

Proteomika jako nástroj porozumění stresové odezvě rostlin

- Klára Kosová, Pavel Vítámvás, Miroslav Klíma, Ilja Tom Prášil
- *Laboratoř biologie stresu a biotechnologie ve šlechtění, Odbor genetiky a šlechtění rostlin, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6 - Ruzyně*



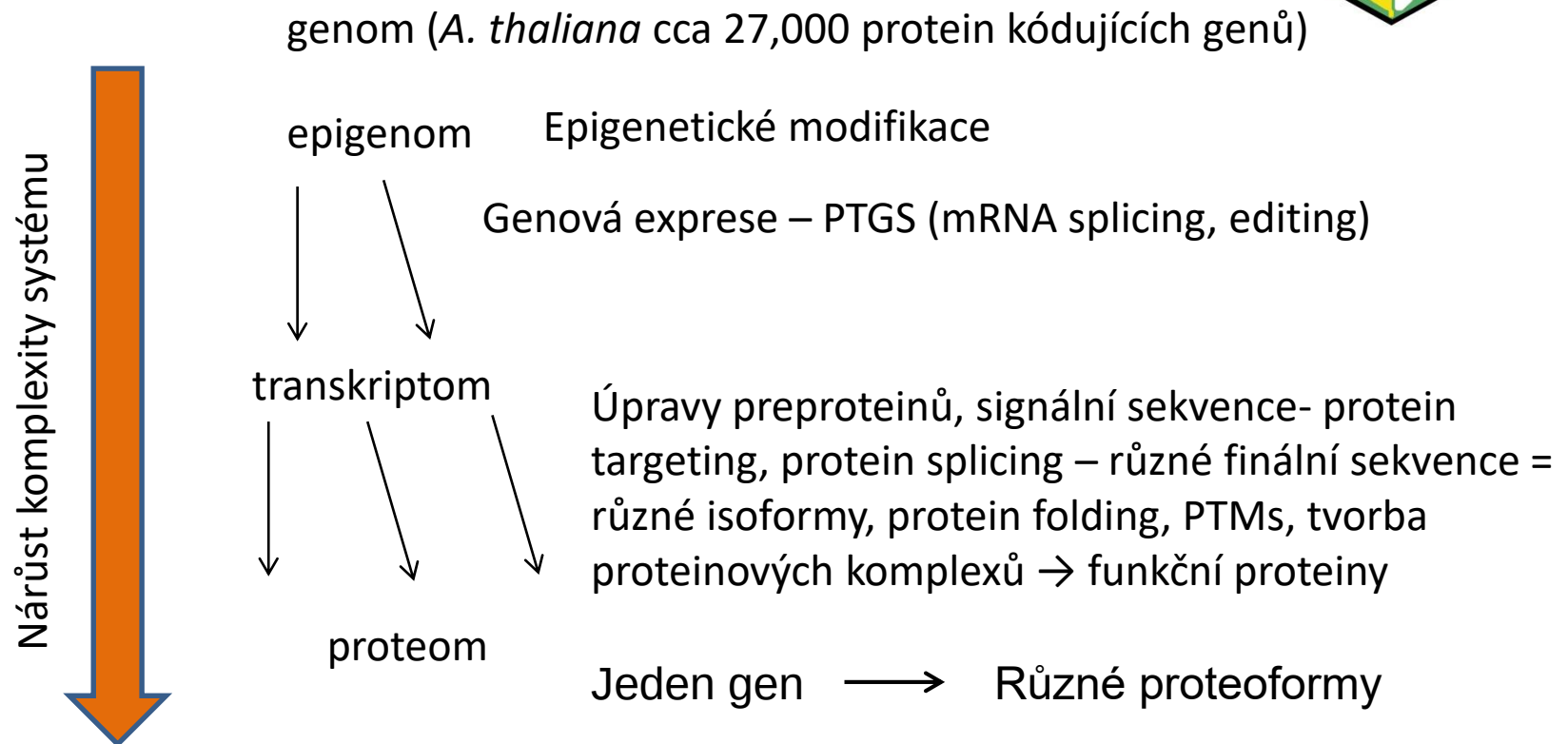


Vymezení proteomiky

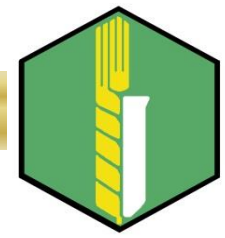
- Proteomika jako komplexní biochemický „omiks“ přístup ke studiu tzv. proteomu, tj. souboru všech proteinů v daném organismu (orgánu, pletivu, typu buněk) v daném časovém okamžiku
- „Proteom“ jako proteinový komplement genomu (Marc R. Wilkins, 1994).
- Jedinec je během svého života definován svým genomem, který je prakticky neměnný, naopak proteom je vysoce dynamický, je výsledkem $G \times E$ interakcí.
- Cílem proteomiky není pouze popis proteomu (separace, detekce a identifikace jednotlivých proteinů, resp. Proteoform – isoformy a PTMs), ale i studium biologické funkce proteinů (transgenní systémy: overexprese či knock-out daného genu, resp. proteinu; transientní silencing daného proteinu pomocí antisense-RNA – tzv. VIGS approach).



Proteomika ve srovnání s genomikou a transkriptomikou



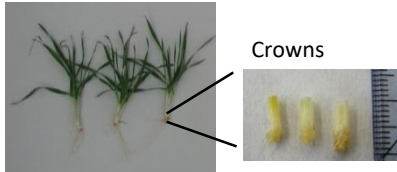
Nárůst complexity systému od genomu směrem k proteomu. Genom jako stálá struktura definující jedince reaguje během života jedince na vnitřní a vnější podněty vedoucí k nekonečnému množství transkriptomů a proteomů specifickým pro danou buněčnou linii, vývojovou fázi, zdravotní stav, a podmínky prostředí = proteiny se přímo podílejí na formování fenotypu jedince v závislosti na jeho specifické odezvě na podněty prostředí.



Metody proteomiky

Separace
proteinů

Plant material



Crowns

Extraction

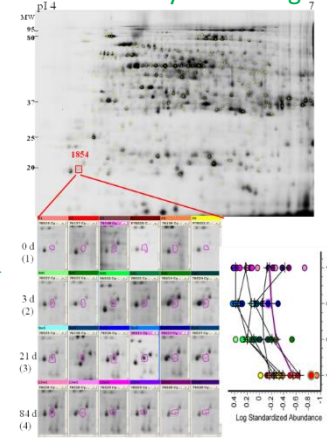


SDS-PAGE, 2DE, 2D-DIGE („gel
based“ proteomics)

