

# **Untersuchungen zur rekombinanten Proteinexpression im Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii***

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Ivo Bertalan

geb. am 12.01.1978 in Finsterwalde

Gutachter:

1. Prof. Dr. Udo Johanningmeier
2. Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen
3. Prof. Dr. Michael Schroda

Halle (Saale), 09.06.2016

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.11.2016

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung.....	1
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Verbrauchsmaterialien.....	14
2.2 Algenstämme.....	14
2.2.1 Anzucht .....	15
2.2.2 Lagerung.....	15
2.3 Bakterienstämme .....	16
2.3.1 Anzucht .....	16
2.3.2 Lagerung.....	16
2.4 Plasmide .....	16
2.5 Oligonukleotide .....	18
2.6 Physiologische Untersuchungen.....	22
2.6.1 Zellzahlbestimmung .....	22
2.6.2 Bestimmung des Algenwachstums.....	22
2.6.3 Chlorophyllbestimmung .....	22
2.6.4 Bestimmung der Photosystem II-Effizienz.....	23
2.7 Nukleinsäure-spezifische Methoden .....	23
2.7.1 Plasmid-Isolation aus <i>E. coli</i> .....	23
2.7.2 Isolation von Gesamtzell-DNA aus <i>C. reinhardtii</i> .....	23
2.7.3 Isolation von Gesamtzell-RNA aus <i>C. reinhardtii</i> .....	24
2.7.4 Konzentrationsbestimmung.....	24
2.7.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	24
2.7.6 <i>Splicing by overlapping extension</i> (SOE)-PCR.....	25
2.7.7 Gensynthese.....	25
2.7.8 Agarosegelelektrophorese von DNA.....	26
2.7.9 Agarosegelelektrophorese von RNA.....	26
2.7.10 Southern und Northern Blot .....	26
2.7.11 Reinigung von DNA-Fragmenten .....	27
2.7.12 Standard-Klonierung .....	27
2.7.13 <i>Golden Gate shuffling</i> .....	27
2.7.14 Sequenzierung .....	28

---

2.8	Transformation .....	28
2.8.1	Transformation von <i>E. coli</i> .....	28
2.8.2	Transformation von <i>C. reinhardtii</i> .....	29
2.9	Proteinbiochemische Methoden .....	29
2.9.1	Gesamtzellproteinextraktion aus <i>C. reinhardtii</i> .....	29
2.9.2	Extraktion der löslichen Proteinfraction .....	29
2.9.3	Konzentrationsbestimmung nach Bradford .....	30
2.9.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	30
2.9.5	Kolloidale Coomassie-Färbung .....	30
2.9.6	Western Blot .....	30
2.9.7	Immundetektion .....	31
2.9.8	Massenspektrometrie (MS) .....	31
2.10	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	32
2.10.1	Proteinaufreinigung aus der löslichen Fraktion .....	32
2.10.2	Proteinaufreinigung aus <i>inclusion bodies</i> .....	33
2.11	Antikörperproduktion .....	33
2.12	<i>In vivo</i> -Stabilitätstest .....	34
2.13	Elektronenmikroskopische Aufnahmen .....	34
2.13.1	Untersuchung der Ultrastruktur .....	34
2.13.2	Immunogoldmarkierung .....	34
3	Ergebnisse .....	36
3.1	Das Transformationssystem für <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	36
3.1.1	Rezipient Fud7 .....	36
3.1.2	Transformationsplasmide .....	37
3.1.3	pMM2 und Golden Gate shuffling .....	40
3.2	Etablierung des Transformationssystems .....	42
3.2.1	Verwendung unterschiedlicher Promotor-UTR-Kombinationen .....	42
3.2.2	Erstellung von Mutante 16S/MPT (ohne His-TAG) .....	47
3.2.3	Optimierung der Fremdproteinexpression .....	49
3.3	Untersuchungen zur MPT64-Expression/-Akkumulation .....	50
3.3.1	Expression von MPT64 in <i>E. coli</i> .....	51
3.3.2	Quantifizierung von MPT64 in Mutante 16S/HMPT .....	53
3.3.3	Untersuchungen zur Prozessierung von MPT64 .....	54
3.4	Einfluss von Signalpeptiden auf die Fremdproteinakkumulation .....	55
3.4.1	MPT64-exprimierende Mutanten .....	56

---

3.4.2	Lokalisation von MPT64 in <i>C. reinhardtii</i> .....	59
3.4.3	Vergleich der <i>in vivo</i> -Stabilität von MPT64 im Stroma bzw. Lumen.....	63
3.4.4	Physiologische Charakterisierung .....	65
3.5	Verwendung des Transformations- und Expressionssystems.....	66
3.5.1	Expression von eGFP .....	66
3.5.2	Expression von Plättchenfaktor 4.....	67
3.5.3	Expression der Phytochelatin-Synthase .....	71
3.5.4	Expression der $\beta$ -Carotin-Ketolase.....	74
3.6	Methodische Optimierungen .....	75
3.6.1	Etablierung eines Multiplex-PCR-basierten Schnelltests auf Homoplasmie .....	75
3.6.2	Etablierung eines Schnelltests für MPT64 .....	77
4	Diskussion.....	79
4.1	Transformations- und Klonierungsstrategie .....	79
4.2	Expression von MPT64.....	81
4.3	Expression von eGFP, PF4, PCS und BKT.....	92
4.4	Methodische Optimierungen .....	99
5	Zusammenfassung.....	101
6	Literaturverzeichnis .....	103
Anhang A: Plastomsequenz im Deletionsbereich der Fud7-Mutante .....		119
Anhang B: Erstellung der plastidären Transformationsvektoren.....		120
Anhang C: Anpassung der kodierenden DNA an den wirtsspezifischen Codongebrauch ....		123
Anhang D: Signalpeptidsequenzen .....		132
Anhang E: Ergebnis der MS-Analyse .....		133
Anhang F: Astaxanthin-Biosynthese in <i>C. reinhardtii</i> .....		134
Anhang G: Allgemeine Sequenzdaten .....		135
Anhang H: Sequenz von pMM2.....		137
Anhang I: Gesamtschau aller Transgenkonstrukte.....		139
Publikationen.....		141
Erklärung.....		142
Danksagung.....		143
Lebenslauf .....		144

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest	destilliertes Wasser
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
CAP	Chloramphenicol
cDNA	<i>complementary</i> DNA (Desoxyribonukleinsäure)
Chl	Chlorophyll
CSPD	Disodium3-(4-methoxyspiro{ 1,2-dioxetane-3,2'-(5'-Chloro) tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan}-4-yl)phenyl phosphate
D1	PsbA-Protein, 32 kDa Untereinheit von Photosystem II
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al</i>	et alteri (und andere)
E64	<i>N</i> -[ <i>N</i> -( <i>L</i> -3- <i>trans</i> -carboxyirane-2-carbonyl)- <i>L</i> -leucyl]-agmatine
F <sub>0</sub>	minimale Fluoreszenz
F <sub>m</sub>	maximale Fluoreszenz
F <sub>v</sub>	variable Fluoreszenz
G	Guanin
GGG	<i>Golden Gate shuffling</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
HA	Hämagglutinin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HS	<i>high salt</i>
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Ribonukleinsäure)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OEE1, 2, 3	<i>oxygen evolving enhancer</i> -Proteine (Größe: 33, 23 und 16kDa)
p.a.	pro analysi (analysenrein)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

---

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
rRNA	<i>ribosomal RNA</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskonstante
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SSC	<i>sodium chloride/sodium citrate</i>
SOC	<i>super optimal broth</i> (SOB)-Medium mit Glucose
T	Thymin
TAP	Tris-Acetat-Phosphat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
TE	Tris-EDTA
TEN	Tris-Natrium-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tricin	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
tRNA	<i>transfer RNA</i> (Ribonukleinsäure)
TSP	<i>total soluble protein</i>
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-Monolaurat
u	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UTR	<i>untranslated region</i> (untranslatierter Bereich)
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen zu Volumen)
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewicht zu Volumen)

Entsprechend den IUPAC-IUB Vereinbarungen von 1969 wurden Aminosäuren nach dem Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code abgekürzt. Kursiv hervorgehoben sind Begriffe, die aus der englischen Sprache ohne Übersetzung als Eigenname übernommen wurden.

# 1 Einleitung

Mit der Entwicklung gentechnischer und molekularbiologischer Methoden wurde vor ca. vierzig Jahren die Grundlage für die moderne Biotechnologie geschaffen. Mikroorganismen konnten in der Folge genetisch verändert und mit neuen Eigenschaften ausgestattet werden. Mit der Herstellung größerer Mengen an humanem Insulin gelang 1982 der Durchbruch zur kommerziellen Nutzung der rekombinanten Proteinexpression [1]. Gegenwärtig stehen verschiedene Plattformen für die Proteinproduktion zur Verfügung (Tab. 1.1). Diese basieren vor allem auf Bakterien wie z.B. *E. coli*, aber auch auf Hefen, Insekten- und Säugerzelllinien. Die einzelnen Expressionssysteme verfügen über individuelle Besonderheiten [2], die abhängig vom jeweiligen Zielprotein Einfluss auf die qualitative und quantitative Ausbeute, auf den Arbeitsaufwand und letztendlich auf die entstehenden Produktionskosten nehmen.

**Tabelle 1.1:** Vergleich unterschiedlicher Expressionssysteme (verändert nach Desai *et al.*, 2001 [3])

System	Produktionskosten	Zeitaufwand	Expressionslevel	Proteinmodifikationen <sup>a</sup>	Kontaminationsrisiko
Bakterien	niedrig	gering	hoch	keine	Endotoxine
Hefen	mittel	mittel	gering - hoch	möglich	geringes Risiko
Insektenzellen	hoch	mittel	gering - hoch	möglich	Viren, Prionen
Säugerzellen	hoch	hoch	gering - mittel	möglich	Viren, Prionen
Pflanzen	niedrig	hoch	gering - hoch	möglich	geringes Risiko

a: Disulfidbrückenbindungen und Glykosylierungen

Jedes rekombinante Protein stellt individuelle Anforderungen an das Expressionssystem. Deshalb werden bestehende Systeme sukzessiv optimiert, um möglichst vielen Ansprüchen gerecht zu werden. Für den am häufigsten verwendeten Organismus *E. coli* steht bereits ein umfangreicher Katalog an Expressionsvektoren, individuellen Stämmen und unterschiedlichen Kultivierungsstrategien zur Verfügung [4]. Zusätzlich werden aber auch immer neue Expressionssysteme mit ganz eigenen Vorzügen etabliert. So kann aus einem immer größer werdenden Pool an Möglichkeiten das optimale System für jedes einzelne Protein gewählt werden.

Im Zuge des ständig steigenden Bedarfs an hochwertigen rekombinanten Proteinen und der damit verbundenen Suche nach kostengünstigen Alternativen zu bisherigen Produktionsplattformen gewinnen pflanzliche Systeme zunehmend an Bedeutung [5–8].

Analog zu anderen eukaryotischen Systemen sind Pflanzen in der Lage, Proteine post-translational zu modifizieren. Das heißt, komplexe Proteine können zum einen korrekt gefaltet und zum anderen glykosyliert werden, wodurch deren Stabilität und/oder biologische Aktivität gewährleistet wird. Ferner sind Pflanzen frei von bakteriellen Endotoxinen und tierischen bzw. menschlichen Pathogenen. In einigen Fällen kann deshalb auf eine kostenintensive Reinigung verzichtet werden, beispielsweise wenn die Expression von Vakzinen in nahrungsrelevanten Pflanzenteilen erfolgt. Durch deren Verzehr kann in Einzelfällen eine direkte Aufnahme über den Magen-Darm-Trakt ermöglicht werden [9,10]. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass für die Anzucht transgener Pflanzen weder wartungsintensive Bioreaktoren noch teure Kulturmedien benötigt werden. Ein Anbau auf bestehenden landwirtschaftlichen Flächen gewährleistet eine fast unbegrenzte Steigerung der Produktion bei vergleichsweise geringen Kosten [11]. Allerdings gibt es in der EU keine Akzeptanz für die Kultivierung transgener Pflanzen außerhalb von Gewächshäusern. Die Bedenken hinsichtlich einer nicht kontrollierbaren Verbreitung der gentechnisch veränderten Pflanzen sowie die Übertragung von Erbgut auf traditionelle landwirtschaftliche Produkte erscheinen größer als der potentielle Nutzen dieser Technologie.

Einen Ausweg bietet hier die Verwendung pflanzlicher Zellkulturen. Sie ermöglichen es, viele Vorzüge des Expressionssystems Pflanze innerhalb geschlossener Systeme zu nutzen [12,13]. Frei von Umwelteinflüssen lassen sich rekombinante Proteine in gut kontrollierbaren Bioreaktoren unter GMP-Bedingungen (*Good Manufacturing Practice*) produzieren [14]. Dadurch kann die Qualität der Produkte sichergestellt werden, die besonders bei Nahrungs- und Futtermitteln, Kosmetika und pharmazeutischen Stoffen behördlich gefordert wird.

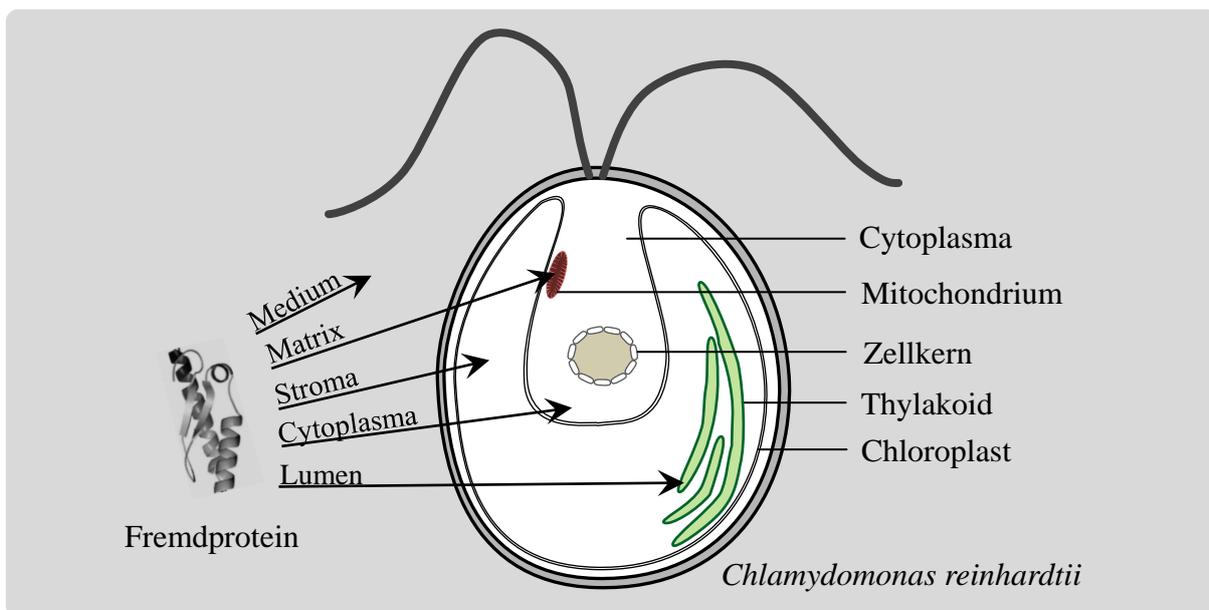
Neben Zellsuspensionen höherer Pflanzen können aber auch niedere Pflanzen wie Moose und Mikroalgen in sogenannten Photobioreaktoren kultiviert werden. Das Moos *Physcomitrella patens*, ein genetisch gut charakterisierter pflanzlicher Modellorganismus, wurde bereits als Expressionsplattform für pharmazeutische Proteine etabliert [15,16]. Mit der Produktion und Vermarktung des humanen Wachstumsfaktors FGF7/KGF gelang es 2013 der Firma greenovation Biotech GmbH, diese Technologie in die wirtschaftliche Anwendung zu überführen. Allerdings wachsen Zellkulturen höherer Pflanzen und Moose relativ langsam, während Mikroalgen über deutlich höhere Wachstumsraten und infolge der hohen Produktivität über ein größeres wirtschaftliches Potential verfügen [17].

Unter dem Begriff Mikroalgen wird eine Vielzahl einzelliger photosynthetisch aktiver Organismen zusammengefasst. Dazu gehören sowohl Prokaryoten wie Cyanobakterien als auch Eukaryoten wie z.B. Grünalgen, Rotalgen und Diatomeen. Schon seit Jahrzehnten werden Mikroalgen biotechnologisch bearbeitet. Im Bereich der Ernährungs-, Futter-, Pharma- und Kosmetikindustrie dienen sie als Quelle für Fettsäuren, Pigmente und bioaktive Stoffe mit z.B. antimikrobieller Wirkung [18–21]. Zu den Vertretern mit wirtschaftlicher Relevanz gehören unter anderem *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* und *Haematococcus pluvialis*, die zur Herstellung von Nahrungsergänzungsmitteln,  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin genutzt werden [19,22,23].

Für die Verwendung als alternative Expressionsplattform zur kostengünstigen Produktion hochwertiger Proteine und sekundärer Metabolite verfügen vor allem eukaryotische Mikroalgen über günstige Voraussetzungen [24,25].

- Sie benötigen nur einfach zusammengesetzte und damit preiswerte Medien, können in gut zu kontrollierenden Photobioreaktoren unter Zufuhr von Licht und CO<sub>2</sub> wachsen und weisen dabei deutlich höhere Wachstumsraten auf als pflanzliche oder humane Zellkulturen.
- Im Gegensatz zu prokaryotischen Systemen wie *E. coli* sind eukaryotische Mikroalgen in der Lage, Proteine posttranslational zu modifizieren. Für viele therapeutisch relevante Proteine kann dadurch deren Stabilität und/oder Funktion gewährleistet werden.
- Viele Grünalgen besitzen den GRAS-Status (*generally recognized as safe*), d.h. sie haben das Potential, als Nahrungsmittel und/oder Futtermittel zugelassen zu werden. Das Fehlen von Toxinen und Pathogenen gestattet es, die aufwendige Reinigung rekombinanter Proteine zu reduzieren oder gänzlich einzusparen. Algen, die z.B. therapeutische Proteine oder Vakzine exprimieren, könnten direkt lyophilisiert und in Form von Tabletten oral aufgenommen werden.
- Die große Artenvielfalt (ca. 8000 Grünalgenarten) bietet die Möglichkeit Organismen zu identifizieren, die natürlicherweise wertvolle Rohstoffe wie z.B. Lipide, Pigmente oder Vitamine synthetisieren. Für eine wirtschaftlich tragbare biotechnologische Produktion kann eine häufig zu geringe Produktmenge potentiell durch die gezielte Optimierung einzelner Stoffwechselwege (*metabolic engineering*) erhöht werden.
- Unterschiedliche Transformationstechniken für Kern-, Plastiden- und Mitochondrien-Genome sind verfügbar, wurden allerdings erst für wenige Arten etabliert.

Als Expressionsplattform für rekombinante Proteine steht aktuell die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* im Fokus der wissenschaftlichen und anwendungsbezogenen Forschung. Dieser nur 10µm große Organismus gehört zu den pflanzlichen Modellorganismen und stellt darüber hinaus die am umfassendsten charakterisierte Mikroalge dar. Besonders die einfache und schnelle Kultivierung, die geringen Nährstoffansprüche und die Fähigkeit, sowohl photoautotroph als auch heterotroph mit Acetat als Kohlenstoffquelle zu wachsen, machen *Chlamydomonas reinhardtii* zu einem beliebten Untersuchungsobjekt, um beispielsweise die Photosynthese, die Funktion der Flagellen oder die Phototaxis zu studieren [26,27]. Alle drei Genome (Kern, Mitochondrien und Chloroplast [28–30]) sind vollständig sequenziert und können gezielt transformiert werden [31–33]. Somit steht die gesamte Alge, einschließlich ihrer Organellen, für die rekombinante Proteinexpression zur Verfügung (Abb. 1.1). Für die Insertion und Expression von Transgenen ist jedoch der Chloroplast besonders gut geeignet.



**Abbildung 1.1: Akkumulationsorte heterolog in *C. reinhardtii* exprimierter Proteine.** Ausgehend vom Kern erfolgt die Expression eines Transgens im Cytoplasma. Anschließend kann das Fremdprotein durch die Verwendung eines geeigneten Transit- bzw. Signalpeptids ins umgebende Medium oder in spezifische Organellen transportiert und dort angereichert werden. Darüber hinaus ist die Expression rekombinanter Proteine auch direkt in den Mitochondrien oder im Chloroplasten möglich.

Chloroplasten sind chlorophyllhaltige Plastiden, in denen die Strahlungsenergie der Sonne für die Synthese energiereicher, organischer Verbindungen genutzt wird. Von einer doppelten Hüllmembran umgeben, befinden sich im Inneren der Chloroplasten zwei unterschiedliche Reaktionsräume. Dabei handelt es sich zum einen um den Stroma-Bereich, in dem unter anderem die Licht-unabhängigen Reaktionen der Photosynthese ablaufen, und zum anderen

um das von der Thylakoidmembran umschlossene Lumen, das im Licht angesäuert wird und über den pH-Gradienten die ATP-Synthese ermöglicht.

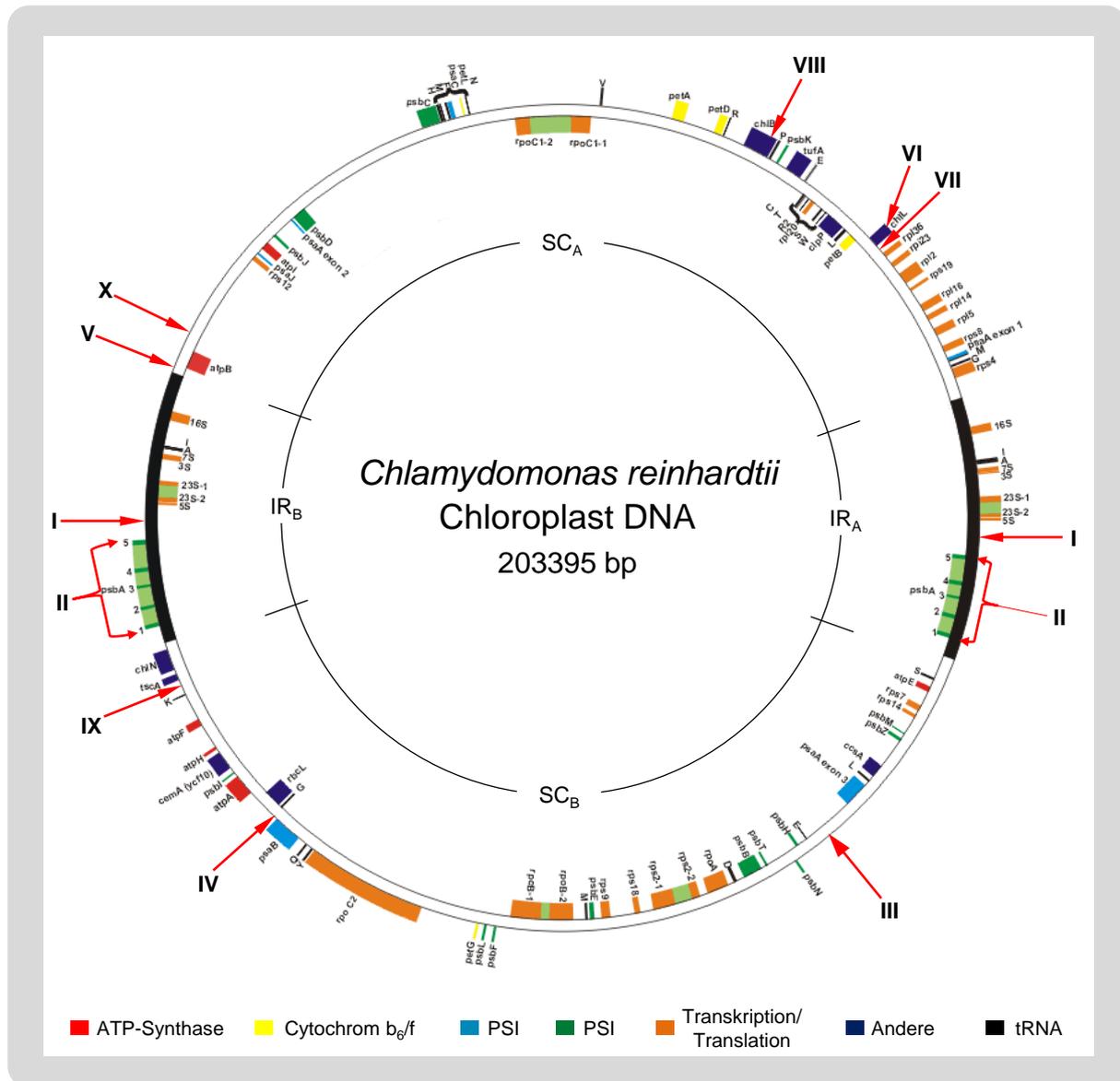
Ihren Ursprung haben Plastiden in einem photoautotrophen Prokaryoten, der den heute existierenden Cyanobakterien entspricht und vor mehr als 1 Milliarde Jahren von einem eukaryotischen Wirt aufgenommen wurde [34]. Aus dem zunächst endosymbiotisch lebenden Prokaryoten entwickelte sich ein semiautonomes Organell, das weiterhin über ein eigenes Genom mit dem dazugehörigen Transkriptions- und Translationsapparat verfügt. Diese intrazelluläre Evolution ging jedoch mit einem enormen Verlust an genetischem Material einher. Zurück blieb ein stark reduziertes plastidäres Genom (Plastom) mit durchschnittlich weniger als 200 Genen [35,36]. Eine Vielzahl der plastidären Gene wurde in den Kern transferiert, obwohl deren Produkte für die Funktion des Chloroplasten weiterhin erforderlich sind. Im Cytosol werden die nun kernkodierte plastidären Proteine als Vorläufer synthetisiert. N-terminal verfügen sie über eine zusätzliche Sequenz, die als Transitpeptid bezeichnet wird und für den Transfer zum Organell und den anschließenden Import über die doppelte Hüllmembran ins Stroma verantwortlich ist. Dort wird in den meisten Fällen das Transitpeptid von der stromalen Prozessierungspeptidase (SPP) abgespalten, und das reife, funktionelle Protein entsteht. Handelt es sich jedoch um ein Protein, das zusätzlich über die Thylakoidmembran transportiert oder in diese integriert werden soll, ist ein weiterer Import notwendig. Dafür sind derzeit vier verschiedene Wege bekannt: der spontane, der SRP- (*signal recognition particle*), der Sec- (*secretory*) und der Tat- (*twin-arginine translocase*) abhängige Weg [37,38]. Die Mehrzahl der Membranproteine inseriert spontan oder wird über den SRP-Weg in die Thylakoidmembran integriert. Lösliche Proteine, die im Fokus dieser Arbeit stehen, werden dagegen ausschließlich über den Sec- oder den Tat-Weg ins Thylakoidlumen transportiert [37,39]. Dazu verfügen sie über ein zweiteiliges Transitpeptid, das aus einer Stroma- und einer Lumen-dirigierenden Domäne besteht. Nach dem Import des Vorläuferproteins in das Stroma erfolgt die Abspaltung der stromalen Domäne durch die SPP. Es entsteht ein Transportintermediat, das am N-Terminus die Lumen-dirigierende Domäne trägt. Dieser auch als Signalpeptid bezeichnete Teil bestimmt den Transportweg (Sec- oder Tat-Weg) und wird nach dem Import ins Thylakoidlumen von der Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) abgespalten. Die in ihrer Struktur recht ähnlichen Signalpeptide unterscheiden sich vor allem im N-terminalen Bereich. Beim Tat-spezifischen Signalpeptid kommt dort ein charakteristisches Arginin-Paar vor, das zum Namen dieses Transportweges (*twin-arginine translocase*) führte. Darüber hinaus existieren funktionale

Unterschiede zwischen den beiden Transportwegen. Demnach werden über den Sec-Weg ausschließlich Proteine ATP-abhängig im ungefalteten Zustand transportiert. Im Gegensatz dazu können über den Tat-Weg auch gefaltete Proteine ATP-unabhängig transportiert werden; notwendig ist lediglich ein Protonengradient über der Thylakoidmembran. Phylogenetisch stammt die Thylakoidmembran von der bakteriellen Cytoplasmamembran ab. Beide Membranen verfügen deshalb über vergleichbare Sec- und Tat-Transportwege, die den Transport artfremder Substrate erlauben. Das heißt, Vorläuferproteine, die ursprünglich über die Cytoplasmamembran transportiert werden, können zum Teil auch über die Thylakoidmembran transferiert werden und umgekehrt [40–42].

Bei bakteriellen Expressionssystemen werden Signalpeptide bereits routinemäßig für den Export rekombinanter Proteine eingesetzt [43]. Mit der Lokalisation im Periplasma bzw. im umgebenden Medium wird eine einfache und kostengünstige Proteinaufreinigung ermöglicht. Ferner können dadurch Proteine angereichert werden, die intrazellulär einem starken proteolytischen Abbau unterliegen oder toxisch wirken [43,44]. Für die Anreicherung plastidär exprimierter Proteine stellt das Thylakoidlumen infolge der geringen Ausstattung an spezifischen Proteasen und modifizierenden Enzymen [45] und der Abwesenheit von Nukleinsäuren eine Alternative zum Stroma dar [40,46]. Allerdings sind Untersuchungen dazu rar und beschränken sich auf Plastiden höherer Pflanzen.

In der Grünalge *C. reinhardtii* gelang vor mehr als 25 Jahren die erste stabile Transformation von Chloroplasten [33]. Seitdem können unter Verwendung der Partikelkanone DNA-beladene Mikropartikel aus Wolfram oder Gold in pflanzliche Zellen geschossen [47] und die eingebrachte DNA über homologe Rekombination, die dem bakteriellen RecA-System entspricht [48], gerichtet in das Plastom integriert werden. Neben aufwendig erstellten Transformationsplasmiden können für die Transformation auch direkt PCR-Fragmente verwendet werden [49,50]. *C. reinhardtii* besitzt nur einen großen becherförmigen Chloroplasten, der über 40% des gesamten Zellvolumens einnimmt. Das zirkuläre Plastom ist ca. 200kbp groß (Abb. 1.2) und liegt in etwa 80 Kopien vor. Durch den Gebrauch von homologen Plastomsequenzen, die das Transgen flankieren, wird eine zielgenaue Insertion in intergenische, auch als „*silent sites*“ bezeichnete Plastomregionen ermöglicht [51]. Die Störung bzw. Inaktivierung von nativen Genen, wie sie bei der nicht-homologen Rekombination im Kern vorkommen kann, wird somit vermieden. In der Abbildung 1.2 sind

Positionen innerhalb des Plastoms aufgezeigt, die bereits für eine Transgeninsertion genutzt wurden.



**Abbildung 1.2: *Chlamydomonas reinhardtii* - Plastom.**

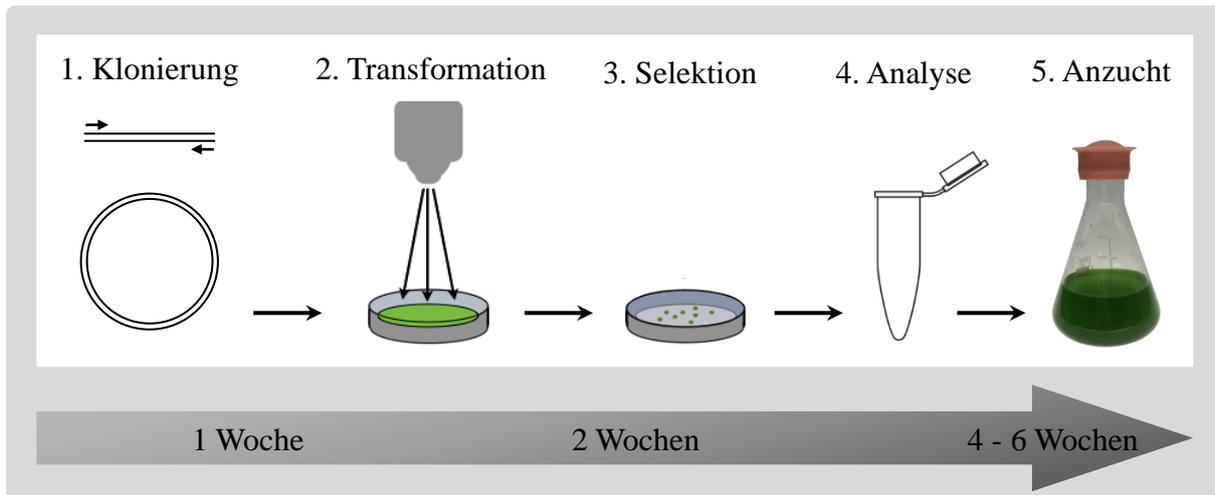
Das zirkuläre Plastidengenom weist zwei Kopien einer 22,211kbp großen, invertierten DNA-Sequenz (IR-Region, *inverted repeat*) auf. Diese werden durch zwei individuelle Sequenz-Bereiche (SC-Regionen, *single copy*) mit nahezu gleicher Größe (SC<sub>A</sub> 78,100kbp und SC<sub>B</sub> 80,873kbp) unterbrochen. Die Gene sind entsprechend ihrer Funktion bzw. Zugehörigkeit farblich gekennzeichnet (siehe Legende). Introns sind hellgrün dargestellt. Mit roten Pfeilen sind Positionen innerhalb des Plastoms markiert, die bereits für eine Transgeninsertion verwendet wurden. Der doppelte Pfeil am *psbA*-Gen (Position II) kennzeichnet den Austausch der kodierenden Sequenz des *psbA*-Genprodukts (D1) mit der Sequenz für das jeweilige Fremdprotein. In der nebenstehenden Tabelle sind die dazugehörigen Referenzen aufgeführt. Die gewählte Reihenfolge der Positionen richtet sich nach der Nutzungshäufigkeit bzw. der zeitlichen Abfolge. Die Grafik wurde nach J. E. Maul *et al.*, 2002 [30] verändert.

Position	Referenzen
I	[52–64]
II	[53,65–74]
III	[65,67,69,71,75]
IV	[76–78]
V	[57,66,79]
VI	[80,81]
VII	[82]
VIII	[83]
IX	[84]
X	[85,86]

Für die rekombinante Proteinexpression ist besonders die *inverted repeat*-Region (IR-Region), eine in zweifacher Kopie vorkommende Plastomsequenz, von Interesse. Im Vergleich zu den nur einfach (*single copy*) vorkommenden Plastomregionen verfügen Transgene innerhalb der IR-Region über die doppelte Gendosis und werden daher auch stärker exprimiert [57]. Darüber hinaus können in einem Transformationsansatz gleich mehrere Gene an unterschiedliche Stellen oder an einer definierten Position unter Kontrolle eines Promotors, zusammengefasst in einem Operon, in das Plastom eingebracht werden [87,88]. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, ganze Stoffwechselwege zu integrieren oder aus mehreren Untereinheiten bestehende Proteinkomplexe zu exprimieren. Für eine korrekte Faltung komplexer Proteine verfügt der Chloroplast über Chaperone [89] und Protein-Disulfid-Isomerasen [90], wodurch biologisch aktive Produkte generiert werden können [91]. Allerdings werden keine Glykosylierungen durchgeführt [51], die insbesondere für viele pharmazeutische Proteine von Bedeutung sein können [92]. Es gibt jedoch Beispiele, wie rekombinant im Chloroplasten von *C. reinhardtii* erzeugte monoklonale Humanantikörper, die auch ohne entsprechende Zuckerreste aktiv [93] und für spezifische therapeutische Anwendungen besonders gut geeignet sind [67].

Für die stabile Expression plastidärer Transgene ist die Abwesenheit epigenetischer Effekte und Gen-*silencing* von großem Vorteil. In Verbindung mit der hohen Zahl an Plastomkopien und einem im Vergleich zum Cytosol reduzierten proteolytischen System [94] wurden im Chloroplasten von *C. reinhardtii* bereits rekombinante Proteinakkumulationen von bis zu 21% des gesamtlöslichen Proteins (TSP- *total soluble protein*) erzielt [66]. Durchschnittlich liegen die Ausbeuten bei 1 - 5% TSP (Tab. 1.2) und damit deutlich über denen von Kern-expressionen (< 0,25% TSP) [24,95].

Hervorzuheben ist vor allem die kurze Zeit, die für die Erzeugung transplastomischer Algenstämme benötigt wird (Abb. 1.3). Von der Idee bis zur Protein produzierenden Mutante vergehen nur wenige Wochen und nicht wie bei höheren Pflanzen mehrere Monate oder Jahre [91]. Unmittelbar nach der Transformation liegt zunächst ein heteroplasmischer Zustand vor, d.h. nur eine bis wenige Plastomkopien verfügen über das eingebrachte Transgen. Durch eine sich anschließende selektive Phase zu Gunsten des transgenen Plastoms erhalten nach und nach alle Plastomkopien das Transgen und ein einheitlicher, genetisch stabiler Zustand (Homoplasmie) wird wiederhergestellt [96].



**Abbildung 1.3: Ablauf der rekombinanten Proteinproduktion in *C. reinhardtii*.** 1. Klonierung einer transgenen Sequenz (bestehend aus: Promotor, 5'-UTR, kodierender Sequenz und 3'UTR) zwischen Plastomsequenzen, die eine homologe Rekombination im Plastom des Rezipienten erlauben. 2. Der erstellte Vektor, gebunden an Wolfram oder Goldpartikel, wird mit Helium-Druck in die auf einer Agar-Platte befindlichen Algenzellen geschossen. 3. Wachstum der Transformanten auf selektivem Medium. 4. Analyse der Transformanten: Test auf Homoplasmie, Nachweis des Transgens (Sequenzierung), des Transkripts und des Zielproteins. 5. Anzucht des transgenen Algenstammes in einem größeren Volumen für die Produktion des rekombinanten Proteins. (verändert nach Johanningmeier und Fischer, 2010 [97])

Anfänglich basierte die Selektion von Transformanten vorwiegend auf Regeneration des photoautotrophen Wachstums von Mutanten mit Deletionen im *atpB*- [33] bzw. *tscA*- [96] Gen oder auf Resistenzen gegenüber Herbiziden bzw. Antibiotika, vermittelt durch Mutationen in den plastidären Genen *psbA* [98] bzw. *rrnS* [99]. Für die rekombinante Proteinexpression in Chloroplasten setzte sich jedoch der Einsatz der bakteriellen Antibiotikaresistenzgene *aadA* [96] und *aphA-6* [75] durch. Die Expression eines weiteren Proteins stellt jedoch immer eine zusätzliche Belastung für die bereits von der Fremdproteinproduktion gestresste Translationsmaschinerie des Chloroplasten dar. Beim Einsatz transgener Stämme für therapeutische Zwecke (z.B. bei der oralen Applikation) besteht ferner die Gefahr des horizontalen Gentransfers [100], wodurch multiresistente Keime entstehen könnten. Um die Resistenzgene wieder zu entfernen, wurde die Methode des *Marker-Recycling* entwickelt [101,102]. Allerdings verursacht die Entfernung der Markergene einen höheren Aufwand und kostet zusätzliche Zeit. Eine Antibiotika-unabhängige Methode zur Erzeugung transplastomischer Algenstämme wurde 2013 von Chen und Melis beschrieben [78]. Aufgrund einer Punktmutation im *rbcL*-Gen kann der als Rezipient eingesetzte Algenstamm nur heterotroph mit Acetat im Medium wachsen. Durch die Insertion des Transgens in Verbindung mit der fehlerfreien nativen *rbcL*-Sequenz können Transformanten photoautotroph auf Minimalmedium wachsen und entsprechend selektiert werden.

Bei der Erzeugung transplastomischer Algenstämme liegt der Schwerpunkt gegenwärtig in der effizienten Assemblierung und Integration komplexer Transgenkonstrukte bzw. mehrerer Transgene, um beispielsweise die plastidäre Fremdproteinexpression zu optimieren oder um neue Stoffwechselwege im Chloroplasten zu etablieren. Noor-Mohammadi *et al.* [59] entwickelten einen Vektor, der, basierend auf der DNA-Assembler-Methode [103], die homologe Rekombination sowohl in Hefe als auch in *C. reinhardtii* nutzt, um verschiedene Transgene zusammenzufügen und abschließend in das Plastom zu integrieren. Ein weiteres, aktuelles Beispiel wurde 2014 von Oey *et al.* [60] beschrieben. Mit Hilfe des Gateway<sup>®</sup>-Systems [104] können DNA-Fragmente *in-vitro* zu einem Transgenkonstrukt zusammengesetzt und, in einen Zielvektor integriert, für die Transformation des Plastoms verwendet werden. Die Selektion der Transformanten beruht bei beiden Systemen jedoch unverändert auf der Expression eines zusätzlichen Antibiotikaresistenzgens. Dennoch stellen derartige Systeme eine wichtige methodische Bereicherung dar und tragen zur schrittweisen Optimierung der rekombinanten Proteinproduktion im Expressionssystem *C. reinhardtii* bei.

Neben der Entwicklung effektiver Systeme zur Erzeugung transplastomischer Algenklone liegt der Fokus in der Produktion hoher Mengen an rekombinantem Protein. Dazu muss das Transgenkonstrukt optimal an das regulatorische System des Chloroplasten angepasst werden. Primär erfolgt die plastidäre Regulation auf posttranskriptionaler Ebene [105]. Daran beteiligt sind in der UTR (*untranslated region*) lokalisierte RNA-Sequenzen (cis-aktive Elemente), die spezifisch mit kernkodierten Proteinen (trans-aktive Elemente) interagieren und die mRNA-Prozessierung, -Stabilisierung und schließlich die Translation an den Ribosomen beeinflussen [106–110]. Aufgrund der spezifischen Regulation werden für transgene Konstrukte hauptsächlich endogene Promotor- und UTR-Sequenzen stark exprimierter Chloroplasten-Gene (*psbA*, *psbD*, *atpA*, *rbcL* und *rrnS*) verwendet. Gegenwärtig kommen vornehmlich Promotor/UTR-Kombinationen zum Einsatz, die aus den Arbeiten von Barnes *et al.* [52] und Rasala *et al.* [69] hervorgehen und starke Expressionen unterschiedlichster Transgene zeigten. Die bislang höchsten Ausbeuten an rekombinanten Proteinen wurden mit *psbA*-spezifischen Promotor/UTR-Sequenzen erzielt [61,65,66]. Das *psbA*-Gen kodiert für die D1-Untereinheit vom Photosystem II und wird aufgrund des hohen D1-Umsatzes sehr stark exprimiert. Die D1-Synthese unterliegt jedoch einer komplexen Regulation, die von Marín-Navarro *et al.* [105] detailliert beschrieben wurde. Besonders die negativ auf das Translationslevel wirkenden *feedback*-Mechanismen [111,112] erlauben ausschließlich in D1-defizienten Stämmen eine *psbA*-Promotor/UTR vermittelte Transgenexpression, die zu größeren Mengen

an rekombinantem Protein führt [65]. Ohne D1-Protein können diese Stämme aber nur heterotroph wachsen und benötigen als zusätzliche Kohlenstoff-Quelle Acetat im Medium. Gegenüber einer photoautotrophen Anzucht steigt dadurch das Kontaminationsrisiko und höhere Kosten entstehen. Für eine kommerzielle Proteinproduktion sind deshalb photosynthetisch kompetente Algenzellen von Nutzen, die über eine starke rekombinante Proteinexpression verfügen. Rasala *et al.* [69] konnten zeigen, dass der Promotor der ribosomalen 16S-RNA (*rrnS*-Gen) in Verbindung mit der 5'*atpA* UTR und der 3'*rbcL* UTR eine hohe Fremdproteinexpression in photosynthetisch aktiven Stämmen gewährleistet. Allgemein wird die Höhe der mRNA-Akkumulation und -Translation maßgeblich von der Kombination aus Promotor und 5'UTR bestimmt, die Wahl der 3'UTR hat dagegen keinen entscheidenden Einfluss [52].

Um die Translationseffizienz zu steigern und die Produktausbeute zu erhöhen, ist es in der Regel zusätzlich erforderlich, die kodierende Sequenz des zu exprimierenden Fremdproteins an den Codongebrauch (*codon usage*) des jeweiligen Expressionssystems anzupassen [54,86,113]. Davon betroffen sind Codons, die für die gleiche Aminosäure kodieren (synonyme Codons). Sie verfügen über eine unterschiedliche Nutzungsfrequenz, die von einem begrenzt zur Verfügung stehenden Satz an tRNAs bestimmt wird [114] und Organismus- bzw. Organellen-spezifisch ist [115]. Allgemein verringern selten genutzte Codons die Translationseffizienz transgener Sequenzen. Sie können aber auch *frameshift*-Mutationen [116] und den Einbau falscher Aminosäuren [117] in das Zielprotein hervorrufen. Am Beispiel des *gfp* Gens konnten Franklin *et al.* [54] die Bedeutung der Codon-Optimierung für die Produktion hoher Level an rekombinantem Protein im Chloroplasten von *C. reinhardtii* aufzeigen. Die Expression eines Codon-adaptierten *gfp*-Gens führte zu einer etwa 80-fach höheren GFP-Akkumulation gegenüber einer nicht adaptierten *gfp*-Version. Seltene Codons können aber auch regulatorisch wirken und die Faltung und somit die Funktion der Proteine beeinflussen [118]. Statt einer pauschalen Optimierung wird deshalb zunehmend eine Codon-Harmonisierung der transgenen Sequenzen angestrebt [119].

Trotz optimaler Anpassung besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass das artifizielle Transgen auf mRNA-Ebene eine Struktur bildet, die einen schnellen Abbau oder eine reduzierte Translationseffizienz zur Folge hat [52]. Um dennoch eine erfolgreiche Fremdproteinexpression gewährleisten zu können, wird eine Umgestaltung des rekombinanten Gens notwendig. Das bedeutet, UTR-Sequenzen müssen ausgetauscht oder die

kodierende Sequenz modifiziert werden. Surzycki *et al.* [66] berichten zusätzlich von stark schwankenden Fremdproteinakkumulationen (0,9 - 21% TSP) in Transformanten, die aus ein und demselben Transformationsansatz hervorgingen. Vermutlich sind zufällige Modifikationen im Genom der Transformanten, verursacht durch den Transformationsvorgang, für die variierenden Expressionsleistungen verantwortlich. Ziel wird es zukünftig sein, derartige genetische Veränderungen zu identifizieren und gezielt für die rekombinante Proteinexpression in *C. reinhardtii* einzusetzen.

Der Chloroplast von *C. reinhardtii* stellt eine noch recht junge aber zukunftsreiche Expressionsplattform für rekombinante Proteine dar. Mit dem umfangreich zur Verfügung stehenden Methodenspektrum ist es gelungen, zahlreiche biotechnologisch relevante Proteine zu exprimieren (Tab. 1.2). Dennoch ist eine kontinuierliche Weiterentwicklung der Methoden zur Assemblierung, Integration und funktionellen Expression von Transgenen notwendig, um die Mikroalge zu einem leistungsfähigen Expressionssystem zu entwickeln.

**Tabelle 1.2:** Auswahl an rekombinant im Chloroplasten von *C. reinhardtii* exprimierten Proteinen.

Jahr	Protein (Gen)	Ausbeute (TSP)	Funktion / Besonderheit	Ref.
1991	Aminoglycoside adenine transferase ( <i>aadA</i> )	n.b.	vermittelt Spectinomycin- und Streptomycin-Resistenz / erstes plastidär exprimiertes Fremdprotein	[96]
1999	$\beta$ -Glucuronidase ( <i>uidA</i> )	n.b.	Reporter für kolori- und fluorimetrische Analysen / erstes immunologisch nachgewiesenes Fremdprotein	[76]
2000	Aminoglycoside phosphotransferase ( <i>aphA-6</i> )	n.b.	vermittelt Kanamycin- und Amikacin-Resistenz / neben <i>aadA</i> wichtigstes Antibiotikaresistenzgen	[75]
2002	Green fluorescent protein ( <i>gfp</i> )	n.b.	Reporterprotein für <i>in-vivo</i> Fluoreszenzanalysen / Steigerung der Expression durch Codon-Anpassung	[54]
2003	Anti-HSV Glykoprotein D Isc (HSV8-Isc)	n.b.	aktiver Antikörper gegen Herpes-simplex-Viren / Expression des ersten humanen Proteins	[56]
2003	VP1-CTB Fusionsprotein	3%	Vakzin gegen ( <i>foot-&amp;-mouth disease</i> ) FMD-Virus / erste Vakzinexpression	[80]
2007	(M-SAA) bovine mammary-associated serum amyloid	5%	Prophylaxe gegen bakterielle Darminfektionen / Bioaktivitätsnachweis von Algen-M-SAA	[65]
2009	Virusprotein VP28	bis 21%	Vakzin gegen <i>white spot syndrome</i> Virus / bislang stärkste Fremdproteinakkumulation	[66]
2010	CTB-D2 Fusionsprotein	0,7%	Schutz vor <i>S. aureus</i> / oral applizierbares Vakzin	[84]
2010	HMGB1 <i>high mobility group protein B1</i>	2,5%	Wundheilung durch Aktivierung von Endothelzellen	[61]
2013	E7-Protein des humanen Papillomavirus (HPV-16)	0,12%	Vakzin gegen HPV / therapeutischer Schutz vor HPV-basierten Wunden oder Krebs	[79]
2014	Camelid V <sub>H</sub> H-Antikörper	5%	Inaktivierung von Botulinum neurotoxin-A (BoNT/A) / oral applizierbares Antitoxin	[53]

n.b.: nicht bestimmt

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein einfaches Transformationssystem für die Fremdproteinexpression im Chloroplasten der Grünalge *C. reinhardtii* zu etablieren, das die Insertion individuell erzeugter Transgene in das Plastom erlaubt und bei der Selektion auf den Gebrauch von Antibiotika verzichtet. Mit der Erstellung eines umfangreichen Sets an Transgenen sollte das System bezüglich seiner Funktionalität und Eignung für die heterologe Proteinexpression untersucht und Möglichkeiten zur Optimierung der Proteinausbeuten identifiziert werden. Als Modellprotein wurde primär das von *Mycobacterium tuberculosis* sezernierte MPT64 genutzt. In Vorversuchen zeigte sich, dass MPT64 ein gut im Chloroplasten zu exprimierendes Fremdprotein darstellt. Darüber hinaus wurden die heterologen Proteine eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und humanes PF4 (Plättchenfaktor 4) sowie die endogenen aber kernkodierte Proteine BKT ( $\beta$ -Carotin-Ketolase) und PCS (Phytochelatin Synthase) verwendet, um ein breiteres Spektrum an unterschiedlichen Proteinen abzudecken.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterialien

Vor der Verwendung wurden alle hitzebeständigen Lösungen, Glas- und Plastikmaterialien für 20min bei 121°C und 1,2bar autoklaviert (Varioklav<sup>®</sup>, H + P Labortechnik GmbH).

Die Chemikalien wurden in größtmöglicher Reinheit (p.A.-Qualität) von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Peqlab, Sigma, Agrisera und Roche bestellt.

Die Marker und Enzyme wurden von den Firmen Biometra, Thermo Scientific, New England Biolabs (NEB) und Promega bezogen.

Für die Chloroplasten-Transformation wurden die Algen mit Hilfe einer Saugflasche auf sterile Membranfilter NL17 (0,45 µm) der Firma Schleicher und Schuell überführt.

### 2.2 Algenstämme

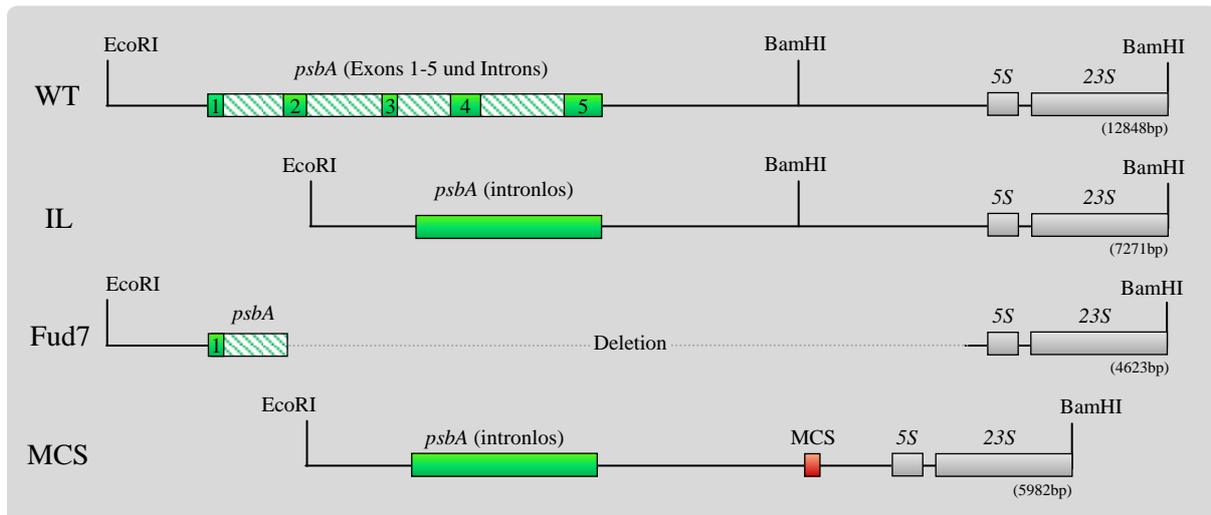
Folgende *C. reinhardtii*-Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. (Abb. 2.1)

**WT:** Dabei handelt es sich um den Wildtypstamm 11/32-b von der SAG (Sammlungen von Algenkulturen, Göttingen).

**IL:** Die IL-Mutante ist im *psbA*-Gen intronlos und wurde durch Komplementation der *psbA*-Deletionsmutante Fud7 mit der cDNA des *psbA*-Gens erzeugt [120]. Durch die Synthese eines unveränderten D1-Proteins ist die IL-Mutante physiologisch mit dem Wildtyp vergleichbar. Sie dient allgemein als Referenzstamm für intronlose *psbA*-Mutanten und ist im Chlamydomonas Resource Center unter der Stammmnummer CC-3946 erhältlich. Die IL-DNA wurde im Rahmen dieser Arbeit als Matrize für alle Promotor- und UTR-Sequenzen genutzt.

**Fud7:** Die *psbA*-Deletionsmutante Fud7 ist nicht in der Lage photoautotroph zu wachsen und somit auf Acetat als Kohlenstoffquelle angewiesen [121]. Vom *psbA*-Gen sind auf Grund einer ca. 8kb großen Deletion nur noch Reste (Exon I sowie ein Teil von Intron I) vorhanden [64]. Im Chlamydomonas Resource Center wird diese Mutante unter der Stammmnummer CC-4147 geführt. Sie diente in dieser Arbeit als Rezipient für die Chloroplasten-Transformation.

**MCS:** Die MCS-Mutante wurde von Matthias Munder [122] durch Transformation der Fud7 mit dem Plasmid pMM2 erzeugt. Diese Mutante besitzt ein intronloses *psbA*-Gen und kann somit photoautotroph wachsen. Zwischen dem *psbA*-Gen und der 5SrDNA fehlen zusätzlich 1161bp intergenische Sequenz, die durch 42bp (Sequenzen für Restriktionsendonukleasen; MCS) ersetzt wurden. Die MCS-Mutante diente als Referenz.



**Abbildung 2.1: Ausschnitt aus der Plastomsequenz der verwendeten Algenstämme.** Schematisch dargestellt ist die Plastomsequenz im Bereich des *psbA*-Gens (Exons – grün, Introns – schraffiert) und der rRNA-Gene (grau) *rrn5* (5S) und *rrnL* (23S). Rot markiert ist eine 42bp lange Sequenz, die 1161bp intergenische Plastomsequenzen ersetzt und im pMM2 als *multiple cloning site* (MCS) genutzt wird. Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

### 2.2.1 Anzucht

Die Kultivierung aller *C. reinhardtii*-Stämme, einschließlich der neu erstellten Mutanten, erfolgte auf einem Schüttler (GFL 3019) bei 23°C und  $35\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (OSRAM L58W/31-830 Lumilux Plus; warm white) in Erlenmeyerkolben. Für das Wachstum der Algenkulturen unter photoautotrophen Bedingungen wurde HS-Medium [123] und unter heterotrophen Bedingungen acetathaltiges TAP-Medium [124] verwendet.

### 2.2.2 Lagerung

Eine kurzfristige (2 bis 3 Monate) Stammhaltung erfolgte auf Platten mit TAP-Medium (+1,5% Agar-Agar). Für eine längere Lagerung der Algenkulturen erfolgte eine Kryokonservierung nach dem auf der Chlamy-Homepage verfügbaren Protokoll von Dick Sayre (<http://www.chlamy.org.methods/freezing.html>). Dafür wurde 1ml einer 4 bis 5 Tage alten TAP-Kultur ( $\text{OD}_{750\text{nm}} = 1$ ) in sterile Nunc CryoTube Vials (1,8ml; Thermo Scientific) überführt und für 2min bei 1000g zentrifugiert. Das Algenpellet wurde anschließend in 250ml frischem TAP-Medium vorsichtig resuspendiert und mit 250ml TAP-Medium + 6% Methanol (v/v) versetzt. Die CryoTubes wurden in einen mit Isopropanol gefüllten Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene) überführt und für 70min bei -80°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein schneller Transfer in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Kryo-Behälter. Für die Verwendung einer kryokonservierten Kultur wurde diese in einem 35°C warmen Wasserbad für 2min aufgetaut und in 50ml frisches TAP-Medium überführt.

## 2.3 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden folgende *E. coli*-Stämme verwendet.

### **DH5 $\alpha$** : (Firma: Clontech)

F-, deoR, endA1, gyrA96, hsdR17, (rk-mk+), recA1, relA1, supE44, F80lacZDM15, thi-1, D(lacZYA-argFV169)

### **TG1**: (Firma: Stratagene)

*supE thi-1  $\Delta$ (lac-proAB)  $\Delta$ (mcrB-hsdSM)5 (rK- mK-)* [F' *traD36 proAB lacIqZ $\Delta$ M15*].

### **Top10**: (Firma: Invitrogen)

F-, mcrA, D(mrr-hsdRMS-mcrBC), F80lacZDM15, DlacX74, recA1, deoR, araD139, D(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (StrR), endA1, nupG

### **M15 [pREP4]**: (Firma: Qiagen)

### 2.3.1 Anzucht

Die Anzucht der *E. coli*-Kulturen erfolgte bei 37°C in LB (Luria-Bertani)-Medium [125] in 10ml Flüssigkulturen bei ca. 120U/min oder auf Agarplatten (+1,5% Bakterien-Agar). Für die Anzucht von *E. coli*-Stämmen, die für eine Proteinexpression vorgesehen waren, wurde TB (Terrific Broth)-Medium [126] verwendet. Zur Selektion Antibiotikaresistenz-vermittelnder Plasmide wurde dem Medium nach dem Autoklavieren spezifisch die sterile Antibiotikaauslösung zugegeben:

Ampicillin (Amp) (Endkonzentration: 100 $\mu$ g/ml)

Kanamycin (Kan) (Endkonzentration: 50 $\mu$ g/ml)

### 2.3.2 Lagerung

Zur Langzeitlagerung erfolgte eine Kryokonservierung der *E. coli*-Stämme. Dafür wurden 700 $\mu$ l einer Übernachtskultur mit 300 $\mu$ l sterilem 50%igen Glycerin vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Kulturen wurden bei -80°C gelagert.

## 2.4 Plasmide

**pQE-30**: (Firma: Qiagen) ist ein 3,4kb großer Klonierungsvektor für die Expression von N-terminal 6xHistidin markierten Fremdproteinen in *E. coli* (M15[pREP4]). Der Vektor besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker.

**pSH4IL:** (D. Fischer) ist ein 7kb großer Vektor basierend auf dem pBluescript SK+ (Firma: Stratagene). Enthalten ist ein 4kb großer Plastomabschnitt (begrenzt durch EcoRI und HindIII) von *C. reinhardtii*. Innerhalb dieser Sequenz wurde die ursprüngliche *psbA*-Gensequenz (6636bp) durch die der cDNA (1059bp) ersetzt.

**pSHc6:** [127] ist ein 8,8kb großer Vektor, der auf dem pBluescript SK+ (Fa. Stratagene) basiert und das intronlose *psbA*-Gen sowie 4755bp von der im 3'-Bereich angrenzenden Plastomsequenz trägt. Die IL-Mutante ist das Ergebnis aus der Transformation des Fud7-Stammes mit dem Vektor pSHc6.

