

MODERN PROTEOMICS IN PLANT SCIENCE

Černý M., Brzobohatý B.

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

E-mail: martincerny83@gmail.com

ABSTRACT

Arabidopsis as the first established model plant worldwide belongs among the most intensively studied organism in science. While its entire genome sequence has been available for last ten years, map of Arabidopsis proteome is still mostly blind. It is estimated that there is at least 100, 000 gene products for approximately 25, 000 genes in Arabidopsis genome. However, best proteomic experiments are covering only about 10% of this number. Major problem with uncovering new proteins is their low abundance in the sample. Here we show advantages of modern isolation procedures design to uncover the hidden proteome.

Key words: proteomics, 2D PAGE, plants

Acknowledgments: Supported by grants IAA600040701, LC06034, 1M06030, GACR 206/09/2062, AV0Z50040507, AV0Z50040702 and AV0Z40310501

ÚVOD

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) je první rostlinou se známou genomovou sekvencí. I dnes, deset let od dokončení sekvenování, patří *Arabidopsis* mezi nejvíce studované organismy. Zatímco genomová sekvence známá je, mapa proteomu je stále z velké části prázdná. Nejnižší odhady předpokládají, že k přibližně 25 000 genů existuje minimálně 100 000 různých proteinů. Tento téměř řádový rozdíl je způsoben jak alternativním sestřihem genu, kdy jeden gen může mít několik různých produktů-proteinů, tak především post-translačními modifikacemi proteinu. Mezi nejznámější post-translační modifikace patří částečná proteolýza, fosforylace, glykosylace, ale existuje i celá řada dalších, které byly již v proteinech nalezeny. Post-translační modifikace významně ovlivňují chování daného proteinu (Černý et al., 2010a). Pro samotnou fosforylacii se odhaduje, že minimálně 10-30 % všech proteinů v buňce je fosforylovaných a to třeba i mnohanásobně. Různé modifikace se navíc mohou kombinovat, čímž dramaticky roste počet různých proteinů a lze odhadovat, že skutečný rozdíl mezi počtem genů a počtem různých proteinů v buňce bude i několik řádů. Základní problém dnešní proteomiky je rozlišení, s jakým je schopna pracovat. Nejlepší práce nepřesahují 10 000 identifikovaných proteinů a běžné studie s limitním množstvím materiálu se pohybují v tisících detekovaných proteinů, což při nejnižších odhadech počtu možných proteinů v buňce nepřesahuje 5-10 % zachycených proteinů. Jedním z důvodů, proč jsou počty sledovaných proteinů tak nízké, je přítomnost majoritních proteinů, které znemožňují detekci proteinů o nižších koncentracích. Příkladem takového proteinu u rostlin je RUBISCO, které je považováno za nejrozšířenější protein v přírodě a v běžném zeleném pletivu je jeho obsah okolo 45%. Pokud by se nám podařilo takovéto majoritní proteiny odfiltrovat, rozlišení proteomických map by značně vzrostlo.

MATERIÁL A METODIKA

V experimentu bylo použito metodiky popsané v práci Černý et al., (2010b) pro izolaci proteomu a fosfoproteomu s drobnými modifikacemi a manuály výrobců a statistické analýzy popsané v Skalák et al., (2010)

VÝSLEDKY A DISKUZE

Porovnali jsme využití několika separačních technik pro sledování proteomu rostlin. Jako nejnáročnější na spotřebu materiálu se jeví izolace fosfoproteomu, kdy z jedné izolace získáme pouze 2 malé gely (cca 300 µg proteinu z 350 mg semenáčků). Naopak nejlepší výtěžek proteinu poskytuje aceton/TCA extrakce (2100 µg proteinu z 350 mg semenáčků), která však neřeší problém

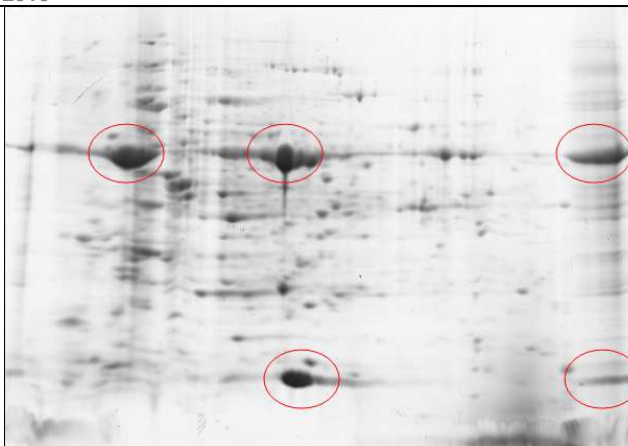


Fig. 1 2D mapa proteomu *Arabidopsis* (aceton/TCA extrakce) s vyznačenými spoty obsahujícími RUBISCO

s majoritními proteiny a velkou část 2D mapy pokrývá RUBISCO (Fig. 1) a další vysoko abundanční proteiny.

Částečným kompromisem se zdá být odstranění RUBISCO pomocí afinitní chromatografie (Seppro), kdy je výtěžek izolace dostačující (450 μ g proteinu z 875 mg semenáčků). Aplikaci analýzy obrazu popsané v Skalák et al. (2010) jsme zhodnotily jako nejvýhodnější izolaci s odstraněním RUBISCO.

ZÁVĚR

Provedli jsem porovnání několika izolačních metod. Samotné porovnání kvality obrazu ukázalo jako nejvýhodnější metodu izolace izolaci s odstraněním RUBISCO, která je i po stránce nároku na množství vzorku kompromisem mezi běžnou izolací a izolací pomocí purifikačních kitů (např. purifikace fosfoproteomu). Nicméně dokud nebude provedena identifikace všech detekovaných spotů, aby bylo možné porovnat zastoupení nízkou a vysoko abundančních proteinů, nelze říci, zda je tato izolace pro sledování proteomu výhodnější, než jiné metody navržené k obohacování proteomu.

LITERATURA

Černý M., Doubnerová V., Müller K., Ryšlavá H. (2010): Characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from mature maize seeds: Properties of phosphorylated and dephosphorylated forms

MENDELNET 2010

- Černý M., Dyčka F., Bobáľová J., Brzobohatý B. (2010): Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of *Arabidopsis thaliana* identified by proteome and phosphoproteome profiling
- Skalák J., Černý M., Mitošinková I., Brzobohatý B. (2010): Komparace 2D elektroforetických přístupů pro sledování proteomického profilování rostlin