

Návrh témy doktorandského štúdia v odbore Fyziológia rastlín so začiatkom štúdia v školskom roku 2024/2025

Meno školiteľa: doc. Mgr. Viktor Demko, PhD.

Pracovisko: Botanický ústav, Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV, v.v.i.

Študijný program: Fyziológia rastlín

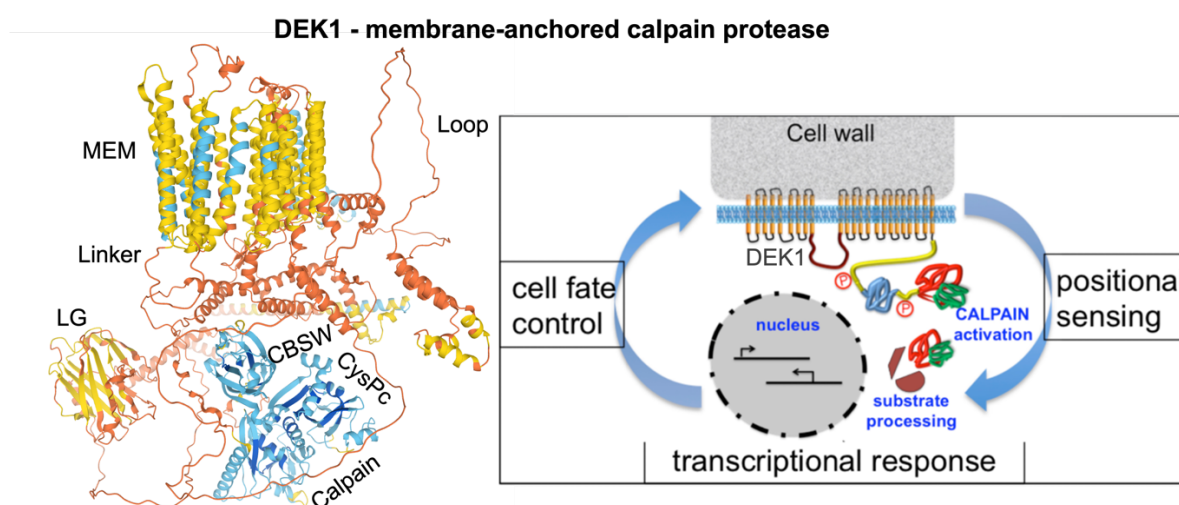
Téma neprístupná pre externé štúdium (len interné štúdium)

Téma pre: BÚ, CBRB SAV

Téma dizertačnej práce slovensky/anglicky:

Objasnenie molekulárnej funkcie rastlinného kalpainu DEK1

Uncovering the molecular function of plant calpain DEK1



Ilustračný obrázok: Vľavo, predpokladaná štruktúra DEK1 s popisom jednotlivých domén podľa AlphaFold. Vpravo, model funkcie DEK1.

Anotácia (vrátane cieľa): DEFECTIVE KERNEL 1 (DEK1) je mnoho-doménový membránový proteín s kalpainovou proteázou na C-konci. DEK1 má esenciálne funkcie počas celej ontogenézy rastlín. Od jeho aktivity závisí správna orientácia bunkových delení a špecifikácia bunkovej identity ako napr. epidermálnych buniek alebo aleurónových buniek v semenách obilnín. Súčasný model funkcie DEK1 predpokladá senzorickú úlohu jeho veľkej transmembránovej domény, regulačnú funkciu Linker segmentu a proteolytickú aktivitu kalpainovej proteázy. Napriek nevyhnutnosti DEK1 pre akýkoľvek organizovaný rast rastlín sú mnohé aspekty jeho molekulárnej funkcie stále neznáme. Predovšetkým, nepoznáme priame substráty DEK1 kalpainu, nepoznáme štruktúru a molekulárnu funkciu transmembránovej domény DEK1, a nie je jasné, aké mechanizmy sa podieľajú na časopriestorovej regulácii aktivácie DEK1 kalpainu. V našom laboratóriu sa zaoberáme genetickými analýzami DEK1 v modelovom organizme *Physcomitrium patens*. Pracujeme tiež na prepojení funkcie DEK1 s ďalšími dôležitými regulačnými mechanizmami ako napr. epigenetická modifikácia DNA a RNA. Naším dlhodobým zámerom je tiež určenie 3D štruktúry DEK1 proteínu.

