

ECTOPIC ACTIVITY OF CRUCIFERIN PROMOTER AND ITS INFLUENCE ON THE PREMATURE EXCISION *LOXP* EMBEDDED DNA IN TRANSGENIC PLANTS.

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

ABSTRACT

This work is focused on ectopic activity of cruciferin *cruC* promoter that leads to premature expression of *cre* recombinase gene in self-excision *Cre/loxP* strategy. The *cruC* is strong tissue embryo-specific promoter, therefore, *cre* recombinase driven by this promoter should be active during seed development. Based on our previous results, the presence of strong double dCaMV 35S promoter could be one of the possible factors that affects expression pattern of the *cre* gene. To evaluate this possibility, in another vector construct dCaMV 35S promoter (previously used to control reporter *gus* gene) was replaced by the light regulated *Lhca3.St.1* promoter and cloned in inverted orientation with respect to *loxP*-embedded cassette. T-DNA of binary vector was introduced into tobacco genome via *Agrobacterium*-mediated transformation. Although our results showed that the presence of strong dCaMV 35S promoter can partially influence ectopic *cruC* activity, another factors such some type of a(biotic) stress should be also considered.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, cruciferin, *cre* recombinase, ectopic expression

INTRODUCTION

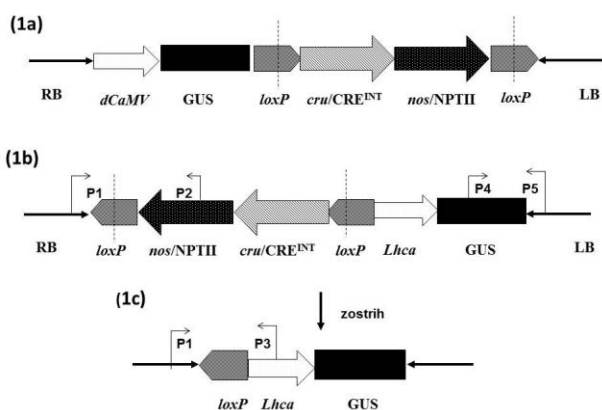
Selektčné markerové gény zohrávajú významnú úlohu v procese transformácie rastlín tým, že dávajú selektívnu výhodu pre to málo buniek, čo dokázali prijať cudziu DNA. Získaním transgénnych rastlín ich úloha však zaniká. *Cre/loxP* rekombinačný systém predstavuje jednu z viacerých stratégií, ktoré boli doposiaľ navrhnuté za účelom eliminácie selektčného markerového génu z genómu transgénnych rastlín. *Cre/loxP* systém pozostáva z *cre* rekombinázového génu a dvoch 34 pb *loxP* sekvencií. *Cre* rekombináza sprostredkováva rekombinačnú udalosť medzi dvoma *loxP* sekvenciami v rovnakej orientácii. V stratégií samozostrihu, na jednej T-DNA medzi dvoma *loxP* sekvenciami je umiestnený *cre* rekombinázový gén spolu so selektčným markerovým génom. Po aktivácii *cre* rekombinázy dochádza k zostrihu DNA sekvencií umiestnených medzi *loxP* miestami. *Cre* rekombináza je riadená indukovateľným promótorom, ktorý môže byť aktivovaný externými stimulmi a to zmenou teploty (Hoff et al., 2001; Liu et al., 2005, Wang et al. 2005; Cuellar et al., 2006) alebo chemikáliami ako napr. β -estradiolom (Zuo et al., 2001; Sreekala et al., 2005; Zhang et al., 2009) alebo kyselinou salicylovou (Ma et al., 2008). Ďalší postup využíva promótor, ktoré sú aktívne v určitom type pletiva a v určitom vývinovom štádiu. Ich výhodou je, že sú súčasťou rastlinnej biológie. V stratégii samozostrihu bol takto doteraz využitý peľovo-špecifický promótor *ntm19* (Mlynárová et al., 2006), embryo-špecifické promótor *app1* (Li et al. 2007), *pab5* (Luo et al., 2007), kruciferínový *cruC* (Moravčíková et al., 2008) alebo napínový (Kopertek et al., 2010). Cieľom tejto práce je nadviazať na predchádzajúce výsledky týkajúce sa využitia kruciferínového *cruC* promótoru (izolovaného z *Arabidopsis thaliana*)

