
METHODS OF PROTEOME ANALYSIS IN INVESTIGATION OF HORMONAL REGULATIONS IN PLANTS

Skalák J., Černý M., Jedelský P., Brzobohatý B.

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

E-mail: skalak.jan7@gmail.com

ABSTRACT

The subject of thesis is the employment of 2D electrophoresis in study of effect of plant hormones cytokinins on tobacco proteome. The experimental part is based on previous work at LPMB MENDELU and studies effects of inducibly-increased levels of endogenous cytokinins on tobacco proteome. The optimal conditions for tobacco proteome separation were found and method for proteome-quality evaluation was developed. Protein spots were classified according to their profiles in transgenic plants with increased levels of endogenous cytokinins and control plants SR1. The presented results will help to bring deeper insight into molecular mechanism of cytokinin action.

Key words: cytokinins, proteomics, elektroforetic analysis of proteins, mass spectrometry, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*

Acknowledgments: This research was financially supported by grants LC06034 and 1M06030 (Ministry of Education, Youth and Sports), IAA600040701 (GA CR) and 206/09/2062 (GA CR).

ÚVOD

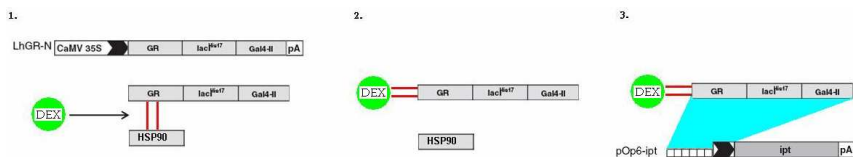
Cytokiny jsou rostlinné hormony, které hrají důležitou roli v molekulární odpovědi buňky na vnější i vnitřní stimulus. Studium jejich funkce, metabolismu a biosyntézy zaznamenalo již několik zásadních objevů, i tak je tato problematika prozkoumána pouze z části.

Jedním z oborů, které dávají možnost sledování molekulárních procesů buňky je proteomika. Tento vědní obor nabízí široké spektrum metod, kterými lze zkoumat jednu ze základních složek těchto procesů – proteiny. Právě tyto biopolymery se podílejí na celé řadě funkcí, ať už signální, regulační, stavební, katalytické, obranné, transportní nebo zásobní (Murray a spol., 2003).

Jednou ze základních separačních technik proteomiky je 2D polyakrylamid gelová elektroforéza (2D PAGE). Gelová elektroforéza je již několik desítek let osvědčeným separačním nástrojem a do dnes se vyvinulo několik jejích modifikací (Blue native PAGE, SDS-PAGE, 2D DIGE, a další). Kromě technik založených na polyakrylamidovém gelu existuje i několik dalších (2D-LC, iTRAQ). Všechny tyto techniky mají však specifické nároky a limity.

MATERIÁL A METODIKA

Rostliny tabáku pro proteomickou analýzu poskytl Mgr. Jan Novák. Kultivace byla následující: v substrátu byli pěstováni jedinci tří linií *Nicotiana tabacum* za standardních světelných podmínek, a to dvou transgenních linií (303, 307) a dále odpovídají rodičovská linie *L. cv. Petit Havana SR1*. Linie 303 a 307 jsou geneticky modifikované rostliny obsahující pOp6-ipt/LhGR-N (viz. Obr. 1), což je systém regulovaný dexamethasonem (DEX). Linie 303 a 307 jsou dva nezávisle připravení transformanti, které mají zařazené konstrukty na různých místech chromozomu. Linie SR1 jsou geneticky nemodifikované rostliny sloužící jako kontroly, tzv. wild type. Po uplynutí čtyř týdnů byly všechny linie ošetřeny zálivkou 50 ml obsahující 20 μ M DEX. Po 4 dnech po aktivaci byly odebrány vzorky, vždy 2 g listů z jedince, a ihned zamražený v tekutém dusíku.



Obr. 1: Schematické znázornění systému indukce exprese genu *ipt* v transgenních rostlinách 303 a 307. Navázáním DEX na vazebnou doménu glukokortikoidního receptoru (1.) se receptor uvolní z vazby s HSP90 (2.) a může tak začít exprese genu *ipt* (3.). (Šámalová a spol., 2005).

MENDELNET 2010

Postup separace byl proveden podle návodu popsaneho Lochmanovou a kol., 2008. Vzorky byly naneseny v mnozstvi 500 µg na 18 cm či 150 µg na 7 cm strip s linearnim pH gradientem 4-7 či nelineranim gradientem 3-10. Po 16 hodinach rehydratace byly vzorky podrobeny izoelektrické fokusaci na PROTEAN IEF Cell Unit (Bio-Rad).

Po ukončení druhé fáze 2D PAGE byly gely 3x promyty destilovanou vodou a následně obarveny koloidní Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad). Následovalo skenování Bio-rad GS-800 kalibrovaným Densitometrem (700 dpi pro malé gely a 400 dpi pro velké gely). Gely byly analyzovány Decodon Delta 2D softwarem (<http://www.decodon.com>).

