada K, Sakai T. (2004) Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 101: 2223–28.
- Oikawa K, Kasahara M, Kiyosue T, Kagawa T, Suetsugu N, Takahashi F, Kanegae T, Niwa Y, Kadota A, Wada M. (2003) Chloroplast unusual positioning1 is essential for proper chloroplast positioning. *Plant Cell* 15: 2805–15.
- Okada, S, Nagabuchi, M, Takamura, Y, Nakagawa, T, Shinmyozu, K, Nakayama, J, Tanaka, K. (2009) Reconstitution of *Arabidopsis thaliana* SUMO pathways in *E. coli*: functional evaluation of SUMO machinery proteins and mapping of SUMOylation sites by mass spectrometry. *Plant Cell Physiol* 50: 1049–1061.
- Palmer JM, Short TW, Gallagher S, Briggs WR, (1993) Blue light-induced phosphorylation of a plasma membrane-associated protein in *Zea mays L.* *Plant Physiol.* 102:1211–18.
- Park HC, Choi W, Cheong MS, KooYD, Shin G, Chung WS, Kim WY, Kim MG, Bressan RA, Bohnert HJ, Lee SY, Yun DJ. (2011) Identification and molecular properties of SUMO-binding proteins in *Arabidopsis*. *Mol Cells* 32: 143–151.
- Park YI, Chow WS, Anderson JM. (1996) Chloroplast movement in the shade plant

- Tradescantia albiflora* helps protect photosystem II against light stress. *Plant Physiol* 111: 867-875.
- Pichler A, Knipscheer P, Oberhofer E, van Dijk W, Olsen JV, Jentsch S, Melchior F, Sixma TK. (2005) SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat Struct Mol Biol* 12: 264–269.
  - Preuten T, Blackwood L, Christie JM, Fankhauser C. (2015) Lipid anchoring of *Arabidopsis* phototropin 1 to assess the functional significance of receptor internalization: should I stay or should I go? *New Phytol* 206: 1038–1050.
  - Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'hara A, Kaiseli E, Baumeister R (2011) Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 Protein. *Science* 332: 103-106.
  - Roberts D, Pedmale UV, Morrow J, Sachdev S, Lechner E, Tang X, Zheng N, Hannink M, Genschik P, Liscum E. (2011) Modulation of Phototropic Responsiveness in *Arabidopsis* through Ubiquitination of Phototropin 1 by the CUL3-Ring E3 Ubiquitin Ligase CRL3NPH3. *The Plant Cell* 23: 3627-3640.
  - Rockwell N, Su YS, Lagarias JC. (2006) Phytochrome Structure and Signaling Mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 837–58.
  - Sadanandom A, Ádám A, Orosa B, Viczián A, Klose C, Zhang C, Josse EM, Kozma-Bognár L, Nagy F. (2015) SUMOylation of phytochrome-B negatively regulates light-induced signaling in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 112: 11108-11113.
  - Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie JM, Briggs W, Wada M, Okada K. (2001) *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *PNAS USA* 98: 6969 – 6974.
  - Sakai Y, Takagi. (2005) Reorganized actin filaments anchor chloroplasts along the anticlinal walls of *Vallisneria* epidermal cells under high-intensity blue light. *Planta* 221: 823–830.
  - Sakai T, Wada T, Ishiguro S, Okada K. (2000) RPT2. A signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:225–36.
  - Sakamoto K, Briggs RW. (2002) Cellular and Subcellular Localization of Phototropin 1. *Plant Cell* 14: 1723–1735.
  - Salomon M, Christie JM, Knieb E, Lempert U, Briggs WR, (2000) Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* 39: 9401–9410.

