

„Der Einfluss seltener Codons auf die Expression plastidencodierter Proteine“

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

Caroline Weiß

geboren am 20.01.1983 in Suhl

Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Johanningmeier
2. Prof. Dr. S. Baginsky
3. PD Dr. T. Pfannschmidt

Halle (Saale), 24.05.2012

Tag der öffentlichen Verteidigung: 23.10.2012

„Die Wissenschaft von heute
ist der Irrtum von morgen.“

Jakob von Üxküll

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis im Dokument.....	6
Tabellenverzeichnis im Dokument.....	7
1 Einleitung	8
1.1 Der Genetische Code.....	8
1.2 Genexpression in Plastiden.....	9
1.3 <i>Codon Usage</i>	12
1.3.1 <i>Codon usage</i> Effekte und die regulatorische Relevanz seltener Codons.....	13
1.3.2 Translationsprobleme durch seltene Codons.....	14
1.3.3 Bedeutung der <i>Codon Usage</i> für die heterologe Genexpression.....	16
1.4 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> als Bioreaktor.....	16
1.5 Chloroplasten – semiautonome Organellen als Proteinfabriken.....	18
1.5.1 Das Plastom.....	19
1.5.2 Das D1-Protein und die Funktion im Elektronentransport.....	19
1.6 Zielstellung.....	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	23
2.2 Algenstämme und Anzuchtbedingungen.....	23
2.3 Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen.....	25
2.4 Messverfahren.....	25
2.4.1 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes.....	25
2.4.2 Zellzahlbestimmung.....	25
2.4.3 Messung des Algenwachstums.....	26
2.4.4 Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung.....	26
2.4.5 Messung der Photosystem II-Effizienz.....	27
2.4.6 Messung der D1-Proteinlevel.....	27
2.5 Oligonucleotide.....	27
2.6 Plasmide.....	27
2.7 DNA-Methoden.....	28
2.7.1 Isolation genomischer DNA aus <i>C. reinhardtii</i>	28
2.7.2 Isolation genomischer DNA aus <i>Synechocystis sp</i> PCC6803.....	29
2.7.3 Isolation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	29
2.7.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
2.7.5 DNA-Sequenzierung.....	29
2.7.6 Erzeugung der Plasmide.....	30
2.7.7 Polymerasekettenreaktion.....	30
2.7.8 Mutagenese zur Erzeugung der <i>psbA</i> -Mutanten.....	30
2.7.9 Mutagenese zur Erzeugung der <i>AadA</i> -Mutanten.....	31
2.7.10 Mutagenese zur Erzeugung der GFP- sowie tmGFP-Mutanten.....	31
2.7.11 Kolonie-PCR an <i>C. reinhardtii</i> Kulturen.....	32
2.7.12 Agarosegelelektrophorese.....	32

2.7.13	Reinigung von PCR-Produkten, DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	32
2.8	RNA-Methoden	32
2.8.1	Isolation von Gesamtzell-RNA aus <i>C. reinhardtii</i>	32
2.9	Protein-Methoden.....	33
2.9.1	Isolation von Gesamtzell-Protein aus <i>C. reinhardtii</i>	33
2.9.2	Fraktionierte Proteinisolation aus <i>C. reinhardtii</i>	33
2.9.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	33
2.9.4	Reinigung der fraktionierten Proteinproben mit Kit	34
2.9.5	Acetonfällung	34
2.9.6	SDS-PAGE.....	34
2.9.7	Coomassie kolloidal Färbung.....	36
2.10	Blotting Verfahren	36
2.10.1	Southern und Northern Blot	36
2.10.2	<i>Semi Dry</i> Western Blot	37
2.11	Transformation.....	37
2.11.1	Chloroplastentransformation von <i>C. reinhardtii</i>	37
2.11.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	37
2.11.3	Transformation von <i>E. coli</i>	38
2.12	Physiologische Methoden	38
2.12.1	<i>Droptest</i>	38
2.12.2	Photoinhibition.....	38
2.12.3	Puls-Markierung.....	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Etablierung eines Codon Test Systems.....	40
3.1.1	Sequenzierung und Test auf Homoplasmie	43
3.1.2	Wachstumsraten	44
3.1.3	Sauerstoffproduktionsrate	45
3.1.4	Photosystem II Effizienz	46
3.1.5	Analyse der D1-Level unter Starklichtbedingungen.....	47
3.1.6	PSII-Effizienz unter Starklichtbedingungen	48
3.1.7	<i>in vivo</i> Markierung des D1-Proteins	49
3.2	Der Einfluss selten genutzter Arg-Codons auf die heterologe Proteinexpression	51
3.2.1	Erzeugung der AadA-, GFP- und tmGFP-Mutanten.....	52
3.2.2	Sequenzierung und Test auf Homoplasmie	54
3.2.3	Northern Blot Analyse	55
3.2.4	<i>Codon usage</i> Effekte auf die Expression von AadA	57
3.2.5	<i>Codon usage</i> Effekte auf die Expression von GFP	60
3.2.6	Integration einer tmRNA in das Plastom.....	63
4	Diskussion	66
4.1	Codon Test System	66
4.1.1	Arginin	67
4.1.2	Leucin	70
4.1.3	Alanin.....	71
4.1.4	Glycin.....	72

4.1.5	Serin.....	73
4.2	Anpassung der Arg-codon usage des <i>aadA</i> -Gens.....	78
4.3	Effekte der Arg-codon usage auf die Expression von GFP	81
4.4	Insertion einer tmRNA in das Plastom der Grünalge	83
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis	88
7	Anhang	102
	I Primertabellen:.....	102
	II Codon usage Tabellen für <i>C. reinhardtii</i>	106
	III Sequenzierungen.....	107
	IV Wachstumskurven der AadA Mutanten in Flüssigkultur	114
	Publikationen	115
	Eidesstattliche Erklärung.....	116
	Danksagung	117
	Lebenslauf	118

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest	destilliertes Wasser
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHAPS	3 [(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propan-sulfonat
Chl	Chlorophyll
Ci	Curie
CP43	zentrales Chlorophyll α -Protein des LHCII am Photosystem II
CP47	zentrales Chlorophyll α -Protein des LHCII am Photosystem II
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-Chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate
D1	PsbA-Protein, 32 kDa Untereinheit des Photosystems II
D2	PsbD-Protein, 33 kDa Untereinheit des Photosystems II
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al</i>	et alii (und andere)
E64	<i>N</i> -[<i>N</i> -(<i>L</i> -3- <i>trans</i> -carboxyirane-2-carbonyl)- <i>L</i> -leucyl]-agmatine
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F ₀	minimale Fluoreszenz
F _M	maximale Fluoreszenz
F _V	variable Fluoreszenz
Freq	Frequenz
<i>g</i>	Vielfaches der mittleren Normalfallbeschleunigung
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HS	<i>high salt</i>
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LHC	Lichtsammelkomplex (<i>light-harvesting complex</i>)
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-Propansulfonsäure

mRNA	<i>messenger</i> RNA
Myc	Polypeptid des c-Myc-Genes
N	Nukleobase
NADP	Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinukleotid-Phosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
p.a.	pro analysi (zur Analyse)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
pD1	<i>precursor</i> D1-Protein
pI	isoelektrischer Punkt
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PVDF	Polyvinyliden Difluorid Membran
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskonstante
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SSC	Sodium-Sodiumcitrat
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> -Medium plus Glucose
T	Thymin
TAP	Tris-Acetat-Phosphat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
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</i> RNA
tmRNA	<i>transfer-messenger</i> RNA
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-Monolaurat
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UTR	nichtcodierender Bereich (<i>untranslated region</i>)
v/v	Volumen zu Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht zu Volumen

Aminosäuren wurden nach dem Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code entsprechend den IUPAC-IUB Vereinbarungen von 1969 abgekürzt.