Visualization of gels



Picture analysis of the gels



Cutting of chosen
protein spots



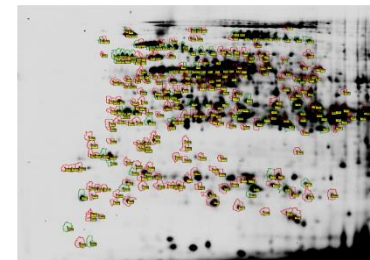
„Gel-free“

„Gel-free“ proteomics



MS/MS

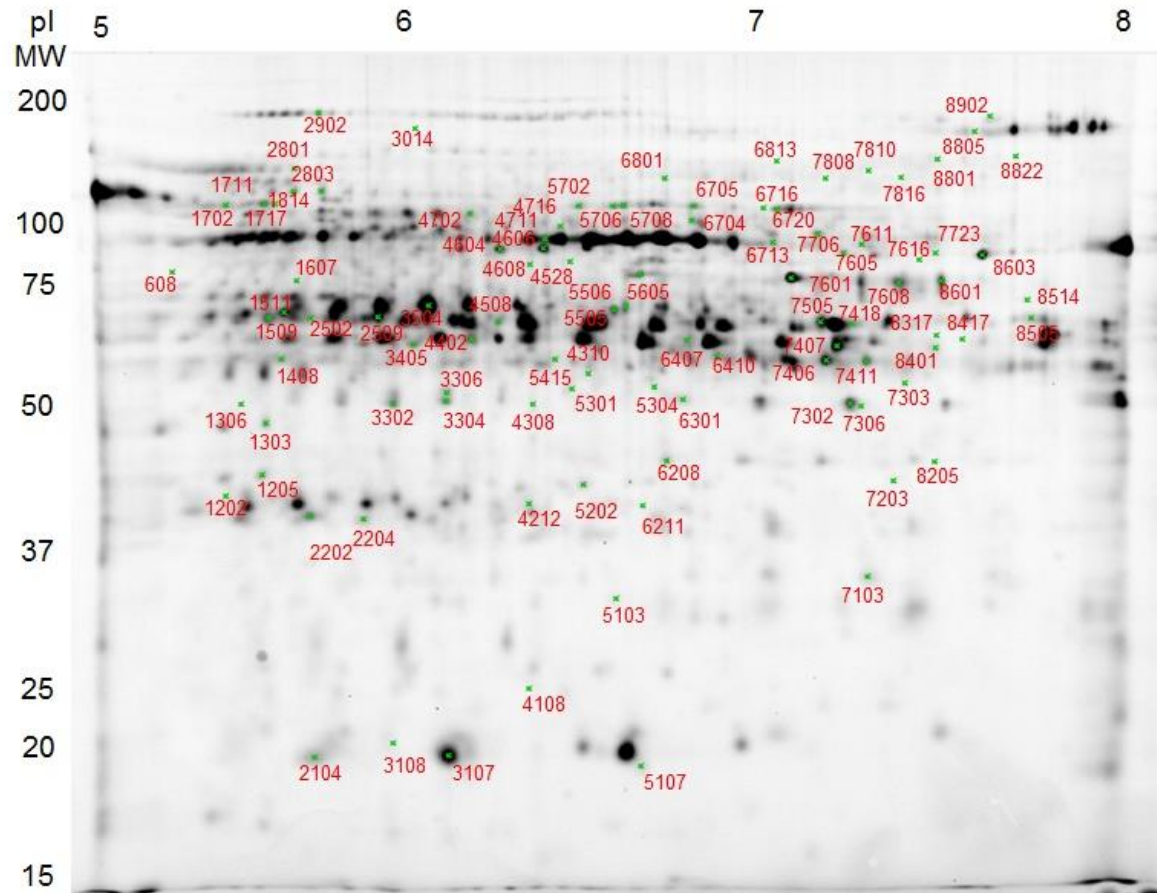
Identification of proteins, statistic
and bioinformatic analysis of
obtained results



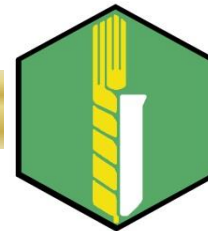
Protein map of identified spots



Komplexita rostlinného proteomu

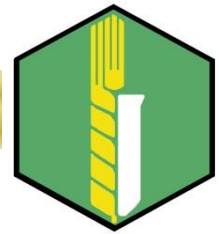


Rostlinný proteom je vysoce komplexní systém, dané pletivo v daném čase obsahuje desetitisíce různých odlišných funkčních proteinů (včetně isoform a PTMs), 2-DE (2D-DIGE) i jakákoliv jiná analytická metoda dokáže většinou postihnout pouze část proteomu (dáno vysokou variabilitou proteinů co se týče jejich abundance, hydrofilicity/hydrofobicity, pI, MW a dalších charakteristik – dáno vysokou chemickou variabilitou proteinových aminokyselin a jejich PTMs).
2DE a 2D-DIGE: ideální k rozlišení různých proteoforem daného proteinu



Nutné předpoklady pro rozvoj proteomiky:

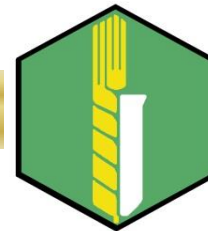
- Rozvoj vysokoúčinných analytických metod umožňujících separaci a identifikaci komplexních směsí proteinových extraktů
- Sekvenace genomů a anotace proteinových sekvencí, rozvoj proteinových databází a predikčních nástrojů (predikce buň. Lokalizace, PTMs, aj.) = zvyšuje šanci na identifikaci a funkční charakterizaci proteinu × alternativa: tzv. „proteogenomics approach“ = u dosud nepublikovaných genomů (např. oves) – spojení transkriptomiky a proteomiky (vytvoření databáze experimentovaných genů vůči níž jsou prohledávána MS data pro identifikaci proteinů).
- Biologická funkce proteinu je determinována nejen jeho primární sekvencí, ale rovněž jejími modifikacemi (isoformy), modifikacemi aminokys. zbytků (PTMs), buň. Lokalizací, interakcemi s dalšími proteiny (tvorba komplexů) i neproteinovými molekulami (interaktomika)
- Biologická charakterizace rostlinného materiálu: charakteristiky spojené s rostlinou (VSD, RWC) vs charakteristiky spojené s prostředím (půdní vodní kapacita)



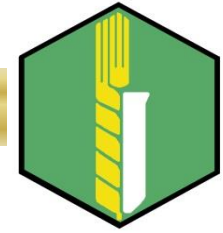
Proteomika environmentálních stresů u rostlin:

- Stresové faktory (E) – v přírodě jsou obvykle rostliny vystaveny kombinacím různých stresových faktorů, které na proteinové úrovni mají specifickou odezvu
- Dynamika stresové odezvy rostlin – proteom se významně liší v závislosti na fázi stresové odezvy (době odběru)
- Genotypové rozdíly (G) – různá citlivost, resp. Tolerance rostlin k dané souhře stresových faktorů
- U zemědělských plodin faktor „managementu“, tj. technologie pěstování (M)
- Proteom zemědělských plodin jako výsledek tzv. $G \times E \times M$

Proteinové sekvence a proteomické časopisy



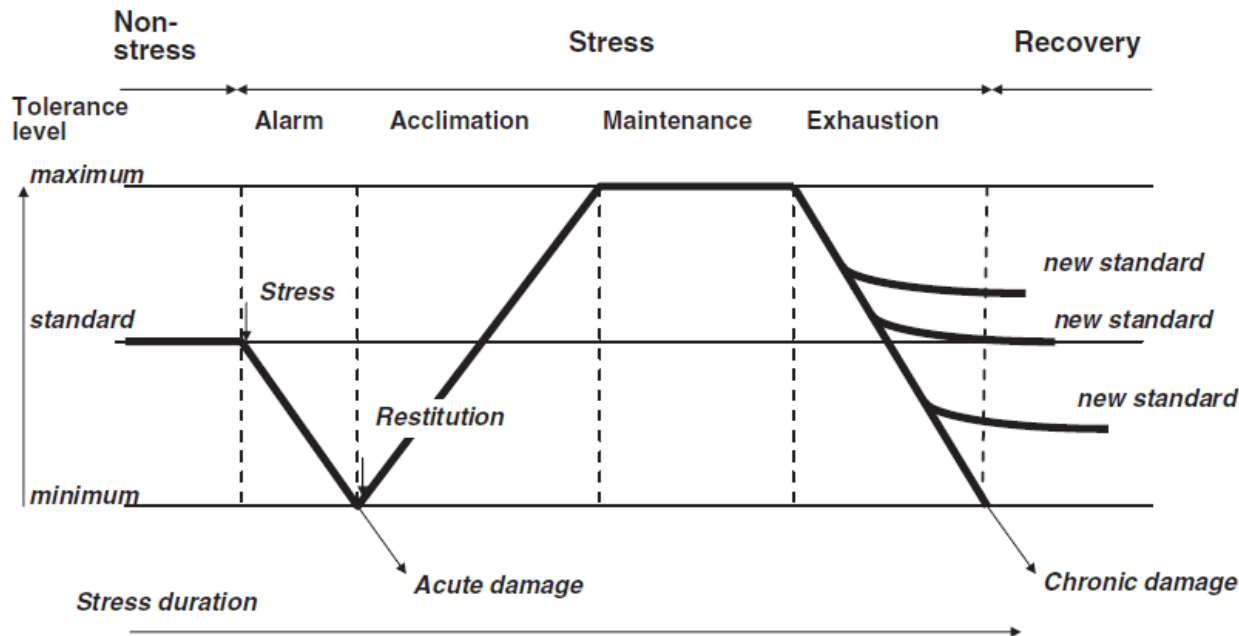
- Proteinové databáze:
- Sekvenční databáze: NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov); Uniprot (www.uniprot.org); SwissProt (web.expasy.org) – proteinové sekvence plus další nástroje (predikce 3D struktury, výpočet pI/MW, proteinové domény – PFAM; enzymy – BRENDA)
- Funkční databáze: Gene Ontology (www.geneontology.org) –
- GO kategorie: molekulární funkce, buněčná lokalizace, biologický proces
- Proteomické časopisy:
- Proteomics (IF 3.5), Journal of Proteomics (IF 3.7), Journal of Proteome Research (IF 3.9), Molecular and Cellular Proteomics (IF 5.2); sekce Plant proteomics v časopise Frontiers in Plant Science (IF 3.7)



Definice stresu

Stres

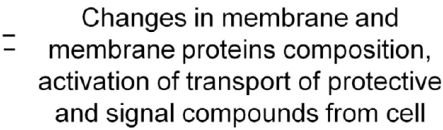
- Soubor environmentálních faktorů vedoucích k omezení růstu a vývoje rostlin

