

PhD értekezés tézisei

**Stressz-élettani vizsgálatok aldo-keto reduktáz génekkel transzformált
transzgenikus árpa vonalakon**

Éva Csaba, okleveles biológus

Témavezető: Tamás László PhD, habil. egyetemi docens



ELTE Biológia Doktori Iskola (Prof. Dr. Erdei Anna)
Kísérletes Növénybiológia Doktori Program (Prof. Dr. Szigeti Zoltán)
ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék
2014

Bevezetés

A növények a különböző stresszhatások során szinte mindig elszenvednek másodlagos stresszként oxidatív stresszt is. Ennek forrása leggyakrabban a fotoszintézis. Az ún. fénygátlás során ugyanis pl. akár a kadmium-kezelés vagy vízhiány hatására bekövetkező alacsony sztómakonduktancia miatt, akár alacsony hőmérsékleten, a fotoszintézis sötétszakasza gátolt és a relatív fénytöbblet hatására reaktív oxigénformák képződnek. Ezek közvetlenül is károsítják az élő sejt szinte minden részét, de közvetett károsító hatásuk is jól ismert. A membránokban lévő lipidekkel reagálva (lipid peroxidáció) ugyanis fehérjék keresztkötésére képes két kettős kötéssel rendelkező reaktív aldehidek (pl. malondialdehid, 4-hidroxi-2-nonenal) képződnek. A reaktív aldehidek semlegesítését hatékonyan végzik a már több növényben (pl. rizs, kukorica, lucerna) azonosított stresszvédő aldo-keto reduktáz (AKR) enzimek. Ezek a fehérjék javíthatják a szárazság- (Oberschall és mtsai. 2000), a nehézfém- (Hegedűs és mtsai. 2004), UV- (Hideg és mtsai. 2003) és hőtűrést (Turóczy és mtsai. 2011). Simpson és mtsai. (2009) kimutatták, hogy az *Arabidopsis thaliana*-eredetű AKR4C9 enzim is redukál reaktív aldehideket. **Ezek alapján kutatásunk fókuszába az AKR4C9 enzimet állítottuk. Az enzim reaktív aldehid detoxifikáló funkciójának tanulmányozása során a következő kérdésekre kerestük a választ.**

- **Mennyire általános az aldo-keto reduktázos védekező mechanizmus a növényekben?**
- **Az arabidopsis eredetű AKR4C9 is szerepet játszik-e a növények nehézfém tűrésében, a lucernában kódolt enzimhez hasonlóan?**
- **Milyen mértékben javíthatja ez az enzim a transzgenikus növények reaktív aldehid tűrését?**
- **Kialakítható-e egy olcsó, a teljes növény reaktív aldehid detoxifikáló kapacitásának mérésére alkalmas növényélettani vizsgáló módszer? Ha igen, mik a reaktív aldehidek specifikus hatásai a növények növekedési és egyéb élettani folyamataira?**

Gyakran, és többféle stressztípusnál (hidegstressz, fagystressz, sóstressz, szárazságtressz) másodlagos stresszként ozmotikus stressz is éri a növényeket. Az ozmotikus

stressz – többek között – a sejtek kiszáradását és az enzimek hidrátburkának elvesztését okozhatja. Az ozmotikus stressz ellen pl. ozmotikusan aktív anyagok jelenthetnek védőhatást. Közülük a cukoralkoholok hidroxil-csoportjaikkal az enzimek elveszett hidrátburkát is pótolhatják. Cukoralkoholok szintézisére több aldo-keto reduktáz enzim is képes, pl. a zeller mannóz-6-foszfát reduktáz, mely mannitot szintetizál. Zifang és Loescher (2003) a zeller eredetű enzimet termeltették *Arabidopsis thaliana*-ban, és ennek hatására az arabidopsis mannitot termelt és javult a sótűrése. Ezzel szemben kevés adat van arra a szakirodalomban, hogy egy reaktív aldehidek redukciójára képes AKR enzim jelentős mennyiségű cukoralkohol szintézisét is tudja katalizálni, ha a szükséges feltételek rendelkezésre állnak. A cukoralkohol termelés – mint már láttuk – kedvezően befolyásolhatja a növény sótűrését, de fagytűrését is. A stresszindukálható AKR-ok szerepét eddig kevésbé vizsgálták a fagy-, és sóstressztűréssel kapcsolatban. **A doktori munka során, az AKR-ok cukoralkohol termelő funkciójával kapcsolatban tisztázni kívántuk a következő kérdéseket:**

