

Arabidopsis thaliana defensīniem līdzīgo peptīdu analīze

Defensīni ir maza izmēra proteīni, kas parasti sastāv no 18-45 aminoskābēm. Defensīniem raksturīga strukturālā iezīme ir liels cisteīnu (aminoskābe) skaits molekulā. Šie proteīni ir atrodamī gan dzīvniekos, gan augos, un to galvenā funkcija ir imūnā aizsardzība, kas arī ir par iemeslu šo molekulu nosaukumam (*defence* no angļu val. aizstāvēšana, aizsardzība). Izteiktu aktivitāti defensīni izrāda cīņā pret baktērijām, sēnītēm un vīrusiem, pie kuru ārējām membrānām tie saistās, izveidojot porām līdzīgus caurumus, kas nodrošina nekontrolētu jonu un barības vielu plūsmu, kas noved pie patogēnu bojāejas.

Fakts, ka defensīni ir atrodamī gan dzīvnieku, gan augu valsts organismos, liecina par to, ka tie ir parādījušies ārkārtīgi sen. Visticamāk evolūcijas ceļā tos ieguva kāds kopīgs sencis, vēl pirms dzīvība nošķīrās florā un faunā. Laika gaitā defensīni ir ieguvuši papildus funkcijas, kas nav saistītas ar aizsardzību pret patogēniem. Tas skaidrojams ar šo molekulu seno izcelsmi un vienkāršo strukturālo uzbūvi, kas ir ievērojami palīdzējusi pielāgoties jaunajām vajadzībām, kuras radās laika gaitā, dzīvājiem organismiem kļūstot arvien sarežģītākiem.

Lai gan dzīvnieku valstī atrodamie defensīni ir plaši pētīti un galvenokārt nodrošina aizsardzību pret dažādākajām baktērijām, augos atrodamie defensīniem līdzīgie peptīdi ir maz pētīti, un to potenciālais ieguldījums lauksaimniecībā vēl nav pilnībā aptverts. Ir zināms, ka augu defensīni galvenokārt cīnās ar dažādu sēnīšu infekcijām, bet tā kā tiek atrasti arvien jauni peptīdi, kas strukturāli līdzinās defensīniem un kuru reālā funkcija augos vēl nav noskaidrota, tos mēdz dēvēt par defensīniem līdzīgiem peptīdiem (DLP).

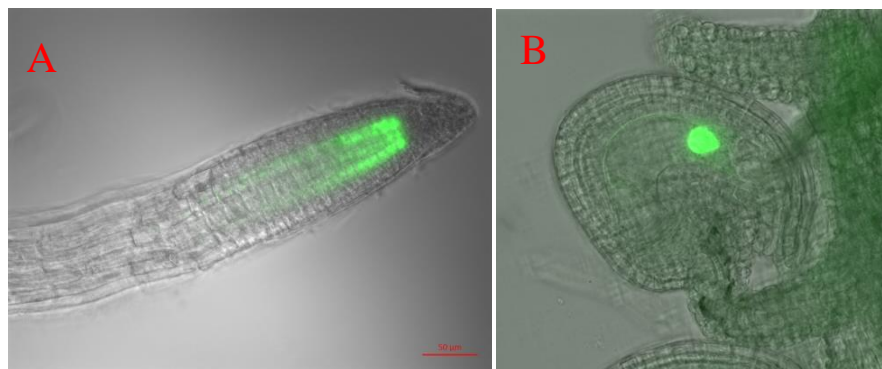
Šajā pētījumā mēs apskatījām vairākus, līdz šim neanalizētus DLP, kuri bija atrodamī augā *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis thaliana* bioloģijā tiek izmantots kā modeļorganisms, jo tā genoms, salīdzinot ar kultūraugiem, ir ārkārtīgi mazs, tādējādi atvieglojot konkrētu gēnu izpēti un funkcionālo analīzi (*A. thaliana* genoms ir 135 milj. bāzu pāru liels, kamēr, piemēram, mīksto kviešu genoms ir ~17 000 milj. bāzu pāru jeb 126 reizes lielāks). *Arabidopsis thaliana* kopumā ir atrasti vismaz 300 gēnu, kuri ekspresē DLP. Mūsu pētījumā sākotnēji tika izvēlēti ap 30 peptīdu, kuri uzrādīja aktivitātes izmaiņas gan patogēna klātbūtnē, gan augu apputeksnēšanās un apaugļošanās laikā. Izmaiņas aktivitātē tika noteiktas vērojot attiecīgo peptīdu kodējošo gēnu ekspresijas izmaiņas, ko veica ar RNS sekvencēšanas metodi. Lai ģenētiskā DNS informācija tiktu ekspresēta gatavā proteīnā, šūna to sākumā transkriptē uz RNS, tāpēc, izmantojot RNS sekvencēšanu, ir iespējams noteikt, kurus peptīdus un kādā apjomā šūna plāno sintezēt, vēl pirms to ekspresija ir pilnībā pabeigta. Tomēr, izmantojot šo metodi, nav iespējams noteikt konkrētu vietu augā, kur šie peptīdi tiek sintezēti.