**pMM2:** [122] ist ein 9kb großer Vektor. Ausgehend vom pSH4IL wurde die BamHI-Schnittstelle genutzt, um folgende Sequenzen einzufügen: (i) eine MCS (42bp) für die beabsichtigte Insertion von Transgenen und (ii) im 3'-Bereich angrenzend 2000bp homologe Plastomsequenz für die Transformation des Fud7-Stammes. Alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten plastidären Transformationsvektoren basieren auf pMM2.

**p322GFPct:** (S. Franklin, Scripps Research Institut) ist ein 10kb großer Vektor, der auf dem pBluescript SK+ (Fa. Stratagene) basiert und ein 7kb großes Insert der IRa-Region des *C.r.*-Plastoms (EcoRI-XhoI-Fragment) besitzt. Darin enthalten ist ein Teil des *psbA*-Gens (Intron 4 und Exon 5), das an den plastidären Codongebrauch angepasste *gfp*-Gen (GFPct) und die rRNA-Gene 5S und 23S (Exon 2). Das Plasmid diente in dieser Arbeit als Ausgangspunkt für die Erstellung der eGFP-kodierenden Sequenz.

**Vektoren mit Codon-optimierten Gensequenzen:** Die Synthese erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon. Jedes der *de novo*-synthetisierten DNA-Fragmente wurde in den Eingangsvektor pCR2.1 (3,9kb) über TOPO-TA Cloning inseriert, in TOP10-Zellen (*E. coli*) transformiert und auf Ampicillin und Kanamycin selektiert.

**pCrMPTcp:** enthält 741bp MPT64-kodierender Sequenz, die an den plastidären Codongebrauch von *C. reinhardtii* angepasst ist.

**pEcMPT:** enthält 741bp MPT64-kodierender Sequenz, die an den Codongebrauch von *E. coli* angepasst ist.

Die *de novo*-synthetisierten DNA-Fragmente wurden in den Eingangsvektor pEX-A (2450bp) über Typ IIs-Restriktionsenzyme inseriert, in DH5 $\alpha$ -Zellen (*E. coli*) transformiert und auf Ampicillin selektiert.

**pCrBKTcp:** enthält 984bp BKT-kodierender Sequenz, die an den plastidären Codongebrauch von *C. reinhardtii* angepasst ist.

**pCrPCScp:** enthält 762bp PCS-kodierender Sequenz, die an den plastidären Codongebrauch von *C. reinhardtii* angepasst ist.

## 2.5 Oligonukleotide

Für das Design der Primersequenzen wurde die Software „Oligo Calc“ verwendet (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Damit konnten die spezifischen *Annealing*-Temperaturen berechnet und störende Sekundärstrukturen ausgeschlossen werden. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma biomers.net GmbH.

**Tabelle 2.1: Oligonucleotide mit BsaI-Überhang**, verwendet für die Erzeugung von PCR-Fragmenten, die im *Golden Gate shuffling* eingesetzt wurden. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BsaI ist grau unterlegt und die resultierende Schnittstelle unterstrichen.

Name	Sequenz (5' → 3')
HA tag for	TATAGGTCTCAT <u>ACC</u> CTTACGATGTTCTGATTAC
HA tag rev	TATAGGTCTCA <u>ATTA</u> AGCGTAATCAGGAACATCGTAAGGG
rbcL 3' Bsa for	TATAGGTCTCATA <u>ATTTTT</u> ATTTTCATGATGTTTATGTGAATAGCATAAACATCG
rbcL 3' Bsa rev	TATAGGTCTCAA <u>AGCA</u> ACACATAA <u>CTCC</u> ACGTAAGCGCA
psbA 3'UTR for	TATAGGTCTCATA <u>ATTTTT</u> TTTAACTAAAATAAAATCTGGTTAACCATACCTGG
psbA 3'UTR rev	TATAGGTCTCAA <u>AGCGGG</u> ACGTCCTGCCAACTGCC
P 16S for+Bsa	TATAGGTCTCA <u>AGGTC</u> AGGCAACAAATTTATTTATTGTCCCGTAAGGGG
P 16S rev+Bsa	TATAGGTCTCAGATA <u>CTCTT</u> TAAAGTTTAAATTTGTCCGGGATTTTAAACCC
5'atpA for+Bsa	TATAGGTCTCATA <u>CTTT</u> ACCTTTTTTTAATTTGCATGATTTTAAATGCTTATGC
atpA 5' Bsa for	TATAGGTCTCA <u>AGGTC</u> AAAAGTCATTTTATAACTCGTCTCAA
atpA 5' Bsa rev	TATAGGTCTCCATA <u>AAAAA</u> AGAAAAATAAAATAAAAGATTA <u>AAAAA</u> AG
HisX 5'atpA rev	TATAGGTCTCAGAT <u>GGTGGT</u> GATGCATAAAAAAGAAAAATAAAATAAAAGATTA <u>AAAAA</u> AG
HisX MPT for	TATAGGTCTCACATCATCATCACCATCACCACATGCGTATCAA <u>AAATCTT</u> CATGCTTGTTA

## Fortsetzung der Tabelle 2.1

Name	Sequenz (5' → 3')
P psbAfor+Bsa	TATAGGTCTCAAGGTCGCTCTATTTAATACTCCGAAGGAGGCAG
psbA 5'Bsa rev	TATAGGTCTCTCATAATGTTAATTTTTTAAAGTTTTAATTTCTCCGTAAAATATTG
BKTfor+Bsa	TATAGGTCTCATATGGGTCCAGGTATTCAACCAACATCAGC
BKTrev+Bsa	TATAGGTCTCAGGTAAGCTAAAGCAGCACCACGAGCAATTTGACGAC
HisX PF4 for	TATAGGTCTCACATCATCATCACCATCACCACATGGAAGCTGAAGAGGATGGTGACTTAC
PF4 for 1+Bsa	TATAGGTCTCTCGCAATGGAAGCTGAAGAGGATGGTGACTTACAATGTTTATGTGTTAAA
PF4HA rev3+Bsa	TATAGGTCTCAGGTATGATTCAAGTAATTTCTTAATGATTTTCTGTATAATGGAGCTTG
PF4 atpA5'for	TATAGGTCTCATATGGAAGCTGAAGAGGATGGTGACTTAC
MPT psbD5'for	TATAGGTCTCTCGCAATGCGTATCAAAATCTTCATGCTTG
MPT atpA5'for	TATAGGTCTCATATGCGTATCAAAATCTTCATGCTTGTTACTGCTG
psbD 5' UTR for	TATAGGTCTCAAGGTCAGGCAATTGTCAGTGGCGTC
psbD 5' UTR rev	TATAGGTCTCATGCGTGTATCTCCAAAATAAAAAACAACATCATCG
SP1for GGCT	TATAGGTCTCTGGCTTTACGTGCTGCTCAATCAGC
SP 1 rev+Bsa	TATAGGTCTCTCATAGCATTGTCAGAACAGCTACCATAGC
SP3for GGCT	TATAGGTCTCTGGCTTTAGCTTCAAAAGTTGCTACTCG
SP 3 rev+Bsa	TATAGGTCTCTCATAGCTAATGCAGCTTTTGGAGCTACAGC
MPT rev	TATAGGTCTCAGGTAAGCAAGCATTGAGTCGATAGCAG
MPT 24start	TATAGGTCTCATATGGCTCCTAAAACATACTGCGAAGAGTTAAAAGG
MPT SP rev	TATAGGTCTCTCATAGCAGTAGCAACACCTGAACAACAAAGTAAAAAC
eGFPatpA5'for	TATAGGTCTCATATGGTATCTAAAGGTGAAGAATTATTCACAGGTG
eGFP H231Lrev	TATAGGTCTCAGGTATTTGTATAATTCATCCATACCAAGAGTAATACCAGC
P7S BsaI for	TATAGGTCTCAAGGTGATATCAATGTTAGTGGCAGTGGCCTGCAC
P7S BsaI rev	TATAGGTCTCACTGTCATTTGACCTTATAAAACAAAAATAAACCTCTTTAGCAG
ACAGP16SforBsa	TATAGGTCTCAACAGGCAACAAATTTATTTATTGTCCTGTAAGGGG
5'atpA GGCT rev	TATAGGTCTCAAGCCATAAAAAAGAAAAATAAATAAAAGATTAATAAAAG
SP2for GGCT	TATAGGTCTCTGGCTACTGCTTTATGTAATAAAGCTTTCGC
SP2 rev+Bsa	TATAGGTCTCTCATAGCGTTAGCTGGTGAAGATGATAC
5'atpA for ATGA	TATAGGTCTCAATGATTTACCTTTTTTTAATTTGCATGATTTAATGCTTATGC
P7S rev ATGA	TATAGGTCTCATCATTTGACCTTATAAAACAAAAATAAACCTCTTTAGCAG
crPCSforBsaI	TATAGGTCTCATATGGGTTTCAAGAAAACCTTTCTACAAACGTAAGC
crPCSrevBsaI	TATAGGTCTCAGGTAAGAGCAGCAGCACCAGAACGAACG
ecPF4for TATG	TATAGGTCTCATATGGAAGCGGAAGAAGATGGTGAC
ecPF4rev TAAT	TATAGGTCTCAATTAGCTTTCCAGCAGTTTTTTAATGATTTTTTTG

**Tabelle 2.2: Oligonukleotide für die Gensynthese von PF4<sub>Chlamy</sub> (*C. reinhardtii* Chloroplast Codon-optimiert)** Die Erkennungssequenz für BsaI ist grau unterlegt und die resultierende Schnittstelle unterstrichen. Zielvektor = pMM2

Name	Sequenz (5' → 3')
PF4 for 1+BSA	TATAGGTCTCTCGCAATGGAAGCTGAAGAGGATGGTGACTTACAATGTTTATGTGTAAAA
PF4 for 2	GTCGTCCACGTCATATTACTTCATTAGAAGTTATCAAAGCTGGTCCACATTGTCCAAC
PF4 for 3	ACACTTAAAAACGGTCGTAAAACTGTTTAGACTTACAAGCTCCATTATACAAGAAAATC
PF4 rev 1	AGTAATATGACGTGGACGAACTTGTGAAGTTGTTTTAACACATAAACATTGTAAGTCACC
PF4 rev 2	AGATTTTACGACCGTTTTTAAGTGTAGCGATTAATTGAGCAGTTGGACAATGTGGACCAG
PF4HA rev 3+BSA	TATAGGTCTCAGGTAATGATTCAAGTAATTTCTTAATGATTTTCTTGTATAATGGAGCTTG

**Tabelle 2.3: Oligonukleotide für die Gensynthese von PF4<sub>E.coli</sub> (*E. coli* Codon-optimiert)**

Name	Sequenz (5' → 3')
EcPF4 for1	ATGGAAGCGGAAGAAGATGGTGACCTGCAGTGTCTGTGTGTTAAAAACCACCAGCC
EcPF4 for2	TTACCTCCCTGGAAGTTATCAAAGCGGGTCCGCATTGTCCGACCGCACAGCTGATCGCGA
EcPF4 for3	GTCTGGACCTGCAGGCACCGCTGTACAAAAAAATCATAAAAAACTGCTGGAAAGCTACC
EcPF4 rev1	TTGATAACTTCCAGGGAGGTAATATGACGCGGACGAACCTGGCTGGTGGTTTTAACACAC
EcPF4 rev2	GTGCCTGCAGGTCCAGACAGATTTTACGACCGTTTTTCAGGGTCCGATCAGCTGTGCGG
EcPF4 rev3	TTACGCGTAATCCGGAACATCGTACGGGTAGCTTTCCAGCAGTTTTTTAA

**Tabelle 2.4: Oligonukleotide für die Erstellung von *E. coli* Expressionsvektoren in pQE30.** Die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und die Erkennungssequenz von BsaI ist grau unterlegt. Die verdauten PCR-Fragmente wurden in den mit BamHI und HindIII geöffneten pQE30 kloniert.

Name	Sequenz (5' → 3')	Zielvektor
EcPF4 for BamH	TATAGGATCCATGGAAGCGGAAGAAGATGGTGAC	pQE30
EcHA rev Hind	TATAAAGCTTACGCGTAATCCGGAACATCGTACG	
EcMPTforBsaneu	TATAGGTCTCTGATCCATGCGTATCAAAATCTTCATGCTG	pQE30
EcHA rev Hind	TATAAAGCTTACGCGTAATCCGGAACATCGTACG	

**Tabelle 2.5: Mutagene Oligonukleotide für die Erstellung der kodierenden eGFP-Sequenz** Die Erkennungssequenz für BsaI ist grau unterlegt und die resultierende Schnittstelle unterstrichen. Die gegenüber der Originalsequenz veränderten Nukleotide wurden rot markiert. Der Vektor p322GFPct wurde im 1. Schritt der SOE-PCR (siehe 2.7.6) als Template eingesetzt.

Name	Sequenz (5' → 3')
eGFPatpA5'for	TATAGGTCTCATATG <u>GTAT</u> CTAAAGGTGAAGAATTATTCACAGGTG
eGFP F64L rev	CTGAAACATTGTACACCGTATGTAAAGTTGTAAC
eGFP F64L for	CCAACTTAGTTACAACCTTAAACATACGGTGTAC
eGFP H231Lrev	TATAGGTCTCAGGTAATTTGTATAATTCATCCATACCAAGAGTAATACCAGC

**Tabelle 2.6: Oligonukleotide für die Erstellung der SP-Fragmente von OEE1 und OEE3.**

Name	Sequenz (5' → 3')
SP OEE1 for	ATGGCTTTACGTGCTGCTCAATCAGCTAAAGCTGGTGTTCGTGCTGCACGTCCAAATCGTGCTACAGCTGTAGTTTGTAAGCTCA
SP OEE1 rev	AGCATTTCAGAAACCAGCTACCATAGCAGTAGCTAAAGCTGCAGCTGCAGCAGCTTGACCTACTTTTGGAGCTTTACAAACTACAGCTG
SP OEE3 for	ATGGCTTTAGCTTCAAAAGTTGCTACTCGTCCAGCAGTAGCTTCACGTCGTGGTGTGTAGTTGTACGTGCTTCAGGTGAATCTCGTC
SP OEE3 rev	AGCTAATGCAGCTTTTGGAGCTACAGCAGCTACAGCTGATGCTAATAAACACCTAATACAGCAGACGAGATTACCTGAAGCAGC

**Tabelle 2.7: Oligonukleotide mit 5'-Markierungen für den Homoplasmie-Schnelltest.**

Name	Sequenz (5' → 3')	5'-Markierung
147for-FITC	ATCGCTTTCATCGCTGCTCC	FITC
ILrev-Dig	CGATTGCGTTAGAAGTTGGGA	Digoxigenin
Fud7rev-Bio	TTGGCTGCTGATTACCTTTTCG	Biotin

**Tabelle 2.8: Standard-Oligonukleotide**

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
-251for	CGTCCTATTTTAATACTCCGAAG	Test-PCR / Sequenzierung
-MCS for	CTAATAACTTTAATATCGCTGGATCTTGAGGT	Test-PCR / Sequenzierung
5S Endefor	AACTTTACGGGTCGCCGTCTGGAATC	Test-PCR / Sequenzierung
HA rev	CGTAATCAGGAACATCGTAAGG	Test-/ Sonden-PCR / Sequenzierung
HA for	CCTTACGATGTTCTGATTACG	Test-PCR / Sequenzierung
MPT for	ATGCGTATCAAAATCTTCATGCTTG	Test-/ Sonden-PCR / Sequenzierung
162MPT rev	GATGTTGATGTTGTAAGCTGGGTC	Test-PCR / Sequenzierung
162MPT for	GACCCAGCTTACAACATCAACATC	Test-PCR / Sequenzierung
MPT520for	GAAC TAAGCAAACAACAGGTCAACAAG	Test-PCR / Sequenzierung
MPT520rev	CTTGTTGACCTGTTTGTGTTGCTTAGTTC	Test-PCR / Sequenzierung
5S -64 for	CCCCTTGCGGGTAACTATCG	Sonden-PCR (5S rDNA-Sonde)
5S Sonde	CGAAGGGGACGTCCTTCGGAGT	Sonden-PCR (5S rDNA-Sonde)
BKTfor	ATGGGTCCAGGTATTCAACCAACATCAG	Test-PCR / Sequenzierung
BKT 79 rev	CAGCAGCTAATAAAGCAAACGTGAATG	Test-PCR / Sequenzierung
PF4 for	ATGGAAGCTGAAGAGGATGGTG	Test-PCR / Sequenzierung
-262atpA5'for	CTTTAGTTGCTTACGACGCCTG	Test-PCR / Sequenzierung
-262atpA5'rev	CAGGCGTCGTAAGCAACTAAAG	Test-PCR / Sequenzierung
pQE for	CGGATAACAATTTACACAG	Kolonie-PCR / Sequenzierung
pQE rev	GTTCTGAGGTCATTACTGG	Kolonie-PCR / Sequenzierung

## 2.6 Physiologische Untersuchungen

### 2.6.1 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl in Algensuspensionen wurde die Zählkammer nach Thoma verwendet. Von der zu messenden Algensuspension wurde 1ml abgenommen und zur Inaktivierung der Geißelbewegung mit 10µl Jodlösung (gesättigt) versetzt. 15µl dieser Suspension wurden auf die Zählkammer gegeben und mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurden die Zellen innerhalb der Markierungen (Quadrate) gezählt. In zwei unabhängigen Messungen wurden für jede Probe mindestens 4 Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Mit der folgenden Formel wurde abschließend die Zellzahl berechnet.

$$\text{Zellzahl /ml} = 2,5 \cdot 10^5 \text{ (Kammerfaktor eines Großquadrates) } * \text{Mittelwert der gezählten Zellen}$$

### 2.6.2 Bestimmung des Algenwachstums

Die Anzucht der Algen erfolgte in einer sogenannten Kniese-Apparatur bei 24°C, einer Lichtintensität von  $75 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und bei ständiger Begasung mit einem CO<sub>2</sub>-Luftgemisch (2,5% CO<sub>2</sub>). 300ml acetatfreies Medium (HS) wurden mit einer Zellzahl von jeweils  $1,5 \times 10^7$  Zellen beimpft. Für die Messung der Zelldichte wurde zu verschiedenen Zeitpunkten 1ml entnommen und die optische Dichte (OD) bei 750nm [128] bestimmt. Die Wachstumsrate ( $\mu$ ) wurde innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase anhand der Kulturdichte (OD) zum Zeitpunkt  $t_1$  und  $t_2$  entsprechend der nachfolgenden Formel bestimmt.

$$\mu = \frac{\ln OD_2 - \ln OD_1}{t_2 - t_1}$$

### 2.6.3 Chlorophyllbestimmung

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes erfolgte nach [129]. Dazu wurde 1ml Algenkultur pelletiert (30s, 16000g), 800µl vom Überstand verworfen und die Zellen in den restlichen 200µl resuspendiert. Durch Zugabe von 800µl Aceton (100%) und Schütteln für 4min (Vortex) wurde das Chlorophyll extrahiert. Nach der Sedimentation (2min, 16000g) von nicht löslichen Bestandteilen wurde vom chlorophyllhaltigen Überstand die optischen Dichte bei 652nm (Ultraspec 2000, Pharmacia/Biotech) gemessen. Mit der nachfolgenden Formel wurde der Chlorophyllgehalt berechnet.

$$\text{mg Chlorophyll}_{(a+b)}/\text{ml} = E_{652} * \text{Verdünnungsfaktor} / 34,5 \text{ (molarer Extinktionskoeffizient)}$$

#### **2.6.4 Bestimmung der Photosystem II-Effizienz**

Die Bestimmung der PSII-Effizienz (Fv/Fm) erfolgte nach der Methode von Nedbal *et al.*, 2000 [130] und wurde mit Hilfe der FluorCam 800 MF (Photon System Instrument, Brno, Tschechische Republik) durchgeführt. Jeweils 200µl von 3 bis 4 Tage alten Algenkulturen wurden auf eine Mikrotiterplatte überführt und vor der Messung 10min dunkel adaptiert.

### **2.7 Nukleinsäure-spezifische Methoden**

#### **2.7.1 Plasmid-Isolation aus *E. coli***

Plasmid-Isolationen wurden entsprechend der Herstellerangaben mit Hilfe des PureYield™ Plasmid Miniprep Systems von Promega durchgeführt.

#### **2.7.2 Isolation von Gesamtzell-DNA aus *C. reinhardtii***

Aus *C. reinhardtii*-Zellen wurde DNA nach der Methode von Newman *et al.*, 1990 [99] isoliert. Dafür wurden Zellen entsprechend 150µg Chlorophyll bei 16000g für 2min zentrifugiert und das Algenpellet in 300µl TEN-Puffer (50mM EDTA, 20mM Tris pH 8, 0,1M NaCl) resuspendiert. Nach Zugabe von 40µl 20% SDS (w/v), 40µl 20% Laurylsarcosyl (w/v) und 30µl Pronase erfolgte durch 10-minütiges Invertieren die Zelllyse. Diesem Ansatz wurden 650µl PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol; 25/24/1) hinzugefügt und 5min vorsichtig geschüttelt. Nach einer Zentrifugation für 5min bei 16000g erfolgte eine Phasentrennung. Die Nukleinsäure-enthaltende, obere klare Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und einer erneuten PCI-Fällung unterzogen. Dem resultierenden Volumen wurden 2 Volumina 100% Ethanol (-20°C) zugegeben, gemischt und für mindestens 30min bei -20°C inkubiert. Die denaturierte DNA wurde für 10min zentrifugiert (4°C, 16000g) und 2-mal mit 800µl 70%igen Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde anschließend in 300µl TE-Puffer (10mM Tris pH 8, 10mM EDTA) gelöst und mit 30µl 3M Ammoniumacetat und 30µl 3M MgCl<sub>2</sub> versetzt. Durch die Zugabe von 2 Volumina 100%igen Ethanol (-20°C) wurde die DNA erneut für mindestens 30min bei -20°C gefällt. Im Anschluss wurde die DNA pelletiert (10min, 4°C, 16000g) und erneut 2-mal mit 70%igen Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in Aqua dest. gelöst.

### 2.7.3 Isolation von Gesamtzell-RNA aus *C. reinhardtii*

Zellen entsprechend einer Chlorophyllmenge von 300µg wurden pelletiert, (4°C, 5min, 6000g) und in 1ml Trizol (38% gesättigtes Phenol (v/v), 0,8M Guanidinthiocyanat, 0,4M Ammoniumthiocyanat, 0,1M Na-Acetat pH 5, 0,5% Glycerol (v/v)) aufgenommen. Die Zellen wurden bei 55°C für 5min lysiert und im Anschluss wurden 200µl Chloroform zugegeben, gemischt (15s Vortex) und 5min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation (4°C, 10min, 16000g) wurde die farblose, obere Phase vorsichtig abgenommen, mit 500µl Isopropanol versetzt und sorgfältig gemischt. Die Fällung der RNA erfolgte für 5min bei RT. Anschließend wurde die RNA pelletiert (10 min, 4°C, 16000g), 2 mal mit 1ml 75%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30µl DEPC-Wasser aufgenommen.

### 2.7.4 Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurde das NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Peqlab) entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

### 2.7.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle DNA-Abschnitte wurden im Thermocycler TRIO-Thermoblock bzw. TGradient der Firma Biometra vermehrt. Je nach Anforderung wurden die DNA-Polymerasen Go-Taq® (Promega), Phusion® oder Long-PCR-Enzyme-Mix (beide Thermo Scientific) verwendet. Ein Standard-PCR-Pipettier-Ansatz und ein dazugehöriges PCR-Programm sind in der Tabelle 2.9 aufgeführt.

**Tabelle 2.9: Standard-Pipettierschema und PCR-Programm**

Pipettierschema		PCR-Programm	
PCR-Komponenten	Volumen	Temperatur in °C	Zeit in sec
5x PCR-Puffer	10µl	94	180
dNTP's (10mM)	1µl	94	45
Primer forward (20pmol/µl)	1µl	50 bis 72*	40
Primer reverse (20pmol/µl)	1µl	72	60/kbp
Template (DNA ca. 200ng/µl)	1µl	72	300
Go-Taq (5u/µl)	0,2µl	4	∞
H <sub>2</sub> O	ad 50µl		

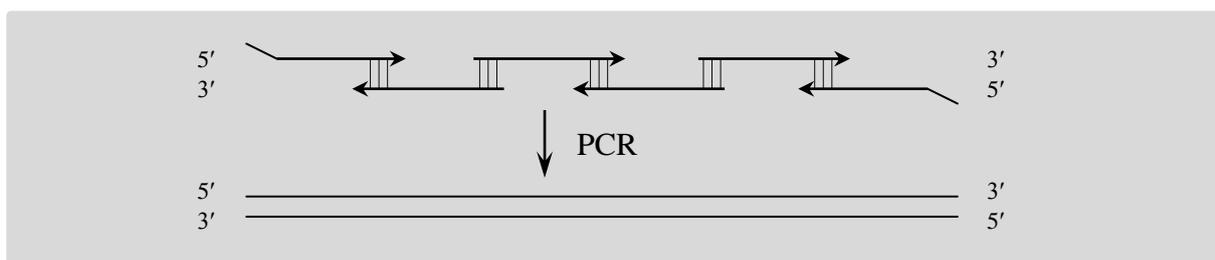
\* abhängig von der Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide (Primer)

### 2.7.6 *Splicing by overlapping extension (SOE)-PCR*

Die SOE-PCR [131] wurde verwendet, um innerhalb der GFP-Sequenz sieben Punktmutationen einzuführen und dadurch eine eGFP-kodierende Sequenz zu erzeugen. Das Plasmid p322GFPct (S. Franklin, Scripps Research Institut) diente dafür als Template. In einem ersten Schritt wurden zwei Teilbereiche der GFP-kodierenden Sequenz unter Verwendung der Primerpaare eGFPatpA5'for / eGFP F64L rev und eGFP F64L for / eGFP H231L rev (Tab. 2.5) amplifiziert. Beide Fragmente konnten auf Grund einer 25bp überlappenden Sequenz innerhalb einer dritten PCR in Anwesenheit der Primer eGFPatpA5'for und eGFP H231L rev fusioniert werden.

### 2.7.7 Gensynthese

Für eine optimale Proteinexpression wurden die Gensequenzen *in silico* an den spezifischen Codongebrauch vom Zielorganismus bzw. Organell (*E. coli* bzw. Chloroplast von *C. reinhardtii*) angepasst. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass innerhalb der Sequenz keine Schnittstellen für klonierungsrelevante Restriktionsenzyme vorhanden sind. Die kodierenden Sequenzen für die Proteine MPT64, CrBKT und CrPCS wurden der Firma Eurofins MWG-Operon übermittelt und dort zu günstigeren Konditionen generiert als es im eigenen Labor möglich gewesen wäre. Aufgrund der geringen Größe der PF4-kodierenden Sequenz (210 bp) war es wirtschaftlich sinnvoll, die Gensynthese selbst durchzuführen, da nur wenige Oligonukleotide (Tab. 2.2 und 2.3) benötigt wurden. Die dafür angewandte Methode (Abb. 2.2) leitet sich vom DNA-*Shuffling* ab und wurde von Stemmer und Mitarbeitern entwickelt [132].



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung der Gensynthese verändert nach Stemmer *et al.*, 1995 [132].

Für die Gensynthese wurden jeweils 6 Oligonukleotide (Tab. 2.2 und 2.3) mit einer Länge von ca. 60bp verwendet, die abwechselnd an den Enden mit 20 bis 27 Nukleotiden komplementär überlappen. Die Oligonukleotide wurden zusammen in einer Standard-PCR eingesetzt und zu einem vollständigen Gen assembliert. Für anschließende Klonierungsschritte wurden über flankierende Primer entsprechende Restriktionsschnittstellen eingefügt.

### 2.7.8 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die horizontale Flachbett-Gelelektrophorese wurde genutzt, um DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Dafür wurde 1 × TBE (89mM Borsäure, 89mM Tris pH 8, 2mM EDTA) als Elektrophorese-Puffer verwendet. Durch Erhitzen in der Mikrowelle wurde Agarose in 1 × TBE gelöst und nach kurzem Abkühlen mit 1µl Ethidiumbromid (Stammlösung 10mg/ml) pro 100ml Agaroselösung versetzt. Zur Herstellung des Agarosegels wurde die Lösung in eine abgedichtete Gießvorrichtung gegossen und der Probenkamm eingehangen. Das erstarrte Agarosegel wurde in eine Elektrophorese-Kammer gestellt, mit 1 x TBE-Puffer überschichtet und mit 6 × Ladepuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau; 15% (w/v) Ficoll) versetzten DNA-Proben beladen. Als Längenstandards wurden die GeneRuler™ 100bp plus oder 1kb der Firma Thermo Scientific mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 90-120V (Standard Power Pack P25, Biometra) für 30 bis 90min. Die Gele wurden abschließend mit dem Gel Imaging System (raytest Isotopenmessgeräte GmbH) dokumentiert.

### 2.7.9 Agarosegelelektrophorese von RNA

Die Auftrennung von RNA erfolgte in einem denaturierenden Agarosegel (1% (w/v) Agarose; 40mM MOPS pH 7,0; 10mM Natriumacetat; 1mM EDTA; 3,5% (v/v) Formaldehyd). Die RNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 2xRNA-Ladepuffer (Thermo Scientific) versetzt und 10min bei 70°C denaturiert. Das Ethidiumbromid im Ladepuffer ermöglichte die Detektion der separierten RNA-Banden unter UV-Licht. Als Längenstandard wurde der „RNA Ladder, High Range“ (200b bis 6000b) der Firma Thermo Scientific verwendet.

### 2.7.10 Southern und Northern Blot

Das Blot-spezifische Verfahren wurde entsprechend Sambrook *et al.* [125] durchgeführt. Infolgedessen wurden die Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Roche®) transferiert und durch UV-Licht (UV-Stratalinker 1800, Stratagene) fixiert. Mit dem DIG DNA Labeling Mix (Roche®) wurden gemäß Herstellerangaben über PCR DIG-markierte DNA-Sonden erstellt. 5SrDNA- bzw. *psbA*-spezifische Sonden kamen für die Southern Blot Analysen zum Einsatz und jeweils genspezifische Sonden wurden für die Northern Blot Analysen verwendet. Nach einer 1 stündigen Prähybridisierung (5 × SSC, 50% Formamid (v/v), 0.1% N-Lauroylsarcosin (w/v), 0.02% SDS (w/v), 2% Boehringer Blockingreagenz (w/v) Roche®) erfolgte durch Zugabe der zuvor denaturierten Dig-makierten Sonde (10min bei 95°C) die Hybridisierung über Nacht bei 50°C im Hybridisierungsofen (WTB binder). Am folgenden Tag wurde die

Membran 2 x 15min bei RT mit 2 x SSC, 0,1% (w/v) SDS und anschließend 2 x 15min bei 65°C mit 0,1 x SSC, 0,1% (w/v) SDS gewaschen, für 45min geblockt (100mM Tris-HCl; 150mM NaCl; pH 7,5; 0,4% (w/v) Boehringer Blocklösung von Roche®) und mit dem anti-DIG fab fragments (Roche®) für 30min bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem CSPD, Ready-to-use Kit (Roche®) entsprechend der Herstellerangaben.

### **2.7.11 Reinigung von DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente wurden direkt aus dem PCR-Ansatz oder erst nach der gelelektrophoretischen Auftrennung isoliert und gereinigt. Die Reinigung erfolgte unter Verwendung des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega) entsprechend der Herstellerangaben.

### **2.7.12 Standard-Klonierung**

Für die Erstellung von *E. coli*-Expressionsvektoren basierend auf pQE30 wurde standardmäßig kloniert (d.h. Verdau – Reinigung – Ligation – Transformation). Dazu wurden die DNA-Fragmente und der pQE30 mit Standard-Restriktionsenzymen (Thermo Scientific) dem Herstellerprotokoll folgend verdaut, über ein Agarosegel aufgetrennt und gereinigt. In einem Verhältnis von 1:5 wurden anschließend Vektor und Insert bei 16°C über Nacht ligiert. Der 20µl Ligationsansatz enthielt 1u T4-DNA-Ligase und 1 x Ligase-Puffer (beides Thermo Scientific). Nach der anschließenden Inaktivierung der Ligase (65°C, 10min) erfolgte die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (M15 [pREP4]) (siehe 2.8.1).

### **2.7.13 Golden Gate shuffling**

Mit der *Golden Gate shuffling*-Methode nach Engler [133] wurden alle Plasmide zur Transformation des Algenstammes Fud7 [121] erstellt. Als Empfängervektor für ein aus mehreren DNA-Fragmenten zusammengesetztes Transgen diente das Plasmid pMM2. Die einzelnen DNA-Fragmente wurden über PCR mit Primern, die am 5'-Ende BsaI-Schnittstellen enthalten (Tab. 2.1), generiert und wie unter 2.7.11 beschrieben gereinigt. In Tabelle 7.1 sind alle PCR-Fragmente dargestellt. Für die Erstellung eines Transformationsvektors wurden die Komponenten (Puffer, Enzyme, pMM2 und bis zu 5 DNA-Fragmente) in einem Reaktionsgefäß vereinigt und im Thermocycler (TRIO-Thermoblock, Biometra) einem sich wiederholenden Zyklus aus Verdau und Ligation ausgesetzt. Die detaillierte Zusammensetzung des Verdau-Ligation-Ansatzes sowie des verwendeten Thermocycler-Programms ist in der Tabelle 2.10 aufgeführt. 10µl des Reaktionsansatzes wurden für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen (TG1) verwendet (siehe 2.8.1).

**Tabelle 2.10: Pipettierschema und Thermocycler-Programm für den Verdau-Ligation-Ansatz**

Pipettierschema		Thermocycler-Programm		
Komponenten	Volumen	Temp.	Zeit in min	Beschreibung
10 x Ligase-Puffer	2µl	37°C	30	Verdau
Vektor pMM2 (50ng/µl)	1µl	37°C	10	Verdau
n x DNA-Fragment (100ng/µl)	je 1µl	16°C	5	} 40 x Ligation
T4 DNA-Ligase (5u/µl)	1,5µl	22°C	5	
BsaI-HF™ (20u/µl)	0,5µl	50°C	60	finaler Verdau
H <sub>2</sub> O	ad 20µl	80°C	5	Denaturierung
		4°C	∞	Lagerung

### 2.7.14 Sequenzierung

Von der Firma SeqLab - Sequence Laboratories Göttingen GmbH wurden alle DNA-Sequenzierungen durchgeführt. Dafür wurden die DNA-Fragmente entsprechend des Firmenprotokolls aufgearbeitet und zusammen mit einem spezifischen Primer versendet. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Hilfe der Chromas-Software ([www.techne-lysium.com.au/chromas.html](http://www.techne-lysium.com.au/chromas.html)) und der ClustalW-Software ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) ausgewertet.

## 2.8 Transformation

### 2.8.1 Transformation von *E. coli*

Über die Rubidiumchlorid-Methode wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen erzeugt und für die Transformation eingesetzt. Dazu wurden 200ml LB-Medium mit 3ml einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln (120rpm), bis zu eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 kultiviert. Je 50ml Aliquots wurden nach 15min Inkubation auf Eis pelletiert (4°C, 5min, 1000g) und die Zellen in 20ml TfbI-Puffer (100mM RbCl, 30mM K-Acetat, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin (v/v)) resuspendiert. Nach 10min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut pelletiert (4°C, 5min, 1000g) und in 2ml TfbII-Puffer (10mM RbCl, 10mM MOPS, 75mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin (v/v)) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 20min auf Eis wurden 100µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorfgläser pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Transformation der *E. coli*-Zellen erfolgte durch die Hitzeschock-Methode nach Sambrook *et al.* [125]. Dafür wurden maximal 10µl Ligationsansatz mit 100µl chemisch kompetenten Zellen gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42°C, 50s) und 2min Inkubation auf Eis wurde 900µl SOC-Medium (2% Trypton (w/v),

0,5% Hefeextrakt (w/v), 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM Glucose) zugegeben und die Zellen für 1h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. In Abhängigkeit von den eingefügten Resistenzen erfolgte die Selektion auf antibiotikahaltigen LB-Platten bei 37°C über Nacht.

### **2.8.2 Transformation von *C. reinhardtii***

Mit Hilfe der Partikelkanone [47] erfolgte die Transformation der ausschließlich heterotroph wachsenden *C. reinhardtii*-Mutante Fud7. In Anlehnung an Dauvillee *et al.*, 2004 [50] wurden die zuvor erstellten Transformationsplasmide an Wolframpartikel präzipitiert und in den Rezipientenstamm (Fud7) geschossen. Nach einer Dunkel-Inkubation von 24h auf TAP-Medium wurden die Zellen auf Minimalmedium (HS) überführt und bei 23°C und einer Lichtintensität von 20 bis 40 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  für 2 bis 3 Wochen inkubiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Photoautotrophie.

## **2.9 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.9.1 Gesamtzellproteinextraktion aus *C. reinhardtii***

Zellen entsprechend einer Chlorophyllmenge von 0,5mg wurden pelletiert (5min, RT, 6000g) und mit 1ml (0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 300 $\mu\text{l}$  (0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), 200 $\mu\text{l}$  (5% SDS (w/v), 30% Saccharose (w/v)) und 25 $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen und für 25min bei RT geschüttelt (Vortex). Nach der Zentrifugation (3min, RT, 16000g) wurde der proteinhaltige Überstand separiert und der Chlorophyllgehalt bestimmt.

### **2.9.2 Extraktion der löslichen Proteinfraction**

*C. reinhardtii*-Zellen entsprechend 0,5mg Chlorophyll wurden sedimentiert (5min, RT, 6000g), in Proteinpuffer (50mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 1mM EDTA) aufgenommen, gewaschen und erneut pelletiert. Das gewaschene Algen-Pellet wurde in 2ml Proteinpuffer, dem die Proteaseinhibitoren AEBSF (1 mM) und E64 (10  $\mu\text{M}$ ) zugegeben wurden, suspendiert und ein Ultraschall-Aufschluss (4 x 15s, auf Eis; Sonifier B12, Branson Sonic Power) durchgeführt. Grobe Zelltrümmer wurden sedimentiert (2min, 4°C, 1000g) und der Überstand zur Entfernung von Restteilchen (z. B. Membran-Bruchstücke) einer hochtourigen Zentrifugation (4°C, 45min, 70000g) unterzogen. Der Überstand, der die löslichen Proteine enthält, wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 2.9.3 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der löslichen (nicht chlorophyllhaltigen) Proteinproben erfolgte mit den Roti®-Quant-Universallösungen entsprechend der Herstellerangaben. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei einer OD von 503nm bestimmt und mit einer BSA-Eichgerade abgeglichen.

### 2.9.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurden 14cm\*14cm\*0,1cm große Gele nach den Angaben von Schägger und Jagow, 1987 [134] hergestellt. Das Gel wurde aus einem 6%igen Sammelgel [0,5ml Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (45:1,5), 1,65ml 3 x Gelpuffer (3M Tris, 8% HCL (konz.), 0,3% SDS (w/v)), 3ml Aqua dest., 50µl 10% Ammoniumpersulfat (w/v), 5µl TEMED] und einem 12%igen Trenngel [7,5ml Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (45:1,5); 7,5ml 3 x Gelpuffer, 7,5ml Aqua dest., 100µl 10% Ammoniumpersulfat (w/v); 10µl TEMED] zusammengesetzt. Die Trennung der Proteine erfolgte über Nacht bei 50V und maximaler Stromstärke (mA) in einem Nachbau einer Hoefer Midi-Gel Elektrophorese-Kammer. Als Laufpuffer wurden der Kathodenpuffer [10 fach: 1M Tris, 1M Tricin, 1% SDS (w/v)] und der Anodenpuffer (10 fach: 2 M Tris pH 8,9) jeweils einfach eingesetzt. Als Größenstandard wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma Thermo Scientific mitgeführt.

### 2.9.5 Kolloidale Coomassie-Färbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das SDS-Gel mit Aqua dest. gewaschen (3 x 20min) und über Nacht in der Färbelösung [0,02% Coomassie Brilliant Blue-G250 (w/v), 5% Aluminiumsulfat-Hexahydrat (w/v), 10% Ethanol (v/v) und 2% ortho-Phosphorsäure (v/v)] unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Färbung wurde das Gel je nach Bedarf mit Aqua dest. entfärbt und anschließend dokumentiert.

### 2.9.6 Western Blot

Der Proteintransfer auf eine Nitrozellulose-Membran (0,45µm, Whatman™ GE Healthcare) erfolgte durch eine Semi Dry Blot-Apparatur (Trans-Blot®SD, Bio-Rad) nach dem Protokoll von Towbin *et al.*, 1992 [135]. Die dafür verwendeten Materialien (Whatman Papier, NC-Membran und SDS-Gel) wurden in Transferpuffer [25mM Tris pH 8,3, 192mM Glycin, 20% Methanol (v/v), 0,1% SDS (w/v)] äquilibriert (5min) und ein Sandwich aus Whatman Papier, NC-Membran, SDS-Gel und erneut Whatman Papier aufgebaut. Der Transfer erfolgte bei 15V

für 1h und konnte durch eine anschließende Ponceau-Färbung (0,1% (w/v) Ponceau S, 5% (v/v) Essigsäure) der Membran kontrolliert werden.

### 2.9.7 Immundetektion

Nach dem Proteintransfer wurden noch freie Bindestellen auf der NC-Membran durch eine 1-stündige Inkubation mit Blocklösung [3% BSA (w/v) in 1 x TBST-Puffer (150mM NaCl, 0,1% Tween20 (w/v), 100mM TRIS, pH 7.5)] abgesättigt. Danach erfolgte eine Inkubation (30 bis 45min) der Membran in einer spezifischen Antikörperlösung [1 x TBST-Puffer, 3% BSA (w/v), Antikörper (in einer Verdünnung von 1:10000 bis 1:30000)]. Durch 3 x 10min Waschen in 1 x TBST-Puffer wurden anschließend unspezifische Antikörperbindungen entfernt. Der Nachweis der HRP-gekoppelten Antikörper erfolgte mit dem ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham) entsprechend der Herstellerangaben. Bei der Verwendung AP-gekoppelter Antikörper wurde die Membran in Detektionspuffer (50mM NaCl, 50mM Mg<sub>2</sub>Cl, pH 9,5) mit 2% NBT/BCIP (v/v), (Roche®) inkubiert bis eine entsprechende Farbreaktion detektiert werden konnte.

**Tabelle 2.11: Übersicht der eingesetzten Antikörper**

Name	Beschreibung	Hersteller
anti-His-HRP	Histidin-TAG Erkennung, HRP gekoppelt	Miltenyi Biotec GmbH
anti-HA-HRP	Hämagglutinin (HA)-TAG Erkennung, HRP gekoppelt	Miltenyi Biotec GmbH
anti-PF4	Monoklonaler PF4-Antikörper aus Maus (1. AK)	Milenia Biotec. GmbH
<i>Goat anti-Mouse-AP</i>	erkennt Maus IgG-Antikörper, AP gekoppelt (2. AK)	Chemicon international

### 2.9.8 Massenspektrometrie (MS)

Die MS-Analyse wurde freundlicher Weise von Herrn S. Helm und Dr. D. Dobritzsch (MLU Halle-Wittenberg, Pflanzenbiochemie, AG Baginsky) unter Verwendung der SYNAPT G2-S mass spectrometer (Waters, Eschborn) durchgeführt. Bevor die Proteinprobe analysiert werden konnte, wurde die aus einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel ausgeschnittene Bande mit Trypsin verdaut. Dazu wurde die Gelbande durch wiederholtes Waschen mit H<sub>2</sub>O, Entfärbelösung (30% Acetonitril, 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8,5), H<sub>2</sub>O und Acetonitril entfärbt und unter Vakuum getrocknet (ca. 20min). Anschließend erfolgte die Reduzierung und Alkylierung der SH-Gruppen durch Inkubation in 80µl Reduzierungslösung (10mM DTT, 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8,5) für 5min bei RT und 30min bei 50°C, in 100µl Acetonitril (15min, RT), in 40µl Alkylierungslösung (54mM Iodacetamid, 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8,5) für 15min im Dunkeln bei RT und in 100µl Entfärbelösung (10min, RT). Für den Verdau

wurde die Gelbande mit einer Kanüle zerkleinert und nochmals mit 50µl Entfärbelösung für 10min inkubiert. Die Gelstücke wurden anschließend unter Vakuum getrocknet und in 80µl Trypsinlösung (3ng/µl Trypsin, 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8,5, 5% Acetonitril) über Nacht bei RT inkubiert. Die Peptide wurden durch wiederholte Zugabe von Extraktionslösung [50% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure (TFA)] und Schütteln bei RT aus den Gelstücken gelöst. Die in den Überständen befindlichen Peptide wurden unter Vakuum vollständig eingeeengt und in 20µl 0,1% TFA (5min im Ultraschallbad) gelöst. Nach einer Zentrifugation (3min, 16000g) wurde der Überstand in ein MS-geeignetes Gefäß überführt und bis zur nanoLC-HD-MS<sup>e</sup>-Analyse bei -20°C gelagert.

## 2.10 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Für die Klonierung spezifischer Transgene wurde der pQE-30 Vektor (Qiagen) verwendet und im Anschluss der *E. coli*-Stamm M15[pREP4] transformiert. Vektorbedingt enthielten die exprimierten Proteine einen N-terminalen 6 x HIS-TAG, der die Reinigung über eine Nickel-Affinitätschromatographie ermöglichte.

Für die heterologe Proteinexpression wurde 1L TB-Medium mit 50ml einer Übernachtskultur beimpft. Der Ansatz wurde in einen Schüttelinkubator (37°C, 150rpm, Thermoshake C. Gerhardt) überführt. Anschließend wurde gewartet, bis die Kultur eine OD<sub>600nm</sub> von 0,4 bis 0,6 erreichte. An diesem Punkt erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Nach weiteren 3h (PF4-Klon) bzw. 16h (MPT64-Klon) im Schüttelinkubator wurden die Zellen pelletiert (4°C, 10min, 4000g) und in 60ml kalten (4°C) Nativ-Bindepuffer (500mM NaCl, 20mM Imidazol, 20mM HEPES pH 7,5) aufgenommen. Der Aufschluss der *E. coli*-Zellen erfolgte bei 4°C und 1000psi durch 3malige Anwendung der French Press (French-Pressure-Cell FA-031, Simaminger, Spectromic Instruments). Die resultierende Suspension wurde anschließend zentrifugiert (4°C, 30min, 12000g) und infolgedessen die löslichen Proteine (Überstand) von den unlöslichen Proteinen (*inclusion bodies*) getrennt.

### 2.10.1 Proteinaufreinigung aus der löslichen Fraktion

Vor der affinitätschromatographischen Aufreinigung der löslichen Proteinfraction (Überstand) erfolgte eine zusätzliche Ultra-Zentrifugation (1h bei 141000g), um störende Bestandteile (z.B. Membran-Fragmente) zu entfernen. Der saubere Überstand wurde mit ca. 5ml vorbereitetem Säulenmaterial (Ni-NTA-Agarose, QIAGEN®; je zweimal mit 5ml H<sub>2</sub>O und 5ml Nativ-Bindepuffer gewaschen) vereinigt und bei 4°C für 1h unter Rühren inkubiert

(Batchverfahren). Anschließend wurde das Säulenmaterial in eine Säule überführt, zweimal mit je 5ml Nativ-Bindepuffer gewaschen und mit 10ml Nativ-Elutions-Puffer (0,5M NaCl, 0,5M Imidazol, 20mM Hepes pH 7,5) das Protein eluiert.

### 2.10.2 Proteinaufreinigung aus *inclusion bodies*

Das Lösen des Pellets (*inclusion bodies*) erfolgte durch Zugabe von 20ml Harnstoff-Bindepuffer (8M Harnstoff, 0,5M NaCl, 20mM Imidazol, 20mM Hepes pH 7,5), Resuspendieren mittels Polytron PT3000 (Kinematica AG) für 3min bei 12000rpm, Auffüllen auf 100ml (mit Harnstoff-Bindepuffer) und nachfolgender Inkubation für 1h bei RT unter ständigem Rühren. Während der Wartezeit wurde das Säulenmaterial (Ni-NTA-Agarose, QIAGEN<sup>®</sup>) durch jeweils zweimaliges Waschen mit Harnstoff-Bindepuffer vorbereitet. Nach der Ultra-Zentrifugation (1h bei 141000g) der Proteinsuspension wurde der Überstand mit der vorbereiteten Säulenmatrix vereint und für 2h bei RT gerührt. Das Säulenmaterial wurde in eine Säule überführt und zweimal mit je 5ml Harnstoff-Bindepuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution mit 7ml Elutionspuffer (8M Harnstoff, 0,5M NaCl, 0,5M Imidazol, 20mM Hepes pH 7,5). Der Durchlauf wurde mit Hilfe eines Amicon Ultra-15 Centrifugal-Filters (10kDa Ausschluss, Merck Millipore) bei RT und 4000g auf ein Volumen von ca. 1,5ml eingengt, mit 500µl 4 x SDS-Ladepuffer (8% SDS (w/v), 40% Glycerin (v/v), 0,4% Bromphenolblau (w/v), 0,4M Tris-HCl pH 6,8) versetzt, 10min bei 95°C aufgeköcht und einer SDS-PAGE unterzogen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel für 30sec mit H<sub>2</sub>O gewaschen, für 20min in Imidazol-Lösung (0,1% SDS (w/v), 200mM Imidazol) inkubiert und durch Zinksulfat-Lösung (0,2M ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O) gefärbt. Die farblose Proteinbande wurde aus dem weiß gefärbten Gel geschnitten und dreimal für je 20min mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Abschließend erfolgte die Elution des Proteins aus der zerkleinerten SDS-Gelbande mit Hilfe des Gel-Elutionspuffers (0,1% SDS (w/v), 20mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) über Nacht bei RT auf einem Schüttler.

## 2.11 Antikörperproduktion

In Zusammenarbeit mit den Firmen Squarix GmbH und Milenia Biotec GmbH wurden monoklonale Antikörper gegen rekombinant in *E. coli* exprimiertes MPT64 hergestellt. Verwendet wurde dafür das aus *inclusion bodies* gewonnene MPT64. Die Immunisierung der Tiere (Mäuse) erfolgte in regelmäßigen Abständen von ca. 3 bis 4 Wochen, während dieser Zeit wurden die Seren der Tiere auf den Antikörpertiter bzw. auf die Spezifität gegenüber

MPT64 untersucht. Die monoklonalen Antikörper wurden abschließend über die Hybridom-Technik gewonnen.

## **2.12 *In vivo*-Stabilitätstest**

Algenzellen entsprechend 750µg Chlorophyll wurden pelletiert (5min, 1000g), in 50ml frischem Medium (TAP) aufgenommen und in Erlenmeyerkolben (100ml) überführt. Die Kolben wurden auf einen Schüttler (GFL 3019) bei 23°C und  $35\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  inkubiert. Nach einer Erholungsphase von 15min erfolgte die Inhibierung der plastidären Proteinbiosynthese durch Zugabe von Chloramphenicol (CAP; 200µg/ml). Ab diesem Zeitpunkt wurde in regelmäßigen Abständen je 1ml Algensuspension entnommen, zentrifugiert (4°C, 5min, 16000g) und das Pellet bei -20°C gelagert. Im Anschluss wurde aus den Proben Gesamtzellprotein isoliert (siehe 2.9.1) und nach der Auftrennung in einer SDS-PAGE einer Western Blot Analyse unterzogen.

## **2.13 Elektronenmikroskopische Aufnahmen**

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, einschließlich der vorgeschalteten Fixierung, Einbettung und Markierung, wurden von der Abteilung "Bildgebende Verfahren" unter Leitung von Herrn Dr. Gerd Hause am Biozentrum (MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

### **2.13.1 Untersuchung der Ultrastruktur**

Die Fixierung und Einbettung der Algenzellen erfolgte nach der Methode von Spurr *et al.*, 1969 [136]. Im Anschluss wurden mit dem Ultramikrotom (Ultracut-S, Leica) und einem Diamantmesser Schnitte (90nm) hergestellt und auf Ceducol beschichtete Kupfer-Grids transferiert. Nach Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat in einem Färbeautomaten (EM-Stain, Leica) wurden die Schnitte mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Libra 120, Carl Zeiss Microscopy) ausgewertet. Die Beschleunigungsspannung betrug 120kV. Die Aufnahmen wurden mit einer Dual-Speed on axis SSCCD Kamera (BM-2k-120; TRS, Moorenweis) angefertigt.

### **2.13.2 Immunogoldmarkierung**

Die aufkonzentrierten Algenzellen wurden mit einer „HPM 010“ (BAL-TEC, Balzers) in Aluminium-Haltern (Ø von 2mm, 0,2mm Höhe) einer Hochdruckgefrierfixierung unterzogen und anschließend in einer Kryosubstitutionseinrichtung (FSU 010, BAL-TEC, Balzers) für 2 Tage bei -80°C mit Substitutionslösung (0,25% Glutaraldehyd und 0,1% Uranylacetat in

Aceton) inkubiert. Die Einbettung der Proben erfolgte schrittweise durch Infiltration mit einem Methacrylat (HM20, Polysciences) für 4 Tage bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Das Methacrylat wurde unter UV-Licht für 24 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und anschließend 24 Stunden bei RT polymerisiert. Mit einem Diamantmesser und einem Ultramikrotom (Ultracut-S, Leica) wurden Ultradünnschnitte angefertigt und für die Immunmarkierung auf Formvar beschichtete Nickel-Grids übertragen. Zunächst erfolgte die Inkubation der Grids für 30min in Blocking-Reagenz (BR; 1% acetyliertes BSA (w/v) und 0,1% Tween20 (v/v) in PBS-Puffer) und anschließend über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit dem primären anti-HA-Antikörper (HA.11, Convance) 1:500 verdünnt in BR. Nach 4 Waschschritten von je 5min mit BR wurden die Grids mit dem sekundären Antikörper (Ziege-anti-Maus-IgG -10nm Gold Konjugat; G7777 Sigma) 1:100 verdünnt in BR für 90min bei RT inkubiert und anschließend mit  $\text{H}_2\text{O}$  viermal für jeweils 5min gewaschen. Die Kontrastierung der Proben erfolgte in einem Färbeautomaten (EM-Stain, Leica) mit Uranylacetat und Bleicitrat. Mit einer Beschleunigungsspannung von 120kV wurden die Schnitte mit dem Transmissionselektronenmikroskop (Libra 120, Carl Zeiss Microscopy) ausgewertet und mit einer Dual-Speed on axis SSCCD-Kamera (BM-2k-120; TRS, Moorenweis) wurden Aufnahmen angefertigt.

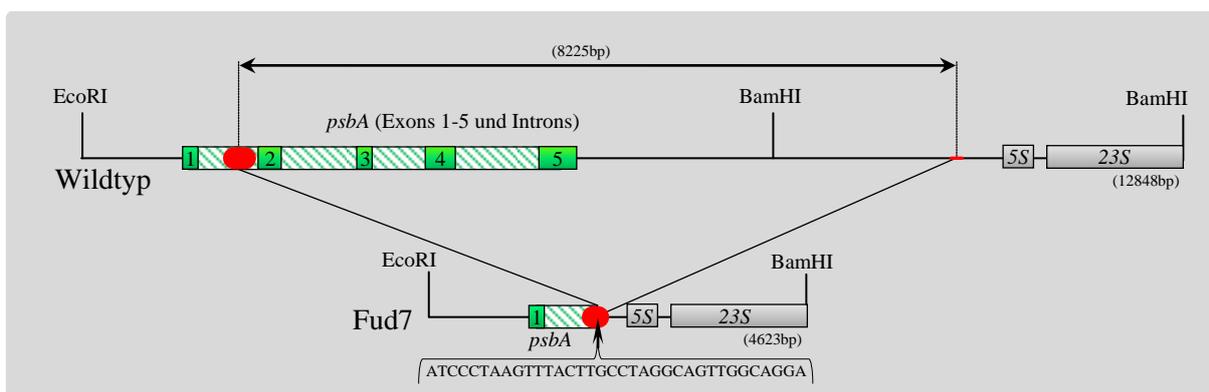
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Das Transformationssystem für *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Insertion von Fremdgenen in das Plastidengenom erfolgt über homologe Rekombination und ist grundsätzlich nicht auf bestimmte Bereiche beschränkt. Dennoch ist speziell die *inverted repeat* (IR)-Region für eine Transgeninsertion besonders geeignet. Gene innerhalb dieser Region liegen in zwei Kopien pro Plastom vor, verfügen daher über eine höhere Gen-Dosis und gehören zu den am stärksten transkribierten Genen im Chloroplasten (z.B. alle rRNA-Gene). Innerhalb der IR-Region zwischen dem *psbA*- und dem 5S rRNA-Gen befindet sich ein 2,8 kb großer *open reading frame* (ORF)-freier Bereich mit einer BamHI-Schnittstelle, die bereits erfolgreich für die Insertion von Fremdgenen genutzt wurde [52,54,69] (Abb. 1.2). Dieser Bereich sollte auch in dieser Arbeit als Insertionsort dienen. Als Rezipienten für die Transgeninsertion wurden bisher überwiegend Wildtypstämme verwendet. Allerdings bestand dadurch die Notwendigkeit, zusätzlich ein Antibiotikaresistenzgen für die anschließende Selektion einzubringen. Aus mehreren Gründen (siehe Einleitung) wird bei der Erstellung transgener Stämme zunehmend auf die Verwendung von Antibiotika verzichtet, was unter anderem auch Ziel dieser Arbeit sein sollte.

##### 3.1.1 Rezipient Fud7

Der Fud7-Stamm wurde bereits oft als Rezipient für die Erzeugung von *psbA*-Mutanten und Untersuchungen am D1-Protein [120] genutzt. Zusätzlich ist er aber auch für die Insertion von Fremdgenen in dem vom *psbA*-Gen benachbarten Plastombereich geeignet [57].

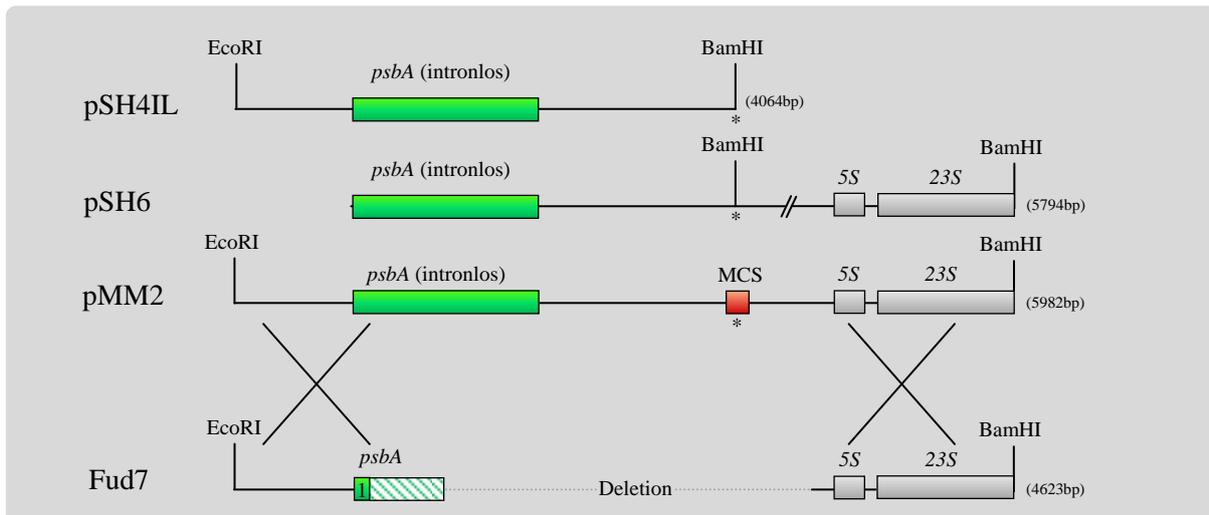


**Abbildung 3.1 Vergleich der Plastomabschnitte von Wildtyp und Fud7-Mutante.** Schematisch dargestellt ist die Plastomsequenz im Bereich des *psbA*-Gens (Exons – grün, Introns – schraffiert) und der rRNA-Gene (grau) *rrn5* (5S) und *rrnL* (23S). Rot markiert ist eine 35bp lange Sequenz. Diese kommt in der Wildtypsequenz zweimal vor und ist vermutlich für ein Rekombinationsereignis verantwortlich, wodurch 8225bp aus der Plastomsequenz der Fud7-Mutante deletiert wurden.

