

Abstract

Plants growing in natural conditions are exposed to numerous environmental stresses, both biotic and abiotic. Because of their inability to avoid these stresses by moving away, they had to develop specific defense mechanisms to survive. Upon stress signal recognition plants trigger specialized signaling pathways in which protein kinases and phosphatases play crucial roles. One of the main groups of kinases involved in stress signaling is the SnRK2 family. These kinases are engaged in the plant response to various abiotic and biotic stresses, and in the plant development dependent on ABA. Basing on a phylogenetic analysis, SnRK2s have been divided into three groups. This classification correlates well with their sensitivity to ABA: group 1 comprises kinases independent of ABA, group 2 – those not activated or weakly activated by ABA, and group 3 – kinases strongly activated by ABA.

So far, group 3 (SnRK2.2, SnRK2.3 and SnRK2.6 in *A. thaliana*) is the best known. These kinases are the main regulators of the plant response to ABA in osmotic stress (e.g., salinity and drought), in the response to bacterial pathogens, and during development. Numerous cellular substrates of these enzymes have been identified. Among them are proteins involved in the regulation of gene expression, stomatal closure or water distribution, as well as redox homeostasis. Kinases belonging to group 2 (SnRK2.7 and SnRK2.8 in *Arabidopsis*) play similar roles as those from group 3. They also act as positive regulators of the plant response to water deficit, and they probably complement the activity of group 3 kinases. SnRK2.8 has also been shown to be involved in the regulation of metabolism and the plant response to a pathogen attack. Among their substrates are proteins involved in the regulation of gene expression, sugar metabolism and SA-independent systemic response to pathogens.

Group 1 of SnRK2s (SnRK2.1, SnRK2.4, SnRK2.5, SnRK2.9 and SnRK2.10 in *Arabidopsis*) is the least known. They regulate the plant response to abiotic stresses, mainly the osmotic one. SnRK2.4 and SnRK2.10 play a crucial role in the regulation of development of roots and in maintaining the homeostasis of reactive oxygen species under salinity stress conditions. The knowledge about specific substrates of this group of kinases is limited. So far, they have been demonstrated to phosphorylate two proteins involved in RNA degradation, VARICOSE and VARICOSE-RELATED. It has also been

found that *in vitro* SnRK2.10 preferentially phosphorylates a conserved motif, L-x-R-x-x-S/T, in proteins.

The goal of my work was to identify new substrates phosphorylated by SnRK2.10 in plant cells in response to salinity stress. I chose this particular kinase since it has been shown to be involved in the response to salinity and is the only SnRK2 with an exclusively cytoplasmic localization. Since other SnRK2s demonstrate nuclear-cytoplasmic localization, a unique role of SnRK2.10 in the plant response to the stress could be expected. Initial experiments comprised three independent phosphoproteomic analyses. Two of them were conducted for a comparative analysis of proteins phosphorylated in roots of *A. thaliana* under salinity conditions in the wild type, an *snrk2.10* mutant lacking SnRK2.10, and in plants overproducing the kinase. The third approach was based on screening of a library of peptides phosphorylated *in vitro* by SnRK2s belonging to different groups. From among all putative substrates of SnRK2.10 identified, three proteins were chosen for the further studies: dehydrins ERD10 and ERD14, and glycine-rich RNA-binding protein GRP8. I confirmed that ERD10, ERD14, and GRP8 are bona fide targets of SnRK2.10 and also of SnRK2.4, another member of group 1 SnRK2s. Using MS analysis, I identified the main phosphorylation sites for these kinases in the substrates selected. In all three substrates they were in the L-x-R-x-x-S/T motif. I also demonstrated *in planta* interactions of all three targets with the both kinases and established the effects of their phosphorylation.

I showed that the phosphorylation of ERD14 on Ser 79 is needed for its transport from the cytoplasm to the nucleus under salinity conditions. The nuclear localization of ERD14, probably connected with its chaperone activity, was postulated but had never been confirmed experimentally before. I also demonstrated that the same phosphorylation affects the ability of ERD14 to bind to membranes by weakening the interaction with phosphatidic acid. Additionally, my studies indicated that phosphorylation of Ser 27 in GRP8 is required for its translocation into specific RNA-protein complexes, stress granules, in response to salt stress. Under various stress conditions mRNAs kept in these structures are prevented from being translated. This is the first indication of the GRP8 presence in stress granules.

The obtained results extend our knowledge about the role of SnRK2.10 and the ABA-independent SnRK2s in general in the regulation of the plant response to salt stress.

Streszczenie

Rośliny rosnące w naturalnych warunkach narażone są na działanie wielu stresów, zarówno biotycznych jak i abiotycznych. Ze względu na niezdolność do przemieszczania się rośliny musiały wykształcić specyficzne mechanizmy obrony przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi. Jedną z głównych grup enzymów biorących udział w przekazywaniu sygnału stresu u roślin jest rodzina serynowo/ treoninowych kinaz SnRK2. Biorą one udział w odpowiedzi rośliny na stresy abiotyczne (przede wszystkim stres zasolenia i suszy), biotyczne oraz w rozwoju rośliny zależnym od ABA. Na podstawie filogenezy rodzinę tę podzielono na trzy grupy. Podział ten jest skorelowany z ich zdolnością do aktywacji przez ABA. Grupę 1 stanowią kinazy niezależne od ABA, grupę 2 – kinazy nieaktywowane lub aktywowane bardzo słabo przez ABA, grupę 3 – kinazy silnie aktywowane przez ABA.

