

Fortgeschrittenenpraktikum Genetik

WS 2007/2008

**Die Häufigkeit illegitimer Rekombination an den
Grenzen homologer Rekombinationsbereiche in
*Acinetobacter baylyi***

Johann de Vries

AG Neurogenetik

Institut für Biologie und Umweltwissenschaften

Fakultät V

Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

22.10. - 16.11.2005

(Blockpraktikum, 4 Wochen ganztägig, 9-18 Uhr)

Raum: W4-2-202

**Wichtig: Die Referate beginnen am 22.10.07. Sie werden an den folgenden Tagen jeweils dann gehalten, wenn es der Experimentalzeitplan ermöglicht.
Bitte deshalb die Referate bis Kursbeginn abschließend vorbereiten!**

Ungefährer Zeitplan

- | | |
|-----------------|---|
| Mo. 22.10. | - Einführung und Sicherheitsbelehrung
- Belehrung entsprechend GenTG
- Vorbesprechung der Projekte |
| 23.10. - 26.10. | - Projekt 1: Ortsspezifische Mutagenese und Klonierung der <i>nptII(-7)</i> -Kassette |
| 23.10. - 02.11. | - Projekt 2: Stammkonstruktionen bei <i>Acinetobacter baylyi</i> (Natürliche Transformation und homologe Rekombination) |
| 05.11. - 09.11. | - Projekt 3: Charakterisierung der HFIR-Transformation mit kurzen heterologen Markern (Mikro-HFIR) |
| Fr. 16.11. | - Abschlusssymposium
(Einzelvorträge zu den Projektergebnissen der verschiedenen Gruppen; Referenten werden von den Gruppen bestimmt) |

Einleitung

Unsere Untersuchungen zur natürlichen Transformation von *Acinetobacter baylyi* haben gezeigt, dass homologe Rekombinationsereignisse die Häufigkeit illegitimer Rekombination in ihrer Nachbarschaft erhöhen. Dieser neuartige Rekombinations-Mechanismus, den wir als HFIR (**h**omology-**f**acilitated **i**llegitimate recombination bzw. Homologie-vermittelte illegitime Rekombination) bezeichnen, besitzt ein hohes Potenzial für die Evolution, da er die hohe Effizienz homologer Rekombination mit der Sequenz-verändernden Wirkung der illegitimen Rekombination verbindet. Die HFIR wurde durch Untersuchungen mit speziellen Substraten entdeckt und weiter charakterisiert. Die prinzipielle Struktur dieser Substrate ist wie folgt: Donor- und Empfänger-DNA besitzen eine homologe Region, die als Ankersequenz bezeichnet wird. Daneben befindet sich in der Donor-DNA ein selektierbarer Marker (siehe Abbildung 1). Dieser Marker kann nicht durch homologe Rekombination eingebaut werden, da stromabwärts keine weitere homologe Sequenz folgt. Nachdem die Donor-DNA jedoch im Bereich der Ankersequenz mit der Empfänger-DNA homolog rekombiniert hat, kann ein Einbau des Markers durch illegitime Rekombination erfolgen. Etliche Details zum Mechanismus und Ergebnis der HFIR wurden bereits aufgeklärt. Im vorliegenden Projekt geht es vor allem um die Frage, mit welcher Häufigkeit sehr kurze Abschnitte fremder DNA in den Randbereichen homologer Rekombination integriert werden.

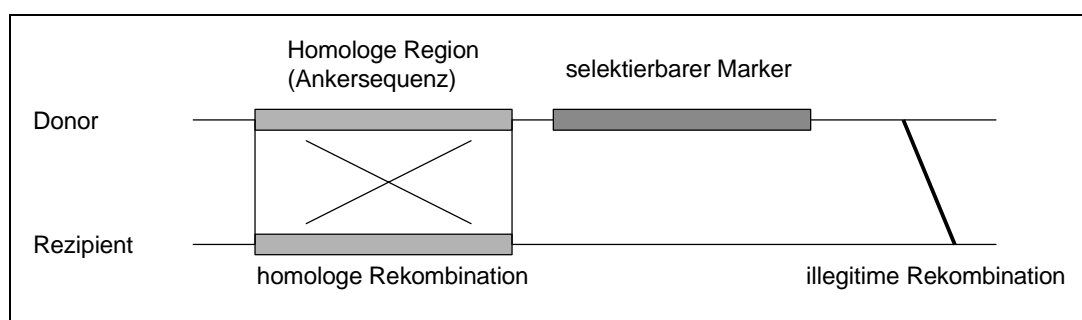


Abb. 1: Schematische Darstellung des Prinzips der HFIR. Der selektierbare Marker wird durch eine homologes Crossover im Bereich der Ankersequenz und eine illegitime Fusion auf der anderen Seite in das Genom des Rezipienten integriert.

