

## DETECTION OF EXPRESSION OF THE *GUS* REPORTER GENE FUSED TO PLANT TISSUE SPECIFIC PROMOTER IN *E. COLI*

Martin Jopčík, Eva Boszorádová, Ildikó Matušiková, Jana Moravčíková, Jana Libantová

### ABSTRACT

The aim of most genetically modified organisms is production of specific proteins, therefore, the demand of well characterised transgenic expression appears to be necessary in respect of defining biosafety measures. In our experiments, the recognition of plant tissue specific promoter sequence by the bacterial RNA polymerase was detected in *Escherichia coli*. *In silico* analyses revealed the presence of sequence for putative TATAAT box, 246 bp upstream of eukaryotic translation start. Activity detection of some plant specific promoters in bacteria leads to the conclusion, that prokaryotic and eukaryotic transcription machinery are much less specific than initially expected.

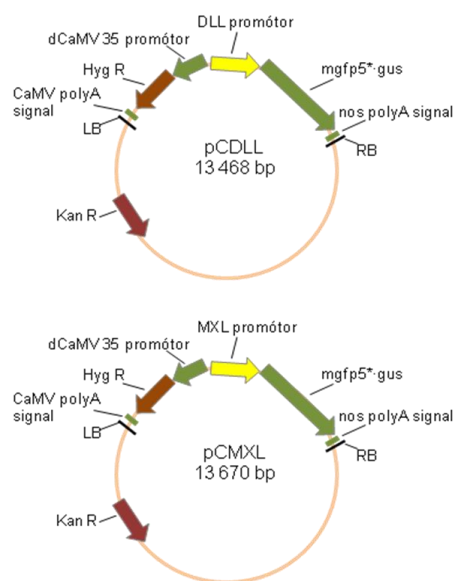
**Keywords:** *Escherichia coli*, plant specific promoter, safety measures, transcription

### INTRODUCTION

Expresné jednotky funkčné v rastlinných eukaryotických bunkách sa pripravujú v prokaryotických systémoch technikami rekombinantnej DNA. Na základe rozdielností transkripčného aparátu prokaryotických a eukaryotických organizmov sa vo všeobecnosti nepredpokladá funkčnosť rastlinných promótorov v bunkách *Escherichia coli*. Vyplýva to napríklad zo skutočnosti, že prepis v bakteriálnej bunke zabezpečuje RNA polymeráza, ktorá sa skladá  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  podjednotiek a je úzko spojená s funkčnosťou  $\sigma$  faktora (Eick et al. 1994). V eukaryotických bunkách sú funkčné až tri typy RNA polymeráz, I, II, III; pričom každá sa skladá z 10 – 15 podjednotiek a transkripčná iniciácia vyžaduje interakciu s rôznymi transkripčnými faktormi (Sentenac et al. 1992). Veľké rozdiely existujú aj v štruktúre prokaryotických a eukaryotických promótorov. Prokaryotické promótory sú relatívne kompaktné (kratšie ako 100 pb) a obsahujú dve krátke -10 a -35 konzervované konsenzus sekvencie umiestnené v protismere od transkripčného štartu. Eukaryotické promótory nemajú jednotnú štruktúru, mnohé z nich obsahujú TATA box v oblasti -25 – -45 v protismere od transkripčného štartu, iniciačný element v oblasti transkripčného štartu (TŠ) a ďalšie elementy ako CAAT box (-75 TŠ) GC box (-90 TŠ) a cis elementy udeľujúce pletivovú a bunkovú špecificitu. (Kanhare, Bansal 2005). Hoci existujú podstatné rozdielnosti pri prepise eukaryotických a prokaryotických génov, prekvapením bola funkčnosť rastlinného vírusového promótoru CaMV 35S v kvasinkách, ľudských nádorových bunkách a dokonca aj v prokaryotoch (Assaad, Singer, 1990; Pobjecky et al. 1990; Guilley et al. 1982). Aj v prípade niektorých rastlinných špecifických promótorov bola zistená aktivita v prokaryotických organizmoch (Jacob et al. 2002). Existujú prípady, kedy neočakávaná funkčnosť eukaryotickej expresnej jednotky v prokaryotickom organizme nie je akceptovateľná, napríklad ak by rekombinovaný proteín bol v baktériách funkčný a zároveň pre bunky toxický. Iným príkladom sú vektory obsahujúce samozostrihujúce Cre/loxP kazety s miestom účinku v rastlinnej bunke, čo je zabezpečované tým, že cre rekombináza riadi pre rastliny špecifický promótor. Jeho predčasná aktivita v baktériách by spôsobila predčasný zostrih kazety už v *E. coli*. Preto sa aspoň v niektorých prípadoch javí ako opodstatnené preveriť aktivitu eukaryotického promótoru v baktériách.

