

Nghiên cứu chức năng của Botrytis Susceptible1 Interactor (BOI) trong điều khiển sự ra hoa ở cây *Arabidopsis*

Nguyễn Thị Khoa

Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành
khoant@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Botrytis Susceptible1 Interactor (BOI) là một Really Interesting New Gen (RING) finger protein ức chế sự ra hoa bằng cách giảm sự biểu hiện của gen *Flowering Locus T (FT)*, một yếu tố quyết định sự ra hoa ở cây *Arabidopsis*. Để làm rõ cơ chế phân tử BOI, chúng tôi tìm hiểu khả năng tương tác của BOI với protein trong phức hệ Histone Deacetylase Complex (HDAC) vì phức hệ này cũng có vai trò ức chế sự biểu hiện của *FT*. Nghiên cứu đã chứng minh được tương tác của BOI với Histone Deacetylase 6 (HDA6) - một protein thành phần trong HDAC, trên nấm men và trên *in vitro*. Kết quả lai đôi ở nấm men (yeast two-hybrid assay) cho thấy chỉ có tế bào nấm men chứa BOI và HDA6 mới sống được môi trường chọn lọc không chứa tryptophan, leucine, adenine và histidine. Điều này chứng tỏ tương tác giữa BOI và HDA6 là tương tác protein trực tiếp trên nấm men. Ngoài ra, phương pháp tương tác protein *in vitro* (*in vitro* pull-down assay) cũng cho thấy BOI tương tác đặc hiệu với HDA6 nhưng không tương tác với glutathion-S-transferase (GST). Kết quả này gợi ý BOI có thể ức chế *FT* thông qua HDAC. Cần có các nghiên cứu sâu hơn để chứng minh mối liên hệ giữa BOI và HDAC trong ức chế sự biểu hiện của *FT* ở cây *Arabidopsis*

Nhận 28.10.2020
Được duyệt 04.08.2021
Công bố 10.11.2021

Từ khóa

Arabidopsis, Botrytis Susceptible1 Interactor (BOI), Constans (CO), Flowering Locus T (FT), histone deacetylase (HDAC) complex, ra hoa

© 2021 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Ra hoa là quá trình phát triển từ giai đoạn sinh dưỡng lên giai đoạn sinh sản phức tạp nhưng rất quan trọng ở cây [1, 2]. Vì vậy, cơ chế và các nhân tố điều khiển sự ra hoa đã được nghiên cứu từ rất lâu ở cả cây trồng và cây mô hình. Trên cây mô hình *Arabidopsis thaliana*, để tạo chồi hoa, cây cần tổng hợp yếu tố quyết định sự ra hoa (florigen) Flowering Locus T (FT). Bản chất của yếu tố quyết định này là một loại protein kích thước nhỏ, có khả năng di chuyển từ mạch lá đến mô phân sinh ngọn để kích thích sự biểu hiện của các gen tạo chồi hoa như *APETALA 1 (API)* [3]. Tất cả các nhân tố bên ngoài và bên trong như chu kỳ ngày đêm, nhiệt độ thấp kéo dài, chất kích thích sinh trưởng,

nhân tố già hóa và nhân tố tự sinh đều ảnh hưởng tới sự ra hoa thông qua sự biểu hiện của gen *FT* [1, 2].

Trong con đường ra hoa nhờ chu kỳ ngày đêm, những cây ngày dài như *Arabidopsis* sẽ tích lũy nhân tố phiên mã (transcription factor) có tên gọi Constans (CO) ở cuối chu kỳ ngày để tăng sự biểu hiện của gen *FT*, do đó kích thích sự ra hoa [4]. Phức hệ histone deacetylase (HDAC) tham gia vào quá trình điều khiển sự ra hoa bằng cách ức chế sự phiên mã của gen *FT*. Phức hệ này loại bỏ gốc acetyl trên phân tử histone bao quanh DNA, do đó ảnh hưởng tới cấu trúc nhiễm sắc chất (chromatin) và sự biểu hiện của gen [5]. Ngoài ra, HDAC cũng ảnh hưởng tới khả năng



bám của CO vào promoter của gen *FT* nhưng không tương tác trực tiếp với nhân tố phiên mã này [5].

Nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã tìm ra họ RING finger protein Botrytis Susceptible1 Interactor (BOI) gồm 4 thành viên chính BOI, BOI-Related Gene1 (BRG1), BRG2, và BRG3 ức chế sự ra hoa trên cây *Arabidopsis* thông qua gen *FT* [6-8]. BOI tương tác trực tiếp với CO và ức chế CO bám vào promoter của gen *FT*, vì thế giảm sự tổng hợp của gen *FT*. Chúng tôi tìm hiểu tương tác giữa BOI và HDAC vì cả BOI và HDAC đều ức chế sự biểu hiện của *FT*, đồng thời có mối liên hệ với CO [5]. Bằng phương pháp lai đôi ở nấm men, tương tác protein in vitro, chúng tôi đã thu được kết quả tương tác trực tiếp giữa BOI và Histone Deacetylase 6 (HDA6), một enzyme tiêu phân trong HDAC. Kết quả này sẽ góp phần làm tăng sự hiểu biết về cơ chế BOI điều khiển sự ra hoa ở cây *Arabidopsis*.

2 Phương pháp nghiên cứu

2.1 Cây trồng và điều kiện trồng

Arabidopsis thaliana trồng ở nhiệt độ (22 - 24) °C trong điều kiện 16 giờ sáng /8 giờ tối. Cây *Arabidopsis* chuyển gen tăng biểu hiện của *BOI* có gắn FLAG (*BOI-FLAG*) và cây chuyển gen tăng biểu hiện của green fluorescent protein (GFP) có gắn FLAG (*GFP-FLAG*) sử dụng trong nghiên cứu này được tạo ra từ nghiên cứu trước đây [8]. Trình tự gen *BOI* (At4g19700) và GFP được đưa vào plasmid pBFLAG2 và chuyển vào *Arabidopsis* nhờ *Agrobacterium tumefaciens*.

2.2 Phương pháp lai đôi ở nấm men

BOI và HDA6 tương ứng được chuyển vào vector pGBKM và pGADM bằng các enzyme giới hạn. Primer cho tách dòng đối với BOI và HDA6 như sau:

BOI-F AvrII:

GTGTCCTAGGATGGCTGTTCAAGCTCATCACATG

BOI-R BamHI:

GTGTGGATCCGGAGAAGACATGTTAACATGCACA

HDA6-F SpeI:

GTGTGTACTAGTATGGAGGCAGACGAAAGCGGCATC

HDA6-R XmaI :

GTGTCCCGGGAGACGATGGAGGATTACAGT

Phương pháp yeast-2-hybrid (Y2H) được thực hiện [7,8]. Các vector pGBKM và pGADM sau khi tách dòng được biến nạp vào nấm men (chủng AH109) theo hướng dẫn của hãng sản xuất (Clontech). Tiếp đó, tế bào nấm men đã biến nạp được nhỏ giọt trên môi trường không chứa tryptophan và leucine (SD-2) để chọn lọc những tế bào chứa cả 2 vector pGBKM và pGADM hoặc trên môi trường không chứa tryptophan, leucine, adenine và histidine (SD-4) để chọn lọc những tế bào có tương tác của BOI và HDA6. Tế bào nấm men chủng AH109 bị đột biến các gen tổng hợp tryptophan, leucine, adenine và histidine, do đó không thể sống trong môi trường không được bổ sung các amino acid này. Vector pGBKM có chứa gen tổng hợp tryptophan và domain hoạt hóa GAL4 (GAL4 activation domain, AD) nằm ở đầu N của gen cần tách dòng (trong nghiên cứu này là BOI). Trong khi đó, vector pGADM chứa gen tổng hợp leucine và domain bám DNA của GAL4 (GAL4 DNA-binding domain, DNA-BD) nằm ở đầu N của gen cần tách dòng (trong nghiên cứu này là HDA6). Tế bào nấm men chủng AH109 chứa cả 2 vector pGBKM và pGADM tự tổng hợp được tryptophan và leucine nên sống được trong môi trường không được bổ sung tryptophan và leucine. Trong tế bào nấm men AH109, DNA-BD bám vào trình tự GAL4 upstream activating sequence (UAS) nằm phía trên vùng khởi động (promoter) của một số gen chỉ thị (reporter) tổng hợp adenine và histidine. AD khi ở khoảng cách gần với DNA-BD có chức năng hoạt hóa sự biểu hiện của các gen chỉ thị. Khi có sự tương tác trực tiếp giữa protein được tách dòng vào pGBKM (trong nghiên cứu này là BOI) và protein được tách dòng vào pGADM (trong nghiên cứu này là HDA6), AD và DNA-BD ở khoảng cách gần nhau. Do đó, các gen tổng hợp adenine và histidine được biểu hiện và tế bào nấm men AH109 có thể sống được trong môi trường không chứa tryptophan, leucine, adenine và histidine. Kết quả tương tác sẽ được kiểm tra sau 4 ngày nuôi cấy ở tủ ấm 28 °C.

