



## Podobny do katalazy gen *Pharbitis nil* ulega podwyższonej ekspresji u roślin uprawianych na świetle ciągłym

Grażyna Dąbrowska<sup>1</sup>, Justyna Veit<sup>1</sup>, Anna Goc<sup>1</sup>, Andrzej Tretyn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Genetyki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

<sup>2</sup>Zakład Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

### Expression of the *Pharbitis nil* catalase-like gene is elevated in plants growing under continuous light conditions

#### Summary

The *Pharbitis nil* cDNA about 165 bp was identified by differential display method. Screening of the *P. nil* cDNA library allowed to find homologous clone PnCAT-L 985 bp in length. Sequence analysis of *P. nil* cDNA indicated that the identified clone has 81% homology to *Zea mays* and *Campylobacter jejuni* catalase genes. The expression of the catalase-like gene is elevated in cotyledons of *P. nil* plants cultivated under continuous light conditions.

#### Key words:

catalase, differential display, *Pharbitis nil*.

### 1. Wstęp

Indukcja kwitnienia badana jest głównie u tych roślin, u których jest ona kontrolowana przez czynniki zewnętrzne dające się regulować. Fotoperiodyzm, czyli reakcja na czas trwania i periodyczne następstwo w czasie okresów światła i ciemności w ciągu doby, jest jednym z głównych czynników tego typu (1).

Zjawisko fotoperiodyzmu występuje nie tylko u roślin, lecz również u wielu zwierząt, jest ono szeroko rozpowszechnionym mechanizmem okresowej regulacji procesów biologicznych, a zwłaszcza procesów rozmnażania. Aczkolwiek fotoperiodyzm

#### Adres do korespondencji

Grażyna Dąbrowska,  
Pracownia Genetyki,  
Uniwersytet Mikołaja  
Kopernika,  
ul. Gagarina 9,  
87-100 Toruń.

#### biotechnologia

2 (65) 61–66 2004

wykryto dzięki jego powiązaniu z kwitnieniem, kontroluje on również inne procesy życiowe roślin, nawet jeśli nie wpływa na kwitnienie (1).

Obiektem prezentowanych badań jest *Pharbitis nil*, roślina dnia krótkiego (2), u której jeden cykl o krótkim dniu może doprowadzić do kwitnienia roślin pozostających następnie w warunkach nieindukującego długiego dnia.

W przedstawionej pracy DNA produktu różnicowego uzyskanego (3) metodą różnicowego profilowania ekspresji genów (*differential display*) (4,5) posłużyło do zidentyfikowania genu *P. nil* ulegającego podwyższonej ekspresji u roślin nieindukowanych do kwitnienia. Sprawdzone również poziomy ekspresji znalezionej genu w liściach roślin uprawianych w różnych warunkach fotoperiodycznych.

## 2. Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły siewki uzyskane z nasion *Pharbitis nil* (*Convolvulus nil* L., *Ipomea nil* Roth., *Convolvulaceae*), odmiany Violet, rośliny dnia krótkiego oraz kalusy uzyskane z liści siewek *P. nil* indukowanych do kwitnienia oraz kontrolnych (3).

Rośliny uprawiano przez 5 dni w temperaturze 26°C w warunkach nieindukcyjnych – na świetle ciągłym. Po tym okresie pozostawiano na świetle część roślin jako kontrolę (K), pozostałe przenoszono do ciemni, gdzie rosły w warunkach indukcyjnej 16-godzinnej nocy (próby oznaczone I). Następnie zbierano liście z wszystkich roślin (K, I), umieszczano je natychmiast w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

### 2.1. Izolacja całkowitego RNA

RNA z liści *Pharbitis nil* wyizolowano zgodnie z protokołem TRI-Reagent firmy MRC (6). Uzyskane RNA traktowano DNazą wolną od RNaz (Promega) oraz sprawdzano elektroforetycznie w denaturującym żelu agarozowym.

### 2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy – PCR

W celu zamplifikowania produktu RT przeprowadzono reakcję PCR używając polimerazy Taq (PolGen) i starterów: TOR5 – (5'T<sub>12</sub>MG 3'), gdzie M oznacza mieszaninę A,C,G i TOR4 – (5'GATCCAGATC3"). Reakcję PCR prowadzono przez 40 cykli w następujących warunkach: 94°C – 15 s, 42°C – 1 min, 72°C – 30 s.



### 2.3. Przeszukiwanie biblioteki

Bibliotekę cDNA utworzoną z mRNA liścieni zaindukowanych do kwitnienia (7) przeszukiwano metodą hybrydyzacji kolonijnej (8) z użyciem izotopowo znakowanego 165 pz fragmentu cDNA *P. nil*.