Proteomická odpověď na oxidační stres vyvolaný cytokininy byla považována za signifikantní, pokud se shodně projevila alespoň ve 2 z celkového počtu 3 biologických opakování. Za signifikantní projev byla stanovena hodnota poměru relativního objemu spotů aktivovaný:kontrolní vzorek $\pm 1,4x$ pro proteinové spoty splňující hodnotu T-testu $\geq 95\%$.

Vyhodnocené spoty, kde byl zaznamenán signifikantní projev, byly vyřezány a zaslány na analýzu hmotnostní spektrometrie (MS).

VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci přípravných prací byla vypracována metoda pro rychlou analýzu rozdělení proteomu, využitelná při porovnávání kvalit rozdělení proteomu. Sledované parametry shrnuje Tabulka 1:

Parametr	Název
N	Počet detekovaných spotů
V	Celkový objem všech detekovaných spotů
V _{%min}	Počet spotů s relativním objemem menším než 0,05%
V _{%mix}	Hraniční relativní objem rozděleného spotu
V _{%max}	Počet spotů s relativním objemem větším než V _{%mix}
Ā	Střední šedá hodnota
Δ	Podíl střední šedé hodnoty a počtu kvalitních spotů

Tab 1: Parametry vhodné pro porovnávání 2D map proteomu

Při hledání optimálních podmínek byly porovnány 4 varianty 2D PAGE: 7 cm pI 4-7, 18 cm pI 4-7, 7 cm pI 3-10 a pI 4-7.

Rozdělení v pI 4-7 (7 cm, ~150 µg proteinu, A): N: 500 spotů; V: 3500; V_{%min}: 204; V_{%mix}: 1,0; V_{%max}: 22; Ā: 237; Δ: 0,9. Rozdělení v pI 4-7 (18 cm, ~500 µg proteinu): N: 1146 spotů; V: 12200; V_{%min}: 700; V_{%mix}: 0,4; V_{%max}: 43; Ā: 200; Δ: 0,5; význam parametrů, viz. Tab. 3. Rozdělení v pI 3-10 (7 cm, ~150 µg proteinu): N: 462 spotů; V: 5037; V_{%min}: 203; V_{%mix}: 0,6; V_{%max}: 62; Ā: 217; Δ: 0,9. Rozdělení v pI 4-7 (7 cm, ~150 µg proteinu): N: 500 spotů; V: 3500; V_{%min}: 204; V_{%mix}: 1,0; V_{%max}: 22; Ā: 237; Δ: 0,8; význam parametrů, viz. Tab. 1.

Před samotnou analýzou vlivu zvýšených hladin endogenních cytokininů v rostlinách 303 a 307 byly porovnány mapy proteomu jednotlivých rostlin 303, 307 a SR1.

Pro statistické zpracování byly použitelné vždy minimálně 2 z 3 gelů. Bylo nalezeno celkem 882 spotů, z nichž 137 jeví významné odchylky. Proto těchto 137 spotů bylo sledováno v 2. a 3. opakování. Ve všech opakováních bylo nalezeno celkem 37 odlišně regulovaných spotů. Ty byly podle tendence nárůstu či poklesu koncentrací zařazeny do 4 profilových skupin.

ZÁVĚR

Při sledování okamžité odpovědi organismu na stimulus je stále jasnější, že nejvýznamnější část okamžité reakce probíhá na úrovni proteomu. Příkladem jsou post-translační regulace enzymů hrající významnou roli v mnoha aktivačních drahách. Proteomické studie však mají význam i při studiu dlouhodobých dějů, kdy můžeme sledovat jevy nezávislé na regulaci genové exprese. Nevýhodou však zůstává omezený počet proteinů, které jsou experimenty schopné pokrýt. Pro dosažení většího počtu sledovatelných proteinů se proto musí proteomické techniky stále vyvíjet a optimalizovat.

Na základě analýzy proteomu rostlin tabáku bylo nalezeno 37 proteinových spotů, které se zdají být regulované zvýšenou hladinou cytokininů. Proteinové spoty byly roztříděny do 4 základních skupin podle svého profilu v transgenních liniích 303, 307 a kontrolních rostlinách SR1.

LITERATURA

Lochmanová, G., Zdráhal, Z., Konečná, H., Koukalová, Š., Malbeck, J., Souček, P., Válková, M., Nagavalli, S. K. a Brzobohatý, B. (2008) *Cytokinin-induced photomorphogenesis in dark-grown Arabidopsis: a proteomic analysis*. Journal of Experimental Botany, **59**: 3705-3719.

Novák, J., Pavlů, J. a Brzobohatý, B. (2009) *P6-9 oxidative stress in Nicotiana tabacum with elevated level of cytokinins*. In ACPD 2009, **9**: 98.

Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. & Rodwell, V.W. (2003): *Harper's Illustrated Biochemistry*. Medical Publishing Division.

Šámalová, M., Brzobohatý, B. a Moore, I. (2005) *pOp6/LhGR: a stringently regulated and highly responsive dexamethasone inducible gene expression system for tobacco*. The Plant Journal, **41**: 919-935.