### MATERIAL AND METHODOLOGY

Na preverenie aktivity rastlinných pletivovo špecifických promótorov DLL a MXL (Tabuľka 1) v *Escherichia coli* sme použili vektorové konštrukcie pripravené podľa postupu (Jopčík et al. 2010). V T-DNA oblasti obsahovali hygromycínový gén fúzovaný s dCaMV35S promótorom a klonovaný príslušný pletivovo špecifický promótor fúzovaný s *gfp:gus* reportérovými génmi. V kostre vektora sa vyskytovala sekvencia pre gén neomycín fosfotransferázu III zabezpečujúca expresiu v baktériách (Obrázok 1).



Obrázok 1 Schéma pripravených vektorových konštrukcií

Kvantitatívne meranie GUS aktivity sme uskutočnili fluorimetricky podľa Kaufusiho et al. (2004). Princípom metódy je lýzia buniek v GUS extrakčnom roztoku obsahujúcom lyzozým [50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7), 10mM  $\beta$  – merkaptoetanol, 10 mM EDTA, 0.1% laurylsarkozín sodný, 0.1% Triton X-100, 1mg/ml lyzozým]. Následne sme 2  $\mu$ l lyzátu zmiešali s 200  $\mu$ l pufru pre fluorimetrické stanovenie [1mM 4-methylumbelliferyl-b-D-glukuronidu (MUG) v GUS extrakčnom pufri] a nechali inkubovať 1 hodinu pri 37 °C. Fluorimetrické meranie GUS aktivity sme uskutočnili na fluorimetri (Fluoroskan II, TITERTEK) pomocou exitačného a emisného filtra s vlnovou dĺžkou 355 nm/450 nm a vyhodnotili sme ju ako množstvo vytvoreného produktu (MU) za hodinu na ml kultúry *E. coli* s vektorom

obsahujúcim testovaný promótor ( $OD_{600nm}$  1). Ako kontrolu sme použili kmeň *E. coli* DH5 $\alpha$  bez plazmidu. Robili sme tri opakovania experimentov.

**Tabuľka 1 Charakteristika rastlinných pletivovo špecifických promótorov v pôvodnom organizme**

Konstrukt	Označenie génu*	Funkcia**	Veľkosť promótoru (pb)***
CMXL	At5g38170	Proteázový inhibítor/zásobný proteín/lipidový transportný proteín	1846
CDLL	At4g16160	Mitochondriálny importný membránový proteín	1644

\*Označenie príslušného génu v TAIR databáze (<http://www.arabidopsis.org>)

\*\*Funkcia génu klonovaného promótoru v pôvodnom organizme *Arabidopsis thaliana*