Abbildungsverzeichnis im Dokument

Abb. 1-1 Schematische Darstellung der Translation	12
Abb. 1-2 Schematische Darstellung der <i>trans</i> -Translation.....	15
Abb. 1-3 Elektronentransport über die Photosynthesekomplexe in der Thylakoidmembran.....	20
Abb. 2-1 Ausschnitt der Plastomsequenz von Wildtyp <i>C. reinhardtii</i> sowie den Plasmiden pMM2 und pTrans.	28
Abb. 3-1 Schematische Darstellung des D1-Proteins.	40
Abb. 3-2 Test der <i>psbA</i> -Mutanten auf Homoplasmie.	43
Abb. 3-3 Wachstumsraten der <i>psbA</i> -Mutanten.....	44
Abb. 3-4 SPR der Mutanten.....	45
Abb. 3-5 D1-Protein Level während Starklichtbestrahlung sowie zugehörige repräsentative Western Blot Analysen.	48
Abb. 3-6 PSII-Effizienz der Mutanten Ser3h und Ser3s nach Starklichtbestrahlung	49
Abb. 3-7 <i>In vivo</i> Markierung der plastidären Proteine von Mutante Ser3s und Ser3h	50
Abb. 3-8 Homologe Rekombination zwischen FUD7-Plastom und den Plasmiden pCW (3-7)	54
Abb. 3-9 Southern Blot Analyse des FUD7-Stammes sowie der Transformanten tmGF5P5h, tmGF5s, GFP5h, GFP5s, AadAh und AadAs.....	55
Abb. 3-10 Northern Blot Analysen der FUD7 sowie der Transformanten	56
Abb. 3-11 <i>Drop Test</i> Analyse.	57
Abb. 3-12 Wachstumsraten der AadA-Mutanten.	58
Abb. 3-13 Quantifizierung von AadA-Protein der Mutanten AadAh und AadAs	60
Abb. 3-14 Expression von GFP unter Anzucht der Algen bei 24°C in TAP-Medium und Schwachlicht	61
Abb. 3-15 Expression von GFP unter Anzucht der Algen bei 24°C, konstanter CO ₂ Begasung (2,5 %) und einer Lichtintensität von 80 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	63
Abb. 3-16 Western Blot Analysen der Mutanten IL, tmGF5h und tmGF5s nach eindimensionaler SDS-PAGE.....	64
Abb. 3-17 Western Blot Analysen der Mutanten IL, tmGF5h und tmGF5s nach zweidimensionaler SDS-PAGE.....	65
Abb. 7-1 Auschnitte der Elektropherogramme der Sequenzierungsreaktionen der Mutanten. .	107
Abb. 7-2 Wachstumskurven der Mutanten AadAh und AadAs.....	114

Tabellenverzeichnis im Dokument

Tabelle 1-1 Standard Codon-Tabelle	8
Tabelle 2-1 Im Rahmen der Arbeit erstellte Plasmide	28
Tabelle 2-2 Erzeugung der Plasmide	30
Tabelle 2-3 Verwendetes Programm der isoelektrischen Fokussierung.....	35
Tabelle 3-1 Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante	41
Tabelle 3-2 Fv/Fm-Werte der Mutanten	46
Tabelle 4-1 Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit den gewählten Arg-Codons.....	67
Tabelle 4-2 Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit den gewählten Leu-Codons.	70
Tabelle 4-3 Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit den gewählten Ala-Codons.	71
Tabelle 4-4 Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit den gewählten Gly-Codons.	72
Tabelle 4-5 Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit den gewählten Ser-Codons.	73
Tabelle 7-1 Oligonucleotide zur Erzeugung der <i>psbA</i> -Mutanten.	102
Tabelle 7-2 Oligonucleotide zur Erzeugung des Plasmides pCW5 sowie zur Analyse der AadA-Mutanten	103
Tabelle 7-3 Oligonucleotide zur Erzeugung der Plasmide pCW3 und pCW4 sowie zur Analyse der GFP Mutanten	104
Tabelle 7-4 Oligonucleotide zur Erzeugung der Plasmide pCW6 und pCW7 sowie zur Analyse der tmGFP Mutanten.....	105
Tabelle 7-5 Übersicht über die Codon-Nutzung des Chloroplasten in <i>C. reinhardtii</i>	106
Tabelle 7-6 Übersicht über die Codon-Nutzung des <i>psbA</i> Gens in <i>C. reinhardtii</i>	106

1 Einleitung

1.1 Der Genetische Code

Der genetische Code ermöglicht die Übersetzung der Nucleotidsequenz der DNA über eine RNA-Stufe in die Aminosäuresequenz der Proteine. Während des Prozesses der Transkription wird die Erbinformation der DNA zunächst in eine mRNA umgeschrieben und diese anschließend im Verlauf der Translation in die Aminosäureabfolge übersetzt. Dieser Informationsfluss ist seit den 1950er Jahren bekannt und wurde bereits von Watson & Crick als zentrales Dogma der Molekularbiologie bezeichnet [1].

Die Verschlüsselung der in der DNA codierten Erbinformation erfolgt über die spezifische Abfolge von Triplets (Codons) aus den Nucleobasen Adenin (A), Thymin (T) bzw. Uracil (U) auf mRNA-Ebene, Guanin (G) und Cytosin (C). Daraus ergibt sich die Summe von 64 unterschiedlichen Codons, aus denen sich der genetische Code zusammensetzt. Da für die Synthese von Proteinen nur 20 proteinogene Aminosäuren verwendet werden, existieren für einige von ihnen mehrere Triplets, die als synonyme Codons bezeichnet werden. Der genetische Code ist folglich degeneriert [2]. Zudem ist er nicht überlappend, komma- sowie leerzeichenfrei und gilt als nahezu universell. Tabelle 1-1 zeigt die 61 Triplets zur Codierung der Aminosäuren sowie die *Nonsense*- oder Stopp-Codons (UAA, UAG und UGA), die zur Termination der Translation führen [3].

Tabelle 1-1| Standard Codon-Tabelle. Dargestellt sind die Triplets und die jeweils codierten Aminosäuren (entsprechend des Dreibuchstabencodes) sowie die Stopp-Codons.

		zweite Base								
		U		C		A		G		
erste Base		Codon	AS	Codon	AS	Codon	AS	Codon	AS	dritte Base
	U	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	
UUC				UAC				UGC		C
UUA		Leu	UCA	UAA	Stopp	UGA	Stopp	A		
UUG			UCG			UAG	UGG	Trp	G	
C	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
		CUC		CCC		CAC	Gln	CGC		C
		CUA		CCA		CAA		CGA		A
		CUG		CCG		CAG	CGG	CGG		G
A	A	AUU	Ile	ACU	Thy	AAU	Asn	AGU	Ser	U
		AUC		ACC		AAC	AGC	C		
	AUA	ACA	AAA	Lys	AGA	Arg	A			
	AUG	ACG	AAG		AGG		G			
G	G	GUU	Val	GCT	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
		GUC		GCC		GAC	Glu	GGC		C
		GUA		GCA		GAA		GGA		A
		GUG		GCG		GAG	GAG	GGG		G

Nicht-Standard Versionen dieser Codon-Tabelle werden in Mitochondrien sowie einigen pro- und eukaryotischen Genomen verwendet [4]. So kann z.B. das Stopp-Codon UGA durch regulatorische Sequenzen innerhalb der mRNA zum Einbau von Selenocystein in Proteinsequenzen genutzt werden [5]. Ebenso verfügt das Stoppcodon UAG über eine duale Funktion und wird in Nucleotidsequenzen von Bakterien und Archaeen auch zur Verschlüsselung von Pyrrolysin genutzt [6]. In einigen Genomen führen programmierte *frameshifts* zur Erweiterung der Standard-Codierung [7] und auch post- oder co-transkriptionale Umgestaltungen codierender Regionen von Primärtranskripten sind bekannt. Durch Substitution, Deletion oder Addition von Nucleotiden wird so die Genexpression durch *RNA-Editing* gezielt modifiziert [8].