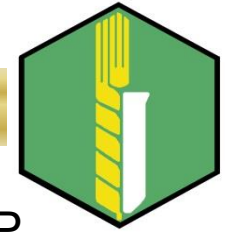


Kosová et al. (2011) J. Proteomics 74(8): 1301-1322

- Dynamika stresové odezvy rostlin (počáteční tzv. alarm fáze, fáze aklimace, rezistence, vyčerpání „exhaustion“ a regenerace „recovery“, kdy dochází k ustanovení nové homeostase mezi rostlinou a prostředím

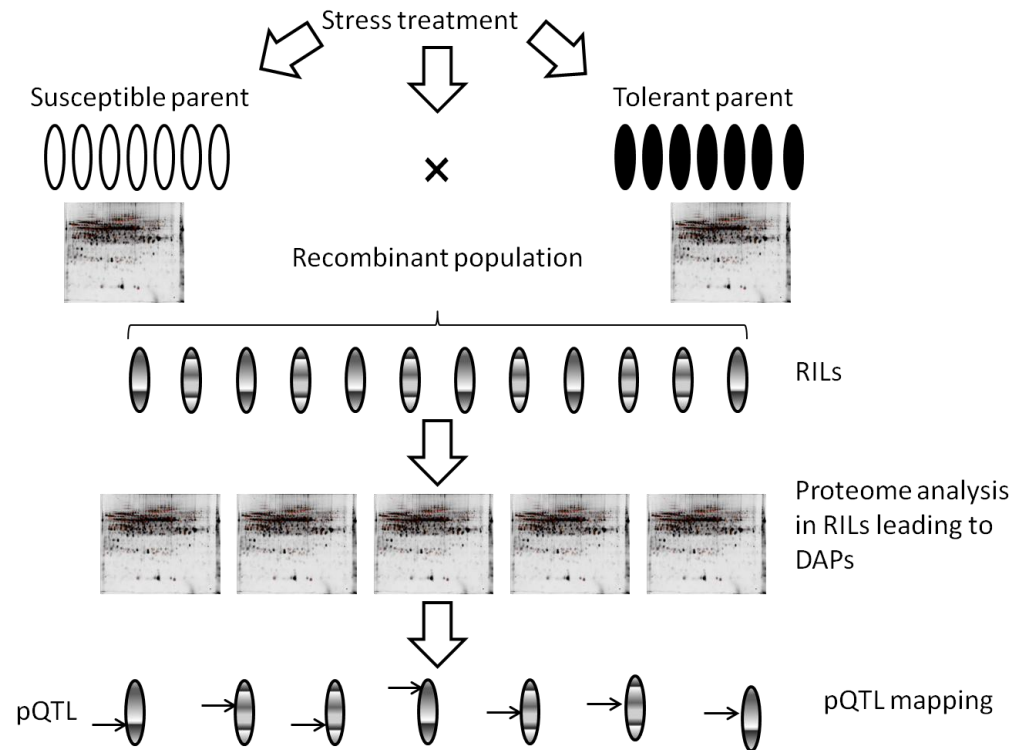
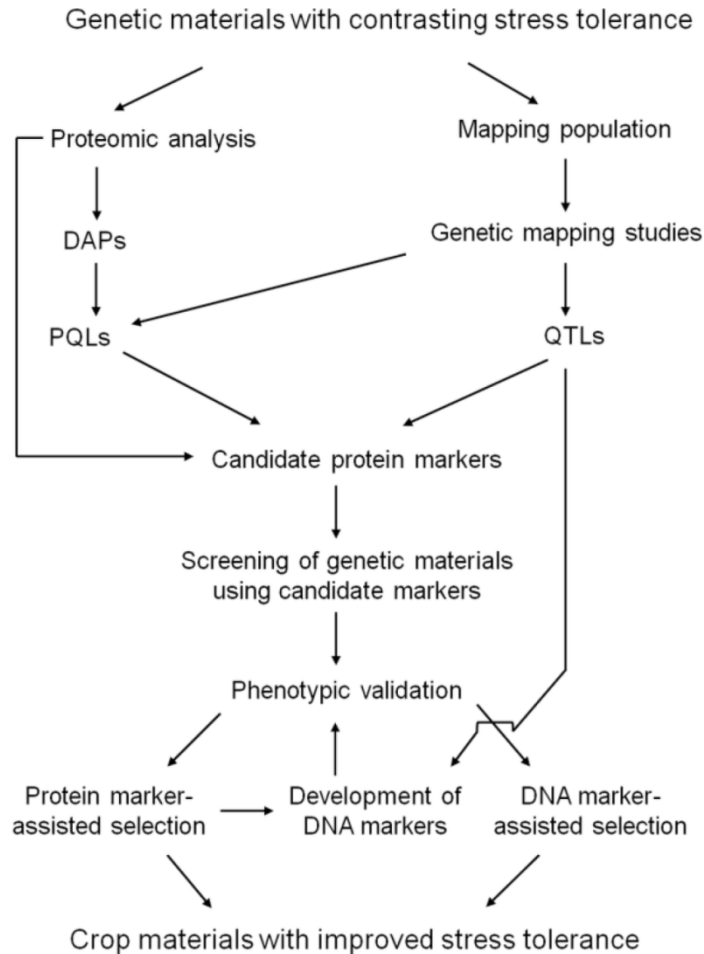
Reakce rostlin na stres



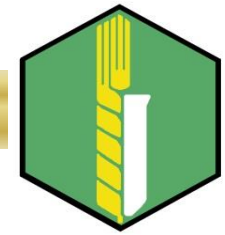


Hledání markérů pro zvýšení odolnosti rostlin

Mapování tzv. pQTL = lokusy determinující rozdíly v rel. abundanci DAP



Kosová et al. 2019, J. Exp. Bot. 70(10): 2605-2608 insight to Rodziewicz et al.

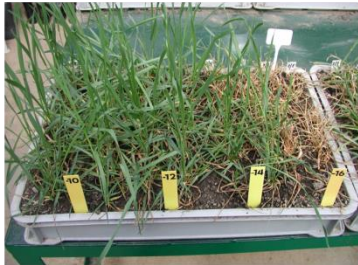


Laboratoř stresové biologie a biotechnologie

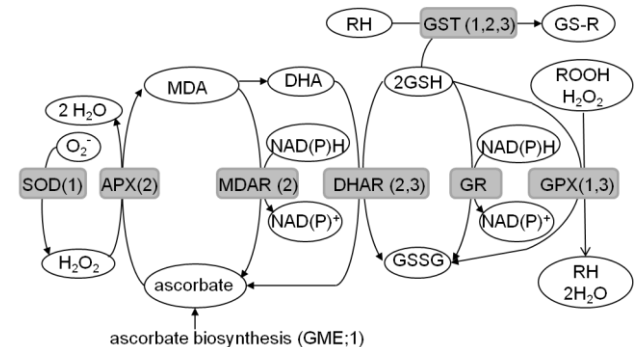
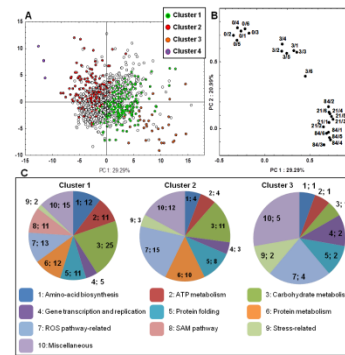
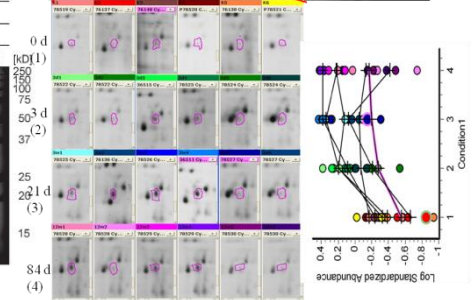
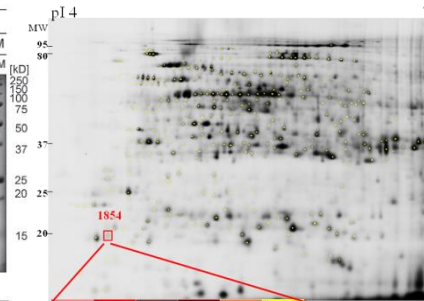
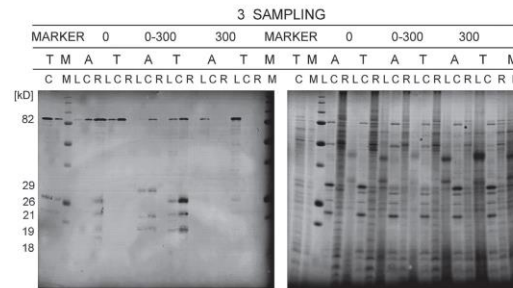
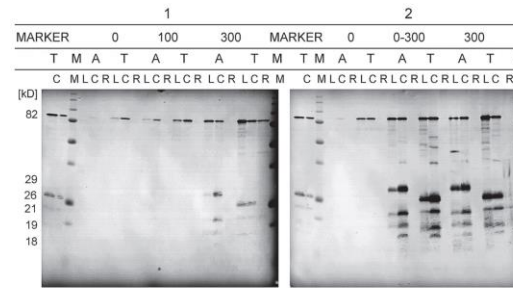
Stresová biologie:

