

# Štúdium expresie a lokalizácie THF1 proteínu vo vybraných druhoch parazitických rastlín rodu *Cuscuta* v podmienkach *in vitro*.

Renáta Švubová, Alžbeta Blehová

Katedra fyziológie rastlín, Prírodovedecká fakulta Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovenská Republika, balazovar@gmail.com.

## ABSTRACT

The Thylakoid Formation Protein 1 (THF1), a nuclear-encoded plastid-localized protein, has been identified in various plant species. It has been shown previously that the THF1 is involved in thylakoid membrane differentiation, in plant-fungal and plant-bacterial interactions and sugar signalling with its preferential localization to plastids. Our immunofluorescence localization analyses revealed that in addition to plastids, the THF1 protein localizes also to the plasma membrane and plasmodesmata in developing *Cuscuta europaea* haustorium, most abundantly in the digitate cells of the endophyte primordium. These results are supported with Western blot analysis in which we observed the highest levels of THF1 protein in *Cuscuta* stem attached to the host, the haustorium and tobacco stems attacked by *Cuscuta*. In 7-day-old dodder seedlings and dodder flowers, THF1 protein was not detected. Here we report a simple procedure for *A. tumefaciens*-mediated stable transformation of *C. europaea*.

**Key words:** *Cuscuta*, dodder seedlings, haustorium, microscopy, THF1 protein, Western blot.

**Pod'akovanie:** Táto práca je súčasťou grantového projektu VEGA 1/052012 a podporená je aj nadáciou SPP 2011/2012.

## ÚVOD

Parazitické rastliny majú špeciálny absorpčný orgán – haustórium, pomocou ktorého prenikajú pletivami hostiteľa a napájajú sa na xylém či floém. Rastliny rodu *Cuscuta* sa vo všeobecnosti považujú za holoparazity a od svojho hostiteľa prijímajú vodu aj organické látky. *C. grandiflora*, *C. odorata*, špeciálne v rastových vrcholoch mladých klíčencov, obsahujú detegovateľné množstvá chlorofylov, enzýmu Rubisco (Panda et Choudhury, 1992, Dawson et al., 1994, Lee et al., 2005) a plastidy so slabo diferencovanými tylakoidmi (van der Kooij et al., 2000). Bolo dokázané, že *C. reflexa* si zachovala viacero génov kódujúcich proteíny fotosyntetického aparátu s preukaznou homológiou s génmi identifikovanými vo vyšších rastlinách (Haberhausen et Zetsche, 1994). Z literatúry vyplýva, že práve *C. europaea* je najviac prispôbená na holoparazitizmus (Machado et Zetsche, 1990) s veľkými deléciami génov kódujúcich proteíny fotosyntetického aparátu (Freyer et al., 1995, Stefanović et Olmstead, 2005).

V *Arabidopsis thaliana* bolo identifikovaných viacero jadrom- a plastidom-kódovaných génov, ktorých produkty môžu ovplyvniť vývin chloroplastov ako aj formovanie tylakoidov. Thylakoid Formation Protein 1 (THF1) bol identifikovaný v mnohých rastlinných druhoch (Peltier et al., 2004, Wang et al., 2004, Peltier et al., 2006, Zhang et al., 2009). V literatúre sa stretávame s viacerými pomenovaniami tohto proteínu – THF1 (Wang et al., 2004, Huang et

al., 2006), ToxA-binding protein (Manning et al., 2007), Psb29 (Keren et al., 2005). Je známe, že sa lokalizuje do plastidovej membrány, strómy a do stromulov (Huang et al., 2006). Podľa Wang et al. (2004) je THF1 proteín zapojený do procesu diferenciácie tylakoidov, podieľa sa na stresovej odpovedi rastliny napadnutej patogénom (Wangdi et al., 2010) a podľa Huang et al. (2006), ako interakčný partner  $\alpha$ -podjednotky G-proteínu (GPA1), zohráva úlohu pri metabolizme cukrov.