2.3 Phương pháp tương tác protein in vitro

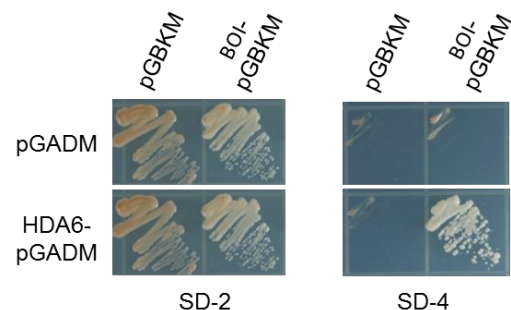
Trong thí nghiệm này, protein tái tổ hợp glutathione-S transferase (GST)-HDA6 được tách dòng vào vector pGEX4T-1 và biểu hiện ở chủng *E. coli* BL21 (DE3) RIL. Protein được tinh sạch bằng Pierce™ Glutathione agarose theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Scientific, Mỹ). BOI-FLAG hoặc GFP-

FLAG được tách từ cây *Arabidopsis* 7 ngày tuổi tăng biểu hiện của BOI và GFP bằng dung dịch tách protein chứa 50 mM Tris-Cl, pH = 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % Nonidet, 1X MG132 và protease inhibitor cocktail (Roche, Thụy Sĩ). Các bước tiến hành tương tác protein *in vitro* được tiến hành trong nghiên cứu trước đây [7,8]. Về mặt cơ bản, *Arabidopsis* 7 ngày tuổi (*Arabidopsis* seedling) biểu hiện BOI-FLAG hoặc GFP-FLAG được thu từ đĩa petri và nghiền trong nito lỏng để tạo bột. Tiếp đó, 2 mL dung dịch tách protein cho vào 2 mL bột cây và lắc đều. Bột cây sau khi được hòa tan trong dung dịch tách protein sẽ được đồng nhất bằng cột QuiaShredder. Sau khi li tâm ở tốc độ 12 000 rpm, 4 °C trong 10 phút, phần dịch thu được chia thành 2 phần bằng nhau, một phần ủ với resin chứa GST, phần còn lại ủ với resin chứa GST-HDA6 ở nhiệt độ 4 °C trong 2 giờ. Sau khi ủ, li tâm các ống ở 2 000 rpm, 4 °C trong 5 phút, loại bỏ phần dung dịch bên trên và giữ phần giá thể (resin) lắng xuống dưới. Tiếp đó, rửa resin bằng cách thêm vào 1 mL dung dịch rửa (dung dịch tách mẫu không chứa MG132 và protease inhibitor cocktail), lắc nhẹ ở 4 °C trong 5 phút, li tâm ở 2 000 rpm, 4 °C trong 5 phút, loại bỏ dung dịch và giữ lại resin. Lặp lại bước rửa thêm 3 lần. Sau khi li tâm loại bỏ dung dịch phía trên, thêm 20 µL dung dịch nạp mẫu SDS (SDS loading buffer) vào resin, đun sôi ở 100 °C trong 10 phút để biến tính protein. Li tâm ở 2 000 rpm trong 5 phút, phần dịch thu được sẽ được dùng để chạy điện di protein SDS-PAGE, sau đó chuyển lên màng nitrocellulose (GE Healthcare, Mỹ) để tiến hành Western Blot. Sau khi protein đã được chuyển lên màng, trước hết màng sẽ được nhuộm với Ponceau S để phát hiện protein tái tổ hợp GST và GST-HDA6. Sau đó, màng sẽ được ủ với kháng thể đa dòng kháng FLAG từ thỏ (Sigma-Aldrich, Đức) để phát hiện BOI-FLAG hoặc GFP-FLAG.

