

ISOLATION OF PHOSPHOPROTEOM AND ITS APPLICATION IN STUDY OF THE EFFECT OF CYTOKININ ON PLANTS

IZOLACE FOSFOPROTEOMU A JEHO VYUŽITÍ PŘI STUDIU ÚČINKU CYTOKININŮ NA ROSTLINU

Černý 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: martincerny@atlas.cz, brzoboha@ibp.cz

ABSTRACT

Phosphorylation is one of the most important posttranslational modifications in proteins. It is also a major issue in modern proteomics. Its application in plant research is rather scarce. We present here development of optimized protocol for phosphoprotein enrichment kit (Quiagen) for extraction of plant phosphoproteom. This protocol allows reusing of affinity column designated for single use only up to 3 times with phosphoproteom quality unaffected. We also provide example of application of this improved protocol in research of cytokinin activation pathway in plants.

Key words: phosphorylation, plant proteomics, cytokinin

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

ÚVOD

Fosforylace je jedna z nejdůležitějších post-translačních modifikací proteinu v živém organismu. Její role byla dosud potvrzena v regulaci aktivity enzymů, při přenosu signálu, zprostředkování protein-proteinových interakcí, směřování proteinů, či regulaci délky života proteinu. I když byl první fosforylovaný protein vitelin objeven již před více jak 100 lety, studium fosfoproteomu zůstává stále velmi komplikovanou záležitostí. Některé studie odhadují, že až třetina všech exprimovaných proteinů v buňce může být v danou chvíli ve fosforylovaném stavu. Mnoho proteinů pak může být fosforylováno na více než jednom aminokyselinovém zbytku. Pro regulaci tak složitého procesu je potřeba množství genů, například v rostlině *Arabidopsis thaliana* je to odhadováno na minimálně 5% jejího genomu (Laugesen et al. 2004). Analýza fosfoproteomu se od svých počátků potýká s několika problémy. Fosforylované proteiny je třeba separovat a identifikovat. Identifikace fosfoproteinů a nalezení místa fosforylace se dnes již výhradně provádí pomocí hmotnostní spektrometrie (Kersten et al. 2006). Oddělení fosforylovaných proteinů je ale stále komplikované. Od roku 2003 jsou dostupné kity pro separaci fosfoproteinů. Jejich užití je však od počátku zaměřeno na živočišné buňky a bakterie. Aplikace na rostlinný materiál je vzácná a i finanční náročnost kitů, které jsou připraveny na jedno použití, brání většímu rozšíření.

MATERIÁL A METODIKA

Sedmi denní semenáčky *Arabidopsis thaliana* var. Columbia byly 15 min aktivovány 5 μ M cytokininem benzylaminopurinem (BAP). Proteom byl izolován pomocí metody TCA/acetone (Görg A 2003) a pomocí kitu na izolaci fosfoproteinů (Qiagen). Získaný protein byl separován pomocí standardní 1D a 2D elektroforézy (Bio-Rad) a výsledné proteinové mapy porovnány pomocí analýzy obrazu (Decodon Delta 2D).

