

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Justyny Maszkowskiej pod tytułem:

„Identification of proteins phosphorylated by ABA-unresponsive SNF1-related protein kinases (SnRK2s) in the plant response to salinity stress”**Tematyka badań i cele rozprawy**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska autorstwa Pani mgr Justyny Maszkowskiej to opracowanie, w którym Autorka podjęła się ambitnego zadania naukowego, jakim jest identyfikacja substratów białkowych dla grupy ABA-niezależnych kinaz białkowych SnRK2. Praca dotyczy aspektu fosforylacji białek, tj. post-translacyjnej modyfikacji, która moduluje aktywność biologiczną białka na wielu poziomach; jeśli rozpatrzmy pełny zakres biofizycznych parametrów białka, to fosforylacja może wpływać na wszystkie te parametry, a co istotne wbudowanie grupy fosforanowej jest tzw. ‘białko-specyficzne’ i rola tej modyfikacji jest przypisana do konkretnego białka – na dzień dzisiejszy uważa się, że brak jest określonego wzorca zachowania się białka związanego z tą modyfikacją, tzn. fosforylacja może modulować wszystkie aspekty aktywności biologicznej białka. Co więcej, obecnie wysoko przepustowe analizy MS wskazują, że znaczna część proteomu komórki eukariotycznej ulega fosforylacji (w zależności od organizmów – to ponad 30%), co ważne poziom fosforylacji jest uzależniony od stanu metabolicznego, co radykalnie podwyższa stopień trudności w analizach biochemicznych związanych z identyfikacją fosfo-białek. Ponadto, kinazy białkowe to ogromna i nad wyraz zróżnicowana grupa enzymów, które są zaangażowane praktycznie w każdy szlak metaboliczny, a przede wszystkim regulacja transmisji sygnału w komórce. Dlatego też, zadanie naukowe jakie postawiła sobie Autorka pracy, tj. identyfikacja substratów białkowych dla kinaz z rodziny SnRK2 oraz eksperymentalne potwierdzenie wybranych substratów, to zadanie nad wyraz ambitne i wymagające. Już na wstępie można stwierdzić, iż Autorka poradziła sobie z tym zadaniem doskonale; stosując bardzo szeroki wachlarz technik analitycznych, poczynawszy od wysoko-przepustowych analiz MS poprzez, zastosowanie technik biologii molekularnej i biochemicznych, Autorka zidentyfikowała szereg białek, które ulegają fosforylacji przez kinazy SnRK2 ABA-niezależne. Czytając pracę, odnoszę wrażenie, że Autorka prowadząc badania oraz przygotowując opracowanie, wykonywała je z ogromnym zaangażowaniem i pasją, a mając nieocenione wsparcie w osobie Pani Prof. dr hab. Grażyny Dobrowolskiej oraz w zasobach całego Jej grupy badawczej, praca ta zakończyła się sukcesem.

Ocena pracy

Praca doktorska Autorstwa Pani mgr Justyny Maszkowskiej to opracowanie naukowe przygotowane w klasycznym układzie dla opracowań tego typu, zaopatrzone w streszczenie, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja i spis literatury. Praca została przygotowana w języku angielskim, co zapewne jest ułatwieniem w przygotowaniu opracowania, z racji na obowiązujące standardy naukowe panujące w upowszechnianiu prac badawczych; wyrazem tego jest udział



Autorki w szeregu publikacjach naukowych, które ukazały się w uznanych czasopismach, jak: *Plant Physiol.*, *Plant Cell Environ.*, czy *Int. J. Mol. Sci.*