### 2.4. Hybrydyzacja testem kropkowym (*dot-blot*)

RNA wyizolowane z roślin uprawianych w porównywanych warunkach fotoperiodycznych denaturowano i nanoszono na membranę nylonową (Sigma). Hybrydyzację prowadzono z sondą *PnCAT-L* wyznakowaną radioizotopowo (8).

Sekwencjonowanie zamplifikowanego klonu cDNA wykonano w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów IBB w Warszawie.

## 3. Wyniki i dyskusja

Porównując populację mRNA otrzymanego z tkanek kalusowych uzyskanych z liścieni *P. nil* zaindukowanych i nieindukowanych do kwitnienia metodą różnicowego profilowania ekspresji genów, zidentyfikowano fragment cDNA wielkości 165 pz (3). W pierwszym etapie badań namnożono DNA produktu różnicowego wielkości 165 pz, charakterystycznego dla tkanki kalusowej pochodzącej z liścieni roślin hodowanych na świetle ciągłym (fot. 1). Zamplifikowane DNA prążka różnicowego użyto do przeszukania biblioteki cDNA *P. nil*. Po przeszukaniu biblioteki cDNA roślin indukowanych do kwitnienia otrzymano klon zawierający fragment cDNA długości ok. 1000 pz. Klon nazwano *PnCAT-L*. Odczyt sekwencji wysokiej jakości zakończył się na 985 nukleotydzie. Porównanie z użyciem programu BLAST sekwencji klonu *PnCAT-L* z danymi zawartymi w banku NCBI wykazało, że największą homologię na poziomie sekwencji aminokwasowej klon *P. nil* wykazuje do białka katalazy pochodzącej z *Campylobacter jejuni* i enzymu CAT2 z *Zea mays* (rys. 1). Homologia dla obu porównań wynosi 81% na odcinku 16 aminokwasów. Nie jest to, jak się wydaje, odcinek znaczący, ale dalsze przeszukiwanie baz danych pozwoliło zakwalifikować sekwencję uzyskanego klonu jako fragment cDNA genu *P. nil* kodującego katalazę (dane nie pokazane).

Porównanie programem ClustalW (NCBI) sekwencji klonu *PnCAT-L* z sekwencją katalazy *Danio rerio* (gi|29001145) pokazało istnienie ich dużego podobieństwa na poziomie nukleotydowym. Stwierdzono homologię na odcinku 69 pz (od 353 do 421 nukleotydu cDNA *P. nil*) (rys. 1).

M 1 2 3



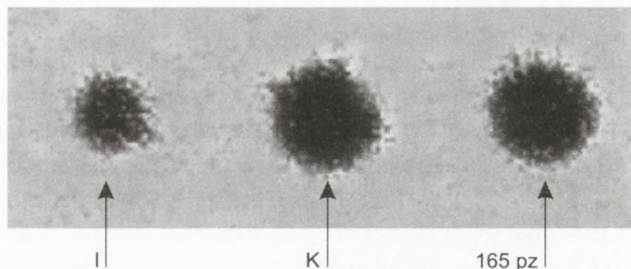
Fot. 1. Zdjęcie w świetle UV produktów re-PCR rozdzielonych w 2,5% żelu agarozowym. Poszczególne ścieżki żelu zawierają: M – DNA pBR332 trawione MspI, 1, 2, 3 – produkty reamplifikacji DNA prążka różnicowego na matrycy odpowiednio 1; 1,5; 2 µl eluatu. Jedynie ścieżka nr 3 zawiera specyficzny produkt reakcji re-PCR. Produkt ten wyeluowano z żelu za pomocą zestawu QIAquick (Qiagen).