1986 wurde der Fud7-Stamm von Bennoun *et al.* [121] durch Mutagenese mit dem Thymidin-Analogon 5-Fluorodeoxyuridin erzeugt und später als *psbA*-Deletionsmutante identifiziert. Überraschenderweise war die exakte Größe und Position der Deletion bislang nicht bekannt. In der Abbildung 3.1 ist der betreffende Plastomausschnitt des Fud7-Stammes basierend auf den Ergebnissen einer Sequenzanalyse (siehe Anhang A) dargestellt. Die Deletion umfasst demnach 8225bp, wodurch nicht nur ein großer Teil des *psbA*-Gens, sondern auch ca. 2700bp angrenzende intergenische Plastomsequenz eliminiert wurden. Eine nur 35bp lange identische Sequenz flankiert im WT-Plastom sowohl den 5'- als auch den 3'-Bereich der Fud7-spezifischen Deletion. Bei der Entstehung der Fud7-Mutante war diese Sequenzwiederholung vermutlich ausschlaggebend für ein Rekombinationsereignis, das zur Deletion führte. Aufgrund der Deletion kann die Fud7-Mutante kein intaktes D1-Protein mehr synthetisieren und ist nicht in der Lage photoautotroph zu wachsen. Durch Insertion eines funktionellen *psbA*-Gens in den Fud7-Stamm entstehen wieder photosynthetisch aktive Transformanten, die anschließend einfach auf Minimalmedium (HS) selektiert werden können [120,127]. Zusätzlich ist es möglich, das relativ große Wildtyp *psbA*-Gen (6639bp) durch eine intronlose Variante (1059bp) zu ersetzen. Die Verwendung eines solchen intronlosen *psbA*-Gens ermöglicht es, für die Transformation Plasmide mit einer geringeren Größe zu generieren, welche molekularbiologisch einfacher zu bearbeiten sind. Darüber hinaus sind Mutanten mit einem intronlosen *psbA*-Gen physiologisch mit dem Wildtyp vergleichbar [120,127,137].

### 3.1.2 Transformationsplasmide

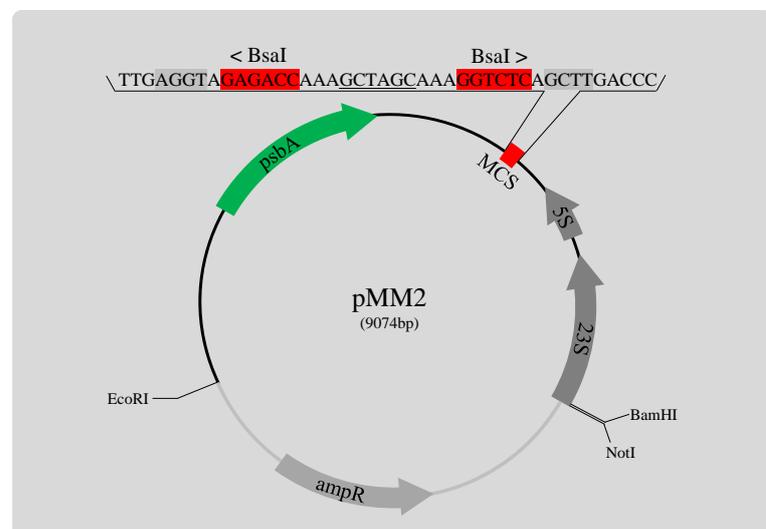
Für eine erfolgreiche Transformation des Fud7-Stammes existieren bereits geeignete Plasmide wie zum Beispiel pSH6 und pSH4IL (Abb. 3.2). Wird pSH6 zur Transformation benutzt, erhält man nur wenige Transformanten [127]. Grund dafür ist vermutlich die kurze homologe Sequenz von 180bp am 5'-Ende. Innerhalb dieser Sequenz finden offensichtlich nur sehr selten Rekombinationsereignisse statt. Im Gegensatz dazu ist durch die Verwendung von pSH4IL die Transformationseffizienz höher. Jedoch fehlen in diesem Fall homologe Sequenzen im 3'-Bereich. Möglicherweise kommt es aufgrund einer kurzen Sequenz im Plasmid-Rückgrat trotzdem zur homologen Rekombination innerhalb der rRNA-Gene. Infolgedessen werden in das Plastom zusätzlich Plasmidsequenzen integriert und rRNA-Gensequenzen deletiert. Dadurch erreichen die Plastomkopien dieser Transformanten unter photoautotrophen Selektionsbedingungen keinen einheitlichen Zustand (Daten nicht gezeigt). Somit ist auch pSH4IL zur Erzeugung stabiler Transformanten ungeeignet.



**Abbildung 3.2: Plasmide für die Transformation der Fud7-Mutante.** Dargestellt sind der Deletionsbereich im Plastom der Fud7-Mutante einschließlich *psbA*-Gen (Exon – grün, Intron – schraffiert) und den rRNA-Genen (grau) *rrn5* (5S) und *rrnL* (23S) sowie die Transformationsplasmide (ohne pBSK+-Rückgrat) pSH4IL, pSH6 und pMM2. Die gekreuzten Linien kennzeichnen den Bereich für die homologe Rekombination. Die gekennzeichnete Stelle (\*) stellt den anvisierten Insertionsort für Fremdgen dar. Im pMM2 ist die 42bp große MCS, die eine 1161bp lange intergenische Plastomsequenz ersetzt, rot gekennzeichnet.

Um einen universellen Transformationsvektor für den Fud7-Stamm zu erzeugen, stellten die Plasmide pSH6 und pSH4IL jedoch eine geeignete Grundlage dar. Von Matthias Munder [122] wurde der 3'-Plastombereich von Vektor pSH6 in den Vektor pSH4IL kloniert, um eine effiziente homologe Rekombination mit dem Fud7-spezifischen Plastidengenom gewährleisten zu können. Für die Insertierung von Fremdgenen wurden außerdem 1161bp intergenische Sequenz zwischen *psbA*- und *5S*-Gen durch eine 42bp große MCS (*multiple cloning site*) ersetzt (Abb. 3.5). Dadurch entstand der Vektor pMM2 (Abb. 3.2 und 3.3), der mit 9074bp für gezielte Klonierungen nicht zu groß, d.h. für die zusätzliche Insertion von Transgenen geeignet ist.

**Abbildung 3.3: Vektor pMM2.** Dargestellt ist die Vektorkarte von pMM2 mit relevanten Restriktionsschnittstellen zwischen dem pBSK+-Rückgrat (hellgrau) und der Plastomsequenz. Gene sind durch Pfeile abgebildet (grün *psbA*; grau *rrn5* (5S), *rrnL* (23S) und *ampR*). Die Sequenz der MCS (rot) ist gesondert dargestellt und die Erkennungs- (rot) und Schnittsequenzen (grau) des Typ II-Restriktionsenzym *BsaI* hervorgehoben. Zusätzlich enthalten ist eine *NheI*-Schnittstelle (GCTAGC).



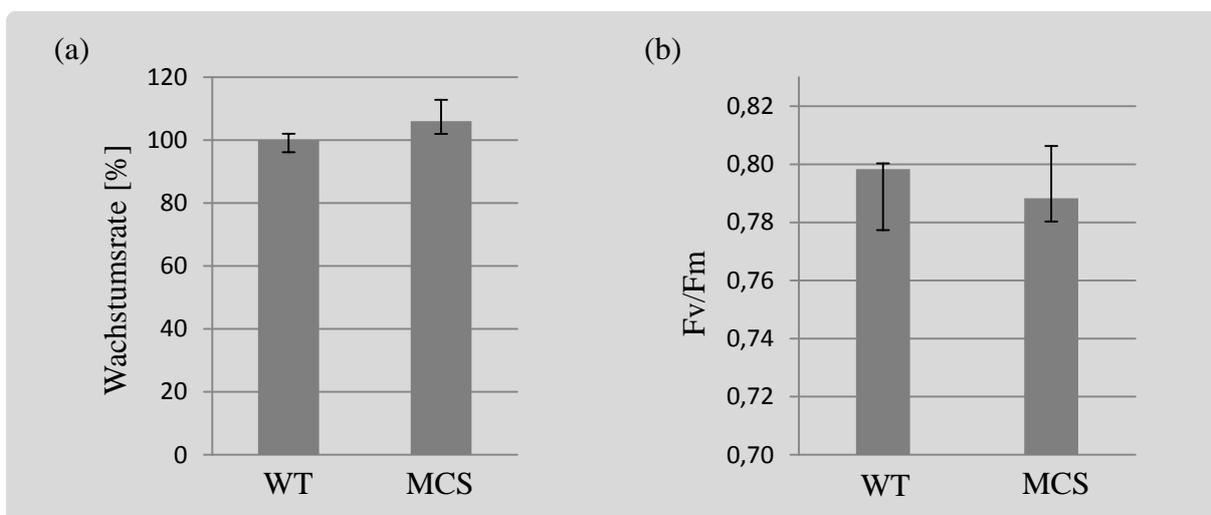
Die Transformationseffizienz von pMM2 wurde mit den Ausgangsplasmiden pSH4IL und pSH6 verglichen (Tab. 3.1). Hierzu wurden gleiche Mengen an Plasmidmolekülen für die Transformation des Fud7-Stammes eingesetzt. Bei der anschließenden Selektion auf Minimalmedium konnten nur photoautotrophe Algenzellen wachsen, die zuvor über homologe Rekombination das intronlose *psbA*-Gen in ihr Plastom aufgenommen haben.

**Tabelle 3.1: Transformation des Fud7-Stammes mit den Plasmiden pSH4IL, pSH6 und pMM2.**

Plasmid	pSH4IL	pSH6	pMM2
Transformanten (pro $1,5 \cdot 10^8$ Zellen)	29	5	35

Ergebnis aus 10 unabhängigen Transformationen von jeweils  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen (Fud7);  $1,3 \cdot 10^{11}$  Plasmidmoleküle wurden pro Transformation eingesetzt.

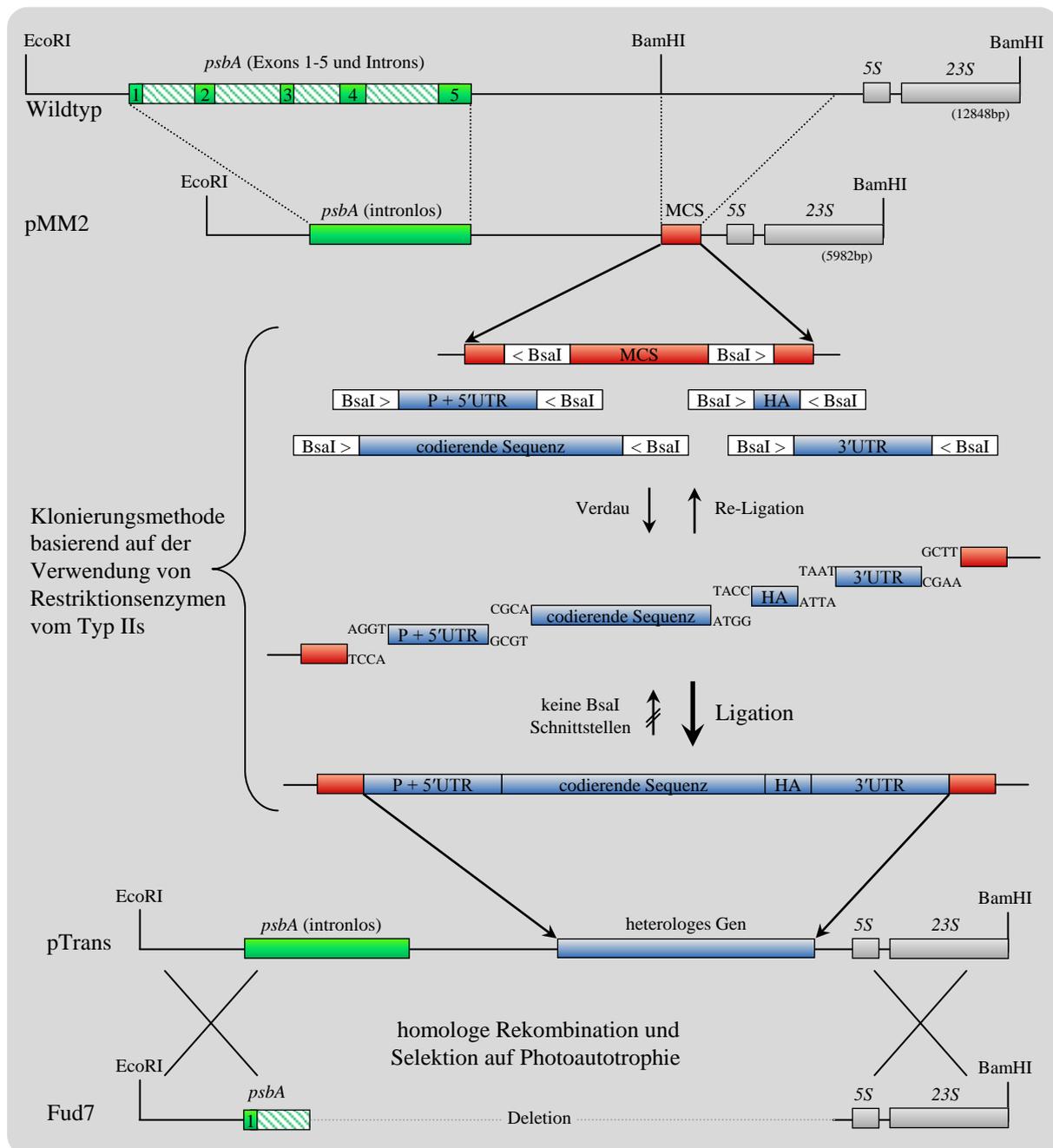
Erwartungsgemäß lag die Transformationseffizienz bei pMM2 und pSH4IL deutlich über der von pSH6. Im Gegensatz zu pSH4IL erlangten die Plastomkopien von pMM2-Transformanten einen homoplasmischen Zustand (Daten nicht gezeigt). Somit ist pMM2 für die Erstellung von stabilen Transformanten geeignet und kann für die Insertion von Transgenen genutzt werden. Zur Kontrolle späterer Transgen-exprimierender Mutanten wurde eine pMM2-Transformationsmutante erzeugt und als MCS-Stamm bezeichnet. Dieser Kontrollstamm verfügt über eine ca. 6,8kb kürzere Plastomsequenz, bedingt durch das Fehlen der *psbA*-Introns (5580bp) und 1116bp intergenischer Plastomsequenz zwischen dem *psbA*- und *rrn5*- (5S) Gen. Im Vergleich zum Wildtyp konnten keine signifikanten Beeinträchtigungen im photoautotrophen Wachstum und in der PSII-Effizienz festgestellt werden (Abb. 3.4).



**Abbildung 3.4: Wachstumrate und PSII-Effizienz von Wildtyp (WT) und MCS-Mutante (MCS).**  
**(a):** Wachstumrate in % bezogen auf den WT (=100%), ermittelt aus 4 unabhängigen Wachstumsversuchen.  
**(b):** PSII-Effizienz (Fv/Fm) ermittelt aus drei unabhängigen Messungen von jeweils 4 Proben.

### 3.1.3 pMM2 und Golden Gate shuffling

Der Vektor pMM2 erlaubt die Insertion von Transgenen in das Plastom von *C. reinhardtii*. In einem ersten Schritt muss dafür ein entsprechendes Transformationsplasmid erstellt werden. Die spezielle MCS des pMM2-Vektors ermöglicht eine zuvor *in silico* geplante Kombination von verschiedensten PCR-Fragmenten zu einem vollständigen Transgenkonstrukt. So können regulatorische Sequenzabschnitte wie Promotor- und UTR-Sequenzen innerhalb nur eines Reaktionsansatzes beliebig mit proteinkodierenden Sequenzen kombiniert und in den pMM2-Vektor integriert werden. Dabei kommt die Methode des *Golden Gate shuffling* (GGS) [133,138] zum Einsatz. Sie basiert auf der Verwendung eines Typ IIs-Restriktionsenzym (BsaI). Im Gegensatz zu Standard-Restriktionsenzymen ist besonders vorteilhaft, dass mit Hilfe dieses Enzyms keine unerwünschten DNA-Sequenzen als Klonierungsartefakte im Transgen verbleiben. Die so erzeugten Plasmide werden zunächst in *E. coli* kloniert und vor der Algen-Transformation sequenziert, um Fehler innerhalb der transgenen Sequenz ausschließen zu können. Die fehlerfreien Transformationsplasmide können anschließend mit Hilfe der Partikelkanone in den Chloroplasten des Rezipientenstammes Fud7 transferiert werden. Dort erfolgt die gleichzeitige Insertion von Transgen und intronlosem *psbA*-Gen über homologe Rekombination mit den plastidären DNA-Regionen der Transformationsplasmide (pTrans). Transgene Algenzellen sind daraufhin in der Lage, photoautotroph zu wachsen und können auf Minimalmedium (HS) selektiert werden. In der Abbildung 3.5 ist die Methodik der Erzeugung transplastomischer Algenzellen dargestellt.



**Abbildung 3.5: Schema zur Erzeugung transplastomischer *C. reinhardtii*-Stämme.** Dargestellt ist der Ausgangsvektor pMM2 im Vergleich zum betreffenden Plastomausschnitt des Wildtyps. Anschließend ist die Verwendung der speziellen MCS (*multiple cloning site*) für das *Golden Gate shuffling* (GGs) gezeigt. Dabei kommen PCR-Fragmente für z.B. Promotor- und UTR-Sequenzen (P+5'UTR, 3'UTR), proteinkodierende Sequenzen oder TAG-Sequenzen (z.B. HA) zum Einsatz. Die Fragmente werden, definiert durch ihre Überhänge, in den Vektor (pMM2) inseriert, wodurch ein Transformationsvektor (pTrans) für die Insertion eines heterologen Gens in das Plastom des Fud7-Stammes entsteht. Das Transgen wird gemeinsam mit dem intronlosen *psbA*-Gen über homologe Rekombination in das Fud7-Plastom integriert. Resultierende Mutanten sind anschließend in der Lage, photoautotroph zu wachsen und können auf Minimalmedium (HS) selektiert werden. Die *psbA*-Exonsequenzen sind grün, die *psbA*-Intronsequenzen schraffiert, die MCS-Sequenz rot und Sequenzen des heterologen Gens blau dargestellt. Mit einem Pfeil (< oder >) wird die Richtung der BsaI-Schnittstelle im Bezug zur Erkennungssequenz (weiß) angegeben.

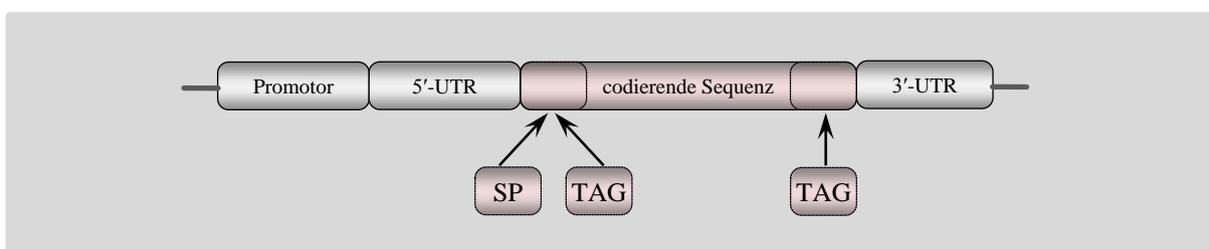
## 3.2 Etablierung des Transformationssystems

Das oben beschriebene Transformationssystem bietet für die heterologe Proteinexpression die Möglichkeit, ein beliebig zusammengestelltes Transgen stabil in das Plastom zu inserieren und dabei auf den Gebrauch von Antibiotika verzichten zu können. In Vorversuchen erwies sich die Expression von MPT64 als effektiver gegenüber dem plastidären Reportergen *GFPct* von Franklin *et.al.* [54]. Deshalb sollte zunächst mit Hilfe des bakteriellen Proteins MPT64 das System auf seine Funktionalität hin untersucht und für eine allgemeine Verwendung etabliert werden. Beim MPT64 handelt es sich um ein vom Erreger der Tuberkulose (TB), *Mycobacterium tuberculosis*, sezerniertes 23kDa großes Protein, das zur Diagnose einer TB-Erkrankung herangezogen [139] und aufgrund seiner stark immunogenen Wirkung als potentiell TB-Vakzin gehandelt wird [140]. Als Erstes wurden Transgene mit unterschiedlichen regulatorischen bzw. TAG-spezifischen Sequenzen erstellt und die daraus hervorgegangenen Mutanten molekularbiologisch und biochemisch untersucht.

Um eine möglichst hohe Expression im Fremdorganismus zu gewährleisten, war es zunächst erforderlich, die kodierende Sequenz vom MPT64 an den plastidären Codongebrauch (siehe Anhang C) anzupassen. Insgesamt erfolgte eine Modifizierung von 57% der Codons. Für die Expressionsversuche wurde die gesamte Sequenz einschließlich der Signalpeptid-kodierenden Sequenz genutzt. Demzufolge verfügt das entstehende Protein zusätzlich noch über das bakterielle Signalpeptid ( $SP_{MPT}$ ), worauf im Kapitel 3.4 genauer eingegangen wird.

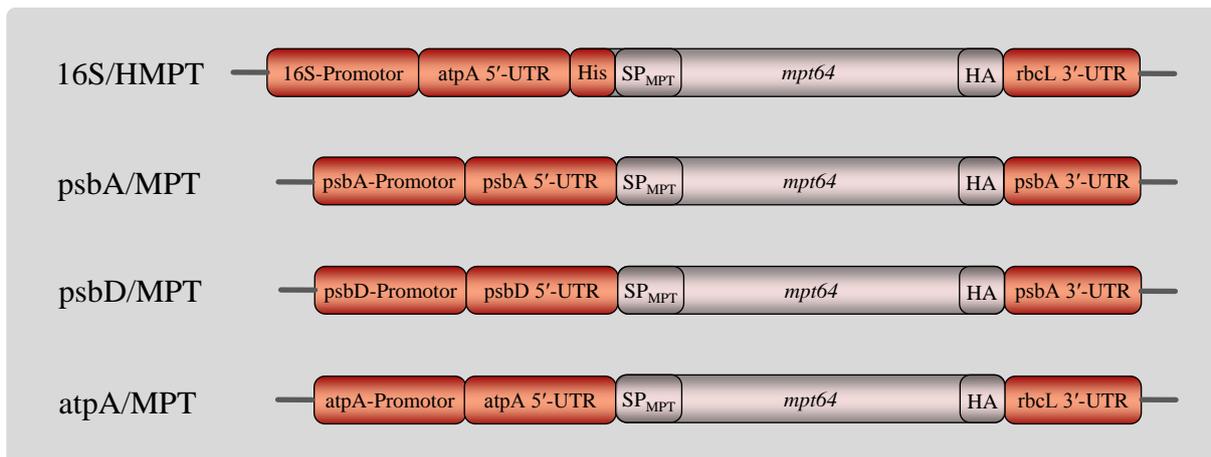
### 3.2.1 Verwendung unterschiedlicher Promotor-UTR-Kombinationen

Ein funktionstüchtiges plastidäres Transgenkonstrukt benötigt neben der kodierenden Sequenz für das Fremdprotein zusätzlich regulatorische Sequenzen (Abb. 3.6). Es handelt sich dabei um Sequenzen für den Promotor, die 5'- und 3'-UTR. Die besten Expressionsraten wurden bisher ausschließlich mit *C. reinhardtii*-spezifischen Sequenzen erzielt [141].



**Abbildung 3.6: Transgen-Elemente.** Gezeigt ist ein allgemeines chloroplastidäres Transgenkonstrukt mit den essentiellen Sequenzen für Promotor, 5'UTR, kodierende Sequenz und 3'UTR. Innerhalb der kodierenden Sequenz sind zusätzliche Sequenzen für z. B. Signalpeptide (SP) oder TAGs (TAG) aufgeführt.

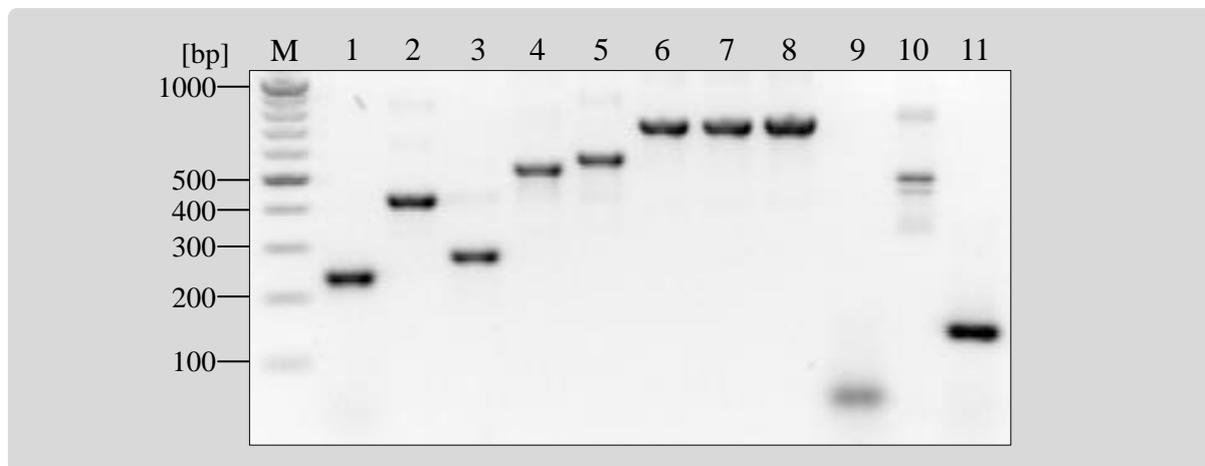
Um hohe Expressionsraten für MPT64 zu erreichen, wurden Promotor-UTR-Kombinationen mit einer nachweislich starken Proteinexpression gewählt [52,69]. Für die Detektion bzw. Aufreinigung stand zu Beginn der Arbeiten kein MPT64-spezifischer Antikörper zur Verfügung. Deshalb wurde zusätzlich ein Hämagglutinin-TAG (HA-TAG) und im Fall von Konstrukt 16S/HMPT ein Histidin-TAG (His-TAG) an die kodierende Sequenz fusioniert. In der Abbildung 3.7 sind die geplanten Genkonstrukte dargestellt.



**Abbildung 3.7: MPT64-Konstrukte mit unterschiedlichen Promotor-UTR-Kombinationen.** Dargestellt sind vier Varianten heterologer *mpt64*-Gene. Der Einfluss unterschiedlicher Promotor- und UTR-Sequenzen auf die *mpt64* Genexpression im Chloroplasten wurde mit Hilfe dieser Genkonstrukte untersucht. Sequenzunterschiede sind rot markiert. His: Sequenz für einen 10er Histidin-TAG, SP<sub>MPT</sub>: Sequenz für das MPT64-Signalpeptid, HA: Sequenz für einen Hämagglutinin-TAG.

Alle konstruktsspezifischen Fragmente wurden über PCR mit Primern (Tabelle 2.1) generiert, die am 3'-Ende BsaI-Schnittstellen besitzen (Anhang B und Tab. 3.2). Während des GGS ermöglichen die BsaI-Überhänge spezifische Verknüpfungen der einzelnen PCR-Fragmente innerhalb des pMM2-Vektors. Abbildung 3.8 zeigt die im Agarosegel aufgetrennten Fragmente. Die Reaktionsansätze mit den assemblierten Transformationsplasmiden wurden in *E. coli* transferiert und positive Klone auf Ampicillin-haltigen Platten selektiert. Nach der Plasmidisolation erfolgte eine Sequenzierung des Transgens (Daten nicht gezeigt), um die Verwendung fehlerhafter Sequenzen bei der Algen-Transformation ausschließen zu können. Innerhalb der aus der IL-Mutante stammenden Promotor- und UTR-Sequenzen wurden einzelne Nukleotidsubstitutionen gegenüber der veröffentlichten *C. reinhardtii* Plastomsequenz [30] festgestellt (siehe Anhang G). Diese Sequenzunterschiede sind vermutlich auf eine jahrzehntelange, jeweils unter laborspezifischen Bedingungen stattfindende, getrennte Entwicklung der einzelnen Stämme zurückzuführen [30]. Da der IL-Stamm, dessen DNA als Matrize für die Erstellung der Promotor- und UTR-Sequenzen verwendet wurde, aber

physiologisch mit dem Wildtyp vergleichbar ist [120,127], wurde davon ausgegangen, dass diese Sequenzen funktionell sind.



**Abbildung 3.8: PCR-Fragmente für die Erstellung plastidärer Transgenkonstrukte.** Dargestellt sind PCR-Fragmente, welche am 5'- und 3'-Ende BsaI-Schnittstellen enthalten, im Agarosegel (1,5%) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt sind. DNA des IL-Stammes diente als Template. In verschiedenen Kombinationen wurden diese Fragmente für die Erzeugung von vier Genkonstrukten in Verbindung mit dem Vektor pMM2 und dem GGS verwendet (Tabelle 3.2). Spur 1: *16S*-Promotor (P16S), Spur 2: *atpA* 5'UTR mit Teilsequenz für einen N-terminalen His-TAG (*atpA* 5'UTR HisX), Spur 3: *psbA*-Promotor und 5'UTR (*psbA* P+5'UTR), Spur 4: *psbD*-Promotor und 5'UTR (*psbD* P+5'UTR), Spur 5: *atpA*-Promotor und 5'UTR (*atpA* P+5'UTR), Spur 6: MPT64-kodierende Sequenz (*psbA/atpA* MPT) passend für die Fragmente *psbA* und *atpA* P+5'UTR, Spur 7: MPT64-kodierende Sequenz (*psbD* MPT) passend für das Fragment *psbD* P+5'UTR, Spur 8: MPT64-kodierende Sequenz mit Teilsequenz für einen N-terminalen His-TAG (HisX MPT) passend zum Fragment *atpA* 5'UTR HisX, Spur 9: Sequenz für einen C-terminalen HA-TAG (HA TAG) passend für alle MPT und 3'UTR Fragmente, Spur 10: *rbcL* 3'UTR (*rbcL* 3'UTR), Spur 11: *psbA* 3'UTR (*psbA* 3'UTR), M: DNA-Marker 100bp plus

**Tabelle 3.2: Zusammensetzung der MPT64-spezifischen Transgenkonstrukte.**

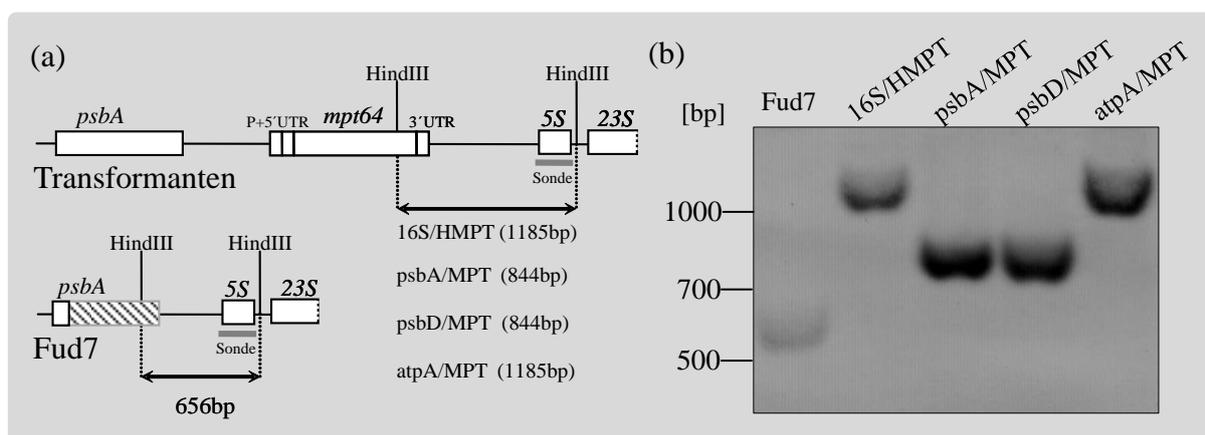
Konstrukt	durch <i>Golden Gate shuffling</i> fusionierte PCR-Fragmente	Größe [bp]
16S/HMPT	(P16S) + ( <i>atpA</i> 5'UTR HisX) + (HisX MPT) + (HA TAG) + ( <i>rbcL</i> 3'UTR)	1814
<i>psbA</i> /MPT	( <i>psbA</i> P+5'UTR) + ( <i>psbA/atpA</i> MPT) + (HA TAG) + ( <i>psbA</i> 3'UTR)	1079
<i>psbD</i> /MPT	( <i>psbD</i> P+5'UTR) + ( <i>psbD</i> MPT) + (HA TAG) + ( <i>psbA</i> 3'UTR)	1342
<i>atpA</i> /MPT	( <i>atpA</i> P+5'UTR) + ( <i>psbA/atpA</i> MPT) + (HA TAG) + ( <i>rbcL</i> 3'UTR)	1711

\*für Erläuterungen zu den Abkürzungen siehe Abb. 3.7 und 3.8

Im Gegensatz zu herkömmlich verwendeten Standard-Klonierungsmethoden werden die einzelnen Fragmente im GGS nahtlos zusammengesetzt. Die im Transgen enthaltenen UTR-Sequenzen verfügen somit nicht über die üblichen Klonierungsartefakte (Abb. 4.1) mit möglichen Konsequenzen für die zu erwartende Fremdproteinexpression.

### 3.2.1.1 Transformation, Test auf Homoplasmie und Sequenzierung

Für die Chloroplastentransformation wurde die *particle-gun*-Methode [47] verwendet. Dazu wurden mit Transformationsplasmiden beladene Wolframpartikel durch Heliumdruck beschleunigt und auf einen Zellrasen der heterotrophen Fud7-Mutante geschossen. Über homologe Rekombination konnte das *psbA*-Gen zusammen mit dem Fremdgen gezielt in das Plastom der Deletionsmutante (Fud7) eingebaut werden. Zur Selektion von Transformanten wurden die Zellen auf Acetat-freies HS-Medium überführt, so dass nur noch photoautotrophe Algen wachsen konnten, die über ein funktionstüchtiges *psbA*-Gen verfügen. Bereits nach 10 Tagen unter selektiven Bedingungen (HS-Medium, 23°C,  $35\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) waren erste Kolonien sichtbar. Diese wurden in flüssiges HS-Medium überführt und über 3 bis 5 Wochen weiter diesem Selektionsdruck ausgesetzt. Damit sollte erreicht werden, dass die eingebrachte DNA nach und nach in alle Plastomkopien integriert und ein homoplasmischer Zustand erreicht wird [142]. Über eine Southern Blot Analyse wurden die Plastomkopien der Transformanten 16S/HMPT, *psbA*/MPT, *psbD*/MPT und *atpA*/MPT daraufhin untersucht. Dafür wurde Gesamtzell-DNA mit HindIII verdaut, elektrophoretisch getrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einer 5SrDNA-spezifischen Sonde hybridisiert (Abb. 3.9). Die Transformantenstämme wiesen jeweils ein konstruktsspezifisches Fragment von 844bp bzw. 1185bp auf. Das Fud7-spezifische Fragment von ca. 650bp wurde hingegen in keiner der vier Transformanten detektiert. Es handelt sich somit um homoplasmische Algenstämme, die aufgrund des spezifischen Southern Blot Signals auch das jeweilige Transgen enthielten.

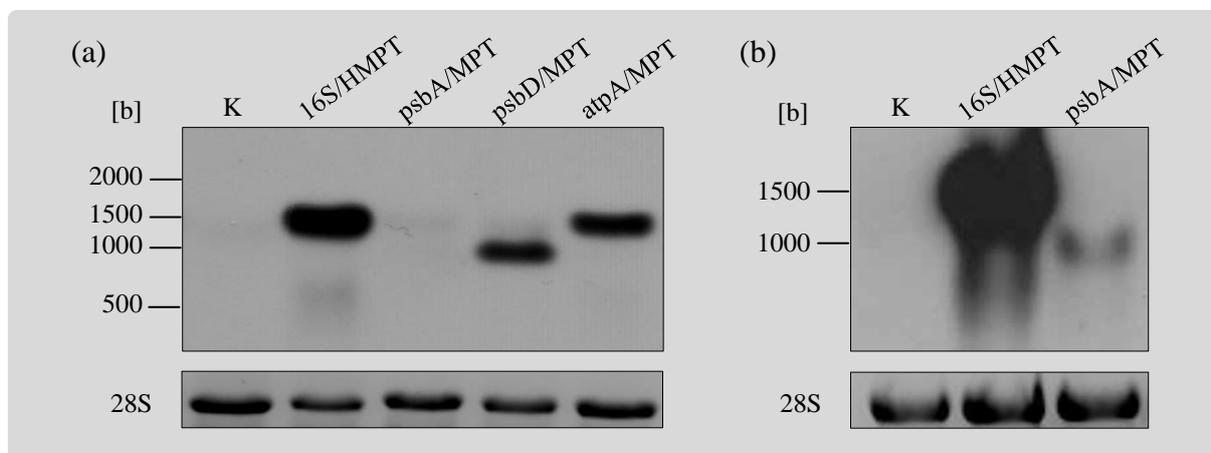


**Abbildung 3.9: Southern Blot Analyse der MPT64-Transformanten.** (a): Schematische Darstellung der Plastomsequenzen mit den HindIII-Schnittstellen und den resultierenden Fragmentlängen, die durch die 5SrDNA-spezifische Sonde (grauer Balken) detektiert wurden. (b): Ergebnis der Southern Blot Analyse: Gesamtzell-DNA (5µg) wurde HindIII verdaut, elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit der 5SrDNA-spezifischen Sonde und dem CSPD-Detection-Kit.

Um Fehler in den Transgensequenzen der Mutanten ausschließen zu können, wurden diese über PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.1.2 Northern Blot Analyse

Durch eine Northern Blot Analyse sollte untersucht werden, welchen Einfluss die unterschiedlichen Promotor- / UTR-Kombinationen auf die transgene mRNA-Akkumulation haben. Dazu wurde Gesamtzell-RNA isoliert, elektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit einer *mpt64*-spezifischen Sonde hybridisiert. Durch die Verwendung unterschiedlicher UTR-Kombinationen ergeben sich mRNA-Größen von ca. 1600b für 16S/HMPT, 900b für *psbA*/MPT und *psbD*/MPT und 1500b für *atpA*/MPT. Gesamtzell-RNA des transgenfreien MCS-Stammes wurde zur Kontrolle (K) mitgeführt (Abbildung 3.10).



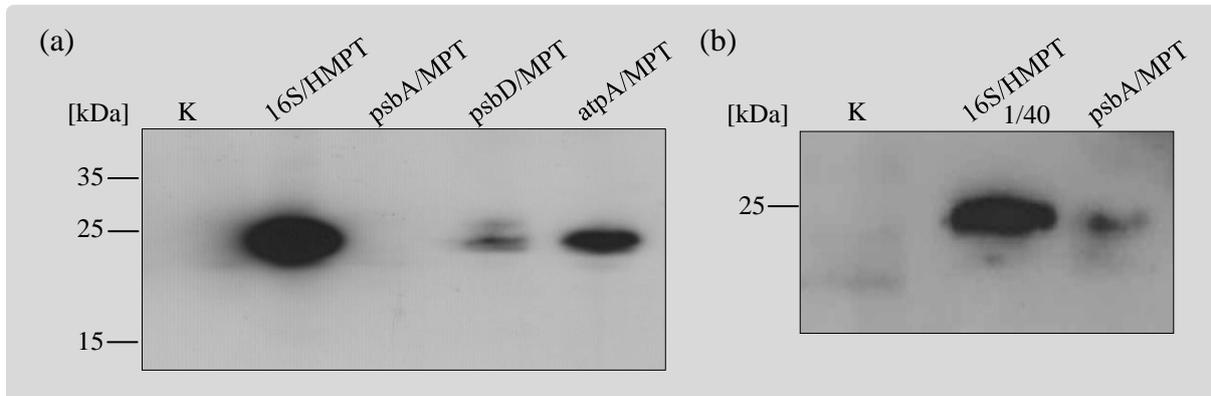
**Abbildung 3.10: Northern Blot Analyse der MPT64-Mutanten**, im Vergleich zum Kontrollstamm K (MCS-Stamm). 5µg (a) und 10µg (b) Gesamtzell-RNA wurden elektrophoretisch getrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *mpt64*-genspezifischen Sonde hybridisiert. Die Detektion erfolgte mit dem CSPD-Detection-Kit. Unterhalb der Northern Blot Ergebnisse ist die 28Sr RNA-Bande im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel als Beladungskontrolle gezeigt. RNA-Marker: RiboRuler High Range RNA Ladder.

Die *mpt64*-spezifischen Transkriptmengen der verschiedenen Mutanten unterscheiden sich dabei deutlich. So weist die Mutante 16S/HMPT die stärkste Transkriptakkumulation auf, gefolgt von den Mutanten *atpA*/MPT und *psbD*/MPT. Die Mutante *psbA*/MPT zeigt die geringste Transkriptakkumulation, deren Nachweis erst durch Analyse der doppelten RNA-Menge ermöglicht wurde (Abb. 3.10b). Abgesehen von den unterschiedlichen Mengen konnte jedoch in allen Mutanten eine *mpt64*-spezifische mRNA nachgewiesen werden.

### 3.2.1.3 Western Blot Analyse

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob das Fremdprotein MPT64 im Chloroplasten synthetisiert und über eine Western Blot Analyse nachgewiesen werden kann. Algenzellen wurden unter Standardbedingungen (TAP-Medium, 23°C und  $35\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) angezogen, geerntet und Gesamtzellprotein, wie unter 2.9.1 beschrieben, isoliert. Die Proteine wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die

Abbildung 3.11a zeigt den immunologischen Nachweis des HA-markierten MPT64-Proteins in den Mutanten 16S/HMPT, *psbD*/MPT und *atpA*/MPT. In allen vier Mutanten konnte eine Expression von MPT64 nachgewiesen werden. Allerdings musste von der *psbA*/MPT Mutante die 40-fache Gesamtzellproteinmenge analysiert werden, um die geringe MPT64-Expression zu detektieren (Abb. 3.11b).

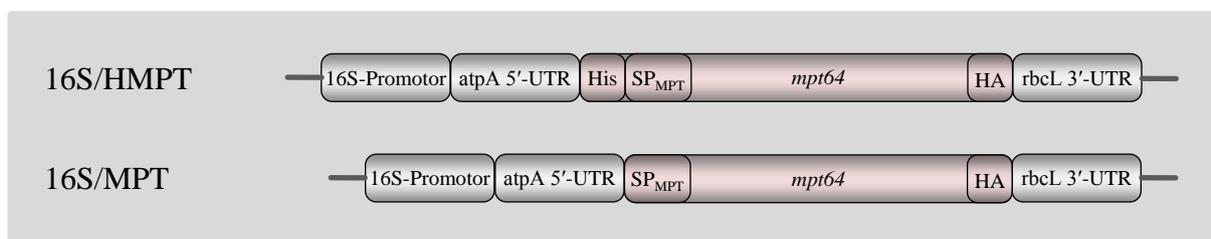


**Abbildung 3.11: Western Blot Analyse der MPT64-Mutanten**, im Vergleich zum Kontrollstamm K (MCS-Stamm). Von den Algenstämmen wurde Gesamtzellprotein entsprechend 1 µg Chl (a) und 40 µg Chl bei K und *psbA*/MPT bzw. 1 µg Chl bei 16S/HMPT (1/40) (b) im SDS-Gel getrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit dem anti-HA-HRP Antikörper hybridisiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL Detection Reagent. Proteinmarker: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Durch die Verwendung des 16SrDNA-Promotors in Kombination mit der *atpA* 5'-UTR und der *rbcL* 3'-UTR konnte in der Mutante 16S/HMPT die stärkste MPT64-Expression erreicht werden. Deshalb wurde diese Promotor-UTR-Kombination zunächst auch für weitere Expressionskonstrukte verwendet. Ferner erfolgte eine genauere Untersuchung zur MPT64-Expression bzw. -Akkumulation von Mutante 16S/HMPT (siehe Kapitel 3.3).

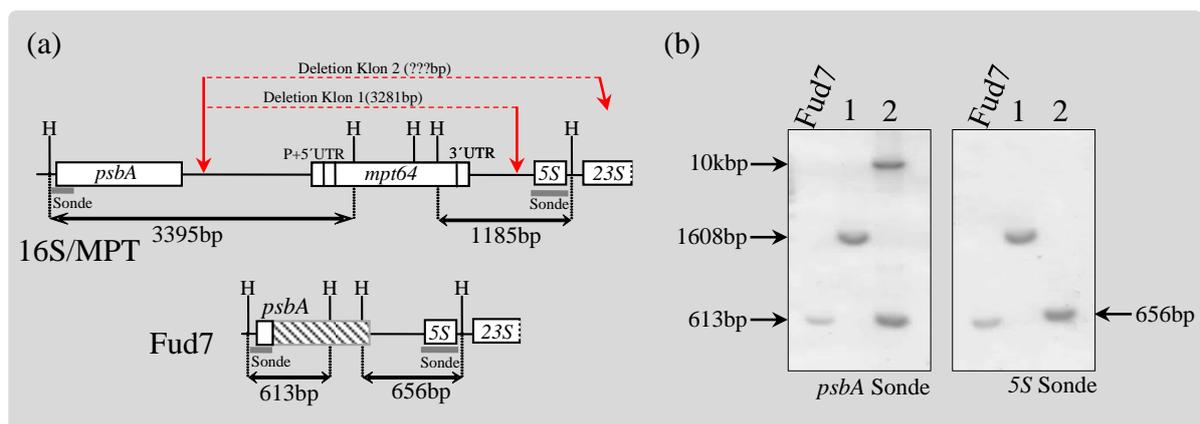
### 3.2.2 Erstellung von Mutante 16S/MPT (ohne His-TAG)

Die Mutante 16S/HMPT zeigte die stärkste Expression von MPT64. Um zu überprüfen, ob die zusätzlichen 10 Histidine am N-Terminus einen Einfluss auf die Proteinmenge nehmen, wurde ein Transformationskonstrukt ohne den Histidin-TAG erstellt und für die Erzeugung eines MPT64-exprimierenden Algenstammes (16S/MPT) verwendet (Abb. 3.12).



**Abbildung 3.12: Transgenkonstrukte der 16S/HMPT-Mutante und der geplanten 16S/MPT-Mutante.** Unterschiede beschränken sich ausschließlich auf das Fehlen der Sequenz für den N-terminalen His-TAG bei Mutante 16S/MPT.

Das Transformationsplasmid (p16S/MPT) konnte erfolgreich aus den PCR-Fragmenten (16S Promotor + *atpA* 5'UTR), (MPT64-HA- *rbcL* 3'UTR) (siehe Anhang B) und pMM2 generiert und für die Transformation des *Fud7*-Stammes eingesetzt werden. Direkt nach der Transformation konnten jedoch nur wenige, sehr langsam wachsende Kolonien detektiert werden. Vier Kolonien wurden isoliert und für weitere Analysen in flüssiges Minimalmedium (HS) überführt. Extrem langsam wachsend überlebten lediglich zwei Klone die folgenden 2 - 3 Wochen, bis sich schlagartig ihr photoautotrophes Wachstum verbesserte. Der Versuch, das eingebrachte Transgen für eine Sequenzierung zu amplifizieren, blieb erfolglos. Um den Plastombereich der Insertionsstelle genauer untersuchen zu können, wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. In der Abbildung 3.13a sind die mit einer *psbA*- bzw. 5S-Sonde detektierbaren Fragmentgrößen nach einem *Hind*III-Verdau dargestellt. Die zu erwartenden Fragmente einer 16S/MPT-Mutante konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.13b). Stattdessen entstanden Fragmente von ca. 1600bp (Klon1) und ca. 10kbp (Klon2).



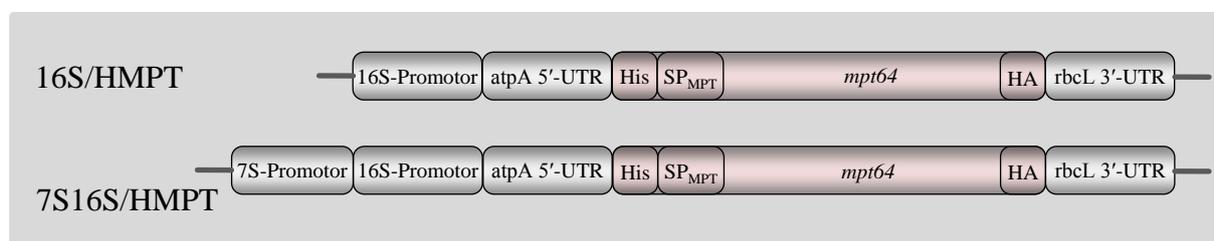
**Abbildung 3.13: Southern Blot Analyse der 16S/MPT-Transformanten.** (a): Schematische Darstellung der Plastomsequenzen mit den *Hind*III-Schnittstellen (H) und den resultierenden Fragmentlängen, die über eine *psbA* bzw. 5SrDNA-spezifische Sonde (grauer Balken) detektiert werden sollten. Eingezeichnet (Rot) sind Deletionen im Plastombereich der Transformanten, festgestellt über Sequenzierungen bzw. der dargestellten Southern Blot Analyse (b): Gesamtzell-DNA (10µg) wurde *Hind*III verdaut, elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit einer *psbA*-(links) bzw. 5SrDNA-(rechts) spezifischen Sonde und dem CSPD-Detection-Kit. Spur 1 (Klon1) und Spur 2 (Klon2) der 16S/MPT-Transformanten.

Diese Ergebnisse lassen sich durch entsprechende Deletionen der transgenen Sequenzen erklären (Abb. 3.13a rot). Bedingt durch das spezielle Transgen wurden die Transformanten vermutlich in ihrem photoautotrophen Wachstum beeinträchtigt, so dass eine Inaktivierung des Transgens, z.B. durch eine Deletion, einen selektiven Vorteil auf Minimalmedium darstellte. Über eine Sequenzierung konnte eine Deletion für Klon 1 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). In Klon 2 wurde zusätzlich das *Fud7*-spezifische Fragment detektiert. Wahrscheinlich sind die rRNA-Gene 5S und 23S durch die Deletion betroffen, weshalb *Fud7*-spezifische Plastomkopien koexistieren, um ein photoautotrophes Wachstum zu ermöglichen.

Überraschenderweise konnte die Mutante 16S/MPT nicht über photoautotrophe Selektion erhalten werden, obwohl sich das Transgen lediglich durch den stärkeren 16S-Promotor von dem der *atpA*/MPT-Mutante mit dem schwächeren *atpA*-Promotor (Abb. 3.7) und durch das Fehlen der für einen N-terminalen His-TAG kodierenden Sequenz von dem der 16S/HMPT-Mutante (Abb. 3.12) unterscheidet. Eine mögliche Erklärung ist, dass eine potentiell verstärkte Expression des N-terminal ungetaggteten MPT64 in der geplanten 16S/MPT-Mutante zur Beeinträchtigung der plastidären Funktion führt.

### 3.2.3 Optimierung der Fremdproteinexpression

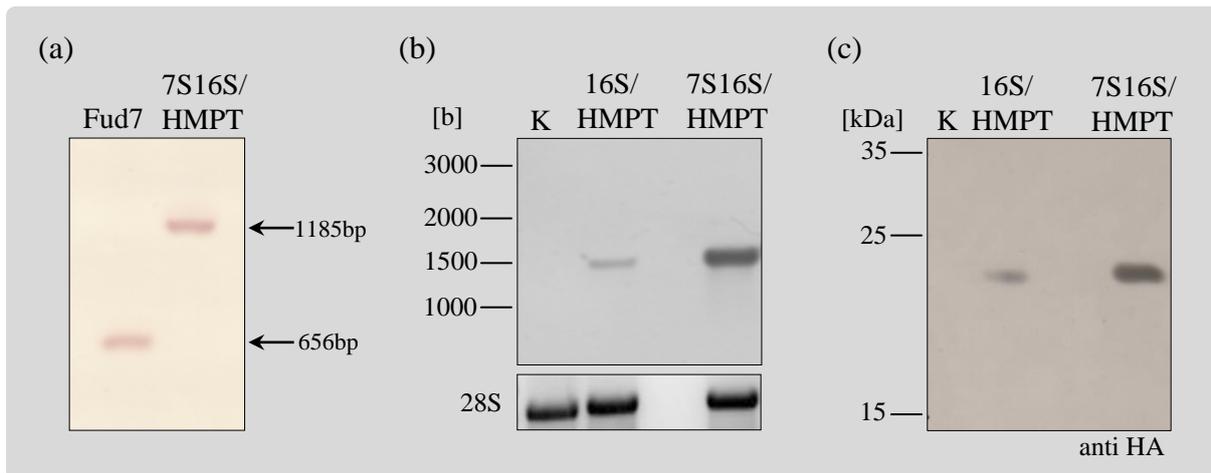
Mit den zuvor untersuchten Mutanten wurde gezeigt, dass die Verwendung des 16S-Promotors eine starke Transkriptakkumulation und eine hohe MPT64-Expression bewirkt. Auf der Suche nach weiteren Optimierungsmöglichkeiten speziell der Promotorsequenz sollte ein doppelter Promotor zum Einsatz kommen. In *E. coli* konnte durch die Verwendung von zwei hintereinander geschalteten Promotorsequenzen eine deutliche Steigerung der Expression erzielt werden [143,144]. Deshalb wurde im Plastom nach einem weiteren starken Promotor gesucht, um diesen mit dem 16S-Promotor zu kombinieren. Zu den am stärksten transkribierten Genen gehören die rRNA-Gene. Bisher ist jedoch lediglich der 16S-Promotor genauer beschrieben bzw. untersucht. Anhand von Sequenzanalysen konnte im 5'-Bereich des 7SrRNA-Gens mit Hilfe der BPROM-Software [145] eine putative Promotorsequenz ermittelt werden (siehe Anhang G). Spezifische Primer mit BsaI-Überhängen im 5'-Bereich wurden erstellt (siehe Tabelle 2.1) und an der DNA des IL-Stammes die Sequenz des putativen 7S-Promotors amplifiziert. Damit stand das Fragment für die Erstellung des Transformationsvektors p7S16S/HMPT (siehe Tabelle 7.2) zur Verfügung. Das Transgen der daraus hervorgegangenen Mutante 7S16S/HMPT ist in der Abbildung 3.14 dargestellt.



**Abbildung 3.14: Transgenkonstrukte der Mutanten 16S/HMPT und 7S16S/HMPT.** Dargestellt ist das Transgen der Mutante 16S/HMPT im Vergleich zum Transgen der Mutante 7S16S/HMPT mit einer zusätzlichen Promotorsequenz (7S).

Nachdem die Mutante 7S16S/HMPT auf den fehlerfreien Einbau des Transgens geprüft (Daten nicht gezeigt) und ein homoplasmischer Zustand nachgewiesen wurde (Abbildung 3.15a), konnte der Einfluss der zusätzlichen Promotorsequenz auf das *mpt64*-Transkript

untersucht werden. Über eine Northern Blot Analyse (Abbildung 3.15b) wurde in der Mutante 7S16S/HMPT mit dem doppelten Promotor mehr *mpt64*-mRNA nachgewiesen als in der 16S/HMPT-Mutante mit nur einem Promotor. Die höhere Transkriptmenge hatte ebenfalls eine Steigerung der MPT64-Expression zur Folge (Abbildung 3.15c). Demnach konnte für die plastidäre Expression von Fremdproteinen in *C. reinhardtii* ein neues Promotorkonstrukt in Form eines Doppelpromotors etabliert werden, das die Resultate bisheriger Konstrukte übertrifft.



**Abbildung 3.15: Analyse der Mutante 7S16S/HMPT.** (a) Test auf Homoplasmie (Southern). Gesamtzell-DNA des Rezipienten (Fud7) und der Mutante 7S16S/HMPT wurde HindIII verdaut und mit einer 5S-spezifischen Sonde hybridisiert. Im 7S16S/HMPT-Stamm konnte das mutantenspezifische Fragment (1185bp), aber nicht das rezipientenspezifische Fragment (656bp) detektiert werden (siehe Abb. 3.13a). Somit ist die Mutante 7S16S/HMPT homoplasmisch. (b) Transkriptanalyse (Northern). 5µg Gesamtzell-RNA wurden elektrophoretisch getrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *mpt64*-genspezifischen Sonde hybridisiert. Als Beladungskontrolle ist darunter die 28Sr RNA-Bande im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel gezeigt. Marker: RiboRuler High Range RNA Ladder. (c) Proteinanalyse (Western). Gesamtzellprotein entsprechend 1µg Chl wurde über SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit dem anti-HA-HRP-AK hybridisiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL Detection Reagent. Zum Vergleich wurde Mutante 16S/HMPT mitgeführt. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Für weitere Transgenkonstrukte konnte der Doppelpromotor, der erst am Ende dieser Arbeit etabliert wurde, aber noch nicht eingesetzt werden.

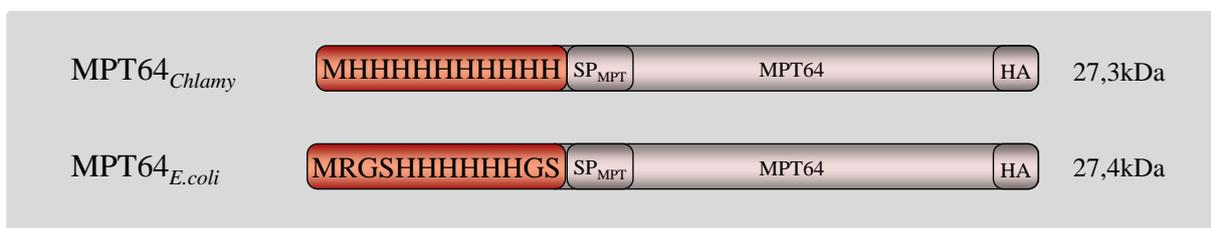
### 3.3 Untersuchungen zur MPT64-Expression/-Akkumulation

Für eine detaillierte Analyse der plastidären MPT64-Akkumulation wurde die Mutante 16S/HMPT mit einer starken Fremdproteinexpression bzw. -akkumulation verwendet. Vorrangig sollte die Menge an synthetisiertem MPT64 bestimmt werden, um einen Vergleich mit bereits erzielten Fremdproteinakkumulationen durchführen zu können. Deshalb wurde das MPT64 zusätzlich über das bakterielle System (*E. coli*) hergestellt und für vergleichende Analysen genutzt. Darüber hinaus konnte nur in *E. coli* ein N-terminal Histidin-getaggetes MPT64 angereichert und über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Dies

ermöglichte die Herstellung monoklonaler Antikörper, mit deren Hilfe ein MPT64-Schnelltest etabliert werden konnte (siehe 3.6.2). Im Zuge der Arbeiten wurde eine Prozessierung von MPT64 sowohl in *E. coli* als auch in *C. reinhardtii* festgestellt und näher untersucht.

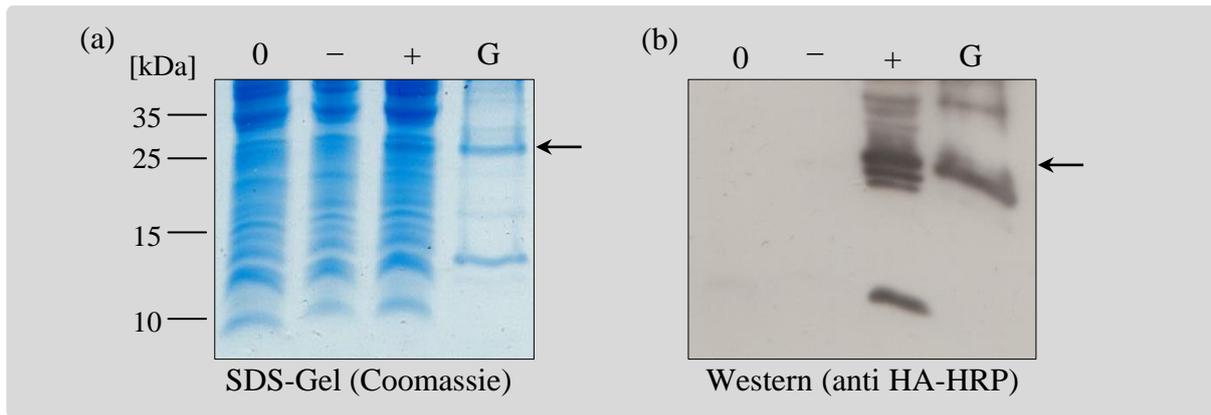
### 3.3.1 Expression von MPT64 in *E. coli*

Das bakterielle Expressionssystem (*E. coli*) wurde genutzt, um ein zur Mutante 16S/HMPT vergleichbares MPT64 (Abb. 3.16) herzustellen. Dadurch konnte das relativ neue plastidäre Expressionssystem *C. reinhardtii* direkt mit dem etablierten System *E. coli* verglichen werden. Weiterhin sollte das bakterielle MPT64 (MPT/bak) für eine Quantifizierung des plastidären MPT64 der Mutante 16S/HMPT sowie für die Produktion von MPT64-spezifischen Antikörpern genutzt werden.



