

Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-16-0398**Funkčná analýza synaptotagmínov so zreteľom na odpovede rastlín na environmentálne stresy.**Zodpovedný riešiteľ **doc. RNDr. Ján Jásik, DrSc.**

Príjemca

Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV - Botanický ústav SAV

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Botanický ústav, Centrum biológie rastlín a biodiverzity, Slovenská akadémia vied v spolupráci s Vedeckým parkom Univerzity Komenského a Katedrou botaniky Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a v spolupráci s Ústavom biologických a ekologických vied Prírodovedeckej fakulty Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Beijing Key Laboratory of Gene Resource and Molecular Development, College of Life Science, Beijing Normal University, China, koordinácia výskumu AtSYT3 génu.
Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of Malaga, Spain, výmena konštruktov, príprava Erasmus pobytov.
Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic, konzultácie v oblasti fotosyntézy, pomoc s protilátkami.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

neboli

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

WOS publikácie

Lešková A., Kusá Z., Labajová M., Krausko M., Jásik J. The photoconvertible fluorescent protein Dendra2 tag as a tool to investigate intracellular protein dynamics. *Methods Mol Biol*, 1992, 2001-2014, 2019

Lešková A., Labajová M., Krausko M., Zahradníková A., Baluška F., Mičieta K., Turňa J., Jásik, J.: Endosidin 2 accelerates PIN2 endocytosis and disturbs intracellular trafficking of PIN2, PIN3, and PIN4 but not of SYT1. *PLoS ONE*, 15, p. e0237448, 2020

Krausko M., Kusá Z., Peterková D., Labajová M., Kumar A., Pavlovič A., Bačovčinová M., Bačkor M., Jásik J: The absence of the atsy1 function elevates the adverse effect of salt stress on photosynthesis in *Arabidopsis*. *Int J Mol Sci*, 2021, (v tlači)

Konferencie s publikovanými abstraktami

Jásik J., Lešková A., Labajová M., Turňa J.: Photoconvertible Fluorescence Proteins as Reporters to Monitor Intracellular Dynamics of Plasma Membrane Proteins. In International Conference "Plant Transformation & Biotechnology IV". Programme and Abstracts. Vienna,

June 29-30, 2017, p. 18.

Lešková A., Labajová M., Krausko M., Kusá Z., Zahradníková A., Turňa J., Jásik J.: Endosidin2 by disruption of golgi/trans-golgi network integrity affects trafficking routes of plasma membrane proteins. In International Conference Plant Physiology & Biochemistry, Vienna, July 9-10, 2018. Programme and Abstracts, p. 33.

Jásik J., Schmelzer E.: The occurrence of plasma membrane proteins in compartments induced by Brefeldin A is not an appropriate method for monitoring their endocytosis. In Small Molecules in Plant Research, Valencia, 10-11 December 2019, p. 67.

Lešková A., Labajová M., Krausko M., Zahradníková A., Mičieta K., Turňa J., Jásik J.: Endosidin2 as a tool to study membrane protein dynamics. In Small Molecules in Plant Research, Valencia, 10-11 December 2019, p. 68.

Bugala J., Kusá Z., Labajová M., Krausko M., Lešková A., Jásik J.: Klonovanie, expresia a purifikácia synaptotagmínu v bunkách E.coli. "Biochemické dni", Horný Smokovec, 21.-24.9. 2019. ISBN 978- 80-89965-27-4.

