



Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-17-0570**
Mechanizmus pozičnej signalizácie v rastlinách - pochopenie DEK1 dráhy

Zodpovedný riešiteľ **Mgr. Viktor Demko, PhD.**
Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita Komenského v Bratislave
Centrum biológie rastlín a biodiverzity SAV (spoluriešiteľská organizácia)

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

French National Institute for Agriculture, Food, and Environment (INRAE), Versailles, France
Inland Norway University of Applied Sciences, Hamar, Norway
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China

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

- projekt základného výskumu

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

Liang Z, Geng Y,..., Demko V, Shen L, Han X, Zhang P, Gu X, Yu H. (2019) Mesostigma viride Genome and Transcriptome Provide Insights into the Origin and Evolution of Streptophyta. *Adv Sci (Weinh)* 7(1):1901850. eCollection 2020 Jan. doi: 10.1002/advs.201901850. IF: 15,84
Perroud PF, Meyberg R, Demko V, Quatrano RS, Olsen OA, Rensing SA. (2020) DEK1 displays a strong subcellular polarity during *Physcomitrella patens* 3D growth. *New Phytol* 226(4):1029-1041. doi: 10.1111/nph.16417. IF: 10,151
Perroud PF, Demko V. (2020) Challenges of in vivo protein localization in plants seen through the DEK1 protein lens. *Plant Signal Behav* 15(8):1780404. doi: 10.1080/15592324.2020.1780404. IF: 2,248
Demko V, Belova T, Messerer M, Hvidsten TR, Perroud PF, Mayer KFX, Olsen OA, Lang D. (2021) Calpain DEK1 acts as a developmental switch gatekeeping cell fate transitions. *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.08.25.457637
Perroud PF, Demko V, Ako AE, Khanal R, Bokor B, Pavlovič A, Jásik J, Johansen W. (2021) The nuclear GUCT domain-containing DEAD-box RNA helicases govern gametophytic and sporophytic development in *Physcomitrium patens*. *Plant Mol Biol* 107: 307–325, doi: 10.1007/s11103-021-01152-w. IF: 4,076
Du H, Hu W, Demko V, Liang Z. (2022) Editorial: Evolution of crop genomes and epigenomes. *Front Plant Sci*. 2022 Sep 22;13:1027698. doi: 10.3389/fpls.2022.1027698. IF: 6,627
Demko, Viktor: *Physcomitrium (Physcomitrella) patens* - modelový organizmus v

experimentálnej biológie rastlín [vysokoškolské skriptá]. - 1. vyd. - Bratislava : Mikula, 2021. - 73 s.

Demko, V., Shumbusho, A., Šafranek, M., Jásik, J., Šarkanová, J., Voško, S., Bokor, B., Drobná, A., Zámečník, M. Plant calpain defective kernel 1 and our current efforts to understand its mode of action. 5th conference on Plant Proteases, University of Ljubljana, Slovenia, September 6-8, 2022. p. 21.

Shumbusho, A., Šoltýsová, A., Bokor, B., Šafranek, M., Šarkanová, J., Voško, S., Levarský, Z., Demko, V. Genetic analyses indicate a role of MEM and Linker domains in tissue-specific regulation of plant calpain DEFECTIVE KERNEL 1. Mendel Early Career Symposium, Vienna, Austria, May 12-13, 2022. p. 39.

Shumbusho, A., Šoltýsová, A., Bokor, B., Šafranek, M., Šarkanová, J., Voško, S., Levarský, Z., Demko, V. Genetic analyses indicate involvement of Loop and Laminin_G-like domain in tissue-specific regulation of plant calpain DEK1 with impact on plant morphogenesis and growth dynamics. Študentská Vedecká Konferencia PriF UK 2022, Bratislava, Slovakia, April 27, 2022. ISBN 978-80-223-5385-4. p. 586-591.

Demko V., Perroud P.F., Messerer M., Belova T., Hvidsten T., Johansen W., Soltysova A., Bokor B., Mayer K.F.X., Olsen O.A., Lang D. Membrane-anchored calpain DEK1 governs developmental transitions in plants and is regulated at multiple levels. Invited lecture, 16th Student Days of Plant Biology CS 2021, České Budějovice, ČR, Book of Abstracts, p.20, ISSN 1213-6670.

