

RESPONSE OF *ARABIDOPSIS THALIANA* TO HEAT STRESS

ODPOVĚĎ *ARABIDOPSIS THALIANA* NA TEPLOTNÍ STRES

Skalák J.¹, Černý M.¹, Jedelský P.², Vaňková R.³, Brzobohatý B.¹

¹Laboratory of Molecular Plant Biology, CEITEC MENDELU, Mendel University in Brno & Institute of Biophysics AS CR, v. v. i Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Charles University in Prague, Faculty of Science, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

³Institute of Experimental Botany AS CR, v. v. i., Rozvojová 263, 165 02 Prague 6, Czech Republic

E-mail: skalak.jan7@gmail.com

ABSTRACT

The climate on Earth is rapidly changing. Thus, plants have to change their responses to environment factors and adapt their growth and development to it. We used methods from proteomics, 2D electrophoresis followed by mass spectrometry analysis, to study this problem. We found over 100 proteins significantly regulated by heat stress. Differential regulations of identified proteins correlated with hormonal profiling and physiology status of treated plants. Measurement of stomata movement, thermocamera plant body temperature screening and hormonal and proteomic profiling indicate that temperature response in *Arabidopsis thaliana* is influenced by plant hormone cytokinin signaling. Our results provide a new overview of signaling pathways of plants involved in response to changing environment conditions.

Key words: *Arabidopsis*, cytokinin, heat stress, proteomics

Acknowledgments: This work was supported by grants LC06034 and 1M06030 (Ministry of Education of the Czech Republic), IAA600040701 (Grant Agency of the Academy of Science of the Czech Republic), GA206/09/2062 (Czech Science Foundation), and AV0Z50040507, AV0Z50040702 and AV0Z40310501 (Academy of Science of the Czech Republic).

ÚVOD

Tato práce řeší problematiku teplotního stresu na různé části rostlinného těla a zkoumá molekulární odpovědi pomocí moderních metod molekulární biologie, převážně proteomiky. S využitím těchto technik je možné zaznamenat funkční změny v odpovědi na teplotní stres a zkoumat tak podstatu ovlivněných molekulárních reakcí. Dále jsme schopni s pomocí transgenních linií upravovat hladiny fytohormonů, cytokininů, které stojí za celou řadou odpovědí rostliny na změnu vnitřních, ale i vnějších podmínek (Černý et al., 2011).

MATERIÁL A METODIKA

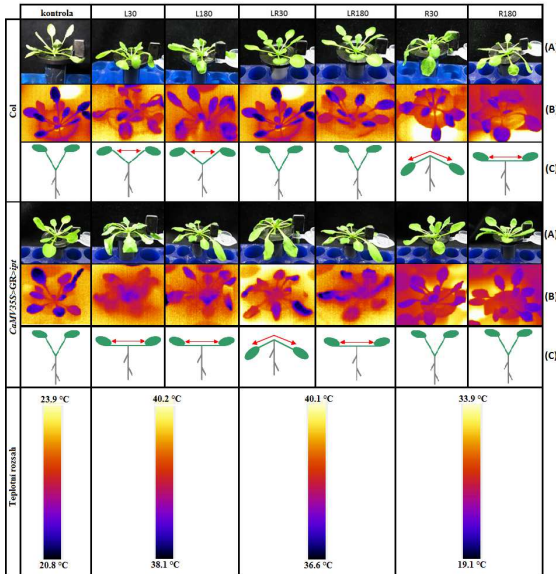
Jako modelové organismy byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* (Col-0) a transgenní linie *CaMV35S>GR>ipt* (pOpBK-*ipt*) (Craft et al., 2005), u kterých je možné indukovatelně zvýšit hladiny aktivních cytokininů. Rostliny byly pěstovány po 4 týdny za standardních podmínek (21 °C/19 °C den/noc, 16-h fotoperioda 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ světelné intenzity) v kultivačním boxu (AR36LX, Percival) v hydroponii (Hoaglandovo medium). Po 4 týdnech kultivace byly rostliny ošetřeny 24 hodinovou aplikací 20 μM dexamethazonu (DEX; 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 byla část vzorku podrobena fenotypové analýze pomocí digitálního fotoaparátu Olympus Ixus 120 IS, termokamerou IRISYS4000 a inverzním fluorescenčním mikroskopem Olympus IX 70 a část vzorků byla okamžitě zamrazena v tekutém dusíku. Homogenizace vzorků probíhala vždy 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, inhibitory 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). Pro elektroforetickou analýzu byl vzorek nejprve nanesen na IPG stripy (pI 3-10, nelineární gradient, Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com/>) a 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 vzorek proteomu 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 obarveny Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad) a neskenovány kalibrováním 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 +/- 1,4 (porovnání relativního objemu nultých bodů obou linií s ostatními časovými body). Signifikantně regulované spoty byly digestovány trypsinem a podrobeny analýze MALDI TOF/TOF MS.