Pierwsza część opracowania to wstęp o holistycznym podejściu do tematu. Autorka na wstępie definiuje problem badawczy w kontekście ekologii i uprawy roślin wskazując, że stres osmotyczny, to globalny problem w uprawie roślin wywierający duży wpływ na efektywność produkcji rolniczej; Doktorantka wskazuje, że efekt ten to nic innego jak modulacja wiele szlaków metabolicznych w roślinie, co prowadzi do adaptacji rośliny na zmienne warunki środowiskowe, ale mimo wielu lat prac badawczych, ciągle adaptacja na poziomie molekularnym jest jeszcze mało poznana. Autorka początkowo charakteryzuje szlaki metaboliczne odpowiedzialne za detekcję oraz przekazywanie sygnały w kontekście stresu osmotycznego, zwracając uwagę na układy receptorowe oraz mechanizmy zarządzające przepływem informacji w odpowiedzi na zmianę stężenia jonów. Przede wszystkim Autorka poświęciła bardzo dużo uwagi białkowym kinazom, które grają wiodące 'skrzypce' w wielu szlakach zarządzających odpowiedzią na stres osmotyczny. W szczególności, Doktorantka zwróciła uwagę na kinazy MAPK i mało poznany aspekt ich aktywacji w stresie osmotycznym; w tym miejscu mam pytanie, jak Autorka może odnieść się do informacji, które obecnie pojawiają się w literaturze naukowej wskazując, że rybosomy tzw. '*colliding ribosomes*' stanowią układ sensoryczny dla niektórych kinaz MAP w komórkach zwierzęcych; czy takowa sytuacja może mieć miejsce także w komórkach roślinnych (np. praca: <https://doi.org/10.1016/j.j.cell.2020.06.006>). W dalszej części Doktorantka poświęciła dużą uwagę szlakom metabolicznym zależnemu od kwasu abscysynowego (ABA), który jest kluczowy w rozwoju rośliny, ale także stanowi zasadniczy element odpowiedzi rośliny na stres biotyczny czy abiotyczny. Zaangażowanie Autorki w opracowanie stanu wiedzy jest imponujące, ponieważ nie tylko opisała Ona rolę ABA, ale także powiązała szlaki syntezy tego kwasu z odpowiedzią komórki na stres osmotyczny, począwszy od białek receptorowych, poprzez białka efektorowe, a skończywszy na końcowych odbiorcach informacji, w kontekście szerokiej gamy analiz genetycznych i biochemicznych, co czyni ten element wstępu bogaty w informację. Zasadnicza część wstępu, to charakterystyka kinaz SnRK2; Autorka scharakteryzowała filogenetycznie rodzinę kinaz SnRK2, a następnie opisała mechanizmy regulacji aktywności kinaz nad wyraz analitycznie, opisując nierzadko indywidulane eksperymenty, które wniosły istotny wkład poznawczy w zrozumienie funkcjonowania kinaz SnRK2. Ukoronowaniem Jej pracy w tej części opracowania jest opis roli fizjologicznej kinaz SnRK2 wraz charakterystyką substratów białkowych, co zostało podane w sposób bardzo wyczerpujący w tabeli nr. 1.

Podsumowując, przedstawiony wstęp to bardzo obszerne opracowanie stanu wiedzy o charakterze analitycznym, na temat zjawisk biologicznych związanych ze stresem osmotycznym u roślin, a przede wszystkim rolę rodziny kinaz SnRK2 w modulacji odpowiedzi rośliny na stres abiotyczny. Wstęp, stanowi niebagatelne opracowanie, wręcz benedyktyńską pracę, która nie tylko przedstawia aktualny stan wiedzy, ale Autorka większość stwierdzeń poparła licznymi analizami odnosząc się do konkretnych doświadczeń, co bezpośrednio walidują Jej stwierdzenia; podejście to wskazuje na ogromną wiedzę i profesjonalizm Doktorantki, co w szczególności widać w krytycznym posumowaniu, gdzie wskazuje Ona mało poznane jeszcze pola naukowe, warte eksploracji w zakresie roli kinaz SnRK2, które nie są aktywowane kwasem abscysynowym.