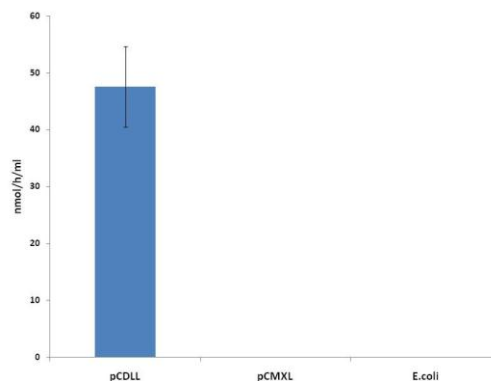
\*\*\*Veľkosť klonovaného fragmentu promótoru (pb)

## RESULTS AND DISCUSSION

Fluorimetrické merania GUS aktivity ukázali, že rastlinný pletivovo špecifický promótor DLL, ktorý bol fúzovaný s *gfp:gus* génmi bol schopný riadiť expresiu *gus* génu v baktériách (Obrázok 2). Pri testovaní promótoru CMXL sme nezískali preukazné výsledky o jeho prípadnej (veľmi nízkej) aktivite v baktériách. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  obsahuje aj vlastný gén pre  $\beta$ -D-glukuronidázu (*gusA*), ktorého expresia je indukovateľná viacerými glukuronidmi. Reakčné podmienky v navrhnutom fluorimetrickom meraní boli však navrhnuté tak, aby neumožnili detekciu GUS aktivity pochádzajúcej z endogénneho génu, ale len aktivitu GUS enzýmu, prislúchajúceho génu funkčne spojeného s rastlinným pletivovo špecifickým promótorom na plazmidovej DNA.

Analýza rastlinných pletivovo špecifických promótorov *in silico* odhalila v prípade promótoru DLL sekvenciu pre bakteriálny Pribnow box TATAAT, na ktorý by sa mohla viazať bakteriálna RNA polymeráza, vo vzdialenosti 246 pb v protismere od eukaryotického translačného štartu. Na definitívne potvrdenie funkčnosti promótoru v baktériách by však bolo potrebné dokázať tvorbu špecifických transkriptov v baktériách napríklad pomocou 5'RACE kitu (Invitrogen). Potvrdenie aktivity niektorých rastlinných promótorov v baktériách aj inými autormi (Janssens et al. 1984; Lewin et al. 1998; Jacob et al. 2002) vedie k záveru, že eukaryotické a prokaryotické transkripčné mašinerie sú omnoho menej špecifické ako sa pôvodne predpokladalo.

V budúcnosti sa očakáva, že transgénne organizmy sa budú stále viac využívať ako potrava, krmivo či na produkciu terapeuticky aktívnych látok. Keďže cieľom prípravy transgénnych organizmov je produkcia špecifických proteínov, požiadavka dôslednej charakterizácie regulačných elementov génovej expície sa javí stále viac opodstatnená.



**Obrázok 2 Grafické znázornenie aktivity rastlinných pletivovo špecifických promótorov v baktériách. Ako kontrolu sme použili *E. coli* DH5 $\alpha$ .**

## CONCLUSION

Pri detailnej charakterizácii rastlinného pletivovo špecifického promótoru DLL sme detekovali jeho aktivitu prokaryotických bunkách *Escherichia coli*. Analýza *in silico* odhalila prítomnosť sekvencie, ktorá je v prokaryotických promótoroch označovaná ako Pribnow box a predstavuje potenciálne miesto pre väzbu RNA polymerázy na promótor pred iniciáciou transkripcie. Stupeň heterologickej génovej expície môže byť dostatočný na expresiu génov pre toxické proteíny, čo musí byť dôsledne zvážené pri definovaní hodnotenia rizika príslušného geneticky modifikovaného organizmu.