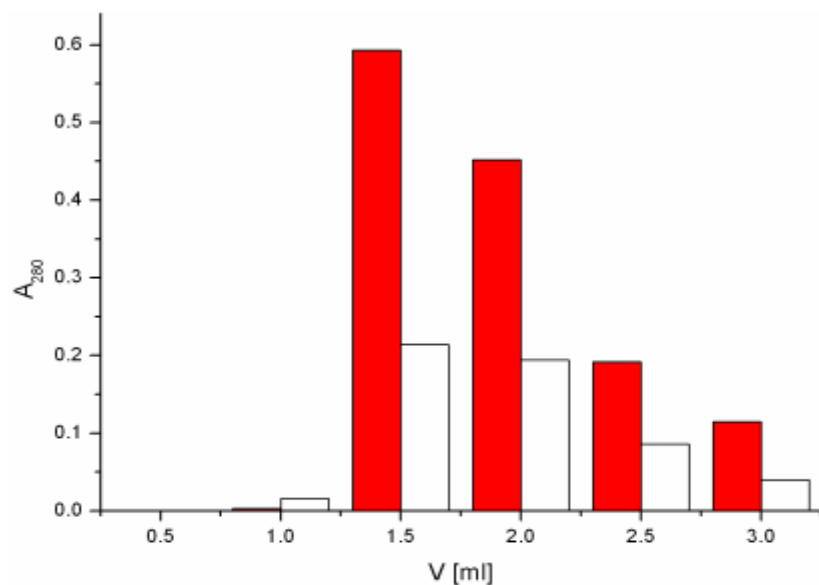
VÝSLEDKY A DISKUZE

Byla optimalizována metoda izolace rostlinného fosfoproteomu pomocí kitu od Qiagen. Srovnáním výsledků bylo prokázáno, že je možné provést izolaci přímo v pufru určeném pro bakteriální buňky, pokud je rostlinný materiál před extrakcí rozdrcen v tekutém dusíku. Optimální množství je 350-400 mg rostlinného materiálu a 4 ml lyzačního pufru (Obr. 1).



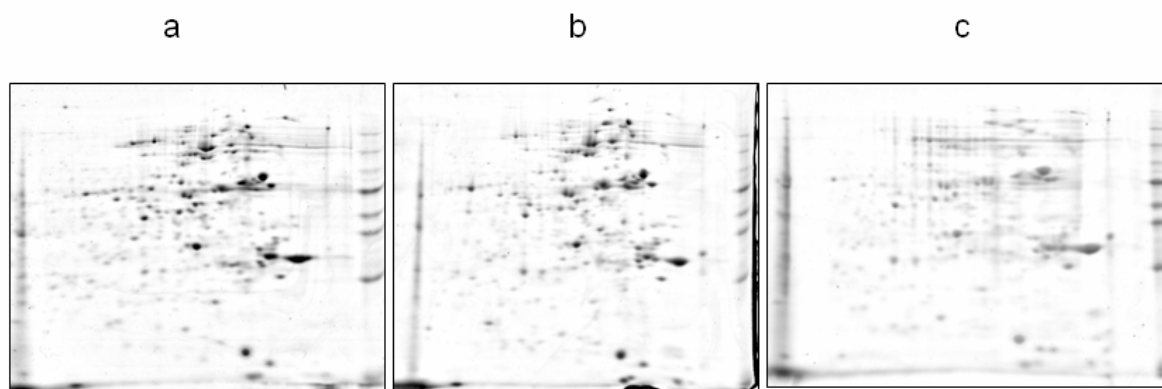
Obr. 1 Izolace fosfoproteomu pomocí komerčního kitu optimalizovanou metodou. a – extrakt, b – protečená frakce, c – zachycená frakce fosfoproteinů (Bio-Safe Coomassie)

Dále bylo zjištěno, že při odsolování vzorku před aplikací na elektrickou isofokusaci je vhodnější použití zakoncentrování (amicon Ultra-4), než metody gelové filtrace. Důvodem je hlavně časová úspora a vyšší výtěžek (99% proti 94%). Podařilo se zavést protokol pro opakované použití kitu, kdy se použitá kolona promyje 5 násobkem svého objemu 50 mM fosfátovým pufrům pH 7.0 a následně reaktivuje v lyzačním pufru (součást kitu). Životnost použité kolony je malá a výtěžek po týdnu skladování jednou použité kolony v chladu je zhruba 40% výtěžku nové kolony (Graf 1).



Graf 1 Opakované použití komerčního kitu pro izolaci fosfoproteomu. červená – výtěžek z nové kolony (100%), bílá – opakované použití kolony po 1 týdnu skladování v chladu (~40%). Absorbance 280 nm.

Nicméně pokud se kolona použije opakovaně ten samý den, je výtěžek téměř 100% a 2D analýza obrazu ukazuje, že kvalita separace je zachována i při 3. použití (Obr. 2).