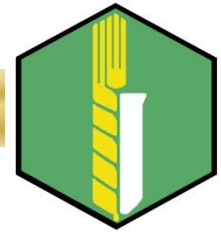
- abiotický stres (chlad, mráz, sucho, zasolení, vysoké teploty)
- biotický stres (klasové fusariosy, virózy obilnin)
- charakterizace klíčových fenotypových znaků rostliny spojených se stresovou odezvou

Odolný genotyp ozimé pšenice vůči mrazu



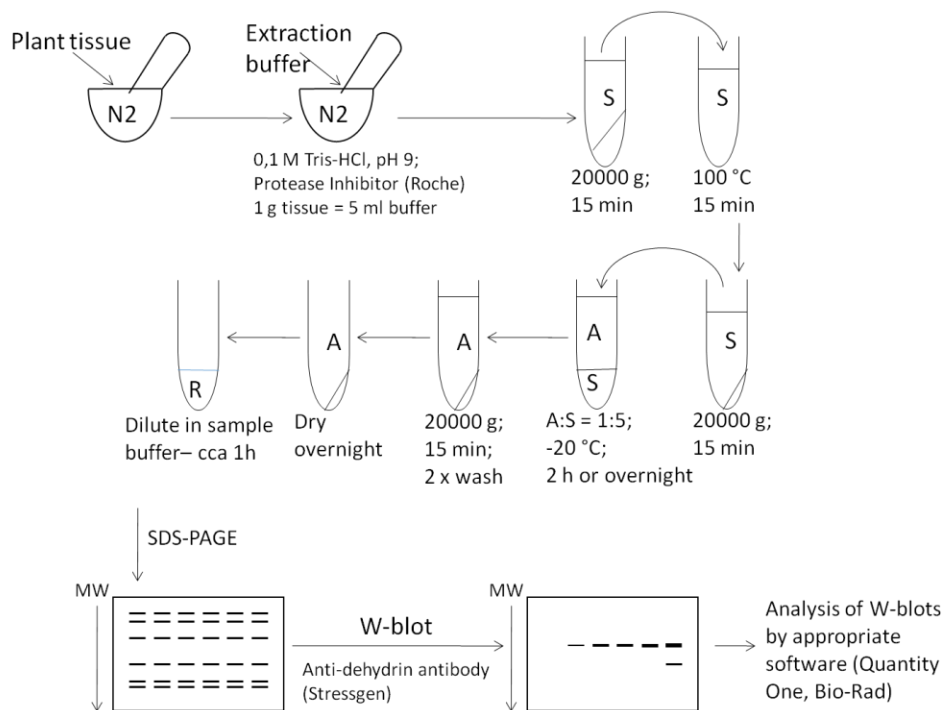
Méně odolný genotyp ozimé pšenice



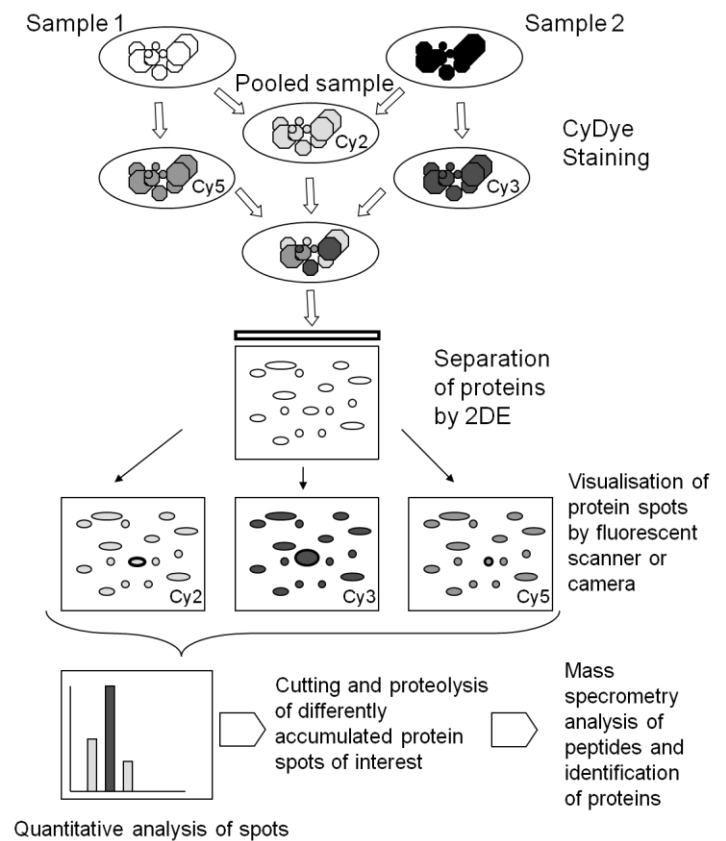


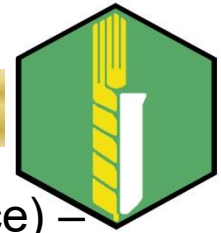
Nejvyžívanější proteomické postupy

Analýza dehydrinů



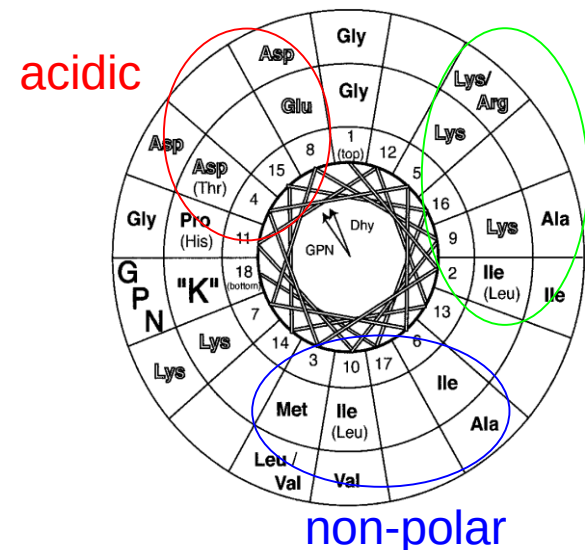
Analýza proteomu

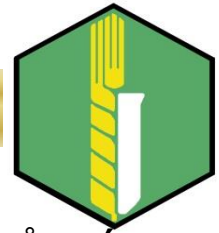




Dehydriny

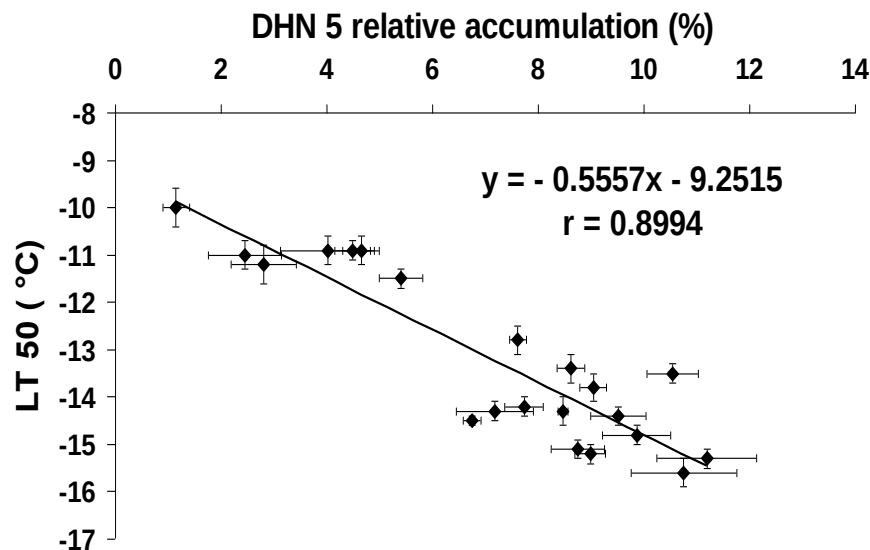
- LEA-II proteiny s min. jedním K-segmentem (lysin-bohatá sekvence) – konsensus pro angiospermní rostliny:
- „**EKKGIMDKIKEKLP**G“
- Primární struktura: Y-, S- a K-segmenty: Kn (bazické), SKn (kyselé), YxSKn, YxKn, KnS; + hydrofilní ϕ segmenty – odlišné vlastnosti a exprese – jeden rostlinný druh kóduje několik dehydrinových genů patřících k různým strukturním typům
- Sekundární a terciární struktura: vysoká hydrofilita molekul = tvorba intermolekulárních vodíkových můstků → hydratační obaly („water envelope“) = konformace tzv. „random coil“ = tzv. IDPs/IUPs; dehydratace → přesun od intermolekulárních vodíkových můstků k intramolekulárním **basic** → amfipatické α -helixy v oblasti K-segmentu
- → interakce částečně dehydratovaných molekul
- dehydrinů s membránami a dalšími amfipatickými
- povrchy



