

Establishing a Two-Plasmid System for the Selection of Active ZincFinger-Flp Mutants in the Context of Directed Evolution

Hartmann Jonas

Molecular Life Sciences, Molekulare Bioanalytik

Hochschule für Life Sciences FHNW, 4132 Muttenz

KURZZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war die Etablierung eines molekularen Selektionssystems zur gerichteten Evolution von programmierbaren Zinkfinger-Flp-Rekombinasen. Dazu wurde ein genetisches System aus zwei Plasmiden generiert, das bakterielles Wachstum auf Ampicillin nur bei Expression einer aktiven Rekombinase erlauben sollte. Die Resultate bestätigen das grundsätzliche Prinzip dieser Methode, jedoch wird eine praktische Anwendung in der gerichteten Evolution durch biologische Variabilität verunmöglicht.

EINLEITUNG

In der Molekular- und Zellbiologie ist die gezielte Veränderung von Genomen ein grundlegender Prozessschritt. Die etablierten Methoden unterliegen aber zahlreichen Limitationen. Diese könnten durch Zinkfinger-Rekombinasen mit programmierbarer Sequenzspezifität überwunden werden.

Um die Flippase (Flp) durch gerichtete Evolution funktionell mit einem Zinkfinger (ZF) kombinieren zu können, muss zunächst ein Selektionsassay etabliert werden. Dies wurde über ein System mit zwei Plasmiden versucht:

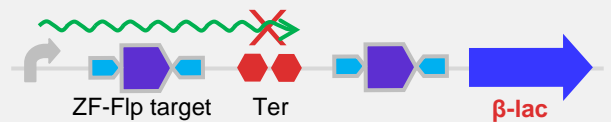
Das Expressionsplasmid codiert für die Flp-Rekombinase.

Das Detektionsplasmid codiert für β -Lactamase, welche Ampicillinresistenz vermittelt. Sie kann nur abgelesen werden, wenn Flp aktiv ist und zwei Terminatoren aus dem Plasmid herausrekombiniert (Kasten rechts).

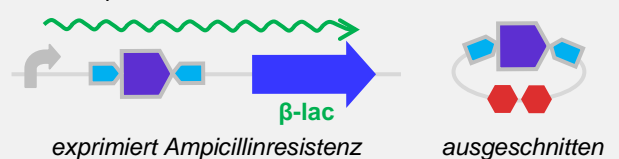
Die beiden Plasmide wurden zunächst kloniert bzw. synthetisiert und in *E. coli* cotransformiert. Anschliessend wurde das Verhalten dieses genetischen Systems untersucht.

DAS SELEKTIONSSYSTEM

Detektionsplasmid normal:



Detektionsplasmid nach Rekombination:



RESULTATE

Die Plasmide konnten erfolgreich kloniert und in einen Expressionsstamm cotransformiert werden. In den Selektionsversuchen zeigten sich dann verschiedene Probleme mit dem System.

Das IPTG, das zur Aktivierung des Systems benutzt wurde, löst gleichzeitig einen toxischen Effekt aus. Wie Kontrollen zeigen, ist dieser aber nicht direkt auf die Substanz selbst zurückzuführen und auch nicht auf eine Genotoxizität, die theoretisch durch die Überexpression der Flp-Rekombinase ausgelöst werden könnte. Vielmehr deutet alles darauf hin, dass das Detektionsplasmid selbst bzw. dessen partielle Transkription die Toxizität verursacht. Der Mechanismus dafür ist aber völlig unklar.



Flp-DNA-Komplex
(Holliday-Junction Intermediate)

Ein weiteres Problem ist die hohe biologische Variabilität: Die Anzahl Kolonien auf einer Selektionsplatte, die als Mass der Resistenz gegen Ampicillin dient, kann sich zwischen zwei Replikaten um bis zu 50% unterscheiden.

Dennoch konnte für den Stamm, der sowohl wild-typ Flp als auch dessen target-Sequenz enthält – also optimale Bedingungen für eine Rekombination – eine klar erhöhte Resistenz festgestellt werden. Dies lässt darauf schliessen, dass das System prinzipiell funktioniert, trotz seiner Anfälligkeit für Störungen und Fluktuationen. Allerdings konnte auch bei diesem Stamm kein zweifelsfreier molekularer Nachweis für die Rekombination erbracht werden.

SCHLUSSFOLGERUNG

Die Resultate geben starke Indizien dafür, dass eine Flp-Expression stattfindet, auch wenn sie nicht direkt nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren deuten sie darauf hin, dass in mindestens einem Stamm eine Rekombination stattgefunden hat. Grundsätzlich scheint das System also funktionell zu sein.

Durch die hohe Variabilität und die IPTG-induzierte Toxizität gibt es aber noch viele Unsicherheitsfaktoren. Für eine Anwendung in der gerichteten Evolution ist das System daher nicht geeignet; es müsste zunächst punkto Robustheit stark verbessert werden.