1.2 Genexpression in Plastiden

Zunächst erfolgt während der Transkription die Übertragung der genetischen Information der DNA in eine einzelsträngige mRNA. Hierbei wird durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase in einer energieabhängigen Reaktion die Polymerisation von Ribonucleosid-5'-triphosphaten katalysiert [9]. Initiiert wird der Prozess über Faktoren, die eine spezifische Promotorsequenz erkennen. In *E. coli* führt die Bindung einer Untereinheit der RNA-Polymerase (Sigmafaktor) zum Entwinden des DNA-Stranges, wodurch das Enzym mit der Synthese der mRNA beginnen kann [10]. Die Termination erfolgt in Prokaryoten entweder intrinsisch, wobei die mRNA durch eine GC-reiche Terminatorsequenz eine Haarnadelstruktur bildet, die die Bindung zwischen Polymerase und mRNA löst, oder Rho-abhängig. In diesem Fall bindet das Rho-Protein die mRNA und unterbricht die Bindung der Polymerase an die mRNA [11,12]. In Eukaryoten leitet vermutlich das Polyadenylierungssignal die Termination ein und ein Schnitt der mRNA beendet die Elongation [13].

Die plastidäre Genexpression ist meist lichtinduziert und folgt weitgehend dem Muster prokaryotischer Zellen [14]. So sind in den meisten höheren Pflanzen plastidäre Gene als polyzistronische Transkriptionseinheiten organisiert [15] und der Prozess der plastidären Transkription erfolgt mit einer für Bakterien typischen RNA-Polymerase [16].

Sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten folgt auf die Transkription die Translation der mRNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz der Proteine. Da prokaryotische Zellen nicht in Kompartimente unterteilt sind, findet dieser Vorgang bereits co-transkriptional an 70S Ribosomen statt [17]. In Eukaryoten übernehmen cytoplasmatische 80S Ribosomen die

Peptidsynthese kerncodierter Gene und Organellen wie Mitochondrien und Chloroplasten verfügen aufgrund ihres prokaryotischen Ursprunges über eine eigene Translationsmaschinerie mit 70S Ribosomen [18].

Ribosomen sind Protein-RNA-Komplexe, die sich aus einer kleinen und einer großen Untereinheit zusammensetzen. Die kleine Untereinheit ist für die Decodierung der mRNA zuständig und die große Untereinheit katalysiert die Peptidbindung zwischen neuen Aminosäuren und der wachsenden Peptidkette [19]. Das hierbei zum Einsatz kommende Adapter-Molekül ist die tRNA, die über eine zu dem mRNA-Codon komplementäre Anticodonsequenz und eine Aminosäurebindestelle am 3'-Ende verfügt. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen übertragen die Aminosäuren auf das passende tRNA-Molekül. Plastome codieren für ein eigenes tRNA-Set, wobei nicht für jedes Codon ein komplementäres tRNA-Molekül existiert. Im Gegensatz zu Mitochondrien konnte für Plastiden bisher kein tRNA-Import nachgewiesen werden [20,21], so dass die plastidär codierten tRNAs alle im Plastom verwendeten synonymen Codons bedienen.

Der Ablauf der Translation ist in Abb. 1-1 schematisch dargestellt. Zunächst bindet die kleine ribosomale Untereinheit die zu translatierende mRNA. Die plastidäre Translation wird durch kerncodierte Faktoren initiiert, die eine stromaufwärts des Initiationscodons liegenden Initiationssequenz (*Shine-Dalgarno Sequenz*) binden [22]. Anschließend erfolgt die Assemblierung eines Initiationskomplexes aus drei Initiationsfaktoren (IF-1-3), einer mit Formylmethionin beladenen tRNA sowie der kleinen ribosomalen Untereinheit mit gebundener mRNA. Nach Bindung der großen ribosomalen Untereinheit wird die Initiator-tRNA aus der Peptidyl-(P)-Bindestelle des Ribosoms entlassen und die Elongation der Peptidkette beginnt [23].

Diese verläuft in Pro- und Eukaryoten weitgehend gleich. In Plastiden ähneln die Abläufe der Peptidsynthese denen der Prokaryoten, da sie über kerncodierte Elongationsfaktoren (EF) verfügen, die Homologe zu den bakteriellen Faktoren EF-Tu, EF-Ts, EF-G und EF-P darstellen [24]. Zunächst wird eine zum mRNA-Codon komplementäre Aminoacyl-tRNA vom Elongationsfaktor EF-Tu (= eEF1 in Eukaryoten) zur Aminoacyl-tRNA-(A)-Stelle der großen ribosomalen Untereinheit geleitet und der Faktor durch GTP-Hydrolyse freigesetzt. In der P-Bindestelle des Ribosoms befindet sich die wachsende Peptidkette, deren C-Terminus auf die Aminoacyl-tRNA der A-Stelle übertragen wird. An dieser Reaktion ist der Elongationsfaktor EF-G (= eEF23 in Eukaryoten) beteiligt und die Hydrolyse von GTP

katalysiert den Vorgang [25]. Im Anschluss bewegt sich das Ribosom auf der mRNA in 3'-Richtung um exakt drei Nucleotide weiter, wodurch das in der P-Stelle gebundene tRNA-Molekül in die Exit-(E)-Stelle verschoben und freigesetzt wird. Die tRNA der A-Stelle, die die wachsende Peptidkette trägt, wird in die P-Stelle verschoben und ein neuer Elongationszyklus beginnt [26]. Die Termination der Translation erfolgt durch *Release-Faktoren* (RF), die durch Bindung an das Ribosom die Hydrolyse der Peptidylkette und der tRNA einleiten. In Prokaryoten erkennt der Faktor RF1 vermutlich die Stopp-Codons UAG oder UAA, Faktor RF2 die Codons UGA oder UAA. In Eukaryoten erfolgt die Termination an allen drei Stopp-Codons durch die Klasse I Terminationsfaktoren eRF1 und aRF1. Neben diesen existieren die zu einer GTPase-Familie zählenden Klasse II Faktoren (RF3 und eRF3), die GTP-abhängig die Klasse I Faktoren unterstützen [27].