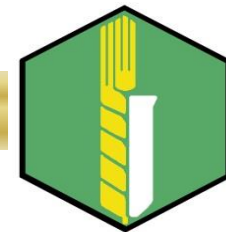


Dehydriny a abiotické stresy

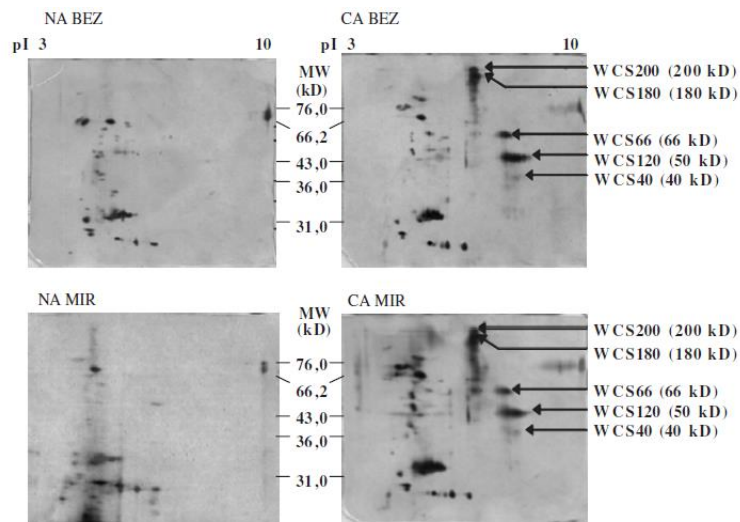
- Zvýšená exprese a akumulace dehydrinových proteinů v odezvě na různé abiotické stresy: nízká teplota, sucho, zasolení, mechanické poranění
- V některých případech zjištěna korelace mezi mírou odolnosti ke stresu a kvantitativní mírou exprese dehydrinových genů/kvantitativní mírou akumulace dehydrinových proteinů → dehydriny jako markery odolnosti vůči stresu
- Chladová aklimace obilnin: pšenice setá: WCS120 (Kn); ječmen setý: DHN5 (Kn) = korelace mezi dosaženou úrovní odolnosti definovanou jako LT50 a mezi kvantitativní mírou akumulace dehydrinových proteinů → dehydriny jako markery vhodné k identifikaci ozimů se zvýšenou mrazuvzdorností (LT50)



Kosová et al. (2008) *J Plant Physiol* 165:1142

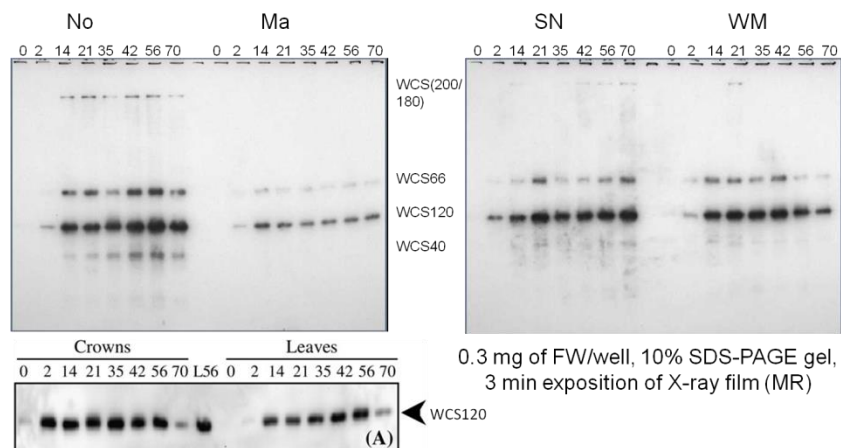


Dosažené výsledky - dehydriny:

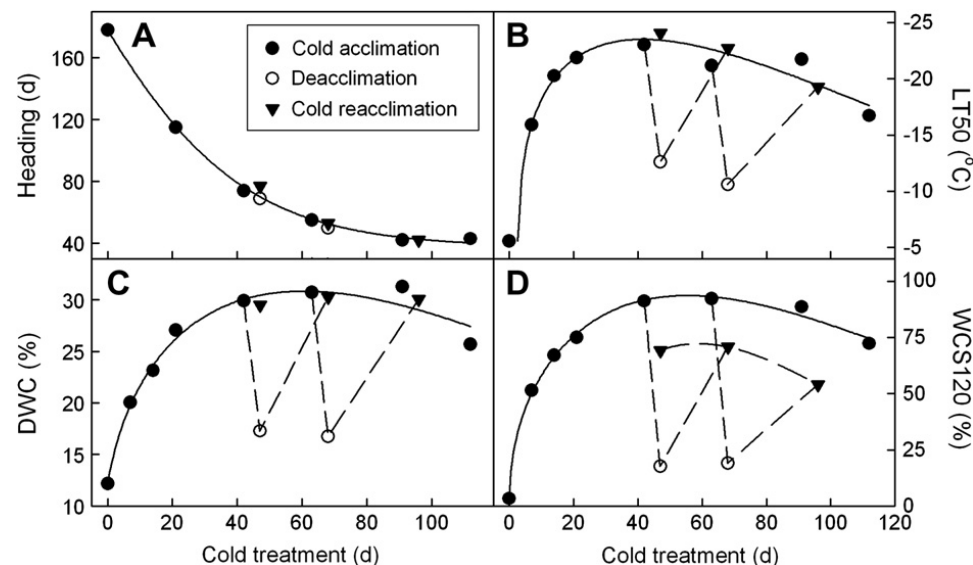


Protein	Integral density			
	Non-acclimated		Cold-acclimated	
	BEZ	MIR	BEZ	MIR
WCS 120	5.0a	7.8a	1220.0a	1734.5b
WCS 66	ND	ND	384.0a	692.7b
WCS 40	ND	ND	79.8a	102.1a
WCS 200	ND	ND	244.0a	288.7a
WCS 180	ND	ND	476.7a	412.5a
Suma	5.0a	7.8a	2404.5a	3231.5b

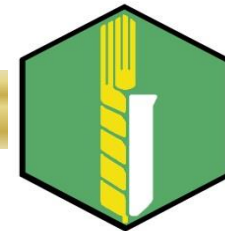
Vítámvás et al. 2007, J Plant Physiol 164: 1197—1207



Ganeshan et al. 2008, J Exp Bot 59 (9), 2393-2402



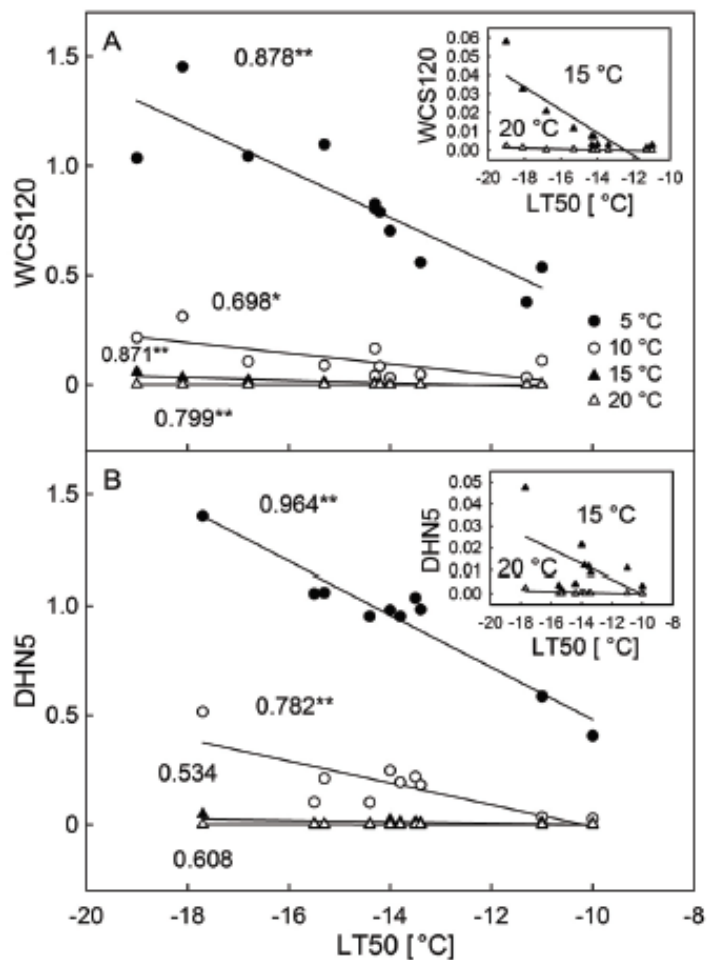
Vítámvás and Prášil 2008, Plant Physiol Biochem 46: 970—976