Nami získané výsledky ako, nízke koncentrácie fotosynteticky aktívnych pigmentov, relatívne nízka fotochemická aktivita PSII ako aj nízka akumulácia študovaných, pre fotosyntézu nevyhnutných proteínov naznačujú, že fotosyntéza nie je primárnym procesom v plastidoch haustória *C. europaea*. Tento predpoklad potvrdzuje aj mimo-plastidová lokalizácia THF1 proteínu v cytoplazmatickej membráne a plazmodezmách predovšetkým v týchto bunkách.

## MATERIÁL A METÓDY

**Rastlinný materiál a podmienky kultivácie:** Ako rastlinný materiál sme v našich experimentoch použili kukučinu (*C. europaea*) a ako hostiteľskú rastlinu tabak (*N. benthamiana*). Semená kukučiny boli pred výsevom opracované koncentrovanou  $H_2SO_4$  po dobu 15 min., povrchovo sterilizované 2% chlórnanom sodným po dobu 15 min. a vysiaté na agarom spevnené MS (Murashige et Skoog, 1962) médium, s prídavkom kinetínu ( $1 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Sedem-dňové klíčence boli narezané na 1 cm časti a prenesené na MS médium s prídavkom 2,4-D ( $2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a kinetínu ( $1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) ako explantáty pre odvodenie kalusových kultúr. Na odvodenie systému hostiteľ-parazit v podmienkach *in vitro* sme okolo báz 8-týždňových tabakov očkovali povrchovo sterilizované semená kukučiny. Materiál bol pestovaný v kultivačnej komore, pri fotoperióde dlhého dňa (16h svetlo/8h tma), pri teplote  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  a intenzite osvetlenia  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  fotosynteticky aktívneho žiarenia.

**Western blot analýza:** S použitím polyklonálnych protilátok sme zisťovali prítomnosť a akumuláciu THF1 proteínu a vybraných proteínov fotosyntetického aparátu (GluTR, FLP, D1, LHCI, RbcL) v pletivách kukučiny a tabaku.

**Analýza obsahu fotosyntetických pigmentov:** Chlorofyly a karotenoidy boli extrahované do 80% vychladeného acetónu ( $4^\circ\text{C}$ ) a merané spektrofotometricky (Jenway 6400, London, UK) a prepočítané podľa Lichtenthalera (1987).

**Meranie fluorescencie chlorofýlov:** Fluorescencia chlorofýlov (efektívny -  $F_V/F_M$  a maximálny -  $\Phi_{PSII}$  kvantový výťažok PSII) vo výhonkoch a kvetoch kukučiny a v stonkách kukučiny prichytenej na hostiteľa bola meraná pomocou prístroja Fluorcam FC1000 LC (Photon Systems Instruments). Saturačný pulz ( $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR, doba trvania 800-ms,  $\lambda = 620 \text{ nm}$ ), aktinické svetlo ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR,  $\lambda = 620 \text{ nm}$ ).

**Immunolokalizácia THF1 proteínu:** Pletivá *C. europaea* a aj hostiteľa boli fixované 2% glutaraldehydom a zaliate do Steedmanovho vosku.  $10 \mu\text{m}$  rezy boli značené špecifickou protilátkou anti-THF1:IgG-FITC.

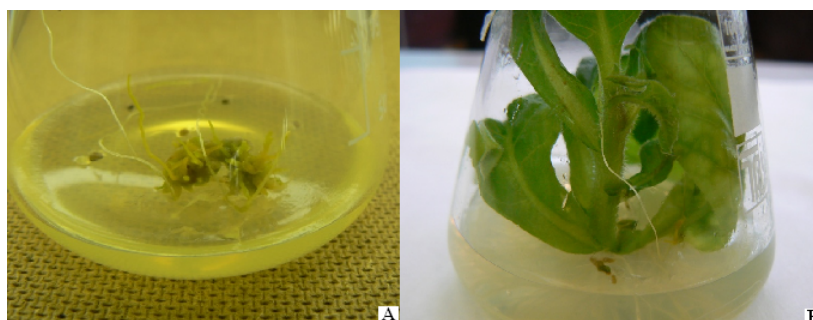
**Mikroskopia:** Vzorky kukučiny boli študované pomocou fluorescenčnej mikroskopie (Axioskop 2 plus, Zeiss - 485/20 nm excitačný filter, 510 nm beamsplitter and 515 nm LP bariérový filter (filter Zeiss set 16, 25) a s pomocou konfokálneho mikroskopu (Olympus BX 61 CLSM Olympus Fluoview FV 1000).