**Abbildung 3.16: Vergleich von rekombinantem MPT64 aus *C. reinhardtii* bzw. *E. coli*.** Dargestellt ist MPT64 aus dem *C. reinhardtii*-Stamm 16S/HMPT (MPT64<sub>Chlamy</sub>) im Vergleich zu MPT64 aus *E. coli* (MPT64<sub>E.coli</sub>). Unterschiede beschränken sich auf den N-terminalen Bereich (rot unterlegte Aminosäuresequenz).

Die kodierende Sequenz für das MPT64 wurde an den *E. coli*-spezifischen Codongebrauch angepasst (siehe Anhang C) und über die Schnittstellen BamHI und HindIII in den Expressionsvektor pQE30 der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) inseriert. Der fehlerfreie Einbau des Expressionskonstrukts konnte durch eine Sequenzanalyse bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Das Plasmid pQE30/MPT wurde anschließend in den Expressionsstamm M15[pREP4] transformiert. Die Induktion der MPT64-Expression erfolgte durch Zugabe von IPTG. Um eine möglichst hohe Ausbeute an MPT64 (MPT<sub>bak</sub>) zu erzielen, wurden verschiedene Medien [LB (Luria-Bertani), SB (Super Broth) und TB (Terrific Broth)], IPTG-Konzentrationen (0,1 bis 1mM) und Inkubationszeiten (1 bis 24h) getestet (Daten nicht gezeigt). Mit der Verwendung von TB-Medium, 1mM IPTG und einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei 37°C und 150rpm im Schüttel-Inkubator konnte die höchste MPT64-Akkumulation erzielt werden. Das MPT64 reicherte sich in „inclusion bodies“ an, die für die Aufreinigung des 6×Histidin-getaggten MPT64 über Ni-NTA-Affinitätschromatographie verwendet wurden. Zur Kontrolle des gereinigten MPT64 wurden verschiedene Proben vor und nach dem Aufreinigungsprozess im SDS-Gel aufgetrennt und Coomassie gefärbt bzw. einer Western Blot Analyse unterzogen (Abb. 3.17).

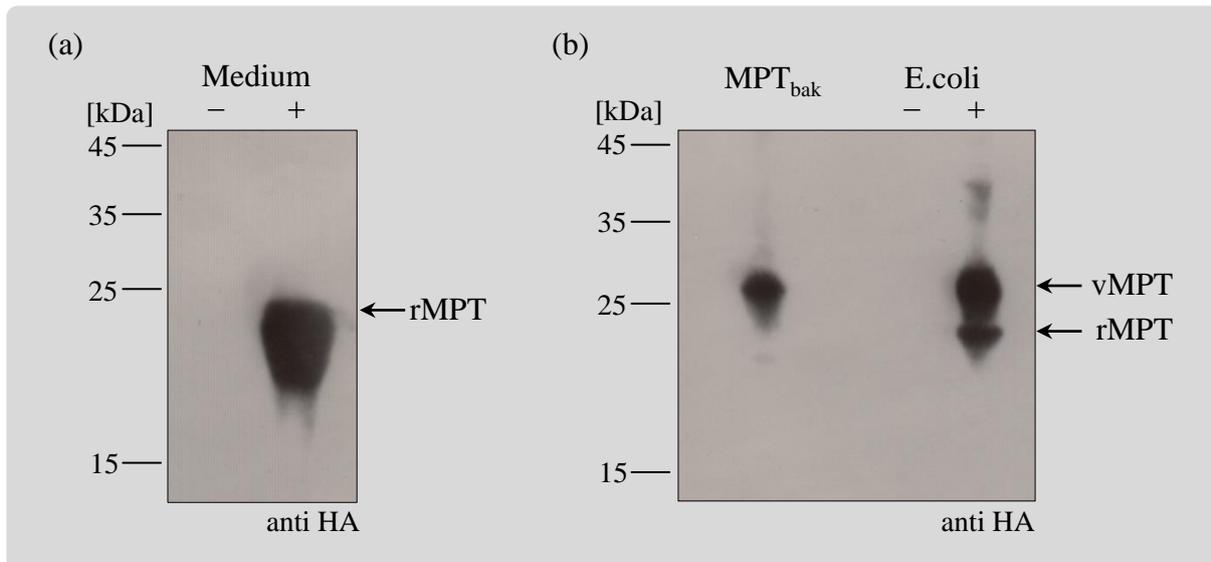


**Abbildung 3.17: SDS-PAGE (a) und Western Blot Analyse (b) von rekombinantem MPT64 aus *E. coli*.** Untersucht wurden folgende Proben 0: *E. coli*-Lysat (M15) als Negativkontrolle, die nicht induzierte Probe (-), die induzierte Probe (+) und die über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigte Probe (G). Das rekombinant in *E. coli* hergestellte MPT<sub>bak</sub> (27kDa) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

In der gereinigten Proteinfraction sind neben dem 27kDa großen MPT64 noch weitere Proteine vorhanden. Deshalb wurde die gereinigte Proteinfraction in einem SDS-Gel aufgetrennt und über eine negative Zink-Imidazol Färbung (siehe 2.10.2) sichtbar gemacht. Aus der herausgeschnittenen, MPT64-spezifischen Bande konnte anschließend das reine Protein eluiert und dessen Menge über den Vergleich mit einer BSA-Konzentrationsreihe im Coomassie-gefärbten SDS-Gel bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Somit stand das in *E. coli* exprimierte MPT64 (MPT<sub>bak</sub>) für vergleichende Analysen mit dem plastidären MPT64 und für die Gewinnung von MPT64-spezifischen Antikörpern zur Verfügung.

### 3.3.1.1 Prozessierung von MPT64 in *E. coli*

Im Verlauf der MPT64-Expression in *E. coli* wurde neben dem erwarteten Protein mit einer Größe von 27kDa noch ein kleineres Protein von ca. 23kDa detektiert. Möglicherweise ist dafür das unbeabsichtigt mitgeführte MPT64-spezifische Signalpeptid verantwortlich, das in *E. coli* einen Transport und eine damit verbundene N-terminale Prozessierung von MPT64 bewirkt. Das reife (prozessierte) MPT64 könnte in *E. coli*, einem gram-negativen Bakterium, in den periplasmatischen Raum oder ins umgebende Medium befördert werden. Durch eine Western Blot Analyse wurde dies näher untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.18 dargestellt. Demnach konnte nach der Induktion der MPT64-Expression das reife MPT64 (rMPT) mit einer Größe von 23kDa im Medium detektiert (Abb. 3.18a) und in der Gesamtzellproteinfraction des induzierten Stammes sowohl der Vorläufer (vMPT) als auch das reife MPT64 (rMPT) nachgewiesen werden (Abb. 3.18b).



**Abbildung 3.18: Western Blot Analyse zum Transport- und Prozessierungsverhalten von MPT64 in *E. coli*.** Proteinproben wurden über eine SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit dem anti-HA-HRP-Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL Detection Reagent. Untersucht wurden (a) jeweils 10  $\mu$ l Medium einer nichtinduzierten (-) bzw. einer induzierten (+) *E. coli* Übernachtskultur und (b) 0,5  $\mu$ g gereinigtes MPT64 (MPT<sub>bak</sub>) sowie Gesamtzellprotein von nichtinduzierten (-) bzw. induzierten (+) *E. coli*-Zellen, Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder.

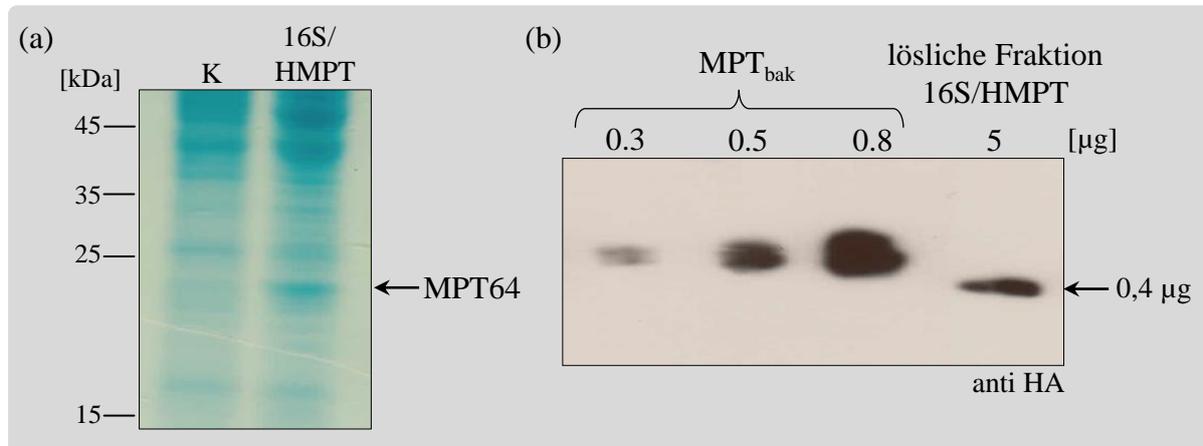
### 3.3.2 Quantifizierung von MPT64 in Mutante 16S/HMPT

Der Fremdproteingehalt wird vornehmlich innerhalb der löslichen Gesamtzellproteinfraktion (TSP, *total soluble protein*) bestimmt [25]. Um den Gehalt an MPT64 mit anderen bisher im Chloroplasten von *C. reinhardtii* erreichten Fremdproteinakkumulationen zu vergleichen, wurde die 16S/HMPT-Mutante unter Standardbedingungen (TAP-Medium, 23°C und 35  $\mu$ E \* m<sup>-2</sup> \* s<sup>-1</sup>) angezogen, die TSP-Fraktion isoliert und für die Quantifizierung verwendet.

Im TSP der Mutante 16S/HMPT konnte nach einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung bereits ein potentiell MPT64-spezifisches Signal detektiert werden (Abb. 3.19a). Die entsprechende Gel-Bande wurde ausgeschnitten und mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse (siehe Anhang E) zweifelsfrei dem MPT64-Protein zugeordnet. Aufgrund möglicher Verluste bei der Probenaufarbeitung war jedoch ein direkter Bezug auf die Gesamtmenge an MPT64 innerhalb der TSP-Fraktion nicht möglich.

Die eigentliche Quantifizierung erfolgte anschließend über Western Blot Analysen, wobei das bakterielle MPT64-Protein (MPT<sub>bak</sub>) in verschiedenen Konzentrationen als Standard verwendet wurde. Exemplarisch ist in der Abbildung 3.19b ein mit dem HA-Antikörper erzieltetes Ergebnis dargestellt. Die MPT64-spezifischen Banden wurden im Anschluss

densitometrisch ausgewertet. In vier unabhängigen Versuchen konnte in der TSP-Fraktion des 16S/HMPT-Stammes ein MPT64-Gehalt von 6 bis 10% ermittelt werden.



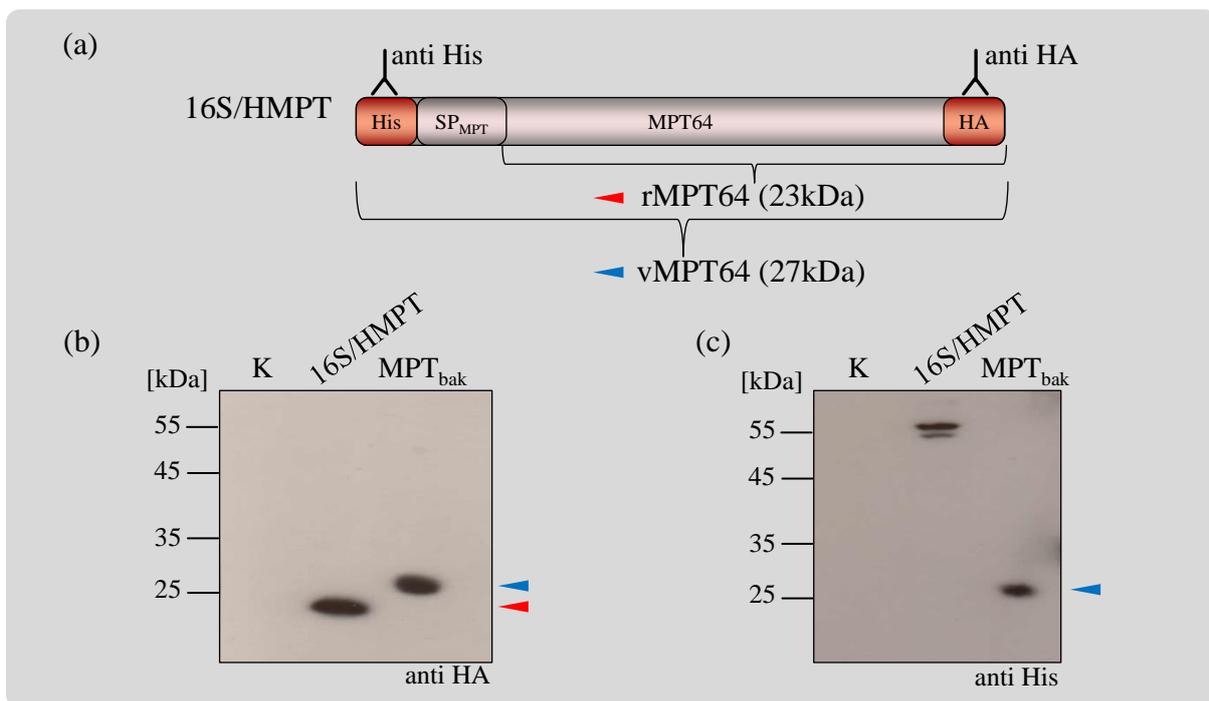
**Abbildung 3.19: SDS-Page und Western Blot Analyse zur Quantifizierung von rekombinantem MPT64 aus Mutante 16S/HMPT.** (a) Die Algenstämme 16S/HMPT und MCS (K, Kontrollstamm) wurden unter Standardbedingungen angezogen ( $23^{\circ}\text{C}$ ,  $35\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  in TAP-Medium) und in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Die Proteine wurden isoliert und  $50\mu\text{g}$  der löslichen Proteinfraction im SDS-Gel getrennt. Färbung: Coomassie, Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder (b) Western Blot Analyse für die Quantifizierung des Anteils von MPT64 in der löslichen Proteinfraction von Mutante 16S/HMPT. Zum Vergleich wurde rekombinant aus *E. coli* hergestelltes  $\text{MPT}_{\text{bak}}$  verwendet. Antikörper: anti-HA-HRP

### 3.3.3 Untersuchungen zur Prozessierung von MPT64

In der Abbildung 3.19b fällt der unerwartete Größenunterschied zwischen dem bakteriellen MPT64 ( $\text{MPT}_{\text{bak}}$ ) und dem plastidär exprimierten MPT64 auf. Der Grund dafür könnte das N-terminale Signalpeptid sein. Dieses vermittelt in *M. tuberculosis* den Transport von MPT64 über die bakterielle Membran in das umgebende Medium, wobei das Signalpeptid von einer spezifischen Protease abgeschnitten und das reife MPT64 freigegeben wird. Der Proteintransport über die Thylakoidmembran ins Lumen der Plastiden ist vergleichbar mit der bakteriellen Proteinsekretion. Für das im Thylakoidlumen lokalisierte Protein OEE1 konnte bereits der *in vivo*-Transport über die Bakterienmembran gezeigt werden [146]. Daher ist es möglich, dass auch das 27kDa große, bakterielle MPT64-Vorläuferprotein (vMPT) in das Lumen transportiert wird und dort das reife MPT64 (rMPT) akkumuliert (Abb. 3.20).

Eine Western Blot Analyse sollte dafür weitere Hinweise liefern. Hierzu wurden die Antikörper anti-His und anti-HA genutzt, um Gesamtzellprotein der Mutante 16S/HMPT mit dem aus *E. coli* gereinigten MPT64 ( $\text{MPT}_{\text{bak}}$ ) zu vergleichen. Der gegen den C-terminalen HA-TAG gerichtete Antikörper (anti-HA) bestätigte den bereits festgestellten Größenunterschied (Abb. 3.20b). Im Gegensatz dazu konnte mit dem anti-His-Antikörper (Abb. 3.20c) nur das bakterielle  $\text{MPT}_{\text{bak}}$  detektiert werden. Somit fehlt dem reifen MPT64

(rMPT) der Mutante 16S/HMPT der N-terminale Histidin-TAG und ausgehend vom Größenunterschied zusätzlich noch das Signalpeptid. Ein Vorläufer (vMPT)-spezifisches Signal konnte nur bei ca. 55kDa detektiert werden, was einem vMPT-Dimer entsprechen könnte. Bei heterolog exprimiertem MPT64 wurden bereits derartige Aggregate beschrieben [147]. Das vMPT-Monomer wird vermutlich sehr effizient transportiert bzw. prozessiert und ist somit durch eine herkömmliche Western Blot Analyse nicht nachweisbar.



**Abbildung 3.20: Western Blot Analysen zur MPT64-Prozessierung in Mutante 16S/HMPT.** (a): Schematische Darstellung vom MPT64-Protein exprimiert im Stamm 16S/HMPT mit den Bindestellen (rot) für die in der Western Blot Analyse verwendeten Antikörper: anti-HA-HRP (b) und anti-His-HRP (c). Es wurde Gesamtzellprotein entsprechend 1 $\mu$ g Chlorophyll der Mutanten MCS (K) als Kontrollstamm, 16S/HMPT im Vergleich zu 1 $\mu$ g aufgereinigtem MPT64 aus *E. coli* (MPT<sub>bak</sub>) untersucht. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder.

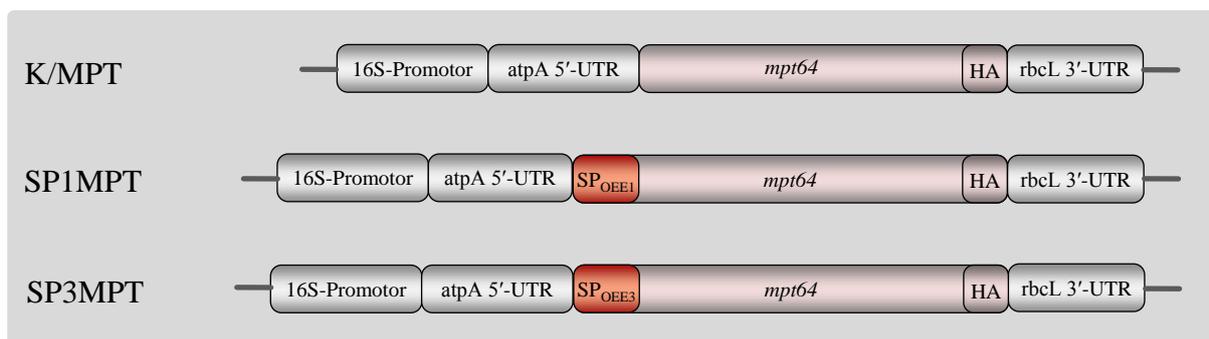
### 3.4 Einfluss von Signalpeptiden auf die Fremdproteinakkumulation

Die bisherigen Ergebnisse der 16S/HMPT-Mutante deuten auf eine MPT64-Akkumulation im Thylakoidlumen hin. Möglicherweise ist dieses Kompartiment besonders gut für die Anreicherung von Fremdproteinen im Allgemeinen oder speziell von MPT64 geeignet. Um dieser Frage nachzugehen, sollten Mutanten mit einer gezielten Anreicherung von MPT64 im Stroma bzw. im Thylakoidlumen erstellt und mit der 16S/HMPT-Mutante verglichen werden. Für den Proteintransfer über die Thylakoidmembran ins Lumen stehen verschiedene

Transportwege (Sec- und Tat-Weg) zur Verfügung. Ausschlaggebend für den Transport ist ein spezifisches N-terminales Signalpeptid, das den entsprechenden Weg definiert.

### 3.4.1 MPT64-exprimierende Mutanten

Um vergleichbare Mutanten mit einer möglichst starken Fremdproteinexpression zu erhalten, wurde für die Erstellung aller Transgenkonstrukte die identische Kombination aus 16S-Promotor, 5'*atpA* UTR und 3'*rbcL* UTR genutzt. Unterschiede beschränken sich auf den Gebrauch verschiedener Signalpeptid-kodierender Sequenzen (Abb. 3.21).

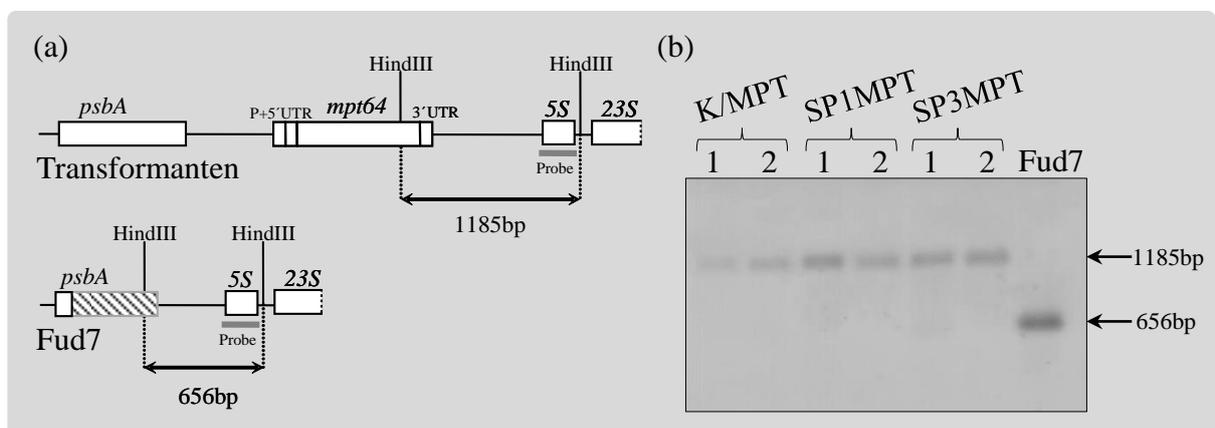


**Abbildung 3.21: Transgenkonstrukte ohne bzw. mit Signalpeptidsequenzen.** Dargestellt sind die Transgene der Mutanten K/MPT (ohne Signalpeptidsequenz), SP1MPT (mit der Signalpeptidsequenz vom OEE1, rot) und SP3MPT (mit der Signalpeptidsequenz vom OEE3, rot)

Für eine stromale MPT64-Akkumulation wurde bei der Kontrollmutante (K/MPT) die Sequenz für das bakterielle Signalpeptid (siehe Anhang C, [148]) deletiert. Der Transport von MPT64 ins Thylakoidlumen sollte hingegen durch die gut untersuchten Signalsequenzen vom *oxygen evolving enhancer* Protein OEE1 (Mutante SP1MPT) und OEE3 (Mutante SP3MPT) erfolgen [149] (siehe Anhang D). Die Signalsequenzen bestehen aus dem N-terminalen Transitpeptid und dem sich C-terminal anschließenden Signalpeptid. Im Stroma des Chloroplasten wird das Transitpeptid durch die SPP (*stromal processing peptidase*) abgeschnitten und das Signalpeptid vermittelt anschließend den Transport über die Thylakoidmembran ins Lumen [39]. Aufgrund der Unkenntnis bezüglich der genauen Prozessierungsstelle zwischen Transit- und Signalpeptid wurde die gesamte Signalsequenz des jeweiligen OEE-Proteins für den Transport des plastidär exprimierten Fremdproteins genutzt und entsprechend des Gebrauchs nur als Signalpeptid (SP) bezeichnet. Das SP vom OEE1-Protein vermittelt den Transport von weitestgehend ungefalteten Proteinen über den Sec-Weg [150,151]. Im Gegensatz dazu kann das SP vom OEE3 auch gefaltete Proteine über den Tat-Weg transportieren [152].

### 3.4.1.1 Test auf Homoplasmie und Sequenzierung

Die für die Erzeugung der entsprechenden Mutanten erforderlichen Transformationsplasmide wurden, wie unter 3.2.1 beschrieben, erstellt und erfolgreich für die Transformation des Rezipientenstammes Fud7 eingesetzt. Im weiteren Verlauf konnten photoautotrophe Kolonien, die zusätzlich das entsprechende Transgen tragen, selektiert werden. Pro Transgenkonstrukt wurden zwei unabhängige Klone isoliert, sequenziert (Daten nicht gezeigt) und auf Homoplasmie getestet (Abb. 3.22). Durch die Southern Blot Analyse konnte in den Transformanten nur ein konstruktsspezifisches Signal bei 1185bp, aber kein zusätzliches Rezipienten (Fud7)-spezifisches Signal bei 656bp detektiert werden. Somit lagen nachweislich homoplasmische Mutanten vor, die jeweils das korrekte Transgen tragen.



**Abbildung 3.22: Southern Blot Analyse der MPT64-Transformanten**, im Vergleich zum Rezipienten Fud7. (a) Schematische Darstellung der Plastomsequenzen mit den HindIII-Schnittstellen und den resultierenden Fragmentlängen, die durch die 5SrDNA-spezifische Sonde (grauer Balken) detektiert wurden. (b) Ergebnis der Southern Blot Analyse: Gesamtzell-DNA (5µg) wurde HindIII verdaut, elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit der 5SrDNA-spezifischen Sonde und dem CSPD-Detection-Kit. 1 und 2 stellen unabhängige Klone ein und derselben Mutante dar.

### 3.4.1.2 Northern Blot Analyse

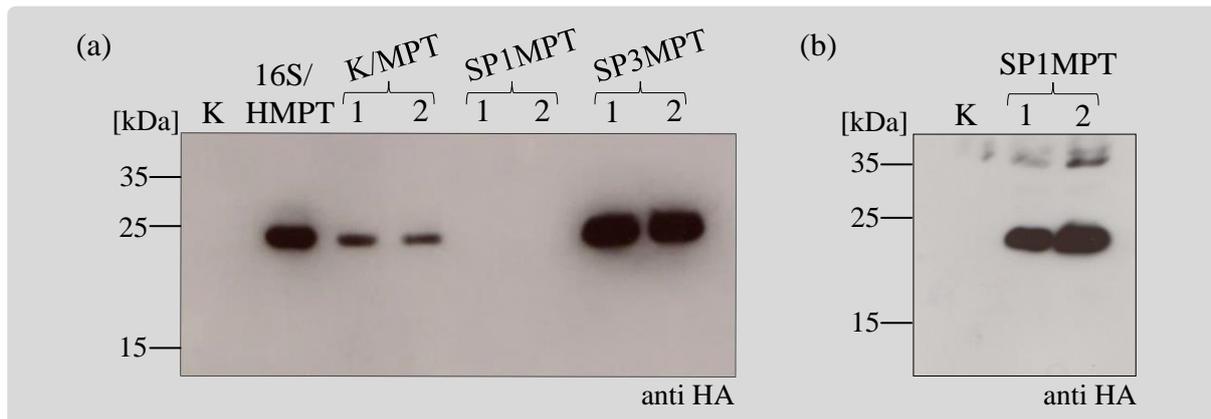
Die Detektion von *mpt64*-mRNA in den Mutanten erfolgte über eine Northern Blot Analyse mit einer *mpt64*-spezifischen Sonde (Abb. 3.23). Bis auf den transgenfreien Kontrollstamm (MCS-Stamm) konnte in allen Mutanten das *mpt64*-spezifische Transkript nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Größen sind auf das Fehlen der Sequenz für das Signalpeptid (Mutante K/MPT) bzw. auf ein ungleichmäßiges Laufverhalten im Gel (vergl. 28S rRNA) zurückzuführen (Mutanten SP1MPT und SP3MPT).



**Abbildung 3.23: Northern Blot Analyse von MPT64-Mutanten mit und ohne Signalpeptid**, im Vergleich zum Kontrollstamm K (MCS-Stamm) und dem 16S/HMPT-Stamm. 5 µg Gesamtzell-RNA wurden elektrophoretisch getrennt, auf Nylonmembran transferiert und mit einer *mpt64*-genspezifischen Sonde hybridisiert. Die Detektion erfolgte mit dem CSPD-Detection-Kit. Als Beladungskontrolle ist unterhalb des Northern Blot die 28Sr-RNA-Bande im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel gezeigt. 1 und 2 stellen unabhängige Klone ein und derselben Mutante dar. RNA-Marker: RiboRuler High Range RNA Ladder.

### 3.4.1.3 Western Blot Analyse

Durch eine Western Blot Analyse sollte der Einfluss von Signalpeptiden auf die MPT64-Expression bzw. -Akkumulation untersucht werden. Dafür wurde Gesamtzellprotein der Mutanten verwendet, die unter Standardbedingungen ( $23^{\circ}\text{C}$ ,  $35\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , TAP-Medium) angezogen wurden. Abbildung 3.24 zeigt, dass die Mutante SP1MPT mit dem Sec-Weg-spezifischen Signalpeptid (vom OEE1) die geringste MPT64-Konzentration aufweist. Erst die Analyse der 10-fachen Gesamtzellproteinmenge ermöglichte den Nachweis einer MPT64-Expression (Abb. 3.24b) Im Gegensatz dazu konnte durch die Verwendung des Tat-Weg-spezifischen Signalpeptids (SP3MPT) eine stärkere MPT64-Akkumulation als in der 16S/HMPT-Mutante mit dem N-terminal His-getaggten MPT64-Signalpeptid erreicht werden. Bei diesen Signalpeptid-tragenden Mutanten kann angenommen werden, dass das reife MPT64 ins Thylakoidlumen transportiert wird. Demgegenüber besitzt die Mutante K/MPT kein Signalpeptid, wodurch das MPT64 im Stroma verbleibt und dort in deutlich geringerer Menge akkumuliert als in den Mutanten 16S/HMPT und SP3MPT (Abb. 3.24a).



**Abbildung 3.24: Western Blot Analyse von MPT64-Mutanten mit und ohne Signalpeptid**, im Vergleich zum Kontrollstamm K (MCS-Stamm) und dem 16S/HMPT-Stamm. Gesamtzellprotein entsprechend 1  $\mu$ g Chlorophyll (a) bzw. 10  $\mu$ g Chlorophyll (b) wurden im SDS-Gel getrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit dem anti-HA-HRP-Antikörper hybridisiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL Detection Reagent. 1 und 2 stellen Proben von unabhängigen Klonen ein und derselben Mutante dar. Proteinmarker: PageRuler Prestained Protein Ladder.

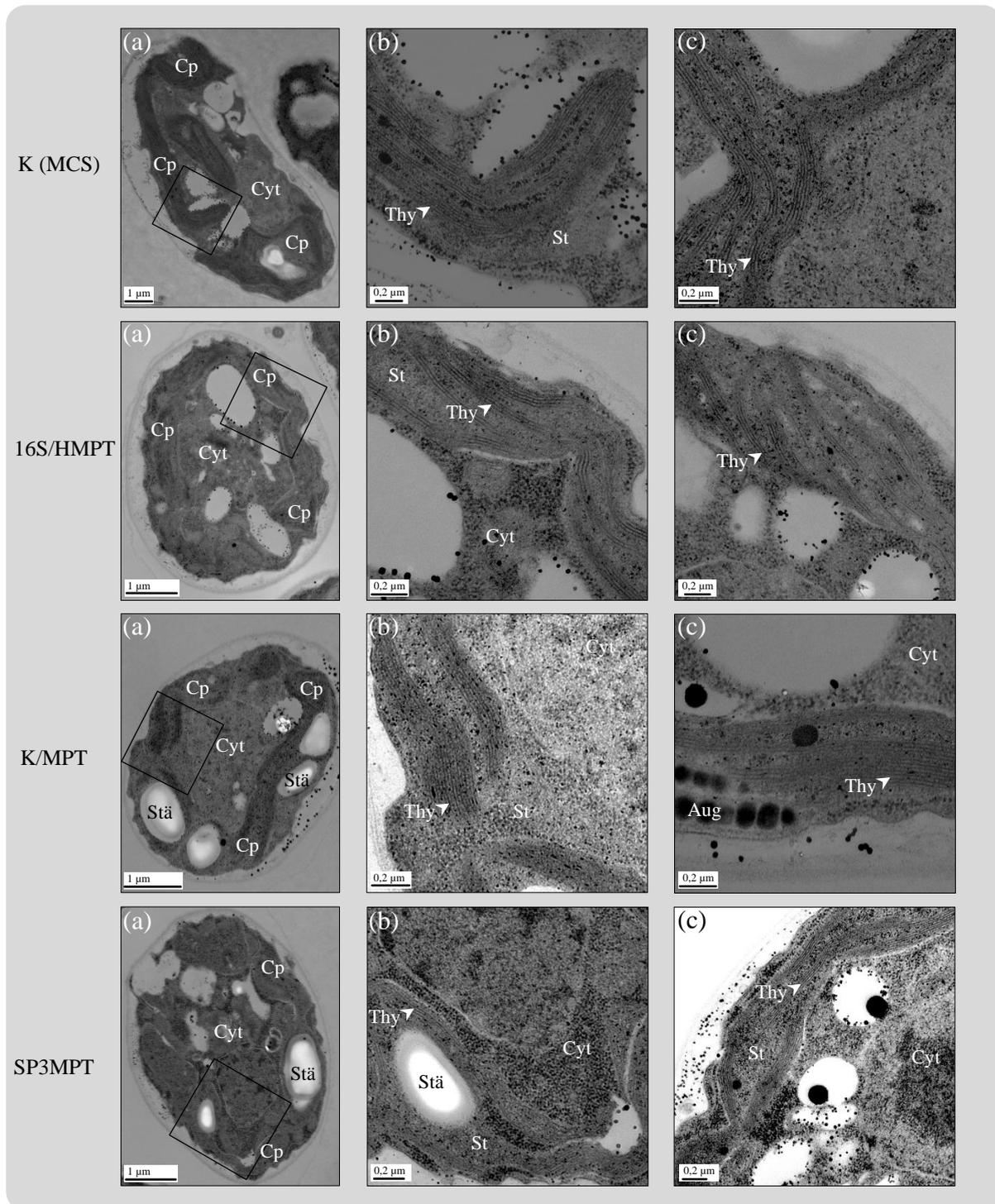
### 3.4.2 Lokalisation von MPT64 in *C. reinhardtii*

Aus den bisherigen Untersuchungen kann gefolgert werden, dass MPT64 abhängig vom Transportweg stärker im Lumen als im Stroma akkumuliert. Bei den entsprechenden Mutanten fehlt jedoch bisher der direkte Nachweis, dass sich MPT64 tatsächlich im Thylakoidlumen befindet. Eine Möglichkeit wäre die Präparation von Stroma- und Lumenfraktion an isolierten Chloroplasten. Doch bereits die Isolierung des relativ großen Chloroplasten ist in *C. reinhardtii*-Stämmen mit intakter Zellwand schwierig und verlangt Anzuchtbedingungen, die von den in dieser Arbeit verwendeten Standardbedingungen stark abweichen [153,154]. Deshalb wurde über die Elektronenmikroskopie versucht, einen differenzierten Einblick in den Chloroplasten der MPT64-exprimierenden Mutanten zu erhalten. In Plastiden höherer Pflanzen, in denen Fremdproteine exprimiert wurden, sind in einigen Fällen Strukturveränderungen festgestellt worden (unveröffentlichte Daten, Dirk Fischer). Ziel war es deshalb einerseits, detaillierte Strukturaufnahmen zu erhalten, um mögliche Abweichungen in der Form bzw. Organisation der Thylakoide aufzeigen zu können und andererseits über eine Immunogold-Markierung das MPT64 zu lokalisieren. Die Untersuchungen wurden auf die Mutanten MCS (Kontrollstamm), K/MPT (stromale MPT64-Akkumulation) sowie 16S/HMPT und SP3MPT (potentiell lumenale MPT64-Akkumulation) beschränkt. Für die Untersuchungen wurden die Algenzellen unter Standardbedingungen (TAP-Medium, 23°C und einer kontinuierlichen Beleuchtung von 35  $\mu$ E  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>) für 3 bis 4 Tage bis zu einer OD<sub>750nm</sub> von ca. 1 angezogen und im Anschluss für die

elektronenmikroskopische Untersuchung vorbereitet. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen einschließlich der vorgeschalteten Fixierung, Einbettung und Markierung wurden freundlicherweise von der Abteilung "Bildgebende Verfahren" unter Leitung von Herrn Dr. Gerd Hause am Biozentrum (MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

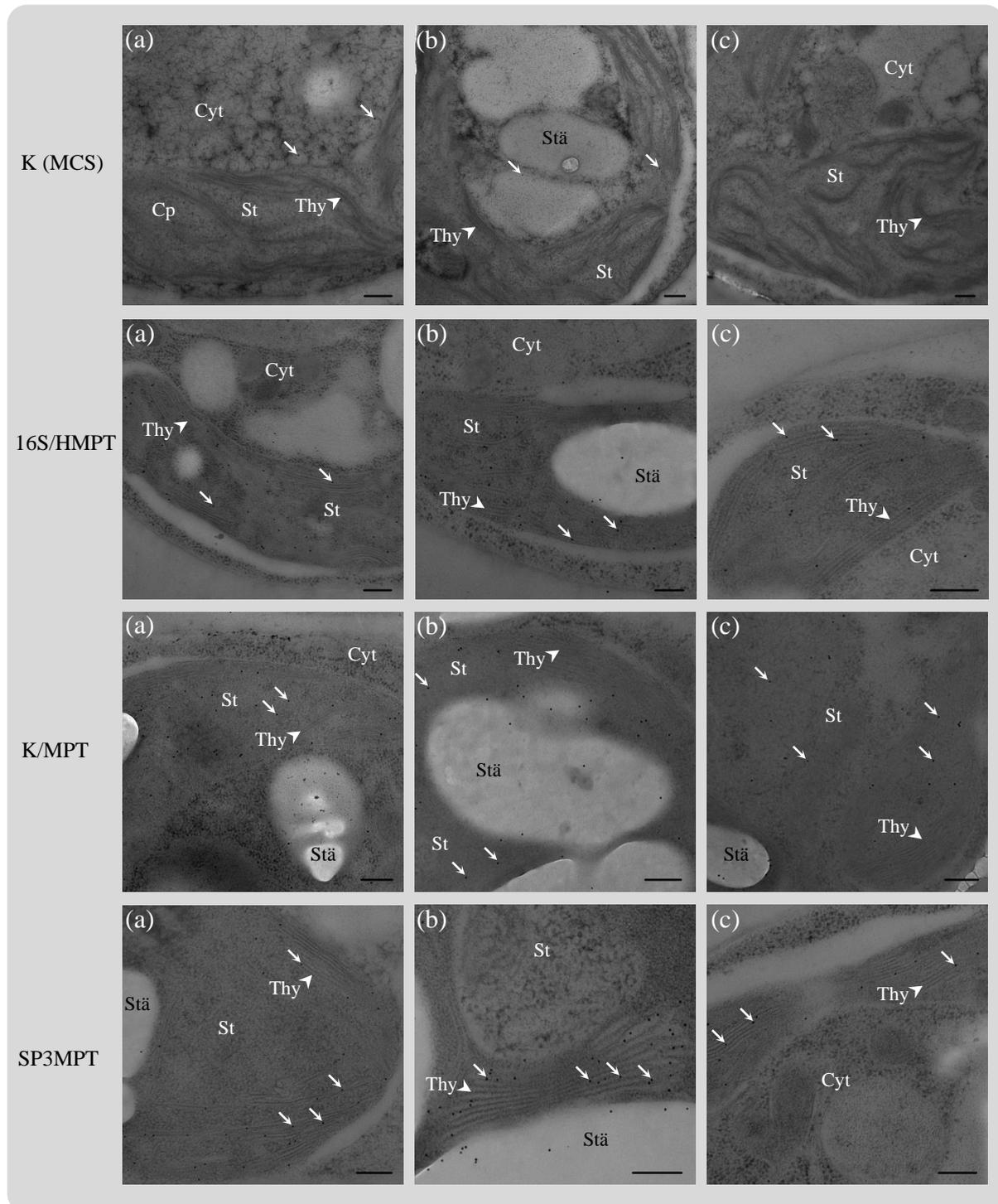
#### **3.4.2.1 Strukturaufnahmen**

Die Präparation der Algenzellen erfolgte nach der Methode von Spurr *et al.*, 1969 [136], die eine kontrastreiche Darstellung der Ultrastruktur ermöglicht. Von jeder Mutante wurden mehrere Algenzellen (5 bis 10) dokumentiert. In der Abbildung 3.25 sind für jede Mutante repräsentative Aufnahmen einer ganzen Zelle (a) mit 2 zusätzlichen Detailansichten (b und c) dargestellt. Im Vergleich der Strukturaufnahmen zwischen der Kontrollmutante (MCS) und den transgenen Stämmen (16S/HMPT, K/MPT und SP3MPT) kann keine Veränderung weder bei der Zellgröße oder der plastidären Struktur (becherförmiger Chloroplast) noch bei den für *C. reinhardtii* typischen langgezogenen und mehrlagigen Thylakoiden festgestellt werden. Des Weiteren ist bei den Mutanten 16S/HMPT und SP3MPT mit einer potentiell luminalen MPT64-Akkumulation kein vergrößertes bzw. aufgeblähtes Thylakoid-Lumen zu beobachten.



**Abbildung 3.25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen plastidärer Strukturen.** Untersucht wurden Ultradünnschnitte der Mutanten K (MCS = Kontrollstamm), 16S/HMPT, K/MPT (Kontrolle für eine stromale MPT64-Lokalisierung) und SP3MPT (Kontrolle für eine luminaire MPT64-Lokalisation). **(a):** Aufnahme einer gesamten Zelle zum Zwecke der Übersicht; **(b):** Detailausschnitt plastidärer Strukturen aus (a) siehe Markierung; **(c):** Detailausschnitt einer anderen Zelle. Cyt: Cytoplasma, Cp: Chloroplast, St: Stroma, Thy: Thylakoide, Stä: Stärke, Aug: Augenfleck. Aufnahmen der Abteilung „Bildgebende Verfahren“ (Dr. Gerd Hause).

## 3.4.2.2 Immunogold-Markierung



**Abbildung 3.26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen Immunogold-markierter Zellen.** Untersucht wurden die Mutanten K (MCS = Kontrollstamm), 16S/HMPT, K/MPT (Kontrolle für eine stromale MPT64 Lokalisierung) und SP3MPT (Kontrolle für eine MPT64-Lokalisation im Thylakoidlumen). (a), (b) und (c) sind Detailaufnahmen unterschiedlicher Zellen desselben *C. reinhardtii*-Stammes. Cyt: Cytoplasma, Cp: Chloroplast, St: Stroma, Thy: Thylakoide, Stä: Stärke, ↓: Goldpartikel, Balken entspricht 0,2µm. Aufnahmen der Abteilung „Bildgebende Verfahren“ (Dr. Gerd Hause).

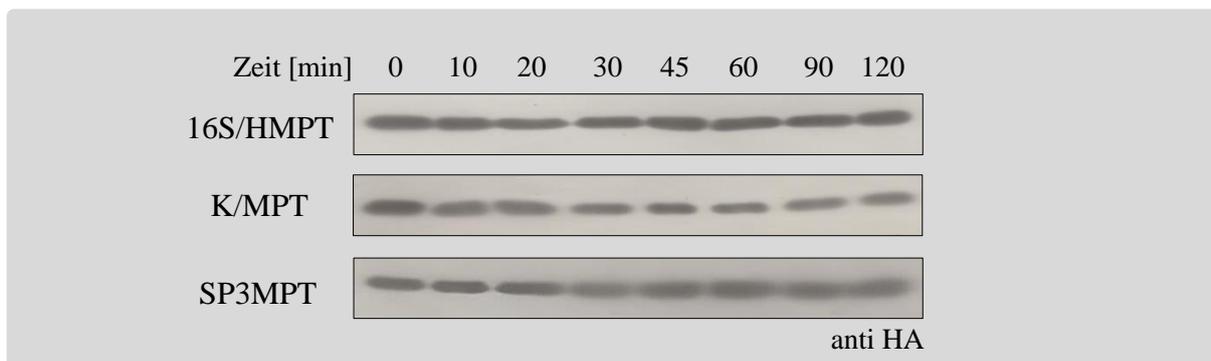
Für die Immunogold-Markierung wurden Ultradünnschnitte der Algenzellen wie unter 2.13.2 beschrieben, hergestellt. Die Detektion von MPT64 erfolgte mit einem primären anti-HA- und einem sekundären Gold-gekoppelten Antikörper. Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3.26) sind die nur 10nm großen Goldpartikel (weißer Pfeil) als kleine schwarze Punkte mit stets gleicher Größe zu erkennen. In dem MPT64-freien Kontrollstamm K (MCS-Stamm) können lediglich vereinzelt Goldpartikel festgestellt werden, die sich vornehmlich auf das Cytosol und im Chloroplasten auf Stärkekörner beschränken. Im Gegensatz dazu sind im Chloroplasten der transgenen Stämme deutlich mehr und demnach spezifisch am MPT64 lokalisierte Goldpartikel zu beobachten. In der Mutante (K/MPT) mit stromalem MPT64 sind die Goldpartikel diffus im Stroma verteilt und in Bereichen mit mehrschichtigen Thylakoiden nur vereinzelt nachweisbar. Indessen kommen die Goldpartikel im Chloroplasten der Mutanten 16S/HMPT und SP3MPT mehrheitlich in Verbindung mit Thylakoiden vor. Aus rein präparativen Gründen (schneiden und Verwendung von zwei AK) treten die Goldpartikel im Verhältnis zu ihrem Zielprotein leicht versetzt auf und können deshalb eher selten direkt im Thylakoidlumen nachgewiesen werden. Weil es sich bei dem MPT64 jedoch um ein lösliches Protein handelt, kann von einer Lokalisation im Thylakoidlumen ausgegangen werden.

Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten in den Mutanten 16S/HMPT und SP3MPT die vermutete Akkumulation von MPT64 im Thylakoidlumen bestätigen und zeigen, dass keine unmittelbar sichtbaren strukturellen Veränderungen der Thylakoide auftreten.

### **3.4.3 Vergleich der *in vivo*-Stabilität von MPT64 im Stroma bzw. Lumen**

Für die Expression von MPT64 wurden in den Mutanten K/MPT, SP1MPT, SP3MPT und 16S/HMPT die gleichen regulatorischen Sequenzen (Promotor und UTR's) genutzt. Die Menge an MPT64 unterschied sich jedoch deutlich (Abb. 3.24), obwohl die Transkriptmengen ähnlich sind (Abb. 3.23). In Abhängigkeit von dem jeweils verwendeten Signalpeptid (SP) konnte in Mutanten mit einer luminalen Akkumulation (z.B. SP3MPT) mehr MPT64 detektiert werden als in der Mutante K/MPT mit einer stromalen Akkumulation. Es ist denkbar, dass der Ort (Stroma bzw. Lumen) der Akkumulation mit den dort spezifisch vorkommenden proteolytischen Enzymen einen Einfluss auf die Stabilität von MPT64 hat.

Um dies zu untersuchen, wurde die plastidäre Proteinbiosynthese durch Chloramphenicol (CAP) inhibiert und der Abbau von MPT64 bei 23°C und einer Lichtintensität von  $35\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  mit Hilfe einer Western Blot Analyse verfolgt (Abb. 3.27). Zusätzlich fungiert CAP aber auch als Elektronen-Akzeptor am PSI [155], wodurch CAP verbraucht wird und die inhibitorische Wirkung auf die Proteinexpression nach ca. 2 Stunden abnimmt. Aus diesem Grund wurde der Versuch auf 2 Stunden begrenzt. Innerhalb dieser Zeitspanne konnte bei den Mutanten 16S/HMPT und SP3MPT mit MPT64 im Thylakoidlumen kein Abbau von MPT64 festgestellt werden, während in der Mutante mit der stromalen Lokalisation von MPT64 (K/MPT) dagegen eine leichte Abnahme der MPT64-spezifischen Banden zu beobachten ist. Eine densitometrische Auswertung der K/MPT-Banden ergab nach 2h eine Reduzierung der MPT64-Menge von ca. 40%.



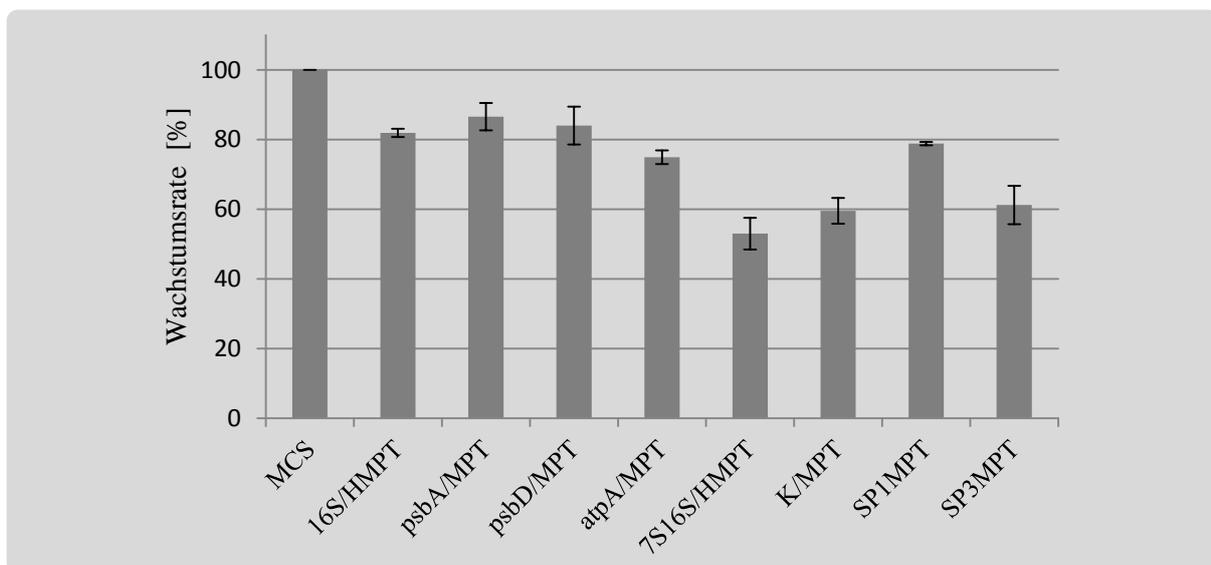
**Abbildung 3.27: Western Blot Analyse zur *in vivo*-Stabilität von MPT64.** Die plastidäre Proteinbiosynthese der Mutanten 16S/HMPT, K/MPT und SP3MPT wurde durch CAP (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inhibiert und der Abbau von MPT64 über einen Zeitraum von 120min verfolgt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquotes entnommen, Gesamtzellprotein isoliert und Proben entsprechend 1 $\mu\text{g}$  Chlorophyll über SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit dem anti-HA-HRP-Antikörper inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit dem ECL Detection Reagent.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass im Vergleich zum Stroma das Thylakoidlumen unter den gewählten Versuchsbedingungen eine höhere Stabilität von MPT64 gewährleistet.

### 3.4.4 Physiologische Charakterisierung

Um den Einfluss der MPT64-Expression auf das photoautotrophe Wachstum zu untersuchen, wurden Wachstumskurven erstellt und innerhalb der logarithmischen Phase die Wachstumsrate bestimmt. Dafür wurden die Algenzellen bei 23°C, einer Lichtintensität von  $75\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und unter ständiger  $\text{CO}_2$  (2,5%)-Begasung in Acetat-freiem Medium (HS) kultiviert.

Der transgenfreie MCS-Stamm wurde als Referenz mitgeführt und dessen Wachstumsrate (=100%) mit denen der MPT64-exprimierenden Mutanten verglichen (Abb. 3.28). Alle Mutanten zeigten gegenüber dem Referenzstamm MCS ein um mindestens 15 Prozent reduziertes photoautotrophes Wachstum. Die deutlichste Abnahme (40 bis 50 Prozent) der Wachstumsrate wurde bei den Mutanten 7S16S/HMPT, K/MPT und SP3MPT festgestellt. Dabei handelt es sich zum einen um Mutanten mit der stärksten luminalen MPT64-Akkumulation (7S16S/HMPT und SP3MPT) und zum anderen um die Mutante K/MPT mit einer vergleichsweise geringen MPT64-Akkumulation im Stroma.



**Abbildung 3.28: Wachstumsraten der MPT64-exprimierenden Mutanten,** im Vergleich zum Referenzstamm MCS. Die Wachstumsraten wurden innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase von jeweils 4 unabhängig aufgenommenen Wachstumskurven ermittelt und im Vergleich zum MCS-Stamm (100%) dargestellt.

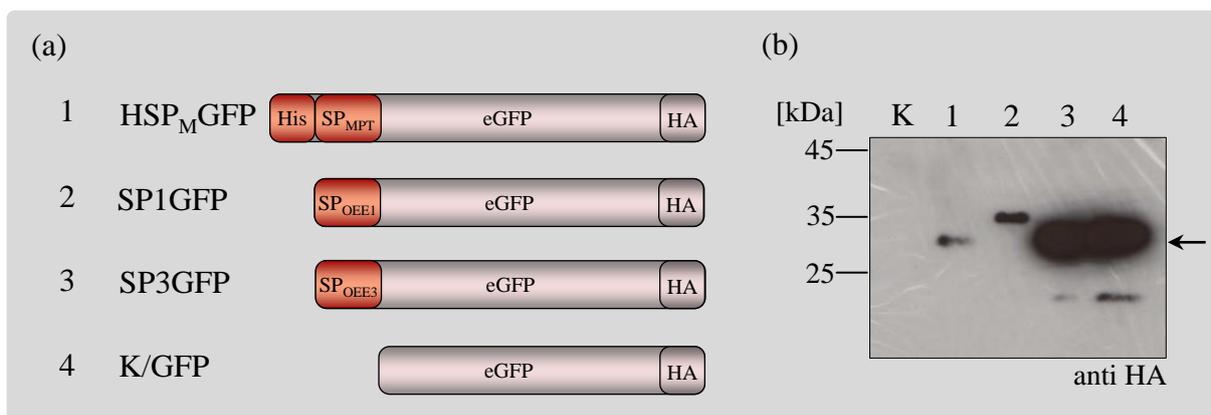
Allgemein hat die Expression von MPT64 eine Reduktion des photoautotrophen Wachstums zur Folge. Dabei bestimmen vor allem der Ort und die Menge an akkumuliertem MPT64 über die Stärke der Beeinträchtigung.

### 3.5 Verwendung des Transformations- und Expressionssystems

#### 3.5.1 Expression von eGFP

Die Verwendung von Signalpeptiden verursachte große Unterschiede in der Menge an akkumuliertem MPT64. Um zu überprüfen, ob das auch auf ein anderes Fremdprotein zutrifft, sollte das Reporterprotein eGFP mit den bereits für die MPT64-Expression verwendeten Signalpeptiden exprimiert werden.

Ausgehend von einer *gfp*-kodierenden Sequenz, die an den plastidären Codongebrauch von *C. reinhardtii* angepasst ist [54], wurde über eine SOE-PCR [156] mit mutagenen Primern (Tab. 2.5) ein *eGFP* kodierendes Fragment erzeugt (siehe Anhang C) und für die Erstellung von vier Transformationsvektoren genutzt. Für die Expression des C-terminal HA-markierten eGFP's wurde jeweils die Kombination aus 16S-Promotor, *atpA* 5'UTR und *rbcL* 3'UTR verwendet. Unterschiede beschränken sich ausschließlich auf den N-Terminus des exprimierten eGFP-Proteins (Abb. 3.29a). Die grundlegende Charakterisierung der Mutanten (Sequenzierung, Homoplasmietest, Transkriptanalyse und erste Untersuchungen auf Proteinebene) erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Frau Kathrin Pohle [157]. In der Mutante SP3GFP (Tat-Weg vermittelter Transport) konnte trotz reduzierter Transkriptmenge eine der K/GFP-Mutante (ohne Signalpeptid) vergleichbare Anreicherung an reifem eGFP (28kDa) festgestellt werden (Abb. 3.29b).



**Abbildung 3.29: Signalpeptid-abhängige eGFP-Expression.** (a): Dargestellt sind Mutanten, die das HA-getaggte eGFP im Chloroplasten exprimieren, teilweise mit einer zusätzlichen N-terminalen Sequenz (Signalpeptid = SP bzw. Histidin-TAG = His; rot markiert). Daraus ergeben sich folgende Größen: HSP<sub>M</sub>GFP (32kDa), SP1GFP (33kDa), SP3GFP (33kDa) und K/GFP (28kDa). (b): Western Blot Analyse von Gesamtzellprotein entsprechend 20 µg Chl (Probe K, 1 und 2) bzw. 10µg Chl (Probe 3 und 4). Der MCS-Stamm (K) wurde als Kontrolle mitgeführt. Der Pfeil kennzeichnet das reife (prozessierte) 28kDa große eGFP. Verwendet wurde der anti-HA-HRP-Antikörper sowie der Proteinmarker: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Deutlich geringere eGFP-Akkumulationen zeigten die Mutanten HSP<sub>M</sub>GFP (mit dem Histidin getaggten SP vom MPT64; HSP<sub>M</sub>) und SP1GFP (mit dem SP vom OEE1). Dabei fiel auf, dass bei Mutante SP1GFP der 33kDa große eGFP-Vorläufer akkumulierte und somit keine Prozessierung und vermutlich auch kein Sec-Weg-vermittelter Transport von eGFP ins Thylakoidlumen erfolgte. Im Gegensatz dazu wurde der Vorläufer von Mutante HSP<sub>M</sub>GFP prozessiert und das reife 28kDa große eGFP vermutlich auch ins Thylakoidlumen transportiert.

Analog zur MPT64-Expression wurde durch die eGFP-Expression im Chloroplasten von *C. reinhardtii* gezeigt, dass die Wahl des Signalpeptids einen entscheidenden Einfluss auf die Fremdproteinakkumulation im Thylakoidlumen nimmt. Im Gegensatz zur Expression von MPT64 konnten jedoch keine Unterschiede in der eGFP-Akkumulation zwischen Thylakoidlumen (Mutante SP3GFP) und Stroma (Mutante K/GFP) festgestellt werden. Vermutlich ist dies auf die generell hohe Stabilität von GFP [158,159] zurückzuführen.

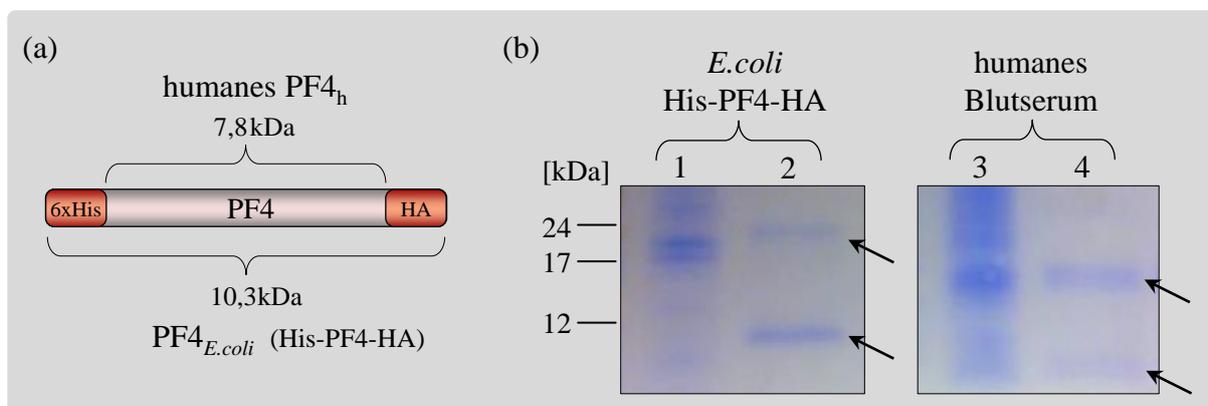
### 3.5.2 Expression von Plättchenfaktor 4

Der humane Plättchenfaktor 4 (PF4) ist ein 70 Aminosäuren großes Protein, das von den Thrombozyten freigesetzt wird und als Monomer, Dimer und Tetramer in unterschiedlichen Verhältnissen vorkommt. Bei der Behandlung von Patienten mit Heparin entsteht ein PF4-Heparin-Komplex, der vereinzelt zur Bildung von Antikörpern und somit zur Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) [160], d.h. zum Verklumpen der Thrombozyten (Thrombose), führt. Um eine HIT frühzeitig erkennen zu können, werden die vom Patienten gebildeten Antikörper z.B. über einen Lateral Flow Immunoassay nachgewiesen [161]. Dieser Test basiert zurzeit auf PF4, der aus Blutspenden isoliert wird. Dadurch entstehen einerseits hohe Kosten und andererseits können personenbedingte Qualitätsunterschiede, z.B. durch Punktmutationen im PF4 auftreten. Heterolog exprimiertes PF4 stellt daher eine aussichtsreiche Alternative für den Einsatz in derartigen Testsystemen dar.

Für eine vergleichende Expression von PF4 in *E. coli* bzw. in Chloroplasten von *C. reinhardtii* wurde die PF4-kodierende Sequenz individuell an den jeweiligen Codongebrauch angepasst (siehe Anhang C). Die Synthese der PF4-kodierenden Sequenzen erfolgte mit Hilfe einer PCR (siehe 2.7.7), in der spezifische, sich überlappende Oligonukleotide (Tab. 2.2 und 2.3) zu einem DNA-Fragment zusammengefügt wurden.