Sākotnēji izvēlētie peptīdi tika izmantoti, lai izveidotu 30 ģenētiski modificētas DNS sekvences. Katra no šīm unikālajām sekvencēm sevī ietvēra izvēlēta peptīda un fluorescējošā proteīna GFP (no angļu val. *green fluorescence protein*) gēnu. Šādā veidā tika nodrošināts vizuāls marķieris, kurš UV gaismā spīdētu spilgti zaļā krāsā, tādējādi

norādot uz vietu augā, kurā attiecīgais DLP gēns tiek ekspresēts. Jaunizveidotās 30 sekvenču tika ievietotas katra atsevišķā *Arabidopsis thaliana* augā, izmantojot *Agrobacterium* ģenētiskās transformācijas metodi, kuras princips ir ģenētiskās sekvenču ievietošana augsnes baktērijās *Agrobacterium tumefaciens* un augu inficēšana ar šīm transformētajām baktērijām. Šīs baktērijas, inficējot augu, iekļūst atvērto ziedu drīksnās un injicē savu ģenētisko materiālu auga olšūnās, tādējādi nodrošinot, ka jaunās sēklas, kuras izveidosies no šīm olšūnām, būs pilnībā modificētas un saturēs vēlamo sekvenču.

Pēc šo modificēto sēklu izaudzēšanas tika iegūti augi, kuru saknes un vasas daļas tika analizētas mikroskopā UV gaismā, lai meklētu konkrētas vietas, kur attiecīgais DLP ir sintezēts, tādējādi noskaidrojot vairāk par šo peptīdu funkciju augos. Pēc visu 30 modificēto augu analīzes tika izvēlēti 4 potenciāli interesantākie peptīdi, kuri uzrādīja gēnu ekspresiju vairākās auga daļās vienlaicīgi (1. attēls).

Šie izvēlētie augi, kuri saturēja modificētās 4 peptīdu sekvenču, tika pakļauti sēnīšu patogēna infekcijām un kontrolētai apputeksnēšanai, lai noteiktu konkrētus apstākļus, kuros šo peptīdu sintēze palielinās vai samazinās. Kopumā mēs noskaidrojām, ka izvēlētie peptīdu sintēzes apjomi palielinās pēc pirmās saskarsmes ar sēnīšu patogēnu, bet ar laiku DLP sintēze lēnām samazinās. Šī aktivitāte infekcijas sākumā norāda, ka šiem peptīdiem visticamāk ir loma cīņā ar patogēnu. Novērojot aktivitātes izmaiņas apputeksnēšanās laikā, vairāki izvēlētie peptīdi uzrādīja paaugstinātu aktivitāti 8 stundas pēc apputeksnēšanas, kas *Arabidopsis thaliana* augos sakrīt ar apaugļošanās brīdi, tādēļ mēs no šiem rezultātiem secinājām, ka šie ir daudzfunkcionāli peptīdi ar potenciālu lomu gan imūnajā aizsardzībā, gan vīrišķo un sievišķo dzimumšūnu saplūšanā. Lai noskaidrotu šo peptīdu konkrētus darbības principus un lomu augos, ir nepieciešams veikt papildus pētījumus, veidojot izsistos (knock-out) mutantus, kuros attiecīgo peptīdu darbība ir pilnībā imobilizēta.



1. attēls. (A) GFP signāla (zaļš) ekspresija saknēs. (B) Signāla ekspresija piemērs sēklotnēs. Mērogs - 50 μm.