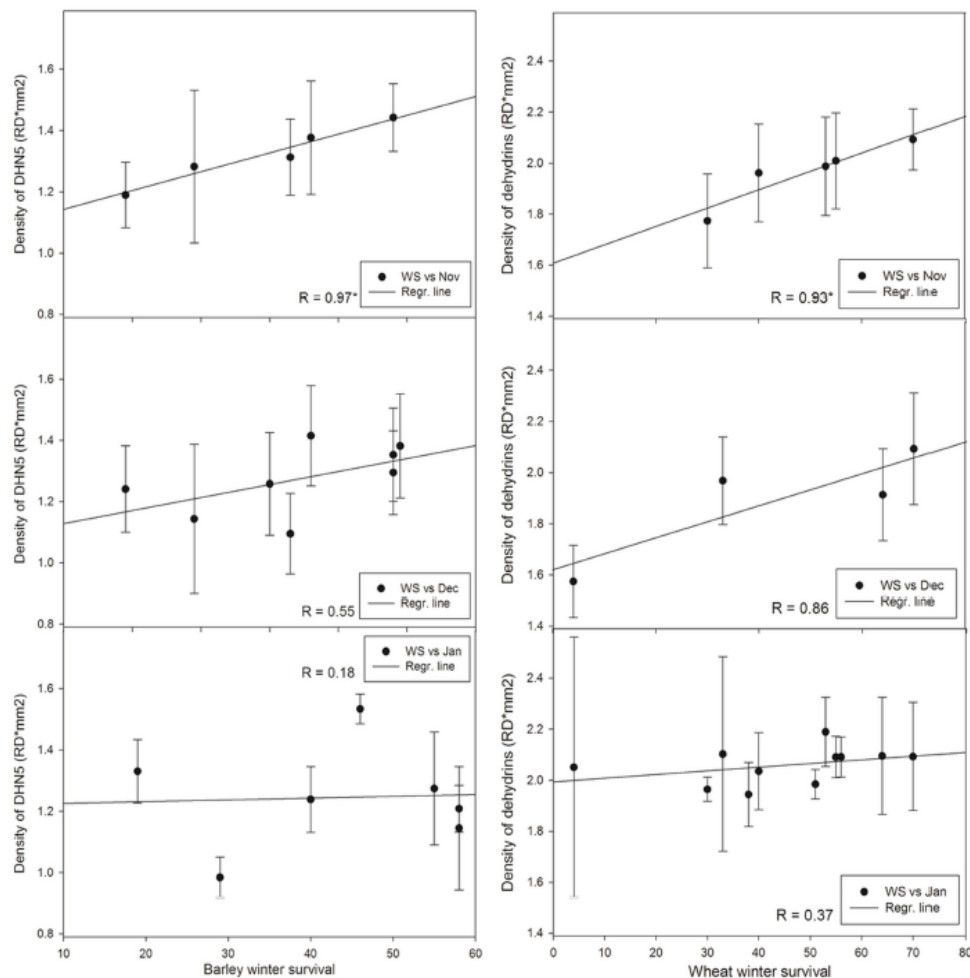
Dosažené výsledky - dehydriny:

Regulované podmínky: široká škála teplot od 5 do 20 °C

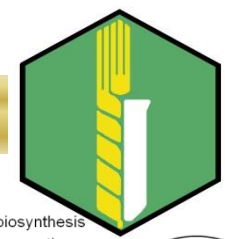
Polní podmínky: listopad, prosinec, leden



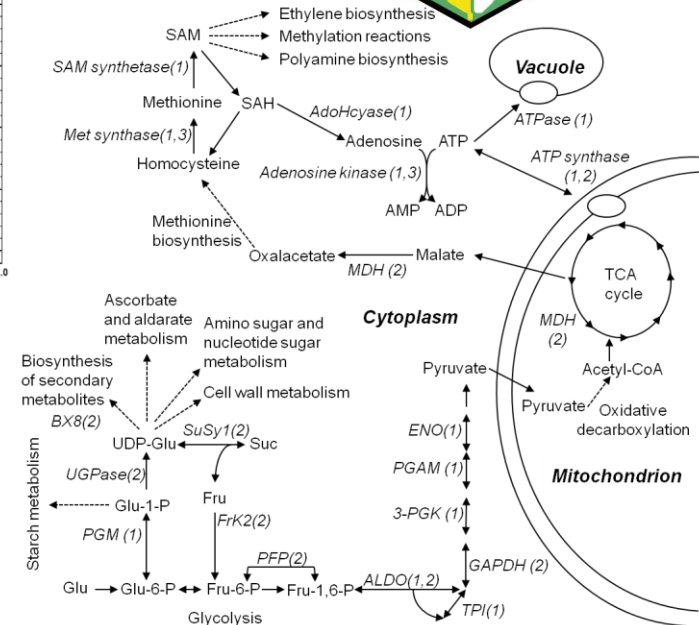
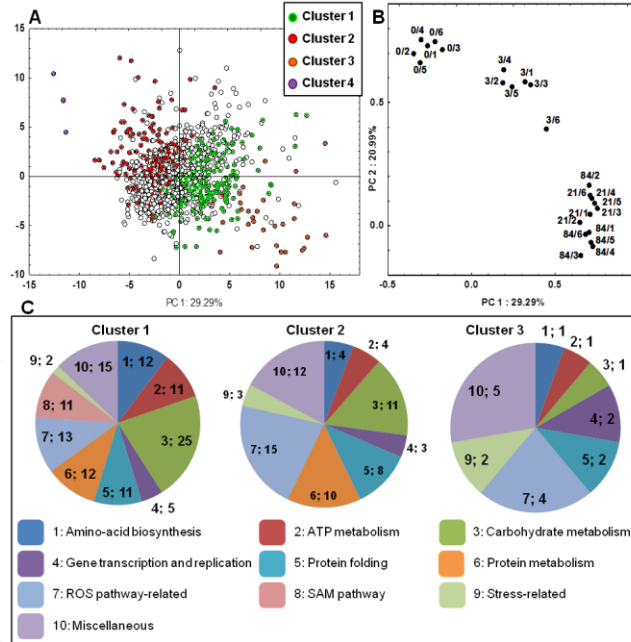
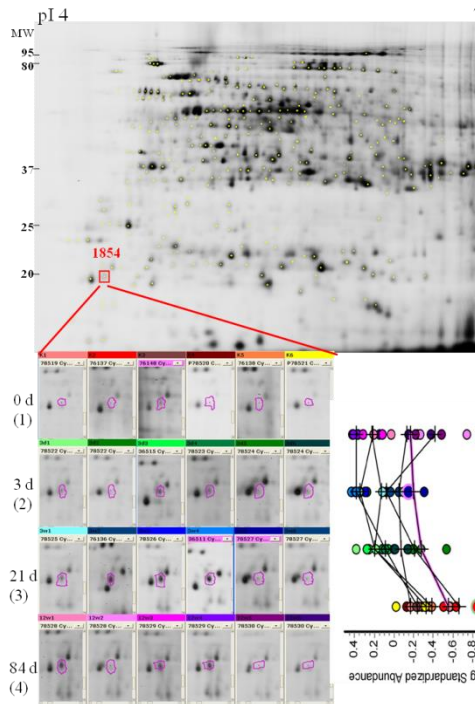
Kosová et al. (2013) Biol. Plant. 57:105-112



Vítámvás et al. (2019) Front. Plant Sci. 10:7



Dosažené výsledky – totální proteom, chladová aklimace



Changes in protein metabolism
(amino acid biosynthesis – M, S; protein biosynthesis – eIF3, eIF5A; protein degradation – ubiquitin E2 ligase, cystatin)

Increase in protective proteins (chaperones), stress- and defence-related proteins (HSP70, WCS120, thioredoxin-dependent peroxidase, thaumatin-like); enhanced ABA level, decrease in LT50

Wheat response to cold

Enhanced demands on energy metabolism

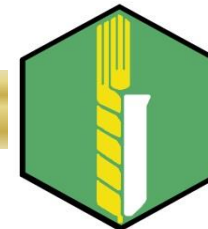
Changes in developmental and regulatory processes

Decrease of carbohydrate anabolism (starch biosynthesis), degradation of storage compounds