Pozvané prednášky

Jásik J.: Photoconvertible Fluorescence Proteins as Reporters to Monitor Intracellular Dynamics of Plasma Membrane Proteins. International Conference VISCEA 2017: "Plant Transformation & Biotechnology IV". 29 – 30. 06. 2017, Viedeň, Rakúsko

Jásik J.: A fresh look at membrane protein dynamics, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika, 27. 03. 2018

Jásik J.: Intracellular dynamics of plasma membrane proteins explored by a photo-convertible Dendra2 tag. Scientific seminar at College of Life Sciences, Beijing Normal University, Peking, Čína, 10. 10. 2018

Jásik J.: Trafficking of plasma membrane proteins: facts and artifacts. Universidad de Málaga-IHSM-UMA-CSIC, Malaga, Španielsko, 12. 12. 2019

Ostatné konferencie, sympóziá a semináre

Krausko M.: Role of AtSYT1 in biotic and abiotic stress response. Mini-sympózium „Plants in stress conditions and beyond“, CBRB, Bratislava, 02. 07. 2019

Kusá Z.: Expression analysis of AtSYT3. Mini-sympózium „Plants in stress conditions and beyond“, CBRB, Bratislava, 02. 07. 2019

Jásik J.: Arabidopsis synaptotagmins: state of the art and perspectives. Scientific seminar at College of Life Sciences, Beijing Normal University, Peking, Čína, 10. 10. 2018

Popularizačné aktivity

Jásik J.: Veda na dosah, <https://vedanadosah.cvtisr.sk/priroda/biologia/protein-ktory-hra-klucovu-ulohu-v-odpovediach-rastlin-na-stres/>

Jásik J.: Nočná pyramída, Rádio Slovensko, 4.11.2021, <https://www.rtvs.sk/radio/archiv/11436/1676482>

Krausko M.: Veda na dosah, <https://vedanadosah.cvtisr.sk/priroda/biologia/podcast-kam-siaha-inteligencia-rastlin/>

(<https://open.spotify.com/episode/2Q7WWM3V8WO93ETbYBpLaQ>

<https://www.youtube.com/watch?v=YJk-Ts8KfR4&t=2s>

Uplatnenie výsledkov projektu

Projekt sa týkal základného výskumu a nebolo očakávané bezprostredné vyústenie výsledkov do praxe. Z dlhodobého hľadiska a predovšetkým so zreteľom na početné práce týkajúce sa AtSYT1 génu, ktoré sa objavili aj počas riešenia projektu, by mohli naše výsledky, po vyriešení problematiky s transgénymi rastlinami, prispieť k tvorbe odolných rastlín voči environmentálnym stresom. Z vedeckého hľadiska si myslíme, že výsledky dosiahnuté v rámci projektu sú významným príspevkom k objasneniu úlohy dosiaľ nepopísaných AtSYT3, AtSYT4 a AtSYT5 génov. Ich veľmi špecifická expresia načrtáva ich možnú participáciu vo vývine sprievodných buniek prieduchov v prípade AtSYT3, trichómov v prípade AtSYT5 či floému v prípade AtSYT4. Spolu s údajmi zo štúdií rôznorodých faktorov na aktivitu promótorov, ktoré sme urobili v rámci projektu, budú návodom pre ďalšie smerovanie výskumu v tejto oblasti pomocou mutantných, dvojítych alebo viacnásobných mutantných línií. Taktiež prehĺbenie znalostí o AtSYT1 géne, ktorý začína byť veľmi populárny, sú významné, keďže sme skúmali po prvý krát jeho funkciu na úrovni rastlín pokročilého štádia a nie v podmienkach in vitro. Táto štúdia môže byť inšpiráciou pre iné laboratória. Definovali sme úlohu AtSYT1 vo fotosyntéze pravdepodobne prostredníctvom prieduchov a v tejto súvislosti je zaujímavá silná expresia AtSYT3 v zatváracích bunkách