- **Szintetizál-e egy, a reaktív aldehidek redukciójára képes AKR enzim cukoralkoholt? Ha igen, milyen molekula átalakításával?**
- **Milyen hatással van az AKR4C9 termelése a transzgenikus növények só-, és fagytűrésére?**

Az említett területeken az ismeretek hiányát az általunk korábban előállított (Éva és mtsai. 2008), *Arabidopsis thaliana* eredetű AKR4C9 fehérjét konstitutívan termelő transzgenikus árpanövényeket vizsgálatával igyekeztünk pótolni. Meghatároztuk a transzgén beépülési kópiaszámát. Ezen kívül *in vitro* körülmények között, szénhidrátokkal és reaktív aldehidekkel szemben mértük a transzgenikus növényekből tisztított AKR4C9 aktivitását. Az enzim egy lehetséges termékének, a szorbit cukoralkoholnak a szintjét a növényekben is megmértük. Végül reaktív aldehidek képződésével járó, illetve ozmotikus stresszt okozó hatások mellett tanulmányoztuk a transzgenikus és nem transzgenikus növények ellenállóképességét.

Anyagok és módszerek

Növényi anyagként transzgenikus árpanövények (*Hordeum vulgare* L. cv. ‘Golden Promise’) szolgáltak. T3, vagy magasabb utódgenerációs növényeket vizsgáltunk. A transzgenikus növények a rizs aktin promóter::*Arabidopsis thaliana At2g37770.2*

gén::*Agrobacterium tumefaciens nos* terminátor konstrukciót hordozták. A cserepes növényeket (pl. enzimkivonáshoz, utódgenerációk neveléséhez) SANYO Fitotron készülékben, tőzeges virágföld és homok keverékébe (3:1) ültetve; 16 óra 15 °C, 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ fényen, és 8 óra 12 °C sötétben, 70% relatív páratartalom mellett neveltük, heti kétszeri öntözés mellett. Az árpa vízkultúrák növénynevelése során (életteni vizsgálatokhoz) Fodor és mtsai. (1998) módosított módszerét követtük; 14 óra 24 °C, 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ fényen, és 10 óra 18 °C sötétben. A stressz-életteni vizsgálatokat a magoncok 10 napos korában kezdtük el.

Kópiaszámbeccslés: a transzgén beépülési kópiaszámát qPCR-el határoztuk meg. A transzgén beépülési kópiaszámát kvantitatív real-time PCR-el (qPCR) határoztuk meg, a $\Delta\Delta\text{Ct}$ módszert követve (Schmittgen és Livak, 2001). Az *At2g37770.2* transzgenen kívül az egy kópiás árpa *blz2* génre (Gén Bank azonosító: Y10834.1), mint belső kontrollra PCR-eztünk.

Enzimkinetikai mérések: az enzimaktivitás méréséhez His-taggelt rekombináns AKR4C9 enzimet tisztítottunk affinitás-kromatográfiával transzgenikus árpanövények leveléből, majd az aktivitását *in vitro* mértük, a NADPH kofaktor abszorbanciáját követve, Vander Jagt és mtsai. (1992) módszere alapján

Cukoralkohol-mérés: a növényekben a szorbit cukoralkohol koncentrációját HPLC-RID (nagy felbontású folyadék-kromatográfia, törésmutató detektorral) módszerrel mértük, Simonzadeh és Ronsen (2012) módosított eljárását követve. A mérést – együttműködés keretében – Tömösköziné Farkas Rita végezte a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központban (NAIK, korábban KÉKI).

Stressz-életteni vizsgálatok: vízkultúrában nevelt növényeken végeztük. Közvetlen reaktív aldehid tőrés meghatározásához 3 nap alatt kétszer permeteztünk 0,1 V/V % glutáraldehid oldattal, kadmiumtőrés meghatározásához 5 nap 10 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ kezelést (vízkultúrába keverve), míg sótőrés meghatározásához 6 nap 175 mM NaCl kezelést (vízkultúrába keverve) alkalmaztunk. A fagytőrés mértékére 4 nap 4 °C-os hidegedzést követő háromszori -20 °C-os fagykezelést, illetve felolvasztást alkalmazva következtettünk.