VÝSLEDKY A DISKUZE

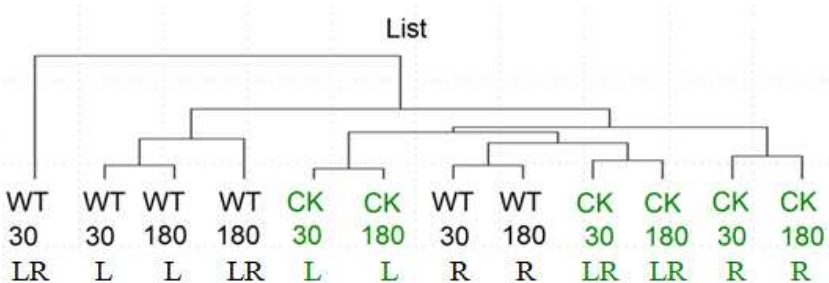
Před samotnou proteomickou analýzou bylo provedeno otestování funkčnosti kolony pro afinitní odstranění RUBISCO Seppro IgY-Rubisco Spin Column (Sigma-Aldrich). Bylo zjištěno, že dané kolony jsou schopny snížit hladinu tohoto abundantního proteinu na 25% z původního obsahu. Díky tomu jsme na gelu po depleci Rubisko schopni identifikovat více skvrn odpovídajících proteinům ležícím ve shodné oblasti MW/pI jako RuBisCO. Tyto výsledky byly publikovány (Černý et. al, 2011).

Fenotyp nadzemní části rostlin *Arabidopsis thaliana* standardního typu vystavených teplotnímu stresu závisel na způsobu jeho aplikace. V případě ohřevu celé rostliny nebyly pozorovány v průběhu 3 hodin působení teplotního stresu významné odchylky od fenotypu při standardní kultivační teplotě. Vadnutí bylo zjištěno při aplikaci teplotního stresu na nadzemní část rostliny. Nejvyšší stupeň vadnutí byl pozorován v případě působení teplotního stresu pouze na kořeny. Zvýšené hladiny cytokininů u transgenní linie *CaMV35S>GR>ipt* tuto odpověď změnilo. Vadnutí nebylo pozorováno při ohřevu pouze kořenů. Při ohřevu pouze nadzemní části rostlin bylo vadnutí výraznější než u rostlin se standardními hladinami cytokininů. Při ohřevu celých rostlin byl rozsah vadnutí nejsilnější a podobal se situaci u rostlin se standardními hladinami cytokininů, u kterých došlo k ohřevu pouze kořenů. Nejvyšší stupeň fenotypových změn pozorovaných v těchto dvou případech velmi dobře koreloval s výsledkem shlukové analýzy diferenciálně regulovaných proteinů listového proteomu (Obr. 2). Tato analýza ukázala, že odpovědi na úrovni proteomu jsou si nejbližší u standardní linie při teplotním působení na kořeny a transgenní linie při teplotním působení na celou rostlinu. K průkazu, že teplota listu odpovídala očekávání pro jednotlivé způsoby aplikace teplotního stresu, bylo využito techniky termálního snímání (Obr. 1).

Obr.1: fotografie (A) a termo snímky (B) působení teplotního stresu na kontrolní (Col) a transgenní (CaMV35S>GR>ipt) linii *Arabidopsis thaliana*. Pro lepší přehlednost byly stanoveny 4 parametry signifikantního vadnutí (C) u těchto linií, kde červená šipka značí odlišnou polohu listů oproti kontrole (L = teplotní stres pouze na listy; LR = teplotní stres na celou rostlinu; R = teplotní stres na kořeny; 30 a 180 = časový interval měření v minutách).