### 3.5.2.1 Expression von PF4 in *E. coli*

Für die bakterielle PF4-Expression wurde die an den Codongebrauch von *E. coli* angepasste Sequenz über die Schnittstellen BamHI und HindIII in den pQE-30 Vektor kloniert und das entstandene Plasmid pQE-30-PF4 in den Expressionsstamm M15 transformiert. Das bakteriell exprimierte PF4 enthielt für eine spätere Aufreinigung bzw. einen immunologischen Nachweis N-terminal einen 6-fachen Histidin-TAG und C-terminal einen HA-TAG (Abb. 3.30a). Das mit nur 70 AS relativ kleine PF4-Protein vergrößert sich dadurch um ca. 30%, wodurch Veränderungen in der Struktur und Funktion nicht ausgeschlossen werden können. Über die vergleichende Aufreinigung von PF4 aus Blutserum und der löslichen Fraktion des PF4-exprimierenden *E. coli*-Stammes (durchgeführt von Frau Dr. Eberle, Milenia Biotec) konnte trotz der TAG-Sequenzen die Heparin-bindende Eigenschaft des bakteriellen His-PF4-HA-Proteins gezeigt werden (Abb. 3.30b). Weitere immunologische Untersuchungen (Daten nicht gezeigt) zeigten jedoch, dass PF4-spezifische Antikörper eine deutlich reduzierte bis keine Affinität zum bakteriellen His-PF4-HA aufweisen. Die Verwendung dieser PF4-Variante in einem HIT-Test ist somit ausgeschlossen. Dennoch konnte das in *E. coli* rekombinant hergestellte PF4 für den Vergleich mit der plastidären PF4-Expression in *C. reinhardtii* verwendet werden.

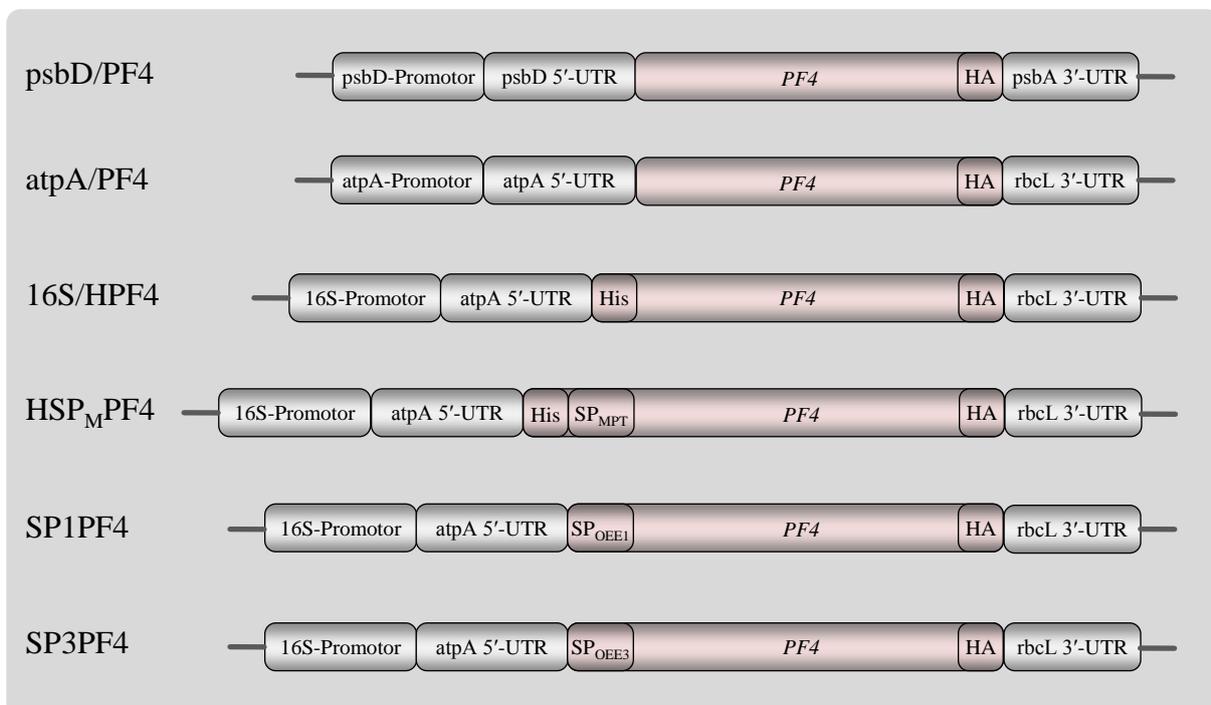


**Abbildung 3.30: Expression von Plättchenfaktor 4 (PF4) in *E. coli*.** (a): Schematische Darstellung des in *E. coli* exprimierten PF4-Proteins mit dem 6-fachen Histidin-TAG (rot) am N-Terminus und dem HA-TAG (rot) am C-Terminus im Vergleich zum humanen PF4 (PF4<sub>h</sub>). (b): Die lösliche Proteinfraction des induzierten *E. coli*-Stammes und humanes Blutserum wurden über eine Heparinsäule gereinigt. Die Durchfluss- (Spur 1 und 3) und die Eluat-Fractionen (Spur 2 und 4) wurden über eine SDS-PAGE separiert und Coomassie gefärbt. Das PF4 Monomer und das Dimer sind durch Pfeile gekennzeichnet.

### 3.5.2.2 Expression von PF4 in *C. reinhardtii*

Um PF4 im Chloroplasten zu exprimieren, wurde die *C. reinhardtii*-spezifisch Codon-adaptierte PF4-Sequenz genutzt und mit der unter 2.7.13 beschriebenen Methode des GGS sechs verschiedene Transformationsvektoren erzeugt (siehe Anhang B). Diese konnten erfolgreich zur Transformation des Rezipientenstammes Fud7 genutzt werden. Aus jedem

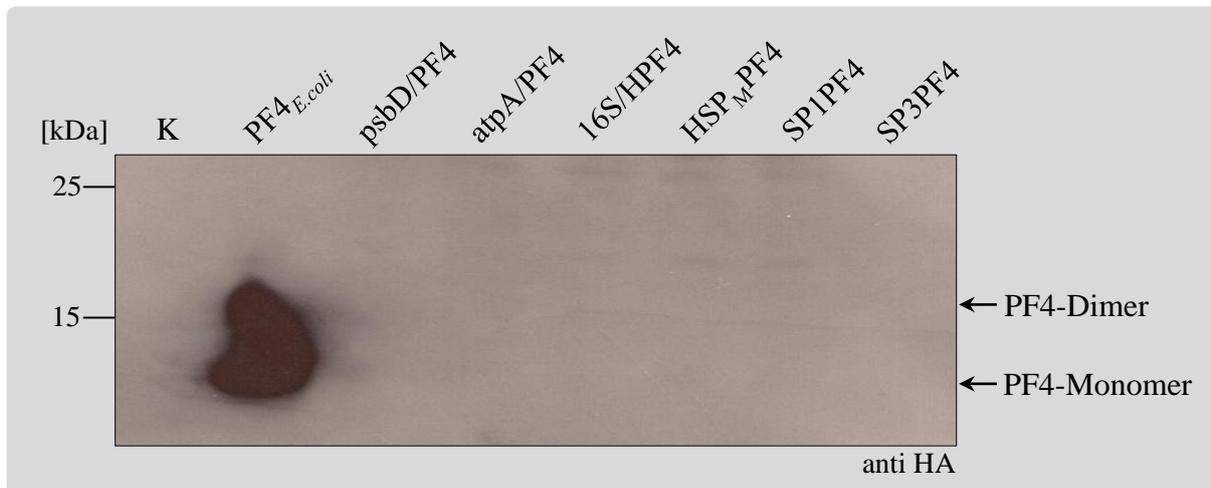
einzelnen Transformationsansatz gingen photoautotroph wachsende Transformanten hervor. Diese hatten das *PF4*-spezifische Transgen fehlerfrei inseriert, was über Sequenzierungen bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). In der Abbildung 3.31 sind die Transgenkonstrukte der sechs *PF4*-Mutanten dargestellt. Innerhalb der Mutanten steht die Expression des C-terminal HA-markierten *PF4* zum einen unter Kontrolle verschiedener Promotor-UTR-Kombinationen (Mutanten: *psbD/PF4*, *atpA/PF4* und *16S/HPF4*), wodurch eine unterschiedlich starke Expression an *PF4* erwartet wurde. Zum anderen sollte durch die Verwendung unterschiedlicher Signalpeptide das *PF4* im Lumen angereichert werden (Mutanten *HSP<sub>M</sub>PF4*, *SP1PF4* und *SP3PF4*), wodurch der Vergleich zur stromalen Akkumulation ermöglicht wird.



**Abbildung 3.31: Transgene für die plastidäre Expression von Plättchenfaktor 4 (PF4).** Die dargestellten Transgene konnten erfolgreich ins Plastidengenom inseriert werden. Für die Expression des HA-getaggten Proteins (*PF4*) wurden unterschiedliche Promotor/UTR-Kombinationen sowie Sequenzen für N-terminale Modifikationen verwendet. His = Histidin-TAG (10x), SP = Signalpeptid (vom MPT64, OEE1 bzw. OEE3)

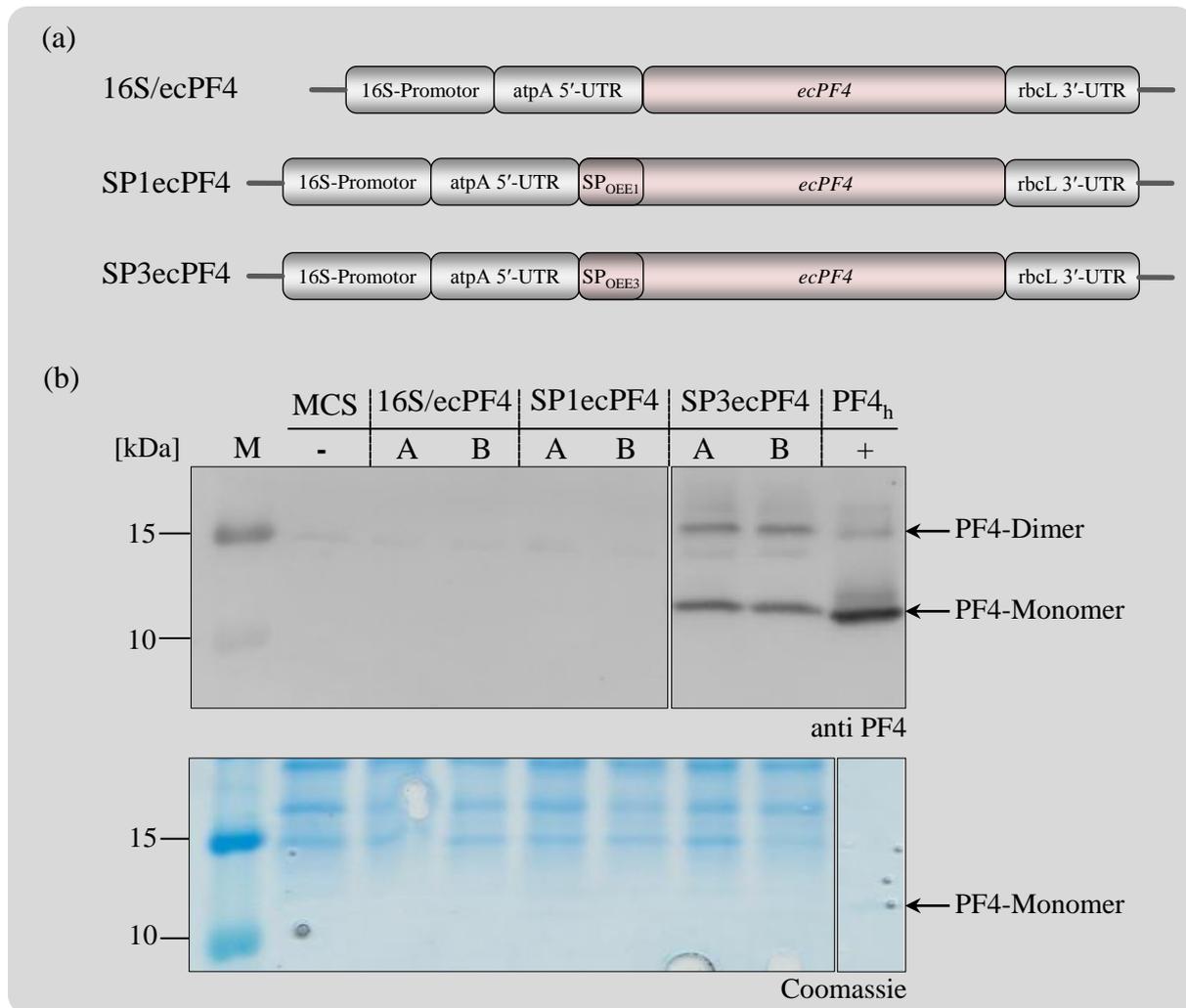
Nach der erfolgreichen Insertion der Transgene wurde über Northern Blot Analysen versucht, mit Hilfe einer Digoxigenin-markierten *PF4*-Sonde die *PF4*-spezifischen Transkripte in der Gesamtzell-RNA der jeweiligen Mutanten nachzuweisen. Doch in keiner der Mutanten konnte eine *PF4*-spezifische mRNA detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Auch bei weiterführenden Western Blot Analysen wurden trotz zahlreicher Wiederholungen und der Verwendung unterschiedlicher Antikörper (anti-*PF4* und anti-HA) in keiner Mutante ein *PF4*-spezifisches Signal detektiert. In der Abbildung 3.32 ist exemplarisch ein mit dem HA-

Antikörper erzielt Ergebnis dargestellt. Dabei wurde das in *E. coli* exprimierte His-PF4-HA-Protein als Positivkontrolle mitgeführt. Um auch geringste Mengen an PF4 in den *C. reinhardtii*-Proben zu detektieren, wurde der Blot stark überexponiert.



**Abbildung 3.32: Western Blot Analyse der PF4-Mutanten**, im Vergleich zur Kontrolle K (MCS-Stamm) und dem PF4-exprimierenden *E. coli*-Stamm (Positivkontrolle). Untersucht wurde jeweils Gesamtzellprotein entsprechend 5µg Chlorophyll bzw. 1µl induzierte *E. coli*-Suspension ( $OD_{600} = 0,8$ ). Der anti-HA-HRP-Antikörper sowie der Proteinmarker: PageRuler Prestained Protein Ladder wurden verwendet.

Trotz der gelungenen Integration von 6 unterschiedlichen Transgenen in das Plastom von *C. reinhardtii* konnte kein Nachweis für eine PF4-Expression erbracht werden. Grund dafür könnte die in allen Transgenen identische PF4-codierende Sequenz sein, die möglicherweise zu einem instabilen Transkript führt. Um dennoch im Verlauf dieser Arbeit überprüfen zu können, ob eine plastidäre PF4-Expression möglich ist, wurde keine neue Codon-adaptierte PF4-Sequenz erstellt, sondern die an den Codongebrauch von *E. coli* adaptierte Sequenz (ecPF4) für die Erzeugung von weiteren Transformationskonstrukten (Abb. 3.33a) genutzt. Neben einem Konstrukt für eine stromale PF4-Akkumulation (16S/ecPF4) wurden zusätzlich Konstrukte mit Signalpeptidsequenzen vom OEE1 bzw. OEE3 (SP1ecPF4 und SP3ecPF4) für eine potentiell lumenale PF4-Akkumulation erstellt. Aus zeitlichen Gründen konnten die daraus hervorgegangenen Transformanten bislang aber nur einer Western Blot Analyse (Abb. 3.33b) unterzogen werden. Dabei gelang der Nachweis einer PF4-Expression in beiden Klonen der SP3ecPF4 Mutante mit einer potentiell lumenalen PF4-Akkumulation. In den Mutanten 16S/ecPF4 und SP1ecPF4 konnte dagegen kein PF4 detektiert werden. Nichtsdestotrotz ist es mit der nicht Codon-adaptierten ecPF4-Sequenz (siehe Anhang C) gelungen, eine plastidäre PF4-Expression zu erzielen. Zusätzlich weist das vorläufige Ergebnis auf eine potentiell bessere lumenale PF4-Akkumulation gegenüber der im Stroma hin. Allerdings fehlen hier zusätzliche Untersuchungen auf DNA-, RNA- und Proteinebene.



**Abbildung 3.33: Algenklone mit *E.coli* Codon-adaptierter PF4-Sequenz (ecPF4).** (a): Dargestellt sind die Transgene der Mutanten 16S/ecPF4, SP1ecPF4 und SP3ecPF4. Bei diesen ist die PF4-codierende Sequenz (ecPF4) jedoch nicht an den Codongebrauch von *C. reinhardtii* sondern an den von *E. coli* angepasst. (b): Western Blot Analyse: Untersucht wurden je 10µl der löslichen Proteinfraction, isoliert aus 15ml Algenkultur OD<sub>750</sub> = 1 von je zwei unabhängigen Transformantenklonen (A und B) derselben Mutante und vom MCS-Stamm, der als Negativkontrolle (-) diente. Als Positivkontrolle (+) wurde 0,5µg humanes PF4 (PF4<sub>h</sub>) verwendet. Die PF4-Detektion erfolgte durch den primären anti-PF4 AK und den sekundären *Goat* anti-*Mouse*-AP AK. Als Beladungskontrolle ist unter dem Blot ein identisch beladenes und Coomassie gefärbtes SDS-Gel dargestellt. Proteinmarker: PageRuler Prestained Protein Ladder.

### 3.5.3 Expression der Phytochelatin-Synthase

Die Phytochelatin-Synthase (PCS) ist ein im Pflanzenreich ubiquitäres Enzym. Es ist kernkodiert und vermittelt im Cytoplasma die Bildung von Phytochelatinen (PC) aus Glutathion (GSH). In der Zelle sind neben GSH maßgeblich PC für die Bindung von Schwermetallen und deren Entgiftung verantwortlich. Die *C. reinhardtii*-spezifische PCS (CrPCS) erzeugt spezielle PC-Isoformen [162], deren Bedeutung für die Schwermetall-Detoxifikation bisher noch ungeklärt sind. An der Aufklärung arbeitet die Gruppe um Prof. Dr. D. Schaumlöffel (Universität de Pau, Frankreich) und Dr. D. Dobritzsch (MLU Halle-Wittenberg). Im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation ist die Idee entstanden, eine

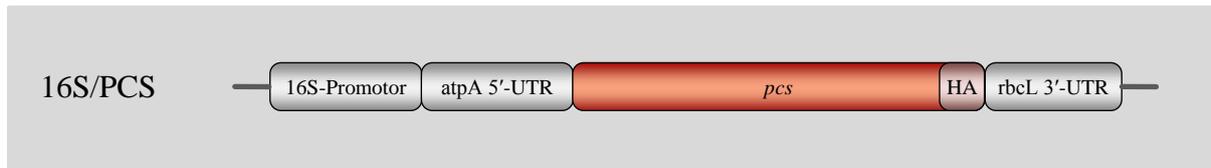
*C. reinhardtii*-Mutante mit einer plastidären *CrPCS*-Expression zu erstellen, um spezifische Fragestellungen der Schwermetallakkumulation im Chloroplasten untersuchen zu können.

Zu Beginn dieser Arbeit war nur ein Teil der für die *CrPCS*-kodierenden Sequenz bekannt (NCBI Reference Sequence: XP\_001701021.1), [28]. Über Sequenzanalysen und Homologie-Vergleiche mit höheren Pflanzen und anderen Algenarten konnte der potentiell aktivitätsrelevante und konservierte Teil der *CrPCS* anhand der genomischen Sequenz [163] identifiziert (Abb. 3.34) und im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Patrice Peterson (AG I. Thondorf, Biochemie, MLU Halle-Wittenberg) für eine erste *in silico*-Modellierung der Phytochelatin-Synthese von *C. reinhardtii* genutzt werden [164].

At	MAMASLYRRS	LPSPPAID	FSSAE	KLIFNEALQKGTMEGF	RLISYFQ	QSEPAY	CGLAS	60						
Nt	MAMAGLYRRV	LPSPPAVD	FASTE	QQLFLEAIQNGTMEGF	FKLISYFQ	QSEPAY	CGLAS	60						
Cr	-----	GFKKTFYKRK	LPSPAIE	FSCPE	GRQLFQEALLDGMTG	FKLMEQFNT	QDEPAF	CGLAS						
Cv	MERKPLAPP	GFSRIFYKRQ	LPSPAIE	FASAR	GKQVFGEALADGTVN	NFKLIEQFR	QDEPAY	CGLAS						
Vo	MTDSANKR	TYTKRV	LPSPAIS	FSSAE	GRQIFSEALPHGTMV	GFKLIEQFT	QEEPOY	CGLAA						
At	LSVVLNALS	IDPGRKWKGPWRWF	DESMLD	CCEPLEVVVKEK	GISFGKVV	CLAHCSGAKVEAF	RSTSQS--	T 127						
Nt	LSMVLNALA	IDPGRKWKGPWRWF	DESMLD	CCEPLEKVKAKG	ISFGKVV	CLAHCAGAKVEAF	RSNHS--	T 127						
Cr	LAMTLNALS	IDPRRTWKGSWRWF	HEAMLDC	CRPLDAVKEEG	ITLYQAS	CLARCNGARVEL	VPYGSAGLS	129						
Cv	LAMTLNLT	LNIDPRRTWKGPWRWF	HEEMLDC	CHPLPKVREE	GITLTQA	ACLARCNGARVEL	YPY--	AVS 136						
Vo	LSMTLNAL	GIDPRRTWKGAWRWF	SETMLDC	CKSMEEVKEK	GITLSQA	ACLARCNGADV	SLHRHGS--	FD 131						
At	IDDFRKFV	VVKCTSS	ENCHMISTYHR	GVFK	GTGTGH	FSP	IGGYNAERDMAL	LILDVAF	FKYPPH	WVPLKLL	196			
Nt	IDDFRKQV	MACTTSD	NCHLISSYHR	GLFK	GTGSH	FSP	IGGYHVGKDMAL	LILDVAF	FKYPPH	WVPLPLL	196			
Cr	LERFRRE	VEAVCGS	GEEHIVVS	SRKAF	LOTG	GH	FSP	IGGYHRGRDL	VLVLDVAF	FKYPPH	WVPLPML	198		
Cv	LEEFRGM	VAEVCSS	AAEHIIVS	YSRQ	EFR	TGD	GH	FSP	IGGYSAREDL	LALILD	TAF	FKYPPH	WVPLPML	205
Vo	GATFRLL	REACASE	DRHMVVS	YSR	KAFK	OSGD	GH	FSP	IGGYHDPDR	VVLLLDVAF	FKYCPH	WVAVDEL	200	
At	WEAMSDI	QSTGKR	RFMLISR	PHREP	GLLYTL	SCKDES	WIEIAKYL	KEDV	PRLVSS	QHVD	SVEKI	ISV	265	
Nt	WEAMNTI	DEATGL	HRGFM	LITKL	HRA	PALLYTL	SCKHES	WVTISK	HLMD	DLVLL	SSENV	KGIK	DVLST	265
Cr	YHGMSY	VDKVT	GRPRGY	MRLAS	NPLLD	SVLLT	CDVRS	APED	WRP	AEAF	VRS	GAAAL	-----	254
Cv	YK-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	207
Vo	LGAMGLL	DPVT	GMWGD	GDGWG	KGEGA	ATYWF	RRRLCS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	237

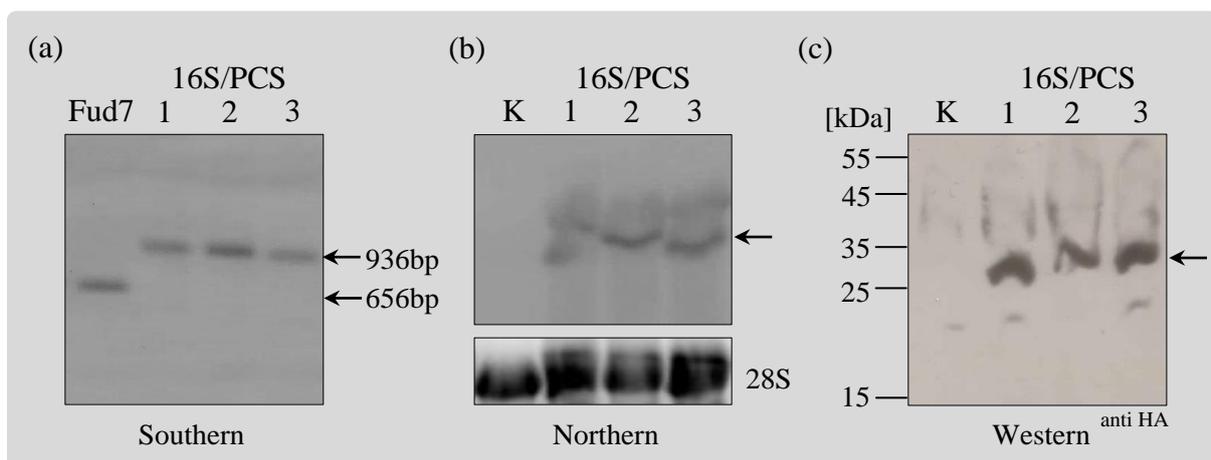
**Abbildung 3.34: Sequenzalignment unterschiedlicher Phytochelatin-Synthesen.** Hochkonservierte und strukturell relevante Aminosäuren [165] wurden rot unterlegt. Der graue Sequenzbereich der *CrPCS* wurde anhand der genomischen Sequenz von *C. reinhardtii* [28] abgeleitet. At: *Arabidopsis thaliana*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Cr: *Chlamydomonas reinhardtii*; Cv: *Chlorella vulgaris*; Vo: *Volvox spec.*

Mit dem Ziel, die *CrPCS* im Chloroplasten von *C. reinhardtii* zu exprimieren, wurde eine *pcs*-Sequenz erstellt, die an den Codongebrauch des Chloroplasten angepasst ist (siehe Anhang C). Diese konnte anschließend zusammen mit einer HA-TAG-kodierenden Sequenz und der Kombination aus 16S-Promotor, *atpA* 5'UTR und *rbcL* 3'UTR, wie unter 3.2.1 beschrieben, in den pMM2-Vektor inseriert werden (Abb. 3.35). Die HA-Markierung der *CrPCS* wurde notwendig, da kein PCS-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand. Das gebildete Transformationsplasmid p16S/PCS wurde anschließend für die Transformation des Rezipientenstammes Fud7 verwendet.



**Abbildung 3.35: Transgenkonstrukt der 16S/PCS-Mutante.** Die Kombination aus 16S-Promotor, *atpA* 5'UTR und *rbcL* 3'UTR sollte die plastidäre Expression der HA-getaggen Phytochelatin-Synthase (PCS) gewährleisten.

Von den zahlreichen Transformanten wurden für genauere Untersuchungen drei Klone isoliert und in flüssiges Minimalmedium (HS) überführt. Die fehlerfreie Insertion der transgenen Sequenz konnte über eine Sequenzierung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Im weiteren Verlauf erbrachte eine Southern Blot Analyse (Abb. 3.36a) den Nachweis, dass alle Plastomkopien der drei 16S/PCS-Mutanten identisch sind und somit stabile homoplasmische Kulturen vorlagen. Der entscheidende Nachweis eines *pcs*-spezifischen Transkripts bzw. des entsprechenden Proteins (*CrPCS*) erfolgte über eine Northern und eine Western Blot Analyse (Abb. 3.36b und c).



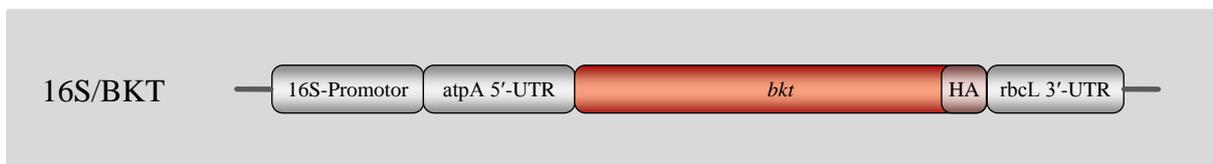
**Abbildung 3.36: Analyse von drei unabhängigen Klonen (1, 2 und 3) der 16S/PCS-Mutante.** (a): Southern Blot Analyse: Für den Homoplasmietest wurde eine 5SrDNA-Sonde verwendet, um an HindIII verdauten DNA-Proben das Rezipienten (Fud7)-spezifische Fragment (656bp) und/oder das transformantenspezifische Fragment (936bp) detektieren zu können (siehe Abb. 3.9a). (b): Northern Blot Analyse: 5µg Gesamtzell-RNA wurden mit Hilfe einer *pcs*-Sonde untersucht. Der Pfeil kennzeichnet das spezifische *pcs*-Transkript. Darunter ist die 28SrRNA-Bande im ethidiumbromidgefärbten Gel als Beladungskontrolle dargestellt. (c): Western Blot Analyse: Gesamtzellprotein entsprechend 5µg Chl wurde über eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen. Der Nachweis erfolgte mit dem anti-HA-HRP-AK. Der Pfeil kennzeichnet das 29kDa große PCS-Protein. K: Kontrollstamm MCS. Marker: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Sowohl *pcs*-spezifisches Transkript als auch exprimiertes Protein wurden in allen drei Klonen nachgewiesen. Klon 1 der *CrPCS*-Mutanten wird aktuell von Herrn F. Penen im Rahmen seiner Promotionsarbeit (AG Prof. Dr. D. Schaumlöffel) zur *in vivo*-Analyse von gebundenem Schwermetall (Cadmium) genutzt.

### 3.5.4 Expression der $\beta$ -Carotin-Ketolase

Die  $\beta$ -Carotin-Ketolase (BKT) von *C. reinhardtii* (*CrBKT*) ist ein kernkodiertes Enzym, das ausschließlich während der Sporenbildung exprimiert wird und maßgeblich an der Bildung sekundärer Carotinoide wie z.B. Astaxanthin (Ax) beteiligt ist [166] (siehe Anhang F). Die Expression der *CrBKT* führte in *Arabidopsis thaliana* zur Akkumulation großer Mengen von Ax ohne negative Folgen für das pflanzliche Wachstum [167]. Eine Ax-Produktion in *C. reinhardtii* wäre allein aus wirtschaftlichen Gründen interessant. Zusätzlich könnte die Ax-bedingte Rotfärbung von transgenen Algenklonen aber auch als optischer Selektionsmarker für eine gezielte Optimierung der heterologen Genexpression genutzt werden.

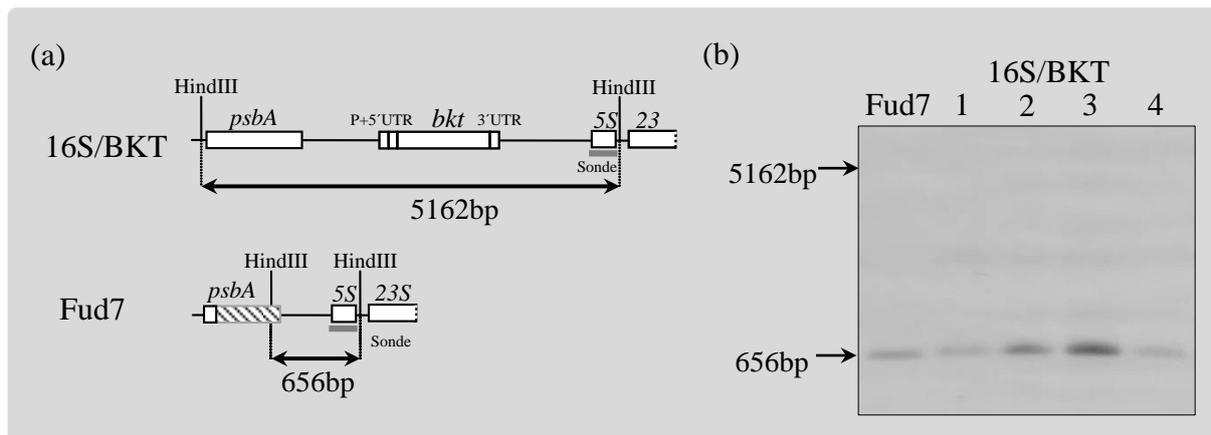
Im Vergleich zu anderen BKT besitzt die *CrBKT* eine um 120 AS verlängerte C-terminale Sequenz, die jedoch nicht funktionsrelevant ist [166]. Aus Kostengründen wurde deshalb nur der funktionelle Teil (AS 1 bis 328) einschließlich des potentiellen Transitpeptids verwendet, um eine an den plastidären Codongebrauch angepasste cDNA zu generieren (Anhang C). Anschließend konnte, wie unter 3.2.1 beschrieben, ein Transformationsvektor mit einem in der Abbildung 3.37 dargestellten Transgenkonstrukt erstellt werden. Die Verwendung des 16S-Promotors, der *atpA* 5'UTR und der *rbcL* 3'UTR sollten eine möglichst starke BKT-Expression bewirken. Über den C-terminalen HA-TAG könnte ein immunologischer Nachweis der plastidär exprimierten BKT erfolgen.



**Abbildung 3.37: Transgenkonstrukt für die plastidäre Expression der BKT.** In der geplanten Mutante 16S/BKT steht die Expression der C-terminal HA-getaggten BKT unter der Kontrolle des 16S-Promotors, der *atpA* 5'UTR und der *rbcL* 3'UTR.

Aus der Transformation des Fud7-Stammes gingen nur wenige photoautotroph wachsende Kolonien hervor. Teilweise zeigten diese Kolonien eine leicht rötliche Färbung, was auf eine erfolgreiche Expression der *CrBKT* hindeutete. Sechs Klone wurden zur näheren Untersuchung (Test auf Homoplasmie, Sequenzierung) in flüssiges Minimalmedium (HS) überführt. Es gelang jedoch nur vier der sechs Klone zu kultivieren. Dabei zeigten diese zunächst ein extrem langsames photoautotrophes Wachstum, welches sich jedoch nach 1 bis 2 Monaten allmählich verbesserte. Anschließende Versuche, das Transgen über PCR zu amplifizieren (Daten nicht gezeigt), blieben erfolglos. Über eine Southern Blot Analyse konnte das transgenspezifische Fragment ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.38).

Mit der 5S-spezifischen Sonde wurde lediglich ein Signal des nur heterotroph wachsenden Fud7-Stammes detektiert, obwohl die Transformanten photoautotroph wachsen, d.h. über ein *psbA*-Gen verfügen. Erklärbar ist dies durch eine Deletion von der nicht das *psbA*-Gen aber neben dem Transgen noch weitere essentielle Gene betroffen sind. Um dennoch photoautotroph wachsen zu können müssen die Rezipienten (Fud7)- als auch das deletierte Transformanten-spezifische Plastom koexistieren. Ein vergleichbares Ergebnis wurde beim Versuch, die Mutante 16S/MPT zu erstellen (siehe 3.2.2), festgestellt.



**Abbildung 3.38: Southern Blot Analyse der 16S/BKT-Transformanten (1-4).** (a): Schematische Darstellung der Plastomsequenzen mit den HindIII-Schnittstellen und den resultierenden Fragmentlängen, detektierbar durch die 5SrDNA-spezifische Sonde (grauer Balken). (b): Southern Blot Ergebnis: Gesamtzell-DNA (5µg) wurde HindIII verdaut, elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit dem CSPD-Detection-Kit.

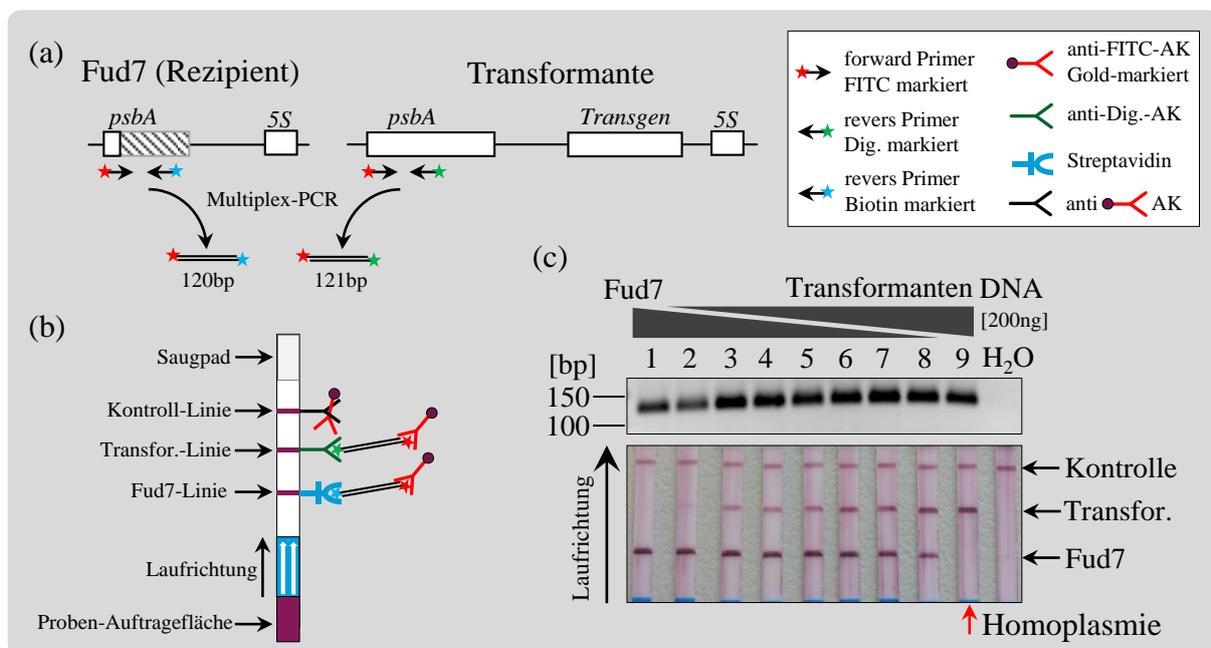
Die Expression der *CrBKT* beeinträchtigt vermutlich die Funktion des Chloroplasten so sehr, dass die Deletion des Transgens unter den photoautotrophen Wachstumsbedingungen einen selektiven Vorteil darstellt.

### 3.6 Methodische Optimierungen

#### 3.6.1 Etablierung eines Multiplex-PCR-basierten Schnelltests auf Homoplasmie

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode zur Erzeugung transgener Algenstämme hat gegenüber anderen Methoden den Vorteil, sehr effizient und schnell ein Transgenkonstrukt für die Transformation des Fud7-Stammes bereitzustellen. Um auch die Analyse der Transformanten deutlich zu beschleunigen, wurde versucht die Suche nach genetisch stabilen (homoplasmischen) Mutanten zu optimieren. Die bisher genutzte Methode der Southern Blot Analyse (siehe 2.7.10) ist sehr aufwendig und dauert bis zu 3 Tagen, weshalb diese Untersuchung in größeren Zeitabständen (Wochen) durchgeführt wird. Mit einer simpleren und vor allem schnelleren Methode wäre man in der Lage, homoplasmische Mutanten bei kürzeren Untersuchungsintervallen zeitnah zu detektieren.

Auf Basis einer Multiplex-PCR konnte ein Schnelltest auf Homoplasmie entwickelt werden. Wie in Abbildung 3.39a gezeigt, wurden dafür drei Primer (Tab. 2.7) mit unterschiedlichen Markierungen verwendet. Als *forward* Primer kam ein mit Fluoreszeini $\theta$ thiocyanat (FITC) markiertes Oligonukleotid zum Einsatz, das im Exon 1 des *psbA*-Gens bindet. Dieser Sequenzbereich befindet sich sowohl im Plastom des Rezipientenstammes Fud7 als auch im Plastom der geplanten Transformante. Im Gegensatz dazu binden die *revers* Primer nur spezifisch entweder am intronlosen *psbA*-Gen der Transformante (Digoxigenin markierter *revers* Primer) oder an Intronsequenzen des teilweise deletierten *psbA*-Gens im Rezipientenstamm Fud7 (Biotin markierter *revers* Primer). Ausgehend von einer heteroplasmischen Transformante entstehen bei einer PCR nahezu gleichgroße Fragmente (120bp Fud7 und 121bp Transformante). Zwischen diesen Fragmenten kann selbst nach einer 1,5 stündigen gelelektrophoretischen Auftrennung nicht unterschieden werden (Abb. 3.39c).



**Abbildung 3.39: Prinzip des Schnelltests auf Homoplasmie.** (a) Dargestellt sind Bindestellen der FITC-, Biotin- und Digoxigenin-markierten Primer, welche zusammen in einer Multiplex-PCR eingesetzt sowohl ein Fud7 (120bp) als auch ein transformantenspezifisches Fragment (121bp) generieren können. (b) Der Nachweis der individuell markierten PCR-Fragmente erfolgt durch markierungsspezifische AK bzw. Streptavidin (fest auf dem Dipstick gebunden) in Kombination mit einem Gold-markierten frei auf der Auftragsfläche lokalisierten anti-FITC-AK. Nachweisbanden (rötlich) entstehen, wenn die PCR-Fragmente einerseits den Gold-markierten anti-FITC-AK und andererseits durch die Biotin-Markierung (Fud7-Fragmente) das Streptavidin bzw. durch die Digoxigenin-Markierung (Transformanten-Fragmente) den anti-Dig.-AK binden. Ungebundene Goldpartikel strömen weiter bis zur Kontrolllinie, an der ein fixierter anti-Kaninchen-AK den Gold-beladenen anti-FITC-AK bindet und damit die fehlerfreie Funktion des Dipsticks anzeigt. (c) Nachweis-PCR an Proben mit unterschiedlicher Zusammensetzung aus Fud7- bzw. homoplasmischer Transformanten-DNA. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden 20  $\mu$ l der Proben über ein Agarosegel (1,5%) aufgetrennt (oben) und nur 2  $\mu$ l der Probe einer Dipstickanalyse unterzogen (unten). 1 (100% Fud7-DNA), 2 (95% Fud7+5% Trans.-DNA), 3 (80% Fud7+20% Trans.-DNA), 4 (66,6% Fud7+33,3% Trans.-DNA) 5 (50% Fud7+50% Trans.-DNA), 6 (33,3% Fud7+66,6% Trans.-DNA), 7 (20% Fud7+80% Trans.-DNA), 8 (5% Fud7+95% Trans.-DNA), 9 (100% Trans.-DNA), H<sub>2</sub>O (Negativkontrolle)

Erst die Verwendung eines Dipsticks (Milenia® HybriDetect 2T) ermöglicht die Detektion der unterschiedlich markierten Fragmente (Abb. 3.39b und c). Dabei ist die nur 5 Minuten dauernde Analyse ein beachtlicher Zeitgewinn gegenüber einer herkömmlichen gelelektrophoretischen Untersuchung, die ca. 45 min dauert. Der Test auf Homoplasmie kann nun innerhalb kürzester Zeit (ca. 1h, incl. PCR) durchgeführt werden und somit die Analyse der Transformanten enorm beschleunigen.

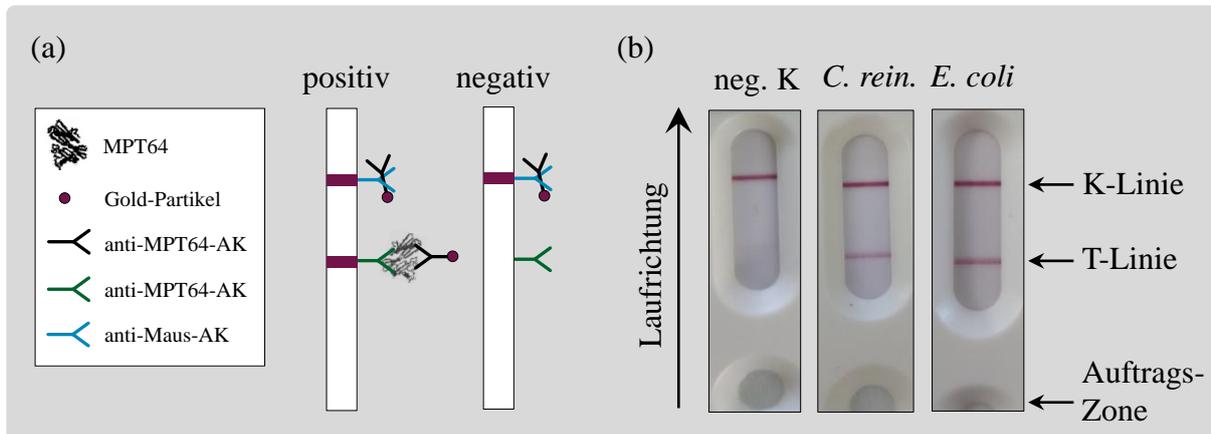
Der etablierte Schnelltest auf Homoplasmie ersetzt zwar nicht die genaue Untersuchung (Sequenzierung) des eingefügten Transgens, aber für eine potentiell routinemäßige Erstellung transgener Mutanten bietet dieser Schnelltest bei der Identifizierung homoplasmischer Transformanten zukünftig einen zeitlichen Vorteil gegenüber der bisher genutzten Southern Blot Methode.

### 3.6.2 Etablierung eines Schnelltests für MPT64

Mit Hilfe von MPT64-spezifischen Antikörpern (AK) sollte man in der Lage sein, das in *E. coli* bzw. *C. reinhardtii* exprimierte MPT64 unabhängig von zusätzlichen TAGs detektieren zu können. Ferner wäre sogar der Nachweis von nativem MPT64 aus Kulturüberständen von *M. tuberculosis* möglich, wodurch eine Tuberkuloseerkrankung detektierbar wäre. Ein solcher Nachweis kann über einen Lateralfluss-Immuno-Assay, der auch beim Schwangerschaftstest angewandt wird, erfolgen. Dafür werden zwei MPT64-spezifische AK, welche jedoch an unterschiedliche Bereiche des Proteins binden, benötigt. Mit dem 1. AK (*catcher*) kann das MPT64 gebunden und mit dem 2. AK (*detector*), welcher Gold-markiert ist, detektiert werden (Abb. 3.40a).

Die Herstellung von MPT64-spezifischen AK erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma Milenia Biotec GmbH. Dafür wurden Mäuse mit dem aus *E. coli* gereinigten MPT64 (MPT<sub>bak</sub>) immunisiert und im weiteren Verlauf die Seren der Tiere getestet (Daten nicht gezeigt). Tiere mit einem hohen AK-Titer konnten anschließend für die Herstellung monoklonaler AK verwendet werden. Die daraus hervorgegangenen AK wurden auf ihre entsprechende Spezifität gegenüber MPT64 untersucht. Die Ergebnisse wurden über Western Blot Analysen generiert, wobei Proteinfractionen von MPT64-exprimierenden *C. reinhardtii* und *E. coli* Stämmen verwendet wurden (Daten nicht gezeigt). Aus verschiedenen Kombinationen positiver AK konnten unterschiedliche Prototypen eines MPT64-Tests durch

die Milenia Biotec GmbH erzeugt und für den Nachweis von MPT64 in *C. reinhardtii* (16S/HMPT) bzw. *E. coli* genutzt werden. Das Ergebnis einer vielversprechenden AK-Kombination ist in der Abbildung 3.40b dargestellt. Mit diesem Schnelltest konnte MPT64 in der löslichen Gesamtzellproteinfraktion von MPT64-exprimierenden *C. reinhardtii*- und *E. coli*-Stämmen innerhalb kürzester Zeit (ca. 10 min) nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.40: MPT64-Schnelltest.** (a): Gezeigt wird die Funktion des Schnelltests bei Anwesenheit (positiv) bzw. Abwesenheit (negativ) von MPT64. Der Nachweis von MPT64 beruht auf der Bindung zweier MPT64-spezifischer Antikörper (AK). Das auf dem Teststreifen entlangströmende MPT64 wird einerseits durch den mobilen Gold-markierten AK und zusätzlich durch einen auf der (Test-) T-Linie fixierten AK gebunden und dadurch eine rötliche Linie (Positives Signal) erzeugt. Ungebundene Gold-markierte AK strömen weiter bis zur (Kontroll-) K-Linie, wo sie von einem dort fixierten dritten AK gebunden werden und ebenfalls eine rötliche Linie (Kontrollsignal) entstehen lassen. Damit wird die fehlerfreie Funktion des Tests angezeigt. (b): Funktionstest einer vielversprechenden AK-Kombination im vorgestellten Lateralfuss-Immuno-Verfahren. Analysiert wurden folgende Proben: (neg. K.) negativ Kontrolle = lösliche Proteinfraktion von *C. reinhardtii* und *E. coli* Wildtypen 1:1 gemischt; (*C. rein.*) lösliche Proteinfraktion vom *C. reinhardtii*-Stamm 16S/HMPT mit ca. 0,5ng MPT64; (*E. coli*) lösliche Proteinfraktion, *E. coli*-Medium mit ca. 0,5ng MPT64.

Der etablierte MPT64-Schnelltest steht nun für die medizinische Diagnostik, d.h. zur Detektion einer Tuberkuloseerkrankung zur Verfügung. Darüber hinaus ermöglicht der Test aber auch eine einfache Detektion MPT64-exprimierender Klone. Im Verlauf dieser Arbeit zeigte sich, dass das MPT64 ein ideales Reporterprotein für die heterologe Genexpression darstellt. Deshalb kann diese schnelle und effiziente Screening-Methode zukünftig für weitere Optimierungen der Fremdproteinexpression möglicherweise nicht nur im Chloroplasten von *C. reinhardtii* genutzt werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Transformations- und Klonierungsstrategie

Für die Fremdproteinexpression im Chloroplasten der Grünalge *C. reinhardtii* wurde ein Transformationssystem entwickelt, das die Insertion individuell entworfener Transgene in das Plastidengenom erlaubt und bei der Selektion auf den Einsatz von Antibiotika verzichtet (Abb. 3.5). Das System zur Erstellung transplastomischer Algenstämme basiert zum einen auf einem Vektor (pMM2) für die schnelle und „zielgenaue“ Aufnahme beliebig zusammengesetzter Transgene und zum anderen auf einem geeigneten Rezipientenstamm, der eine stabile Transgeninsertion und eine antibiotikafreie Selektion erlaubt.

Als Empfänger für eine derartige Transgeninsertion wurde der 1986 von Bennoun *et al.* [121] erzeugte Fud7-Stamm genutzt. Der nur heterotroph wachsende Algenstamm verfügt über eine 8225bp umfassende Deletion innerhalb der *inverted repeat* (IR)-Region des Chloroplastengenoms. Von der Deletion betroffen ist ein großer Teil des *psbA*-Gens (kodiert für das D1-Protein) und ca. 2700bp intergenische Plastomsequenzen im angrenzenden 3'-Bereich. Dieser Bereich zwischen dem *psbA*- und dem 5SrRNA-Gen besteht aus zahlreichen Sequenzwiederholungen [168,169] und enthält keinen putativen ORF [30], der durch eine Insertion zerstört werden könnte. Schon mehrfach wurde eine erfolgreiche Insertion funktioneller Transgene in dem auch als *silent site* bezeichneten Plastombereich gezeigt (Abb. 1.2) [54,170]. Ein weiterer Vorteil der IR-Region ist, dass dort befindliche Transgene in zwei Kopien pro Plastom vorkommen und in Folge dessen höhere Expressionen aufweisen als Transgene in einer *single copy*-Region [57].

Aufgrund des fehlenden D1-Proteins als essentielle Untereinheit von PSII ist der Fud7-Stamm nicht in der Lage, photoautotroph zu wachsen und deshalb auf Acetat als Kohlenstoffquelle angewiesen. Durch Transformation mit einem funktionellen *psbA*-Gen kann das partiell deletierte Gen jedoch komplementiert und die Fähigkeit zum photoautotrophen Wachstum wiederhergestellt werden [120,127]. Folglich wird eine einfache Selektion transformierter Zellen auf Minimalmedium (HS) im Licht möglich. Die Insertion der über die Partikelkanone eingebrachten DNA-Sequenzen beruht auf der für das Chloroplastengenom typischen homologen Rekombination mit den plastidären DNA-Regionen in entsprechenden Transformationsplasmiden. Für die Etablierung Fremdprotein-exprimierender Mutanten sollte das *psbA*-Gen zusammen mit einem Transgen in den deletierten Plastombereich der Fud7-

Mutante integrieren und damit eine antibiotikafreie Selektion ermöglichen. Im Gegensatz zur oft verwendeten Co-Transformation [56,61,62], bei der zwei Plasmide eingesetzt werden, würde dadurch die aufwendige Suche nach Mutanten entfallen, die neben dem Antibiotikaresistenzgen auch das Zielgen enthalten.

Zur Wiederherstellung der Wildtyp-Plastomsequenz im Fud7-Stamm werden neben den deletierten 8225bp zusätzlich flankierende Sequenzen für die homologe Rekombination benötigt. Das führt zu großen Transformationsplasmiden von mehr als 13kb [120], sodass weitere Insertionen nur schwer möglich sind. Mit Hilfe kleinerer Vektoren, denen z.B. homologe Sequenzen im 5'- oder im 3'-Bereich fehlen, kann das Fud7-Plastom zwar ebenfalls transformiert werden [57,127], doch werden so erfahrungsgemäß zusätzliche Plasmidsequenzen inseriert und Plastombereiche deletiert. Solche Transformanten besitzen dann heterogene Plastomkopien und neigen zu weiteren Mutationen. Deshalb wurde auf die Verwendung der homologen Bereiche hier nicht verzichtet und stattdessen auf ein um 5580bp verkleinertes intronloses *psbA*-Gen zurückgegriffen. Mutanten mit einem derart verkürzten, aber funktionstüchtigen *psbA*-Gen sind physiologisch mit dem Wildtyp vergleichbar [120,137]. Für die Transformation eines verkürzten *psbA*-Gens in das Plastom des Fud7-Stammes existierten bereits Plasmide (pSH6 und pSH4IL) mit individuellen Vor- und Nachteilen (siehe 3.1.2). Von diesen Plasmiden ausgehend konnte der ca. 9kb große Vektor pMM2 erstellt werden [122], (Abb. 3.3). Neben dem intronlosen *psbA*-Gen und den homologen Sequenzen für eine effiziente Komplementierung der Fud7-spezifischen Deletion verfügt dieser Vektor über eine spezielle MCS und gestattet so den gezielten Einbau von Transgenen. Die Besonderheit dieser MCS stellen zwei Erkennungssequenzen eines Typ II-Restriktionsenzym (BsaI) dar, die in entgegengesetzter Orientierung angeordnet sind. Im Gegensatz zu Standard-Restriktionsenzymen schneidet BsaI in einem definierten Abstand zur Erkennungssequenz [GGTCTC (1/5)] und erzeugt damit Überhänge (*sticky ends*), die innerhalb des *Golden Gate shuffling* Verfahrens [133,138] zur gezielten Kombination von Teilsequenzen zu einem kompletten Transgen genutzt werden können. Die einzelnen Fragmente für eine heterologe Expressionskassette können über eine PCR mit BsaI-Schnittstellen im 3'- und 5'- Bereich versehen und zusammen mit dem pMM2 innerhalb nur eines Reaktionsansatzes zu einem Transformationsplasmid fusioniert werden (Abb. 3.5). Im Gegensatz zur Verwendung von Standard-Restriktionsenzymen kann hierbei ausgeschlossen werden, dass unerwünschte DNA-Sequenzen als Klonierungsartefakte in Form von zusätzlich eingebrachten Schnittsequenzen im Transgen verbleiben. Speziell bei der Zusammensetzung

komplexer Konstrukte kann ein Einfluss solcher Sequenzrückstände auf die Expression nicht ausgeschlossen werden. Eine Limitierung der Methode besteht jedoch, wenn innerhalb der zu fusionierenden Fragmente selbst BsaI-Schnittstellen vorhanden sind. In dem Fall kann auf ein vergleichbares Enzym, wie z.B. BpiI, zurückgegriffen werden [138].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Kollektion von 34 PCR-Fragmenten (Tab. 7.1) erstellt und in Verbindung mit dem Vektor pMM2 für die Erzeugung von 24 individuellen Transformationsplasmiden (siehe Anhang B und I) genutzt. Innerhalb nur eines Reaktionsansatzes konnten bis zu 5 PCR-Fragmente zu einem Expressionskonstrukt zusammengesetzt werden (Tab. 3.2). Mit einer herkömmlichen Klonierungsmethode wären dafür 6 unterschiedliche Restriktionsenzyme notwendig gewesen, was für den Anwender einen hohen Aufwand in Planung und Durchführung (individueller Verdau, Reinigung und anschließende Ligation) bedeutet hätte [133]. Neben der Möglichkeit, schnell und effizient Transgen-tragende Plasmide zu erstellen, können aber auch einzelne oder mehrere Module (z.B. Promotor- oder UTR-Sequenzen) beliebig kombiniert und dadurch deren Einfluss auf die Expression untersucht werden. Zukünftig könnte die in dieser Arbeit begonnene Sammlung konstruktsspezifischer Fragmente sukzessiv erweitert und in Verbindung mit dem Vektor pMM2 für die gezielte Optimierung der heterologen Genexpression in Plastiden von *C. reinhardtii* genutzt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, das beschriebene System zur Etablierung transplastomischer Algenstämme bezüglich seiner Funktionalität und Eignung für die heterologe Proteinexpression zu untersuchen und Möglichkeiten zur Optimierung der Proteinausbeuten zu identifizieren. Um stets den Überblick zu behalten, nutzen Sie bitte die herausklappbare Gesamtschau der erzeugten Transgenkonstrukte aus Anhang I.

## 4.2 Expression von MPT64

MPT64 ist ein vom Erreger der Tuberkulose (TB) *Mycobacterium tuberculosis* sezerniertes 23kDa großes Protein mit einer stark immunogenen Wirkung [140]. Es wird teilweise schon zur Diagnose einer TB-Erkrankung herangezogen [139] und darüber hinaus als potentielles TB-Vakzin gehandelt [140]. Die genaue Funktion von MPT64 ist bislang aber noch ungeklärt.

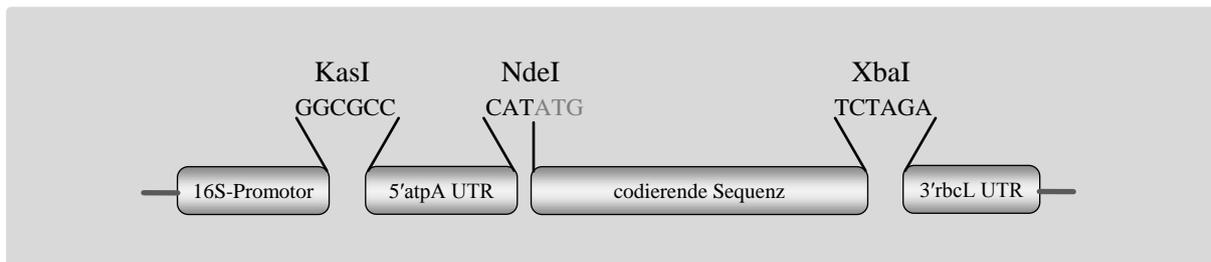
In Vorversuchen zeigte sich, dass MPT64 im Vergleich zum typischen Reporterprotein GFP deutlich besser im Chloroplasten exprimiert wird. Deshalb wurde es in dieser Arbeit als

Testprotein verwendet, um das Transformations- und Expressionssystem experimentell zu überprüfen und zu optimieren. Der semiautonome Chloroplast verfügt über eine eigene Translationsmaschinerie mit einer individuellen tRNA-Kollektion [30], die es erforderlich macht, die bakterielle Sequenz von MPT64 an den chloroplastidären Codongebrauch anzupassen und damit die inhibierende Wirkung von seltenen Codons auf die Expression des Fremdgens zu vermeiden [54,113]. Die Codon-optimierte Sequenz für das MPT64 einschließlich des Signalpeptids wurde zunächst für die Erstellung von Transgenen mit unterschiedlichen Promotor-UTR-Kombinationen verwendet.