Ein bislang bereits häufig eingesetztes System zur Charakterisierung der HFIR ist in Abbildung 2 gezeigt {de Vries, 2002 #1238}. Die Rezipientenzellen tragen ein um 51 Nukleotide verkürztes *nptII*-Gen, das keine Resistenz gegen Kanamycin vermittelt

(*nptII*). Die Donor-DNA trägt ein vollständiges *nptII*-Gen (*nptII*⁺), welches gleichzeitig die Funktion des Ankers und des selektierbaren Markers erfüllt: das 5'-Ende des Gens dient als Ankersequenz, innerhalb derer die homologe Rekombination stattfinden kann (homologe Region grau schattiert). Die letzten 51 Nukleotide des *nptII*-Gens im Donor stellen den selektierbaren Marker dar (entspricht etwa der Pfeilspitze von *nptII*⁺).

Die Analyse einer Vielzahl von Transformanten hat ergeben, dass in etlichen Fällen wenig mehr als die selektierbare Marker-Region in das Empfänger-genom eingebaut wird. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 2A dargestellt. Die Clusterung der illegitimen Rekombinationsstellen nahe der Ankersequenz ist deutlich erkennbar.

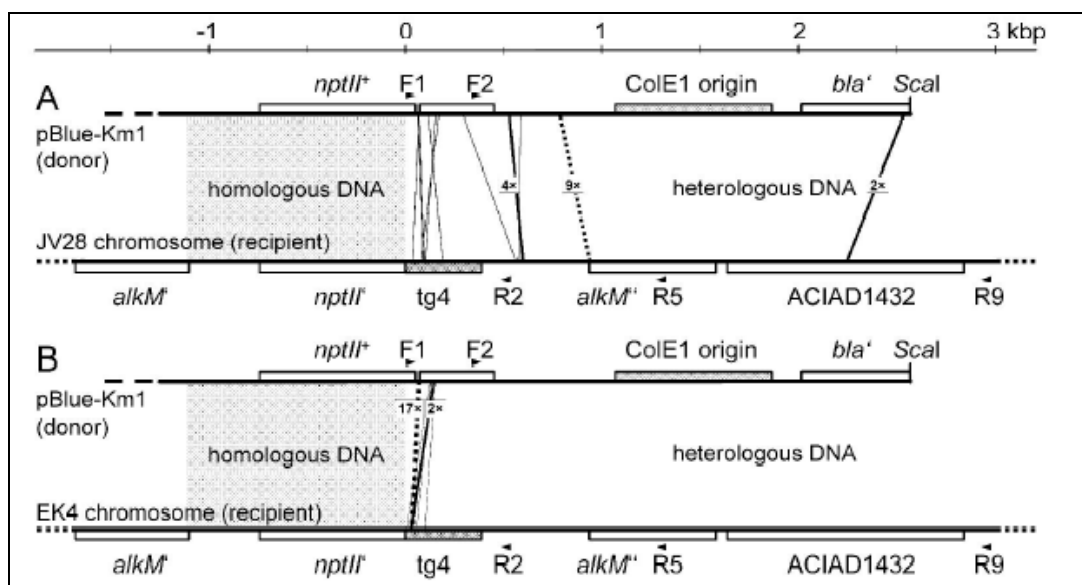


Abb. 2: Untersuchung der HFIR mit *nptII*. Der grau schattierte Bereich symbolisiert den homologen Abschnitt und die schrägen Linien die illegitimen Fusionsstellen zwischen Donor- und Rezipientensequenz {Harms, 2007 #2006}. Verteilung der illegitimen Fusionen im Wildtyp (A) und in einer *recJ*-Mutante (B).

Das Gen *recJ* von *A. baylyi* codiert die 5'-Exonuklease RecJ, die im Wildtyp häufig kurze heterologe Enden abbaut. Wird dieses Enzym entfernt, so persistieren diese kurzen heterologen 5'-Enden länger und können mit höherer Häufigkeit integriert werden. Bei einer *recJ*-Mutante von *A. baylyi* ist daher die Clusterung der illegitimen Übergänge von der Donor- zur Rezipienten-DNA noch deutlich stärker ausgeprägt (Abbildung 2B) {Harms, 2007 #2006}. Die Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die

Häufigkeit illegitimer Fusionen noch höher wäre, wenn die selektierbare Marker-Region deutlich kürzer als 51 Nukleotide wäre.