Jak dotąd, najlepiej poznana jest grupa 3 (u *A. thaliana* są to SnRK2.2, SnRK2.3 i SnRK2.6). Kinazy te są głównymi regulatorami odpowiedzi roślin na obecność ABA zarówno w warunkach stresu osmotycznego, ataku patogenów bakteryjnych, jak i podczas rozwoju rośliny. Zidentyfikowano szereg ich substratów komórkowych. Wśród nich są m. in. białka zaangażowane w regulację ekspresji genów, zamknięcie aparatów szparkowych, dystrybucję wody w roślinie, jak również homeostazę redoks. Kinazy z grupy 2 (u *Arabidopsis*: SnRK2.7 i SnRK2.8) pełnią podobne funkcje, co grupa 3. Również one są pozytywnymi regulatorami odpowiedzi na deficyt wody. Ponadto, biorą udział w regulacji metabolizmu rośliny i odpowiedzi na atak patogenów. Pośród znanych substratów tej grupy znajdują się białka zaangażowane w regulację ekspresji genów, metabolizm cukrów oraz niezależną od kwasu salicylowego systemiczną odpowiedź rośliny na patogenezę.

Najmniej wiadomo o grupie 1 kinaz SnRK2 (u *Arabidopsis*: SnRK2.1, SnRK2.4, SnRK2.5, SnRK2.9 i SnRK2.10). Biorą one udział w regulacji odpowiedzi na stres abiotyczny, głównie osmotyczny. Pokazano, że SnRK2.4 i SnRK2.10 pełnią kluczową rolę w regulacji wzrostu korzeni oraz homeostazy reaktywnych form tlenu w warunkach stresu solnego. Niewiele wiadomo na temat specyficznych substratów tej grupy kinaz. Jak dotąd pokazano, że fosforylują one dwa białka zaangażowane w proces degradacji RNA, VARICOSE oraz VARICOSE-RELATED. Stwierdzono również, że *in vitro* kinaza SnRK2.10 fosforyluje konserwowany motyw L-x-R-x-x-S/T.

Celem mojej pracy była identyfikacja nowych substratów kinazy SnRK2.10, fosforylowanych w komórkach roślinnych w odpowiedzi na stres zasolenia. Wybrałem tę kinazę, ponieważ jako jedyna wykazuje ona lokalizację cytoplazmatyczną, a nie cytoplazmatyczno-jądrową jak reszta kinaz SnRK2, co może sugerować jej unikalną funkcję w szlaku sygnałowym odpowiedzi na stres. W pierwszym etapie badań wykorzystałem trzy niezależne metody fosfoproteomiczne. Dwie z nich posłużyły do analizy porównawczej białek fosforylowanych w korzeniach *A. thaliana*, w roślinach typu dzikiego, pozbawionych aktywności SnRK2.10 oraz nadprodukujących tę kinazę, w odpowiedzi na stres zasolenia. Trzecia metoda opierała się na przeszukaniu biblioteki peptydów fosforylowanych *in vitro* przez kinazy SnRK2 z różnych grup. Spośród wszystkich zidentyfikowanych potencjalnych substratów kinazy SnRK2.10 do dalszych badań wybrałem trzy białka:dehydryny ERD10 i ERD14 oraz bogate w glicynę białko wiążące RNA, GRP8. W kolejnym etapie badań potwierdziłem, że ERD10, ERD14 i GRP8 są fosforylowane przez SnRK2.10, a także SnRK2.4, również należącą do grupy 1. Za pomocą analizy MS zidentyfikowałem główne miejsca fosforylacji dla tych kinaz w badanych substratach. We wszystkich trzech białkach znajduje się ono w motywie L-x-R-x-x-S/T. Pokazałem również, że wszystkie trzy substraty oddziałują z kinazami SnRK2.4 i SnRK2.10 *in planta*.

W niniejszej rozprawie wykazałem, że fosforylacja Ser 79 w ERD14 jest kluczowa dla transportu tego białka z cytoplazmy do jądra komórkowego w warunkach stresu solnego. Jądrowa lokalizacja ERD14, związana prawdopodobnie z czaperonową rolądehydryny, była wcześniej postulowana, ale nigdy nie została potwierdzona eksperymentalnie. Pokazałem również, że badana fosforylacja może zmieniać zdolność oddziaływanego ERD14 z błonami poprzez osłabienie wiązania z kwasem fosfatydowym. Ponadto, uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że fosforylacja Ser 27 w GRP8 jest kluczowa dla translokacji tego białka do specyficznych kompleksów RNA-białka zwanych granulami stresowymi, w warunkach zasolenia. W kompleksach tych przechowywany jest mRNA nielegający translacji w warunkach stresu. Jest to pierwsze doniesienie o udziale GRP8 w tworzeniu tego typu struktur.

Podsumowując, przedstawione w poniżej rozprawie wyniki pokazują nowe role kinaz SnRK2 niezależnych od ABA w regulacji odpowiedzi roślin na stres zasolenia.