**Nepriama transformácia kalusov a stoniek kukučiny:** Stonky a kalusy boli nepriamo transformované pomocou *A. tumefaciens*, kmeň LBA4404 s binárnym vektorom pBIN-mgfp5-ER. Selekcii transgénnych buniek a pletív sme robili na MS médiu s prídavkom kanamycínu ( $100 \text{ mg.l}^{-1}$ ), streptomycínu ( $100 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a cefotaxímu ( $200 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Na vizuálnu selekciiu GFP pozitívnych kalusov a stoniek sme použili fluorescenčný mikroskop.

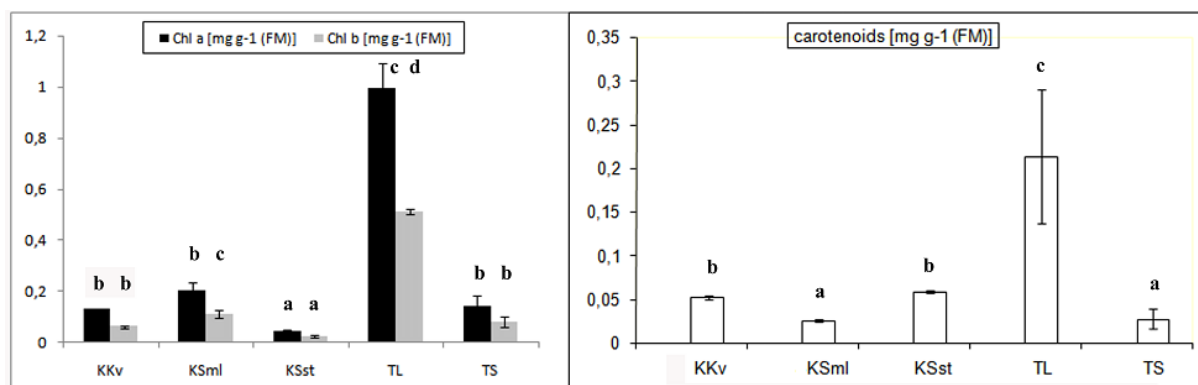
**Izolácia DNA, RNA, RT-PCR:** Celková DNA bola izolovaná pomocou DNazol (Invitrogen), celková RNA pomocou Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total RNA kit (SIGMA-ALDRICH, USA). Prvé vlákno cDNA sa syntetizovalo pomocou ImProm-II<sup>IM</sup> Reverse Transcription System (Promega, USA) s použitím špecifických primerov (F: 5' TTGGGATCTTTCGAAAGGGC 3', R: 5' ACCCAGATCATATGAAGCGG 3'). Program cyklera: počiatočná denaturácia -  $94^{\circ}\text{C}$ , 5 min (1x), denaturácia -  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 min (35x), anelácia primerov -  $54^{\circ}\text{C}$ , 1 min (35x), elongácia -  $72^{\circ}\text{C}$ , 1 min (35x), konečná elongácia -  $72^{\circ}\text{C}$ , 7 min (1x),  $4^{\circ}\text{C}$  ∞.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