Um einen erneuten Translationszyklus beginnen zu können, muss eine Trennung der ribosomalen Untereinheiten erfolgen. In Prokaryoten existiert hierfür ein Ribosomen-Recycling-Faktor (RRF), der ein nahezu perfektes Imitat eines tRNA-Moleküls darstellt und zusammen mit dem Elongationsfaktor EF-G die Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten einleitet [28]. Durch GTP-Hydrolyse wird zunächst die große Untereinheit gelöst, bevor im Anschluss der Initiationsfaktor IF3 die kleine noch an der mRNA gebundene Untereinheit bindet und den Komplex voneinander trennt. Der Vorgang des eukaryotischen Ribosomenrecyclings ist noch weitgehend unbekannt. Homologe des prokaryotischen Faktors RRF wurden in Chloroplasten und Mitochondrien, nicht aber im Cytoplasma nachgewiesen [28,29]. Auch die in dieser Arbeit verwendete Grünalge *C. reinhardtii* nutzt Homologe der *Recycling/Releasefaktoren* RF-1, RF-2, RF-3 und RRF, weshalb die Termination sowie die Trennung der ribosomalen Untereinheiten vermutlich dem prokaryotischen Muster folgen [30]. Dennoch ist die Genexpression der Plastiden komplexer organisiert als in Bakterien und z.B. RNA- und Proteinkomponenten essentiell, die bislang nicht in bakteriellen Systemen nachgewiesen wurden [18].

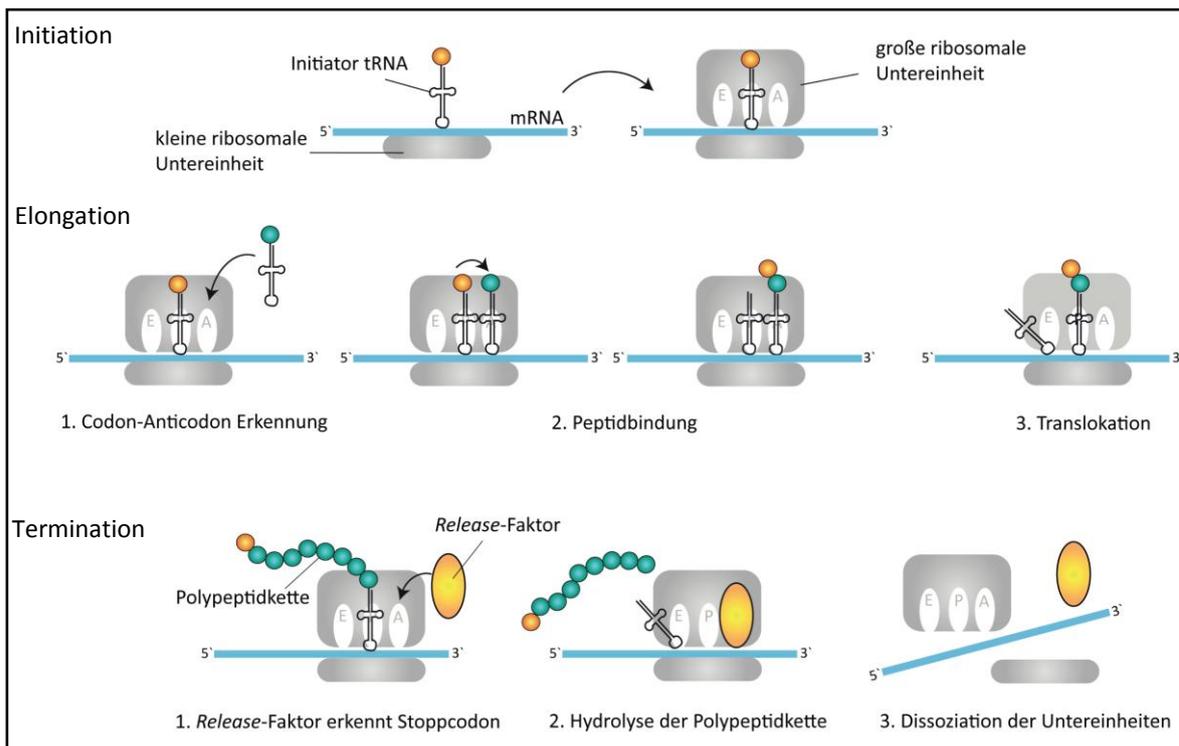


Abb. 1-1| Schematische Darstellung der Translation am Ribosom mit den Teilschritten Initiation, Elongation und Termination. E = Exit-Stelle, P = Peptidyl-Bindestelle, A = Aminoacyl-tRNA-Stelle.

1.3 Codon Usage

Aminosäuren können aufgrund ihrer Verschlüsselung durch mehrere synonyme Codons verschiedenen Gruppen zugeteilt werden. Für Met und Trp existiert nur je ein Codon, neun Aminosäuren werden von je zwei Codons verschlüsselt und demnach als zweifach degeneriert bezeichnet. Die Codierung von Ile erfolgt durch drei verschiedene Triplets. Fünf Aminosäuren sind vierfach und drei Aminosäuren (Arg, Leu, Ser) sechsfach degeneriert (Tabelle 1-1). Dabei werden synonyme Codons einer Aminosäure, deren erste und zweite Base gleich ist, zu einer Codon-Familie zusammengefasst.

Synonyme Codons werden in Nucleotidsequenzen nicht mit gleicher Häufigkeit verwendet. Dieses Phänomen der *codon usage*, das vermutlich ein evolutionäres Ergebnis aus Selektion, Mutation und Gendrift ist [31–33], wurde bereits Anfang der 1980er Jahre beschrieben. Die von Grantham veröffentlichte „Genom-Hypothese“ besagt, dass sowohl verschiedene Organismen als auch jeder Genomtyp eine eigene Codierungsstrategie nutzt. Der Codon-Gebrauch innerhalb eines Genomtypes ist dabei gleich [34–36] und meist an die tRNA-Verfügbarkeit der Zelle oder des Kompartimentes angepasst [37–40]. Da jeder Translationsmaschinerie nur ein begrenztes Set an tRNAs zur Verfügung steht und demnach nicht für jedes Codon ein komplementäres Anticodon existiert, müssen

einige tRNAs in der Lage sein mehr als ein Codon abzulesen. Bei diesem als *Wobble* bezeichneten Mechanismus erfolgt eine unübliche Basenpaarbindung zwischen erster Anticodonbase und dritter mRNA-Codonbase und die Translationseffizienz ist verringert [41]. Rogalski *et al.* [42] konnten zeigen, dass lediglich eine tRNA mit einem unmodifizierten U in der *Wobble*-Position (= 5'-Base des Anticodons) ausreicht, um alle vier Nucleotide einer Codon-Familie abzulesen. Sie bezeichneten dies als „*Super-Wobbling*“.

Zahlreiche Studien an verschiedensten Organismen belegen, dass eine Anpassung der Nucleotidsequenz an die Verfügbarkeit komplementärer tRNAs die Translationseffizienz steigert und vor allem hoch exprimierte Gene eine starke Adaption aufweisen [43–47]. Palidwor *et al.* [48] entwickelten ein Modell, wonach sowohl in Prokaryoten als auch in Pflanzen- und Humangenomen die GC-Zusammensetzung der dominierende Faktor für die jeweilige Codon-Nutzung ist. So werden bei steigendem GC-Gehalt des Genoms Codons bevorzugt verwendet, die ein G bzw. C an dritter Codon-Position haben. Eine Ausnahme stellen hierbei die Codons AGG (Arg) und TTG (Leu) dar: ihre Nutzung sinkt mit zunehmender GC-Zusammensetzung.