Fotoszintetikus pigmenttartalom meghatározásához levéllemezek klorofilltartalmát 80%-os acetondalattal vontuk ki. A klorofilloldat abszorbanciáját a Porra és mtsai. (1989) által megadott hullámhosszokon mértük Shimadzu spektrofotométerrel, majd a mért

adatokból az általuk javasolt képlet szerint számoltuk ki a koncentrációt. Levelek összkarotinoid-tartalmát 100% acetonnal vontuk ki, majd az acetonoldat elnyelését a Lichtenhaler és mtsai. (1987) által megadott hullámhosszokon mértük Shimadzu spektrofotométerrel, illetve az általuk javasolt számítás szerint számoltuk belőle koncentrációt.

Fluoreszcencia indukciós paraméterek mérése: klorofill-fluoreszcenciát Solti és mtsai. (2008) által leírtakkal azonos módon mértünk pulzus-amplitúdó modulációs klorofill-fluorométerrel (PAM 101–102–103, Walz, Effeltrich, Németország).

Malondialdehid (MDA) tartalom mérése: levelek malondialdehid-tartalmát Kovács és mtsai. (2009) módszere alapján határoztuk meg.

Elektrolitvesztés meghatározása: a sejtmembrán károsodásának méréséhez a növényi sejtek elektrolitvesztését mértük, felületre vonatkoztatva, Hara és mtsai. (2003) eljárásával. A módszer során, a növényi leveleket 1,5 óráig inkubáltuk 10 ml ioncserélt vízben, majd inkubáció után a körülöttük lévő oldat vezetőképességét Radelkis OK 112, (Budapest, Magyarország) konduktométerrel mértük. A növényi minták teljes elektrolit-vesztésének meghatározásához 30 percig forraltunk 10 ml ioncserélt vízben majd a körülöttük lévő oldat vezetőképességét mértük. A fagykezelés hatására bekövetkező elektrolitvesztést a teljes elektrolitvesztés %-ában adtuk meg.

Statisztikai analízis: az élettani paraméterek meghatározásához minden vizsgálatot öt független ismétlésben végeztünk. A kapott adatokon párosítatlan T-próbát vagy varianciaanalízist végeztünk. Statisztikai elemzéshez Graphpad Instat és Microcal Origin programot használtunk.

Eredmények és értékelésük

1. A transzgenikus növények beépülési kópiaszáma az agrobaktériumos transzformációra jellemző alacsony értéknek adódott (1-4).

2. *In vitro* kísérletekben igazoltuk az AKR4C9 enzim aktivitását reaktív aldehid (glutáraldehid), valamint szénhidrát (fruktóz) típusú szubsztrátokkal szemben. A vizsgálatok

eredményeként megállapítottuk, hogy a stressz-indukálható, reaktív aldehideket redukáló aldo-keto reduktáz enzimek funkciói között szerepelhet cukoralkoholok szintézise is, szénhidrátokból kiindulva. Továbbá arra is következtettünk az elvégzett kísérletek alapján, hogy a glutáraldehid alkalmas lehet teljes növények reaktív aldehyd detoxifikációs kapacitásának *in vivo* tesztelésére.

3. Az AKR4C9 reaktív aldehidekkel szembeni védőhatását a növények glutáraldehyd-kezelésével *in vivo* módszerrel is igazoltuk. A transzgenikus növények több élettani paraméter (friss tömeg, klorofill-tartalom, klorofill-fluoreszcencia, légzésintenzitás) mérése alapján jobb közvetlen reaktív aldehyd semlegesítő képességet mutattak. Elsőként jellemeztünk egy reaktív aldehyd molekula élettani hatásait teljes növényen, és így növekedési paramétereket is tudtunk vizsgálni. Korábban csak levélkorongos vizsgálatokra volt példa a szakirodalomban.