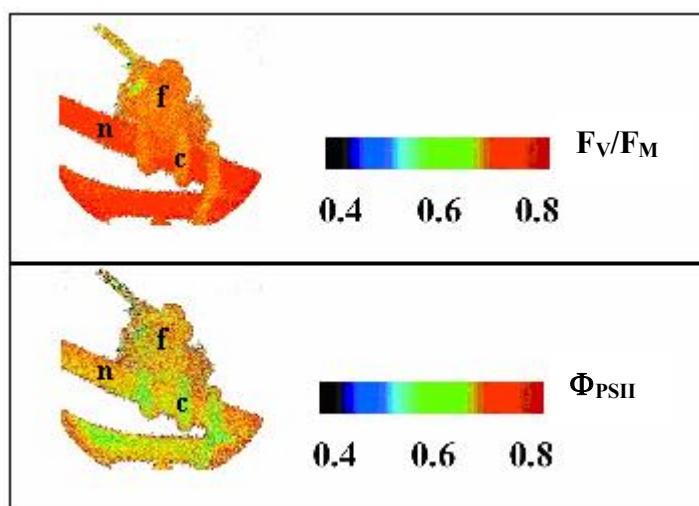
Približne 30 dní po naočkovaní stonkových explantátov kukučiny na MS médiu s 2,4-D ( $2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a kinetínom ( $1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) sme prevažne na rezných plochách pozorovali proliferáciu kalusu. Z kalusov dlhodobo (7-8 týžňov) kultivovaných na uvedenom médiu, resp. po ich prenose na bezhormónové MS médiu, spontánne regenerovali stonkové primordiá (Obr. 1 – A). Zo semien kukučiny, vysiatych okolo 8-týždňových rastlín tabakov, vyrástli mladé rastliny, ktoré sa po 20 dňoch kultivácie prichytili na svojho hostiteľa (Obr. 1 – B). Aj keď sa *C. europaea* považuje za striktného holoparazita, predovšetkým mladé stonky a kvety sú schopné akumulovať chlorofyly, pričom najvyšší obsah týchto pigmentov sme namerali v 7-dňových klíčencoch (Obr. 2 – A2). Štatisticky signifikantný pokles Chl (*a+b*) sme zaznamenali v 30-dňových stonkách kukučiny, kde sme potvrdili len stopové množstvá uvedených pigmentov (Obr. 2 – A3). Detegovateľné množstvá chlorofylov uvádzajú aj Panda et Choudhury (1992), Dawson et al. (1994) a Lee et al. (2005) v rastových vrcholoch mladých klíčencov *C. grandiflora*, *C. odorata*. Staršie stonky a kvety *C. europaea* naopak akumulujú vyššie koncentrácie karotenoidov (Obr. 2 – B1,3) kým v prípade 7-dňových klíčencov kukučiny sme zaznamenali podstatne nižší obsah karotenoidov (Obr. 2 – B2). Tieto výsledky korelujú aj s hodnotami  $F_v/F_m$  a  $\Phi_{PSII}$ , ktoré potvrdzujú pomerne nízku fotochemickú aktivitu fotosystému II v kvetoch a stonkách *C. europaea* (Obr. 3).



**Obr. 1.** *In vitro* kultúry *C. europaea* a *N. benthamiana*. Kalus odvodnený zo 7-dňových klíčencov *C. europaea* kultivovaný na MS médiu s  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D +  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  kinetínu (A) *C. europaea* a *N. benthamiana* na bezhormónovom MS médiu (B).