1.3.1 *Codon usage* Effekte und die regulatorische Relevanz seltener Codons

Lange Zeit ging man von einem unwesentlichen Einfluss synonyme Codon-Substitutionen auf die Translation aus. Heute weiß man, dass der unterschiedliche Codon-Gebrauch nicht nur Effekte auf das Expressionslevel hat, sondern auch die Proteinfaltung und -funktion beeinflusst [49]. Selten genutzte Codons verringern meist die Translationseffizienz, da der Zelle keine oder zu wenig komplementäre tRNAs für die Peptidsynthese zur Verfügung stehen, allerdings haben sie auch regulatorische Funktionen inne. So wirken sich z.B. die Position sowie die Anzahl aufeinander folgender seltener Codons auf die Geschwindigkeit der translatierenden Ribosomen aus.

Zu Beginn der Translation werden oft selten genutzte Codons zur Verzögerung der Peptidsynthese benötigt [41]. Dieser *Ramp*-Effekt wird genutzt, um genügend Platz zwischen Ribosomen zu ermöglichen, die die mRNA nacheinander binden. So können Ribosomenstaus verhindert werden. Auch innerhalb codierender Sequenzen regulieren einzelne selten genutzte Codons die Elongationsgeschwindigkeit. Translationsabbrüche durch sich anstauende Ribosomen oder interribosomale Kollisionen können durch die systematische Nutzung seltener Codons vermieden werden [50]. Darüber hinaus wird die

Translationsgeschwindigkeit vermutlich durch die tRNA-Komplexität am translatierenden Ribosom sowie über ein effizientes tRNA-Recycling beeinflusst. Studien an Hefe zeigen eine Steigerung der Translationsgeschwindigkeit durch eine Codon-Zusammensetzung, die keine häufigen tRNA-Wechsel zur Folge hat. Das heißt, es werden bevorzugt synonyme Codons aufeinanderfolgend genutzt, die durch die gleiche tRNA translatiert werden [51]. Ebenfalls essentiell sind selten genutzte Codons für die korrekte Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen, da sie gezielte Pausen des Ribosoms verursachen. Man findet sie demzufolge vor allem in Regionen, die für Beta-Faltblattstränge, *random coils* und Domänengrenzen codieren. Häufige Codons hingegen findet man meist in Regionen der α -Helices [52]. Auch die mRNA-Stabilität wird durch die Codon-Nutzung beeinflusst. Studien an über 800 sequenzierten, prokaryotischen Genomen zeigen, dass vor allem synonyme Codon-Substitutionen im 5'-und 3'-Bereich der codierenden Sequenz des Transkriptes eine Rolle spielen und mit dem Proteinlevel korrelieren. So werden in diesen Regionen entgegen der sonst üblichen GC-reichen Sequenzen die sonst seltener genutzten AT-reichen Codons bevorzugt, um die Translationseffizienz zu erhöhen [50,53].

1.3.2 Translationsprobleme durch seltene Codons

Einzelne sowie Cluster selten genutzter Codons verringern nicht nur die Translationseffizienz, sondern können auch den Einbau falscher Aminosäuren in das Zielprotein [54,55] und *frameshift*-Mutationen hervorrufen [56]. Vor allem selten genutzte Arg-Codons führen zu Translationsproblemen. Im Chloroplast von *C. reinhardtii* stellen einige der sechs synonymen Arg-Codons die am seltensten genutzten Triplets in Nucleotidsequenzen dar. Deren Translation erfolgt über *Wobble*-Bindung und läuft daher ineffizient ab. Liegen Cluster seltener Arg-Codons vor, können Ribosomen stocken und infolgedessen blockierte Translationskomplexe entstehen. Um diese aufzulösen und neue Translationszyklen zu ermöglichen, existieren verschiedene regulatorische Mechanismen.

In Prokaryoten sichert ein besonderes Kontrollsystem das Überleben der Zelle und ist meist essentiell für das Ribosomenrecycling. Bei diesem als *trans*-Translation bezeichneten Mechanismus wird der blockierte Translationskomplex erkannt, recycelt und die mRNA degradiert, so dass ein neuer Translationszyklus beginnen kann (Abb. 1-2). Die zum Einsatz kommenden Faktoren sind die sogenannte tmRNA sowie der essentielle Cofaktor SmpB (*small protein B*). Die tmRNA vereint sowohl tRNA- als auch mRNA-Eigenschaften,

da sie eine Aminosäurebindestelle besitzt und über einen offenen Leserahmen (ORF) verfügt, der für einen spezifischen *tag* codiert. Vermutlich führen endonucleolytische Schnitte der im pausierenden Ribosom fixierten mRNA zunächst zur Produktion von *nonstop*-mRNAs, die von dem tmRNA-Molekül erkannt werden [57]. Zusammen mit dem Elongationsfaktor EF-Tu bindet die mit Alanin beladene tmRNA (= Ala-tmRNA) den Cofaktor SmpB, der den anti-Codonarm einer tRNA imitiert [58] und die Bindung des tmRNA-Komplexes in der A-Stelle des Ribosoms ermöglicht [59]. Die tRNA-Domäne des Moleküls befindet sich nun in der ribosomalen P-Seite und der Cofaktor SmpB ist nahe der Dekodierungsstelle lokalisiert [60]. Nach der Übertragung der vom Ribosom gebundenen Peptidkette auf die tmRNA wird der ORF des Moleküls in die Dekodierungsseite des Ribosoms verschoben und die mit einem Stopp-Codon endende tmRNA-*tag*-Sequenz an die Peptidkette angehängt. Auf diese finale Elongation folgt die Freisetzung der Peptidkette aus dem Ribosom und deren Abbau durch zelluläre Proteasen [58,61].

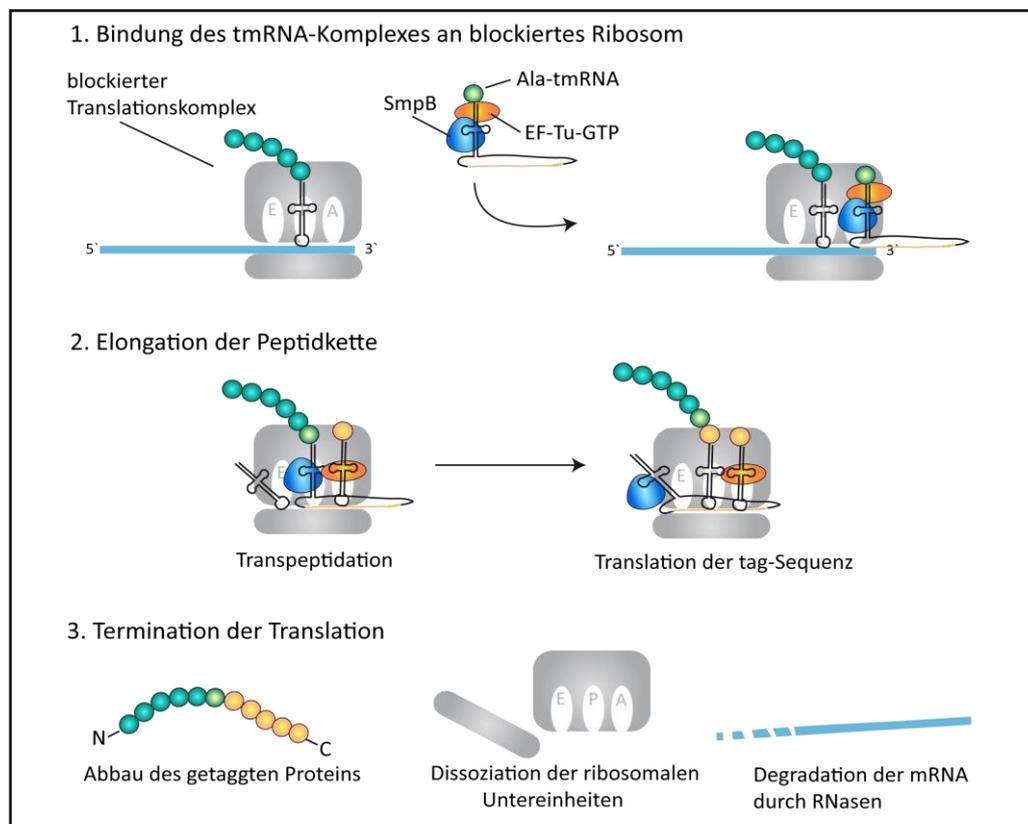


Abb. 1-2| Schematische Darstellung der *trans*-Translation durch die tmRNA.