Ein Allel des *nptII*-Gens wurde entwickelt, das um nur sieben Nukleotide verkürzt ist und dennoch keine Resistenz vermittelt. Mit diesem Allel sollten sich Insertionen einer Länge von minimal sieben Nukleotiden erfassen lassen. Das Allel wird als *nptII(-7)* bezeichnet. Für die Charakterisierung der HFIR mit diesem Allel muss es zunächst in das Chromosom von *A. baylyi* integriert werden. Im Praktikum soll zunächst eine Kassetten aus *nptII(-7)* und dem *tg4*-Terminator konstruiert werden und diese dann chromosomal integriert und für die Charakterisierung der HFIR genutzt werden.

Gliederung des Praktikums

Projekt 1: Ortsspezifische Mutagenese und Klonierung

Das erste Teilprojekt innerhalb dieses Praktikums wird sich damit befassen, ein Plasmid durch ortsspezifische Mutagenese an die Erfordernisse des Projektes anzupassen. Als Technik bietet sich hierfür die inverse PCR an. Dazu werden Primer mit modifizierten 5'-Ende verwendet, über die die Sequenz-Änderung eingeführt wird. Das Prinzip ist in Abbildung 3 erläutert. Wir verwenden das Plasmid pBlue-Km-tg4 als Basis. Nach der Amplifikation durch PCR erfolgt eine Ligation. Damit eine Ligation erfolgen kann, ist darauf zu achten, dass die verwendeten PCR-Primer phosphoryliert sein müssen. Die Ligationsprodukte werden anschließend durch Elektroporation in *Escherichia coli* eingebracht. Die Selektion der Transformanten erfolgt zunächst auf Ampicillin-haltigem Medium. Die Kontrolle der Deletion erfolgt anschließend durch einen Stichtest der Transformanten-Kolonien auf Kanamycin-haltigem Medium. Einige Ampicillin-resistente und Kanamycin-sensible Klone werden schließlich durch Restriktionsanalysen untersucht.

Projekt 2: Stammkonstruktionen bei *Acinetobacter baylyi*

Im zweiten Teilprojekt soll das neue *nptII(-7)*-Konstrukt in das Chromosom von *A. baylyi* integriert werden. Hierbei ist ein Umweg erforderlich, um diesen Konstruktionsschritt phänotypisch überprüfen zu können. Der Umweg besteht darin,

dass zunächst das intakte *nptII*-Gen in das Chromosom eingebracht wird. Dabei entstehen Kanamycin resistente Transformanten. Wenn nun das um sieben Basenpaare verkürzte defekt-Allel durch Transformation in die Zellen eingebracht wird, entstehen wiederum Kanamycin-sensible Transformanten. Doch wie können diese Transformanten selektiert werden? Das ist tatsächlich nicht möglich. Einen Ausweg bietet die Stempel-Technik. Die Zellen werden zunächst unselektiv transformiert und so ausplattiert, das etwa fünf bis zehntausend Kolonien auf einer Agar-Platte wachsen. Die Kolonien werden nun auf eine Agar-Platte mit Kanamycin überstempelt, um Kanamycin-sensible Klone zu identifizieren. Diese werden schließlich von der Originalplatte isoliert. Als Endergebnis sollte das um 7 Nukleotide verkürzte *nptII*-Gen im Chromosom vorliegen. Die Absicherung des Genotyps der so erhaltenen Stämme erfolgt mittels PCR mit geeigneten Primern, die die genomische Verankerung nachweisen können.

Projekt 3: Charakterisierung der HFIR-Transformation mit kurzen heterologen Markern

Im dritten Teilprojekt geht es darum, die Häufigkeit der HFIR im neuen System zu messen und zu überprüfen, ob tatsächlich verstärkt sehr kurze Insertionen erfolgen. Die Feststellung der Insertionslänge kann durch PCR erfolgen. Dazu werden verschiedene Primer-Kombinationen benötigt, bei denen der Vorwärts-Primer im Donor und der Rückwärts-Primer im Rezipienten bindet. Durch die Auswahl der Bindepositionen lässt sich der Fusionsort eingrenzen. Sofern genügend Zeit zur Verfügung steht, kann gegebenenfalls eine Sequenzierung der Übergänge erfolgen.