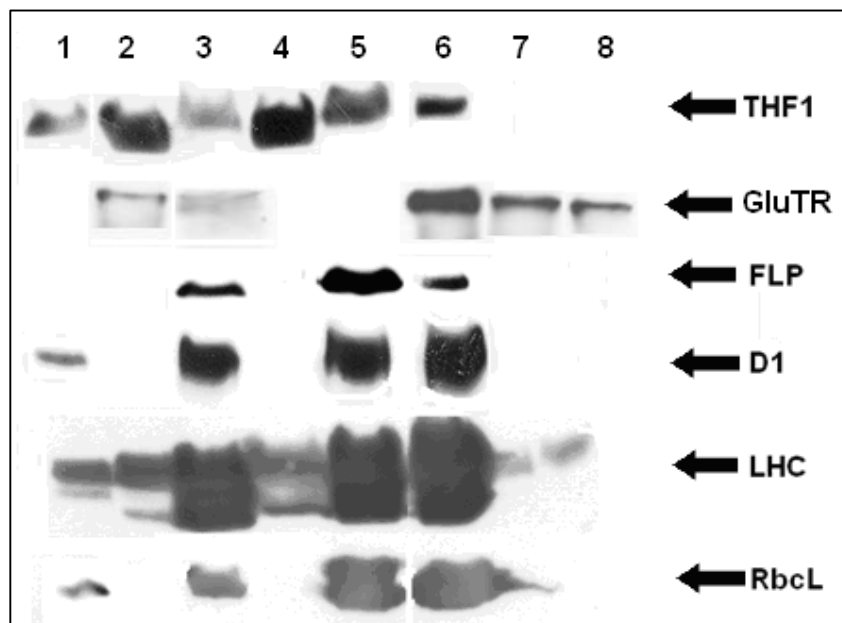


**Obr. 2.** Obsah Chl *a*, Chl *b* a karotenoidov v *C. europaea* a *N. benthamiana*. (1) – kukučina kvet, (2) – 7-dňový klíčeneček kukučiny, (3) – 30-dňová stonka kukučiny, (4) – list tabaku, (5) – stonka tabaku. FM – čerstvá hmotnosť. Dáta predstavujú ( $\pm$  stredné chyby) troch nezávislých experimentov. Malé písmenka v grafe (a, b, c, d) znamenajú štatisticky preukazné rodiely na hladine preukaznosti  $P < 0.05$  (*t*-test).

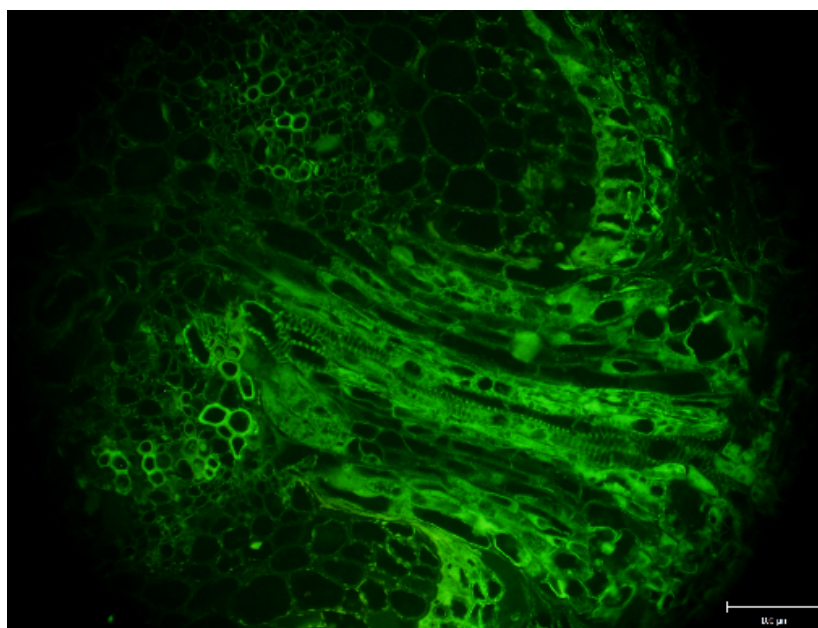


**Obr. 3.** Meranie fluorescence chlorofylov (efektívneho a maximálneho kvantového výťažku PSII) v stonkách (c) a kvetoch (f) *C. europaea* a stonkách (n) *N. benthamiana*.