*Welche Promotor-UTR-Kombinationen gewährleisten eine optimale plastidäre Expression von MPT64?*

Die plastidäre Genexpression unterliegt primär einer posttranskriptionellen Regulation [171]. Entscheidend für die Initiation der Translation sind strukturbildende Elemente der 5'-UTR und damit interagierende kernkodierte Proteine [172]. Darüber hinaus existieren weitere Rückkopplungsmechanismen, mRNA-Prozessierungen sowie Stabilisierungen, die spezifisch auf die Translation einwirken [105,173]. Diese komplexe Regulation plastidär kodierter Proteine ist für die Funktion des semiautonomen Organells essentiell. Für die Verwendung des Chloroplasten als Expressionsplattform bedeutet dies jedoch, geeignete Sequenzelemente (Promotor und UTR) zu finden, die eine stabile Transgenexpression gewährleisten. Aktuelle Versuche, heterologe Promotor- und UTR-Sequenzen des stark exprimierten *psbA*-Gens zu verwenden [141,174], führten nur zu schwachen bis nicht nachweisbaren Expressionen. Dagegen konnten erste Expressionssteigerungen durch die gezielte Modifizierung der *psaA* 5'-UTR erreicht werden [175]. Dennoch werden für die heterologe Proteinexpression in Plastiden von *C. reinhardtii* hauptsächlich endogene Promotor- / UTR-Kombinationen verwendet, die von Barnes *et al.* [52] und Rasala *et al.* [69] beschrieben wurden. Von diesen Kombinationen wurden für die vorliegende Arbeit vier ausgewählt (Abb. 3.7), die eine hohe plastidäre MPT64-Expression erwarten lassen. Durch den Einsatz der *Golden Gate shuffling*-Methode erfolgte im Vergleich zur bisher üblichen Klonierungsstrategie (Verwendung von Standard-Restriktionsenzymen) eine „rückstandsfreie“ Fusion von Promotor, 5'-UTR, kodierender Sequenz und 3'-UTR (Abb. 4.1). Dadurch liegen in den Transgenkonstrukten geringe Sequenzunterschiede im angrenzenden Bereich der kodierenden Sequenz vor, die Einfluss auf die Struktur der transgenen mRNA und somit auf deren Stabilität und Translationseffizienz nehmen könnten [176,177]. Die Ergebnisse der Mutantanalyse

zeigten jedoch, dass alle vier Transgenvarianten eine MPT64-Expression bewirkten (Abb. 3.10 und 3.11), die mit den heterolog von Barnes *et al.* [52] und Rasala *et al.* [69] exprimierten Proteinen vergleichbar sind. Inwiefern fehlende Klonierungsartefakte in den jeweiligen Transgenen Einfluss auf deren Expression haben, könnte zukünftig durch den Vergleich von Mutanten mit gleichartigen Transgenen jeweils mit und ohne Klonierungsartefakte geklärt werden.



**Abbildung 4.1: Transgenkonstrukt mit Klonierungsartefakten.** Dargestellt ist ein Transgen, das mit dem von Mutante 16S/HMPT vergleichbar ist. Von Rasala *et al.* [69] wurden für die Erstellung Standard-Restriktionsenzyme (KasI, NdeI und XbaI) verwendet. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erzeugten Konstrukten enthält dieses Klonierungsartefakte zwischen den fusionierten DNA-Fragmenten.

Die Mutante 16S/HMPT mit der Kombination aus 16S-Promotor, 5'atpA-UTR und 3'rbcl-UTR weist die stärkste MPT64-Expression auf. Gegenüber den anderen Mutanten (psbA/MPT, psbD/MPT und atpA/MPT) verfügt das exprimierte MPT64 aber über 10 zusätzliche Histidine am N-Terminus mit möglichen Konsequenzen für die akkumulierte Menge. In Plastiden höherer Pflanzen zeigte sich, dass die Sequenz *downstream* vom Start-Codon (ATG) die Translationseffizienz entscheidend beeinflusst [178]. Der Versuch, eine Mutante (16S/MPT) mit einem vergleichbaren Transgen ohne His-TAG zu erzeugen, blieb erfolglos (siehe 3.2.2). Unter den photoautotrophen Selektionsbedingungen wurden ausschließlich Transformanten erhalten, die das eingebrachte Transgen deletiert hatten. Es ist denkbar, dass eine verstärkte Expression von MPT64 ohne N-terminalen His-TAG zur deutlichen Reduktion der photosynthetischen Aktivität führt und dadurch ein selektiver Druck besteht das Transgen zu inaktivieren bzw. zu deletieren (siehe auch BKT-Expression, 3.5.4). Der genaue Grund für den misslungenen Versuch bleibt jedoch unklar und wird an anderer Stelle weiter diskutiert. Nichtsdestotrotz wird die plastidäre Expression eines MPT64-Proteins mit einem N-terminalen His-TAG besser toleriert als ohne His-TAG. Deshalb wurde das His-getaggte MPT64 (His-TAG/SP<sub>MPT</sub>/MPT64/HA-TAG) als Testprotein für die weitere Optimierung der heterologen Proteinexpression verwendet. Obwohl die plastidäre Proteinexpression in *C. reinhardtii* überwiegend unbeeinflusst von der jeweiligen Transkriptmenge ist [179], zeigten die Ergebnisse der Mutanten 16S/HMPT und atpA/MPT,

dass durch einen starken Promotor (16S) die Menge an mRNA erhöht und die Proteinexpression gesteigert wurde. In *E. coli* konnte eine weitere Zunahme der Transkript- und Proteinexpression durch die Verwendung von zwei hintereinander geschalteten Promotorsequenzen erzielt werden [143,144]. Dieser Arbeit analog wurde nach einem zweiten möglichst starken Promotor gesucht, der mit dem 16S Promoter kombiniert werden konnte. Von den besonders stark transkribierten plastidären rRNA-Genen ist bekannt, dass sie zusammen mit einzelnen tRNA-Genen als Operon vorliegen [180–182], d.h. vom starken 16S Promotor ausgehend wird ein polycistronischer RNA-*precursor* gebildet. Dieser *precursor* konnte in *C. reinhardtii* bisher aber nicht detektiert werden [183]. Für die Expression aller rRNA-Gene könnten deshalb zusätzlich zum 16S Promotor weitere Sequenzen mit einer starken Promotoraktivität vorhanden sein. Das größte über Northern Blot Analysen nachgewiesene primäre rRNA-Transkript besteht aus den rRNAs 7S, 3S und 23S [184]. Für dieses Transkript konnte mit Hilfe der BPROM-Software [145] im 5'-Bereich des 7S rRNA-Gens eine potentielle Promotersequenz detektiert werden. Dieser putative 7S Promotor wurde direkt vor (upstream) den 16S-Promotor des Transgens der Mutante 16S/HMPT platziert und mit dem entstandenen Konstrukt die Mutante 7S16S/HMPT erstellt (Abb. 3.14). Im Vergleich der Mutanten 16S/HMPT und 7S16S/HMPT konnte in der Mutante mit dem doppelten Promotor (7S/16S) eine deutliche Steigerung an Transkript und exprimiertem MPT64 detektiert werden (Abb. 3.15). Auf diese Weise wurde für die plastidäre Expression von Fremdproteinen ein 7S/16S Doppelpromotor gefunden, der in Chloroplasten möglicherweise den bisher stärksten Promotor darstellt. Hier muss aber noch geklärt werden, ob der 7S Promotor allein eine starke Fremdproteinexpression gewährleistet.

**Tabelle 4.1:** Auflistung der verwendeten Promotor- / UTR-Kombinationen mit den im Verhältnis zueinander erreichten MPT64-Expressionen und der jeweiligen Referenz.

Nr.	Promotor + 5'UTR / 3'UTR	MPT64-Expression*	Referenz
1	<i>psbA + psbA / psbA</i>	gering	[52]
2	<i>psbD + psbD / psbA</i>	mittel	[52]
3	<i>atpA + atpA / rbcL</i>	mittel	[52]
4	<i>16S + atpA / rbcL</i>	hoch	[69]
5	<i>7S/16S + atpA / rbcL</i>	sehr hoch	diese Arbeit

\*in photosynthetisch kompetenten Zellen und unter den in dieser Arbeit genutzten Standardbedingungen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten 5 verschiedene Kombinationen aus Promotor, 5'-UTR und 3'-UTR identifiziert werden (Tab. 4.1), mit deren Hilfe die einfache und schnelle Erstellung funktionaler Transgene ermöglicht (Abb. 3.5) und darüber hinaus unterschiedlich starke Expressionen erzielt wurden. Um zukünftig auch komplexe metabolische Prozesse im Chloroplasten zu manipulieren bzw. neue zu etablieren (*metabolic engineering*), wird es nötig sein, die Expressionsstärke für einzelne Proteine spezifisch anzupassen [185]. Eine Möglichkeit wäre die gezielte Beeinflussung der Translationsgeschwindigkeit über die mehr oder weniger gute Anpassung der kodierenden Sequenz an den plastidären Codongebrauch [113]. Einfacher hingegen ist die Verwendung unterschiedlicher Promotor- / UTR-Kombinationen, die eine individuelle Transgenexpression bewirken. Mit dem in dieser Arbeit etablierten Klonierungssystem ist es möglich, eine Vielzahl verschiedener Transgene mit zufälligen Kombinationen aus Promotor- und UTR-Sequenzen zu generieren und in das Plastom zu transformieren. In *E. coli* werden auf diese Weise bereits Klone mit einer spezifisch adaptierten Expression erstellt [185].

#### *Wie leistungsstark ist das plastidäre Expressionssystem?*

Mit dem Gebrauch eines heterologen Expressionssystems wird generell das Ziel verfolgt, möglichst viel Fremdprotein zu exprimieren und dieses anzureichern. Um die in dieser Arbeit erreichte MPT64-Akkumulation mit anderen plastidären Fremdproteinexpressionen vergleichen zu können, wurde die Mutante 16S/HMPT näher untersucht. Andere Mutanten, die eine noch stärkere Anreicherung von MPT64 aufweisen (z.B. Mutante 7S16S/HMPT), standen erst am Ende dieser Arbeit zur Verfügung.

In Plastiden höherer Pflanzen konnten bereits Fremdproteinakkumulationen von bis zu 70% der löslichen Proteinfraction (TSP, *total soluble protein*) erzielt werden [186,187]. Im Gegensatz dazu wurde im Chloroplasten von *C. reinhardtii* eine Expression von Fremdprotein bis maximal 21% der TSP detektiert [66]. Eine so hohe Fremdproteinmenge konnte bislang aber nur in photosynthetisch inaktiven Algenzellen erzielt werden. Gegenüber anderen Expressionssystemen, wie z.B. Bakterien oder Hefen, geht dadurch jedoch der entscheidende Vorteil des pflanzlichen Systems verloren, die frei verfügbare und somit billige Kohlenstoffquelle CO<sub>2</sub> nutzen zu können. Aus ökonomischer Sicht ist deshalb das Bestreben groß, neben einer möglichst hohen Fremdproteinexpression die photosynthetische Aktivität der transgenen Algenstämme zu erhalten [65,69,95]. In photosynthetisch aktiven Algenzellen konnten Fremdproteinakkumulationen zwischen 0,1 bis 3% [25,61], in einem Fall sogar bis

ca. 5% [65], der TSP-Fraktion erreicht werden. Alle transgenen Algenstämme dieser Arbeit wurden auf Minimalmedium (HS) selektiert und sind demnach in der Lage photoautotroph zu wachsen. Zur Bestimmung der MPT64-Menge wurde die Mutante 16S/HMPT einer quantitativen Western Blot Analyse unterzogen (siehe 3.3.2) und eine Akkumulation von ca. 8% ( $\pm 2$ ) MPT64 in der TSP-Fraktion ermittelt. Die Mutante 16S/HMPT verfügt demnach über die stärkste bisher nachgewiesene plastidäre Fremdproteinakkumulation einer photosynthetisch aktiven *C. reinhardtii*-Mutante. Eine noch stärkere MPT64-Expression weisen die Mutanten 7S16S/HMPT und SP3/MPT auf. Allerdings steht bei diesen Mutanten die quantitative Analyse noch aus.

*Welche Bedeutung hat das bakterielle MPT64-spezifische Signalpeptid für die Fremdproteinakkumulation im Chloroplasten?*

Im gram-positiven *Mycobacterium tuberculosis* wird der MPT64-Vorläufer exprimiert und aufgrund des N-terminalen Signalpeptids sekretiert. Im Verlauf des Transportprozesses über die Cytoplasmamembran trennen Peptidasen das Signalpeptid vom Vorläuferprotein ab und das reife MPT64 gelangt ins umgebende Medium. Das komplexe sekretorische System in *M. tuberculosis* verfügt über vielfältige Transportwege [188,189]. Diese sind zum Teil nicht nur in anderen Bakterien sondern auch in Archaeen und den Chloroplasten der Pflanzen verbreitet. Da Plastiden aus endosymbiotischen Cyanobakterien entstanden sind [34], entspricht die Thylakoidmembran aus phylogenetischer Sicht der bakteriellen Cytoplasmamembran und verfügt über ein ursprünglich bakterielles Sekretionssystem für den Proteintransport ins Thylakoidlumen. Der Transfer löslicher Proteine erfolgt maßgeblich über den Sec- oder den Tat-abhängigen Transportweg [37].

Für die Quantifizierung des im Chloroplasten der 16S/HMPT-Mutante akkumulierten MPT64 wurde ein nahezu identisches (siehe Abb. 3.16), zuvor in *E. coli* exprimiertes und über den N-terminalen His-TAG aufgereinigtes MPT64 (MPT<sub>bak</sub>) verwendet. In der quantitativen Western Blot Analyse (Abb. 3.19b) fiel jedoch ein deutlicher Größenunterschied zwischen dem ca. 27kDa großen MPT<sub>bak</sub> und dem mit ca. 23kDa deutlich kleineren plastidären MPT64 auf. Der Nachweis erfolgte über den C-terminalen HA-Tag, deshalb fand offensichtlich eine Prozessierung im N-terminalen Bereich statt. Der dort positionierte Histidin-Tag konnte nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.20), so dass vermutet werden kann, dass das bakterielle Signalpeptid zusammen mit dem N-terminalen His-Tag den Transport über die Thylakoidmembran vermittelt und vom MPT64 abgespalten wurde, d.h. im Thylakoidlumen

akkumuliert nur das reife ca. 23kDa große MPT64. Die Untersuchung des MPT64 exprimierenden *E. coli* Klons unterstützt diese Annahme. Dort konnte neben dem 27kDa auch ein ca. 23kDa großes MPT64-spezifisches Protein detektiert (Abb. 3.18b) und eine Sekretion des prozessierten MPT64 ins umgebende Medium festgestellt werden (Abb. 3.18a). In *M. smegmatis*, einem nicht pathogenen Mykobakterium, führte die heterologe Expression des nativen MPT64-Vorläuferproteins ebenfalls zur extrazellulären Anreicherung von reifem MPT64 [190]. Demnach könnte ein auch in Plastiden vorhandenes System für den Transport von MPT64 in das Thylakoidlumen verantwortlich sein. Ohne den bisher ungeklärten Transportweg von MPT64 näher zu untersuchen, sollte aber geklärt werden, ob das mykobakterienspezifische Signalpeptid einen Transport von MPT64 ins Thylakoidlumen bewirkt und welche Konsequenzen sich daraus für die Fremdproteinakkumulation ergeben. In Plastiden von Tabak führte die heterologe Expression des bakteriellen Vorläuferproteins OspA (*outer surface protein A*) aus *Borrelia burgdorferi* zur Anreicherung großer Mengen (10% der TSP-Fraktion) von reifem OspA im Thylakoidlumen [41]. Für die ursprünglich im Periplasma von *E. coli* lokalisierte alkalische Phosphatase konnte ebenfalls nach Expression des bakteriellen Vorläufers ein Transport über die Thylakoidmembran ins Lumen festgestellt werden [40]. Diese Beispiele zeigen, dass bakterielle Signalpeptide aufgrund phylogenetisch verwandter Transportsysteme in Bakterien und Plastiden durchaus den Transport über die Thylakoidmembran vermitteln können. Umgekehrt sind auch pflanzliche Thylakoid-Signalpeptide dazu im Stande, die Sekretion von Proteinen über die bakterielle Cytoplasmamembran zu ermöglichen [42].

Um Nachweise für einen MPT64-Transport ins Thylakoidlumen zu erbringen, wurde erfolglos versucht, das in Mutante 16S/HMPT akkumulierte MPT64 mit Hilfe eines anti-HA-Antikörpers über den C-terminalen HA-TAG aufzureinigen (Daten nicht gezeigt). Über eine anschließende N-terminale Sequenzierung (Edman-Abbau) wäre die genaue Schnittstelle des prozessierten MPT64 identifizierbar und ein unspezifischer Abbau hätte weitestgehend ausgeschlossen werden können. Ferner konnten keine sauberen Fraktionen der stromalen und der luminalen Proteine präpariert werden (Daten nicht gezeigt), die eine Lokalisierung des prozessierten MPT64 ermöglicht hätten. Um dennoch Antworten auf die nachfolgende Frage zu erhalten, wurden weitere MPT64-exprimierende Mutanten mit einer gezielt stromalen sowie luminalen Akkumulation erstellt.

*Ist der Transport von MPT64 in das Thylakoidlumen möglicherweise vorteilhafter für dessen Anreicherung als der Verbleib im Stroma?*

Bislang wurde meist das Stroma für die Anreicherung plastidär exprimierter Fremdproteine genutzt. Doch das Thylakoidlumen und eventuell auch der Intramembranraum zwischen der inneren und der äußeren Envelope-Membran [191] stellen mögliche Alternativen für die Lokalisation von Fremdproteinen dar. Die unterschiedlichen intraplastidären Kompartimente verfügen jeweils über ein spezifisches Milieu mit eigenem Proteom, das unter anderem charakteristische Enzyme für die Faltung, Modifikation und den Abbau von Proteinen enthält [192–194]. Daraus ergeben sich individuelle Einflüsse auf Aktivität und Stabilität der Fremdproteine und somit auf deren Akkumulationslevel [195]. Untersuchungen zur gezielten Lokalisation von Fremdproteinen im Thylakoidlumen sind rar und beschränken sich auf Plastiden höherer Pflanzen. So konnte gezeigt werden, dass die Translokation des Protease-Inhibitors Aprotinin ins Thylakoidlumen zur Akkumulation des aktiven Enzyms führte [46]. Voraussetzung dafür waren die korrekte N-terminale Prozessierung und die Bildung spezifischer Disulfidbindungen. Zusätzlich konnte durch die Verwendung verschiedener Signalpeptide, die entweder den Sec- oder aber den Tat-spezifischen Transport vermittelten, die Anreicherung unterschiedlicher Mengen an Aprotinin festgestellt werden.

Um den Effekt des Akkumulationsortes (Stroma oder Lumen) auf die Anreicherung von MPT64 zu untersuchen, wurden Mutanten erzeugt, die das MPT64 ohne Signalpeptid (K/MPT) bzw. mit *C. reinhardtii*-spezifischen Signalpeptiden (SP1MPT und SP3MPT) exprimieren (Abb. 3.21). Die Transgene dieser Mutanten verfügen über die identische Promoter-/ UTR-Kombination der Mutante 16S/HMPT und können deshalb untereinander verglichen werden. In der Northern Blot Analyse (Abb. 3.23) wurde bei den drei Mutanten vergleichbare Mengen MPT64-spezifischer Transkripte detektiert. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse (Abb. 3.24) zeigten, dass alle Mutanten MPT64 exprimieren und in gleicher Größe (ca. 23kDa) akkumulieren. Das heißt, in den Mutanten SP1MPT und SP3MPT wurde, vergleichbar mit Mutante 16S/HMPT, der MPT64-Vorläufer wahrscheinlich ins Thylakoidlumen transferiert und anschließend prozessiert. Die intraplastidäre Lokalisation von MPT64 konnte über Immunogold-Markierungen und elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden (Abb. 3.26). Abhängig vom Akkumulationsort traten aber deutliche Unterschiede in der Menge an MPT64 auf. Demnach wurde von Mutante K/MPT (ohne Signalpeptid) weniger MPT64 im Stroma angereichert als im Lumen der Mutanten

16S/HMPT und SP3MPT. Möglicherweise wird die MPT64-Akkumulation in beiden Kompartimenten durch die spezifische Ausstattung an proteolytischen Enzymen unterschiedlich stark beeinflusst. Über einen *in vivo*-Stabilitätstest (Abb. 3.27) konnte diese Vermutung bekräftigt werden. Demzufolge unterliegt das stromal lokalisierte MPT64 (K/MPT) einem stärkeren Abbau als das lumenal lokalisierte MPT64 (SP3MPT). Ähnliche Ergebnisse lieferte die heterologe Expression der alkalischen Phosphatase in Plastiden von Tabak [40]. Gegenüber dem Stroma konnte im Thylakoidlumen eine größere Menge des Enzyms mit einer deutlich besseren Aktivität angereichert werden. Ein entscheidender Faktor für die Stabilität eines Proteins ist dessen N-Terminus [196–198], der durch eine Vielzahl von möglichen Modifikationen wie z.B. Abspaltung des N-terminalen Methionins oder einer Acetylierung auch eine regulatorische Bedeutung hat [199,200]. In Arabidopsis Plastiden wurden am N-Terminus von stromalen Proteinen neben dem Start-Methionin hauptsächlich kleine, unpolare Aminosäuren (Ala, Val, Ser und Thr) detektiert. Luminale Proteine dagegen wiesen einen weit variableren N-Terminus auf [201]. Für Fremdproteine, die über einen im Stroma ungünstigen N-Terminus verfügen, könnte daher eine stabilere Akkumulation im Thylakoid-Lumen erzielt werden. Das MPT64 der Mutante K/MPT mit den N-terminalen Aminosäuren Met und Ala (1. und 2. Position) ist jedoch kein Beispiel dafür. Nach Rowland *et al.* [201] ist bei diesem N-Terminus auch im Stroma mit einer stabilen Akkumulation zu rechnen. Dessen ungeachtet könnte der Transport von Fremdproteinen ins Thylakoidlumen aber auch den Einfluss von möglichen Produkt-Rückkopplungsmechanismen auf die im Stroma stattfindende Expression minimieren und damit indirekt die Proteinakkumulation im Lumen begünstigen. Bei der heterologen Expression von Phaseolin in Plastiden von Tabak wurde ein derartiger, vom rekombinanten Protein selbst ausgehender, negativer Rückkopplungseffekt beschrieben [202]

*Welche Bedeutung haben Transportweg und Signalpeptid für die Anreicherung von MPT64 im Thylakoidlumen?*

Die Analyse der Signalpeptid-Mutanten (Abb. 3.24) zeigte, dass auch der Transportweg bzw. das entsprechende Signalpeptid Einfluss auf die MPT64-Akkumulation im Thylakoidlumen nehmen. So konnten nur geringe Mengen MPT64 in Mutante SP1MPT mit dem Sec-spezifischen SP vom OEE1 detektiert werden. Im Gegensatz dazu führte das Tat-spezifische SP vom OEE3 in Mutante SP3MPT zu einer noch stärkeren MPT64-Akkumulation als in Mutante 16S/HMPT mit dem Histidin getaggten bakteriellen SP. Aufgrund des fehlenden

doppelten Arginin-Motivs im originalen SP von MPT64 wird hier ein Sec-spezifischer Transport angenommen. Demnach könnten beide Transportwege für die Translokation von MPT64 ins Thylakoidlumen geeignet sein. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass das MPT64 abhängig vom jeweiligen Transportweg unterschiedlich effizient transportiert wird und dadurch verschieden stark akkumuliert. Darüber hinaus ist eine vom Transportweg abhängige Modifikation des transferierten Proteins möglich, die dessen Stabilität beeinflussen kann. In Plastiden von Tabak wurde die Oxidation eines spezifischen Methionin-Rests von Aprotinin, das über den Tat-Weg ins Thylakoidlumen transportiert wurde, festgestellt [46]. Beim Transport über den Sec-Weg blieb die entsprechende Oxidation dagegen aus und resultierte in einer verstärkten Anreicherung von Aprotinin.

Abgesehen vom Transportweg ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auch das SP selbst für eine unterschiedliche MPT64-Akkumulation in den einzelnen Mutanten verantwortlich. Die Kombination aus einem *C. reinhardtii*-spezifischen SP und einem Fremdprotein bildet ein unnatürliches chimäres Protein, das im Stroma einem mehr oder weniger starken Abbau unterliegt und zusätzlich mit einer individuellen Effizienz über die Thylakoidmembran transportiert wird. Das chimäre 16/23-Protein ist ein Beispiel für ein nur sehr verzögert transportiertes Substrat [203]. Es weist auf eine funktionale Co-Evolution der natürlichen Vorläuferteile (SP und reifes Protein) hin. Das heißt, ein natürliches SP ist an das zu transportierende Protein angepasst und gewährleistet dessen Transport optimal. Möglicherweise ist das ebenso für das natürliche SP von MPT64 im Chloroplasten von *C. reinhardtii* zutreffend. In den Mutanten mit einer relativ schwachen MPT64-Expression (psbA/MPT, psbD/MPT und atpA/MPT) führte das unveränderte SP (ohne His-TAG) zur Anreicherung von reifem (prozessiertem) MPT64. Dagegen misslang der Versuch, Mutante 16S/MPT (ohne His-TAG) mit einer potentiell gesteigerten Expression des MPT64-Vorläuferproteins zu erstellen (siehe 3.2.2). Es ist denkbar, dass aufgrund des natürlichen SP ein sehr effizienter Transport über die Thylakoidmembran erfolgte und zu einer hohen MPT64-Akkumulation im Lumen führte, die die photosynthetische Aktivität der Transformanten allerdings soweit herabsetzte, dass keine Selektion auf photoautotrophes Wachstum mehr möglich war.

*Welchen Einfluss haben Lokalisation und Menge von heterolog exprimiertem MPT64 auf das photoautotrophe Algenwachstum?*

Durch die plastidäre Expression von MPT64 wurde das photoautotrophe Wachstum der Mutanten unterschiedlich stark reduziert (vgl. Tabelle 4.2). Die Ergebnisse zeigten, dass neben der Menge an MPT64 und dessen Lokalisation auch das entsprechende Signalpeptid bzw. der Transportweg Einfluss nehmen.

**Tabelle 4.2:** Zusammenfassende Charakterisierung der MPT64-Mutanten. Angegeben sind die Lokalisation (einschließlich Signalpeptid und Transportweg) und die Akkumulation von MPT64 sowie der Einfluss auf das photoautotrophe Wachstum.

Mutante	Signalpeptid (SP)/ Transportweg	MPT64- Lokalisation	MPT64- Akkumulation	Wachstumsrate***
psbA/MPT	SP <sub>MPT64</sub> / Sec*	Lumen*	sehr niedrig	87%
psbD/MPT	SP <sub>MPT64</sub> / Sec*	Lumen*	mittel	84%
16S/HMPT	His+SP <sub>MPT64</sub> / Sec*	Lumen	hoch	82%
SP1MPT	SP <sub>OEE1</sub> / Sec	Lumen	niedrig	79%
atpA/MPT	SP <sub>MPT64</sub> / Sec*	Lumen*	mittel	75%
K/MPT	ohne SP	Stroma	mittel	60%
SP3MPT	SP <sub>OEE3</sub> / Tat	Lumen	sehr hoch	61%
7S16S/HMPT	His+SP <sub>MPT64</sub> / Sec*	Lumen*	sehr hoch	53%
16S/MPT**	SP <sub>MPT64</sub> / Sec*	Lumen*	-	-

\*vermuteter Transportweg bzw. Lokalisation; \*\*Mutante konnte über photoautotrophe Selektion nicht generiert werden; \*\*\*prozentuale Wachstumsrate im Vergleich zum Kontrollstamm MCS (=100%)

Die Mutanten K/MPT, psbD/MPT und atpA/MPT akkumulieren vergleichbare Mengen an MPT64 innerhalb zweier verschiedener plastidärer Kompartimente. Dabei verursacht die stromale MPT64-Lokalisation (K/MPT) gegenüber der luminalen (psbD/MPT und atpA/MPT) eine stärkere Reduktion des photoautotrophen Wachstums. Ausschließlich Mutanten mit einer deutlich höheren luminalen Anreicherung von MPT64 (SP3MPT und 7S16S/HMPT) weisen ein vergleichbar geringes Wachstum auf. Im Gegensatz zum Stroma verfügt das Thylakoidlumen über ein reduziertes Proteom [204] und ist frei von vielen im Stroma vorkommenden sensitiven Zellkomponenten, wie z.B. DNA, RNA und Proteine, die an der Transkription und Translation beteiligt sind. Möglicherweise kann in photosynthetisch kompetenten Algenzellen deshalb mehr MPT64 im Thylakoidlumen als im Stroma angereichert werden. Allerdings zeigen die geringen Wachstumsraten der Mutanten SP3MPT und 7S16S/HMPT, dass auch im Thylakoidlumen keine unbegrenzte Akkumulation von

Fremdproteinen möglich ist, ohne die Funktion des Chloroplasten zu stören. Demnach könnte der misslungene Versuch, die Mutante 16S/MPT zu erstellen, auf eine sehr hohe luminale MPT64-Akkumulation zurückzuführen sein (siehe 3.2.2). Um diesen Sachverhalt zu klären, wäre es möglich, diese Mutante über eine nicht auf photoautotrophes Wachstum beruhende Methode (z.B. über Antibiotika) zu selektieren und anschließend zu untersuchen. Die zusätzliche Expression eines Antibiotikaresistenzgens stellt jedoch eine weitere Belastung des plastidären Stoffwechsels dar und würde das photoautotrophe Wachstum der Mutanten weiter minimieren. Für das sehr häufig verwendete Resistenzgen *aadA* konnte gezeigt werden, dass dessen alleinige Expression zu einer ca. 20 %igen Wachstumsreduktion führte [113]. Mit einem hohen Aufwand ist es jedoch möglich eingebrachte Markergene auch wieder zu entfernen [101,102].

Neben der Proteinmenge könnte auch der verstärkte Transfer von Fremdprotein über die Thylakoidmembran zu einem verzögerten Transport natürlicher Substrate und dadurch ebenfalls zur Beeinträchtigung der photosynthetischen Aktivität führen. Besonders deutlich müsste sich dieser Effekt bei einem verzögert transportierten Vorläuferprotein bemerkbar machen. Ein mögliches Beispiel könnte die Mutante SP1MPT darstellen. Gegenüber der Mutante 16S/HMPT reichert diese Mutante nur geringe Mengen prozessiertes MPT64 an, verfügt aber dennoch über eine vergleichbar reduzierte Wachstumsrate. Inwiefern jedoch überhaupt ein verzögerter Transport vorliegt, müsste zukünftig erst noch geklärt werden.

Mit Hilfe des bakteriellen Proteins MPT64 konnte das unter 3.1 beschriebene Transformations- und Expressionssystem experimentell untersucht und optimiert werden. Doch erst durch die Expression unterschiedlicher Transgene können spezifische Stärken aber auch Schwächen des Systems aufgedeckt und die daraus gewonnenen Kenntnisse für die zukünftige Fremdproteinexpression im Chloroplasten von *C. reinhardtii* genutzt werden.

### **4.3 Expression von eGFP, PF4, PCS und BKT**

#### *Expression von eGFP*

Das Reporterprotein GFP wurde in *C. reinhardtii* schon vielfach zur Untersuchung der heterologen Genexpression genutzt [205–208]. Ferner existieren verschiedene Codon-optimierte Gensequenzen, die eine verstärkte GFP-Expression entweder vom Kerngenom [209] oder vom Plastidengenom [54] gewährleisten. Auch in der AG Johanningmeier wurde

ein Codon-adaptiertes *gfp*-Gen zur heterologen Expression im Chloroplasten eingesetzt [174,210]. Trotz deutlicher GFP-Akkumulationen konnten *in vivo* aber nur schwache Fluoreszenzsignale detektiert werden. Um zukünftig bessere Lokalisationsstudien durchführen zu können, wurde eine Gensequenz erzeugt (siehe Anhang C), die die Expression einer *enhanced* GFP-Variante (eGFP) mit einer gesteigerten Sensitivität (höhere Extinktion), Lichtstabilität und Faltungskinetik erlaubt [211]. In Mitochondrien von *C. reinhardtii* konnte bereits die erfolgreiche Expression eines heterologen *egfp*-Gens gezeigt werden [212].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mutanten mit einer plastidären eGFP-Expression erzeugt, die sowohl über eine stromale (K/GFP) als auch über eine luminale eGFP-Lokalisation (HSP<sub>M</sub>GFP, SP1GFP und SP3GFP) verfügen sollten. Für den Transfer über die Thylakoidmembran kamen die bereits für die MPT64-Expression verwendeten Signalpeptide zum Einsatz. Dadurch wurde ein Vergleich zwischen eGFP- und MPT64-Expression ermöglicht. Die grundlegende Charakterisierung der eGFP-Mutanten (Sequenzierung, Southern-, Northern- und Western-Analyse) erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Frau Kathrin Pohle [157]. Im Gegensatz zum herkömmlich verwendeten GFP konnte dabei das plastidär exprimierte eGFP *in vivo* eindeutig über dessen Fluoreszenz nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass trotz gleicher Promotor- und UTR-Sequenzen in den Mutanten unterschiedliche eGFP-Mengen akkumulierten. Durch das Tat-spezifische SP der Mutante SP3GFP erfolgt offenbar ein effizienter Transport von eGFP in das Thylakoidlumen. Das dort prozessierte eGFP wurde in vergleichbaren Mengen wie in Mutante K/GFP mit der stromalen eGFP-Lokalisation angereichert. Es ist bekannt, dass zelluläre Prozesse von der GFP-Expression relativ unbeeinflusst bleiben und GFP aufgrund der Struktur stabil gegenüber proteolytischen Prozessen ist [213]. Im Gegensatz zum MPT64 könnte deshalb das Stroma als auch das Lumen für die eGFP-Akkumulation gleichermaßen geeignet sein. Allerdings ist die luminale Translokation von eGFP infolge der schnellen autokatalytischen Faltung [214] nur eingeschränkt möglich. Studien von Marques *et al.* zeigten sowohl *in vitro* an isolierten Chloroplasten [215] als auch *in vivo* in *A. thaliana* [152], dass eGFP ausschließlich durch Tat-spezifische SP, jedoch nicht durch SP des Sec-Typs in das Thylakoidlumen transportiert wurde. Diese Ergebnisse konnten durch die *C. reinhardtii* Mutanten SP1GFP und SP3GFP bestätigt werden. So führte die plastidäre Expression des eGFP-Vorläufers mit dem Tat-spezifischen SP (SP3, Mutante SP3GFP) zur deutlichen Akkumulation von reifem eGFP mit einer vermutlich luminalen Lokalisation. In Mutante SP1GFP mit dem Sec-spezifischen SP konnten dagegen nur geringe Mengen des nicht prozessierten Vorläufers detektiert werden.

Die fehlende Prozessierung deutet dabei auf einen Verbleib im Stroma hin. Überraschend war dagegen, dass in Mutante HSP<sub>M</sub>GFP prozessiertes eGFP detektiert wurde (Abb. 3.29b) und deshalb von einem Thylakoid-Import des sich spontan faltenden Proteins ausgegangen werden kann. Allerdings wurde angenommen, dass das bakterielle SP (HSP<sub>MPT64</sub>, siehe Anhang D) aufgrund des fehlenden Arginin-Motivs (RR) den Transport über den Sec-Weg vermittelt und somit keinen eGFP-Transfer gewährleisten sollte. Ungeachtet vom Transportweg wurden aber nur geringe Mengen an prozessiertem eGFP akkumuliert. Die geringen Mengen an eGFP-Vorläufer (Mutante SP1GFP) und prozessiertem eGFP (Mutante HSP<sub>M</sub>GFP) sind möglicherweise auf einen ausbleibenden bzw. verzögerten Transport zurückzuführen. Dies könnte Rückkopplungsmechanismen zur Folge haben, die inhibierend auf die Translation wirken oder aber einen verstärkten Abbau des eGFP-Vorläufers auslösen.

#### *Expression von PF4*

Der humane Plättchenfaktor (PF4) ist ein wirtschaftlich interessantes Protein, das zum Nachweis der Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) verwendet wird [161]. Mit der plastidären Expression des humanen Plättchenfaktors 4 (PF4) sollten sowohl das in dieser Arbeit beschriebene Transformations- und Expressionssystem als auch die Auswirkungen der spezifischen Lokalisation (Stroma oder Lumen) auf die akkumulierte PF4-Menge untersucht werden. Analog zur MPT64-Expression wurde PF4 zusätzlich in *E. coli* exprimiert, um Vergleiche zwischen dem prokaryotischen und dem plastidären System anstellen zu können.

Die PF4-spezifische cDNA wurde an den plastidären Codongebrauch angepasst und für die Erstellung von sechs verschiedenen Transgenen verwendet (Abb. 3.31). Diese konnten stabil und fehlerfrei in das Plastom der Fud7-Mutante transformiert werden. Allerdings wurde in keiner der Mutanten das PF4 (Abb. 3.32) oder ein PF4-spezifisches Transkript detektiert. Die ausbleibende mRNA-Akkumulation verwunderte, weil alle PF4-spezifischen Transgene über Promotor- und UTR-Sequenzen verfügen, die bereits die Expression von MPT64 (siehe 3.2.1) gewährleisten. Die Transkriptstabilität wird maßgeblich durch die im 5'- und 3'-Bereich lokalisierten UTR-Sequenzen bestimmt [106]. Allerdings zeigten Expressionsstudien an 154 unterschiedlichen Codon-Varianten des *GFP*-Gens deutliche Unterschiede in Struktur, Menge und Abbauverhalten der jeweiligen Transkripte [216]. Demnach könnte auch hier die PF4-kodierende Sequenz für eine Destabilisierung der Transkripte und somit für die ausbleibende PF4-Expression verantwortlich sein. In *E. coli* wiederum ist es mit einer an den bakteriellen Codongebrauch angepassten ecPF4-Sequenz gelungen PF4 zu exprimieren (Abb. 3.30), d.h.

die ecPF4-Sequenz ist im bakteriellen Hintergrund funktionell. Um einen weiteren Versuch zur PF4-Expression im Chloroplasten zu unternehmen, wurde aus zeitlichen Gründen die zur Verfügung stehende ecPF4-Sequenz verwendet. Obwohl diese nicht an den Codongebrauch des Chloroplasten angepasst ist (siehe Anhang C), befinden sich darin aber auch keine sehr selten im Chloroplasten genutzten Codons wie z.B. CGG (R) oder AGG (R), die die Translation stark verzögern oder sogar zu deren Abbruch führen können [113]. Schließlich konnte mit der ecPF4-Sequenz das PF4 im Chloroplasten exprimiert werden (Abb. 3.33). Vorerst wurde das PF4 aber nur in der Mutante SP3ecPF4 mit einer potentiell luminalen Akkumulation nachgewiesen. Vergleichbar mit der Expression von MPT64 deutet dieses vorläufige Ergebnis auf eine bevorzugte PF4-Anreicherung im Thylakoid-Lumen, vermittelt durch das SP vom OEE3, hin. Außerdem wird deutlich, dass bei der rekombinanten Proteinexpression nicht allein auf nur eine Codon-adaptierte Sequenz gesetzt werden sollte. Deshalb könnte mit weiteren, aber an den plastidären Codongebrauch angepassten, PF4-Sequenzen eine Optimierung der PF4-Expression im Chloroplasten unternommen werden. Zusätzlich zur Variation der Codon-optimierten Sequenz bestehen noch andere Möglichkeiten, die Stabilität einer transgenen mRNA zu steigern und dadurch die Fremdproteinexpression zu erhöhen. Im Kerngenom führte die Insertion eines Introns zu einer gesteigerten mRNA-Akkumulation gegenüber dem gleichen aber intronlosen Gen [217,218]. Eine Erhöhung der Transkriptstabilität konnte ebenfalls durch die Fusion mit der kodierenden Sequenz des stark transkribierten *rbcL*-Gens erreicht werden [58].

### *Expression der PCS*

Die Grünalge *C. reinhardtii* stellt einen leistungsfähigen Modellorganismus dar, der u.a. auch zur Untersuchung von Schwermetallstress geeignet ist [219,220]. Das Wachstum, die photosynthetische Aktivität und der Chlorophyllgehalt der Grünalge werden durch Schwermetalle wie z.B. Cadmium, Zink und Kupfer, beeinflusst. In Pflanzen erfolgt die intrazelluläre Detoxifikation von Schwermetallen durch cysteinhaltige Peptide, dazu gehören genkodierte Metallothioneine (MT) [221] und enzymatisch generierte Phytochelatine (PC) [222]. In *Arabidopsis thaliana* [223], *Oryza sativa* [224,225] und *Nicotiana tabacum* [226] konnte durch die Überexpression der Phytochelatin-Synthase (PCS) die PC-Konzentration im Cytosol der Pflanzen deutlich gesteigert und dadurch die Toleranz gegenüber bestimmten Schwermetallen erhöht werden. Entgegengesetzt dazu wurde bei *A. thaliana* aber auch eine Hypersensitivität gegenüber Cadmium festgestellt [223]. *C. reinhardtii* reagiert auf

Schwermetalle wie Cadmium ebenfalls mit der Produktion von PC [162], die im Cytosol von der dort lokalisierten CrPCS gebildet werden. Die entstehenden PC-Cd-Komplexe werden bei höheren Pflanzen anschließend in die Vakuole transportiert [227]. Bei *C. reinhardtii* [228] und *E. gracilis* [229] wurde der überwiegende Teil dieser Schwermetallkomplexe jedoch in den Chloroplasten nachgewiesen. Neben der Vakuole könnte in pflanzlichen Organismen demnach der Chloroplast ein weiterer wichtiger Akkumulationsort für Schwermetalle sein.

Im Gegensatz zum MPT64, eGFP und PF4 wurde mit der Expression der CrPCS versucht, einen neuen Stoffwechselweg im Chloroplasten zu etablieren. Durch eine zusätzliche plastidäre PC-Synthese könnte in der Alge damit das Potential zur Schwermetallakkumulation bzw. -detoxifikation erhöht werden und somit ein Schwermetall-toleranterer Stamm erstellt werden. Beim Substrat der PCS handelt es sich um Gluthation (GSH), das unter anderem selbst an der Entgiftung von Schwermetallen beteiligt ist [230]. Die GSH-Konzentration im Chloroplasten ist mit der im Cytosol vergleichbar [231]. Deshalb sollte eine plastidäre PC-Synthese, vermittelt durch eine dort exprimierte PCS möglich sein. In *A. thaliana*-Plastiden konnte eine PC-Synthese durch eine Kern-vermittelte Überexpression der AtPCS1 verbunden mit einer plastidären Lokalisationsdomäne (*rbcS* Transitpeptid) erzielt werden [232]. Entgegen den Erwartungen wurde im Vergleich zum Wildtyp aber keine veränderte Reaktion gegenüber Schwermetallen (Cadmium und Arsen) festgestellt. Vermutet wurde, dass der im Cytosol angereicherte AtPCS1-Vorläufer aktiv ist und analog zu einer im Cytosol AtPCS1-überexprimierenden Mutante [223], lokal zur Hypersensitivität führt. Gesamtzellulär könnte dadurch die möglicherweise Schwermetall-tolerantere Wirkung der zusätzlichen PC-Synthese in den Plastiden aufgehoben sein. Um diese Hypothese zu klären, schlugen die Autoren eine direkte plastidäre PCS-Expression vor.

Die PCS verfügt artübergreifend über einen hochkonservierten N-terminalen Bereich, der als aktivitätsrelevanter Teil identifiziert wurde [165,233]. Über Sequenzanalysen und Homologievergleiche ist es in dieser Arbeit gelungen, die vollständige Sequenz dieses spezifischen Bereiches der CrPCS zu identifizieren (Abb. 3.34). Auf Grundlage dieser Sequenz konnte von Patrice Peterson eine *in silico*-Modellierung der PCS von *C. reinhardtii* durchgeführt werden [164], die wiederum die Basis für zukünftige Funktionsstudien darstellt. Für die plastidäre PC-Synthese wurde die kodierende Sequenz der CrPCS an den plastidären Codongebrauch angepasst (siehe Anhang C) und zur Erstellung eines entsprechenden Transgens genutzt (Abb. 3.35). Nach der Transformation des Fud7-Stammes konnten

photoautotroph wachsende Klone identifiziert werden, die das Transgen in das Plastom integriert hatten und ein *pcs*-spezifisches Transkript sowie Protein exprimieren (Abb. 3.36). Erste Wachstumsversuche unter Schwermetallstress (70µM Cadmium) zeigen, dass die Mutante 16S/PCS im Vergleich zum Wildtyp über ein besseres photoautotrophes Wachstum verfügt und deutlich mehr Cadmium im Chloroplasten akkumuliert (unveröffentlichte Daten Florent Penen). Diese und vorläufige Daten zeigen, dass das rekombinant im Chloroplasten exprimierte Enzym (*CrPCS*) aktiv ist und eine PC-Synthese stattfindet. Die Funktion des Chloroplasten ist durch den neu eingefügten metabolischen Prozess weitestgehend unbeeinflusst, da die PCS-exprimierende Mutante (16S/PCS) photoautotroph wächst. Somit könnte der 16S/PCS-Stamm kostengünstig in Minimalmedium (HS) kultiviert und abhängig vom spezifischen Vermögen der Schwermetallakkumulation z.B. für die Reinigung kontaminierter Abwässer (*phytoremediation*) genutzt werden. Genetisch veränderten Algen mit einer erhöhten PC-Synthese oder aber MT-Expression wird für die Beseitigung von Schwermetallen aus aquatischen Systemen ein großes Potential zugeschrieben [234,235]. Allerdings stellt das damit verbundene Risiko einer Freisetzung von transgenen Algen (GMOs) in die Umwelt ein nicht unerhebliches Problem dar [236].

#### *Expression der BKT*

Mit der  $\beta$ -Carotin-Ketolase (BKT) wurde versucht, ein weiteres kernkodierte Enzym im Chloroplasten von *C. reinhardtii* zu exprimieren, um damit die Synthese von sekundären Carotinoiden wie z.B. Astaxanthin (Ax) zu ermöglichen (Syntheseweg siehe Anhang F). Sekundäre Carotinoide werden vor allem von höheren Pflanzen und Algen zum Schutz vor oxidativen Schädigungen gebildet [237]. Tiere sind allgemein nicht in der Lage, Carotinoide selbst herzustellen. Zur Aufrechterhaltung ihrer Gesundheit sind sie jedoch darauf angewiesen, Carotinoide über ihre Nahrung aufzunehmen [238]. Speziell Ax gewinnt aufgrund seiner antioxidativen Wirkung immer mehr wirtschaftliche Bedeutung als Zusatzstoff in Nahrungsmitteln, Kosmetika und Medikamenten [239]. Die wichtigste natürliche Quelle für Ax stellt bisher die Grünalge *Haematococcus pluvialis* dar. Aufgrund der steigenden Nachfrage wird zunehmend auf biotechnologischem Wege versucht, auch in anderen Organismen, wie z.B. höheren Pflanzen, eine gesteigerte und kostengünstigere Ax-Synthese zu etablieren [167,240–244]. In *Arabidopsis thaliana* konnte durch die Expression der *C. reinhardtii*-spezifischen *CrBKT* die Akkumulation großer Ax-Mengen erzielt werden. Die rotbräunlichen Pflanzen zeigten dabei phänotypisch keine Wachstumsdefizite [167]. In

*C. reinhardtii* erfolgt die Expression der kernkodierten *CrBKT* ausschließlich während der Sporenbildung [245]. Mit der plastidären Überexpression der *CrBKT* sollte eine starke Ax-Synthese etabliert werden, die potentiell wirtschaftlich nutzbar wäre. Zusätzlich könnten phänotypische Veränderungen in der Färbung der Transformanten auch als Selektionsmarker für gezielte Optimierungen der allgemeinen Expression von Transgenen oder der Biosynthese sekundärer Carotinoide verwendet werden. Ein vergleichbares System wurde von Zhu *et al.* [241] in *Zea mays* entwickelt.

Allerdings gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, einen plastidär *CrBKT*-exprimierenden Algenstamm zu erzeugen. Direkt nach der Transformation des Fud7-Stammes konnten zwar Klone mit einer leicht rötlichen Färbung detektiert werden, die vermutlich über eine *CrBKT*-bedingte Synthese sekundärer Carotinoide wie z.B. Ax verfügten. Die noch heteroplasmischen Algenklone zeigten jedoch ein deutlich reduziertes Wachstum unter photoautotrophen Selektionsbedingungen. Offensichtlich wurde die Funktion des Chloroplasten durch das Transgen bzw. dessen Produkt (die *CrBKT*) beeinflusst. Aktuelle Ergebnisse von transgenen Tabakpflanzen stützen diese Vermutung. Die Expression der *CrBKT* führte dort zur Reduzierung der photosynthetischen Effizienz [246]. Um genetisch stabile Kulturen zu erhalten, die über identische Plastomkopien verfügen, musste die Kultivierung der Algen-Transformanten unter photoautotrophen Bedingungen fortgeführt werden. Dadurch erhöhten sich sukzessiv die Dosis des Transgens sowie der selektive Druck, das Transgen zu inaktivieren. Analog zum Versuch zur Erstellung der Mutante 16S/MPT (siehe 3.2.2) kam es vermutlich zur Deletion der transgenen Sequenz. Ein vergleichbarer Verlust des Transgens wurde durch Lentz *et al.* [247] in Plastiden von Tabak detektiert. Die Ergebnisse deuteten dabei auf einen toxischen Effekt des exprimierten Einzeldomänenantikörpers (VHH) hin. Die kontinuierliche Expression solcher Proteine könnte in einem geringen Maße toleriert und durch den Einsatz schwächerer Promotor-UTR-Kombinationen erreicht werden. Nichtsdestotrotz sollte für die Erstellung transplastomischer Algenstämme mit einer geplanten Überexpression von wachstumshemmenden oder toxischen Proteinen ein induzierbares System verwendet werden. In *C. reinhardtii* konnte für die *psbD* 5'UTR bereits ein gut funktionierendes System etabliert werden [248,249]. Dafür waren zusätzliche Modifikationen im Kern- und im Plastidengenom erforderlich, die nicht direkt auf das in dieser Arbeit etablierte System übertragbar sind. Ausschließlich den Chloroplasten betreffend wurde bisher nur ein *Lac-Repressor*-basiertes und somit IPTG-induzierbares Expressionssystem beschrieben [77,250], dessen Transgenexpression allerdings ohne IPTG nur partiell

unterdrückt und mit IPTG-Zugabe nicht vollständig induziert werden konnte. Für den biotechnologischen Gebrauch des Algen-Chloroplasten wird es zukünftig erforderlich sein, simple Möglichkeiten zur Induktion der transgenen Expression zu entwickeln, die eventuell auch ohne den Gebrauch kostenintensiver Induktoren wie IPTG auskommen. Ein mögliches Werkzeug könnten beispielsweise thermosensible „RNA-Thermometer“ [251,252] darstellen. Bei den in *E. coli* erprobten Elementen genügen einfache Temperaturänderungen, um die Transgenexpression zu regeln. Erste Versuche unserer Arbeitsgruppe, thermosensible Elemente im Chloroplasten für eine induzierbare Transgenexpression zu etablieren (Diplomarbeit Anja Gohlke [253]), schlugen jedoch fehl.

#### 4.4 Methodische Optimierungen

Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten System zur heterologen Expression von Proteinen ist es möglich, beliebig zusammengesetzte Transgenkonstrukte stabil in das *C. reinhardtii*-Plastom zu inserieren. Für die Erstellung der individuellen Transgene kommt ein Kassetten-System zum Einsatz, das die freie Kombination verschiedener Module in Form von PCR-Fragmenten erlaubt. Daraus ergeben sich Möglichkeiten zur weiteren Optimierung der heterologen Genexpression, z.B. durch Methoden der gerichteten Evolution wie der *random mutagenesis* [254]. Um zukünftig eine größere Anzahl der daraus hervorgehenden Transformanten effizienter als bisher untersuchen zu können, wurden spezielle Analysemethoden etabliert.

##### *Etablierung eines Multiplex-PCR-basierten Schnelltests auf Homoplasmie*

Die Phase von der Transformation bis zum Erhalt transplastomischer Algenstämme mit einheitlichen Plastomkopien (Homoplasmie) ist individuell verschieden und umfasst wenige Wochen bis mehrere Monate. Nur durch regelmäßige Untersuchungen in möglichst kurzen Abständen (Wochen) können homoplasmische Transformanten zeitnah detektiert werden. Erst im Anschluss kann mit der eigentlichen Analyse der genetisch stabilen Transformanten begonnen werden. Für gewöhnlich erfolgt der Nachweis über eine oder mehrere Standard-PCRs [61,62] oder wie auch in dieser Arbeit durch eine besonders zeitaufwendige Southern Blot Analyse [58,65]. Mit einem Schnelltest auf Homoplasmie (siehe 3.6.1) ist es möglich, auch bei einer steigenden Anzahl von Transformanten den Untersuchungsaufwand gering zu halten. Dafür wurde eine Multiplex-PCR etabliert, die mit Hilfe individuell markierter Primerpaare die spezifische Amplifikation von Rezipienten- und Transformanten-DNA ermöglicht.

Die entstehenden PCR-Fragmente können über ihre individuelle Markierung in nur 5 Minuten auf einem Dipstick detektiert werden. Auf eine langwierigere gelelektrophoretische Auswertung kann verzichtet werden. Abhängig vom Thermocycler wird es nun möglich sein, bis zu 96 Proben (96-Well-Format) in etwa einer Stunde zu analysieren. Ein vergleichbares Ziel wurde von E. A. Johnson [255] verfolgt. Er entwickelte eine qualitative Multiplex-PCR (qPCR), um Homoplasmie sowie den Grad der Heteroplasmie in transplastomischen Algenstämmen bestimmen zu können.

#### *Etablierung eines Schnelltests für MPT64*

Nachdem Homoplasmie festgestellt wurde, ist entscheidend inwiefern in den Transformanten eine Expression des Fremdproteins erfolgt bzw. Unterschiede vorhanden sind. Ein Schnelltest könnte an dieser Stelle eine aufwendige Western Blot Analyse ersetzen und einen höheren Probendurchsatz ermöglichen. Erst kürzlich wurde zur Lösung derartiger Probleme ein immunologischer Test zur schnellen Detektion Histidin-getaggtter Proteine vorgestellt [256]. Im Verlauf der Arbeit hat sich das MPT64 als ein nützliches Reporterprotein erwiesen und könnte deshalb auch zur weiteren Optimierung der plastidären Fremdproteinexpression in *C. reinhardtii* verwendet werden. Über das rekombinant in *E. coli* exprimierte MPT64 ist es gelungen, monoklonale AK zu generieren und damit einen immunologischen *lateral-flow*-Test zur Detektion von MPT64 zu entwickeln (siehe 3.6.2). Dieser Test hat vorrangig medizinische Relevanz zum Nachweis einer Tuberkulose-Erkrankung [257]. Er erlaubt jedoch auch, rekombinantes MPT64 in der Gesamtzellproteinfraktion von *E. coli* sowie *C. reinhardtii* innerhalb von nur 10 Minuten zu detektieren.

Mit diesen innovativen Untersuchungsmethoden wird es zukünftig möglich sein, einen umfangreichen Pool an Transformanten schnell und zuverlässig zu analysieren, um so weitere Elemente (Promotoren, UTR, SP usw.) für die plastidäre Proteinexpression zu identifizieren oder aber auch schnell und einfach induzierbare Systeme zu testen. Darüber hinaus können Algenklone identifiziert werden, die über unterschiedlich starke Expressionen identischer Transgene verfügen. Nach Surzycki *et al.* [66] ist dafür ein individuelles „Transformosom“ verantwortlich. Beschrieben wurden damit zufällige transformationsbedingte Veränderungen im Genom, die sich negativ oder positiv auf die transgene Expression auswirken.

## 5 Zusammenfassung

Für die heterologe Proteinexpression stellt der *C. reinhardtii*-Chloroplast eine aussichtsreiche Alternative zu klassischen Expressionssystemen dar. In den vergangenen Jahren gelang die Expression therapeutisch und industriell relevanter Proteine, wie z.B. Vakzine, Enzyme und funktionelle Antikörper. Trotz dieser Erfolge besteht jedoch weiter die Notwendigkeit, die vergleichsweise geringen Proteinausbeuten für eine wirtschaftliche Nutzung zu erhöhen. Dafür werden vorrangig effiziente und universell verwendbare Systeme zur Erzeugung transgener Algenstämme benötigt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein entsprechendes System etabliert. Dieses basiert auf dem Vektor pMM2 und dem Rezipientenstamm Fud7. Aufgrund einer Plastomdeletion, von der u.a. das *psbA*-Gen betroffen ist, kann der Fud7-Stamm nur heterotroph mit Acetat als Kohlenstoffquelle wachsen. Mit Hilfe des pMM2-Vektors, der über ein intaktes *psbA*-Gen und umfangreiche Plastomsequenzen verfügt, kann die Deletion im Fud7-Stamm effizient komplementiert werden. Transformanten sind anschließend in der Lage photoautotroph zu wachsen und können auf Minimalmedium im Licht ohne den Gebrauch von Antibiotika selektiert werden. Zusätzlich verfügt der pMM2-Vektor über eine spezielle MCS, die den Einbau individueller, aus PCR-Fragmenten zusammengesetzter Transgene innerhalb nur eines Reaktionsansatzes ermöglicht (*Golden Gate shuffling*). Insgesamt wurden 24 verschiedene Transformationsplasmide erstellt und diese für die Erzeugung Transgen-tragender, photoautotroph wachsender Algenstämme genutzt. Dabei entstand eine Sammlung von 34 konstruktsspezifischen Fragmenten, die zukünftig sukzessiv erweitert und in Verbindung mit dem Vektor pMM2 für die gezielte Optimierung der heterologen Genexpression in Plastiden von *C. reinhardtii* verwendet werden können.

Für erste Untersuchungen erfolgte die heterologe Expression des bakteriellen MPT64, das als Testprotein verwendet wurde. Unter Kontrolle bekannter Promotor-, 5'- und 3'-UTR-Kombinationen wurden erwartungsgemäß Unterschiede in der Transkript- und Proteinakkumulation festgestellt. Die stärkste MPT64-Anreicherung wurde in Mutante 16S/HMPT detektiert. Mit ca. 8% der gesamtlöslichen Proteinmenge (TSP-Fraktion) an MPT64 verfügt diese Mutante über die höchste Fremdproteinakkumulation, die bisher im Chloroplasten photosynthetisch aktiver Algenzellen nachgewiesen wurde. Um die plastidäre Fremdproteinexpression weiter zu optimieren, wurde in Anlehnung an bakterielle Expressionssysteme für *C. reinhardtii* ein Doppelpromotor (7S/16S) etabliert, der in

Kombination mit der *atpA* 5'-UTR und der *rbcL* 3'-UTR zu einer deutlichen Steigerung der Transkript- und Proteinmenge gegenüber der 16S/HMPT-Mutante führte und vermutlich derzeit den leistungsstärksten plastidären Promotor darstellt.

Ferner wurde eine N-terminale Prozessierung von MPT64 festgestellt. Vermutet wurde, dass das bakterielle Signalpeptid den Transport von MPT64 ins Thylakoidlumen vermittelt. Durch die Erstellung weiterer MPT64-, eGFP- und PF4-exprimierender Mutanten konnte die luminaire Lokalisation teilweise bestätigt und erstmalig deren Bedeutung für die Anreicherung von Fremdproteinen im Chloroplasten von *C. reinhardtii* untersucht werden. Dabei erwies sich die luminaire Lokalisation von MPT64 und vermutlich auch von PF4 als vorteilhafter gegenüber dem Verbleib im Stroma. Für die Akkumulation von eGFP, das für seine Verträglichkeit und Stabilität bekannt ist, waren hingegen beide Kompartimente gleichermaßen geeignet. Eine Schlüsselrolle beim Proteintransport über die Thylakoidmembran kommt jedoch dem Signalpeptid zu. Für jedes Fremdprotein sollte deshalb individuell nach einem geeigneten Signalpeptid gesucht werden, das einen optimalen Transport und infolgedessen eine möglichst hohe luminaire Akkumulation des Fremdproteins gewährleistet. In dieser Arbeit hat sich das Tat-spezifische Signalpeptid vom OEE3 besonders bewährt.

Um das Expressionssystem ausgiebig zu testen, wurde versucht, neben MPT64, eGFP und PF4 auch die ursprünglich kernkodierte Proteine PCS und BKT im Chloroplasten zu exprimieren. Im Gegensatz zur erfolgreichen Expression der PCS, wodurch eine potentiell schwermetalltolerante Alge erstellt werden konnte, misslang der Versuch BKT- und zum Teil auch MPT64- und PF4- exprimierende Mutanten zu erzeugen. Die Gründe dieser Fehlversuche werden diskutiert und machen ferner den Bedarf an zusätzlichen Optimierungen deutlich. Speziell für das in dieser Arbeit etablierte System wurden Methoden (Schnelltest auf Homoplasmie und MPT64-Nachweis) entwickelt, die zukünftig ein schnelles Screening transplastomischer Algenklone ermöglichen und somit von Vorteil bei der Suche nach weiteren Expressionssteigerungen, induzierbaren Systemen oder der Etablierung von neuen Synthesewegen (*metabolic engineering*) sein werden.