3 Kết quả và bàn luận

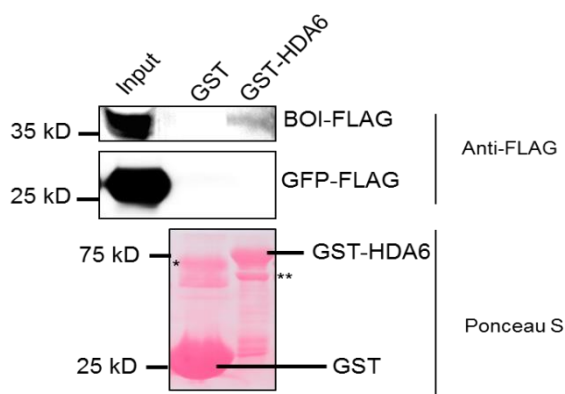
3.1 BOI tương tác trực tiếp với HDA6 trên nấm men
HDAC có chức năng loại bỏ gốc acetyl trên phân tử histone, do đó thay đổi cấu trúc chromatin và biểu hiện của gen. Thông thường, HDAC duy trì trạng thái nghỉ của gen sau quá trình phiên mã [5]. HDAC của *Arabidopsis* gồm các tiểu phần tương tự như phức hệ Sin3-HDAC của nấm men. Trong phức hệ này, Sin3 đóng vai trò như một giá thể (scaffold) để tương tác

với các protein khác, protein RbAp46/48 có chức năng bám vào phân tử histone, các enzyme histone deacetylase như HDA6, HDA9 thực hiện chức năng loại bỏ gốc acetyl của histone, ngoài ra còn có các protein SAP18 và SAP30 chưa rõ chức năng [5]. Để chứng minh BOI tương tác trực tiếp với HDAC, chúng tôi tiến hành kiểm tra tương tác của BOI với một tiểu phần của phức hệ này là enzyme Histone Deacetylase 6 (HDA6) trên nấm men. Trên môi trường chọn lọc chỉ chứa tryptophan và leucine (SD-2), tất cả tế bào nấm men đều phát triển tốt. Điều này chứng tỏ các tổ hợp pGBKM/pGADM, BOI-pGBKM/pGADM, pGBKM/HDA6-pGADM, BOI-pGBKM/HDA6-pGADM đã được biến nạp thành công vào tế bào nấm men. Tuy nhiên, chỉ có tế bào nấm men chứa tổ hợp BOI-pGBKM/HDA6-pGADM phát triển trên môi trường chọn lọc không tryptophan, leucine, adenine và histidine (SD-4). Kết quả này cho thấy BOI tương tác trực tiếp với HDA6 khiến cho các gen chỉ thị tổng hợp adenine và histidine được biểu hiện. Vì thế tế bào nấm men có thể sống trong môi trường không chứa hai loại amino acid này. Các tế bào nấm men chứa tổ hợp pGBKM/pGADM, BOI-pGBKM/pGADM, pGBKM/HDA6-pGADM không thể phát triển trong môi trường SD-4. Điều này cho thấy domain AD trên vector pGADM và domain BD trên vector pGBKM, domain AD trên vector pGADM và BOI trên vector pGBKM, HDA6 trên vector pGADM và domain BD trên vector pGBKM đều không tương tác trực tiếp với nhau. Kết quả này gợi ý tương tác giữa BOI và HDA6 là tương tác đặc hiệu trên nấm men (Hình 1).



Hình 1 Tương tác của BOI và HDA6 trên nấm men.

Môi trường không chứa tryptophan và leucine (SD-2) chọn lọc những tế bào chứa cả 2 vector pGBKM và pGADM. Môi trường không chứa tryptophan, leucine, adenine và histidine (SD-4) chọn lọc những tế bào có tương tác của BOI và HDA6.



Hình 2 Tương tác của BOI và HDA6 *in vitro*.

Resin chứa GST hoặc GST-HDA6 được sử dụng làm giá thể để kéo protein BOI-FLAG hoặc GFP-FLAG tách từ cây *Arabidopsis* chuyển gen. GST và GST-HDA6 được nhuộm bằng Ponceau S. BOI-FLAG và GFP-FLAG được phát hiện bằng kháng thể đa dòng kháng FLAG từ thỏ. * và **: protein không đặc hiệu.

3.2 BOI tương tác trực tiếp với HDA6 *in vitro*

Để khẳng định kết quả thu được từ phương pháp lai đôi trên nấm men, chúng tôi tiến hành phương pháp tương tác protein trên *in vitro* (*in vitro* pull-down assay). Trong thí nghiệm này, resin chứa protein tái tổ hợp GST hoặc GST-HDA6 biểu hiện trên *E. coli* được sử dụng làm giá thể để bắt giữ protein BOI-FLAG hoặc GFP-FLAG từ cây *Arabidopsis* chuyển gen nếu có tương tác xảy ra. Hình ảnh Western Blot cho thấy cả BOI-FLAG và GFP-FLAG đều không được phát hiện trên resin có chứa GST. Điều này cho thấy BOI-FLAG và GFP-FLAG không tương tác *in vitro* với GST. Bên cạnh đó, chỉ có BOI-FLAG được phát hiện trên resin có chứa GST-HDA6 chứng tỏ BOI-FLAG mà không phải GFP-FLAG tương tác *in vitro* GST-HAD6 (Hình 2). Kết quả này chứng minh tương tác trực tiếp của BOI với HDA6 *in vitro*.