- Salomon M, Knieb E, von Zeppelin T, Rudiger W. (2003) Mapping of low- and high-fluence autophosphorylation sites in phototropin 1. *Biochemistry* 42: 4217 – 25.
- Salomon M, Lempert U, Rudiger W, (2004) Dimerization of the plant photoreceptor phototropin is probably mediated by the LOV1 domain. *FEBS Lett.* 572: 8–10 *Plant Physiol.* 141:1328–37.
- Salomon M, Zacherl M, Luff L, Rudiger W. (1997) Exposure of oat seedlings to blue light results in amplified phosphorylation of the putative photoreceptor for phototropism and in higher sensitivity of the plants to phototropic stimulation. *Plant Physiol* 115:493–500.
- Saracco S, Miller M.J, Kurepa J, Vierstra R.D. (2007) Genetic Analysis of SUMOylation in *Arabidopsis*: Conjugation of SUMO1 and SUMO2 to Nuclear Proteins Is Essential. *Plant Physiol* 145: 119–134.
- Schmidt von Braun S, Schleiff E. (2008) The chloroplast outer membrane protein CHUP1 interacts with actin and profilin. *Planta* 227: 1151-1159.
- Sharrock RA, Clack T. (2002) Patterns of expression and normalized levels of the five *Arabidopsis* phytochromes. *Plant Physiol* 130: 442–456.
- Sommers DE, Schultz TF, Milnamow M, Kay AS. (2000) *ZEITLUPE* Encodes a Novel Clock-Associated PAS Protein from *Arabidopsis*. *Cell* 3: 319-329.
- Song J, Durrin LK, Wilkinson TA, Krontiris TG, Chen Y. (2004) Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *PNAS USA* 101: 14373–14378.
- Stoelzle S, Kagawa, Wada M, Hedrich R, Dietrich P. (2003) Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *PNAS* 3: 1456-1461.
- Stone B, Stowe-Evans EL, Harper RM, Celaya RB, Ljung K, Sandberg G, Liscum E. (2008) Disruptions in AUX1-Dependent Auxin Influx Alter Hypocotyl Phototropism in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 1: 129-144.
- Strzałka W, Labecki P, Bartnicki F, Aggarwal C, Rapala-Kozik M, Tani C, Tanaka K, Gabrys H. (2012) *Arabidopsis thaliana* Proliferating Cell Nuclear Antigen has several potential sumoylation sites. *J Exp Bot* 63: 2971–2983.
- Sztatelman O. (2012) Fototropina 2 – Regulacja i funkcja, praca doktorska, Kraków



- Sztatelman O, Łabuz J, Hermanowicz P, Banaś AK, Bażant A, Zgłobicki P, Aggarwal A, Nadzieja M, Krzeszowiec W, Strzałka W, Gabrys H. (2016) Fine tuning chloroplast movements through physical interactions between phototropins. *Journ Exp Bot* 67: 4963–4978.
- Sztatelman O, Waloszek A, Banaś AK, Gabryś H. (2010) Photoprotective function of chloroplast avoidance movement: *In vivo* chlorophyll fluorescence study. *J Plant Physiol* 9: 709-716.
- Subramanian L, Benson MD, Iñiguez-Lluh JA. (2003) A Synergy Control Motif within the Attenuator Domain of CCAAT/Enhancer-binding Protein  $\alpha$  Inhibits Transcriptional Synergy through Its PIASy-enhanced Modification by SUMO-1 or SUMO-3. *J Biol Chem* 278: 9134-9141.
- Suetsugu N, Higa T, Kong SG, Wada M. (2015) PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1 and PLASTID MOVEMENT IMPAIRED1-RELATED1 mediate photorelocation movements of both chloroplasts and nuclei. *Plant Physiology* 169: 1155-1167.
- Suetsugu N, Yamada N, Kagawa T, Yonekura H, Uyeda TQ, Kadota A. (2010) Two kinesin-like proteins mediate actin-based chloroplast movement in *Arabidopsis*. *PNAS USA* 107: 8860-8865.
- Suetsugu N, Kagawa T, Wada M (2005) An auxilin-like J-domain protein, JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 151–162
- Suetsugu N, Wada M. (2013) Chloroplast photorelocation movement mediated by phototropin family proteins in green plants. *Biol Chem* 388: 927–935.
- Suetsugu N, Wada M. (2016) Evolution of the Cp-Actin-based Motility System of Chloroplasts in Green Plants. *Front. Plant Sci.* 7: 561
- Suzuki R, Shindo H, Tase A, Kikuchi Y, Shimizu M, Yamazaki T. (2009) Solution structures and DNA binding properties of the N - terminal SAP domains of SUMO E3 ligases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Oryza sativa*. *Proteins* 75: 336-347.
- Takemiya A, Inoue S, Doi M, Kinoshita T, Shimazaki K. (2005) Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* 17: 1120–1127.
- Tomanov K, Zeschmannb A, Hermkes R, Eiflera K, Ziba I, Grieco M, Novatchkova M, Hofmann K, HesseH, Bachmair A. (2014) *Arabidopsis* PIAL1 and 2 Promote