Derzeit ist ungeklärt, ob dieser Mechanismus auch in Plastiden existiert. Zwar deuten Sequenz- und Promotoranalysen sowie die Identifizierung kerncodierter Homologe des bakteriellen SmpB-Faktors darauf hin, ein endgültiger Beweis konnte bisher jedoch nicht erbracht werden [62,63].

Eukaryoten verfügen über verschiedene Mechanismen, um blockierte Ribosomen komplexe zu trennen. Beim *nonsense-mediated-decay* (NMD) werden mRNAs mit vorzeitigem Stopp-Codon erkannt, der *nonstop-decay* (NSD) ist für den Abbau von mRNAs ohne Stopp-Codon zuständig und beim *no-go-decay* (NGD) führen endonucleolytische Schnitte nahe des 3'-Endes zur Produktion von *nonstop*-mRNAs, die erkannt und abgebaut werden. Der NGD-Weg spielt vermutlich eine Rolle beim Pausieren der Ribosomen durch seltene Codons [64].

1.3.3 Bedeutung der *Codon Usage* für die heterologe Genexpression

Die Produktion therapeutisch und industriell nutzbarer Proteine ist ein wichtiger Zweig der Biotechnologie. Sowohl die Herstellung heterolog exprimierter löslicher Proteine als auch die von Membranproteinen etablierten sich zu einem essentiellen biotechnologischen Werkzeug der heutigen Zeit.

Ein Ziel der Produktion heterolog exprimierter Proteine sind hohe Produktausbeuten. Um die Translationseffizienz zu steigern, setzt man im Allgemeinen auf die komplette Anpassung der Gensequenzen an die *codon usage* des jeweiligen Expressionssystems. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass z.B. die vollständige Codon-Anpassung einer Chloramphenicol-Acetyltransferase in *E. coli* die Enzymaktivität mindert [65]. Außerdem besteht die Gefahr der Produktion unlöslicher Proteinaggregate in Form von *inclusion bodies* [66,67] und Kimchi-Sarfaty *et al.* [68] konnten zeigen, dass ein seltenes Codon in der Nucleotidsequenz des *Multidrug Resistance 1* Genes (MDR1) die Aktivität des Genproduktes positiv beeinflusst. Die Erhaltung der Regulationsfunktion spezifischer seltener Codons ist demzufolge für die Optimierung der heterologen Genexpression ein wichtiger Faktor. Daher sollte im optimalen Fall statt vollständiger *codon usage*-Anpassung eine Codon-Harmonisierung zwischen *codon usage* des Zielgens und des rekombinanten Organismus erfolgen [69,70].

1.4 *Chlamydomonas reinhardtii* als Bioreaktor

Eine sich aus der Produktion heterolog exprimierter Proteine ergebende Herausforderung besteht in der optimierten Balance aus Kosten und Produktausbeute. Zur heterologen Genexpression wurden in der Vergangenheit ausschließlich Bakterien, Pilze, Hefen sowie Humanzellen, Insektenzellen und zellfreie Systeme verwendet [71–73]. All diese bieten sowohl Vor- als auch Nachteile [74], wobei vor allem der Kostenfaktor und die biologische

Aktivität gewonnener Produkte eine große Rolle spielen. Aufgrund spezifischer Vorteile gewinnt die Verwendung transgener Pflanzen seit kurzem an Bedeutung. So ist die Proteinproduktion in Pflanzen und Algen unter anderem oft kostensparender, die gewonnenen Produkte sind toxischfrei und in großen Mengen verfügbar [75]. Außerdem verfügen diese Systeme über Chaperone, die in der Lage sind komplexe Proteine für die therapeutische Anwendung korrekt zu falten, wodurch biologisch aktive Produkte hergestellt werden können [76].

Die aktuelle Forschung zielt dabei hauptsächlich auf plastidär exprimierte Fremdproteine ab, da sich gegenüber der Kernexpression doch erhebliche Vorteile ergeben. So wird z.B. durch die Möglichkeit der homologen Rekombination eine gezielte Insertion des Fremdgens gewährleistet und Gen-*silencing* ausgeschlossen [75]. Außerdem können aufgrund der Transkription polyzistronischer Einheiten gleich mehrere Gene unter Kontrolle eines Promotors transformiert werden [77]. Ein Nachteil der plastidären Expression sind fehlende Glykosylierungen der rekombinant hergestellten Proteine, doch konnte gezeigt werden, dass z.B. heterolog exprimierte monoklonale Humanantikörper auch ohne diese Zuckerreste funktional sind [78].

In den letzten Jahren erkannte man das Potential der Grünalge *C. reinhardtii* für die Produktion heterolog exprimierter Proteine. Diese auch als „grüne Hefe“ bezeichnete Mikroalge ist ein sehr gut charakterisierter und beliebter Modellorganismus, mit dessen Hilfe z.B. Studien über Abläufe der Photosynthese, Flagellarfunktion sowie Photorezeption untersucht werden können [79]. Die Vorteile von *C. reinhardtii* zur Nutzung in der Grundlagen- und anwendungsbezogenen Forschung sind unter anderem der einfache Lebenszyklus, die kurze Regenerationszeit, minimale Nährstoffansprüche und die Fähigkeit, sowohl photoautotroph als auch heterotroph mit Acetat als Kohlenstoffquelle zu wachsen. Zudem sind alle drei Genome (Kern, Mitochondrien, Chloroplast [80–82]) vollständig sequenziert. Da die Grünalge nur über einen Chloroplasten pro Zelle verfügt und dieser leicht durch Beschuss mit Mikroprojektilen mit Hilfe der Partikelkanone transformiert werden kann, ist die schnelle Erzeugung von Mutanten möglich [83]. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, im Chloroplasten die für therapeutisch relevante Substanzen benötigten Disulfidbrücken zu synthetisieren [84]. Darüber hinaus wurde die Grünalge als GRAS Organismus (*Generally Recognized As Safe*) eingestuft, was bedeutet, dass sie unbedenklich als Futter- oder Nahrungsmittel zulässig ist. Aufgrund der genannten

Vorteile sowie der guten Charakterisierung der Grünalge steigt das Interesse der Optimierung von *C. reinhardtii* zur Nutzung als Bioreaktor. Die ersten Versuche, stabile Produkte im Chloroplasten der Grünalge zu exprimieren, gehen zurück in die 1990er Jahre [85–87]. Codon-Optimierung sowie die Wahl geeigneter Promotor/UTR-Kombinationen führten schließlich in den letzten Jahren zu relativ hohen Ausbeuten verschiedenster rekombinanter Proteine [88]. Auch die plastidäre Expression therapeutisch relevanter Produkte wie Vakzine und *single-chain* Antikörper war bereits erfolgreich [89].