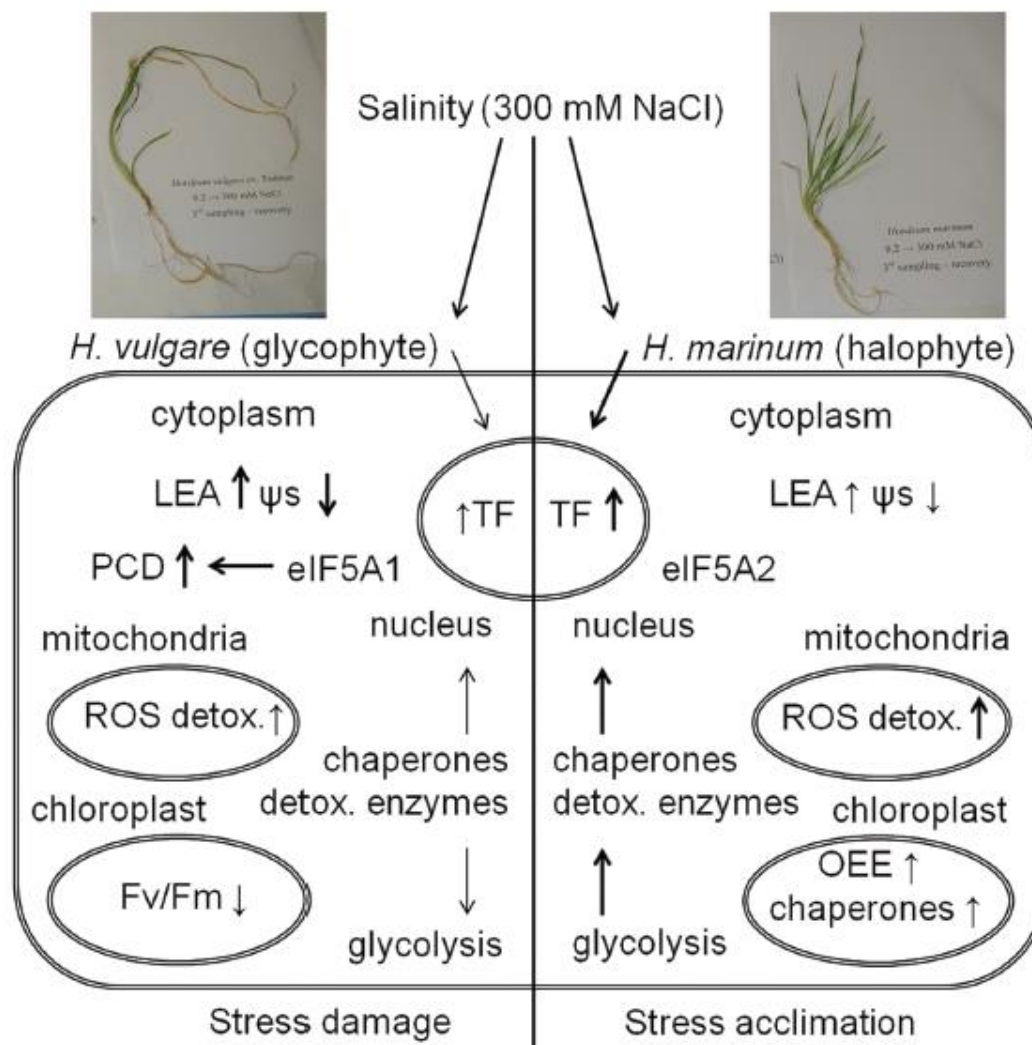
Increase of catabolic processes (glycolysis, ATP biosynthesis)

Winter growth habit: stress acclimation, growth cessation, maintenance of vegetative stage (germin E, VER2; high level of JA)

Spring growth habit: renewal of active growth and development, progression to reproductive stage (eIF5A2, GRP; high level of active CKs and GAs)

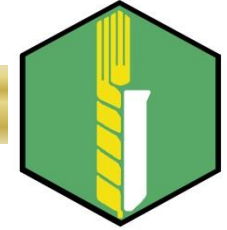


Dosažené výsledky – totální proteom, zasolení

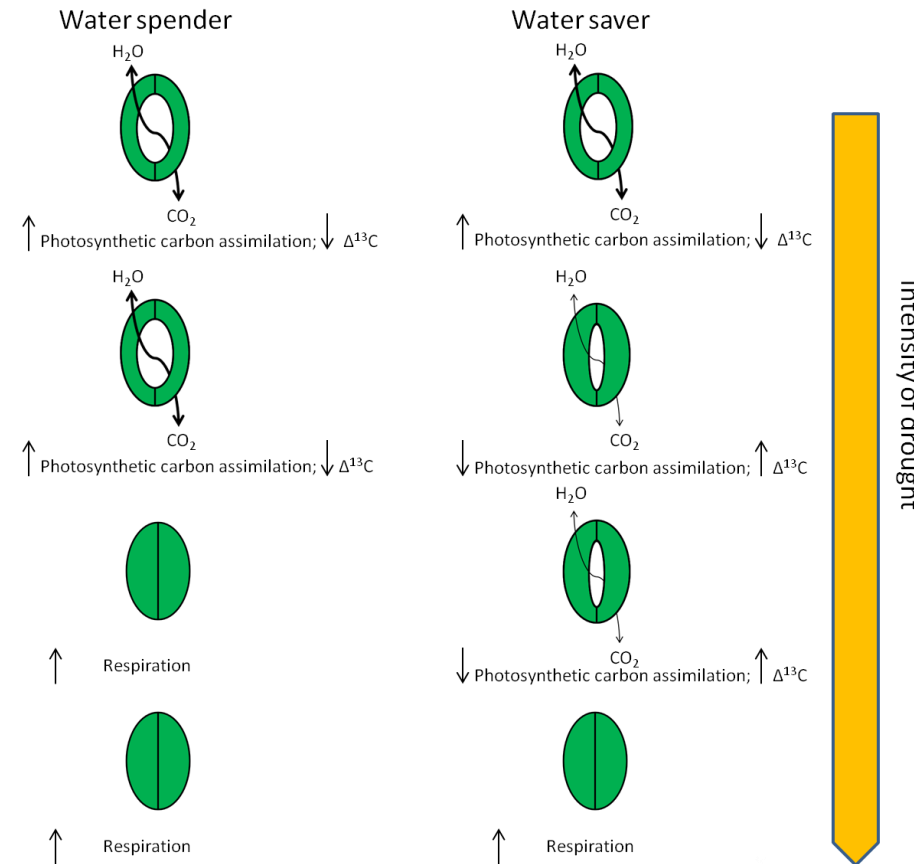
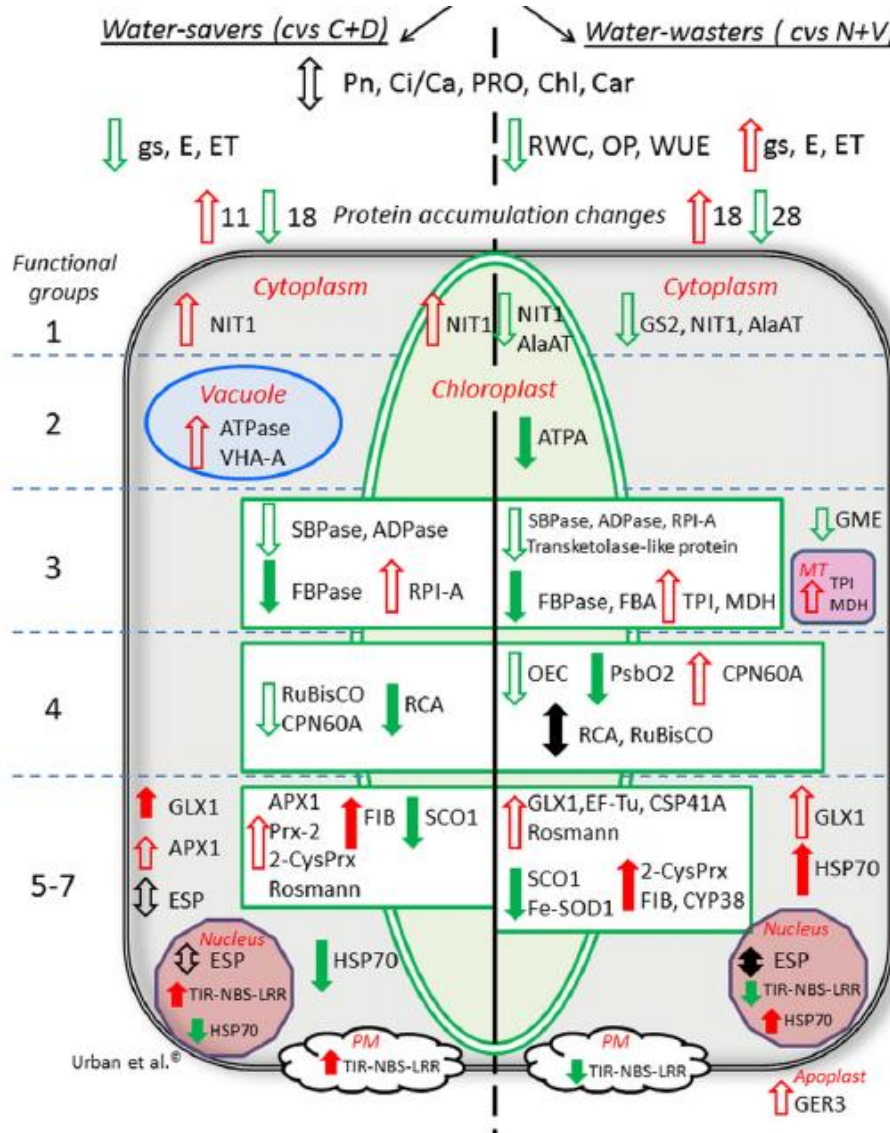