prieduchov. Štúdie dvojitych *atsyt3/atsyt1* mutantných línií by mohli v budúcnosti priniesť veľmi zaujímavé výsledky. V tejto oblasti pokračujeme vo výskume. Za dôležitý metodologický príspevok považujeme zavedenie a rozvinutie metódy fotokonvertibilného fluorescenčného proteínu Dendra2 ako próby pre štúdium dynamiky proteínov. V tejto oblasti sme lídrami. Pripravené konštrukty pre AtSYT proteíny a transgénne rastliny majú veľký potenciál pre poznanie dynamiky AtSYT proteínov. V projekte sme študovali niektoré malé molekuly, ktoré by mali ovplyvňovať dynamiku membránových proteínov. Naše výsledky priniesli nové poznatky o vplyve Endosidínu2, ktorý má zjavne aj iné účinky okrem blokovaní funkcie exocystového komplexu ako bolo navrhnuté v predchádzajúcich štúdiách. Tieto poznatky budú iste zohľadnené v bunkovobiologických štúdiách s použitím Endosidínu 2. Dôležitým výsledkom bolo zapojenie sa mladých vedcov do riešenia projektu. Z dlhodobých riešiteľov okrem dvoch skúsených, všetci boli mladí vedeckí pracovníci do 35 rokov, včítane piatich doktorandov. Témy prác dvoch doktorandov (jeden zo zahraničia) boli súčasťou projektu, ostatní riešili čiastkové úlohy. Mladí vedeckí pracovníci získali laboratórne skúsenosti v moderných metódach molekulárnej a bunkovej biológie rastlín, čo bude iste prospešné pre ich ďalší kariérny rast. V neposlednej miere aj vďaka projektu sme mohli lepšie vybaviť laboratória pre budúcu prácu na SYT génoch. V troch príspevkoch v masovokomunikačných médiách sme spropagovali projekt a dufame vyvolali záujem o rastlinnú vedu, ktorá je často zanedbávaná v celosvetovom meradle.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Vedeckým cieľom projektu bolo objasniť úlohu synaptotagmínov vo vývine rastlín a v odpovediach na environmentálne stresy pomocou modelového organizmu *Arabidopsis thaliana*. Boli vytýčené štyri hlavné smery s mnohými čiastkovými úlohami. Analyzovali sme expresiu dosiaľ neopísaných génov AtSYT3, AtSYT4 a AtSYT5 na rôznych úrovniach. Pripravili sme transkripčné konštrukty s GUS reportérom pre analýzu sily promótorov a pomocou fluorometrickej kvantitatívnej metódy a rôznych histochemických postupov sme zistili aktivitu promótorov na orgánovej, pletivovej a subpletivovej úrovni. Zistili sme značné rozdiely v aktivite jednotlivých promótorov medzi orgánmi. Pomocou histochemických a histoimunologických metód v kombinácii s rôznymi metódami rezania sme urobili presnú analýzu aktivity promótorov vo vnútri komplexných rastlinných orgánov. Jednotlivé promótory génov vykazovali veľkú špecifitu. Napríklad AtSYT3 promótor bol aktívny v zatváracích bunkách prieduchov a endoderme koreňov, AtSYT4 vo floéme všetkých orgánov, AtSYT5 v koreňovej špičke a trichómoch. Tieto údaje naznačujú, že jednotlivé AtSYTs by mohli mať neredundantnú funkciu. Študovali sme tiež ako sú promótory regulované rôznymi faktormi. Výsledky boli doplnené transkriptomickými údajmi získanými pomocou semikvantitatívnej a qRT-PCR. Pre štúdium lokalizácie a vnútrobunkovej dynamiky proteínov sme pripravili transkripčno-tranzlačné konštrukty pre fúzne proteíny AtSYTs s eGFP a Dendra2 fluorescenčnými proteínmi a pomocou transgénnych rastlín ako laserovej konfokálnej mikroskopie sme analyzovali, kde sú jednotlivé proteíny v bunkách lokalizované. AtSYT1, AtSYT3 a AtSYT5 mali veľmi podobnú lokalizáciu v endoplazmatickom retikule, AtSYT4 vo floéme nebol lokalizovaný v endomembránovom systéme. Z verejne dostupných kolekcí mutantov sme získali viacero mutantných alií pre jednotlivé SYTs gény a podrobili ich segregačným a molekulárno-biologickým testom a urobili fenotypický skrining. V prípade dominantného AtSYT1 sme študovali vnútrobunkovú dynamiku proteínu s pomocou farmakologického prístupu a konfokálnej laserovej mikroskopie. Zistili sme odlišné