MODULATION OF CYTOKININ ACTION BY DECREASED INTENSITY OF WHITE LIGHT IN *ARABIDOPSIS* – A PROTEOMIC ANALYSIS

Jajtnerová M., Brzobohatý B.

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

E-mail: martimareckova@seznam.cz

ABSTRACT

Light and cytokinin (CK) signaling are intertwined at several levels, and the underlying molecular mechanisms are being actively researched. To get an insight into the modulation of CK action by decreased light intensity at the proteomic level, we used 2-DE followed by image analysis and MALDI-TOF-TOF MS to analyze changes in steady-state protein levels in *Arabidopsis thaliana* seedlings with increased content of endogenous CKs cultivated at standard (90 μmol m^{-2} s^{-1}) and decreased (20 μmol m^{-2} s^{-1}) white light intensities. After the activation of the CK-biosynthetic gene *ipt*, we observed about 61 differentially expressed protein spots (representing about 12% of detected spots). Out of the 61 protein spots, 36 were regulated in a comparable fashion at both light intensities, and 2 and 23 were differentially regulated at only standard or decreased light intensity, respectively. Till now more than 58 proteins have been identified, and can be classified as proteins involved in seed germination, photosynthesis, carbon and nitrogen metabolism and metabolism of xenobiotics.

Key words: Cytokinins, 2D electrophoresis, *Arabidopsis*

Acknowledgments: Supported by grants IAA600040701, LC06034 and 1M06030.

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 mechanizmy 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 fokusace. 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 (20 μmol m^{-2} s^{-1}) a normální intenzitě (90 μmol m^{-2} s^{-1}). Po 9 dnech u nízké intenzity a 7 dnech u normální intenzity, kdy se zakládaly první pravé lístky, byla část semenáčků 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 1, 2, 3, 4, 5 a 10 dnech po aktivaci u nízké intenzity a po 1, 2, 3, 4 a 5 dnech u normální intenzity. Byly použity dvě různé aktivace pomocí 80 nM a 500 nM dexamethasonu. Byly udělány dva nezávislé experimenty. Výsledky jsou průměrem ze tří gelů.

První rozdíly ve vývoji semenáčků byly pozorovány po dvou dnech po aktivaci. Především to bylo prodlužování hypokotylu (pouze u nízké intenzity) a inhibice růstu kořene.

Z celkového počtu 750 spotů na gelu bylo 58 rozdílně regulovaných. U nich byla provedena identifikace pomocí MALDI-TOF-TOF MS. Bylo identifikováno 61 proteinů v 55 spotech (dva spoty jsou směsné). Z těchto proteinů bylo 36 regulovaných na obou světelných intenzitách a 2 a 23 byly rozdílně regulované pouze na normální a nízké intenzitě, respektive. Tyto proteiny mají úlohu např. v metabolismu uhlíku a aminokyselin, část z nich je také zapojena do odpovědi na nejrůznější stresy. Nejvíce rozdílně regulovaných proteinů bylo lokalizováno v chloroplastu (28%) a cytoplasmě (22%).

ZÁVĚR

Z celkového počtu 750 spotů na gelu bylo 58 rozdílně regulovaných. U nich byla provedena identifikace pomocí MALDI-TOF-TOF MS. Bylo identifikováno 61 proteinů v 55 spotech (dva spoty jsou směsné). Z těchto proteinů bylo 36 regulovaných na obou světelných intenzitách a 2 a 23 byly rozdílně regulované pouze na normální a nízké intenzitě, respektive. Tyto proteiny mají úlohu např. v metabolismu uhlíku a aminokyselin, část z nich je také zapojena do odpovědi na nejrůznější stresy.

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.