4 Kết luận

Kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy cả BOI và HDAC đều ức chế sự phiên mã của gen *FT* và có mối tương tác với CO [5, 8]. Chúng tôi giả định rằng BOI có thể ức chế *FT* bằng cách tương tác với HDAC. Để chứng minh cho giả thuyết trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tương tác giữa BOI và HDA6, một enzyme cấu trúc của HDAC, bằng phương pháp lai đôi trên nấm men và phương pháp tương tác protein *in vitro*. Kết quả cho thấy BOI có thể tương tác với HDA6 trên cả nấm men và *in vitro*, gợi ý cơ chế BOI ức chế sự biểu hiện của gen *FT* thông qua HDAC. Đây là kết quả bước đầu về tương tác trực tiếp giữa BOI và HDA6, cần có nghiên cứu sâu hơn về tương tác *in vivo* trên cây *Arabidopsis* để tái khẳng định các kết quả thu được trên nấm men và trên *in vitro*. Đồng thời ảnh hưởng của BOI trong điều khiển lượng acetyl hóa trên phân tử histone bao quanh gen *FT* cũng cần được đánh giá để chứng minh mối quan hệ tương tác giữa BOI và HDAC.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2020.01.161/HĐ-KHCN.

Tác giả trân trọng cảm ơn Giáo sư Giltso Choi, Khoa Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Tiên tiến Hàn Quốc (KAIST) đã tạo điều kiện để hoàn thành nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Kim, D.H., Doyle, M.R., Sung, S., and Amasino, R.M. (2009). Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25:277-299.
2. Komeda, Y. (2004). Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology* 55:521-535.
3. Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., et al. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y)* 316:1030-1033.
4. Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F., and Coupland, G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y)* 288:1613-1616.
5. Gu, X., Wang, Y., and He, Y. (2013). Photoperiodic regulation of flowering time through periodic histone deacetylation of the florigen gene FT. *Plos Biol* 11: e1001649.
6. Luo, H., Laluk, K., Lai, Z., Veronese, P., Song, F., and Mengiste, T. (2010). The *Arabidopsis* Botrytis Susceptible1 Interactor defines a subclass of RING E3 ligases that regulate pathogen and stress responses. *Plant Physiology* 154:1766-1782.
7. Nguyen, K.T., Park, J., Park, E., Lee, I., and Choi, G. (2015). The *Arabidopsis* Ring domain BOI inhibits flowering via CO-dependent and CO-independent mechanisms. *Mol Plant* 8: 1725-36.
8. Park, J., Nguyen, K.T., Park, E., Jeon, J.S., and Choi, G. (2013). DELLA proteins and their interacting RING Finger proteins repress gibberellin responses by binding to the promoters of a subset of gibberellin-responsive genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25:927-943.

Function of Botrytis Susceptible1 Interactor (BOI) in regulating flowering time in *Arabidopsis thaliana*

Khoa Thi Nguyen

NTT Hi-tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

khoant@ntt.edu.vn

Abstract A Really Interesting New Gene (RING) finger protein BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 INTERACTOR (BOI) represses the expression of the *Flowering Locus T* gene (*FT*) in *Arabidopsis thaliana*, hence the inhibition of flowering in long days. To investigate the molecular function of BOI, we studied the interaction of BOI with a histone deacetylase complex (HDAC) since this complex also acts as a repressive regulator of *FT* expression. Here, we report that BOI directly interacted with HISTONE DEACETYLASE 6 (HDA6), an enzyme subunit of HDAC in yeast and *in vitro*. A yeast bihybrid assay showed that yeast cells containing both BOI and HDA6 were able to grow on a selective medium without tryptophan, leucine, adenine và histidine, indicating a direct interaction of BOI and HDA6 in yeast. In addition, BOI also bound to glutathion S-transferase (GST)-HDA6 but not to GST in an *in vitro* pull-down assay. These results suggest BOI might interact with HDAC to inhibit the expression of *FT* in *Arabidopsis*. Further *in vivo* studies are needed to uncover this molecular mechanism.

Keywords *Arabidopsis*, Botrytis Susceptible1 Interactor (BOI), flowering, *Flowering Locus T* (*FT*), Histone Deacetylase Complex (HDAC)