Zasadnicza część opracowania to część doświadczalna, która została podzielona na trzy elementy: identyfikacja substratów białkowy dla kinazy SnRK2.10, analiza/weryfikacja *in vitro* wybranych substratów białkowych dla kinaz SnRK2 oraz analiza roli fosforylacji w funkcjonowaniu wybranych białek. Pierwsza część to szeroko zakrojona analiza identyfikacji fosfo-białek w kontekście stresu osmotycznego. Doktorantka wykorzystwała *Arabidopsis thaliana* jako obiekt eksperymentalny, w trzech wariantach, WT, KO (tj. delecja genu *snrk2.10*) oraz roślinę transgeniczną prowadzącą ekspresję genu kodującego białko hybrydowe GFP-SnRK2.10. Rośliny były traktowane 250 mM NaCl, a następnie przeprowadzono analizę MS w połączeniu z identyfikacją fosfo-peptydów. Analiza MS wskazała, że 94 białka ulegają specyficznej fosforylacji w warunkach stresu osmotycznego, a znaczna ich część zaangażowana jest w odpowiedź komórki roślinnej na różne warunki stresowe. Autorka wskazała, że część analizowanych peptydów posiada motyw aminokwasowy rozpoznawany przez kinazy SnRK2; z tabeli wynika, że istotna grupa białek posiada także motyw rozpoznawany, na przykład przez kinazę CK2, co może wskazywać że kinaza ta także może brać udział w odpowiedzi na stres osmotyczny (czy są doniesienia współdziałania kinaz SnRK i CK2). Czy na podstawie otrzymanych danych MS można pokusić się o uszeregowanie białek pod względem ilościowym w stosunku do ich fosforylacji? Analiza MS była komplementowana analizą 2D w połączeniu z analizą LC-MS/MS. Autorka zidentyfikowała 26 substratów białkowych, które mogą być potencjalnymi substratami dla SnRK2.10. Jako trzecie, alternatywne podejście, Doktorantka wykorzystwała analizę KiC – ‘Kinase-Client Assay’ wykorzystując bibliotekę syntetycznych peptydów oraz oczyszczone kinazy rekombinowane, w tym SnRK2.10. Analiza wskazała na szereg peptydów, na bazie który Doktorantka zidentyfikowała potencjalne białka jako substraty dla SnRK2.10. Nasuwa się pytanie, czy Doktorantka przeanalizowała wyniki z MS, 2D i KiC w kontekście wspólnych danych, w jakim stopniu wyniki 2D i KiC pokrywają się z analizą MS, która posiada największe spektrum analityczne.

Kolejnym i jednocześnie jak najbardziej naturalnym krokiem Doktorantki to walidacja wybranych substratów białkowych dla kinaz SnRK2. Doktorantka wybrała trzy białka: dwie dehydryny ERD10 i ERD14 oraz GRP8, które zostały wskazane jako potencjalne substraty dla kinazy SnRK2.10 wykorzystując analizę MS. Pierwsza analiza skupiła się na białkach ERD10 i ERD14; Doktorantka przeprowadziła szereg analiz, włączając w to fosforylacje badanych białek *in vitro* wykorzystując cały zestaw białek rekombinowanych (substraty – wraz z mutacjami punktowymi jak i kinazy) w połączeniu z identyfikacją MS fosforylowanych peptydów; analiza ta pozwoliła Doktorantce zmapować dokładnie miejsce fosforylacji, a co więcej wskazała, że kinazy zależne od ABA nie fosforylują tych białek. Inspirującym wynikiem jest identyfikacja miejsc fosforylacji, przez kinazę SnRK2.10, tzw. ‘S-segment’ S₁₀₆SSSSSDEEGEDGEK, z fosforylowaną resztą serynową S₁₀₆. Jak wskazałem wcześniej wiele zidentyfikowanych peptydów metodą MS cechuje się sekwencjami rozpoznawanymi i fosforylowanymi przez kinazę CK2; a w związku z tym czy istnieje korelacja między substratami dla SnRK2 i CK2? Ponadto, S-segment posiada siedem reszt serynowych, a w związku z tym, ile grup fosforanowych zidentyfikowano a takim peptydzie wysokoprzepustową metodą MS; co sądzi Doktoranta o możliwości kaskadowej fosforylacji S-segmentu przez kinazę CK2, tj. najpierw reszta seryny w pozycji 112, a ta fosforylacja może prowadzić do fosforylacji



