



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PANI JUSTYNY MASZKOWSKIEJ ZATYTUŁOWANEJ:

„IDENTIFICATION OF PROTEINS PHOSPHORYLATED BY ABA-UNRESPONSIVE SNF1-RELATED PROTEIN KINASES (SNRK2S) IN PLANT RESPONSE TO SALINITY STRESS”

(IDENTYFIKACJA BIAŁEK FOSFORYLOWANYCH PRZEZ KINAZY BIAŁKOWE SNRK2 (SNF1-RELATED PROTEIN KINASES 2) NIEZALEŻNE OD KWASU ABCYSYNOWEGO W ODPOWIEDZI ROŚLIN NA STRES ZASOLENIA)

W toku ewolucji rośliny, jako organizmy osiadłe, wykształciły ogromną gamę umiejętności, które umożliwiają im wszechstronną adaptację do zmiennych warunków środowiska nieożywionego, jak i reagowanie na ogromną różnorodność organizmów żywych. Z tych względów badania mechanizmów reakcji roślin na różne stresy środowiskowe, w tym również na stres wywołany obecnością dużych ilości soli, są jednym z dominujących nurtów badawczych współczesnej biologii roślin. Wpisuje się w nie znakomicie przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani Justyny Maszkowskiej. Praca została wykonana w Pracowni Fosforylacji Białek Roślinnych Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie pod kierunkiem promotora, prof. dr hab. Grażyny Dobrowolskiej.

Recenzowana praca została napisana w języku angielskim w układzie typowym dla prac doktorskich. Rozprawa mieści się na 194 stronach maszynopisu. Właściwa rozprawa poprzedzona jest informacją o źródłach finansowania badań, streszczeniami: angielskim i polskim, informacją o publikacji części wyników w czasopismach naukowych, oraz wykazem stosowanych skrótów. Wstęp podsumowuje najważniejsze informacje dotyczące 1) procesów sygnalizacyjnych u roślin poddanych stresowi zasolenia oraz 2) udziału kinaz SnRK2 w sygnalizacji stresu osmotycznego u roślin. Wyodrębnioną część stanowi krótki rozdział zarysowujący główne cele rozprawy. W kolejnych dwóch rozdziałach opisane zostały wykorzystane materiały i stosowane metody. Po nich następuje omówienie uzyskanych wyników oraz ich dyskusja. Całość zamyka zestawienie cytowanej literatury.

Kinazy są ogromnie zróżnicowaną grupą enzymów, a jedną z najczęściej pełniących przez nie ról jest udział w szlakach sygnalizacyjnych. Choć białka te są wykrywane u wszystkich grup organizmów, to mają one szczególne znaczenie u organizmów osiadłych, które muszą radzić sobie w bardzo zróżnicowanych warunkach środowiskowych i reagować na pojawiające się zagrożenia natury biotycznej. Stąd też bardzo często właśnie u takich organizmów kinazy wyewoluowały w bardzo liczne rodziny spokrewnionych ze sobą enzymów. Przykładem jest rodzina kinaz serynowo/treoninowych SnRK2 – geny kodujące te białka wykryto we wszystkich dotąd zsekwencjonowanych genomach roślinnych. Przez wiele lat badań wypracowano różne podejścia metodologiczne umożliwiające poznanie znaczenia kinaz w życiu roślin i ich funkcjonowania na różnych poziomach organizacji hierarchicznej. Jednym z najtrudniejszych zagadnień w badaniach tych enzymów jest pytanie o to, jakie białka są substratami kinaz, a w konsekwencji, jakie procesy komórkowe i fizjologiczne są – i za czym pośrednictwem – uruchamiane przez kinazy. W rozprawie Doktorantka postawiła sobie ambitny cel zidentyfikowania białek fosforylowanych przez kinazy SnRK2 niezależne od ABA i zaliczane do grupy 1 (SnRK2.1, SnRK2.4, SnRK2.5, SnRK9 i SnRK2.10), a w szczególności: 1) określenia potencjalnych substratów kinazy SnRK2.10; 2) potwierdzenia, że zidentyfikowane białka są rzeczywiście przez tę kinazę fosforylowane; 3) ustalenia potencjalnego znaczenia fosforylacji prowadzonej przez kinazy SnRK2 z