1.5 Chloroplasten – semiautonome Organellen als Proteinfabriken

Chloroplasten sind Organellen photosynthetisch lebender Organismen, deren wichtigste Funktion der in der Durchführung der Photosynthese besteht. Während dieses Prozesses werden aus energiearmen, anorganischen Stoffen energiereiche, organische Verbindungen synthetisiert. Hierbei erfolgt die Umwandlung der Strahlungsenergie der Sonne in chemische Energie und als Nebenprodukt entsteht Sauerstoff. Auch andere Reaktionen, wie z.B. die Synthese von Lipiden, Amino- und Fettsäuren sowie die Synthese pflanzlicher Hormone, Vitamine und sekundärer Metabolite, sind in den Chloroplasten lokalisiert [90].

Eine doppelte Hüllmembran begrenzt das innere Membransystem sowie den Stroma-raum, wo sich lamellenförmige Thylakoidmembranen befinden, in denen die Komplexe der Elektronentransportkette lokalisiert sind. Die Thylakoide bilden im Inneren einen eigenen Reaktionsraum (Lumen), der eine essentielle Rolle beim Aufbau des zur ATP-Synthese genutzten Protonengradienten spielt.

Vermutlich stammen Chloroplasten von Cyanobakterien ab, die im Lauf der Evolution durch einen eukaryotischen Wirt aufgenommen und später zu einem wirtseigenen, photosynthetischen Organell umgewandelt wurden [91,92]. Aus dem Verlust von Genen des Cyanobakteriums sowie dem Transfer zahlreicher Gene des Symbionten in den Kern des Wirtes resultiert das gegenwärtige Plastom [93–95]. Aufgrund dieses plastideneigenen Genoms, dem Vorhandensein eines Proteinbiosyntheseapparates sowie der Abhängigkeit vom Kern, bezeichnet man Chloroplasten als semiautonome Organellen. Ca. 60 Proteine werden im Plastiden synthetisiert, der Großteil der benötigten Proteine ist kerncodiert und wird posttranslational über Importsysteme in den Chloroplasten transportiert [82].

1.5.1 Das Plastom

Heute bekannte Plastome höherer Pflanzen sind im Durchschnitt etwa zwischen 120-190 kbp groß und umfassen ca. 100-200 bekannte Gene, die für Komponenten der Photosynthesereaktionen sowie der Genexpression codieren [14,96]. Chloroplastidäre Genome von Algen hingegen variieren stark in Größe, Gendichte sowie Informationsgehalt [97]. Plastome liegen in hoher Kopienzahl pro Zelle vor, einige davon dicht gepackt in sogenannten Nucleoproteinpartikeln (Nucleoide), wobei über den Prozess des Verpackens sowie der Organisation der Nucleoide wenig bekannt ist [98]. Die ringförmige plastidäre DNA (cpDNA) enthält meist eine *inverted repeat* (IR) Region, die das Genom in eine große sowie eine kleine *single copy* Region unterteilt. Gewisse Leguminosen, Koniferen und einige Algen weisen diese Region nicht auf [97,99].

Die biolistische Transformation ermöglicht die stabile Insertion von Fremd-DNA in das Plastom [100]. Dabei wird die zu übertragende DNA an Mikroprojekteile (Gold oder Wolfram) gebunden, unter Verwendung der Partikelkanone mit hohem Druck in die Zellen geschossen und das gewünschte Gen durch homologe Rekombination flankierender Sequenzen an der Zielstelle inseriert [83,101]. Durch Regeneration der Zellen auf Selektivmedium können letztlich nur Transformanten wachsen, die die Fremd-DNA stabil im Plastom inseriert haben.

1.5.2 Das D1-Protein und die Funktion im Elektronentransport

Ein essentielles plastidär exprimiertes Protein ist das in der Thylakoidmembran lokalisierte D1-Protein, das aufgrund seiner außergewöhnlich hohen Umsatzrate im Licht das am häufigsten translatierte Genprodukt des Chloroplasten darstellt [102]. Es wird vom *psbA*-Gen codiert, das in höheren Pflanzen in der *single copy* Region des Plastoms lokalisiert ist. In *C. reinhardtii* hingegen liegt es in zweifacher Ausführung pro Plastom in der *inverted repeat* Region vor. Das *psbA*-Gen verfügt über eine im Plastom einzigartige *codon usage*, die perfekt an die plastidäre tRNA-Verfügbarkeit angepasst ist. So zeigen z.B. die verwendeten zweifach degenerierte Aminosäuren eine ungewöhnlich hohe Präferenz für ein C (statt des sonst üblichen T) an dritter Codon-Position [33]. Diese untypische *codon usage* steigert maßgeblich die Translationseffizienz des D1-Proteins.

Die Synthese des D1-Proteins erfolgt lichtabhängig an Ribosomen der Thylakoidmembran [103]. Durch gezielte Pausen der Ribosomen während der Elongation entstehen D1-

Intermediate, so dass co-translational dessen Einbau in die Thylakoidmembran erfolgen kann [104]. Das zunächst translatierte *D1-precursor*-Protein enthält eine C-terminale Extension, die posttranslational von der luminalen Protease CtpA prozessiert wird, um die reife D1-Untereinheit zu erhalten [105,106].

Die funktionale D1-Untereinheit bildet zusammen mit dem D2-Protein das reaktive Zentrum des PSII, das von inneren chlorophyllhaltigen Antennen (CP43 und CP47) sowie Untereinheiten des Cytochrom- b_{559} -Komplexes und weiteren kleinen Untereinheiten umgeben ist. Der D1/D2-Proteinkomplex bindet zudem zahlreiche essentielle Faktoren des photosynthetischen Elektronentransportes, der in Abb. 1-3 dargestellt ist. Durch Anregung lichtabsorbierender Chlorophyllmoleküle des PSII werden Elektronen über Phäophytin (Phe) auf das primäre, vom D2-Protein fest gebundene Plastochinon Q_A und weiter auf das lose am D1-Protein gebundene Q_B übertragen. Die proteolytische Wasserspaltung auf der luminalen Seite gleicht das entstandene Elektronendefizit aus. An dieser Reaktion sind der Tetramangancluser (Mn_4Cl) sowie ein redoxaktiver Tyrosinrest (Tyr) beteiligt und es entsteht Sauerstoff. Der Elektronentransport zwischen dem PSII und dem Cyt b_6/f Komplex erfolgt durch Plastohydrochinon (PQH_2) und zwischen dem Cyt b_6/f Komplex und dem PSI über Plastocyanin (PC). Am PSI erfolgt durch angeregte Elektronen, die zur stromalen Seite auf Ferredoxin (FD) geleitet werden, die Reduktion von $NADP^+$ zu NADPH durch die Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR). Zeitgleich erfolgt die Translokation von Protonen in das Thylakoidlumen, wodurch über der Thylakoidmembran ein Protonengradient erzeugt wird, der die ATP-Synthase antreibt und so ATP generiert.