Cieľom tejto práce bude identifikovať a experimentálne validovať interaktory/substráty DEK1 proteínu využitím genetických, bunkovo-biologických a biochemických prístupov. Ako modelové rastliny budú použité *Physcomitrium patens*, *Arabidopsis thaliana* a *Zea mays*.

Projekt prebieha v rámci medzinárodnej spolupráce a od doktorandov sa očakáva absolvovanie výskumného pobytu na zahraničnom pracovisku.

Annotation (including the aim of thesis):

DEFECTIVE KERNEL 1 (DEK1) is a multi-domain membrane protein with calpain protease at its C-terminus. DEK1 plays essential roles throughout plant ontogenesis. DEK1 activity is necessary for correct execution of asymmetric cell divisions and cell fate specification in epidermis, shoot apical meristem or nutrient-rich aleurone cells in cereal endosperms. Current model of DEK1 action suggests a sensory function of its transmembrane domain, a regulatory role of the Linker segment and proteolytic activity of the calpain domain. Despite its indispensable role for organized growth, many aspects of DEK1 molecular function are still unknown. In particular, no genuine cellular substrate of the DEK1 calpain protease has been identified, the structure and molecular mode of action of its transmembrane domain is unknown, and still don't understand how is the activity of DEK1 precisely regulated at spatiotemporal level. In our lab, we use reverse genetics approach to investigate DEK1 function in the model plant *Physcomitrium patens*. We aim to identify links between the DEK1 function and other important regulatory mechanism including epigenetic modification of DNA and RNA. Our long-term goal is to contribute to the DEK1 protein 3D structure determination.

The main goal of this doctoral thesis will be to identify and experimentally validate direct DEK1 calpain interactors and substrates using genetics, cell biology and biochemistry approaches. *Physcomitrium patens*, *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* will be used as model plants.

Doctoral students are expected to spend research visits at collaborating specialized labs abroad.

Navrhované metodické postupy:

- Cílená mutagenéza prostredníctvom homologickej rekombinácie a CRISPR/Cas9
- Proximity-labeling assay (technika pre *in vivo* značenie a identifikáciu interakčných partnerov študovaného proteínu)
- Indukovateľná (kondicionálna) a pletivovo-špecifická expresia cieľových génov
- Využitie existujúcich a príprava nových reportérových línií s cieľom monitorovania dynamiky a aktivity cieľových proteínov v bunkách modelových rastlín
- Konfokálna laserová mikroskopia, elektrónová mikroskopia
- Analýzy epigenetických modifikácií DNA a RNA, proteomické analýzy

Proposed methodology:

- Targeted mutagenesis using homologous recombination and CRISPR/Cas9
- *Proximity labeling assay* to identify putative *in vivo* interactors of DEK1 protein
- Inducible and tissue-specific expression of genes of interest
- Using reporter lines to monitor subcellular distribution and dynamics of target proteins in plant cells
- Confocal laser microscopy, electron microscopy
- DNA and RNA methylation analyses, proteomic analyses

Dostupné alebo plánované zdroje financovania:

Projekt je v súčasnosti financovaný grantami APVV-21-0227 (obdobie 2022-2026) a VEGA 1/0352/21 (2021-2024). V súvislosti s riešenou problematikou bol podaný návrh projektu z Plánu obnovy (aktuálne v hodnotení). Priebežne budeme reagovať na ďalšie relevantné výzvy grantových schém.

Predpokladané publikačné výstupy v časopisoch WOS (približný okruh časopisov):

Plant Physiology, IF: 7, 4

New Phytologist, IF: 10, 32

Journal of Experimental Botany, IF: 6, 99

Current Opinion in Plant Biology, IF: 9, 39

Kľúčové slová (3-5): CRISPR/Cas9, DEK1, epigenetická kontrola, kalpainová proteáza, kontrola bunkovej identity, vývin rastlín

Keywords (3-5): calpain protease, cell fate control, CRISPR/Cas9, DEK1, plant development, proximity labeling

Kontakt: Viktor Demko, botuvide@savba.sk, viktor.demko@uniba.sk, +421 908 552 685