Mit dem System zur Erstellung transplastomischer Algenstämme, dem leistungsstarken Doppelpromotor (7S/16S), der Identifizierung des Thylakoidlumens als potentiell geeignetem Akkumulationsort für Fremdproteine, sowie schneller Analysemethoden für Transformanten ist es in dieser Arbeit gelungen, die heterologe Proteinexpression im Chloroplasten von *C. reinhardtii* zu optimieren und für eine breitere Anwendung zu öffnen.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Johnson IS. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science* 1983;219:632–7.
- [2] Rai M, Padh H. Expression systems for production of heterologous proteins. *Curr Sci* 2001;80:1121–8.
- [3] Desai PN, Shrivastava N, Padh H. Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnol Adv* 2010;28:427–35.
- [4] Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 2014;5:172.
- [5] Daniell H, Singh ND, Mason H, Streatfield SJ. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci* 2009;14:669–79.
- [6] Ma JK-C, Barros E, Bock R, Christou P, Dale PJ, Dix PJ, *et al.* Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Rep* 2005;6:593–9.
- [7] Merlin M, Gecchele E, Capaldi S, Pezzotti M, Avesani L. Comparative evaluation of recombinant protein production in different biofactories: the green perspective. *Biomed Res Int* 2014;2014:136419.
- [8] Paul M, Ma JK-C. Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms. *Biotechnol Appl Biochem* 2011;58:58–67.
- [9] Mason HS, Warzecha H, Mor T, Arntzen CJ. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol Med* 2002;8:324–9.
- [10] Beltrán-López JI, Romero-Maldonado A, Monreal-Escalante E, Bañuelos-Hernández B, Paz-Maldonado LM, Rosales-Mendoza S. *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts express an orally immunogenic protein targeting the p210 epitope implicated in atherosclerosis immunotherapies. *Plant Cell Rep* 2016.
- [11] Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol* 2003;21:570–8.
- [12] Michoux F, Ahmad N, McCarthy J, Nixon PJ. Contained and high-level production of recombinant protein in plant chloroplasts using a temporary immersion bioreactor. *Plant Biotechnol J* 2011;9:575–84.
- [13] Huang T-K, McDonald KA. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochem Eng J* 2009;45:168–84.
- [14] Fischer R, Schillberg S, Hellwig S, Twyman RM, Drossard J. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnol Adv* 2012;30:434–9.
- [15] Büttner-Mainik A, Parsons J, Jérôme H, Hartmann A, Lamer S, Schaaf A, *et al.* Production of biologically active recombinant human factor H in *Physcomitrella*. *Plant Biotechnol J* 2011;9:373–83.
- [16] Decker EL, Parsons J, Reski R. Glyco-engineering for biopharmaceutical production in moss bioreactors. *Front Plant Sci* 2014;5:346.
- [17] Pulz O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;57:287–93.

- [18] Pulz O, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;65:635–48.
- [19] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 2006;101:87–96.
- [20] Buono S, Langellotti AL, Martello A, Rinnaa F, Fogliano V. Functional ingredients from microalgae. *Food Funct* 2014;5:1669–85.
- [21] Raja R, Hemaiswarya S, Kumar NA, Sridhar S, Rengasamy R. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit Rev Microbiol* 2008;34:77–88.
- [22] Curtain C. PLANT BIOTECHNOLOGY- The growth of Australia’s algal b-carotene industry. *Australas Biotechnol* 2000;10:19–23.
- [23] Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX. Microalgae as sources of carotenoids. *Mar Drugs* 2011;9:625–44.
- [24] Gong Y, Hu H, Gao Y, Xu X, Gao H. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011;38:1879–90.
- [25] Rasala BA, Mayfield SP. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynth Res* 2014.
- [26] Rochaix JD. *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu Rev Genet* 1995;29:209–30.
- [27] Harris EH. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001;52:363–406.
- [28] Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, *et al.* The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 2007;318:245–50.
- [29] Popescu CE, Lee RW. Mitochondrial genome sequence evolution in *Chlamydomonas*. *Genetics* 2007;175:819–26.
- [30] Maul JE, Lilly JW, Cui L, DePamphilis CW, Miller W, Harris EH, *et al.* The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell* 2002;14:2659–79.
- [31] Kindle KL. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1228–32.
- [32] Remacle C, Cardol P, Coosemans N, Gaisne M, Bonnefoy N. High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4771–6.
- [33] Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, *et al.* Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 1988;240:1534–8.
- [34] Gould SB, Waller RF, McFadden GI. Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol* 2008;59:491–517.
- [35] Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, *et al.* Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12246–51.

- [36] Green BR. Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *Plant J* 2011;66:34–44.
- [37] Gutensohn M, Fan E, Frielingsdorf S, Hanner P, Hou B, Hust B, *et al.* Toc, Tic, Tat *et al.*: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol* 2006;163:333–47.
- [38] Aldridge C, Cain P, Robinson C. Protein transport in organelles: Protein transport into and across the thylakoid membrane. *FEBS J* 2009;276:1177–86.
- [39] Albiniak AM, Baglieri J, Robinson C. Targeting of luminal proteins across the thylakoid membrane. *J Exp Bot* 2012;63:1689–98.
- [40] Bally J, Paget E, Droux M, Job C, Job D, Dubald M. Both the stroma and thylakoid lumen of tobacco chloroplasts are competent for the formation of disulphide bonds in recombinant proteins. *Plant Biotechnol J* 2008;6:46–61.
- [41] Hennig A, Bonfig K, Roitsch T, Warzecha H. Expression of the recombinant bacterial outer surface protein A in tobacco chloroplasts leads to thylakoid localization and loss of photosynthesis. *FEBS J* 2007;274:5749–58.
- [42] Henry R, Carrigan M, McCaffrey M, Ma X, Cline K. Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the Sec and the Delta pH protein transport systems in chloroplast thylakoid membranes. *J Cell Biol* 1997;136:823–32.
- [43] Yoon S, Kim S, Kim J. Secretory Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Recent Pat Biotechnol* 2010;4:23–9.
- [44] Ni Y, Chen R. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 2009;31:1661–70.
- [45] Peltier J, Friso G, Kalume D. Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of luminal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell* 2000;12:319–41.
- [46] Tissot G, Canard H, Nadai M. Translocation of aprotinin, a therapeutic protease inhibitor, into the thylakoid lumen of genetically engineered tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol* 2008:309–20.
- [47] Klein T, Wolf E, Wu R, Sanford J. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 1987;327:70–3.
- [48] Nakazato E, Fukuzawa H, Tabata S, Takahashi H, Tanaka K. Identification and expression analysis of cDNA encoding a chloroplast recombination protein REC1, the chloroplast RecA homologue in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003;67:2608–13.
- [49] Johannngmeier U, Bertalan I, Hilbig L, Schulze J, Wilski S, Zeidler E, *et al.* Engineering the D1 Subunit of Photosystem II. *Biotechnol. Appl. Photosynth. Proteins Biochips, Biosens. Biodevices*, 2006, p. 46–56.
- [50] Dauvillee D, Hilbig L, Preiss S, Johannngmeier U. Minimal Extent of Sequence Homology Required for Homologous Recombination at the *psbA* Locus in *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts using PCR-generated DNA Fragments. *Photosynth Res* 2004;79:219–24.
- [51] Franklin SE, Mayfield SP. Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5:225–35.

- [52] Barnes D, Franklin S, Schultz J, Henry R, Brown E, Coragliotti A, *et al.* Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. *Mol Genet Genomics* 2005;274:625–36.
- [53] Barrera DJ, Rosenberg JN, Chiu JG, Chang Y-N, Debatis M, Ngoi S-M, *et al.* Algal chloroplast produced camelid VH H antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin. *Plant Biotechnol J* 2014;1–8.
- [54] Franklin S, Ngo B, Efuet E, Mayfield SP. Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J* 2002;30:733–44.
- [55] Mayfield SP, Schultz J. Development of a luciferase reporter gene, *luxCt*, for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J* 2004;37:449–58.
- [56] Mayfield SP, Franklin SE, Lerner RA. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:438–42.
- [57] Michelet L, Lefebvre-Legendre L, Burr SE, Rochaix J-D, Goldschmidt-Clermont M. Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of *Chlamydomonas*. *Plant Biotechnol J* 2011;9:565–74.
- [58] Muto M, Henry RE, Mayfield SP. Accumulation and processing of a recombinant protein designed as a cleavable fusion to the endogenous Rubisco LSU protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *BMC Biotechnol* 2009;9:26.
- [59] Noor-Mohammadi S, Pourmir A, Johannes TW. Method to assemble and integrate biochemical pathways into the chloroplast genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Bioeng* 2012;109:2896–903.
- [60] Oey M, Ross IL, Hankamer B. Gateway-assisted vector construction to facilitate expression of foreign proteins in the chloroplast of single celled algae. *PLoS One* 2014;9:e86841.
- [61] Rasala BA, Muto M, Lee PA, Jager M, Cardoso RMF, Behnke CA, *et al.* Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J* 2010;8:719–33.
- [62] Wang X, Brandsma M, Tremblay R, Maxwell D, Jevnikar AM, Huner N, *et al.* A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). *BMC Biotechnol* 2008;8:87.
- [63] Yoon S-M, Kim SY, Li KF, Yoon BH, Choe S, Kuo MM-C. Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli* AppA phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;91:553–63.
- [64] Bertalan I, Munder MC, Weiß C, Kopf J, Fischer D, Johanningmeier U. A rapid, modular and marker-free chloroplast expression system for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* 2014;195:60–6.
- [65] Manuell AL, Beligni MV, Elder JH, Siefker DT, Tran M, Weber A, *et al.* Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnol J* 2007;5:402–12.
- [66] Surzycki R, Greenham K, Kitayama K, Dibal F, Wagner R, Rochaix J-D, *et al.* Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals* 2009;37:133–8.

- [67] Tran M, Zhou B, Pettersson PL, Gonzalez MJ, Mayfield SP. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. *Biotechnol Bioeng* 2009;104:663–73.
- [68] Rasala BA, Mayfield SP. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. *Bioeng Bugs* 2010;2:50–4.
- [69] Rasala BA, Muto M, Sullivan J, Mayfield SP. Improved heterologous protein expression in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* through promoter and 5' untranslated region optimization. *Plant Biotechnol J* 2011;9:674–83.
- [70] Gregory JA, Li F, Tomosada LM, Cox CJ, Topol AB, Vinetz JM, *et al.* Algae-produced Pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. *PLoS One* 2012;7:e37179.
- [71] Jones CS, Luong T, Hannon M, Tran M, Gregory JA, Shen Z, *et al.* Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;97:1987–95.
- [72] Tran M, Van C, Barrera DJ, Pettersson PL, Peinado CD, Bui J, *et al.* PNAS Plus: Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci* 2012:1–8.
- [73] Tran M, Henry RE, Siefker D, Van C, Newkirk G, Kim J, *et al.* Production of anti-cancer immunotoxins in algae: Ribosome inactivating proteins as fusion partners. *Biotechnol Bioeng* 2013:1–10.
- [74] Gregory JA, Topol AB, Doerner DZ, Mayfield SP. Alga-produced cholera toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccines. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:3917–25.
- [75] Bateman JM, Purton S. Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: expression vectors and a new dominant selectable marker. *Mol Gen Genet* 2000;263:404–10.
- [76] Ishikura K, Takaoka Y, Kato K, Sekine M, Yoshida K, Shinmyo A. Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *J Biosci Bioeng* 1999;87:307–14.
- [77] Kato K, Marui T, Kasai S, Shinmyo A. Artificial control of transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast using the *lac* regulation system from *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* 2007;104:207–13.
- [78] Chen H-C, Melis A. Marker-free genetic engineering of the chloroplast in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J* 2013;11:818–28.
- [79] Demurtas OC, Massa S, Ferrante P, Venuti A, Franconi R, Giuliano G. A *Chlamydomonas*-derived human papillomavirus 16 e7 vaccine induces specific tumor protection. *PLoS One* 2013;8:e61473.
- [80] Sun M, Qian K, Su N, Chang H, Liu J, Shen G, *et al.* Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnol Lett* 2003;25:1087–92.
- [81] Yang Z, Li Y, Chen F, Li D, Zhang Z, Liu Y, *et al.* Expression of human soluble TRAIL in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Chinese Sci Bull* 2006;51:1703–9.

- [82] He D-M, Qian K-X, Shen G-F, Zhang Z-F, Li Y-N, Su Z-L, *et al.* Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007;55:26–30.
- [83] Han S, Hu Z, Lei A. Expression and function analysis of the metallothionein-like (MT-like) gene from *Festuca rubra* in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Sci China C Life Sci* 2008;51:1076–81.
- [84] Dreesen I a J, Charpin-El Hamri G, Fussenegger M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *J Biotechnol* 2010;145:273–80.
- [85] Wu S, Huang R, Xu L, Yan G, Wang Q. Improved hydrogen production with expression of *hemH* and *lba* genes in chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* 2010;146:120–5.
- [86] Wu S, Xu L, Huang R, Wang Q. Improved biohydrogen production with an expression of codon-optimized *hemH* and *lba* genes in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresour Technol* 2011;102:2610–6.
- [87] Quesada-vargas T, Ruiz ON, Daniell H. Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplasts . *Transcription , Processing , and Translation 1* 2005:1–17.
- [88] Bock R. Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:100–6.
- [89] Schroda M. The *Chlamydomonas* genome reveals its secrets: chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast. *Photosynth Res* 2004;82:221–40.
- [90] Kim J, Mayfield SP. Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science* 1997;278:1954–7.
- [91] Franklin SE, Mayfield SP. Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas*. *Curr Opin Plant Biol* 2004;7:159–65.
- [92] Li H, d’Anjou M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 2009;20:678–84.
- [93] Dove A. Uncorking the biomanufacturing bottleneck. *Nat Biotechnol* 2002;20:777–9.
- [94] Mayfield SP, Manuell AL, Chen S, Wu J, Tran M, Siefker D, *et al.* *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:126–33.
- [95] Specht E, Miyake-Stoner S, Mayfield SP. Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnol Lett* 2010;32:1373–83.
- [96] Goldschmidt-Clermont M. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res* 1991;19:4083–9.
- [97] Johanningmeier U, Fischer D. Perspective for the use of genetic transformants in order to enhance the synthesis of the desired metabolites: Engineering chloroplasts of microalgae for the production of bioactive compounds. *Adv Exp Med Biol* 2010;698:144–51.
- [98] Przibilla E, Heiss S, Johanningmeier U, Trebst A. Site-specific mutagenesis of the D1 subunit of photosystem II in wild-type *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 1991;3:169–74.

- [99] Newman S, Boynton J, Gillham N, Randolph-Anderson B, Johnson A, Harris E. Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics* 1990;126:875–88.
- [100] Pontiroli A, Rizzi A, Simonet P, Daffonchio D, Vogel TM, Monier J-M. Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:3314–22.
- [101] Fischer N, Stampacchia O, Redding K, Rochaix JD. Selectable marker recycling in the chloroplast. *Mol Gen Genet* 1996;251:373–80.
- [102] Day A, Goldschmidt-Clermont M. The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant Biotechnol J* 2011;9:540–53.
- [103] Shao Z, Zhao H, Zhao H. DNA assembler, an *in vivo* genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res* 2009;37:e16.
- [104] Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res* 2000;10:1788–95.
- [105] Marín-Navarro J, Manuell AL, Wu J, Mayfield SP. Chloroplast translation regulation. *Photosynth Res* 2007;94:359–74.
- [106] Monde R a, Schuster G, Stern DB. Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie* 2000;82:573–82.
- [107] Nickelsen J. Chloroplast RNA-binding proteins. *Curr Genet* 2003;43:392–9.
- [108] Herrin DL, Nickelsen J. Chloroplast RNA processing and stability. *Photosynth Res* 2004;82:301–14.
- [109] Goldschmidt-Clermont M, Rahire M, Rochaix J-D. Redundant cis-acting determinants of 3' processing and RNA stability in the chloroplast *rbcL* mRNA of *Chlamydomonas*. *Plant J* 2008;53:566–77.
- [110] Coragliotti AT, Beligni MV, Franklin SE, Mayfield SP. Molecular factors affecting the accumulation of recombinant proteins in the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Mol Biotechnol* 2011;48:60–75.
- [111] Wostrikoff K, Girard-Bascou J, Wollman F-A, Choquet Y. Biogenesis of PSI involves a cascade of translational autoregulation in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J* 2004;23:2696–705.
- [112] Minai L, Wostrikoff K, Wollman F-A, Choquet Y. Chloroplast biogenesis of photosystem II cores involves a series of assembly-controlled steps that regulate translation. *Plant Cell* 2006;18:159–75.
- [113] Weiss C, Bertalan I, Johanningmeier U. Effects of rare codon clusters on the expression of a high-turnover chloroplast protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* 2012;160:105–11.
- [114] Ikemura T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol* 1985;2:13–34.
- [115] Campbell WH, Gowri G. Codon usage in higher plants, green algae, and cyanobacteria. *Plant Physiol* 1990;92:1–11.
- [116] Gurvich OL, Baranov P V, Gesteland RF, Atkins JF. Expression levels influence ribosomal frameshifting at the tandem rare arginine codons AGG\_AGG and AGA\_AGA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2005;187:4023–32.

- [117] Calderone TL, Stevens RD, Oas TG. High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1996;262:407–12.
- [118] Angov E. Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnol J* 2011;6:650–9.
- [119] Angov E, Legler PM, Mease RM. Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding. *Methods Mol Biol* 2011;705:1–13.
- [120] Johanningmeier U, Heiss S. Construction of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant with an intronless *psbA* gene. *Plant Mol Biol* 1993:91–9.
- [121] Bennoun P, Spierer-Herz M, Erickson J, Girard-Bascou J, Pierre Y, Delosme M, *et al.* Characterization of photosystem II mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the *psbA* gene. *Plant Mol Biol* 1986;6:151–60.
- [122] Munder MC. Constitutive and inducible gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. Diplomarbeit, MLU-Halle-Wittenberg, 2010.
- [123] Sueoka N. Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1960;46:83–91.
- [124] Gorman DS, Levine RP. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965;54:1665–9.
- [125] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harb Lab Press 1998.
- [126] Tartof K, Hobbs C. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Focus (Madison)* 1987:1.
- [127] Heiss S. Untersuchungen zur Transformation des Chloroplasten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* am Beispiel des *psbA*-Gens. Dissertation, Bochum 1992:1–85.
- [128] Sager R, Granick S. Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ann NY Acad Sci* 1953;56:831–8.
- [129] Arnon D. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 1949;24.
- [130] Nedbal L, Soukupová J, Kaftan D, Whitmarsh J, Trtílek M. Kinetic imaging of chlorophyll fluorescence using modulated light. *Photosynth Res* 2000;66:3–12.
- [131] Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* 2007;2:924–32.
- [132] Stemmer WP, Cramer A, Ha KD, Brennan TM, Heyneker HL. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 1995;164:49–53.
- [133] Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. *PLoS One* 2009;4:e5553.
- [134] Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987;166:368–79.

- [135] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 1992;24:145–9.
- [136] Spurr AR. A Low-Viscosity Epoxy Resin Embedding Medium for Electron Microscopy Department of Vegetable Crops , University of California , 1969;43:31–43.
- [137] Minagawa J, Crofts AR. A robust protocol for site-directed mutagenesis of the D1 protein in *Chlamydomonas reinhardtii* : A PCR-spliced *psbA* gene in a plasmid conferring spectinomycin resistance was introduced into a *psbA* deletion. *Photosynth Res* 1994;42:121–31.
- [138] Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* 2008;3:e3647.
- [139] Maurya AK, Nag VL, Kant S, Singh Kushwaha RA, Kumar M, Mishra V, *et al.* Evaluation of an immunochromatographic test for discrimination between *Mycobacterium tuberculosis* complex & non tuberculous mycobacteria in clinical isolates from extra-pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 2012;135:901–6.
- [140] Mustafa AS. In silico binding predictions for identification of HLA-DR-promiscuous regions and epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* protein MPT64 (Rv1980c) and their recognition by human Th1 cells. *Med Princ Pract* 2010;19:367–72.
- [141] Gimpel J a, Mayfield SP. Analysis of heterologous regulatory and coding regions in algal chloroplasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:4499–510.
- [142] Goldschmidt-Clermont M. Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Int Rev Cytol* 1998;177:115–80.
- [143] Widner B, Thomas M, Sternberg D, Lammon D, Behr R, Sloma A. Development of marker-free strains of *Bacillus subtilis* capable of secreting high levels of industrial enzymes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2000;25:204–12.
- [144] Yang M, Zhang W, Ji S, Cao P, Chen Y, Zhao X. Generation of an artificial double promoter for protein expression in *Bacillus subtilis* through a promoter trap system. *PLoS One* 2013;8:e56321.
- [145] Solovyev V, Salamov A. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In: Li RW, editor. *Metagenomics its Appl. Agric. Biomed. Environ. Stud.*, Nova Science Publishers; 2011, p. 61–78.
- [146] Seidler a, Michel H. Expression in *Escherichia coli* of the *psbO* gene encoding the 33 kd protein of the oxygen-evolving complex from spinach. *EMBO J* 1990;9:1743–8.
- [147] Chu T-PJ, Yuann J-MP. Expression, purification, and characterization of protective MPT64 antigen protein and identification of its multimers isolated from nontoxic *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Biotechnol Appl Biochem* 2011;58:185–9.
- [148] Oettinger T, Andersen AB. Cloning and B-cell-epitope mapping of MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Infect Immun* 1994;62:2058–64.
- [149] Mayfield SP, Schirmer-Rahire M, Frank G, Zuber H, Rochaix JD. Analysis of the genes of the OEE1 and OEE3 proteins of the photosystem II complex from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 1989;12:683–93.
- [150] Ko K, Cashmore AR. Targeting of proteins to the thylakoid lumen by the bipartite transit peptide of the 33 kd oxygen-evolving protein. *EMBO J* 1989;8:3187–94.

- [151] Klösgen RB. Protein transport into and across the thylakoid membrane. *J Photochem Photobiol B Biol* 1997;38:1–9.
- [152] Marques JP, Schattat MH, Hause G, Dudeck I, Klösgen RB. In vivo transport of folded EGFP by the DeltapH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 2004;55:1697–706.
- [153] Mason CB, Matthews S, Bricker TM, Moroney J V. Simplified Procedure for the Isolation of Intact Chloroplasts from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 1991;97:1576–80.
- [154] Mason CB, Bricker TM, Moroney J V. A rapid method for chloroplast isolation from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nat Protoc* 2006;1:2227–30.
- [155] Okada K, Satoh K, Katoh S. Chloramphenicol is an inhibitor of photosynthesis. *FEBS Lett* 1991;295:155–8.
- [156] Warrens a N, Jones MD, Lechler RI. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene* 1997;186:29–35.
- [157] Pohle K. Expression des Markerproteins eGFP in Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii* - Lokalisation und Akkumulation. Masterarbeit, MLU Halle-Wittenberg, 2013.
- [158] Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 1995;20:448–55.
- [159] Ward WW, Bokman SH. Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry* 1982;21:4535–40.
- [160] Junqueira DRG, Carvalho MDG, Perini E. Heparin-induced thrombocytopenia: a review of concepts regarding a dangerous adverse drug reaction. *Rev Assoc Med Bras* 2013;59:161–6.
- [161] Sachs UJ, von Hesberg J, Santoso S, Bein G, Bakchoul T. Evaluation of a new nanoparticle-based lateral-flow immunoassay for the exclusion of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). *Thromb Haemost* 2011;106:1197–202.
- [162] Bräutigam A, Schaumlöffel D, Preud'homme H, Thondorf I, Wesenberg D. Physiological characterization of cadmium-exposed *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ* 2011;34:2071–82.
- [163] Chlamydomonas connection n.d. <http://www.chlamy.org>.
- [164] Peterson P. Modeling the Phytochelatinsynthase of *Chlamydomonas reinhardtii*. Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg, 2013.
- [165] Vivares D, Arnoux P, Pignol D. A papain-like enzyme at work: native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18848–53.
- [166] Lohr M, Im C, Grossman A. Genome-Based examination of chlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 2005;138:490–515.
- [167] Zhong Y-J, Huang J-C, Liu J, Li Y, Jiang Y, Xu Z-F, *et al.* Functional characterization of various algal carotenoid ketolases reveals that ketolating zeaxanthin efficiently is essential for high production of astaxanthin in transgenic *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2011;62:3659–69.

- [168] Odom OW, Baek K-H, Dani RN, Herrin DL. *Chlamydomonas* chloroplasts can use short dispersed repeats and multiple pathways to repair a double-strand break in the genome. *Plant J* 2008;53:842–53.
- [169] Wagle MD, Sen S, Rao BJ. Local repeat sequence organization of an intergenic spacer in the chloroplast genome of *Chlamydomonas reinhardtii* leads to DNA expansion and sequence scrambling: a complex mode of “copy-choice replication”? *J Biosci* 2001;26:583–94.
- [170] Pourmir A, Noor-Mohammadi S, Johannes TW. Production of xylitol by recombinant microalgae. *J Biotechnol* 2013;165:178–83.
- [171] Rochaix JD. Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 1996;32:327–41.
- [172] Raynaud C, Loiselay C, Wostrikoff K, Kuras R, Girard-Bascou J, Wollman F-A, *et al.* Evidence for regulatory function of nucleus-encoded factors on mRNA stabilization and translation in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:9093–8.
- [173] Stern DB, Goldschmidt-Clermont M, Hanson MR. Chloroplast RNA metabolism. *Annu Rev Plant Biol* 2010;61:125–55.
- [174] Breitbach A. Untersuchungen zur heterologen Genexpression im Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii*. Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg, 2012.
- [175] Specht EA, Mayfield SP. Synthetic Oligonucleotide Libraries Reveal Novel Regulatory Elements in *Chlamydomonas* Chloroplast mRNAs. *ACS Synth Biol* 2013;2:34–46.
- [176] Dvir S, Velten L, Sharon E, Zeevi D, Carey LB, Weinberger A, *et al.* Deciphering the rules by which 5'-UTR sequences affect protein expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:E2792–801.
- [177] Chursov A, Walter MC, Schmidt T, Mironov A, Shneider A, Frishman D. Sequence-structure relationships in yeast mRNAs. *Nucleic Acids Res* 2012;40:956–62.
- [178] Kuroda H, Maliga P. Sequences downstream of the translation initiation codon are important determinants of translation efficiency in chloroplasts. *Plant Physiol* 2001;125:430–6.
- [179] Eberhard S, Drapier D, Wollman FA. Searching limiting steps in the expression of chloroplast-encoded proteins: Relations between gene copy number, transcription, transcript abundance and translation rate in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 2002;31:149–60.
- [180] Suzuki JY, Sriraman P, Svab Z, Maliga P. Unique architecture of the plastid ribosomal RNA operon promoter recognized by the multisubunit RNA polymerase in tobacco and other higher plants. *Plant Cell* 2003;15:195–205.
- [181] Liu J, Zhou W, Liu G, Yang C, Sun Y, Wu W, *et al.* The Conserved Endoribonuclease YbeY Is Required for Chloroplast Ribosomal RNA Processing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2015;168:205–21.
- [182] Sriraman P, Silhavy D, Maliga P. Transcription from heterologous rRNA operon promoters in chloroplasts reveals requirement for specific activating factors. *Plant Physiol* 1998;117:1495–9.
- [183] Herrin DL. Chloroplast RNA Processing and Stability. *Chlamydomonas Sourceb.*, Elsevier; 2009, p. 937–65.

- [184] Holloway SP, Herrin DL. Processing of a composite large subunit rRNA. Studies with *Chlamydomonas* mutants deficient in maturation of the 23s-like rRNA. *Plant Cell* 1998;10:1193–206.
- [185] Weber E, Engler C, Gruetzner R. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One* 2011;6.
- [186] Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B, Bock R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant J* 2009;57:436–45.
- [187] Oey M, Lohse M, Scharff LB, Kreikemeyer B, Bock R. Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:6579–84.
- [188] Champion PAD, Cox JS. Protein secretion systems in *Mycobacteria*. *Cell Microbiol* 2007;9:1376–84.
- [189] Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PAD, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CMJE, *et al.* Type VII secretion-*mycobacteria* show the way. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:883–91.
- [190] Harth G, Lee BY, Horwitz MA. High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic *mycobacteria* of four major *Mycobacterium tuberculosis* extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets. *Infect Immun* 1997;65:2321–8.
- [191] Skalitzky CA, Martin JR, Harwood JH, Beirne JJ, Adamczyk BJ, Heck GR, *et al.* Plastids contain a second sec translocase system with essential functions. *Plant Physiol* 2011;155:354–69.
- [192] Ferro M, Brugière S, Salvi D, Seigneurin-Berny D, Court M, Moyet L, *et al.* AT\_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol Cell Proteomics* 2010;9:1063–84.
- [193] Sakamoto W. Protein degradation machineries in plastids. *Annu Rev Plant Biol* 2006;57:599–621. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105401.
- [194] van Wijk KJ, Baginsky S. Plastid proteomics in higher plants: current state and future goals. *Plant Physiol* 2011;155:1578–88.
- [195] De Marchis F, Pompa A, Bellucci M. Plastid proteostasis and heterologous protein accumulation in transplastomic plants. *Plant Physiol* 2012;160:571–81.
- [196] Varshavsky A. The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci* 2011;20:1298–345.
- [197] van Wijk KJ. Protein maturation and proteolysis in plant plastids, mitochondria, and peroxisomes. *Annu Rev Plant Biol* 2015;66:75–111.
- [198] Apel W, Schulze WX, Bock R. Identification of protein stability determinants in chloroplasts. *Plant J* 2010;63:636–50.
- [199] Gibbs DJ, Bacardit J, Bachmair A, Holdsworth MJ. The eukaryotic N-end rule pathway: conserved mechanisms and diverse functions. *Trends Cell Biol* 2014;24:603–11.
- [200] Tasaki T, Sriram SM, Park KS, Kwon YT. The N-end rule pathway. *Annu Rev Biochem* 2012;81:261–89.

- [201] Rowland E, Kim J, Bhuiyan NH, van Wijk KJ. The *Arabidopsis* Chloroplast Stromal N-Terminome: Complexities of Amino-Terminal Protein Maturation and Stability. *Plant Physiol* 2015;169:1881–96.
- [202] De Marchis F, Bellucci M, Pompa A. Phaseolin expression in tobacco chloroplast reveals an autoregulatory mechanism in heterologous protein translation. *Plant Biotechnol J* 2015; 14(2):603–14.
- [203] Clausmeyer S, Klösgen RB, Herrmann RG. Protein Import into Chloroplasts. *J Biol Chem* 1993;268:13869–76.
- [204] Peltier J-B, Emanuelsson O, Kalume DE, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, *et al.* Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* 2002;14:211–36.
- [205] Bohne A-V, Schwarz C, Schottkowski M, Lidschreiber M, Piotrowski M, Zerges W, *et al.* Reciprocal Regulation of Protein Synthesis and Carbon Metabolism for Thylakoid Membrane Biogenesis. *PLoS Biol* 2013;11:e1001482.
- [206] Rasala BA, Barrera DJ, Ng J, Plucinak TM, Rosenberg JN, Weeks DP, *et al.* Expanding the spectral palette of fluorescent proteins for the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 2013;74:545–56.
- [207] Rasala BA, Lee P a, Shen Z, Briggs SP, Mendez M, Mayfield SP. Robust Expression and Secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by Fusion to a Selection Gene and Processing with the FMDV 2A Peptide. *PLoS One* 2012;7:e43349.
- [208] Noor-Mohammadi S, Pourmir A, Johannes TW. Method for assembling and expressing multiple genes in the nucleus of microalgae. *Biotechnol Lett* 2013.
- [209] Fuhrmann M, Oertel W, Hegemann P. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 1999;19:353–61.
- [210] Weiß C. Der Einfluss seltener Codons auf die Expression plastidencodierter Proteine. Dissertation, MLU Halle-Wittenberg, 2012.
- [211] Cubitt AB, Woollenweber LA, Heim R. Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Methods Mol Biol Cell Biol* 1999;58:19–30.
- [212] Hu Z, Zhao Z, Wu Z, Fan Z, Chen J, Wu J, *et al.* Successful expression of heterologous *egfp* gene in the mitochondria of a photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mitochondrion* 2011;11:716–21.
- [213] Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev* 2002;102:759–81.
- [214] Patterson GH, Knobel SM, Sharif WD, Kain SR, Piston DW. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 1997;73:2782–90.
- [215] Marques JP, Dudeck I, Klösgen RB. Targeting of EGFP chimeras within chloroplasts. *Mol Genet Genomics* 2003;269:381–7.
- [216] Kudla G, Murray AW, Tollervey D, Plotkin JB. Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science* 2009;324:255–8.
- [217] Eichler-Stahlberg A, Weisheit W, Ruecker O, Heitzer M. Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 2009;229:873–83.

- [218] Lumbreras V, Stevens D, Purton S. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J* 1998;14:441–7.
- [219] Harris EH. The *Chlamydomonas* Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. San Diego: Academic Press; 1989.
- [220] Hanikenne M. *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytol* 2003;159:331–40.
- [221] Grennan AK. Metallothioneins, a diverse protein family. *Plant Physiol* 2011;155:1750–1.
- [222] Cobbett C. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* 2000;123:825–32.
- [223] Li Y, Dhankher OP, Carreira L, Lee D, Chen A, Schroeder JI, *et al.* Overexpression of phytochelatin synthase in *Arabidopsis* leads to enhanced arsenic tolerance and cadmium hypersensitivity. *Plant Cell Physiol* 2004;45:1787–97.
- [224] Venkataramaiah N, Vudayagiri Ramakrishna S, Sreevathsa R. Overexpression of phytochelatin synthase (AtPCS) in rice for tolerance to cadmium stress. *Biologia (Bratisl)* 2011;66:1060–73.
- [225] Shri M, Dave R, Diwedi S, Shukla D, Kesari R, Tripathi RD, *et al.* Heterologous expression of *Ceratophyllum demersum* phytochelatin synthase, CdPCS1, in rice leads to lower arsenic accumulation in grain. *Sci Rep* 2014;4:5784.
- [226] Pomponi M, Censi V, Di Girolamo V, De Paolis A, di Toppi LS, Aromolo R, *et al.* Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd(2+) tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta* 2006;223:180–90.
- [227] Salt DE, Rauser WE. MgATP-Dependent Transport of Phytochelatin Across the Tonoplast of Oat Roots. *Plant Physiol* 1995;107:1293–301.
- [228] Nagel K, Adelmeier U, Voigt J. Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Plant Physiol* 1996;149:86–90.
- [229] Mendoza-Cózatl DG, Moreno-Sánchez R. Cd<sup>2+</sup> transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochim Biophys Acta* 2005;1706:88–97.
- [230] Hossain MA, Piyatida P, da Silva JA. T, Fujita M. Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *J Bot* 2012;2012:1–37.
- [231] Rouhier N, Lemaire SD, Jacquot J-P. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu Rev Plant Biol* 2008;59:143–66.
- [232] Picault N, Cazalé AC, Beyly A, Cuiiné S, Carrier P, Luu DT, *et al.* Chloroplast targeting of phytochelatin synthase in *Arabidopsis*: effects on heavy metal tolerance and accumulation. *Biochimie* 2006;88:1743–50.
- [233] Tsuji N, Nishikori S, Iwabe O, Matsumoto S, Shiraki K, Miyasaka H, *et al.* Comparative analysis of the two-step reaction catalyzed by prokaryotic and eukaryotic phytochelatin synthase by an ion-pair liquid chromatography assay. *Planta* 2005;222:181–91.

- [234] Perales-Vela HV, Peña-Castro JM, Cañizares-Villanueva RO. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 2006;64:1–10.
- [235] Chekroun K, Baghour M. The role of algae in phytoremediation of heavy metals: a review. *J Mater Env Sci* 2013;4:873–80.
- [236] Rajamani S, Siripornadulsil S, Falcao V, Torres M, Colepicolo P, Sayre R. Phycoremediation of heavy metals using transgenic microalgae. *Adv Exp Med Biol* 2007;616:99–109.
- [237] Lohr M. Carotenoids. In: Stern DB, editor. *Chlamydomonas* Sourceb. vol. 2, Amsterdam: Academic Press; 2009, p. 799–818.
- [238] Cazzonelli CI. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Funktional Plant Biol* 2011;38:833–47.
- [239] Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol* 2003;21:210–6.
- [240] Zhu C, Naqvi S, Capell T, Christou P. Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. *Arch Biochem Biophys* 2009;483:182–90.
- [241] Zhu C, Naqvi S, Breitenbach J, Sandmann G, Christou P, Capell T. Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:18232–7.
- [242] Huang J, Zhong Y, Sandmann G, Liu J, Chen F. Cloning and selection of carotenoid ketolase genes for the engineering of high-yield astaxanthin in plants. *Planta* 2012.
- [243] Huang J-C, Zhong Y-J, Liu J, Sandmann G, Chen F. Metabolic engineering of tomato for high-yield production of astaxanthin. *Metab Eng* 2013;17:59–67.
- [244] Hasunuma T, Miyazawa SI, Yoshimura S, Shinzaki Y, Tomizawa K-I, Shindo K, *et al.* Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. *Plant J* 2008;55:857–68.
- [245] Bauch ME. Identifizierung und Quantifizierung der Ketocarotinoide in Dauerstadien von Grünalgen und Ketocarotinoidbiosynthese im Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii*. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2011.
- [246] Röding A, Dietzel L, Schlicke H, Grimm B, Sandmann G, Büchel C. Production of ketocarotenoids in tobacco alters the photosynthetic efficiency by reducing photosystem II supercomplex and LHClI trimer stability. *Photosynth Res* 2014.
- [247] Lentz EM, Garaicoechea L, Alfano EF, Parreño V, Wigdorovitz A, Bravo-Almonacid FF. Translational fusion and redirection to thylakoid lumen as strategies to improve the accumulation of a camelid antibody fragment in transplastomic tobacco. *Planta* 2012;236:703–14.
- [248] Surzycki R, Cournac L, Peltier G, Rochaix J-D. Potential for hydrogen production with inducible chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:17548–53.
- [249] Ramundo S, Rahire M, Schaad O, Rochaix J-D. Repression of essential chloroplast genes reveals new signaling pathways and regulatory feedback loops in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 2013;25:167–86.
- [250] Mühlbauer SK, Koop H-U. External control of transgene expression in tobacco plastids using the bacterial *lac* repressor. *Plant J* 2005;43:941–6.

- [251] Neupert J, Bock R. Designing and using synthetic RNA thermometers for temperature-controlled gene expression in bacteria. *Nat Protoc* 2009;4:1262–73.
- [252] Neupert J, Karcher D, Bock R. Design of simple synthetic RNA thermometers for temperature-controlled gene expression in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2008;36:e124.
- [253] Gohlke A. Untersuchungen zur induzierten Genexpression im Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii* durch regulatorische RNA-Elemente. Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg, 2013.
- [254] Cadwell RC, Joyce GF. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *Genome Res* 1992;2:28–33.
- [255] Johnson EA. Monitoring foreign gene incorporation into the plastome of *Chlamydomonas reinhardtii* by multiplex qPCR. *Photosynth Res* 2013;115:81–7.
- [256] Kreisig T, Prasse AA, Zscharnack K, Volke D, Zuchner T. His-tag protein monitoring by a fast mix-and-measure immunoassay. *Sci Rep* 2014;4:5613.
- [257] Yu M-C, Chen H-Y, Wu M-H, Huang W-L, Kuo Y-M, Yu F-L, *et al.* Evaluation of the rapid MGIT TBc identification test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex strain detection. *J Clin Microbiol* 2011;49:802–7.

## Anhang A: Plastomsequenz im Deletionsbereich der Fud7-Mutante

TACATAAATGTGCTAGGTAACCTAACGTTTGGATTTTTTGTGGTATAATATATGT  
 ACCATGCTTTTAATAGAAGCTTGAATTTATAAATTTAAAATATTTTTACAATATT 5'UTR  
 TTACGGAGAAATTTAAACTTTAAAAAATTAACATATGACAGCAATTTTAGA  
 ACGTCGTGAAAATTCTAGCCTATGGGCTCGTTTTTGTGAGTGGATCACTTCAA Exon I  
 CTGAAAACCGTTTATACATCGGTTGGTTCGGTGTAAATCATGATCCCATGTCTT  
 CTTACTGCAACATCAGTATTCATCATCGCTTTCATCGCTGCTCCGCCAGTAGA  
 CATCTTCGCAATACCATAGGTGTCCTGTACTCGTAAGAGTACTGAAAAATTG  
 GGTGAATTGCTGGAACCCGAAAGGTAATCAGCAGCCAAGCTACAGGTGGGCT  
 ATATAAATATTTATATAGGTTCTGTAGAAGGTTTCAGAGACTAGTGCTTGAGTC  
 CCAACAATAATAGCACATTAGCGCCCAACCCCTTTTATTTGAGTTAAAAGGGT  
 GAAGATATAGTCCAACGATTCTCTACTTTATTTACATGATACCCGTTACGGGC  
 AAATAAATTTTATAATACATTACACATATGACAAAAAATTTAAAATTAATGA  
 TCTGACTGCCGAACAAGTTGCTTGGTTAGCAGGTTTATTCCAAGCCGAAGCTT  
 ATTTTCACTATGATAAACGCGTTAGAGCTAAAACCGATAGCGAAGATTATACA  
 CCACAATAAATAAATTTGTCCTCAAATTTAAAATCGAAATGATCGAGCAGGAC Intron I  
 TTAATGGAAACAGTTGGTCAATATCTAGGTCAACCGGTAACCGGTTAATCG  
 TAAAACATCGGCTGGTAATAACGTTTATAAAGTTACGCTTTATGCTAGAGATG  
 AGGTTGAAGCTTTTTTATTAGCTATTCAACCTTACGTGATTGGGAACAAAACA  
 CGTTCTAAAATTACTGAAATGCTAGCTGTTTGTGATGAATATAAAGCTTGGA  
 CGAGGCTGGTGGTAAAACACAAGCAGCAAAAATTGCTAATAAAGCAAGTCAA  
 CAGGCCAAAAGACAAAATAATAAAGACTAAAGTAGTATTAACCTGTACTTTT  
 ATTAATAAAGATGGTTAAATTTGTTAATATTTTATATAAAGTCTCAGCAACTTC  
 TTGCTCCGCAGGCCCGAAGGGGGTGTCTGACGCGTTTGTGAGGCTTTATTA  
 ACATAAAGTTTACTTACCCGACGCGTTGCTGAGGTTGTATTTATCTTCTTCGGG  
 GTATATAAAGATCCCTAAGTTTACTTGCCTAGGCAGTTGGCAGGATATTTATA  
 TACGATATTAATACTTTGCAACTGCCACTAAAATTTATTTGCCCGAAGGGGAC  
 GTCCTTCGGAGTATATAAATATCCCGTAAGGGGAAGGGGATGTCCCGTAAGG  
 GGAAGGGGAGAAGCTCCAACAGAGGTTGGAGCTTCTTTAGTTTCTTAGGCATT  
 ATTTAAATATTTTTTAAACCCTGGCACTAGAAGTACTGAGATTCCAGACGGCGACCC  
 GTAAAGTTCTTCAGTCCCCTCAGCTTTTTTACAACCAAGTTCGGGATGGATTG *rrn5*-Gen  
 GTGTGGGTC

**Abbildung 7.1: Sequenzanalyse der Fud7-spezifischen Deletion.** Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung eines 1650bp großen PCR-Fragmentes, das den Deletionsbereich im Plastom der Fud7-Mutante umfasst. Für die PCR wurden die Primer -251for und 5SEndefor (Tab. 2.8) verwendet. Die Homologie zum Wildtyp bricht im *psbA*-Intron I ab und setzt sich nach 8225 bp in der intergenischen Sequenz zwischen *psbA*-Gen und *rrn5*-Gen (5S rDNA) fort. Der exakte Deletionspunkt kann jedoch nicht genau bestimmt werden. Er befindet sich entweder vor oder nach der unterstrichenen Sequenz. Diese 33bp lange Sequenz kommt im Wildtyp sowohl im *psbA*-Intron I, als auch in der intergenischen Sequenz zwischen *psbA*-Gen und *rrn5*-Gen vor und war vermutlich während der Entstehung der Fud7-Mutante für ein Rekombinationsereignis verantwortlich, das zur Deletion der dazwischen liegenden Sequenz inklusive einer der beiden Sequenzkopien führte.

## Anhang B: Erstellung der plastidären Transformationsvektoren

Über die Methode des *Golden Gate shuffling* (siehe 2.7.13) wurden gezielt PCR-Fragmente zu unterschiedlichen Transgenkonstrukten innerhalb des Eingangsvektors pMM2 verknüpft. Die dafür verwendeten PCR-Fragmente sind in der Tabelle 7.1 aufgeführt und waren Ausgangspunkt für die 21 plastidären Transformationsplasmide, die im Rahmen dieser Arbeit erzeugt wurden (Tabelle 7.2).

**Tabelle 7.1: Auflistung der PCR-Fragmente mit BsaI-Überhängen.** Aufgeführt sind das Template und das jeweilige Primer-Paar (siehe Tabelle 2.1), mit dessen Hilfe am 5'- und 3'-Ende des PCR-Fragmentes BsaI-Erkennungssequenzen angefügt wurden. Nach einem BsaI-Verdau entstehen spezifische 5'- und 3'-Überhänge, die eine gezielte Verknüpfung gewährleisten. Aus den durchnummerierten PCR-Fragmenten wurden Transformationsplasmide mit individuellen Transgenen erstellt (siehe Tabelle 7.2).

Nr.	Fragmentbeschreibung	Primer-Paar	5'-Überhang	3'-Überhang	Template
1	psbA P+5'UTR (280bp)	P psbAfor+Bsa psbA 5'Bsa rev	<b>AGGT</b>	<b>TATG</b>	gen. DNA IL
2	psbD P+5'UTR (520bp)	psbD 5' UTR for psbD 5' UTR rev	<b>AGGT</b>	<b>CGCA</b>	gen. DNA IL
3	atpA P+5'UTR (570bp)	atpA5'Bsafor atpA5'Bsarev	<b>AGGT</b>	<b>TATG</b>	gen. DNA IL
4	16S-Promotor (240bp)	P16Sfor+Bsa P16Srev+Bsa	<b>AGGT</b>	<b>TATC</b>	gen. DNA IL
5	atpA5'UTR+His (420bp)	5'atpAfor+Bsa HisX5'atpArev	<b>TATC</b>	<b>CATC</b>	gen. DNA IL
6	rbcL 3'UTR (470bp)	rbcL3'Bsa for rbcL3'Bsa rev	<b>TAAT</b>	<b>GCTT</b>	gen. DNA IL
7	psbA 3'UTR (140bp)	psbA 3'UTR for psbA 3'UTR rev	<b>TAAT</b>	<b>GCTT</b>	gen. DNA IL
8	HA-Fragment (54bp)	HA tag for HA tag rev	<b>TACC</b>	<b>TAAT</b>	Primer-Paar
9	TATG-MPT64-Fragment (714bp)	MPT atpA5'for MPT rev	<b>TATG</b>	<b>TACC</b>	pCrMPTcp
10	CGCA-MPT64-Fragment (714bp)	MPT psbD5'for MPT rev	<b>CGCA</b>	<b>TACC</b>	pCrMPTcp
11	His-MPT64-Fragment (734bp)	HisX MPT for MPT rev	<b>CATC</b>	<b>TACC</b>	pCrMPTcp
12	16S-Promotor + atpA5'UTR (640bp)	P16S for+Bsa atpA5'Bsa rev	<b>AGGT</b>	<b>TATG</b>	p16S/HMPT
13	CGCA-PF4-Fragment (243bp)	PF4 for 1+BSA PF4HA rev3+BSA	<b>CGCA</b>	<b>TACC</b>	(Tab. 2.2)
14	TATG-PF4-Fragment (243bp)	PF4 atpA5'for PF4HA rev3+BSA	<b>TATG</b>	<b>TACC</b>	(Tab. 2.2)

Fortsetzung der Tabelle 7.1

Nr.	Fragmentbeschreibung	Primer-Paar	5'-Überhang	3'-Überhang	Template
15	HA + psbA 3'UTR (170bp)	HA tag for psbA3'UTRrev	TACC	GCTT	ppsbD/MPT
16	HA + rbcL 3'UTR (500bp)	HA tag for rbcL3'Bsa rev	TACC	GCTT	patpA/MPT
17	His-MPT64-HA-3'rbcL (1230bp)	HisX MPT for rbcL3'Bsa rev	CATC	GCTT	patpA/MPT
18	His-PF4-HA-3'rbcL (730bp)	HisX PF4 for rbcL3'Bsa rev	CATC	GCTT	patpA/PF4
19	MPT64-HA-3'rbcL- Fragment (1200bp)	MPT atpA5'for rbcL3'Bsa rev	TATG	GCTT	p16S/HMPT
20	SP1 (185bp)	SP1for GGCT SP 1 rev+Bsa	GGCT	TATG	(Tab.2.6)
21	SP3 (185bp)	SP3for GGCT SP 3 rev+Bsa	GGCT	TATG	(Tab. 2.6)
22	eGFP-Fragment (747bp)	eGFPatpA5'for eGFP H231Lrev	TATG	TACC	(Tab. 2.5)
23	16S-Promotor + atpA5'UTR (640bp)	P16Sfor+Bsa 5' atpA GGCT rev	AGGT	GGCT	p16S/HMPT
24	16S P + atpA5' + His/SP <sub>MPT</sub> (720bp)	P16Sfor+Bsa MPT SP rev	AGGT	TATG	p16S/HMPT
25	MPT ab AS24-HA-3'rbcL (1120bp)	MPT 24start rbcL3'Bsa rev	TATG	GCTT	p16S/HMPT
26	PF4-HA-3'rbcL ( 720bp)	PF4 atpA5'for rbcL3'Bsa rev	TATG	GCTT	patpA/PF4
27	eGFP-HA-3'rbcL (1220bp)	eGFPatpA5'for rbcL3'Bsa rev	TATG	GCTT	pK/GFP
28	7S Promotor (400bp)	P7S BsaI for P7S BsaI rev	AGGT	ACAG	gen. DNA IL
29	P16S 5'atpA His-MPT64- HA-3'rbcL (1844bp)	ACAG P16SforBsa rbcL3'Bsa rev	ACAG	GCTT	p16S/HMPT
30	PCS-Fragment (792bp)	crPCSforBsaI crPCSrevBsaI	TATG	TACC	pCrPCScp
31	BKT-Fragment (1011bp)	BKTfor+Bsa BKTreiv+Bsa	TATG	TACC	pCrBKTcp
32	TATG-ecPF4-Fragment (239bp)	ecPF4forTATG ecPF4revTAAT	TATG	TAAT	(Tab. 2.3)
33	16S P + atpA5' + SP1 (789bp)	P16Sfor+Bsa SP 1 rev+Bsa	AGGT	TATG	pSP1MPT
34	16S P + atpA5' + SP3 (789bp)	P16Sfor+Bsa SP 3 rev+Bsa	AGGT	TATG	pSP3MPT

**Tabelle 7.2: Darstellung der plastidären Transformationsplasmide inklusive der spezifisch zusammengesetzten Transgene.** Neben der ausführlichen Beschreibung der Transgene sind die bei der Erstellung verwendeten PCR-Fragmente mit angegeben (Nr. entsprechend Tab. 7.1).

Nr.	Bezeichnung	Transgenbeschreibung	PCR-Fragmente
1	p16S/HMPT	P16S / 5'atpA / His-TAG / SP <sub>MPT</sub> / MPT64 / HA-TAG / 3'rbcl	4+5+11+8+6
2	ppsbA/MPT	PpsbA / 5'psbA / SP <sub>MPT</sub> / MPT64 / HA-TAG / 3'psbA	1+9+8+7
3	ppsbD/MPT	PpsbD / 5'psbD / SP <sub>MPT</sub> / MPT64 / HA-TAG / 3'psbA	2+10+8+7
4	patpA/MPT	PatpA / 5'atpA / SP <sub>MPT</sub> / MPT64 / HA-TAG / 3'rbcl	3+9+8+6
5	p16S/MPT	P16S / 5'atpA / SP <sub>MPT</sub> / MPT64 / HA-TAG / 3'rbcl	12+19
6	p7S16S/HMPT	P7S / P16S / 5'atpA / His-TAG / SP <sub>MPT</sub> / MPT64 / HA-TAG / 3'rbcl	28+29
7	pK/MPT	P16S / 5'atpA / MPT64 / HA-TAG / 3'rbcl	12+25
8	pSP1MPT	P16S / 5'atpA / SP <sub>OEE1</sub> / MPT64 / HA-TAG / 3'rbcl	23+20+25
9	pSP3MPT	P16S / 5'atpA / SP <sub>OEE3</sub> / MPT64 / HA-TAG / 3'rbcl	23+21+25
10	pSP <sub>M</sub> GFP	P16S / 5'atpA / His-TAG / SP <sub>MPT</sub> / eGFP / HA-TAG / 3'rbcl	24+17
11	pK/GFP	P16S / 5'atpA / eGFP / HA-TAG / 3'rbcl	12+22+16
12	pSP1GFP	P16S / 5'atpA / SP <sub>OEE1</sub> / eGFP / HA-TAG / 3'rbcl	23+20+27
13	pSP3GFP	P16S / 5'atpA / SP <sub>OEE3</sub> / eGFP / HA-TAG / 3'rbcl	23+21+27
14	ppsbD/PF4	PpsbD / 5'psbD / PF4 / HA-TAG / 3'psbA	2+13+15
15	patpA/PF4	PatpA / 5'atpA / PF4 / HA-TAG / 3'rbcl	3+14+16
16	p16S/HPF4	P16S / 5'atpA / His-TAG / PF4 / HA-TAG / 3'rbcl	4+5+18
17	pHSP <sub>M</sub> PF4	P16S / 5'atpA / His-TAG / SP <sub>MPT</sub> / PF4 / HA-TAG / 3'rbcl	24+26
18	pSP1PF4	P16S / 5'atpA / SP <sub>OEE1</sub> / PF4 / HA-TAG / 3'rbcl	23+20+26
19	pSP3PF4	P16S / 5'atpA / SP <sub>OEE3</sub> / PF4 / HA-TAG / 3'rbcl	23+21+26
20	p16S/PCS	P16S / 5'atpA / PCS / HA-TAG / 3'rbcl	12+30+16
21	p16S/BKT	P16S / 5'atpA / BKT / HA-TAG / 3'rbcl	12+31+16
22	p16S/ecPF4	P16S / 5'atpA / ecPF4 / 3'rbcl	12+32+6
23	pSP1ecPF4	P16S / 5'atpA / SP <sub>OEE1</sub> / ecPF4 / 3'rbcl	33+32+6
24	pSP3ecPF4	P16S / 5'atpA / SP <sub>OEE3</sub> / ecPF4 / 3'rbcl	34+32+6

## Anhang C: Anpassung der kodierenden DNA an den wirtsspezifischen Codongebrauch

Um die Translationseffizienz und dadurch die Proteinausbeute zu erhöhen, wurde die kodierende Sequenz der zu exprimierenden Proteine an den Codongebrauch des Chloroplasten von *C. reinhardtii* (Tabelle 7.3) und bei MPT64 und PF4 zusätzlich an den von *E. coli* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=37762>) angepasst. Dargestellt sind jeweils die Aminosäuresequenz und das Sequenz-Alignment zwischen der ursprünglichen proteinkodierenden Sequenz (Original) und der Codon-optimierten Version. Veränderungen innerhalb der Sequenz wurden mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Für die beiden Codon-adaptierten PF4-Sequenzen ist zusätzlich deren relative Anpassung an den plastidären Codongebrauch dargestellt.