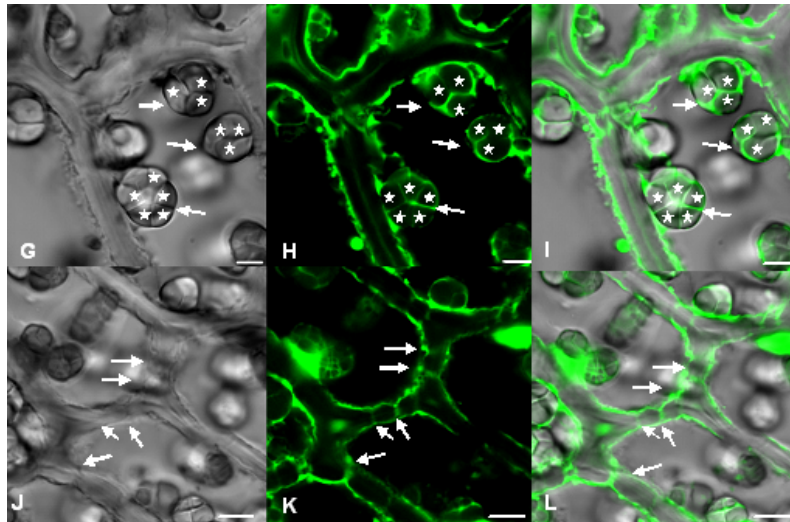
Western blot analýzy potvrdili nízke hladiny proteínov hrajúcich významnú úlohu pri biosyntéze chlorofylu (GluTR, FLP) ale aj LHCI a D1 proteínov. FLP proteín nebol v nami študovaných vzorkách kukučiny detegovaný (Obr. 4). Akumulácia THF1 proteínu, ktorý hrá významnú úlohu pri diferenciacii tylakoidov (Wang et al., 2004), bola najvyššia v haustóriu, v stonke kukučiny prichytenej na hostiteľa ako aj v stonke hostiteľa napadnutého kukučinou. V 7-dňových klíčencoch a kvetoch kukučiny THF1 proteín nebol detegovaný (Obr. 4). Tieto výsledky korelujú s výsledkami Western blot analýz, kde sme opäť potvrdili vysokú akumuláciu THF1 proteínu v haustóriách *C. europaea* a tiež v pletivách napadnutého hostiteľa (*Nicotiana benthamiana*). Zvýšená hladina THF1 proteínu v napadnutých pletivách hostiteľa môže byť reakciou na stres, vyvolaný prítomnosťou parazita. Vysokú akumuláciu THF1 proteínu sme pozorovali predovšetkým v mieste vaskulárneho prepojenia medzi hostiteľom a parazitom (Obr. 5). Amyloplasty v predĺžených bunkách haustória obsahovali 4-5 škrobových zŕn, ktoré zatlačali THF1 pozitívnu strómu do stredu, resp. na okraj plastidu (Obr. 6 G – I). Špeciálne v prípade týchto buniek, sme prítomnosť THF1 proteínu potvrdili aj v plazmatickej membráne a v plazmodezmách (Obr. 6 J – L).



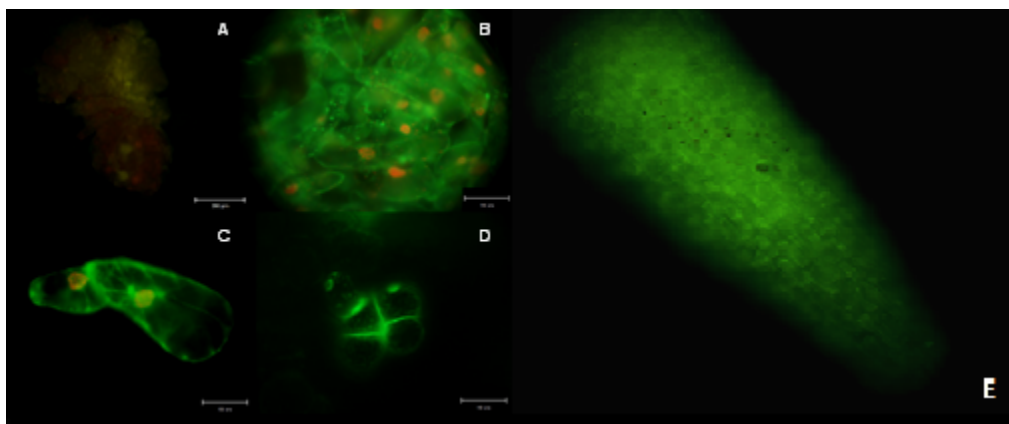
**Obr. 4.** Western blot analýza THF1, GluTR, FLP, D1, RbcL a LHCI v *C. europaea* (1) – 30-dňových stonkách, (2) – 30-dňových stonkách prichytených na hostiteľa, (4) – haustóriu, (7) 7-dňových klíčencoch, (8) – kvetoch a v *N. benthamiana* (3) – stonkách, (5) – stonkách napadnutých kukučinou, (6) – liste.