pozostałych reszt seryny (czy można określić ten stan na bazie wysokoprzepustowej analizy MS); w konsekwencji, S₁₀₆ może być także fosforylowana przez CK2, zakładając że CK rozpoznaje wzór aminokwasowy SXXD/E(pS) – pS – fosfo-seryna. Dodatkowo, Autorka wykonała ciekawą analizę, którą można zakwalifikować do analiz *'semi' in vivo* tj. analizę fosforylacji badanych białek w żelu SDS-PAGE wykorzystując ekstrakty białkowe z korzeni *A. thaliana*, roślin - WT lub roślin transgenicznych pozbawionych poszczególnych kinaz SnRK2; analiza ta wskazała, że ekstrakty te fosforylują badane białka i a co istotne masa molekularna kinaz jest zbliżona do masy kinaz z grupy SnRK2.10. Analiza ciekawa, jednakże pozwalająca tylko na identyfikację kinaz na bazie zbieżności z masą molekularną; a w związku z tym mam pytanie, czy metodę taką można rozbudować o analizę *'western blotting'* w celu jednoznacznej identyfikacji immunologicznej kinazy wykorzystując specyficzne przeciwciała anty-SnRK2.10? W kolejnym kroku, Autorka podjęła próbę analizy oddziaływań białko-białko między dehydrynami a kinazami. Wykorzystała Ona system drożdżowych dwóch hybryd oraz BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*); obie metody mają podobne zasady działania, tj. wykorzystanie białek hybrydowych i rekonstrukcja funkcjonalnego białka reporterowego (czy to czynnika transkrypcyjnego czy to białka fluorescencyjnego). Niestety, system drożdżowy dwóch hybryd nie wskazał na oddziaływanie, zaś na bazie BiFC (w układzie roślinnym) Autorka stwierdza, że takowa interakcja może zachodzić – dlaczego istnieje taka rozbieżność między tymi analizami. W takim wypadku czy trzecia niezależna metoda jak np. Co-IP pomogłaby rozstrzygnąć spór; może warto rozpatrzyć także technikę BiLD - *biotinylation proximity-dependent labelling*, bardzo efektywne podejście w analizach oddziaływań białko-białko. A z drugiej strony, zastanawiam się czy jest możliwe uchwycenie krótko-żyjących oddziaływań między kinazą białkową a jej substratem? Dalsze kroki Doktorantki, to analiza funkcjonalna roli fosforylacji białek ERD10 i ERD14, z wykorzystaniem mutantów fosfo- i defosfo-mimetycznych. Wykorzystała Ona przejściową ekspresję zmutowanych białek hybrydowych w modelowych roślinach jak *Nicotiana benthamiana*, czy protoplasty *Arabidopsis thaliana*. Autorka skupiła się przede wszystkim na białku GFP-ERD14, którego zachowanie w komórce roślinnej wykazywało ciekawe cechy; Białko WT-GFP-ERD14 lokalizowało się przede wszystkim w cytoplazmie zaś fosfo-mimetyk -- cytoplazma-jądro. Szczególnie, wykorzystując protoplasty zauważyła, że stres osmotyczny prowadzi do re-lokalizacji białka GFP-ERD14 do jądra, jednakże nie we wszystkich komórkach i wynik można określić jako heterogenne. Brak jednoznaczności w otrzymanych obserwacji może być wynikiem wpływu białka GFP, które może być dużym obciążeniem, lub nieodpowiednia pozycja GFP względem N- czy C-końca białka badanego; w opracowaniu nie znalazłem danych, które dotyczą analizy białka ERD14 w różnych konfiguracjach z GFP; czy Doktorantce dostępne są informacje na temat roli poszczególnych elementów białka ERD14, a tym samym można by dostosować pozycje GFP, tak aby nie interferowała z aktywnością badanego białka. W zakresie tych analiz, bardzo ważnym elementem walidującym zachowanie się białka ERD14 to analiza z wykorzystaniem rośliny transgenicznej *Arabidopsis thaliana*, która prowadziła ekspresję białka WT-GFP-ERD14 czy jego fosfo-mimetyka. Obserwacje komórek korzenia wskazały, że fosfo-mimetyk lokalizuje się w cytoplazmie jak i w jądrze (czy jest możliwa ewaluacja ilościowa dystrybucji białka fuzyjnego w objętości całej komórki), zaś WT-GFP-ERD14 występuje wyłącznie w cytoplazmie, a pod wpływem stresu widoczna jest re-lokalizacja do jądra (ponownie, ciekawy jestem czy to zachowanie się białka



