

EFFECT LOW LIGHT INTENSITY AND INCREASE CONCENTRATION OF CYTOKININS - PROTEOMIC ANALYSIS

EFEKT NÍZKÉ INTENZITY SVĚTLA A ZVÝŠENÉ KONCENTRACE CYTOKININŮ - PROTEOMICKÁ ANALÝZA

Marečková M., Brzobohatý B.

Department of Molecular Biology and Radiobiology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: martimareckova@seznam.cz, brzoboha@mendelu.cz

ABSTRACT

Together with auxins, cytokinins are key substance in hormonal regulation of plant development. All native cytokinins are derivatives of adenine with substituent at N6 position. Cytokinins affect growth and regeneration of plant. Molecular mechanism of they effect in regulation of plants development is intensively study now. The analysis of genome during cytokinins action was search, but complete analysis of proteomic dynamics isn't known. It was analyzed effect low light intensity and increase levels of cytokinins. It was used the pOp/LhGR system to increased levels of cytokinins. Experimental system was plant *Arabidopsis thaliana*. The changes of proteome analysis were studied by 2D electrophoresis, scene analysis a mass spectrometry. It was observed the effect of cytokinins on hypocotyl length in the low light conditions. It was compared proteome by seedlings with increase levels of cytokinins and wild type. It was identified about 30 different proteins.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, cytokinins, hypocotyl, 2D electrophoresis

Acknowledgments: This work is supported by LC06034 Regulace morfogeneze rostlinných buněk a orgánů and 1M06030 Funkční genomika a proteomika ve šlechtění rostlin.

ÚVOD

Vedle auxinů hrají klíčovou roli v hormonální regulaci vývoje rostlin i cytokininy. Všechny přírodní cytokininy jsou deriváty adeninu substituované v N6 pozici. Cytokininy ovlivňují růst a vývoj rostlin, podílejí se na regulaci organogeneze a regeneraci rostlin (Kamínek 1997). Molekulární mechanismy jejich účinku jsou intenzivně studované jak na genomické, tak na proteomické úrovni.

Bylo prokázáno, že cytokininy mají efekt na prodlužování délky hypokotylu. Elongace hypokotylu je velmi citlivá a závisí nejen na vnějších faktorech jako je například světlo a teplota, ale i na vnitřních faktorech, kterými jsou například rostlinné hormony (Collett at al. 2000).

Ke studiu proteomu byla využita 2D elektroforéza. Nejdříve jsou proteiny separované podle jejich isoelektrického bodu pomocí isoelektrické fokuse. Potom se takto rozdělené proteiny separují podle jejich molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE. Detekce proteinů na gelu je možná pomocí barvení např. stříbrem nebo Coomassie Brilliant Blue. Dále je možné využít specifickou detekci např. pomocí fluorescence nebo protilátek (Görg 2003, Weiss, Görg 2007).

MATERIÁL A METODIKA

Jako rostlinný materiál byly použity transgenní semenáčky *Arabidopsis thaliana* (pOp-ipt- GUS::LhG4) s endogenně zvýšenou hladinou cytokininů a kontrolní divoký kmen var. Columbia.

Semenáčky byly kultivovány na nízké světelné intenzitě $16 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Po 9 dnech, kdy se zakládaly první pravé lístky, byla část aktivována. Byly sledovány změny v proteomu mezi divokým kmenem a semenáčky se zvýšenou hladinou cytokininů.

Proteiny byly izolovány pomocí roztoku kyseliny trichloroctové v acetonu (Görg 2003). Byl použit 18 cm strip pH 3 - 10 (Bio-Rad). SDS PAGE byla provedena standardním způsobem. K barvení byla použita Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad). K analýze obrazu byl použit program DECODON Delta2D. Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie byla realizována Ústavem analytické chemie AV ČR.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Změny v proteomu mezi divokým kmenem a semenáčky se zvýšenou hladinou cytokininů byly sledovány po hodině (bod 0) po aktivaci a dále po 1, 2, 3, 4, 5 a 10 dnech po aktivaci (body 1, 2, 3, 4, 5, 10). Byly použity dvě různé aktivace pomocí 80 nM a 500 nM dexamethasonu. Byly udělány dva nezávislé experimenty. Výsledky jsou průměrem ze tří gelů.

Bylo prokázáno, že cytokininy mají vliv na prodlužování délky hypokotylu u semenáčků *Arabidopsis thaliana* (Collett at al. 2000). Po dvou dnech kultivace byl vidět první rozdíl v délce hypokotylu mezi semenáčky se zvýšenou hladinou cytokininů a divokým kmenem. Proteomická analýza prokázala asi 30 různých proteinů, které mají rozdílnou

intenzitu (tedy i koncentraci) na gelu u aktivovaných semenáčku oproti gelům z kontrol. V tabulce jedna a dvě jsou shrnuty výsledky obou experimentů. Jsou zde uvedeny celkové počty spotů, celkový počet rozdílných spotů, počet rozdílných snížených a zvýšených spotů u aktivovaných semenáček, počet rozdílných spotů u variant aktivovaných pomocí 80 nM a 500 nM dexamethasonu a celkový počet rozdílných spotů poslaných na identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie.

bod	0	1	2	3	4	5	10
celkový počet spotů	826	918	840	822	856	891	870
počet rozdílných spotů	162	116	127	143	192	89	163
počet snížených spotů	110	54	77	106	105	53	89
počet zvýšených spotů	52	62	50	37	87	36	74
počet spotů u 80 nM	52	63	73	65	46	56	69
počet spotů u 500 nM	136	74	68	85	179	49	108
identifikované	17	15	15	17	20	19	17

Tab. 1 Vyhodnocení prvního experimentu

bod	0	1	2	3	4	5	10
celkový počet spotů	830	861	832	822	849	856	892
počet rozdílných spotů	130	171	72	59	99	78	138
počet snížených spotů	71	96	31	38	49	43	61
počet zvýšených spotů	59	75	41	21	60	35	77
počet spotů u 80 nM	51	49	41	19	91	33	72
počet spotů u 500 nM	89	132	51	46	28	59	80
identifikované	13	14	16	12	15	14	12

Tab. 2 Vyhodnocení druhého experimentu

ZÁVĚR

Bylo potvrzeno, že cytokininy mají vliv na prodlužování délky hypokotylu u semenáček *Arabidopsis thaliana*. Byla provedena proteomická analýza. Ke studiu proteomu byla využita 2D elektroforéza. Analýza obrazu byla realizována pomocí programu DECODON Delta2D. Proteomická analýza prokázala 30 různých proteinů, které mají rozdílnou intenzitu (tedy i koncentraci) na gelu u aktivovaných semenáček oproti gelům z kontrolních rostlin. Výsledky budou použity pro další studium této problematiky.

LITERATURA

Kamínek M., (1997): Cytokininy. In Procházka S., Šebánek J., a kol.: Regulátory rostlinného růstu. Academia Praha: 63 – 76.

Görg A., (2003): Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis. Technical University of Munich.

Weiss W., Görg A., (2007): Two-Dimensional Electrophoresis for Plant Proteomics, Plant Proteomics: Methods and Protocol. Methods in Molecular Biology, 335: 121-143.

Collett C. E., Harberd N. P., Leyser O., (2000): Hormonal interaction in the control of arabidopsis hypocotyl elongation. Plant physiology 124: 553-561.