



Информация за изпълнение на етап на проект

Наименование на конкурса:
Конкурс за финансиране на научни изследвания – 2017 г.
Основна научна област:
Биологически науки
№ на договор:
ДН11/8/15.12.2017 г.
Начална и крайна дата на проекта:
15.12.2017 г. – 15.12.2020 г.
Заглавие на проекта:
Нискомолекулните протеини с NudC домен: ефективни модулатори на развитието и толерантността към стрес на <i>Arabidopsis thaliana</i>
Базова организация:
Институт по физиология на растенията и генетика - Българска академия на науките (БАН)
Партньорски организации:
Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев” - БАН
Ръководител на научния колектив (академична длъжност, научна степен, име):
Проф. д-р Валя Николова Василева
Общ размер на отпуснатото финансиране за първи етап:
60000 лв.
Интернет страница на проекта (ако има такава):
Научни публикации по проекта:



Описание на очакваните резултати по проекта (до 1 стр. в рамките на полето по-долу):

Успешната реализация на проекта ще доведе до следните научноизследователски резултати:

- ще бъде проучена биологичната роля на два нискомолекулни белтъка с NudC домен (NMig1 и BOB1) в растителния модел *Arabidopsis*, както и възможността за функционална компенсация между тези белтъци;
- ще бъдат изследвани основни механизми, свързани с формирането на кореновата система в растителния модел *Arabidopsis*, и участието на *NudC* гените/протеините в тези механизми;
- ще бъдат идентифицирани директни партньори на NMig1 и BOB1 в *Arabidopsis* и ще бъде изследвана функционалната хомология между растителните NudC и дрождните NUD1 партньори на протеините;
- ще се направят проучвания за възможното съществуване на Сигнално-трансдукционна каскада за изход от митоза (MEN) в растенията и ще се даде отговор на въпроса дали изследваните NudC белтъци са компоненти на тази каскада, подобно на NUD1 в дрожди;
- ще бъде направен сравнителен анализ на биологичната роля на изследваните белтъци в *Arabidopsis* и дрожди и ще се установи степента на функционална хомология на *NudC* белтъците между растения и дрожди;
- разработеният модел за *in vivo* анализ ще предостави информация за участието на *NudC* гените в иницирането и формирането на кореновата система в динамика и в реално време, както и включването им в основни клетъчни структури и функции.
- възможно е да бъдат идентифицирани растителни мутанти с дефекти във вътреклетъчната миграция на ядрото и последващите асиметрични деления, които засега не са идентифицирани в световен мащаб;
- ще бъде проучена вероятната шаперонова функция на *NMig1* и участието му в отговора към абиотични стресови фактори;
- ще се проучи възможността за използването на NudC протеините като молекулни маркери за толерантност към стрес;
- установената биологична роля на NudC протеините в растителни обекти ще бъде сравнена с тази в дрожди, което ще допринесе за фундаменталното разкриване на функциите на тези протеини.

Потенциал за практическо приложение:

Предложеният проект има потенциал да се превърне в начален етап на едно дългосрочно изследване с важно приложно значение, което да разкрие основни аспекти от ролята на NudC белтъците в развитието на растенията, по-специално, във формирането на кореновата система и устойчивостта им към абиотичен стрес. Изследваните NudC протеини от *Arabidopsis* показват високо сходство на аминокиселинната последователност с редица културни растения, като царевица, соя, сорго, ориз и др., което позволява директно пренасяне на информацията от моделното растение към важни икономически култури. Чрез получените данни могат да бъдат дадени насоки за оптимизиране на кореновото развитие с цел по-ефективен достъп до почвените ресурси и адаптиране на растенията към неблагоприятни условия на околната среда. Тези задачи са изключително важни в контекста на динамичните климатични промени и нарастващата нужда от храна в глобален мащаб.

От друга страна, NudC белтъците функционират като молекулярни шаперони, които участват във формирането и поддържането на пространствената структура на други белтъци. Редица тежки заболявания при човека са свързани с грешно нагъване на белтъците, което се коригира от протеините с шаперонова функция. Предложеното изследване може да даде ценна информация за изясняване на етиологията на редица опасни заболявания при човека. При евентуално успешно изпълнение на този проект, ще потърсим учени, изучаващи нискомолекулни белтъци на топлинния стрес в други организми (напр. в Институт по биология и имунология на размножаването към БАН) с цел съвместно изследване на възможностите за терапевтичното им приложение. Чуждестранните партньори също ще подпомогнат интегрирането на получените данни в Европейското и световно пространство и тяхното по-нататъшно развитие и приложение.