v *Cre/loxP* stratégií (Moravčíková et al., 2008). Napriek tomu, že *cruC* je považovaný za embryo-špecifický promótor, ktorý je aktívny v stredne-globulárnom až skorom srdcovom štádiu vývinu embrya (Becerra et al. 2006), v predchádzajúcich experimentoch, v procese regenerácie transformovaných buniek došlo k predčasnému čiastočnému odstráneniu selektčného markerového génu už v T_0 rastlinách. Jednou z príčin predčasného zostrihu mohla byť prítomnosťou silného dvojitého dCaMV35S promótoru (Obrázok 1a), ktorý bol umiestnený blízko *cru/cre* expresnej jednotky a mohol stimulovať aktivitu *cruC* promótoru. V snahe zabrániť nežiaducej predčasnej expresii *cre* rekombinázy, pripravili sme vektorovú konštrukciu, v ktorej sme dCaMV 35S promótor nahradili s *Lhca3.St.1* promótorom (Obrázok 1b). Získané transgénne rastliny sme podrobili analýzám, za účelom overenia, či zmenou promótorovej sekvencie došlo k eliminácii predčasného zostrihu selektčného markerového génu.

MATERIAL AND METHODOLOGY

Plazmid pEV8 (Obrázok 1a) bol vytvorený klonovaním dvoch fragmentov *loxP-nosT/nptII/nos* a *nosT/cre^{INT}/cruC-loxP-lha3St.1/gus/nosT* do binárneho vektora pUN (Vaculková et al., 2007). Plazmid pEV8 bol vnesený do bakteriálneho kmeňa *Agrobacterium tumefaciens* AGLO. Stabilita plazmidu bola overená restriktčnou analýzou po retransformácii do *Escherichia coli*. Listové disky tabaku (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1) boli transformované pomocou *A. tumefaciens* AGLO/pEV8 metódou podľa Horsch et al. (1985). Transformované pletivo bolo regenerované na regeneračnom médiu s obsahom 50 mg/l kanamycínu. Histochemické stanovenie GUS aktivity sme uskutočnili metódou podľa Jefferson et al. (1987). Listové explantáty boli inkubované v 50 mM fosfátovom pufrí (pH 7) s obsahom 2mM 5-bromo-4-chloro-

3-indolyl glukuronid (X-Gluc, Duchefa) pri teplote 37°C v tme cez noc. Genomickú DNA sme izolovali z listov tabaku pomocou DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). PCR analýzu sme uskutočnili pomocou sady primerov P1/P2, P1/P3 a P4/P5 (Tabuľka 1, Obrázok 1a, 1b). PCR reakciu sme uskutočnili v 50 µl objeme, ktorý tvoril 100-200 ng DNA ako templát, 15 pmol každého primeru, 200 µM dNTPs, 1xPCR reakčný pufo a 1U Taq DNA polymerázy (Finnzymes). Profil reakcie PCR pozostával z inkubácie reakčnej zmesi 4 minúty pri 94°C a následne z 35 cyklov: denaturácia pri teplote 94°C 45 sekúnd, hybridizácia pri 64°C 45 sekúnd, syntéza pri 72°C 2 minúty. Posledný cyklus bol uskutočnený pri teplote 72°C 7 minút.



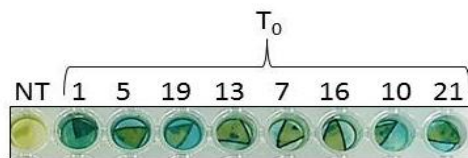
Obrázok 1. T-DNA rastlinného transformačného vektora (1a) T-DNA pozostáva z β-glukuronidázového (*gus*) génu pod kontrolou dvojitého dCaMV35S promótoru a *loxP* sekvenciami ohraničenej kazety pozostávajúcej z intrón obsahujúceho *cre* rekombinázového génu riadeného kruciferinovým (*cre*) promótorom a neomycín fosfotransferázového (*nptII*) génu fúzaného s *nos* promótorom. *LoxP* sekvencie sú v rovnakej orientácii. **(1b)**. T-DNA pozostáva z β-glukuronidázového (*gus*) génu pod kontrolou svetlocitlivého *Lhca*3.St.1 promótoru a *loxP* sekvenciami ohraničenej kazety pozostávajúcej z intrón obsahujúceho *cre* rekombinázového génu riadeného kruciferinovým (*cre*) promótorom a neomycín fosfotransferázového (*nptII*) génu fúzaného s *nos* promótorom. *LoxP* sekvencie sú v rovnakej orientácii. Primery, ktoré boli použité na PCR analýzu sú označené ako P1/P2 a P4/P5. **(1c)** Konfigurácia T-DNA po zostrihu DNA ohraničenej *loxP* sekvenciami. Primery použité na PCR analýzu sú označené ako P1/P3.

