

## MODULATION OF HEAT-STRESS RESPONSIVE PROTEOME IN TRANSGENIC *ARABIDOPSIS THALIANA* PLANTS WITH INDUCIBLY-INCREASED LEVELS OF ENDOGENOUS CYTOKININS

Skalák J.<sup>1</sup>, Černý M.<sup>1</sup>, Jedelský P.<sup>2</sup>, Vaňková R.<sup>3</sup>, Brzobohatý B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Molecular Plant Biology, CEITEC MENDELU, Mendel University in Brno & Institute of Biophysics AS CR, v.v.i Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> Institute of Experimental Botany AS CR, v.v.i. Prague, Czech Republic

E-mail: skalakjan7@gmail.com

---

### ABSTRACT

Cytokinins (CK) are phytohormones with important role in plant growth and development and they are known to participate in number of plant signaling pathways. In our recent work we found link between temperature perception and early responses to CKs and in this follow-up project we studied the effect of inducibly-increased CK levels on temperature-stress responses. Plants were subjected to 3 different kinds of heat stress for up to 3 hours: heat stress from above (leaves), heat stress from below (roots) and heat stress on the whole plant. We analyzed heat stress induced responses by 2-D gel electrophoresis followed by MALDI-TOF/TOF protein identification in root proteome and Rubisco-immunodepleted leaf proteome in plants with increased endogenous CK levels, and wild-type (Col.). In numbers, we found more than 100 responsive proteins and most of these heat-stress responsive proteins exhibit strong modulations by increased CK levels. Moreover, our results indicate interesting interplay between heat-stress perception in roots and leaves.

**Key words:** cytokinins, temperature, *Arabidopsis thaliana*

**Acknowledgement:** Supported by grants IAA600040701, LC06034, 1M06030, GACR 206/09/2062, AV0Z50040507, AV0Z50040702, AV0Z40310501, and project CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from European Regional Development Fund.

## ÚVOD

Vzhledem k rostoucímu zájmu společnosti o ekologii, ale i snaha agronomů šlechtit rostliny odolnější vůči vnějším nepříznivým podmínkám, je studium environmentálních vlivů na rostlinné organismy v dnešní době velice populární, avšak málo probádané téma. Například o vnímání a signalizaci tepla v rostlinném těle na molekulární úrovni existuje pouze málo informací (Penfield, 2008). Proto tato práce řeší problematiku teplotního stresu na různé části rostlinného těla a zkoumá molekulární odpovědi pomocí moderních metod molekulární biologie, převážně proteomiky. Takto jsme schopni zaznamenat funkční a strukturní změny v odpovědi na teplotní stres a zkoumat tak podstatu ovlivněných molekulárních reakcí, ba co více, pomocí transgenních linií jsme schopni upravovat hladiny fytohormonů, které stojí za celou řadou odpovědí rostliny na změnu vnitřních, ale i vnějších podmínek. Existuje již několik prací, které předpokládají vliv hormonu cytokininu (CK) na vnímání teploty (Hare et al., 1997; Burkhanova et al., 2001; Jeon et al., 2010; Černý et al., 2010). Je známo, že cytokininy mají odlišný účinek na kořenovou a nadzemní část rostlin. Stejně tak lze očekávat, že i odpověď na změny v teplotě bude mít odlišný projev. Přesto doposud nebyla provedena žádná studie, která by důkladně sledovala tyto jevy současně. Teplotní stres je v této práci aplikován tak, aby částečně simuloval působení teploty na rostlinu během dne: (i) 40 °C pouze na listy, (ii) celou rostlinu a (iii) pouze na kořeny.

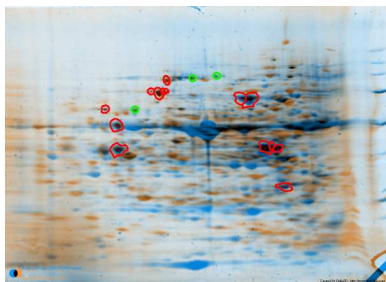
## MATERIÁL A METODIKA

Pro studium účinku teploty a cytokininů byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* (Col-0) a transgenní linie *CaMV35S>GR>ipt* (pOpBK-*ipt*) (Craft et al., 2005), u kterých je možné indukovatelně zvýšit hladiny aktivních cytokininů. Rostliny byly pěstovány hydroponicky (Hoaglandovo medium) po 4 týdny za standardních podmínek (21 °C/19 °C den/noc, 16-h fotoperioda 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  světelné intenzity) v kultivačním boxu (AR36LX, Percival). Po 4 týdnech kultivace byly rostliny ošetřeny 24 hodinovou aplikací 20  $\mu\text{M}$  dexamethazonu (DEX), který slouží jako aktivátor systému transgenní linie. Poté byly rostliny vystaveny teplotnímu stresu zvlášť na kořeny, zvlášť na listy a na kořeny s listy dohromady. Sběrání vzorků probíhalo ve třech časových bodech (0 min, 30 min, 180 min). Po sběru byly vzorky okamžitě zamrazeny v tekutém dusíku. Zmrazené vzorky byly homogenizovány v množství po 180 mg a celkový protein byl vyextrahován pomocí 0,5 ml TBS pufru (10mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) s přísadkem inhibitorů proteas a PVPP (polyvinylpyrrolidon, Sigma-Aldrich). Listový extrakt byl přenesen na IgY-Rubisco Spin Column (GenWay Bitech/Sigma-Aldrich). Po 20 minutách v třepačce (20°C, 800 RPM) byl vzorek zbavený RuBisCO získán centrifugací. Listové i kořenové vzorky byly zkoncentrovány pomocí Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit a extrahovány acetonovou (TCA) extrakcí (Damerval, 1986). Rozpuštěný proteom byl nanesen na IPG stripy (pI 3-10, nelineární