- SUMO Chain Formation as E4-Type SUMO Ligases and Are Involved in Stress Responses and Sulfur Metabolism, *Plant Cell* 26: 4547-4560.
- Trojan A, Gabryś H. (1996) Chloroplast distribution in *Arabidopsis thaliana* depends on light conditions during growth. *Plant Physiol* 111: 419–425.
  - van den Burg HA, Kini RK, Schuurink RC, Takken FL. (2010) *Arabidopsis* small ubiquitinlike modifier paralogs have distinct functions in development and defense. *Plant Cell* 22:1998–2016.
  - van der Hoorn RAL. (2008) Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 59: 191-223.
  - Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcomb D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33: 949-956.
  - Wada M. (2007) The fern as a model system to study photomorphogenesis. *J Plant Res* 120: 3-16.
  - Wada M, Kagawa T, Sato Y. (2003) Chloroplast movement. *Annu Revi Plant Biol* 5:, 455–468.
  - Wan YL, Eisinger W, Ehrhardt D, Kubitscheck U, Baluska F, Briggs W. (2008) The subcellular localization and blue-light-induced movement of phototropin 1-GFP in etiolated seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 1:103–117.
  - Wang Z, Pesacreta TC. (2004) A subclass of myosin XI is associated with mitochondria, plastids, and the molecular chaperone subunit TCP1 $\alpha$  in maize. *Cytoskeleton* 4: 218-232.
  - Whippo CW, Hangarter RP. (2004) Phytochrome modulation of blue light induced phototropism. *Plant Cell Environ* 27: 1223-1228.
  - Whippo CW, Khurana P, Davis PA, DeBlasio SL, DeSloover D, Staiger ChJ, Hangarter RP. (2011) THRUMIN1 is a light-regulated actin-bundling protein involved in chloroplast motility. *Curr Biol* 21: 59-64.
  - Wojtaszek P, Anielska-Mazur A, Gabryś H, Baluška F, Volkmann D. (2005) Recruitment of myosin VIII towards plastid surfaces is root-cap specific and provides the evidence for actomyosin involvement in root osmosensing. *Funct Plant Biol* 32: 721-736.

- Xue F, Cooley L. (1993) Kelch encodes a component of intercellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell* 72: 681–693.
- Yang SH, Galanis A, Witty J, Sharrocks AD. (2006) An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J* 25: 5083-5093.
- Zeidler M. (2016) Physiological Analysis of Phototropic Responses in *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol* 1398: 21-28.
- Zhang S, Qi Y, Liu M, Yang C. (2013) SUMO E3 Ligase AtMMS21 Regulates Drought Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol* 55: 83-95.
- Zhao Q, Xie Y, Zheng Y, Jiang s, Liu W, Mu W, Zhano Y, Xue Y, Ren J. (2014) GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Res* 42: 325–330.
- Zhu D, Maier A, Lee JH, Laubinger S, Saijo Y, Wang H, Qu LJ, Xing UH, Deng W. (2008) Biochemical Characterization of *Arabidopsis* Complexes Containing CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 and SUPPRESSOR OF PHYA Proteins in Light Control of Plant Development. *Plant Cell* 20: 2307-2323.
- Zurzycki J. (1955) Chloroplast arrangements as a factor in photosynthesis. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 24: 27-63.