Tabuľka 1 Zloženie primerov použitých na PCR analýzy

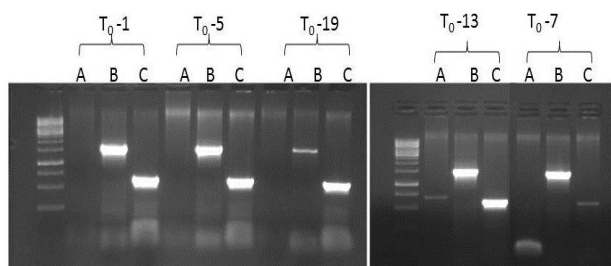
P1	5'-TGT GCT GCA AGG CGA TTA AGT TGG-3'
P2	5'-ACC TTG CTC CTG CCG AGA AAG TAT-3'
P3	5'-ACT TCT GAG GGA CAT GTT TGG GCT-3'
P4	5'-GAT AAC GTG CTG ATG GTG CACGAC-3'
P5	5'-GGC AAT ACT CCA CAT CAC CAC GCT-3'

RESULTS AND DISCUSION

Genetickou transformáciou pomocou *A. tumefaciens* sme vniesli T-DNA binárneho vektora pEV8 do genómu tabaku. Transformované listové pletivá sme regenerovali pod selekčným tlakom antibiotika kanamycínu. Na základe predchádzajúcich problémov s regeneráciou pletív transformovaných s T-DNA obsahujúcou samozostrihujúcu *loxP* kazetu (Moravčíková et al., 2008) sme sa rozhodli regenerované rastlinky udržiavať za neselektívnych podmienok. Za transgénnne rastliny sme považovali len tie, u ktorých sme potvrdili histochemicky GUS aktivitu (Obrázok 2). 14 rastlín s dobre detekovateľnou GUS aktivitou sme podrobili PCR analýzám (Obrázok 3). PCR analýzy potvrdili prítomnosť *gus* a *nptII* génu vo všetkých analyzovaných T₀ rastlinách (Tabuľka 2). V ďalšej časti experimentov sme sledovali prípadný predčasný zostrih v T₀ rastlinách. V prípade, že by došlo k predčasnej aktivácii *cre* rekombinázy, PCR reakciou s primerami P1/P3 by sme amplifikovali fragment korešpondujúci k sekvencii po zostrihu (Obrázok 1b). Naše výsledky ukázali, že 0.69 kb P1-P3 PCR fragment sme detekovali v prípade 7 zo 14 analyzovaných T₀ rastlín (Obrázok 3, dráha A; Tabuľka 2). Keďže u všetkých T₀ rastlín sme dokázali prítomnosť *nptII* génu, týchto 7 rastlín bolo chimerických pre *nptII* gén. U zvyšných T₀ rastlín nedošlo k predčasnej aktivácii *cre* génu. Naším cieľom bolo zistiť, či zmenou promótorovej sekvencie, ktorá riadi expresiu *gus* reprotérového génu došlo k eliminácii ektoptickej aktivácie *cre* promótoru. V našich predchádzajúcich experimentoch (Moravčíková et al., 2008) všetky T₀ rastliny boli chimerické pre *nptII* gén ako dôsledok ektoptickej aktivácie *cre* promótoru. V literatúre sa uvádza, že silný CaMV 35S promótor môže interferovať s pletivovo a orgán špecifickými promótorami (Zheng et al. 2007). Zmenou promótorovej sekvencie sme síce dokázali získať T₀ rastliny, v ktorých nedošlo k ektoptickej aktivácii *cre* promótoru, ale zároveň aj chimerické T₀ rastliny. Zdá sa, že na ektopickú aktivitu *cre* promótoru má vplyv nielen prítomnosť dCaMV35S sekvencie, ale pravdepodobne je to kombinácia silného promótoru a určitého typu a(biotického) stresu. V AMD database (Zimmermann et al., 2004) sa uvádza, že expresia génu z *cre* promótoru môže byť aktivovaná aj agrobaktériom, ktoré prežíva určitý čas po transformácii na povrchu rastlinných buniek.