<i>D. rerio</i>	-----AACAAATTCACACTGGAACAGC--TATGACCATGATT--ACGAATTCGAGCTC	50
<i>P. nil</i>	TCCCGGNGTTATCCCCTNTGGGAATACCCGTATNNCCNCCTTTGGAGGGAGCTGATNCN	240
	* * * * *	
<i>D. rerio</i>	GTACCCGGGATCCT----GTAGAGACTCA----TTAGGCACCCAGGCTTTACA----C	97
<i>P. nil</i>	GNTCCCCCACCAGCGGACGGGCCCCAGCGATTCAATTGAGCCGAGGAANCNGNAAGGCN	300
	* * * * *	
<i>D. rerio</i>	TTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATCAGCT---GGCAGCAG	153
<i>P. nil</i>	CCCCAAAACNCAACCCGCTTNTCCCGGGGTTGGCNGATTTCATTAATNCAGTGGCAGCAG	360
	* * * * *	
<i>D. rerio</i>	-AGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAA-CGCAATTAATGTGAGTTAGCTCA	211
<i>P. nil</i>	CAGTTTTCCCGACTGNAAGCGGCCAGTGGGCGCAAACNCAATTAATGTGAGTTAGCTCA	420
	* * * * *	
<i>D. rerio</i>	AAGGAA-AACCACCCTGGCGCCAATACGCCAACCCCTTCTCCCGCGCGTGTGGCCGAT	270
<i>P. nil</i>	ACTCATTAGGCACCCAG-GCTTAACACTTAATGCTTCCGGNTCGTATGTTGTGGAAT	479
	* * * * *	
<i>D. rerio</i>	TCAATTAATGTGCCAACTTCTTTTCAAGGGCCAGGGGTGAAAGGGCAATCAGCTGTT	330
<i>P. nil</i>	TGTGAGCGGATAACCAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCCATGATTA--CGCCAAGC	537
	* * * * *	
<i>D. rerio</i>	GCCCGTTTCAACTT-GGTGAAAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTTGCTTGGGGCC-	388
<i>P. nil</i>	GCGCAATTAACCTTCAACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCCGCGGTGGCGGCCG	597
	* * * * *	
<i>D. rerio</i>	----AAAACCAGCTGGACCGCTG-----	409
<i>P. nil</i>	CTCTAGAACTAG--TGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCAGGAGCTGGGTTATGTA	655
	* * * * *	

Rys. 1. Wynik porównania sekwencji *PnCAT-L* i sekwencji kodującej katalazę *D. rerio*. Niebieski kolor gwiazdek wyznacza obszar największego podobieństwa sekwencji nukleotydowej. Kolorem czerwonym oznaczono fragment sekwencji *P. nil* wykazujący na poziomie aminokwasowym 81% homologię do katalaz *Z. mays* i *Campylobacter jejuni*.

Na podstawie przeprowadzonej analizy *dot-blot* typu Northern, potwierdzono różnicowy charakter ekspresji genu zawierającego fragment cDNA wielkości 165 pz. Ulega on silniejszej ekspresji u roślin nieindukowanych (hodowanych na świetle ciągłym) i słabszej ekspresji u roślin zaindukowanych do kwitnienia 16-godzinnym okresem ciemności (fot. 2). Wynik ten nasuwa przypuszczenie, że gen *PnCAT-L* nie uczestniczy w indukcji kwitnienia, choć jego ekspresja jest regulowana światłem.





Fot. 2. Autoradiogram hybrydyzacji Northern metodą testu kropkowego z zastosowaniem produktu różnicowego jako sondy. Na błonę naniesiono ok. 20 µg całkowitego RNA wyizolowanego z roślin indukowanych (I) i z roślin nieindukowanych (K). Jako kontrolę pozytywną hybrydyzacji na błonę naniesiono DNA sondy molekularnej (165 pz).

Katalaza znajduje się w dużych ilościach w peroksysomach, które zawierają oksydoreduktazy, a wśród nich enzymy metabolizmu nadtlenu wodoru. Nadtlenek wodoru tworzy się w peroksysomach podczas częściowej oksydacji długich kwasów tłuszczowych ( $\beta$ -oksydacji) i dezaminacji oksydacyjnej. Rośliny wytwarzają też nadtlenek wodoru w procesie fotorespiracji (fotooddychania). Na podstawie niektórych teorii uważa się, że proces fotooddychania chroni rośliny przed fotooksydacyjnymi uszkodzeniami, gdy światło jest zbyt silne, a poziom  $\text{CO}_2$  zbyt niski.