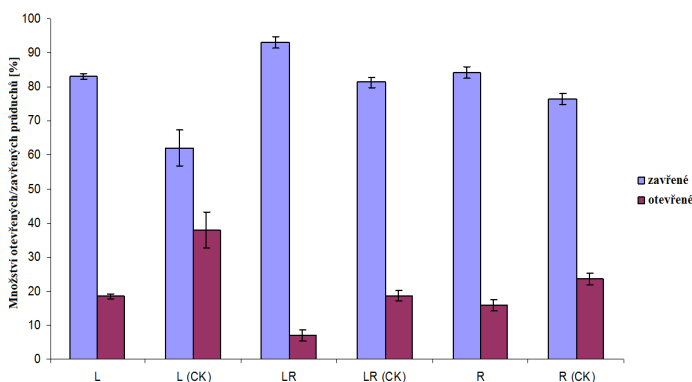


Obr. 2: rozdělení jednotlivých skupin regulovaných proteinů v listovém proteomu pomocí metody City-block distance (WT – kontrola, CK – zvýšená hladina cytokininů, 30 a 180 – časový údaj sběru v minutách).



V práci Dobrá et al., 2010, byla na hormonální úrovni prokázána změna hladiny nejenom cytokininů, ale i ostatních hormonů v reakci na teplotní stres. Efekt zvýšené teploty a změny hladin fytohormonů se projevil na vodní bilanci u pozorovaných linií tabáků (*Nicotiana tabacum*). Vypařování vody z rostlinného těla probíhá prostřednictvím průduchů, jejichž pohyb reguluje vodní bilanci rostlin. Efekt teploty na pohyb průduchů byl již pozorován (Zhang et al., 2008) a můžeme tak vysvětlit rozdílnou úroveň epinastie u našich pokusných linií (Obr. 1). Zvýší-li se vodivost průduchů, zvýší se úbytek vody v rostlině. To povede ke ztrátě turgoru a následné epinastii. Odlišný pohyb průduchů byl pozorován jak u linií se standardní hladinou cytokininů, tak u transgenních linií v závislosti na odlišných aplikacích teplotního stresu (Obr. 3).

Obr. 3: relativní počet otevřených/zavřených průduchů v důsledku odlišného teplotního stresu po 180 minutovém působení teplotního stresu (relativní hodnoty byly vztaženy vždy k nulovému bodu měření dané linie).



ZÁVĚR

Zvýšená teplota se ukázala jako silný stimul pro signifikantní změnu v profilu mnoha proteinů vyskytujících se ve všech typech organel rostlinné buňky. Výsledky této práce poslouží k dalšímu pátrání po teplotních receptorech v rostlinách a otevrou tak možnost vytváření nových transgenních systémů odolných vůči působení extrémních teplot, kterým jsou rostliny v současné době čím dál častěji vystavovány.

LITERATURA

Craft J., Samalova M., Baroun C., Townley H., Martinez A., Jepson I., Tsiantis M., Moore I. (2005): New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in Arabidopsis. *Plant Journal*, 41: 899-918.

Černý M., Dyčka F., Bobalová J., Brzobohatý B. (2011): Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of Arabidopsis thaliana identified by proteome and phosphoproteome profilig. *Journal of Experimental Botany*, 62: 921-937.

Černý M., Skalák J., Kurková B., Brzobohatý B. (2011): Využití komerční metody imunochemického odstranění RUBISCO v analýze rostlinného proteomu. *Chemické Listy*, 105: 640-642.

Damerval C., Devienne D., Zivy M., Thiellement H. (1986): Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic-variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7: 52-54.

Dobrá J., Motyka V., Dobrev P., Malbeck J., Prasil I. T., Haisel D., Gaudinová A., Havlová M., Gubis J., Vaňková R. (2010): Comparison of hormonal responses to heat, drought and cobined stress in tobacco plants with elevated proline content. *Journal of Plant Physiology*, 167: 1360-1970.

Zhang X., Wollenbeweberg B., Jiang D., Thao L. F. (2008): Water deficits and heat shock effects on photosynthesis of a transgenic Arabidopsis thaliana constitutively expressing ABP9, a bZIP transcription factor. *Journal of Experimental Botany*, 59, 839-848.