Obrázok 2 Histochemické stanovenie GUS aktivity v pletivách T₀ rastlín. Aktivita *gus* génu sa prejavila modrým sfarbením v mieste enzymatickej reakcie. NT – netransgénny tabak ako kontrola.



Obrázok 3 Produkty PCR reakcie detekované v etídium bromidovom 1% agarózovom géle.

Dráha A: PCR produkty s primerami P1/P3 amplifikujúce 0.69 kb fragment korešpondujúci k DNA sekvencii po predčasnom zostrihu *nptII* génu (NPT-) (Obrázok 1b). Dráha B: PCR produkty s primerami P1/P2 amplifikujúce 1.54 kb fragment korešpondujúci ku *nptII* génu (NPT+) (Obrázok 1a). Dráha C: PCR produkty s primerami P4/P5 amplifikujúce 0.59 kb fragment korešpondujúci ku *gus* génu (GUS+) (Obrázok 1a). Prvá dráha obsahuje 1 kb DNA ladder (Fermentas).

Tabuľka 2 PCR analýzy T₀ rastlín

Línia	PCR ^a		
	(GUS+)	(NPT+)	(NPT-)
	P4-P5	P1-P2	P1-P3
T ₀ -1	+	+	-
T ₀ -5	+	+	-
T ₀ -7	+	+	-
T ₀ -9	+	+	+
T ₀ -10	+	+	+
T ₀ -11	+	+	-
T ₀ -13	+	+	+
T ₀ -14	+	+	-
T ₀ -16	+	+	+
T ₀ -17	+	+	+
T ₀ -19	+	+	-
T ₀ -21	+	+	+
T ₀ -22	+	+	-
T ₀ -25	+	+	+

^a PCR analýzy s primerami potvrdzujúce prítomnosť *gus* génu (GUS+), prítomnosť *nptII* génu (NPT+) a prípadný predčasný zostrih *nptII* génu (NPT-)

CONCLUSION

Genetickou transformáciou tabaku sme získali sadu transgénnych rastlín, u častí ktorých sme detekovali predčasné odstránenie selekčného markerového génu v dôsledku ektoptickej aktivácie *cruc* promótoru. Zmenou promótorovej sekvencie, ktorá riadila expresiu reportérového *gus* génu sme dokázali čiastočne eliminovať predčasné odstránenie sekvencií umiestnenými medzi dvoma *loxP* miestami.