Maršálová et al. (2016)
Front. Plant Sci. 7:1154

Komparativní proteomika: Porovnání proteomické odezvy glykofytního kulturního ječmene *Hordeum vulgare* cv. Tadmor a planého halofytního ječmene *H. marinum* na vysokou úroveň zasolení 300 mM NaCl ukazuje stresovou aklimaci u halofytu, zatímco poškození u glykofytu.



Dosažené výsledky – totální proteom, sucho



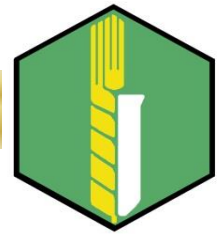
Kosová et al. 2019, J. Exp. Bot.



Shrnutí:

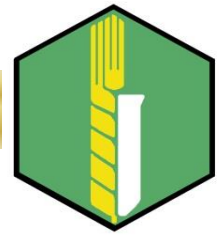
- Studium proteomické odezvy rostlin (plodin) na environmentální stresy představuje nikdy nekončící výzvu díky vysoké plasticitě proteomu v odezvě na vnější i vnitřní podněty.
- Jeden genom dá během života jedince vzniknout nekonečnému množství proteomů.
- Kvalita popisu proteomu závisí na kvalitě sekvenace genomu a možnostech instrumentálních metod pro vysokoúčinnou separaci a identifikaci proteinů.
- Cílem proteomiky však není pouze deskriptivní proteomika, tj. identifikace proteinů extrahovaných z daného proteomu, ale funkční proteomika, tj. charakterizace biologické funkce daného proteinu v daném organismu.
- Biologická funkce proteinu nezávisí pouze na jeho primární sekvenci, ale je rovněž výsledkem celkové konformace proteinu (protein folding), PTMs, tvorby proteinových komplexů, subcelulární lokalizace a interakcí daného proteinu s dalšími proteiny i neproteinovými molekulami (interaktomika).

Shrnutí



- Komparativní proteomické studie zaměřené na identifikaci DAPs vedou k identifikaci klíčových proteinů (a s nimi spojených klíčových biologických procesů) spojených s rozdílnou odezvou a odolností genotypů na stres
- Po identifikaci DAPs by měla následovat validace získaných dat a funkční studie, jelikož určitý protein může mít různé biologické funkce závislé na své isoformě/posttranslační modifikaci, buněčné lokalizaci, a interakci s dalšími proteiny i neproteinovými molekulami.

- Tým laboratoře stresové biologie



Výzkumný tým laboratoře stresové biologie a biotechnologie ve VÚRV, v.v.i.:

- Ing. Miroslav Klíma, Ph.D. – vedoucí týmu
- Mgr. Pavel Vítámvás, Ph.D. – vedoucí proteomické laboratoře
- RNDr. Klára Kosová, Ph.D. – samostatný vědecký pracovník
- RNDr. Ilja Tom Prášil, CSc. – samostatný vědecký pracovník
- Ing. Jana Musilová – vědecko-technický pracovník zabývající se přezimováním rostlin a polně-laboratorními testy zimovzdornosti
- Techničtí pracovníci:
 - Bc. Petra Bartošová, Mgr. Zdeněk Cit, Ing. Marie Coufová, Václava Střesková
- Studenti:
 - Ing. Tereza Bláhová – Ph.D. (VŠCHT Praha), Mgr. Hana Marková – Ph.D. (Přf-UK Praha)
 - Simona Bellová – Bc. (VŠCHT Praha), Bc. Barbora Nezbedová – Ing. (ČZU Praha)

Projekt QK1710302: Zvýšení odolnosti pšeníc vůči suchu, mrazu, padlí a fuzariózám klasu pomocí metod genomiky a proteomiky

VÚRV, v.v.i., Odpovědný řešitel: Mgr. Pavel Vítámvás, Ph.D.; Agrotest fyto s.r.o., Řešitel: Doc. Ing. Antonín Dreiseitl, CSc.; SELGEN, a.s. Řešitel: Ing. Ondřej Veškrna, Ph.D.; Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Řešitel: Prof. Ing. Jaroslav Doležel, DrSc.

Doba řešení: od 02/2017 do 12/2021

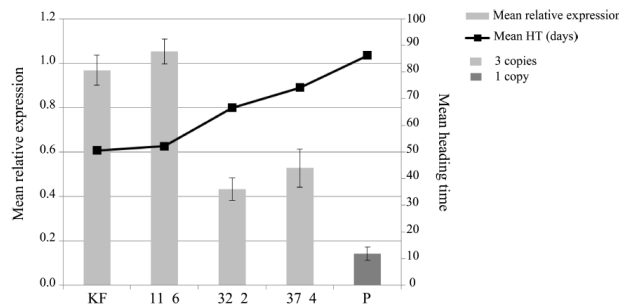
1	Pšenice - kolekce 2017 podzim				
2	Název	země původu	TYP	zdroj osiva	ozn
3	Angelus		OP	Družina Dačice	CULTIVAR
4	Apanage	FRA	OP	Florimond Desprez	CULTIVAR
5	Arktis		OP	Družina Dačice	CULTIVAR
6	Bekend		OP	Družina Dačice	CULTIVAR
7	Bienfait	FRA	OP	Florimond Desprez	CULTIVAR



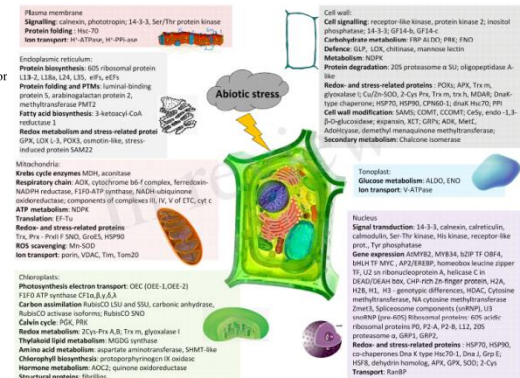
Vybráno a vyseto 452 odrůd a krajových linií pro fenotypování (provokační testy, stanovení fyziologických parametrů) a molekulární analýzy (DART Seq, 2D-DIGE). Probíhá fenotypizování pšeníc vystavených abiotickým a biotickým stresům.



Jednotlivé frakce zrn po umělé infekci *Fusarium culmorum* podle poškození



Transkripce Ppd-B1 alel ve vybraných genotypech



Kosová et al., 2018, Front. Plant Sci. 9: 122

Projekt QK1710302: Zvýšení odolnosti pšenic vůči suchu, mrazu, padlí a fuzariózám klasu pomocí metod genomiky a proteomiky

Náplň projektu:

- Vytvoření souboru 540 odlišných genotypů pšenic pro genotypovací (mapovací) a fenotypovací analýzy zaměřené na identifikaci lokusů podmiňujících rozdíly v odolnosti vůči mrazu, suchu, klasovým fusariosám, padlí
- GWAS analýza SNP markerů (ÚEB AV ČR Olomouc)
- Fenotypování:
 - Hodnocení odolnosti vůči mrazu („bedýnkové pokusy“) (Ing. J. Musilová a RNDr. Prášil, VÚRV Praha-Ruzyně)
 - Hodnocení odolnosti vůči suchu (regulované podmínky, regulovaná zálivka) (Dr. Kosová a Dr. Vítámvás, VÚRV Praha-Ruzyně)
 - Hodnocení vůči klasovým fusariosám (polní pokus) (Ing. J. Chrpová, VÚRV Praha-Ruzyně)
 - Hodnocení odolnosti vůči padlí (doc. A. Dreiseitl, Agrotest-Fyto, Kroměříž)