**Tabelle 7.3: Codongebrauch im Chloroplasten von *C. reinhardtii*.** Den Daten liegt die komplette proteinkodierende Sequenz von insgesamt 93 Plastiden-Genen (26731 Codons) zugrunde. Quelle: <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3055.chloroplast>

Codon	Nutzung in %	Anzahl									
<b>UUU</b>	3,34	894	<b>UCU</b>	1,70	455	<b>UAU</b>	2,46	657	<b>UGU</b>	0,76	203
<b>UUC</b>	1,71	456	<b>UCC</b>	0,28	74	<b>UAC</b>	1,00	266	<b>UGC</b>	0,15	39
<b>UUA</b>	7,77	2078	<b>UCA</b>	2,20	588	<b>UAA</b>	0,29	78	<b>UGA</b>	0,01	3
<b>UUG</b>	0,43	114	<b>UCG</b>	0,40	107	<b>UAG</b>	0,04	12	<b>UGG</b>	1,35	361
<b>CUU</b>	1,43	383	<b>CCU</b>	1,55	414	<b>CAU</b>	1,01	270	<b>CGU</b>	3,24	866
<b>CUC</b>	0,10	28	<b>CCC</b>	0,34	90	<b>CAC</b>	0,88	235	<b>CGC</b>	0,41	110
<b>CUA</b>	0,64	170	<b>CCA</b>	2,36	630	<b>CAA</b>	3,84	1026	<b>CGA</b>	0,34	90
<b>CUG</b>	0,37	99	<b>CCG</b>	0,24	63	<b>CAG</b>	0,41	110	<b>CGG</b>	0,05	14
<b>AUU</b>	5,14	1374	<b>ACU</b>	2,44	651	<b>AAU</b>	4,21	1126	<b>AGU</b>	1,60	428
<b>AUC</b>	0,82	219	<b>ACC</b>	0,51	135	<b>AAC</b>	1,77	472	<b>AGC</b>	0,54	144
<b>AUA</b>	0,69	184	<b>ACA</b>	3,24	865	<b>AAA</b>	6,91	1847	<b>AGA</b>	0,53	143
<b>AUG</b>	2,23	596	<b>ACG</b>	0,39	103	<b>AAG</b>	0,62	167	<b>AGG</b>	0,09	23
<b>GUU</b>	2,93	783	<b>GCU</b>	3,40	908	<b>GAU</b>	2,53	676	<b>GGU</b>	4,40	1177
<b>GUC</b>	0,25	68	<b>GCC</b>	0,59	159	<b>GAC</b>	0,98	263	<b>GGC</b>	0,64	172
<b>GUA</b>	2,60	696	<b>GCA</b>	2,07	554	<b>GAA</b>	4,11	1098	<b>GGA</b>	0,86	229
<b>GUG</b>	0,56	149	<b>GCG</b>	0,33	88	<b>GAG</b>	0,57	152	<b>GGG</b>	0,37	99

**MPT64** *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

GenBank: CAA53143.1

(228 Aminosäuren)

MRIKIFMLVTA VVLLCCSGVATAAPKTYCEELKGTDTGQACQIQMSDPAYNINISLPS  
 YYPDQKSLENYIAQTRDKFLSAATSSTPREAPYELNITSATYQSAIPRGTQAVVLKV  
 YQNAGGTHPTTTYKAFDWDQAYRKPITYDTLWQADTDPLPVVFPVIVQGELSKQTGQ  
 QVSIAPNAGLDPVNYQNFAVTNDGVIFFFNP GELLPEAAGPTQVLVPRSAIDSM LA

**Signalpeptid** 1 – 23 AS (23 AS)  
 MPT64 24 – 228 AS (205 AS)

Alignment der Nukleotidsequenz von MPT64 aus *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv  
 (Original) und für *C. reinhardtii* Chloroplast Codon-optimiert (Chlamy)

Original	ATG	CGC	ATC	AAG	ATC	TTC	ATG	CTG	GTC	ACG	GCT	GTC	GTT	TTG	CTC	TGT	TGT	TCG	GGT	GTC
Chlamy	ATG	CGT	ATC	AAA	ATC	TTC	ATG	CTT	GTT	ACT	GCT	GTT	GTT	TTA	CTT	TGT	TGT	TCA	GGT	GTT
		*		*				*	*	*		*		*	*			*		*

Original	GCC	ACG	GCC	GCG	CCC	AAG	ACC	TAC	TGC	GAG	GAG	TTG	AAA	GGC	ACC	GAT	ACC	GGC	CAG	GCG
Chlamy	GCT	ACT	GCT	GCT	CCT	AAA	ACA	TAC	TGC	GAA	GAG	TTA	AAA	GGT	ACA	GAT	ACA	GGT	CAA	GCT
	*	*	*	*	*	*	*			*		*		*	*		*	*	*	*

Original	TGC	CAG	ATT	CAA	ATG	TCC	GAC	CCG	GCC	TAC	AAC	ATC	AAC	ATC	AGC	CTG	CCC	AGT	TAC	TAC
Chlamy	TGC	CAA	ATT	CAA	ATG	TCT	GAC	CCA	GCT	TAC	AAC	ATC	AAC	ATC	AGC	CTT	CCT	AGC	TAC	TAC
		*				*		*	*							*	*	*		*

Original	CCC	GAC	CAG	AAG	TCG	CTG	GAA	AAT	TAC	ATC	GCC	CAG	ACG	CGC	GAC	AAG	TTC	CTC	AGC	GCG
Chlamy	CCT	GAC	CAA	AAA	TCA	CTT	GAA	AAT	TAC	ATC	GCT	CAA	ACT	CGT	GAC	AAA	TTC	CTT	AGC	GCT
	*		*	*	*	*					*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Original	GCC	ACA	TCG	TCC	ACT	CCA	CGC	GAA	GCC	CCC	TAC	GAA	TTG	AAT	ATC	ACC	TCG	GCC	ACA	TAC
Chlamy	GCT	ACA	TCA	TCT	ACT	CCA	CGT	GAA	GCT	CCT	TAC	GAA	TTA	AAT	ATC	ACA	TCA	GCT	ACA	TAC
	*		*	*			*		*	*		*		*		*	*	*	*	*

Original	CAG	TCC	GCG	ATA	CCA	CCG	CGT	GGT	ACG	CAG	GCC	GTG	GTG	CTC	AAG	GTC	TAC	CAG	AAC	GCC	
Chlamy	CAA	TCT	GCT	ATT	CCA	CCA	CGT	GGT	ACT	CAA	GCT	GTA	GTA	CTT	AAA	GTT	TAC	CAA	AAC	GCT	
	*	*	*	*		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Original	GGC	GGC	ACG	CAC	CCA	ACG	ACC	ACG	TAC	AAG	GCC	TTC	GAT	TGG	GAC	CAG	GCC	TAT	CGC	AAG
Chlamy	GGT	GGT	ACT	CAC	CCA	ACT	ACA	ACT	TAC	AAA	GCT	TTC	GAT	TGG	GAC	CAA	GCT	TAT	CGT	AAA
	*	*	*			*	*	*		*	*		*	*		*	*	*	*	*

Original	CCA	ATC	ACC	TAT	GAC	ACG	CTG	TGG	CAG	GCT	GAC	ACC	GAT	CCG	CTG	CCA	GTC	GTC	TTC	CCC	
Chlamy	CCA	ATC	ACA	TAT	GAC	ACT	CTT	TGG	CAA	GCT	GAC	ACA	GAT	CCA	CTT	CCA	GTT	GTT	TTC	CCT	
			*			*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Original	ATT	GTG	CAA	GGT	GAA	CTG	AGC	AAG	CAG	ACC	GGA	CAA	CAG	GTA	TCG	ATA	GCG	CCG	AAT	GCC	
Chlamy	ATT	GTA	CAA	GGT	GAA	CTA	AGC	AAA	CAA	ACA	GGT	CAA	CAA	GTA	TCA	ATT	GCT	CCA	AAT	GCT	
		*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Original	GGC	TTG	GAC	CCG	GTG	AAT	TAT	CAG	AAC	TTC	GCA	GTC	ACG	AAC	GAC	GGG	GTG	ATT	TTC	TTC	
Chlamy	GGT	TTA	GAC	CCA	GTA	AAT	TAT	CAA	AAC	TTC	GCA	GTT	ACT	AAC	GAC	GGT	GTA	ATT	TTC	TTC	
	*	*		*	*			*		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Original	TTC	AAC	CCG	GGG	GAG	TTG	CTG	CCC	GAA	GCA	GCC	GGC	CCA	ACC	CAG	GTA	TTG	GTC	CCA	CGT	
Chlamy	TTC	AAC	CCA	GGT	GAA	TTA	CTT	CCT	GAA	GCA	GCT	GGT	CCA	ACA	CAA	GTA	TTA	GTT	CCA	CGT	
			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Original	TCC	GCG	ATC	GAC	TCG	ATG	CTG	GCC	TAG
Chlamy	TCT	GCT	ATC	GAC	TCA	ATG	CTT	GCT	TAA
	*	*			*	*	*	*	*

Alignment der Nukleotidsequenz von MPT64 aus *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv  
Codon-optimiert für *C. reinhardtii* Chloroplast (Chlamy) und *E. coli* einschließlich der  
Sequenz für den HA-TAG

```

Chlamy  ATG CGT ATC AAA ATC TTC ATG CTT GTT ACT GCT GTT GTT TTA CTT TGT TGT TCA GGT GTT
E.coli  ATG CGT ATC AAA ATC TTC ATG CTG GTG ACC GCG GTG GTG CTG CTG TGC TGC TCT GGT GTG
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Chlamy  GCT ACT GCT GCT CCT AAA ACA TAC TGC GAA GAG TTA AAA GGT ACA GAT ACA GGT CAA GCT
E.coli  GCG ACC GCG GCG CCG AAA ACC TAT TGC GAA GAA CTG AAA GGC ACC GAT ACC GGT CAG GCG
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Chlamy  TGC CAA ATT CAA ATG TCT GAC CCA GCT TAC AAC ATC AAC ATC AGC CTT CCT AGC TAC TAC
E.coli  TGC CAG ATT CAG ATG TCT GAT CCG GCG TAT AAC ATT AAC ATC AGC CTG CCG TCT TAC TAT
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Chlamy  CCT GAC CAA AAA TCA CTT GAA AAT TAC ATC GCT CAA ACT CGT GAC AAA TTC CTT AGC GCT
E.coli  CCG GAT CAG AAA TCT CTG GAA AAC TAT ATT GCG CAG ACC CGT GAT AAA TTT CTG TCT GCG
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Chlamy  GCT ACA TCA TCT ACT CCA CGT GAA GCT CCT TAC GAA TTA AAT ATC ACA TCA GCT ACA TAC
E.coli  GCG ACC AGC TCT ACC CCG CGT GAA GCG CCG TAT GAA CTG AAC ATT ACC TCT GCG ACC TAT
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Chlamy  CAA TCT GCT ATT CCA CCA CGT GGT ACT CAA GCT GTA GTA CTT AAA GTT TAC CAA AAC GCT
E.coli  CAG TCT GCG ATT CCG CCG CGT GGT ACC CAG GCG GTG GTG CTG AAA GTT TAT CAG AAC GCG
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Chlamy  GGT GGT ACT CAC CCA ACT ACA ACT TAC AAA GCT TTC GAT TGG GAC CAA GCT TAT CGT AAA
E.coli  GGT GGT ACC CAT CCG ACT ACC ACT TAC AAA GCG TTT GAT TGG GAT CAG GCG TAT CGT AAA
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Chlamy  CCA ATC ACA TAT GAC ACT CTT TGG CAA GCT GAC ACA GAT CCA CTT CCA GTT GTT TTC CCT
E.coli  CCG ATT ACC TAT GAT ACC CTG TGG CAG GCG GAT ACC GAT CCG CTG CCG GTT GTG TTT CCG
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Chlamy  ATT GTA CAA GGT GAA CTA AGC AAA CAA ACA GGT CAA CAA GTA TCA ATT GCT CCA AAT GCT
E.coli  ATT GTG CAG GGT GAA CTG AGC AAA CAG ACC GGT CAG CAG GTG TCT ATT GCG CCG AAC GCG
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Chlamy  GGT TTA GAC CCA GTA AAT TAT CAA AAC TTC GCA GTT ACT AAC GAC GGT GTA ATT TTC TTC
E.coli  GGT CTG GAT CCG GTG AAC TAT CAG AAC TTT GCG GTG ACC AAC GAT GGC GTG ATT TTC TTC
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Chlamy  TTC AAC CCA GGT GAA TTA CTT CCT GAA GCA GCT GGT CCA ACA CAA GTA TTA GTT CCA CGT
E.coli  TTT AAC CCG GGT GAA CTG CTG CCG GAA GCG GCG GGT CCG ACC CAG GTG CTG GTT CCG CGT
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Chlamy  TCT GCT ATC GAC TCA ATG CTT GCT TAC CCT TAC GAT GTT CCT GAT TAC GCT TAA
E.coli  TCT GCG ATT GAT TCT ATG CTG GCG TAC CCG TAC GAT GTT CCG GAT TAC GCG TAA
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

**PF4 (*platelet factor 4*) *Homo sapiens***

NCBI Reference Sequence: NP\_002610.1

(101 Aminosäuren)

MSSAAGFCASRPGLLFLGLLLLPLVVAFAFAEAEEDGDLQCLCVKTTSQVRPRHITSL  
 EVIKAGPHCPTAQLIATLKNRKRKICLDLQAPLYKKIHKLLS

Signalpeptid	1 – 31 AS	(31 AS)
PF4	32 – 101 AS	(70 AS)

**Alignment der Nukleotidsequenz von PF4 (ohne Signalpeptid) aus *Homo sapiens* (Original) und Codon-optimiert für den *C. reinhardtii* Chloroplast (Chlamy)**

```

Original GAA GCT GAA GAA GAT GGG GAC CTG CAG TGC CTG TGT GTG AAG ACC ACC TCC CAG GTC CGT
Chlamy   GAA GCT GAA GAG GAT GGT GAC TTA CAA TGT TTA TGT GTT AAA ACA ACT TCA CAA GTT CGT
          *           *           * * * * *           * * * * *
Original CCC AGG CAC ATC ACC AGC CTG GAG GTG ATC AAG GCC GGA CCC CAC TGC CCC ACT GCC CAA
Chlamy   CCA CGT CAT ATT ACT TCA TTA GAA GTT ATC AAA GCT GGT CCA CAT TGT CCA ACT GCT CAA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Original CTG ATA GCC ACG CTG AAG AAT GGA AGG AAA ATT TGC TTG GAC CTG CAA GCC CCG CTG TAC
Chlamy   TTA ATC GCT ACA CTT AAA AAC GGT CGT AAA ATC TGT TTA GAC TTA CAA GCT CCA TTA TAC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Original AAG AAA ATA ATT AAG AAA CTT TTG GAG AGT TAG
Chlamy   AAG AAA ATC ATT AAG AAA TTA CTT GAA TCA TAA
          *           * * * * * * * * * *

```

**Alignment der Nukleotidsequenz von PF4 (ohne Signalpeptid) aus *Homo sapiens* Codon-optimiert für *C. reinhardtii* Chloroplast (Chlamy) und *E. coli* einschließlich der Sequenz für den HA-TAG**

```

Chlamy   ATG GAA GCT GAA GAG GAT GGT GAC TTA CAA TGT TTA TGT GTT AAA ACA ACT TCA CAA GTT
E.coli   ATG GAA GCG GAA GAA GAT GGT GAC CTG CAG TGT CTG TGT GTT AAA ACC ACC AGC CAG GTT
          *           *           * * * * *           * * * * *
Chlamy   CGT CCA CGT CAT ATT ACT TCA TTA GAA GTT ATC AAA GCT GGT CCA CAT TGT CCA ACT GCT
E.coli   CGT CCG CGT CAT ATT ACC TCC CTG GAA GTT ATC AAA GCG GGT CCG CAT TGT CCG ACC GCA
          *           * * * * *           *           *           * * * * *
Chlamy   CAA TTA ATC GCT ACA CTT AAA AAC GGT CGT AAA ATC TGT TTA GAC TTA CAA GCT CCA TTA
E.coli   CAG CTG ATC GCG ACC CTG AAA AAC GGT CGT AAA ATC TGT CTG GAC CTG CAG GCA CCG CTG
          * * * * * * * * * *           * * * * * * * * * *
Chlamy   TAC AAG AAA ATC ATT AAG AAA TTA CTT GAA TCA TAC CCT TAC GAT GTT CCT GAT TAC GCT
E.coli   TAC AAA AAA ATC ATT AAA AAA CTG CTG GAA AGC TAC CCG TAC GAT GTT CCG GAT TAC GCG
          *           *           * * * * * * * * * * * * * * * *
Chlamy   TAA
E.coli   TAA

```



**BKT (*beta-carotene ketolase*) *Chlamydomonas reinhardtii***GenBank: AY860820.1 (*nuclear gene for chloroplast product*)

(444 Aminosäuren)

**MGPGIQPTSARPCSRTKHSRFALLAAALTARRVKQFTKQFRSRRMAEDILKLWQRQY**  
**HLPREDSKRTLRLRERVHLYRPPRSDLGGIAVAVTVIALWATLFFVYGLWVFKLPWAL**  
**KVGETATSWATIAAVFFSLEFLYTGLFITTHDAMHGTIALRNRLNDFLGQLAISLYA**  
**WFDYSVLHRKHWEHHTGEPRVDPDFHRGNPNLAVWFAQFMVSYMTLSQFLKIA**  
**VWSNLLLLAGAPLANQLLFMTAAPILSAFRLFYYGTYVPHHPEKGHTGAMPWQVSR**  
**TSSASRLQSFLTTCYHFDLHWEHHRWPYAPWWELPKCRQIARGAALAPGPLPVPAAA**  
**AATAATAAAAAAATGSPAPASRAGSASSASAAASGFGSGHSGSVAAQPLSSLPLLSE**  
**GVKGLVEGAMELVAGGSSSGGGEGGKPGAGEHLLQRQRQLAPVGVMA**

**potentielles Transitpeptid**      1 – 24 AS                      (24 AS)  
**aktiver Teil**                      25 – 328AS                      (304AS)

Alignment der Nukleotidsequenz von BKT (aktiver Teil) aus *C. reinhardtii* (Kern) und Codon-optimiert für den *C. reinhardtii* Chloroplast (Chloro)

Kern      ATG GGC CCT GGG ATA CAA CCC ACT TCC GCG CGA CCG TGT TCT AGG ACC AAA CAC AGT CGA  
Chloro    ATG GGT CCA GGT ATT CAA CCA ACA TCA GCT CGT CCT TGT TCT CGT ACT AAA CAT TCA CGT  
                 \*

Kern      TTT GCG CTA CTT GCC GCA GCG CTG ACC GCA CGA CGC GTC AAG CAG TTC ACG AAG CAG TTC  
Chloro    TTT GCT TTA TTA GCT GCT GCT TTA ACA GCT CGT CGT GTT AAA CAA TTT ACA AAA CAA TTT  
                 \*

Kern      CGC TCG CGT AGG ATG GCG GAG GAC ATA CTG AAG CTG TGG CAG CGC CAA TAT CAC CTG CCG  
Chloro    CGT TCA CGT CGT ATG GCT GAA GAT ATT TTA AAA TTA TGG CAA CGT CAA TAC CAC TTA CCA  
                 \*

Kern      CGC GAG GAT TCT GAC AAG CGC ACG CTG CGC GAG CGC GTT CAC CTG TAC CGC CCG CCG CGT  
Chloro    CGT GAA GAT TCA GAT AAA CGT ACA TTA CGT GAA CGT GTT CAT TTA TAT CGT CCA CCA CGT  
                 \*

Kern      TCA GAC CTA GGT GGC ATT GCG GTC GCT GTG ACA GTC ATC GCG CTG TGG GCG ACG CTG TTT  
Chloro    TCA GAT TTA GGT GGT ATT GCT GTT GCT GTT ACA GTT ATT GCT TTA TGG GCT ACA TTA TTT  
                 \*

Kern      GTC TAC GGG CTG TGG TTC GTC AAG CTG CCA TGG GCG CTC AAA GTG GGC GAG ACA GCC ACG  
Chloro    GTT TAT GGT TTA TGG TTT GTT AAA TTA CCA TGG GCT TTA AAA GTT GGT GAA ACT GCA ACA  
                 \*

Kern      TCC TGG GCA ACC ATT GCT GCT GTA TTC TTT AGC CTG GAA TTC CTT TAC ACC GGG CTC TTC  
Chloro    TCA TGG GCT ACA ATT GCT GCT GTA TTC TTT TCA TTA GAA TTT TTA TAT ACA GGT TTA TTT  
                 \*

Kern      ATC ACC ACG CAC GAC GCG ATG CAT GGC ACC ATC GCG CTG CGC AAC CGG CGC CTG AAC GAC  
Chloro    ATT ACA ACA CAT GAT GCT ATG CAT GGT ACA ATT GCT TTA CGT AAT CGT CGT TTA AAT GAT  
                 \*

Kern      TTT CTG GGC CAG CTG GCA ATC AGC CTA TAC GCC TGG TTT GAC TAC TCC GTC CTG CAC CGC  
Chloro    TTT TTA GGT CAA TTA GCT ATA TCA TTA TAT GCT TGG TTT GAT TAT TCA GTT TTA CAT CGT  
                 \*

Kern      AAG CAC TGG GAG CAC CAC AAC CAC ACC GGG GAG CCG CGT GTG GAT CCG GAC TTC CAC CGC  
Chloro    AAA CAT TGG GAA CAT CAT AAT CAT ACA GGT GAA CCA CGT GTT GAT CCA GAT TTT CAT CGT  
                 \*



**PCS (phytochelatin synthase) *Chlamydomonas reinhardtii* (kernkodiert)**

NCBI Reference Sequence: XP\_001701021.1 (partielle Sequenz)

**AS-Sequenz** (254 AS) unvollständige Sequenz (siehe 3.5.3)

...GFKKTFYKRKLPSPAIEFSCPEGRQLFQEALLDGTMTGFFKLMEQFNTQDEPAFC  
 GLASLAMTLNALSIDPRRTWKGSWRFHEAMLDCRPLDAVKEEGITLYQASCLAR  
 CNGARVELVPYGSAGLSLERFRREVEAVCGSGEEHIVVSYSRKAFLQTGDGHFPIGG  
 YHRGRDLVLVLDVARFKYPPHWVPLPMLYHGMSYVDKVTGRPRGYMRLASNPLLD  
 SVLLTCDVRSAPEDWRPAEAFVRSAAAL...

**potentiell aktiver Teil** 1 – 198AS (198AS)Alignment der Nukleotidsequenz von PCS (254AS) aus *C. reinhardtii* (Kern) und Codon-optimiert für den *C. reinhardtii* Chloroplast (Chloro)

Kern	GGG TTC AAG AAG ACC TTC TAC AAG CGA AAG CTG CCC TCA CCC CCT GCA ATT GAG TTC TCC
Chloro	GGT TTC AAG AAA ACT TTC TAC AAA CGT AAG CTT CCA TCT CCA CCT GCT ATC GAA TTC TCT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Kern	TGC CCC GAA GGC CGG CAG CTG TTC CAA GAG GCG CTC CTG GAC GGC ACC ATG ACC GGC TTC
Chloro	TGT CCA GAA GGT CGT CAA CTT TTC CAA GAA GCT CTT CTT GAC GGT ACT ATG ACT GGT TTC
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Kern	TTC AAA CTG ATG GAG CAA TTC AAC ACG CAG GAC GAG CCG GCC TTC TGC GGT CTG GCG TCC
Chloro	TTC AAA CTT ATG GAG CAA TTC AAC ACT CAA GAC GAA CCA GCT TTC TGC GGT CTT GCT TCT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Kern	CTG GCC ATG ACG CTC AAC GCG CTG TCC ATT GAC CCG CGC CGG ACC TGG AAG GGC TCC TGG
Chloro	CTT GCT ATG ACT CTT AAC GCT CTT TCT ATC GAC CCA CGT CGT ACT TGG AAA GGT TCT TGG
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Kern	CGC TGG TTC CAC GAG GCC ATG TTG GAC TGC TGC AGG CCG CTG GAC GCT GTG AAG GAG GAG
Chloro	CGT TGG TTC CAC GAA GCT ATG TTA GAC TGC TGC CGT CCA CTT GAC GCT GTT AAA GAG GAA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Kern	GGC ATC ACC CTG TAC CAG GCC TCC TGC CTG GCC CGC TGC AAC GGC GCG CGG GTG GAG CTG
Chloro	GGT ATC ACT CTT TAC CAA GCT TCT TGC CTT GCT CGT TGC AAC GGT GCT CGT GTT GAA CTT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Kern	GTG CCG TAC GGC TCG GCC GGG CTG AGC CTG GAG CGC TTC CGT CGC GAG GTG GAG GCG GTG
Chloro	GTT CCA TAC GGT TCT GCT GGT CTT AGC CTT GAG CGT TTC CGT CGT GAA GTT GAG GCT GTT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Kern	TGC GGC AGC GGC GAG GAA CAC ATC GTG GTG TCC TAC AGC CGC AAG GCA TTC CTG CAG ACG
Chloro	TGC GGT AGC GGT GAG GAA CAC ATC GTT GTT TCT TAC AGC CGT AAA GCT TTC CTT CAA ACT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Kern	GGC GAC GGG CAC TTC AGC CCC ATA GGC GGC TAC CAC CGC GGC CGC GAC CTG GTG CTT GTG
Chloro	GGT GAC GGT CAC TTC TCT CCA ATC GGT GGT TAC CAC CGT GGT CGT GAC CTT GTT CTT GTT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Kern	CTG GAC GTG GCT CGC TTC AAG TAC CCA CCG CAC TGG GTG CCG CTG CCC ATG CTG TAC CAC
Chloro	CTT GAC GTT GCT CGT TTC AAA TAC CCA CCA CAC TGG GTT CCA TTA CCA ATG CTT TAC CAC
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Kern	GGC ATG TCG TAC GTG GAC AAG GTG ACG GGC CGC CCG CGC GGC TAC ATG CGG CTG GCC TCC
Chloro	GGT ATG TCT TAC GTT GAC AAA GTT ACT GGT CGT CCA CGT GGT TAC ATG CGT TTA GCT TCT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Kern	AAC CCG CTG CTG GAC AGC GTG CTG CTG ACC TGC GAC GTG CGC AGC GCG CCG GAG GAC TGG
Chloro	AAC CCA TTA CTT GAC TCT GTT CTT TTA ACT TGC GAC GTT CGT TCT GCT CCA GAA GAC TGG
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Kern	CGG CCG GCG GAG GCG TTC GTG CGC TCC GGT GCG GCC GCC CTG
Chloro	CGT CCA GCT GAA GCT TTC GTT CGT TCT GGT GCT GCT GCT CTT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

**eGFP (enhanced green fluorescent protein)**

GenBank: AFB35384.1

Dargestellt sind die Sequenzen des Codon-adaptierten GFP-Gens (GFPf) von Franklin *et al.* (2002) [54] im Vergleich zur der im Rahmen dieser Arbeit erstellten eGFP-Sequenz (eGFP).

**Alignment der Aminosäuresequenzen**

GFPf	M-AKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVWPWT	59
eGFP	MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVWPWT	60
	**	
GFPf	LVTTFITYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL	119
eGFP	LVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL	120
	*	
GFPf	VNRIELKGIIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA	179
eGFP	VNRIELKGIIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA	180
GFPf	DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITHGMDELYK	238
eGFP	DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDELYK	239
	*	

**Alignment der Nukleinsäuresequenzen**

GFPf	ATG --- GCT AAA GGT GAA GAA TTA TTC ACA GGT GTT GTA CCT ATT TTA GTA GAA TTA GAC
eGFP	ATG GTA TCT AAA GGT GAA GAA TTA TTC ACA GGT GTT GTA CCT ATT TTA GTA GAA TTA GAC
	*** *
GFPf	GGT GAT GTA AAC GGT CAC AAA TTT TCA GTT TCT GGT GAA GGT GAA GGT GAC GCA ACT TAT
eGFP	GGT GAT GTA AAC GGT CAC AAA TTT TCA GTT TCT GGT GAA GGT GAA GGT GAC GCA ACT TAT
GFPf	GGT AAA TTA ACA CTT AAA TTC ATT TGT ACT ACA GGT AAA TTA CCA GTA CCT TGG CCA ACT
eGFP	GGT AAA TTA ACA CTT AAA TTC ATT TGT ACT ACA GGT AAA TTA CCA GTA CCT TGG CCA ACT
GFPf	TTA GTT ACA ACT TTT ACA TAC GGT GTA CAA TGT TTC AGT CGT TAC CCT GAT CAC ATG AAA
eGFP	TTA GTT ACA ACT TTA ACA TAC GGT GTA CAA TGT TTC AGT CGT TAC CCT GAT CAC ATG AAA
	*
GFPf	CAA CAT GAC TTT TTC AAA TCT GCT ATG CCA GAA GGT TAT GTT CAA GAA CGT ACT ATT TTT
eGFP	CAA CAT GAC TTT TTC AAA TCT GCT ATG CCA GAA GGT TAT GTT CAA GAA CGT ACT ATT TTT
GFPf	TTC AAA GAT GAC GGT AAT TAT AAA ACA CGT GCT GAA GTA AAA TTT GAA GGT GAT ACT TTA
eGFP	TTC AAA GAT GAC GGT AAT TAT AAA ACA CGT GCT GAA GTA AAA TTT GAA GGT GAT ACT TTA
GFPf	GTT AAC CGT ATT GAA TTA AAA GGT ATT GAC TTC AAA GAA GAT GGT AAT ATT TTA GGT CAC
eGFP	GTT AAC CGT ATT GAA TTA AAA GGT ATT GAC TTC AAA GAA GAT GGT AAT ATT TTA GGT CAC
GFPf	AAA CTT GAA TAT AAC TAC AAT TCA CAT AAC GTA TAT ATT ATG GCG GAC AAA CAA AAA AAT
eGFP	AAA CTT GAA TAT AAC TAC AAT TCA CAT AAC GTA TAT ATT ATG GCA GAC AAA CAA AAA AAT
	*
GFPf	GGT ATT AAA GTA AAC TTT AAA ATT CGT CAT AAT ATC GAG GAT GGT TCT GTA CAA TTA GCT
eGFP	GGT ATT AAA GTA AAC TTT AAA ATT CGT CAT AAT ATC GAG GAT GGT TCT GTA CAA TTA GCT
GFPf	GAC CAC TAT CAA CAA AAC ACA CCA ATT GGT GAT GGT CCT GTT TTA CTT CCA GAC AAT CAT
eGFP	GAC CAC TAT CAA CAA AAC ACA CCA ATT GGT GAT GGT CCT GTT TTA CTT CCA GAC AAT CAT
GFPf	TAT TTA AGT ACT CAA TCT GCT TTA TCA AAA GAT CCT AAC GAA AAA CGT GAC CAC ATG GTA
eGFP	TAT TTA AGT ACT CAA TCT GCT TTA TCA AAA GAT CCT AAC GAA AAA CGT GAC CAC ATG GTA
GFPf	TTA CTT GAA TTT GTT ACA GCA GCT GGT ATT ACT CAC GGT ATG GAT GAA TTA TAC AAA TAA
eGFP	TTA CTT GAA TTT GTT ACA GCA GCT GGT ATT ACT CTT GGT ATG GAT GAA TTA TAC AAA TAA
	**

## Anhang D: Signalpeptidsequenzen

Dargestellt sind Aminosäuresequenzen, die im Rahmen dieser Arbeit als Signalpeptide für den Transport rekombinanter Proteine über die Thylakoidmembran im Chloroplasten von *C. reinhardtii* verwendet wurden.

**OEE1:** (51AS)

MALRAAQSAKAGVRAARPNRATAVVCKAQKVGQAAAAAALATAMVAGSANA

**OEE3:** (51AS)

MALASKVATRPAVASRRGAVVVRASGESRRAVLGGLLASAVA AVAPKAALA

**MPT64:** (23AS)

MRIKIFMLVTAVVLLCCSGVATA

**HMPT:** (34AS)

MHHHHHHHHHHMRIKIFMLVTAVVLLCCSGVATA

**Abbildung 7.2: Verwendete Signalpeptidsequenzen.** Dargestellt sind die beiden Transitpeptide der kernkodierte *oxygen evolving enhancer*-Proteine (OEE) 1 (UniProtKB/Swiss-Prot: P12853.1) und 3 (UniProtKB/Swiss-Prot: P12852.1) aus *C. reinhardtii* sowie das Signalpeptid des von *M. tuberculosis* sezernierten MPT64 (UniProtKB/Swiss-Prot: P9WIN9.1) mit 10-fachem Histidin-TAG (HMPT) als auch ohne (MPT64). In Klammern ist die Anzahl der Aminosäuren (AS) angegeben.

## Anhang E: Ergebnis der MS-Analyse

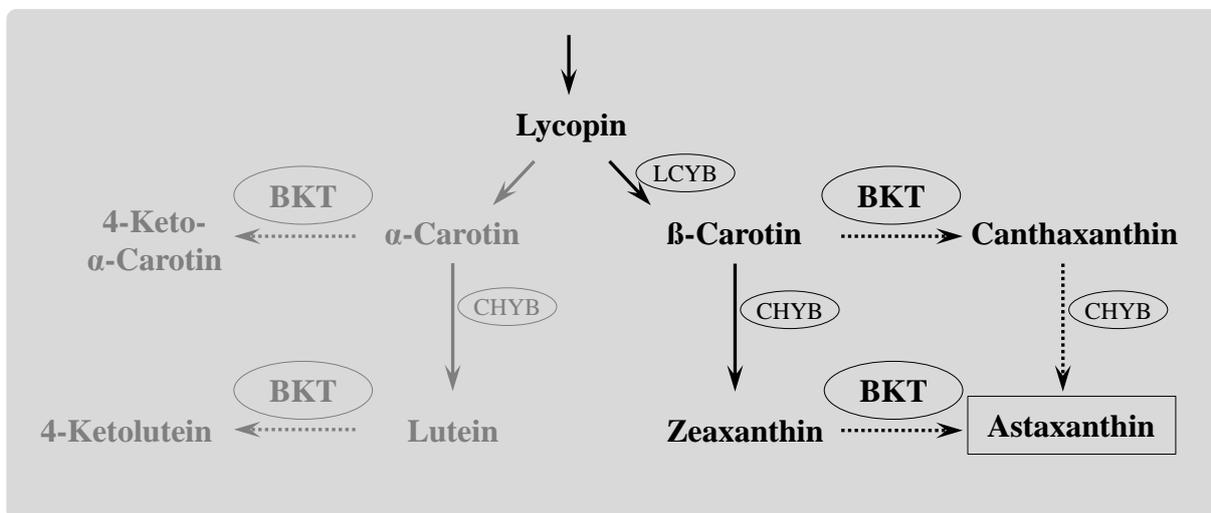
Gezeigt wird das massenspektrometrische Ergebnis der Proteinbande aus dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abb. 3.19a), die als MPT64-spezifisch dargestellt wurde. Mit der Identifizierung von 6 verschiedenen, dem MPT64 zuzuordnenden Peptiden wurde nachgewiesen, dass es sich um MPT64 handelt.



**Abbildung 7.3: MS-Analyse von rekombinant im Chloroplasten von *C. reinhardtii* exprimiertem MPT64.** Dargestellt ist die Proteinsequenz von MPT64 mit den darin enthaltenen Schnittstellen für Trypsin (▼). In der MS-Analyse, der aus dem SDS-Gel ausgeschnittenen und Trypsin-verdauten Proteinbande (Abb. 3.19a) konnten die grün dargestellten Fragmente identifiziert und dem MPT64 zugeordnet werden. Die nanoLC-HD-MS<sup>c</sup>-Analyse wurde freundlicherweise von Herrn S. Helm und Dr. D. Dobritzsch (MLU Halle-Wittenberg, Pflanzenbiochemie, AG Baginsky) durchgeführt.

## Anhang F: Astaxanthin-Biosynthese in *C. reinhardtii*

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Carotinoid-Biosynthese in *C. reinhardtii*. Gezeigt werden Enzyme und Substrate, die an der Bildung von Astaxanthin beteiligt sind.



**Abbildung 7.4: Biosynthese von Astaxanthin in *C. reinhardtii*.** Ausgehend vom Lycopin ist die Synthese von Astaxanthin mit den beteiligten Enzymen LCYB ( $\beta$ -Carotin-Zyklase), CHYB ( $\beta$ -Carotin-Hydroxylase) und BKT ( $\beta$ -Carotin-Ketolase) dargestellt. Pfeile mit unterbrochenen Linien markieren Reaktionen, die ausschließlich bei der Sporenbildung ablaufen. Reaktionen, die auch in vegetativen Zellen ablaufen, sind durch Pfeile mit durchgezogenen Linien dargestellt. Die Schlüsselenzyme CHYB und BKT sind jedoch nicht nur am Umsatz von  $\beta$ -Carotin, Canthaxanthin und Zeaxanthin zum Astaxanthin beteiligt. Zusätzliche Substrate der beiden Enzyme sind  $\alpha$ -Carotin und Lutein (hell-graue Darstellung links). Die Abbildung wurde verändert nach M. Bauch (2011) [245].

## Anhang G: Allgemeine Sequenzdaten

Dargestellt sind *C. reinhardtii*-spezifische Sequenzen des IL-Stammes, die in den Transgenen dieser Arbeit verwendet wurden. Bei den Sequenzen handelt es sich um ausgewählte Promotor-, 5'UTR- und 3'UTR-Bereiche der plastidären Gene *psbA*, *psbD*, *atpA*, *rbcL*, *rrnS* (16SrDNA) und *rrn7* (7SrDNA). Über Sequenzanalysen konnten vereinzelt Abweichungen (Markierungen in Rot) zu der 2002 von Maul *et al.* [30] veröffentlichten Plastomsequenz identifiziert werden. Diese Sequenz-Variationen sind IL-Stamm spezifisch und befinden sich in der Form innerhalb der Transgene. Auf die vollständige Darstellung der sequenzierten Transgene jeder *C. reinhardtii* Mutante wurde an dieser Stelle verzichtet.

### *psbA*-Gen:

Promotor:

CGTCCTATTTTAATACTCCGAAGGAGGCAGTTGGCAGGCAACTGCCACTGACGTCCCGTAAGGG  
TAAGGGGACGTCCACTGGCGTCCCCTAAGGGGAAGGGGACGTAGGTACATAAATGTGCTAGGT  
AACTAACGTTTGATTTTTTTGTGGTATAATATAT

5'UTR:

GTACCATGCTTTTAATAGAAGCTTGAATTTATAAATTAATAATTTTTTACAATATTTTACGGAGA  
AATTAANAACTTTAAAAAATTAACAT

3'UTR:

TTTTTTTTTAAACTAAAATAAATCTGGTTAACCATACCTGGTTTATTTTAGTTTATACACACTTTT  
CATATATATATACTTAATAGCTACCATAGGCAGTTGGCAGGACGTCCC

### *psbD*-Gen:

Promotor:

CCAGGCAATTGTCAC**TGGCGTC**CATAGTATATCAATATTGTAACAGATTGACACCCTTTAAGTAA  
ACATTTTTTTTT**GAGTCATAA**GGAT**TTC**CATATGAAATTAATGGATATTTGGTACATTTAATTCCAC  
AAAAATGTCCAATACTTAAAATACAAAATTAAGTATTAGTTGTAAACTTGACTAACATTTTA  
AATTTTAAATTTTTTCCTAATTATATATTTTACTTGCAAAATTTATAAAAATTTTATGCATTTT  
TATCATAATAATAAACCTTTATTCATGGTTTATAATATAATAATTGTGATGACTATGCACAAAG  
CAGTTCTAGTCCCATATATATAACTATATATAACCCGTTTAAAGATTTATTTAAAAATATGTGTG  
TAAAAATGCTTATTTTTAATTTTATTTTATATAAGTTATAATATTTAAATA

5'UTR:

CACAATGATTAATAAATAATAATAAATTTAACGTAACGATGAGTTGTTTTTTTTATTTTGGAG  
ATACACGCA

***atpA*-Gen:**

Promotor:

GTCAAAGTCATTTTTATAACTCGTCTCAAATACCTATAAACCCATTGTTCTTCTTTTTAGCTC  
 TAAGAACAATCAATTTATAAATATATTTATTATTATGCTATAATATAAATACTATATAAATACAT  
 TTACCTTTTTATAAATACA

5'UTR:

TTTACCTTTTTTTAATTTGCATGATTTTAATGCTTATGCTATCTTTTTATTTAGTCCATAAAACC  
 TTTAAAGGACCTTTTCTTATGGGATATTTATATTTTCTAACAAAGCAATCGGGCGTCATAAACTT  
 TAGTTGCTTACGACGCCTGTGGACGTCCCCCCTTCCCCTTACGGGCAAGTAACTTAGGGATTT  
 TAATGCAATAAATAAATTTGTCTCTTCGGGCAAATGAATTTTAGTATTTAAATATGACGAGGG  
 TGAACCATTACTTTTGTTAACAAGTGATCTTACCACTCACTATTTTGTGGAATTTAAACTTATT  
 TAAAATTCTCGAGAAAGATTTTAAAAATAAACTTTTTTAATCTTTTATTTATTTTTCTTTTTT

***rbcL*-Gen:**

3'UTR:

TTTTTATTTTTCATGATGTTTATGTGAATAGCATAAACATCGTTTTTATTTTTTATGGTGTTTAGG  
 TTAAATACCTAAACATCATTTTACATTTTTAAAATTAAGTTCTAAAGTTATCTTTTGTTTAAATTT  
 GCCTGTGCTTTATAAATTACGATGTGCCAGAAAAATAAAATCTTAGCTTTTTATTATAGAATTTA  
 TCTTTATGTATTATTTTTATAAGTTATAATAAAAGAAATAGTAACATACTAAAGCGGATGTAA  
 CTCAATCGGTAGAGTGCGATCCTTCCAAGTTCGAGGTTGTGGGTTTCGAGTCCCATCATCCGCTA  
 AACCAATCTATAAAAGTTGTTGAATATGCTGAAATGTTTTCAAAGAAAAAGCCTAGTTTTTCTTT  
 TACAACAAGCAAAGAACAATTGGCATTCTTTGATTGTAAGAAAATGCGCTTACGTGGAGTTATG  
 TGTT

***rrnS*-Gen (16SrDNA):**

Promotor:

CAGGCAACAATTTATTTATTGTCCGCTAAGGGGAAGGGGAAAAACAATTATTATTTTACTGCGG  
 AGCAGCTTGTATTAGAAAATTTTTATTAATAAAAAAAAAAATAAAAAATTTGACAAAAAAAAATAAAA  
 AAGTTAAATTAATAAACTGGGAATGTTCTAACAAATCATAAAAAAATCAAAGGGTTTAAAT  
 CCGACAAAATTTAAACTTTAAAGAGTATC

***rrn7*-Gen (7SrDNA):**

Promotor:

GATATCAATGTTAGTGGCAGTGGCCTGCACTGCCGAATTTATTAGCCGATAGGCGACGCCAGCT  
 GATATTTATATFCGCTGCTTTGCAGGGCCCCGAAGGGGAAGATTTAATGCTGCGTTAAACTTTA  
 GTTACCCAATATTTATATTAGGATGTTAATACAATAAATAAATTTGTTGGCAGGCAACAAATTT  
 ATTTATTGTATATAAATATCCACTAATATTTATATTTCCCGTAAGGGGACGTCCCGAAGGGGAAG  
 GGGTTTACATACGATATTTATATACTATAGCAGGTAGCCACTAAATATTAAGAGCGAATCAAAA  
 TCCGAAAAATAAAGTAACTTTCTGCTAAAGAGGTTTATTTTTGTTTTATAAGGTCAAATGA

## Anhang H: Sequenz von pMM2

CACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTT  
AACCAATAGGCCGAAATCGGC AAAATCCCTTATAAAATCAAAAAGAAATAGACCGGAGATAGGGTTGAGTGT  
TGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCG  
TCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTA  
AAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAAGCCGGCGAACGT  
GGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTAC  
GCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTAG  
GCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAAGGG  
GATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACG  
GCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGGTGACGCG  
TATCGATAAGCTTGATATCGAATTCATATTTAGATAAACGATTTCAAGCAGCAGAATTAGCTTTATTA  
GAACAACTTGTAAGAAATGAATGTACCAATGCCGCGCATTGTAGAAAAACCAGATAATTATTATCA  
AATTCGACGTATACGTGAATTA AAAACCTGATTTAACGATTACTGGAATGGCAGATGCAAAATCCATTAG  
AAGTCGAGGTATTACAACAAAATGGTCAGTTGAATTTACTTTTGTCAAATTCATGGATTTACTAAATA  
CACGTGAAATTTAGAATTAGTAACACAGCCTCTTAGACGCAATCTAATGTCAAATCAATCTGTAATG  
CTATTTCTTAATATAAATCCCAAAAGATTTTTTTTATAATACTGAGACTTCAACACTTACTTGTTTTTATT  
TTTTGTAGTTACAATTCACCTACGTTAAAGACATTTGAAAAATGAGGCAGGACGTTAGTCGATATTTATA  
CACTCTTAAGTTTACTTGCCCAATATTTATATTAGGACGTCCCTTCGGGTAATAAAATTTTAGTGGCAG  
TGGTACCACCAGCTGCCTATTTAATACTCCGAAGCATATAAATACTTCGGAGTATATAAATATCCAC  
TAATATTTATATTAGGCAGTTGGCAGGCAACAATAAATAAATTTGCCCGTAAGGGGACGTCCCGAAG  
GGGAAGGGGAAGAAGGCAGTTGCCTCGCCTATCGGCTAACAAAGTTCTTTGGAGTATATAACCGCCTA  
CAGGTAACCTAAAGAACATTTGTTACCCGTAGGGGTTTATACTTCTAATTGCTTCTTCTGAACAATAAA  
ATGGTTTGTGTGGTCTGGGCTAGGAACTTGTAAACAATGTGTAGTGTGCTTCCGCTTCCCTTCGGGAC  
GTCCCTTCGGGTAAGTAACTTAGGAGTATAAATCGGGACGTCCCTTCGGGTAATAAATTTTCCAGT  
GGACGTCCCTTACGGGACGCCAGTAGACGTAGTGGCAGTTGCCTCGCCTATCGGCTAACAAAGTTCT  
TCGGAGTATATAAATATAGAATGTTTACATACTCCTAAGTTTACTTGCCTCCTTCGGAGTATATAAATA  
TCCCGAAGGGGAAGGAGGACGCCAGTGGCAGTGGTACCGCCACTGCCTGCTTCTCCTTCGGAGTATG  
TAAACCCCTTCGGCAACTAAAGTTTATCGCAGTATATAAATATAGGCAGTTGGCAGGCAACTGCCAC  
TGACGTCCTATTTAATACTCCGAAGGAGGCAGTTGGCAGGCAACTGCCACTGACGTCCCCTAAGGGT  
AAGGGGACGTCCACTGGCTCCCGTAAGGGGAAGGGGACGTAGGTACATAAAATGTGCTAGTAACTA  
ACGTTTGATTTTTTGTGGTATAAATATATGTACCAATGCTTTTTAATAGAAGCTTGAATTTATAAATTA  
ATTTTTACAATATTTTACGGAGAAATTA AAACTTTAAAAAAAATTAACATATGACAGCAATTTTAGAACG  
TCGTGAAAATTTAGCCTATGGGCTCGTTTTTGTGAGTGGATCACTTCAACTGAAAACCGTTTATACAT  
CGGTTGGTTCGGTGTAATCATGATCCCATGTCTTCTTACTGCAACATCAGTATTCATCATCGCTTTCATC  
CGTGTCCGCCAGTAGACATCGATGGTATCCGTGAACCAAGTTTCAGGTTCTTCTTTCATCGTTAACAC  
ATCATTACGGTGTGCTAATCCCAACTTCAACGCAATCGGCTTCACTTCTACCCAAATTTGGGAAGCT  
GCTTCTTAGACGAGTGGTTATAACAACGGTGGTCTTACCAACTTATCGTTTTGTCACCTTCTTCTAGGTG  
TATACTGCTACATGGGTCGTGAGTGGGAATTATCTTCCGTTTAGGTATGCGTCCATGGATCGCTGTAG  
CTTACTCAGCTCCAGTAGCTGCAGCTTCAGCTGTATTCTTAGTTTACCCTATCGGCCAAGGTTTCACTC  
TGACGGTATGCCTTTAGGTATCTCTGGTACTTTCAACTTCAATGATCGTATTCCAAGCAGAACAACAAT  
CCTTAGCACCCATTCCACATGTTAGGTGTTGCTGGGTATTCCGGTGGTTCATTATTCTCAGCTATGCAC  
GGTCTTTAGTTACTTCACTTTAATCCGTGAAAACAAGTAAAACGAATCAGCTAACGAAGGTTACCGT  
TTCGGTCAAGAAGAAGAACTTACAACATTTAGCTGCTCATGGTTACTTTGGTCTAATCTTCCAA  
TACGTTCTTTCAACAACCTCTCGTTACATTACACTTCTTCTAGCTGCTTGGCCGGTAATCGGTATTTGGT  
TCACTGCTTTAGGTTTATCAACTATGGCATTCAACTTAAACGGTTTCAACTTCAACCAATCAGTAGTAG  
ACTACAAGGTCGTGACTAAACACTTGGGCAGACATCAACCGTGTAACTTAAAGTATGGAAGTA  
ATGCACGACGCTAACGCTCACAACTTCCCTTAGACTTAGCTTCAACTAACTTAGCTCAAACAACCTAA  
TTTTTTTTTAACTAAAATAAATCTGGTTAACCATACCTGGTTTATTTTAGTTTATACACACTTTTCATAT  
ATATATACTTAATAGCTACCATAGGCAGTTGGCAGGACGTCCCTTACGGGACAAAATGATTTATTGTT  
GCCTGCCAACTGCCTAATATAAATATTAGTGGACGTCCCTTCCCTTACGGGCAAGTAACTTAGGGA  
TTTTAATGCTCCGTTAGGAGGCAATAAATTTTAGTGGCAGTTGCCTCGCCTATCGGCTAACAAAGTTCC  
TTCGGAGTATATAAATATCCTGCCAACTGCCGATATTATATACTAGGCAGTGGCGGTACCCTCGACT  
AATATTTATATTCCGTAAGACGTCTCCTTCGGAGTATGTAACATGCTAAGTTTACTTGCCCAATATTT  
ATATTAGGACGTCAGTGGCAGTGGACCACACTCGTATTTTATACTCGAAAGGCAGTTGGCAGGCAAC  
TCGACTAAAATTTATTTACCCGAAGACGTCCCGAAGAAGGGGAAGGAGGCAGTGGTACCACCCTGGC  
TCCGCAGTATTAACATCCTATATTTATACTCCGAAGAACTTCTTAGCCGATGGCAACTGCCACAAA  
AACCATCGGCTTCGTTTACACACAGATGGTGAGAACCACACGTTTCGTCCTATAAAAAATAGCTAAGTTTA  
CTTGCCCAATATTTATATTAGGACGTCCCTTCGGTAAATAAATTTTAGTGGCTGTGTGACGTTCACTGG  
CGTCTTGGTAGGTTCTGTGACTGACTAAATAAAAAAGTATTTGTGCTACGATATGTAATCTGTGCT  
ATACGATATGTAATTTGAGCTCTTATGGCCTTACATCGAGGTTTATTATCTTACCGAAGGTAATGC  
CTTCGTGGATCTTATGGGACGTCTGTGTCCTTCTAGTGGTCAATAACTTTCGTGACAGCCTGGGTT  
TACATTTATATAAGCGCTGTTATTTATACGCTGTAGACAAGGTTTAAATACATAAATTTTATTAGT  
CTATCGACCGTTAATTTGCTTAACTTACCGAAGGTTAATCGCTTACTTACCGAAGGTTAATCGCTTACT  
TACCGAAGGTTAATTGCTTAACTTACTGAAGGTTAATCGCTTACTTACCGAAGGTTAATTGCTTAACT  
ACTGAAGGTTAATCGCTTACTTACCGAAGGTTAATCCAATTTTTTTTCGCCATATGTAGACGTTTAAAT  
TGCTACAACGTTATTAGCCTTTCGTGCTATCAAATCGGTTTACAGATATATATCACTTTATTCACTTTCG  
TTATATTATGGCTGGATTAGGCTTTTAGTTAATTAATAAATTTACATATTTAATGCTATTTATTATTG  
AATTGCATTAATAATTTTTTTAAAAAAAATTAATCTTCAGCTATATTAGTAAATAACCCATAAATAGTT

pBSK+

plastidäre *C. reinhardtii* SequenzpsbA  
(IL)

TCAATTGGAATAAATTGGAATTGGATATGGACTAGTTTTATTTCTTCTAATAACTTTAATATCGCTGGAT  
 CTTGAGGTA **GAGACC** AAAGCTAGCAA **GGTCTC** AGCTTGACCCGGGGAAGGGGACGTCCTAAACGGA **MCS**  
 GCATTAAAACCCCTAAGTTTACTTGCCTAGGCACTGGCCAGGATATTTATATACGATATTAATACTTTG  
 CAATGCCACTAAAATTTATTGCCGAAGGGAGCTCCCTCGGAGTATATAAATATCCCCTAAGGGG  
 AAGGGGATGTCCCGTAAGGGGAAGGGGAGAAGCTCCAACAGAGGTTGGAGCTTCTTTAGTTTCTAGG  
 CATTATTTAAATATTTTTTAAACCTAGCACTAGAAGTGGAGATTCCAGACGGCGACCCGTAAAGTTCTTC  
**rrn5**  
**(5S)**  
 AGTCCCCTCAGCTTTTTTACAACCAAGTTCGGGATGGATTGGTGTGGGTCCAACCTGAGCAAAGAGCAC  
 CAAGGTTAACTGCATCTCTGTGAGATGTAGTTAAACTAAGCTTAGCTTAGCTCATAAACGATAGTTAC  
 CCGCAAGGGGTTATGTAATTATATTATAAGGTCAAATCAAACGGCCTTAGTATATCTCGGCTAAAGC  
 CATTGCTGACTGTACACCTGATACCTATATAACGGCTGTCTAGCCGGCCCTTAGAGAGCACTCATCT  
 TGAGTTTAGCTTCTACTTAGATGCTTTCAGCAGTTATCTATCCATGCGTAGCTACCCAGCGTTTCCCAT  
 TGGAATGAGAAGTGGTACACAATTGGCATGTCTTTCAGGTCCTCTCGTACTATGAAAGGCTACTCTCA  
 ATGCTCTAACGCCTACCCGGATGGACCAAAGTGTCTCACGCATGAAATTTTAAAGCCGAATAAAA  
 CTGGCGTCTTAAACCTAACCCCTTACTTTTCGTAAGGCATGGACTATGCTTTCATCTCGTACTGTT  
 AATGGCAGGAGTCGGCGTATTATACTTTCCACTCTCGAGAAAATATCCTATAAATCGAGCAACAATA  
 AATAAATTGTATGTAACATTTCTTTTAGAGATTGGCTAAAATTTATAAAGTCTCTACGGGGACGATTTCT  
 TTTTTCACTTAAACTGTCTAGCACAGCAGAACGGTTTCAGAAGTTGTTTTACGCGTCTTCAATCATT  
 CAGAGCTGCAATTTGATCCACCCATGTACAAACTTCTAAGAATTTGTCGGGGATTCTTTTGTGACGG  
 AAGCCGCCAAATAATTTTAAACTAAAATTTGCTTGTTTTTGTTTTAGTTTTAGAAAAGGTTGTAGTTGT  
 GTTAAAAAATTATGCAAAAGGCTTGATTTTCGTTAGAAATAAATCCGAAACGCTACCCCTATCTTACA  
 TAACCAACCCCAATTTATCCACTAATTTGTCTAAAAACCAACGCTCTGTGTCTTTTGGTGTACTTGG  
 ACGCGAGTGATAGCTGATGCTTAAATTTATAAGACTGATTAGGCTTAAATTTGAGCGATTATGCTACCGT  
 CACCGTCTACAAACCTGCTAAGTAGAGTAAGAAGTCTTTATTATATTTTGTATTATAAGATGTTTTAT  
 TTAATTTATTGAATTTATAACCAAAAAGAAATGGTCTCCCTCGGCGTTGCCATCTATTGCCACGAA  
 TGTGGTTTATGCGACAGTTTGTACTTAAAACAATAGGAAGGTTTACCGATATAACCGGATACTTTGCT  
 TACATTACTGCAAGCACACGCAGTGTATTTACGTTTTGAACCCAGCTCACGTACCCTTAAATGGGCG  
 AACAGCCCAACCCCTCGGACCTACTACAGACCGAGGATGTGATGAGCCGACATCGAGGTGCCAAACCT  
 TCCCGTCGATGTGAACTCTTGGGGAAGATCAGCCTGTTATCCCTAGAGTAACTTTTATCCGTTGAGCGA  
 CGGCCCTTCCACGCGGACCCGTCGGATCACTAAGGCCGGCTTTCCGCCCTGCTCGACTTGTAGGTCCTG  
 CAGTCAAGCTCCCTTTTGCCTTACACTCAATGTCTGATTTCCGTCAGACTGAGGGAACCTTTGCACGC  
 CTCCGTTACCTTTTAGGAGGCAATTCGCCCAAATAAACTGCCACCTGAAACTGTCAAGGGTCTGATT  
 CAAGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGG  
 GTTAATTTTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATT  
 CCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCAC  
 ATTAATTCGCTTTCGCTCAGTCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAAT  
 CGGCCAACGCGCGGGGAGGGCGTTTTGCGTATTGGGCGCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTGCTCGCT  
 GCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG  
 AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAA  
 AGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAA  
 GTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTG  
 CGTCTCCCTGTTCCGACCTGCCGTTACCGGATACCTGTCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC  
 TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGC  
 ACGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAA  
 GACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGT  
 GCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCT  
 CTAGTGAAGCCAGTTACTTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTTTGATCCGGCAAACAAACCCGCTGG  
 TAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCCTT  
 GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATT  
 ATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATA  
 TGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGACACCTATCTCAGCGATCTGTCTATT  
 TCGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCGTCTGCTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGG  
 CCCCAGTGTGCAATGATACCGCGGGACCCACGCTCACCAGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACACG  
 CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTT  
 GCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGC  
 ATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTT  
 ACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGTCTCTCCGTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAG  
 TTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAA  
 GATGCTTTTCTGTGACTGGTGTACTCAACCAAGTCACTTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT  
 GCTCTTGGCCGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTAAAAGTGTCTCATCATTG  
 GAAAACGTTTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCA  
 CTCGTGCACCCAACTGATCTTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACGAA  
 GGCAAAATGCCGAAAAAGGGAATAAGGGCGACAGGAAATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTT  
 CAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAA  
 AATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGC

plastidäre *C. reinhardtii* Sequenz

pBSK+

*amp<sup>R</sup>*

**Abbildung 7.5: Nukleotidsequenz von Vektor pMM2.** Dargestellt sind die gesamten 9074bp mit dem pBSK+ „Rückgrat“ einschließlich des Ampicilin-Resistenzgens (*amp<sup>R</sup>*) und der Plastomsequenz mit dem intronlosen *psbA*-Gen (IL), dem *rrn5*-Gen (5S) und der MCS mit den hervorgehobenen BsaI Erkennungs- (rot) und Schnittsequenzen (grau).

## Anhang I: Gesamtschau aller Transgenkonstrukte

Zur besseren Übersicht sind alle in dieser Arbeit erstellten Transgenkonstrukte, die über GGS erfolgreich zusammengesetzt und in den pMM2-Vektor inseriert werden konnten, dargestellt. Darüber hinaus ist angegeben, ob nach der Transformation eine Mutante erhalten und das Fremdprotein detektiert werden konnte. Nutzen Sie die Grafik, um beim Lesen dieser Arbeit stets einen guten Überblick zu haben.

	Promotor- oder UTR-Sequenz
	Protein-kodierende Sequenz
	Mutante erhalten bzw. Protein detektiert
	Mutante nicht erhalten bzw. Protein nicht detektiert
SP	Signalpeptid
HA	Hämagglutinin-TAG
His	10-facher Histidin-TAG

Legende für die nachfolgende Grafik

Transgenkonstrukte		Mutante	Protein
	psbA/MPT	✓	✓
	psbD/MPT	✓	✓
	atpA/MPT	✓	✓
	16S/MPT	✗	✗
	16S/HMPT	✓	✓
	7S16S/HMPT	✓	✓
	K/MPT	✓	✓
	SP1MPT	✓	✓
	SP3MPT	✓	✓
	K/GFP	✓	✓
	HSP <sub>M</sub> GFP	✓	✓
	SP1GFP	✓	✓
	SP3GFP	✓	✓
	psbD/PF4	✓	✗
	atpA/PF4	✓	✗
	16S/HPF4	✓	✗
	HSP <sub>M</sub> PF4	✓	✗
	SP1PF4	✓	✗
	SP3PF4	✓	✗
	16S/ecPF4	✓	✗
	SP1ecPF4	✓	✗
	SP3ecPF4	✓	✓
	16S/PCS	✓	✓
	16S/BKT	✗	✗

## Publikationen:

- Johanningmeier U, Bertalan I, Hilbig L, Schulze J, Wilski S, Zeidler E, *et al.* Engineering the D1 Subunit of Photosystem II. *Biotechnol. Appl. Photosynth. Proteins Biochips, Biosens. Biodevices*, 2006, p. 46–56.
- Bertalan I, Esposito D, Torzillo G, Faraloni C, Johanningmeier U, Giardi MT. Photosystem II stress tolerance in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* under space conditions. *Microgravity Sci Technol* 2007;19:122–7.
- Rea G, Esposito D, Damasso M, Serafini A, Margonelli A, Faraloni C, *et al.* Ionizing radiation impacts photochemical quantum yield and oxygen evolution activity of Photosystem II in photosynthetic microorganisms. *Int J Radiat Biol* 2008;84:867–77
- Rea G, Lambreva M, Polticelli F, Bertalan I, Antonacci A, Pastorelli S, *et al.* Directed evolution and in silico analysis of reaction centre proteins reveal molecular signatures of photosynthesis adaptation to radiation pressure. *PLoS One* 2011;6:e16216
- Weiß C, Bertalan I, Johanningmeier U. Effects of rare codon clusters on the expression of a high-turnover chloroplast protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* 2012;160:105–11
- Giardi MT, Rea G, Lambreva MD, Antonacci A, Pastorelli S, Bertalan I, *et al.* Mutations of Photosystem II D1 Protein That Empower Efficient Phenotypes of *Chlamydomonas reinhardtii* under Extreme Environment in Space. *PLoS One* 2013;8:e64352
- Lambreva MD, Giardi MT, Rambaldi I, Antonacci A, Pastorelli S, Bertalan I, *et al.* A powerful molecular engineering tool provided efficient *Chlamydomonas* mutants as bio-sensing elements for herbicides detection. *PLoS One* 2013;8:e61851.
- Bertalan I, Munder MC, Weiß C, Kopf J, Fischer D, Johanningmeier U. A rapid, modular and marker-free chloroplast expression system for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* 2014;195:60–6.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden von mir als solche kenntlich gemacht. Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich zum ersten Mal um die Erlangung des Doktorgrades.

Ivo Bertalan

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all den Menschen bedanken, die das Entstehen dieser Arbeit erst ermöglicht haben:

**Prof. Dr. Udo Johanningmeier**, für sein in mich gesetztes Vertrauen, seine fortwährenden Inspirationen und den gewährten Raum eigene Ideen zu verfolgen.

**Ehemalige und aktive Mitarbeiter der AG Zellphysiologie sowie zahlreichen Studenten**, die einen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen aber ...

**Jana Schulze** - „meine Betreuerin“, **Dirk Fischer** - „mein alter Mitstreiter“,

**Marlies Wolf** - „die gute Seele des Labors“, **Caroline Weiß**, **Judith Kopf**,

**Matthias Munder**, **André Breitbach**, **Daniel Schröter** und **Kathrin Pohle**

**Allen Mitarbeitern des Fachbereichs Pflanzenphysiologie**, für die nette Atmosphäre im Institut und die verlässliche Hilfsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art.

**Herrn Dr. D. Dobritzsch** und **Herrn S. Helm**, für die massenspektrometrische Analyse.

**Herrn Dr. Gerd Hause**, für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

**Herrn Dr. Ralf Dostatni**, für MPT64, PF4, das gewährte Vertrauen und die reizvolle Zusammenarbeit und für die Unterstützung von **Frau Dr. Gertrud Eberle** und **Frau Susanne Mauracher**.

**Meinen Eltern**, für die Förderung, den Rückhalt und den Glauben an mich.

**Meiner Frau Michaela**, für das Korrekturlesen, den beharrlichen Druck endlich fertig zu werden und das entgegengebrachte Verständnis für die viele im Labor verbrachte Zeit.

**Meinen Kindern Timi und Nika**, für die nötige Ablenkung und Freude im Leben.

## **Lebenslauf**

### **Ivo Bertalan**

geboren am: 12.01.1978 in Finsterwalde

verheiratet, zwei Kinder

wohnhaft in Halle (Saale)

### **Berufstätigkeit**

seit 2015      wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Abteilung Zellphysiologie von Prof. Dr. U. Johanningmeier

2014 - 2015    arbeitssuchend

2004 - 2014    wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Abteilung Zellphysiologie von Prof. Dr. U. Johanningmeier

### **Studium**

1998 - 2004    Biologie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Diplomarbeit zum Thema: „Ungerichtete Mutagenese der D1-Untereinheit von Photosystem II“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Johanningmeier

### **Wehrdienst**

1997 - 1998    Sanitätssoldat im Fallschirmjägerbataillons 373 in Doberlug-Kirchhain

### **Schulbildung**

1990 - 1997    Abitur an der städtischen Gesamtschule Finsterwalde

1984 - 1990    1. Oberschule Finsterwalde