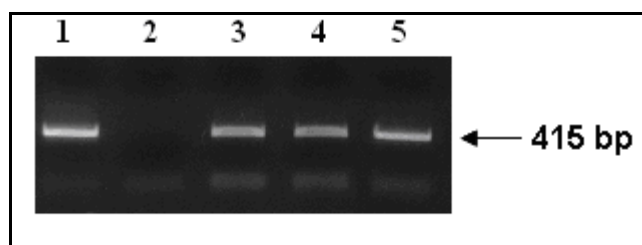
**Obr. 5.** Immunolokalizácia THF1 proteínu v mieste vaskulárneho prepojenia (h) medzi *C. europaea* (c) a *N. benthamiana* (n). Stonkové segmenty boli zaliate do Steedmanovho vosku, 10 μm hrubé rezy boli použité na anti-THF1:IgG-FITC immunoznačenie, mierka 100 μm.



**Obr. 6.** Immunoflorescenčná lokalizácia THF1 proteínu v predĺžených bunkách haustórií *C. europaea* (G – L). Šípky znamenajú amyloplasty v bunkách haustória (G – I), plazmodezmy v bunkách haustórií, mierka 100 µm.



**Obr. 7.** Expresia *gfp*-ER v kalusoch (A – D) a stonke *C. europaea* (E) po 21 dňoch od transformácie *A. tumefaciens* kmeň LBA4404, vektor pBIN-m-*gfp*5-ER.



**Obr. 8.** RT-PCR analýza transgénnych kalusov a stoniek kukučiny ukazuje expresiu *gfp*. 1 – pozitívna kontrola (plazmid), 2 – negatívna kontrola (netransformovaná stonka kukučiny), 3 – stonka kukučiny 14 dní po transformácii, 4 – stonka kukučiny 21 dní po transformácii, 5 – kalus kukučiny 21 dní po transformácii.



Cieľom našich ďalších experimentov bude študovať nielen lokalizáciu, ale predovšetkým funkciu THF1 proteínu v parazitických rastlinách kukučiny. Preto sme vypracovali techniku nepriamej transformácie týchto rastlín, kde chceme využiť gén (*gfp*) pre zelený fluorescenčný proteín, expresia ktorého môže byť vizualizovaná a kvantitatívne meraná v žijúcich pletivách (Hraška et al., 2006). Po transformácii kalusov a stonkových explantátov kukučiny pomocou *A. tumefaciens* s konštruktom pBIN GFP ER sme explantáty každých 7 dní pozorovali pod fluorescenčným mikroskopom. Aj po 21 dňoch sme potvrdili expresiu GFP proteínu v kalusoch (Obr. 7A – D) aj stonkových explantátoch (Obr. 7E) kukučiny. Expresiu *gfp* génu v stabilne transgénnych pletivách potvrdili aj výsledky RT-PCR analýzy (Obr. 8).

## ZÁVERY

Aj keď sa *C. europea* považuje za holoparazitický druh bez detegovateľného množstva chlorofylov, zistili sme, že mladé vývinové štádiá akumulujú relatívne vysoké hladiny Chl (*a+b*). Naše výsledky potvrdzujú nízku fotochemickú aktivitu PSII ako aj nízku akumuláciu študovaných proteínov fotosyntetického aparátu. Z uvedeného vyplýva, že fotosyntéza nie je primárny proces v plastidoch *C. europaea*. Na základe plastidovej ale hlavne extra-plastidovej lokalizácie THF1 proteínu v bunkách haustória predpokladáme signalizačnú funkciu tohto proteínu. Vysoký obsah škrobu v amyloplastoch v bunkách haustórií spolu s lokalizáciou THF1 proteínu do plazmodeziem týchto špeciálnych buniek podporuje fakt, že THF1 proteín by mohol byť zapojený do medzibunkovej komunikácie a signalizácie medzi parazitom a hostiteľskou rastlinou.