## REFERENCES

- ASSAAD, F.F., SIGNER, E.R., 1990. Cauliflower Mosaic Virus P35S promoter activity in *Escherichia coli*. In *Molecular & General Genetics*, vol. 223, 1990, p. 517-520.
- EICK, D., WEDEL, A., HEUMANN, H., 1994. From initiation to elongation - comparison of transcription by prokaryotic and eukaryotic RNA- polymerases. In *Trends in Genetics*, vol. 10, 1994, p. 292-296.
- GUILLEY, H., DUDLEY, R. K., JONARD, G., BALAZS, E., RICHARDS, K. E. 1982. Transcription of Cauliflower Mosaic Virus DNA: Detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. In *Cell*, vol. 30, 1982, p. 763-773.
- JACOB, D., LEWIN, A., MEISTER, B., APPEL, B., 2002. Plant-specific promoter sequences carry elements that are recognised by the eubacterial transcription machinery. In *Transgenic Research*, vol. 11, 2002, p. 291-303.
- KAUFUSI, P.H., FORSBERG, L.S., TITABUTR, P., BORTHAKUR, D., 2004. Regulation of exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium* sp strain TAL1145 involves an alternative sigma factor gene, rpoH2. In *Microbiology-Sgm*, vol. 150, 2004, p. 3473-3482.
- JANSSENS, A., ENGLER, P., ZAMBRYSKI, P., VAN MONTAGU, M. 1984. The nopaline C58 T-DNA is transcribed in *Agrobacterium tumefaciens*. In *Mol Gen Genet*, vol. 220, 1984, p. 314-316.
- JOPČÍK, M., LIBANTOVÁ, J., MATUŠÍKOVÁ, I., SALAJ, J., BOSZORÁDOVÁ, E., MORAVČÍKOVÁ, J. 2010. Aktivita

rastlinných pletivovo špecifických promótorov v prokaryotických bunkách. In: *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín*. 2010, Piešťany, ISBN 978-80-89417-23-0, s.124 – 125

KANHERE, A., BANSAL, M. 2005. Structural properties of promoters: similarities and differences between prokaryotes and eukaryotes. In *Nucleic Acids research*, vol. 33, p. 3165-3175.

LEWIN, A., MAYER, M., CHUSAINOW, J., JACOB, D., APPEL, B., 2005. Viral promoters can initiate expression of toxin genes introduced into *Escherichia coli*. In *BMC Biotechnology*, vol. 5, 2005, p.1-9.

POBJECKY, N., ROSENBERG, G.H., DINTER-GOTTLIEB, G., KAUFER, N.F., 1990. Expression of the beta- glucuronidase gene under the control of the CAMV-35S promoter in *Schizosaccharomyces pombe*. In *Molecular & General Genetics*, vol.220, 1990, p. 314-316.

SENTENAC, A., RIVA, M., THURIAUX, P., BUHLER, J.M., TREICH, I., CARLES, C., WERNER, M., RUET, A., HUET, A., MANN, C., CHIANNILKULCHAI, N., STETTLER, S., MARIOTTE, S. 1992. Yeast RNA polymerase subunits and genes. In *Transcriptional regulation*. Edited by McKinght SL, Yamamoto KR. Cold Spring Harbor, New York. 1992, p. 27-54.

### Acknowledgments:

Táto práca bola vypracovaná v rámci EEA grant SAV-FM-EHP-2008-02-01 a VEGA 2/0011/08.

### Contact address:

Martin Jopčík, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra Slovakia, Email: [martin.jopcik@savba.savba.sk](mailto:martin.jopcik@savba.savba.sk).

Eva Bozsorádová, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra Slovakia, Email: [eva.boszoradova@savba.savba.sk](mailto:eva.boszoradova@savba.savba.sk).

Ildikó Matušiková, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra Slovakia, Email: [ildiko.matusikova@savba.savba.sk](mailto:ildiko.matusikova@savba.savba.sk).

Jana Moravčíková, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra Slovakia, Email: [jana.moravcikova@savba.savba.sk](mailto:jana.moravcikova@savba.savba.sk)

Jana Libantová, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Slovak Academy of Sciences, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra Slovakia, Email: [jana.libantova@savba.savba.sk](mailto:jana.libantova@savba.savba.sk)

.sk.