gradient, Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com/> ). Po izoelektrické fokusaci (150 V 20 min, 300 V 20 min, 600 V 20 min, 1500 V 20 min, 3000 V 20 min a 4000 V stoupající na 12 000 V za hodinu, PROTEAN IEF Cell Unit, Bio-Rad) byl proteom dále rozdělen pomocí SDS-PAGE (dodecylsírán sodný v gradientovém 8-20% polyakrylamidovém gelu, Mini-PROTEAN 3 Dodeca Cell, Bio-Rad: 100 V 10 minut a 150 V 60 minut). Výsledné gely byly několikrát promyty destilovanou vodou a obarveny Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad). Obarvené gely byly neskenovány kalibrovaným Densitomentrem GS-800 (Bio-Rad) s rozlišením 700 dpi. Analýza obrazu byla provedena Decodon Delta 2D softwarem, kde míra signifikace byla nastavena při  $p < 0,05\%$  na  $\pm 1,4$  (porovnání relativního objemu nultých bodů obou linií s ostatními časovými body). Signifikantní spoty byly vyřezány, digestovány trypsinem a analyzovány pomocí MALDI TOF/TOF MS.

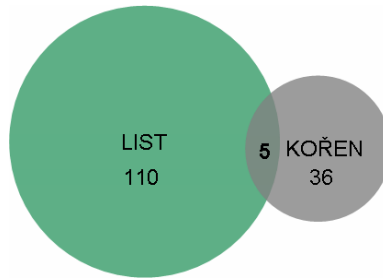
## VÝSLEDKY A DISKUZE

Analýza obrazu 2D gelů ukázala, že v listovém proteomu je mnohem více teplotou regulovaných spotů než v kořenovém proteomu. Z celkového počtu regulovaných spotů patřilo 75% listové části a 25% kořenové části, i když celkový počet spotů je v obou rozděleních srovnatelný. Porovnání obrazu překryvu 2D map kořenového a listového proteomu (Obr. 1.) ukazují veliké rozdíly mezi jednotlivými proteiny.



Obr. 1 Překryv 2D map proteomů kořene a listu. Barevně vyznačeny spoty se shodnou pozicí na gelu.

Po analýze hmotnostní spektrometrií bylo zjištěno, že překryv signifikantně regulovaných proteinů v kořenovém a listovém proteomu byl skutečně velice malý, a to pouze v 5 případech (Obr. 2).



Obr. 2 Překryv signifikantně regulovaných proteinů listového a kořenového proteomu.

## ZÁVĚR

Tato práce úspěšně využila moderní metodu deplece Rubisco použitím IgY-Rubisco Spin Column, jejíž optimalizace pro 2D proteomiku byla nedávno publikována v Černý et. al, 2011. Z výsledku je patrné, že sledování proteomu kořene a listu je vhodné provádět separátně. Stresování teplem spolu se zvýšenou hladinou endogenních cytokininů se ukázalo jako velice důležité a doposud nedostatečně probádané téma. Získané výsledky poslouží k hlubšímu porozumění signalizace a odpovědi mezi kořenovým a listovým proteomem. Současná analýza proteomu zkoumaných rostlin spolu s dalšími přístupy jako transkriptomika nebo metabolomika napomůže k pochopení reakcí souvisejících s odpovědí rostlin na teplotní stres.

## LITERATURA

- Burkhanova E. A., Mikulovich T. P., Kudryakova N. V., Kukina I. M., Smith A. R., Hall M. A. and Kulaeva O. N. (2001) Heat shock pre-treatment enhances the response of *Arabidopsis thaliana* leaves and *Cucurbita pepo* cotyledons to benzyladenine. *Plant Growth Regulation* 33: 195–198.
- Craft J., Samalova M., Baroux C., Townley H., Martinez A., Jepson I., Tsiantis M., Moore I. (2005) New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 41, 899–918.
- Damerval C., De Vienne D., Zivy M. and Thiellement H. (1986) *Electrophoresis*, 7, 52-54.
- Černý M., Dyčka F., Bobál'ová J. and Brzobohatý B. (2010) Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of *Arabidopsis thaliana* identified by proteome and phosphoproteome profiling. *Journal of Experimental Botany*, 1-17.
- Černý M., Skalák J., Kurková B., Babuliaková E., Brzobohatý B. (2011) Využití komerční metody imunochemického odstranění RuBisCO v analýze rostlinného proteomu. *Chemické Listy* 105, 640-642.

Hare P. D., Drese W. A. and van Staden J. (1997) The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant Growth Regulation* 23: 79–103.

Jeon J., Kim N. Y., Kim S., Kang N. Y., Novák O., Ku S.-J., Cho Ch., Lee D. J., Lee E.-J., Strnad M. and Kim J. (2010) A Subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis*. *The Journal Of Biological Chemistry* VOL. 285, NO. 30, 23371–23386.