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky projektu významnou mierou prispeli k spoznaniu funkcie jediného rastlinného kalpaínu DEFECTIVE KERNEL 1 v regulácii rastu a vývinu rastlín. Projekt prispel k implemntácii moderných metód a technológií v oblasti molekulárnej biológie rastlín a biotechnológií na Slovensku. Techniky intragénnej mutagnézy, ktoré sme aplikovali, môžu byť použité pri genetických analýzach ďalších membránových proteínov. Protokoly heterologickej expresie a purifikácie DEK1 domén môžu byť uplatnené pri optimalizácii produkcie ďalších komplikovaných proteínov. Počas riešenia projektu sa vytvorila platforma pre rozšírenie medzinárodnej spolupráce v oblasti experimentálnej biológie rastlín a štruktúrnej biológie.

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

Tento projekt bol zameraný na objasnenie molekulárnej funkcie jediného rastlinného kalpaínu, v membráne-ukotveného DEFECTIVE KERNEL 1. DEK1 je esenciálnym regulátorom bunkovej identity a morfogenézy rastlín. Využitím prístupov reverznej genetiky a bunkovej biológie sme dokázali polárnu distribúciu DEK1 proteínu v membránach susediacich buniek. Deaktivácia kalpaínovej proteázy pritom nemá vplyv na túto polárnu lokalizáciu. Akumulácia DEK1 v membránach závisí od stavu diferenciácie jednotlivých buniek. Je zaujímavé, že DEK1 lokalizuje v membránach buniek mladých samčích pohlavných orgánov (anteridiá), avšak v zreých anteridiách je detegovateľný len v spermatozoidoch. Ukázali sme, že LamininG-podobná doména DEK1 zohráva dôležitú funkciu pri pletivo-špecifickej regulácii DEK1 proteínu nezávisle od aktivity jeho kalpaínovej proteázy. Dlhá centrálna slučka DEK1 transmembránovej domény je dôležitá pre asociáciu DEK1 s cytoplazmatickou membránou. Identifikovali sme viacero potenciálnych substrátov DEK1 a regulačných dráh ovplyvnených zmenou aktivity DEK1. Príkladom je regulón APB-CLAVATA-CLE, ktorý zohráva dôležitú funkciu pri kontrole meristémov rastlín. Sekvenovanie genómu charofytickej riasy *Mesostigma viride* a následné bioinformatické analýzy prispeli k poznaniu evučného pôvodu v membráne-ukotvených kalpaínov v eukaryotoch. Optimalizovali sme protokoly pre heterologickú expresiu a purifikáciu DEK1 domén, čo nám umožňuje pokračovať v ďalších biofyzikálnych analýzach na ceste k odhaleniu jeho štruktúry. Projekt bol kľúčový pre výchovu študentov a mladých vedeckých pracovníkov v oblasti experimentálnej biológie rastlín a biotechnológií.

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

This project focused on molecular function of the unique membrane-anchored plant calpain protease DEFECTIVE KERNEL1 (DEK1). DEK1 is a major regulator of cell fate control and

morphogenesis in plants. Using reverse genetics and translational fusions, we showed polar distribution of DEK1 in the membranes facing cell-to-cell contacts. This polar distribution is not dependent on the intact calpain active site. Cellular abundance of DEK1 varies depending on the differentiation status of cells. Interestingly, the DEK1 localizes in the plasma membranes of young male reproductive organs (antheridia), however it disappears from the membranes in mature antheridia and the strong signal is detected only in spermatozooids. The DEK1 LamininG-like domain plays an important role in tissue-specific regulation of DEK1, independent of the calpain activity. The Loop domain is critical for membrane-association of DEK1. We identified a number of putative DEK1 calpain substrates and DEK1-deregulated pathways in the model plant *Physcomitrium patens*. One of the DEK1-affected regulons is APB-CLAVATA-CLE with important functions in plant stem cell control. The *Mesostigma viride* genome sequencing together with additional bioinformatic analyses contributed to our understanding of the evolutionary history of membrane-anchored calpains in eukaryotes. We developed protocols for heterologous expression and purification of DEK1 domains, which allows us to pursue with further biophysical analyses of the protein towards its structure determination. The project played an instrumental role in recruiting and educating students and young research scientists as well as popularizing plant science among a broader audience.