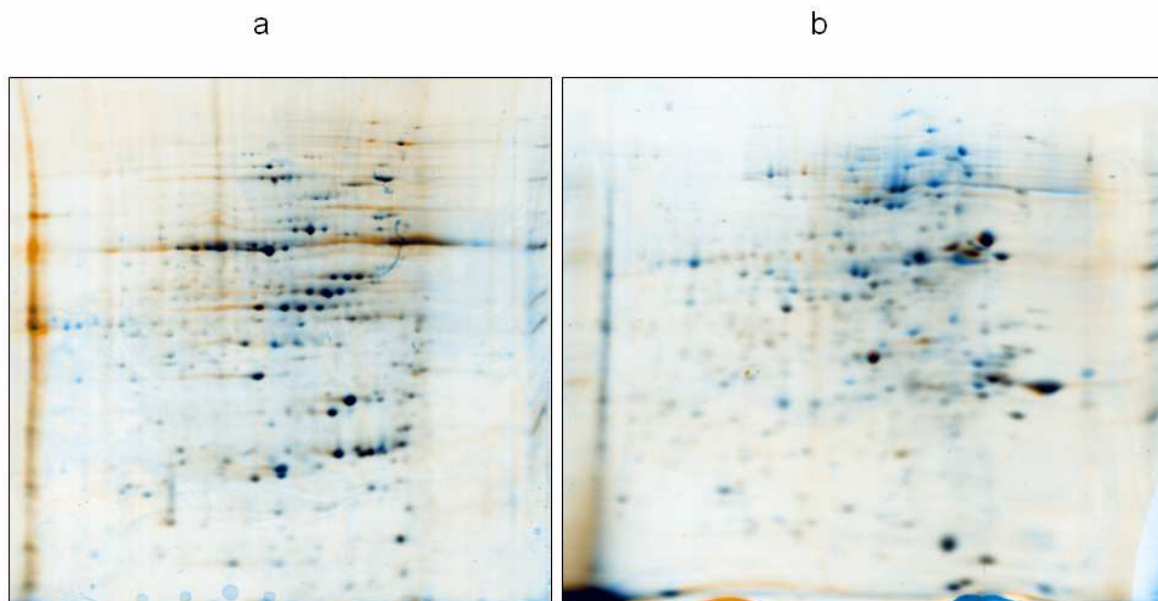
Obr. 2 2D PAGE fosfoproteomu získaného opakovaným použitím jedné afinitní kolony a – nová kolona, b – 1x použitá, c – 2x použitá, 533 detekovaných spotů ve všech případech

Optimalizovaná metoda byla úspěšně použita při porovnání fosfoproteomu 7 denního semenáčku *Arabidopsis thaliana* aktivovaného 5 μ M BAP rozpuštěném v DMSO s kontrolním semenáčkem (pouze DMSO). Bylo nalezeno 25 signifikantních rozdílů (Tab. 1)