4. A transzgenikus és nem transzgenikus árpa növények kadmiumtűrését vizsgálva kimutattuk, hogy a magas AKR4C9 termelésű C1 vonal reaktív aldehyd (malondialdehyd) tartalma sokkal alacsonyabb kadmium stressz alatt, mint a nem transzgenikus növényben mérhető érték. Ezen kívül megállapítottuk, hogy ennek a vonalnak az összklorofill tartalma és a PSII maximális kvantumhatékonysága (F_v/F_m) is szignifikánsan magasabb volt. Az alacsony AKR4C9 termelésű C2 vonal kadmiumtűrése a nem transzgenikus növényekével összemérhető volt. Összességében tehát – a reaktív aldehidek semlegesítése miatt – az AKR4C9 enzim javította a növény kadmiumtűrését, a védőhatás azonban enyhe, hiszen ez az enzim a kadmium-kezelés sok más káros hatásától (pl. fehérjék denaturációja, vasfelvétel gátlása) nem véd.

5. Szorbit cukoralkoholt a transzgenikus és nem transzgenikus növényekben is ki tudtunk mutatni, ám a transzgenikus növények szorbit tartalma 2-4-szer magasabb volt, és a szorbit-termelés arányos volt az AKR4C9 termeléssel. Az AKR4C9 enzim tehát valóban termel szorbit cukoralkoholt *in vivo*, melynek forrása valószínűleg a fruktóz.

6. A transzgenikus és nem transzgenikus növényeket a továbbiakban ozmotikus stresszt okozó stresszeknek tettük ki, ahol a szorbit termelés előnyt jelenthet. A sótűrésre összklorofill-tartalom, klorofill *a/b* arány, F_v/F_m paraméter és klorofill/karotinoid arány meghatározásával következtettünk, melyek során a transzgenikus növények jelentősen jobb sótűrését mutattuk ki. Mivel egyik növény MDA-szintje nem emelkedett a kezelés alatt, így a sótűrés javulását kizárólag megnövelt cukoralkohol-termelés számlájára írhatjuk. Az MDA növekedés hiánya arra utal, hogy az általunk alkalmazott sókezelés nem okozott jelentős

oxidatív stresszt, így a sótűrés javulását valószínűleg nem a szorbit cukoralkohol antioxidáns hatása, hanem az ozmotikus védőfunkciója okozta.

7. A fagyűrés vizsgálatokor megfigyeltük, hogy a magas AKR4C9 termelésű C1 jelű transzgenikus vonalba tartozó növényeknek több levele élte túl a -20 °C-on végzett háromszoros fagyasztást/felengedtetést. Alacsonyabb volt az egész növényre számított átlagos elektrolitvesztés, és ezek a növények gyorsabban is regenerálódtak a fagykezelés után. Minden vonalban kimutattunk kismértékű lipid peroxidációt is a fagykezelés hatására, bár ebben nem volt különbség a transzgenikus és nem transzgenikus növények között. Elképzelhető, hogy az AKR4C9 enzim nem aktív alacsony hőmérsékleten, azonban magas hőmérsékleten, ahol a fagykezelést követően aktivitása fokozódik, gyorsítja a növények regenerációját. A jobb regenerációs képességet mérésekkel is igazoltuk. A fő védőhatást viszont feltételezésünk szerint a megnövekedett szorbit koncentráció jelenthette, amely ozmotikus tulajdonsága révén azonnali védelmet jelentett a fagystresszel szemben.

Jelentősebb eredmények és a belőlük levonható következtetések

- **A glutáraldehid-permetezés alkalmas a reaktív aldehid detoxifikációs kapacitás *in vivo* vizsgálatára, de még legnagyobb reaktív aldehid semlegesítő képességű növényekben is növekedésgátlást okoz.**
- **Az arabidopsis eredetű AKR4C9 enzim, a korábban részletesen jellemzett lucerna eredetű MsALR enzimhez hasonlóan javította a transzgenikus növények kadmiuműrését.**
- **Elsőként mutattuk ki egyértelműen, *in vivo* módon, hogy reaktív aldehideket redukáló AKR-enzim képes szorbit cukoralkohol szintézisére is.**
- **Az AKR4C9 javítja a transzgenikus növények só-, és fagyűrését.**