hybrydowego można opisać ilościowo/cyfrowo wykorzystując potencjał analityczny mikroskopu konfokalnego); w jakiej skali ilościowej następuje przejście białka ERD14 z cytoplazmy do jądra? Ponadto, jaka była brana pula komórek do analizy, czy zmiany widoczne na zdjęciach są istotne statystycznie, ponieważ ocena wizualna jednej komórki jest utrudniona na bazie zamieszczonych zdjęć. Ciekawą obserwacją poczynioną przez Doktorantkę jest fakt, iż białko ERD14 w stresie lokalizowało się blisko membrany komórki i nawet tworzyło struktury nazwane 'bulb-like-structures'. Zjawisko to zostało po części wyjaśnione z zastosowaniem analizy dot-blot z fosfolipidami wskazując, że ERD14 wiąże liczne fosfolipidy (fosfatydyloseryna czy kwas fosfatydowy) ale co najważniejsze mutant fosfo-mimetyczny mniej wydajnie wiąże się do kwasu fosfatydowego. Wynik ten wraz z analizami sub-komórkowej lokalizacji białka ERD14 i jego mutantów znacząco przybliżył Doktorantkę do wyjaśnienia roli fosforylacji białka ERD14 – gratulacje.

Ostatnim elementem opracowania w zakresie prac badawczych jest rozszerzenie wglądu w potencjalne substraty białkowe dla kinaz SnRK2, które zostały zidentyfikowane w początkowych analizach MS i pokrewnych. Doktorantka za cel wybrała białko GRP8, należące do grupy białek wiążących RNA. Do analiz wykorzystwała już opracowany warsztat badawczy, który doskonale się sprawdził dla dehydryn. Wykorzystując analizę fosforylacji *in vitro* wraz z analizą MS zidentyfikowała miejsce fosforylacji, pozycja S27 i wskazała, że białko to jest fosforylowane przez kinazy niezależne od ABA, SnRK2.4 i 2.10. Przeanalizowała oddziaływania między kinazami SnRK2 a GRP8 wykorzystując system dwóch hybryd czy BiFC. Ponownie, wyniki są niekompatybilne; system dwóch hybryd nie pokazuje interakcji zaś BiFC tokową interakcję widzi; myślę, że trzecia metoda pozwoliłaby na rozwianie wątpliwości lub zmiana układu domen w systemie dwóch hybryd mogłaby rozwiązać problem; ewentualnie, czy jest możliwe, że tylko środowisko komórki roślinnej promuje interakcję? Jaka jest orientacja fragmentów białka YFP w poszczególnych analizowanych białkach w stosunku do C- czy N-końca, i jaka jest orientacja domen YFP w stosunku do systemu dwóch hybryd? W kolejnym kroku, Doktorantka wykonała analizę sub-komórkowej lokalizacji białka GRP8, w formie WT oraz mutacji S/A lub S/E. Wszystkie formy ulegały lokalizacji w cytoplazmie i jądrze, a co najważniejsze w warunkach stresu osmotycznego WT-GRP8 wysycało punktowe miejsca, w przeciwieństwie do wariantu S/A, który był niewrażliwy na warunki stresowe; niestety fosfo-mimetyk nie wykazał zmian w lokalizacji, co Doktorantka zinterpretowała, że mutacja S/E nie naśladuje potencjalnej fosforylacji; tak, można założyć taką możliwość, ale uważam, istnieje inna ewentualność, tj. wpływ białka GFP, którego pozycja (fuzja na C- lub N-końcu) względem badanego białka, może znacząco ograniczać jego aktywność biologiczną. Niezależnie od tych ograniczeń, Doktorantka na bazie analiz z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej i transfekcji komórek liścia *Nicotiana benthamiana*, czy wykorzystując protoplasty *Arabidopsis thaliana*, oraz z wykorzystaniem białek markerowych wykazała, że zaobserwowane struktury, w których lokalizuje się GRP8 w stresie to granule stresu; brak reaktywności mutantu S/A w tym zakresie prawdopodobnie wskazuje, że fosforylacja może regulować dystrybucję tego białka w komórce – wynik bardzo ciekawy, a przede wszystkim w kontekście najnowszych doniesień tzw. regulacji aktywności białek na zasadzie separacji faz (*liquid phase separation*), co jest obecnie uważane za