Членове на научния колектив

Организации/участници¹	Бележка²
Базова организация:	
Институт по физиология на растенията и генетика - БАН	
Ръководител на научния колектив	
проф. д-р Валя Николова Василева	
Участници:	
доц. д-р Людмила Петрова Симова-Стоилова доц. д-р Ирина Иванова Васева доц. д-р Григор Трайков Зехиров доц. д-р Мирослава Константинова Жипонова - СУ „Кл. Охридски“ гл. ас. д-р Кирил Михайлов Мишев гл. ас. д-р Анна Димитрова Димитрова гл. ас. д-р Марияна Стамова Георгиева ас. Димитър Тодоров Тодоров Валентин Стефанов Велинов Ирена Пламенова Цекова спец.-биолог Анелия Ангелова Костадинова спец.-биолог Бистра Велислова Юперлиева-Матеева	ПД МУ ДО
Партньорска организация:	
Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ - БАН	
Участници:	
доц. д-р Стойно Стефанов Стойнов гл. ас. д-р Ирина Александър Александрова Георги Тодоров Дановски Теодора Красимилова Дянкова	ДО, МУ ДО, МУ

¹ Отбележете академичната длъжност, научната степен, име и фамилия на всеки участник като включите и участниците, които са работили по проекта не през целия период за изпълнение на проекта

² Отбележете дали участникът в колектива е млад учен (МУ), постдокторант (ПД), докторанти (ДО) или студенти (СТ), или учен от чужбина (УЧ).



Постигнати резултати от изпълнението на проекта и кратък анализ на тяхната приложимост (до 1 стр. в рамките на полето по-долу)

Постигнатите до момента резултати напълно съответстват на планираните изследвания в работната програма за първи етап на проекта, както следва:

По РП1. Създаване на изследователски инструменти

- Създадени са три независими линии с транслационно сливане на промоторната и генната секвенция на *NMig1* с GFP репортерен ген чрез използване на системите Gateway и Golden Gate.
- Генерирани са линии с различно ниво на заглушаване на експресията на *NMig1* чрез системата *CRISPR/Cas9* за изследване на генната функция.
- Конструирани са експресионни клонове за BiFC (p35S:ORF:nGFP и p35S:ORF:cGFP), които са използвани за пилотни експерименти с цел доказване на директни взаимодействия между изследваните гени и предсказани партньори чрез инфилтрация в листа от тютюн.
- Разработват се конструктори за идентифициране на директни партньори на растителните гени и за търсене на функционална хомология с гени от дрожди.
- Трансформирани са див тип (Col-0) растения *Arabidopsis* с генерираните конструктори, извършена е селекция на трансформантите върху MS хранителна среда с канамицин, като след около месец ще бъдат получени T₃ хомозиготни трансформанти.
- Подбрани са три T-DNA линии с инсерти в *NMig1*: Wisc_DsLox330G04, SALKseq_079197, SALK013504. Извършени са първични анализи за определяне на нивото на експресия на *NudC* гените в тези инсерционни мутанти и конструираните линии.
- Направени са генетични кръстоски с цел конструиране на двойни мутанти (*bob1 x nmig1*).

По РП2. Изследване на биологичната роля на NudC протеините в *Arabidopsis*

- Установена е тъканната и клетъчна локализация на *NMig1*, като е установено съответствие между локализацията на транскрипционно и транслационно ниво.
- Установена е пряка взаимовръзка между експресията на *NudC* гените и иницирането и формирането на вторични коренови разклонения.

По РП3. Идентифициране и проучване на взаимодействащи с NudC партньори

- Чрез имунопреципитация на *35S-NMig1-GFP* с анти-GFP магнитни частици са идентифицирани над 50 директни партньори на *NudC* протеините. Четири от тях са валидирани чрез двумолекулна флуоресцентна комплементация (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC).
- Конструирани са карти с директни и функционални партньори на *NudC* протеините.

По РП4. Изследване на участието на NudC молекулите в постигане на повишена толерантност към стрес

- Проучен е ефектът на различни абиотични стресови фактори (висока температура, засушаване и засоляване) върху експресията на *NudC* гените.
- Установена е пряка взаимовръзка между нивото на експресия на *NudC* гените и натрупването на реактивни кислородни форми чрез хистохимично определяне на акумулирането на супероксидени аниони (O₂⁻) и водороден прекис (H₂O₂).
- Установена е стрес-индуцирана промяна в локализацията на *NMig1*, като са наблюдавани сходни промени на транскрипционно и транслационно ниво.
- Техниката за кометен анализ е адаптирана за използване при *Arabidopsis*. Първичните анализи показват взаимовръзка между експресията на *NudC* гените и увреждането на ДНК при третиране с абиотични стресови фактори.