I. Az általunk alkalmazott glutáraldehid-kezelés, egy olcsó és egyszerű vizsgálat, mely alkalmas lehet különböző növényfajok/fajták reaktív aldehid tűrésének vizsgálatára, és így azok általános abiotikus stressztűró képességére lehet következtetni. Az *At2g37770.2*

transzgen nagymértékű védelmet nyújtott a reaktív aldehid kezeléssel szemben, hiszen a magas expressziós szintű C1-es transzgenikus vonal klorofill-tartalma alig csökkent. A védőhatás mégsem volt teljes, hiszen az ebbe a vonalba tartozó növények sem tudtak 3 leveles állapotból 4 leveles állapotba fejlődni a kezelés alatt, a kezeletlen növényektől eltérően. Éppen ezért elképzelhetőnek tartjuk a reaktív aldehidek jelátviteli, növekedésgátló hatását, MAPK jelátviteli úton keresztül, ahhoz hasonlóan, ahogy ezt emlősökben leírták. Növényekből eddig nincs szakirodalmi adat a reaktív aldehidek jelátviteli szerepére úgyhogy ez további kutatások tárgyát képezheti.

II. A nehézfém-tűrés javulása a reaktív aldehid semlegesítő aldo-keto reduktáz enzimek általános funkciója lehet. A kadmiumtűrés javulását – szakirodalmi példák alapján – a reaktív aldehid semlegesítő képesség okozhatta, de mivel kimutattuk az AKR4C9 szorbit termelő képességét, a védekező mechanizmusban a szorbit cukoralkohol antioxidáns hatása is szerepet játszhat.

III. Cukoralkohol-termelés szempontjából az AKR4C9-et kódoló *At2g37770.2* gén előnyösebb transzgennek bizonyult, mint az erre korábban használt transzgenek többsége (pl. bakteriális mannit-1-foszfát dehidrogenáz), hiszen e funkció ellátása mellett reaktív aldehidek detoxifikációját is képes biztosítani. Ezen funkciónak köszönhetően az AKR4C9 az oxidatív és az ozmotikus stressz egyes hatásai ellen is véd, és így expressziójával a transzgenikus növények többféle abiotikus stressztűrése fokozható.

IV. Eddig csak elsődlegesen cukoralkoholokat szintetizáló AKR-ok kedvező hatását mutatták ki a sótűrésre, de vizsgálataink alapján reaktív aldehideket redukáló AKR-ok is hatásosak lehetnek, másodlagos funkciójuk, a cukoralkohol-termelés révén. Jelen doktori disszertáció a legrészletesebb tanulmány bármely aldo-keto reduktáz fagyűrésben játszott szerepének kiderítésére is. Kutatásaink alapján úgy véljük, hogy AKR4C9 enzim mindkét funkciójával együttesen fejt ki fagy elleni védőhatását. Korábban aldo-keto reduktáz gének hatását növények fagyűrésére csak Lee és Chen (1993) vizsgálták, akik árva rozsnok (*Bromus inermis*) sejtszuspenziót abszcizinsavval kezeltek, és így fagyűrővé tettek. A hormonkezelés hatására egy aldo-keto reduktáz gén is aktiválódott, melyet így kapcsolatba lehetett hozni a fagyűréssel.

Hivatkozások

- Fodor F., Cseh E., Varga A. & Zárny G. (1998) *Journal of plant nutrition* 21, 1363-73.
- Hara M., Terashima S., Fukaya T. & Kuboi T. (2003) *Planta* 217, 290-8.
- Hegedüs A., Erdei S., Janda T., Tóth E., Horváth G. & Dudits D. (2004) *Plant science* **166**, 1329-33.
- Hideg É., Nagy T., Oberschall A., Dudits D. & Vass I. (2003) *Plant, Cell & Environment* 26, 513-22.
- Kovács, E., et al. (2009). *Journal of Plant Physiology* 166, 72-79
- Lee S.P. & Chen T.H. (1993) *Journal of Plant Physiology* 142, 749-53.
- Lichtenthaler H.K. (1987) *Methods Enzymol.* 148, 350-82.
- Oberschall A., et al. (2000) *The plant journal* 24, 437-46.
- Porra R. J., Thompson W. A., Kriedemann P. E. (1989) *Biochimica et Biophysica Acta* 975, 384-94.
- Schmittgen T.D. & Livak K.J. (2008) *Nature protocols* 3, 1101-8.
- Simonzadeh N. & Ronsen B. (2012) *Journal of chromatographic science* 50, 644-7.
- Simpson P.J., et al. (2009) *Journal of molecular biology* 392, 465-80.
- Solti Á., Gáspár L., Mészáros I., Szigeti Z., Lévai L. & Sárvári É. (2008) *Annals of botany* 102, 771-82.
- Turóczy Z., et al. (2011) *Plant molecular biology* 75, 399-412.
- Vander Jagt D., Robinson B., Taylor K. & Hunsaker L. (1992) *Journal of Biological Chemistry* 267, 4364-9.
- Zhifang G. & Loescher W. (2003) *Plant, Cell & Environment* 26, 275-83.