správanie sa AtSYT1 v porovnaní s niektorými modelovými membránovými proteínmi. Podrobne sme študovali účinok Endosidínu2, ktorý blokuje exocystový komplex. My sme zistili, že Endosidín 2 spôsobuje aj rozpad Golgiho aparátu ale nemá vplyv na cirkuláciu AtSYT1. Ďalej sme dokázali, že absencia AtSYT1 proteínu významne znižuje účinnosť fotosyntézy v rastlinách vystavených soľnému stresu a to prostredníctvom funkcie prieduchov a rozpadu chlorofylov a karotenoidov. Urobili sme proteomické analýzy na zistenie vplyvu soľného stresu na proteínové spektrum v listových ružiciach a v koreňoch kontrolných a *atsyt1* mutantných rastlín. Pomocou molekulárno-biologických analýz sme nepotvrdili interakciu medzi AtSYT1 a AtSAK1 kinázou, potenciálnym partnerom AtSYT1, ktorá bola zistená pomocou kvasinkového dvojhybridného testu.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The scientific aim of the project was to understand the role of synaptotagmins in plant development and responses to environmental stresses using the model organism *Arabidopsis thaliana*. Four main goals with many milestones were outlined. We analyzed the expression of the previously undescribed genes AtSYT3, AtSYT4, and AtSYT5 at different levels. We prepared transcriptional constructs with a GUS reporter to estimate promoter strength. We detected promoter activity at the organ, tissue, and sub-tissue levels using a fluorometric quantitative method and various histochemical approaches. Considerable variation in the activity of individual promoters between AtSYTs was found. Using histochemical and histoimmunological methods combined with various sectioning approaches, we analyzed in detail the promoter activity within complex plant organs. The individual gene promoters exhibited highly characteristic specificity. For example, the AtSYT3 promoter was active in stomata and root endodermis, AtSYT4 in the phloem of all organs, and AtSYT5 in root tip and trichomes. These data suggest that individual AtSYTs might have a nonredundant function. We also studied how various factors regulate promoters. The results were complemented by transcriptomic data obtained by semi-quantitative and qRT-PCR. To study protein localization and intracellular dynamics, we prepared transcription-translation constructs for fusion proteins of AtSYTs with eGFP and Dendra2 fluorescent proteins. Using transgenic plants as laser confocal microscopy, we analyzed where each protein is localized in cells. AtSYT1, AtSYT3, and AtSYT5 had very similar localization pattern in the endoplasmic reticulum; AtSYT4 was not localized in the phloem in the endomembrane system. We obtained several mutant alleles for each SYTs gene from publicly available mutant collections, subjected them to segregation and molecular biology assays and performed phenotypic screening. In dominant AtSYT1, we studied the intracellular dynamics of the protein using a pharmacological approach and confocal laser scanning microscopy. We found a different behavior of AtSYT1 compared with some model membrane proteins. We studied in detail the effect of Endosidin2, which blocks the exocyst complex. We have discovered that Endosidin2 also disrupted the Golgi apparatus, but it did not impact AtSYT1 cycling. We further showed that the absence of AtSYT1 protein significantly reduced the efficiency of photosynthesis in salt-stressed plants through the function of stomata and the breakdown of chlorophylls and carotenoids. We performed proteomic analyses to determine the effect of salt stress on protein spectrum in leaf rosettes and in roots of control and *atsyt1* mutant plants. Using molecular biology analysis, we did not confirm the interaction between AtSYT1 and AtSAK1 kinase, a potential partner of AtSYT1, which we detected using a yeast two-hybrid assay.