bap2a			Group 1				Group 3				Ratio	t-Test
ID	X	Y	bap2a	bap1a	bap1b	bap2b	dms01a	dms01b	dms02a	dms02b		
201	1,621	218	0.29	0.09	0.08	0.29	0.03	0.04	0.04	0.05	-5.0	95.6
344	1,431	411	0.22	0.18	0.26	0.24	0.04	0.03	0.11	0.03	-4.5	100.0
345	1,783	405	0.44	0.22	0.35	0.33	0.13	0.18	0.28	0.13	-1.9	96.2
359	1,602	437	0.39	0.24	0.42	0.47	0.10	0.12	0.31	0.29	-1.9	94.7
368	1,389	446	0.26	0.14	0.17	0.27	0.08	0.05	0.13	0.12	-2.2	97.7
370	1,564	437	0.24	0.16	0.12	0.20	0.02	0.02	0.16	0.07	-2.7	96.5
389	1,553	523	0.96	0.98	1.18	0.92	0.65	0.59	0.62	0.52	-1.7	99.9
393	1,406	490	0.18	0.24	0.29	0.17	0.08	0.16	0.09	0.07	-2.2	98.5
420	1,446	523	0.20	0.23	0.27	0.33	0.54	0.54	0.35	0.37	1.7	98.3
460	1,410	567	0.40	0.25	0.27	0.36	0.18	0.24	0.18	0.15	-1.7	98.1
461	1,538	586	1.11	0.77	0.84	1.05	0.56	0.59	0.64	0.40	-1.7	99.4
462	1,576	582	0.84	0.68	0.62	0.76	0.35	0.36	0.50	0.55	-1.7	99.4
573	789	806	1.23	0.68	0.58	1.02	0.57	0.50	0.22	0.29	-2.2	97.0
575	1,807	794	1.55	1.27	1.07	1.49	0.92	0.77	0.85	0.96	-1.5	99.3
580	720	795	0.24	0.21	0.21	0.22	0.17	0.15	0.06	0.09	-1.9	99.1
585	657	803	0.13	0.20	0.15	0.17	0.12	0.13	0.04	0.08	-1.8	97.8
639	1,168	908	0.57	0.34	0.30	0.59	0.15	0.20	0.24	0.27	-2.1	97.7
754	1,832	1,149	0.12	0.12	0.10	0.10	0.09	0.05	0.08	0.06	-1.6	99.5
783	838	1,229	0.08	0.14	0.15	0.07	0.02	0.04	0.04	0.01	-3.8	99.0
880	721	1,489	0.06	0.05	0.05	0.06	0.03	0.04	0.01	0.04	-1.8	98.0
906	988	1,552	0.13	0.10	0.08	0.12	0.08	0.02	0.01	0.03	-3.0	98.9
978	1,498	1,769	0.11	0.14	0.08	0.09	0.03	0.05	0.09	0.06	-1.9	96.8
1426	1,520	520	0.35	0.33	0.39	0.47	0.13	0.16	0.18	0.19	-2.3	100.0
1433	1,555	481	0.91	0.50	0.83	0.94	0.22	0.21	0.35	0.50	-2.5	99.2
2396	1,458	411	0.04	0.07	0.09	0.06	0.03	0.02	0.05	0.02	-2.2	96.8

Tab. 1 Analýza obrazu fosfoproteomu *Arabidopsis* aktivované 5 μ M BAP s DMSO kontrolou.

Souběžně byl proveden pokus o porovnání obrazu fosfoproteomu s obrazem celkového proteinu aktivované *Arabidopsis*. Jednotlivé mapy se však příliš lišily (Obr. 3).



Obr. 3 2D PAGE fosfoproteomu a celkového proteomu *Arabidopsis* aktivované 5 μ M BAP. a - celkový proteom, b – fosfoproteom

ZÁVĚR

Podařilo se úspěšně aplikovat komerční kit pro separaci fosfoproteomu na rostlinný materiál. Pomocí nově zavedeného protokolu lze nyní využít tento kit určený na jedno použití až pro trojnásobné opakování, aniž by byla ovlivněna kvalita separovaného fosfoproteomu. Experiment prokázal možnost využití této techniky při řešení klíčových otázek molekulární biologie v oblasti účinku fytohormonů na rostlinu.

LITERATURA

- Collins M O, Yu L, Choudhary JS (2007) Analysis of protein phosphorylation on a proteome-scale *Proteomics* 7:2751-68
- Görg A (2003): Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis. Technical University of Munich
- Kersten B, Agrawal GK, Iwahashi H, Rakwal R (2006) Plant phosphoproteomics: a long road ahead. *Proteomics* 6:5517-28
- Klumpp S, Krieglstein J (2002) Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur J Biochem* 269:1067-71
- Kwon S J, Choi EY, Seo JB, Park OK (2007) Isolation of the *Arabidopsis* Phosphoproteome Using a Biotin-tagging Approach. *Mol Cells* 24:268-75
- Laugesen S, Bergoin A, Rossignol M (2004) Deciphering the plant phosphoproteome: tools and strategies for a challenging task. *Plant Physiol Biochem* 42:929-36.