REFERENCES

- BECERRA C., PUIGDOMENECH P, VICIENT CM 2006. Computational and experimental analysis identifies Arabidopsis genes specifically expressed during early seed development. In *BMC Genomics* 7, 38, 2006, doi:10.1186/1471-2164-7-38
- CUELLAR, W. – GAUDIN, A. – SOLÓRZANO, D. – CASAS, A., NOPO, L., CHUDALAYANDI, P., MEDRANO, G., KREUZE, J., GHISLAIN, M. 2006. Self-excision of the antibiotic resistance gene *nptII* using a heat inducible *Cre-loxP* system from transgenic potato. In *Plant Molecular Biology*, vol. 62, 2006, no. 1-2, p. 71-82.
- HOFF, T., SCHNORR, K. M., MUNDY, J. 2001. A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. In *Plant Molecular Biology*, vol. 45, 2001, no. 1, p. 41-49.
- HORSCH, R. B., FRY, J. E., HOFFMANN, N. L., EICHHOLTZ, D., ROGERS, S. G., FRALEY, R. T. 1985. A simple and general method for transferring into plants. In *Science*, vol. 227, 1985, no. 4691, p. 1229-1231.
- JEFFERSON, R. A., KAVANAGH, T. A., BEVAN, M. W. 1987. GUS fusion: β -glucuronidase as sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. In *The EMBO Journal*, vol. 6, 1987, no. 13, p. 3901-3908.
- KOPERTEKH, L., SCHULZE, K., FROLOV, A., STRACK, D. 2010. Cre-mediated seed-specific transgene excision in tobacco. In *Plant Molecular Biology*, vol. 72, 2010, no. 6, p. 597-605.
- LIU, H. K., YANG, CH., WEI, Z. M. 2005. Heat shock-regulated site-specific excision of extraneous DNA in transgenic plants. In *Plant Science*, vol. 168, 2005, no. 4, p. 997-1003.
- MA, B., XIAOYU, D., MA, CH., NIU, J., ZHANG, H., PAN, L. 2008. Salicylic-acid-induced self-excision of the marker gene *nptII* from transgenic tomato using the *Cre-loxP* system. In *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 26, 2008, no. 3, p. 199-212.
- MLYNÁROVÁ, L., CONNER, A. J., NAP, J. P. 2006. Directed microspore-specific recombination of transgenic alleles to prevent pollen-mediated transmission of transgenes. In *Plant biotechnology Journal*, vol. 4, 2006, no. 4, p. 445-452.
- MORAVČIKOVÁ, J., VACULKOVÁ, E., BAUER, M., LIBANTOVÁ, J. 2008. Feasibility of the seed specific cruciferin C promoter in the self excision *Cre/loxP* strategy focused on generation of marker-free transgenic plants. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 117, 2008, no. 8, p. 1325-1334.
- SREEKALA, C., WU, L., GU, K., WANG, D., TIAN, D., YIN, Z. 2005. Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated *Cre/loxP* system. In *Plant Cell Reports*, vol. 24, 2005, no. 2, p. 86-94.
- VACULKOVÁ, E., MORAVČIKOVÁ, J., MATUŠÍKOVÁ, I., BAUER, M., LIBANTOVÁ, J. 2007. A modified low copy number binary vector pUN for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biol Plantarum* 51:538-540
- WANG, Y., CHEN, B., HU, Y., LI, J., LIN, Z. 2005. Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the *Cre/lox* site-specific recombination system. In *Transgenic Research*, vol. 14, 2005, no. 5, p. 605-614
- ZHANG, Y., LIU, H., LI, B., ZHANG, J. T., LI, Y., ZHANG, H. 2009. Generation of selectable marker-free transgenic tomato resistant to drought, cold and oxidative stress using the *Cre/loxP* DNA excision system. In *Transgenic Research*, vol. 18, 2009, no. 4, p. 607-619.
- ZHENG, X., DENG, W., LUO, K., DUAN, H., CHEN, Y., MCAVOY, R., SONG, S., PEI, Y., LI, Y. 2007. The

cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters. In *Plant Cell Rep* 26:1195–1203

ZIMMERMANN, P., HIRSCH-HOFFMANN, M., HENNIG, L., GRUISSEM, W. 2004. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. In *Plant Physiol* 136:2621–2632

ZUO, J., NIU, Q. W., MOLLER, S. G., CHUA, N. H. 2001. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. In *Nature Biotechnology*, vol. 19, 2001, p. 153-161.

Acknowledgments:

This work was supported by grants SAV-FM-EHP-2008-02-01 and VEGA 2/0011/08.

Contact address:

Jana Moravčíková, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, SAS, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra, Slovakia, email: jana.moravcikova@savba.sk

Zuzana Polóniová, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, SAS, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra, Slovakia, email: zuzana.poloniova@savba.sk

Martin Jopčík, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, SAS, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra, Slovakia, email: martin.jopcik@savba.sk

Eva Boszorádová, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, SAS, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra, Slovakia, email: eva.boszoradova@savba.sk

Ildikó Matušíková, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, SAS, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra, Slovakia, email: ildiko.matusikova@savba.sk

Jana Libantová, Institute of Plant Genetics and Biotechnology, SAS, Akademická 2, P.O.Box 39A, 950 07 Nitra, Slovakia, email: jana.libantova@savba.sk