A tézisek alapjául szolgáló közlemények listája

A. Referált tudományos folyóiratokban megjelent dolgozatok:

Éva Cs., Csóti I., Tamás L. (2008): *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Acta Biologica Szegediensis* 52, 49-51.

Éva Cs., Tóth G., Oszvald M. & Tamás L. (2014a) Overproduction of an *Arabidopsis* aldo-keto reductase increases barley tolerance to oxidative and cadmium stress by an in vivo reactive aldehyde detoxification. *Plant Growth Regulation*, 1-9. DOI: 10.1007/s10725-014-9896-x **IF: 1,68**

Éva Cs., Zelenyánszki H., Tömösközi-Farkas R., Tamás L. (2014b) Transgenic barley expressing the Arabidopsis AKR4C9 aldo-keto reductase enzyme exhibits enhanced freezing tolerance and regenerative capacity. *South African Journal of Botany* 93, 179–184. **IF: 1,409**

Éva Cs., Solti Á., Oszvald M., Tömösközi-Farkas R., Nagy B., Horváth G.V., & Tamás L. (2014c) Improved reactive aldehyde-, salt-, and cadmium tolerance of transgenic barley due to the expression of aldo-keto reductase genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, has been submitted

B. Összefoglalók konferencia kiadványokban:

Éva Cs., Tamás L., Horváth V.G. (2010): Stress-protecting function of an Arabidopsis aldo-keto reductase enzyme in transgenic barley In: Programme and Abstract Book. Society for Experimental Biology Annual Main Meeting. Konferencia helye, ideje: Prague, Csehország, 2010.06.30-2010.07.03.pp. 315-316.

Éva Cs., Horváth, G.V., Tamás L. (2012) Stress-protective function of a reactive aldehyde-neutralizing aldo-keto reductase enzyme in transgenic barley. „Plant Breeding and Biotechnology in the Great Pannonian Region, Experiences with GMP field trials and combating climate change challenges with green biotechnology” konferencia. 2010. július 4-7 Kolozsvár, Románia

Éva Cs., Tamás L (2012): Stress-protective function of a reactive aldehyde-neutralizing aldo-keto reductase enzyme in transgenic barley In: H Rennenberg, R Reski (szerk.) Plant Biology Congress jointly organised by FESPB and EPSO. Konferencia helye, ideje: Freiburg im Breisgau, Németország, 2012.07.29-2012.08.03. Abstracts: p. 324.

Éva Cs., Tóth G., Oszvald M., Tamás L. (2013): Glutaraldehyde spraying: a novel plant physiology test for assessing reactive aldehyde tolerance in vivo. „Our Future” konferencia Keszthely, 2013.05.15 Pannonian Plant Biotechnology Association, Book of Abstracts pp. 32-33

Éva Cs., Zelenyánszki H., Tömösközi-Farkas R., Solti Á., Tamás L. (2014) Transgenic plants benefit from reactive aldehyde detoxifying and sugar alcohol producing function of the same aldo-keto reductase enzyme during heavy metal, freezing and salt stress. “Advances in Plant Breeding & Biotechnology Techniques” konferencia. Mosonmagyaróvár, 2014.04.28-29

Éva Cs. (2009): Egy Arabidopsis aldo-keto reduktáz enzimet termelő transzgénikus árpa előállítás In: XXIX. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Biológia Szekció: Program és összefoglalók. Konferencia helye, ideje: Veszprém, Magyarország, 2009.04.08-2009.04.10. Veszprém:2009. p. 183