Coraz częściej uważa się, że katalaza pełni wielorakie role w różnorodnych tkankach roślinnych na różnych stopniach ich rozwoju (9). U zwierząt występuje zasadniczo jeden gen katalazy – wyjątkiem jest nicieniek *Ceanorhabditis elegans* posiadający dwa różne geny, kodujące dwie odrębne katalazy (10). Natomiast rośliny posiadają przeważnie liczne izoenzymy katalaz kodowane przez rodziny genów. Opisano rodziny genów katalazy fasoli (11) i kukurydzy (12). U *A. thaliana* odkryto trzy geny (CAT1, CAT2, CAT3) kodujące co najmniej sześć izoenzymów katalazy. Ilość mRNA dla CAT1 i CAT2 rośnie po ekspozycji roślin na światło, przy czym indukcja świetlna powoduje silniejszą ekspresję CAT2 (13). Kukurydza zawiera dwa typy katalaz: indukowaną (CAT1 i CAT2) i hamowaną przez światło (CAT3). Także u *O. sativa* występują trzy katalazy: *CatA*, *CatB* i *CatC*. Podobnie jak u innych roślin, katalazy ryżu także ulegają tkankowo i rozwojowo zróżnicowanej ekspresji. U dojrzałych roślin *CatA* ulega ekspresji głównie w kwiatach i w blaszkach liściowych (14). Stwierdzono, że aktywność białka CAT3 kukurydzy jest związana z rozkładem nadtlenu wodoru produkowanego w mitochondriach w okresie ciemnym fotoperiodu (15). Postuluje się zatem, że jego ortolog u ryżu pełni podobną funkcję (14). *CatC* ryżu wykazuje podobny wzorzec ekspresji jak CAT2 kukurydzy. Obie te katalazy mają też najprawdopodobniej zbliżone funkcje. Z porównania sekwencji cDNA klonu *PnCAT-L* z danymi Banku Genów (NCBI) wynika, że wykazuje on podobieństwo do katalazy CAT2 kukurydzy. *PnCAT-L* jest odpowiednikiem *CatC* ryżu, a zatem również ortologiem CAT2 kukurydzy i rzodkiewnika. Gen kodujący *PnCAT-L*, jak się wydaje, ulega zwiększonej ekspresji w roślinach uprawianych na ciągłym nieindukcyjnym świetle

białym. *PnCAT-L* byłby zatem, podobnie jak *CAT2* kukurydzy, fotoindukowaną katalazą. Fragment różnicowy ~165 pz namnożono na cDNA pochodzącym z liścieni, również uzyskany dzięki niemu klon pochodził z biblioteki cDNA utworzonej z mRNA z liścieni. Ponieważ *CatC* ryżu (jako jedyna katalaza *O. sativa*) w siewkach ulega silnej ekspresji w liściach, następnym planowanym krokiem w badaniach nad katalazą *P. nil* będzie sprawdzenie czy wzorzec jej ekspresji w liściach jest podobny jak w liścieniach. W celu dokładnego poznania i scharakteryzowania *CAT P. nil* planuje się także zanalizowanie wzorca ekspresji tego genu w różnych warunkach fotoperiodycznych i poszczególnych organach rośliny. Pozwoli to być może na stwierdzenie, czy znaleziony gen *P. nil* jest rzeczywiście odpowiednikiem genów kodujących *CatC O. sativa* i *CAT2 Z. mays*.

### Skróty:

NCBI – National Center for Biotechnology Information, *PnCAT-L* – *Pharbitis nil catalase-like*, RT – odwrotna transkrypcja.

### Literatura

1. Hillman W. S., (1970), *Fizjologia kwitnienia*, PWRiL, Warszawa, 21-36.
2. Imamura S., Takimoto A., (1956), *Bot. Mag. Tokyo.*, 69, 353-358.
3. Szypl I., Dąbrowska G., Tretyn A., (2001), *Biotechnologia*, 2, 165-169.
4. Liang P., Pardee A. B., (1992), *Science*, 257, 967-971.
5. Dąbrowska D., (2001), *Biotechnologia*, 3, 124-133.
6. Chomczyński P., (1993), *BioTechniques*, 15, 312-318.
7. Wojciechowski W., (2002), *Aktywność homologów znanych genów czynników regulatorowych oraz białek jądrowych w fotoperiodycznej indukcji kwitnienia P. nil.*, rozprawa doktorska, Toruń.
8. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 10.38-10.40.
9. McClung C. R., (1997), *Free Radic. Biol. Med.*, 23, 489-496.
10. Taub J. J., Rothblatt J. A., (1995), *Mol. Biol. Cell*, 6, Suppl. 107.
11. Suzuki M., Ario T., Hattori T., Nakamura K., Asahi T., (1994), *Plant. Mol. Biol.*, 25, 507-516.
12. Scandalios J. G., (1992), *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems.*, Ed. J.G. Scandalios, Plinview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 117-135.
13. Zhong H. H., McClung C. R., (1996), *Mol. Gen. Genet.*, 251, 196-203.
14. Iwamoto M., Higo H., Higo K., (2000), *Plant Sci.*, 151, 39-46.
15. Scandalios J. G., Tong W. F., Roupakias D. G., (1980), *Mol. Gen. Genet.*, 179, 33-41.