zasadniczą siłę, która formuje supra-molekularne struktury komórkowe pozbawione membrany, takie jak ciałka P czy ciałka stresu.

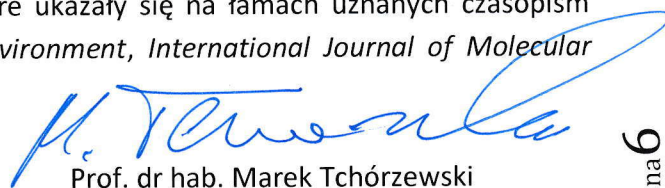
Podsumowując, przeprowadzone prace badawcze przez Panią mgr Justynę Maszkowską to bardzo spójne koncepcyjnie działania, wręcz można powiedzieć, że stanowią pewnego rodzaju układ kartezjański, z logicznie wytyczonymi wektorami poznawczymi. Podejście Doktorantki można określić jako analiza 'top-down', w której początkowo zastosowała wysokoprzepustowe analizy przesiewowe, a następnie skupiła swoją uwagę na pojedynczych zidentyfikowanych białkach, walidując ich fosforylacje z zastosowaniem biochemicznych technik *in vitro*, a następnie scharakteryzowała funkcję biologiczną tejże modyfikacji w układzie *in vivo* wykorzystując, jak że wymagający pod względem technicznym model roślinny. Wszystkie działania naukowe, to bardzo wymagające pod względem technicznym prace eksperymentalne, które zostały wykonane przez Doktorantkę bardzo dobrze, co wskazuje na pełne opanowanie warsztatu naukowego w zakresie biologii molekularnej, biochemii czy biologii komórki roślinnej. Część prac została wykonana także we współpracy z polskimi jak i zagranicznymi grupami naukowymi, co świadczy, że Doktorantka doskonale porusza się na płaszczyźnie współpracy naukowej, co jest kluczowe o obecnej dobie. W ocenie nie mogę pominąć końcowej części opracowania, a mianowicie Dyskusji; muszę podkreślić, iż dyskusja została przygotowana nad wyraz rzetelnie, profesjonalnie, wyczerpująco pod każdym względem, co pokazuje doskonałe przygotowanie merytoryczne Doktorantki; Wstęp w opracowaniu posiadał charakter analityczny, zaś Dyskusja to przykład podejścia syntetycznego, wnosząc istotną wartość dodaną do stanu wiedzy na temat roli kinaz SnRK2 oraz ich substratów białkowych.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Justyny Maszkowskiej to autorskie opracowanie naukowe, które spełnia wszystkie standardy stawiane opracowaniom tego typu. Stwierdzam, że przedstawienie analiz eksperymentalnych wraz z ich opracowaniem i dyskusją naukową zrealizowane zostały przez Doktorantkę w sposób nie budzący zastrzeżeń. Praca doktorska reprezentuje bardzo wysoki poziom metodyczny i merytoryczny. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016r. poz.882) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, o dopuszczenie Pani mgr Justyny Maszkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje, o nagrodzenie Pani mgr Justyny Maszkowska stosowną nagrodą za doskonałe przygotowanie pracy doktorskiej, wysoki profesjonalizm w prowadzonej narracji naukowej, co także przełożyło się na udział w trzech publikacjach, które ukazały się na łamach uznanych czasopism naukowych, jak: *Plant Physiology*, *Plant Cell & Environment*, *International Journal of Molecular Sciences*.

Lublin 09.10.2020


Prof. dr hab. Marek Tchórzewski