prof. dr hab. Przemysław Wojtaszek  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań  
tel. +48 61 829 5972, kom. +48 666 384 066  
przemow@amu.edu.pl



grupy 1 w reakcjach roślin na pojawiające się stresy, zwłaszcza stres zasolenia. Trzeba przyznać, że arsenał zaprzęgniętych przez Doktorantkę technik doświadczalnych jest imponujący, poczynając od klasycznych technik biochemii, biologii molekularnej, czy inżynierii generycznej, poprzez zaawansowane metodologie proteomiki, a na podejściach biologii komórki wykorzystujących mikroskopię fluorescencyjną kończąc.

Aby zidentyfikować białka fosforylowane przez kinazy SnRK2 z grupy 1, Doktorantka wybrała jako swój układ modelowy rośliny *Arabidopsis thaliana* z regulowaną ekspresją kinazy SnRK2.10 (typu dzikiego, mutanty knock-out oraz rośliny transgeniczne z nadekspresją genu kodującego SnRK2.10), które poddawane były krótkoterminowemu stresowi zasolenia (250 mM NaCl przez 30 min). Identyfikację białek poprowadziła trzema różnymi drogami, z których dwie wykorzystywały izolację białek z korzeni roślin, a trzecia bazowała na prowadzeniu reakcji fosforylacji predefiniowanych substratów przez rekombinowane kinazy SnRK2, w tym SnRK2.10. Wynikiem tych doświadczeń była identyfikacja 94 białek metodą wzbogacania fosfopeptydów przy użyciu chromatografii powinowactwa na złożu tlenku tytanu, 26 białek – metodą identyfikacji fosforylowanych białek rozdzielonych na drodze elektroforezy dwukierunkowej, oraz 30 białek – metodą fosforylacji *in vitro*. Dokładniejsze przyjrzenie się wynikom pokazuje, że poszczególne zestawy białek dość mocno różnią się między sobą i w pracy zabrakło mi nieco szerszej dyskusji przyczyn tego zróżnicowania. Chciałbym wobec tego poprosić o nieco obszerniejszy komentarz, zwłaszcza w odniesieniu do obu technik wykorzystanych do analizy ekstraktów białkowych. Szczególnie interesują mnie dwie kwestie. Pierwszą jest pytanie o powody wyboru dość wąskiego zakresu pH 4-7 do ogniskowania izoelektrycznego białek roślinnych w elektroforezie dwukierunkowej. Czy wynikało to z nagromadzonej wiedzy ogólnej lub doświadczenia badawczego zespołu? Czy też powodem była, rozpoznana wcześniej, potencjalna lokalizacja cytoplazmatyczna kinazy SnRK2.10? Czy w opinii Doktorantki warto w ogóle rozważać w tym przypadku rozdzielanie białek w innych zakresach pH? Drugą kwestią jest obserwacja swoistej nadreprezentacji peptydów tubuliny i aktyny w próbkach rozdzielanych na drodze elektroforezy dwukierunkowej w stosunku do próbek identyfikowanych metodą wzbogacania fosfopeptydów na złożu tlenku tytanu. Czy Doktorantka miałaby jakiś pomysł na wyjaśnienie przyczyny takiego zróżnicowania?

Opierając się na uzyskanych wynikach, jak również na wcześniejszych danych literaturowych, Doktorantka wybrała trzy białka: dehydryny ERD10 i ERD14 oraz bogate w glicynę białko wiążące RNA – GRP8, do dalszych analiz szczegółowych. Te obejmowały: 1) badania fosforylacji białek-substratów *in vitro* dla potwierdzenia, że rzeczywiście są one fosforylowane przez kinazy SnRK2, w tym przez kinazę SnRK2.10; oraz 2) identyfikację reszt aminokwasowych, do których przyłączana jest grupa fosforanowa, jak również ustalenie ulokowania tych reszt w obrębie swoistych sekwencji docelowych. W tej drugiej części Doktorantka przeprowadziła również badania fosforylacji zmutowanych form dehydryn, w których potencjalne miejsca fosforylacji zostały zmienione na warianty nienadające się do fosforylacji. W wyniku doświadczeń, Doktorantka potwierdziła, że obie dehydryny są fosforylowane przez dwie kinazy należące do grupy 1, a mianowicie SnRK2.4 i SnRK2.10. Wreszcie, Pani Maszkowska przeprowadziła badania oddziaływań dehydryn z kinazami SnRK2, również z wykorzystaniem dwóch niezależnych metod badań *in vivo*: drożdżowego testu dwuhybrydowego oraz mikroskopowej obserwacji z użyciem technologii BiFC. Tu chciałbym oczywiście spytać, czy rozważane były również inne techniki, w szczególności FLIM-FRET, który na pewno przyniósłby bardziej rozstrzygające wyniki, do pewnego stopnia kwantyfikowalne? Jakie jeszcze inne podejścia mogłyby zostać wykorzystane, również z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej?