## LITERATÚRA

- Dawson J.H., Musselman L.J., Wolswinkel P., Dörr I. (1994): Biology and control of *Cuscuta*. *Rev. Weed Sci.* 6: 265-317.
- Haberhausen G., Zetsche K. (1994): Functional loss of all *ndh* genes in an otherwise relatively unaltered plastid genome of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa*. *Plant Mol. Biol.* 232: 154-161.
- Hraška M., Rakouský S., Čurn V. (2006): Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 86: 303-318.
- Huang J., Taylor J.P., Chen J.G., Uhrig J.F., Schnell D.J., Nakagawa T., Korth K.L., Jones A.M. (2006): The Plastid Protein Thylakoid Formation 1 and the Plasma Membrane G-Protein GPA1 Interact in a Novel Sugar-Signaling Mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1226-1238.
- Keren N., Ohkawa H., Welsh E.A., Liberton M., Pakrasi H.B. (2005): Psb29, a conserved 22-kD protein, functions in the biogenesis of photosystem II complexes in *Synechocystis* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 2768-2781.
- Lee K.B., Park J.B., Lee S. (2005): Morphology and anatomy of mature embryos and seedlings in parasitic angiosperm *Cuscuta japonica*. *J. Plant Biol.* 43: 22-27.
- Lichtenthaler H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148: 350-382.
- Machado M.A., Zetsche K. (1990): A structural, functional and molecular analysis of plastids of the holoparasites *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta europaea*. *Planta* 181: 91-96.
- Manning V.A., Hardison L.K., Ciuffetti L.M. (2007): Ptr ToxA interacts with a chloroplast-localized protein. *Mol. Plant Microbe In.* 20: 168-177.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15: 473-497.
- Panda M.M., Choudhury N.K. (1992): Effect of irradiance and nutrients on chlorophyll and carotenoid content and Hill reaction activity in *Cuscuta reflexa*. *Photosynthetica* 26: 585-592.

- Peltier J.B., Ytterberg A.J., Sun Q., van Wijk K.J. (2004): New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J. Biol. Chem.* 279: 49367-83.
- Peltier J.B., Cai Y., Sun Q., Zabrouskov V., Giacomelli L., Rudella A., Ytterberg A.J., Rutschow H., van Wijk K.J. (2006): The oligomeric stromal proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Mol. Cell. Proteom.* 5: 114-133.
- van der Kooij T.A.W., Krause K., Dörr I., Krupinska K. (2000): Molecular, functional and ultrastructural characterisation of plastids from six species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *Planta* 210: 701-707.
- Wang Q., Sullivan R.W., Kight A., Henry R.L., Huang J., Jones A.M., Korth K.L. (2004): Deletion of the chloroplast-localized Thylakoid formation gene product in *Arabidopsis* leads to deficient thylakoid formation and variegated leaves. *Plant Physiol.* 136: 3594-3604.
- Wangdi T., Uppalapati S.R., Nagaraj S., Ryu CH-M., Bender C.L., Mysore K.S. (2010): A role for chloroplast-localized *thylakoid formation 1* (*THF1*) in bacterial speck disease development. *Plant Signal. Behav.* 5: 425-427.
- Zhang L., Wei Q., Wu W., Cheng Y., Hu G., Hu F., Sun Y., Zhu Y., Sakamoto W., Huang J. (2009): Activation of the heterotrimeric G protein  $\alpha$ -subunit GPA1 suppresses the ftsh-mediated inhibition of chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 58: 1041-105.