Powyższe badania zostały uzupełnione analizą potencjalnych efektów wywołanych fosforylacją dehydryn *in vivo*. Do tego celu wykorzystano przejściową ekspresję rekombinowanych białek w dwóch systemach: infiltrowanych liściach *Nicotiana benthamiana* oraz protoplastach *Arabidopsis thaliana*. Wykorzystano dehydryny typu dzikiego oraz ich zmutowane formy, w których fosforylowana seryna S106 (ERD 10) lub S79 (ERD14) została zastąpiona alaniną (forma nie podlegająca fosforylacji) lub kwasem glutaminowym (forma naśladująca trwale ufosforylowane białko).

prof. dr hab. Przemysław Wojtaszek  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań  
tel. +48 61 829 5972, kom. +48 666 384 066  
przemow@amu.edu.pl



Uzyskane wyniki potwierdzono następnie również z wykorzystaniem roślin transgenicznych wyrażających różne formy dehydryn. Ciekawą konkluzją tych badań jest obserwacja, że fosforylacja S79 w ERD14 w reakcji roślin na stres zasolenia może prowadzić do zmiany lokalizacji tej dehydryny i pojawieniu się jej w jądrze komórkowym. Co więcej, fosforylacja w reakcji na stres zasolenia może również prowadzić do osłabienia oddziaływań dehydryn z błonami biologicznymi. Tu Doktorantka udowodniła także, że oddziaływanie kinaz SnRK2, zwłaszcza SnRK2.4 i SnRK2.10 z kwasem fosfatydowym może hamować ich aktywność fosforylacyjną.

Podobny zestaw doświadczeń został również wykonany dla trzeciego wybranego substratu kinaz SnRK2 z grupy 1, a mianowicie dla bogatego w glicynę białka wiążącego RNA – GRP8. Autorka udowodniła, że GRP8 jest fosforylowane przez SnRK2.10, a ta fosforylacja, w reakcji na stres zasolenia, jest kluczowa dla obserwowanej migracji białka GRP8 do granul stresowych, zawierających kompleksy białko-RNA.

## PODSUMOWANIE

Przedstawioną do recenzji rozprawę Pani Justyny Maszkowskiej oceniam jako całość wysoko. Praca jest bardzo zwartym dziełem opisującym analizę potencjalnych substratów białkowych kinaz typu SnRK2 w warunkach stresu solnego. Wysoko oceniam wielowarstwowość przeprowadzonych badań, zwłaszcza wykorzystanie kilku metod identyfikacji fosforylowanych peptydów oraz analizę wybranych potencjalnych substratów przy zastosowaniu kilku różnych podejść eksperymentalnych. Rozprawę czyta się dobrze i z dużą przyjemnością. Wywód poprowadzony jest logicznie, doświadczenia dobrze zaplanowane i wykonane. **Konkludując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.), tj. stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w określonej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Warto również zauważyć, że badania realizowane były w ramach projektów badawczych finansowanych przez NCN i MNiSW, jak również w ramach minigrantu Szkoły Biologii Molekularnej IBB PAN, a uzyskane wyniki zostały już częściowo opublikowane w dwóch pracach zamieszczonych w bardzo dobrych międzynarodowych czasopismach naukowych. Wobec powyższego z pełnym przekonaniem wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie o dopuszczenie Pani Justyny Maszkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

P. Wojtaszek

prof. dr hab. Przemysław Wojtaszek  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań  
tel. +48 61 829 5972, kom. +48 666 384 066  
przemow@amu.edu.pl