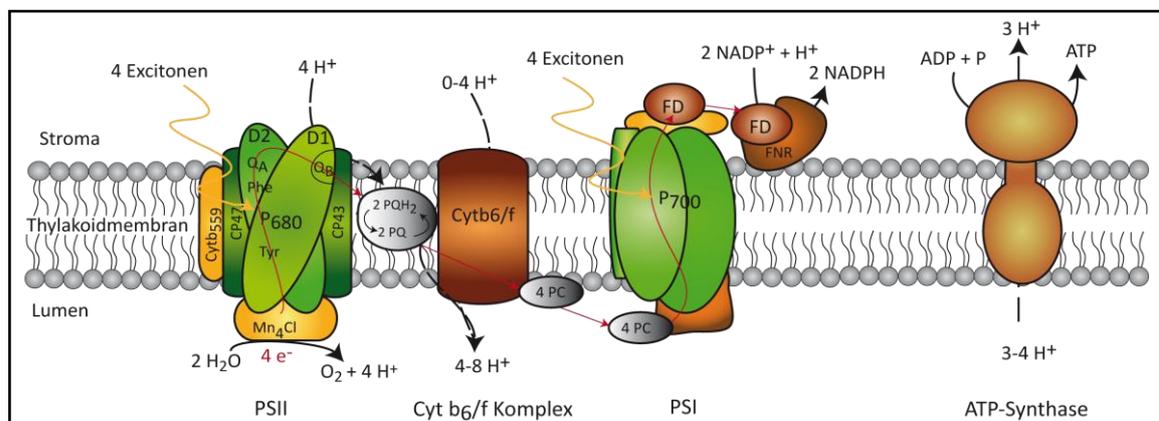


Abb. 1-3| Elektronentransport über die Photosyntheseenzyme in der Thylakoidmembran. Mn_4Cl = Mangancluster, Tyr = Tyrosin, Phe = Phäophytin, Q_A = fest gebundenes Plastochinon, D2 = D2-Protein, Q_B = lose gebundenes Plastochinon, D1 = D1-Protein, Cyt b_{559} = Untereinheit des Cytochrom- b_{559} Komplexes, CP43/CP47 = chlorophyllhaltige Antennen des PSII, P_{680} = Reaktionszentrum PSII, PQH_2 = Plastohydrochinon, PQ = Plastochinon, PC = Plastocyanin, FD = Ferredoxin, FNR = Ferredoxin-NADP-Reduktase, P_{700} = Reaktionszentrum PSI. Die rote Linie markiert den in Pfeilrichtung verlaufenden Elektronentransport und die unterbrochenen schwarzen Linien stellen den Protonentransport dar.

Bei hoher Lichtintensität kommt es zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die unter anderem die Inaktivierung des PSII bewirken [107,108]. Dieser Prozess wird als Photoinhibition bezeichnet und das D1-Protein stellt hierbei einen der Hauptangriffspunkte der irreversiblen Schädigung dar [109]. Der schnelle Abbau geschädigter D1-Proteine und deren kontinuierlicher Ersatz durch *de novo* synthetisierte D1-Proteine sind daher die wichtigsten Reparaturmechanismen für Pflanzen unter Lichtstress [110]. Nur so wird auch bei starker Lichteinstrahlung ein kontinuierlicher Elektronentransport über das PSII gewährleistet [104]. Um diesen hohen *turnover* des D1-Proteins zu ermöglichen, muss dessen schnelle und effiziente Translation erfolgen, die maßgeblich durch die perfekt an die plastidäre tRNA-Verfügbarkeit adaptierte *codon usage* des *psbA*-Gens gewährleistet wird [31,33,111].

1.6 Zielstellung

Synonyme Codon-Substitutionen beeinflussen nicht nur die Effizienz der Translation und somit die Quantität zu synthetisierender Proteine. Auch Effekte auf Proteinfaltung sowie -funktion und folglich auf die Qualität der Proteine sind bekannt [49,112]. Demnach spielt die *codon usage* vor allem für die heterologe Genexpression eine große Rolle, wobei der Chloroplast von *C. reinhardtii* ein zukunftssträchtiges Expressionssystem darstellt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, *codon usage* Effekte auf die plastidäre Proteinexpression von *C. reinhardtii* näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck stand zu Beginn der Arbeit zunächst die Etablierung eines Codon Test Systems im Vordergrund. Um *codon usage* Effekte auf ein plastidär exprimiertes Protein *in vivo* zu untersuchen, wurde das *psbA*-Gen genutzt, das für die D1-Untereinheit des PSII codiert. Durch dessen hohe lichtabhängige Expressionsrate und der Möglichkeit, mit Hilfe von Puls-Experimenten sehr empfindliche Intermediate nachweisen zu können, eignet es sich sehr gut für die Analyse von *codon usage* Effekten. Geplant wurden Peptidinsertionen unterschiedlicher Länge und *codon usage* in die D-de *loop*-Region des D1-Proteins (Vergleich Abb. 3-1) [113,114]. Die Selektion der Insertionsmutanten sollte über photoautotrophes Wachstum erfolgen. Das Ergebnis der Transformation sowie die vergleichende physiologische und biochemische Analyse der Mutanten ließen Aussagen über *codon usage* Effekte auf die Expression des *high turnover* Proteins zu.

Aufgrund der Resultate des Codon Test Systems sollte in weiterführenden Experimenten der Einfluss seltener Arg-Codons auf die Synthese eines heterolog im Chloroplasten exprimierten Proteins analysiert werden. Studien an *E. coli* zeigen, dass allein die *codon usage* Anpassung seltener Arg-Codons die Proteinausbeute steigert [55]. Für die Überprüfung dieser Aussage im Plastiden der Grünalge wurde das *aadA*-Gen gewählt. Dieses vermittelt den Zellen Resistenz gegenüber Aminoacylantibiotika [87,115–117] und enthält für *C. reinhardtii* seltene Arg-Codons. Mutanten, die ein Arg-Codon adaptiertes *aadA*-Gen exprimieren, sollten physiologisch und biochemisch mit Mutanten verglichen werden, die das *E. coli aadA*-Gen exprimieren.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des für Bakterien meist essentiellen tmRNA-*tagging*-Systems [61,118,119], dessen Vorkommen in Plastiden bisher lediglich vermutet wird [62,63]. Verschiedene Ansätze wurden gewählt, um Hinweisen zur Existenz dieses Systems in *C. reinhardtii* nachzugehen. Aus *E. coli* ist bekannt, dass Cluster seltener Arg-Codons das tmRNA-*tagging* verursachen können [57,120,121]. Daher wurde das Reporterprotein GFP mit Arg-*tags* unterschiedlicher *codon usage* heterolog im Chloroplasten exprimiert. Expressionsstudien und die C-terminale Sequenzierung des GFP-Proteins der verschiedenen Mutanten sollten Hinweise auf eine Markierung des Reporterproteins liefern. Ein weiterer Ansatz zur Analyse dieses Systems stellte die gezielte Insertion der tmRNA-Sequenz eines Cyanobakteriums in das Plastom dar. Da diese Organismen als Vorläufer der Chloroplasten gelten, könnten Cofaktoren eines evolutionär entfernten tmRNA-*tagging* Mechanismus noch existieren. Der ursprüngliche tmRNA-*tag* wurde durch einen Myc-*tag* ersetzt, wodurch der Abbau markierter Proteine verhindert und deren Detektion über Antikörper möglich werden sollte. Als Reporterprotein diente das GFP-Protein mit Arg-*tags* unterschiedlicher *codon usage*, dessen Sequenz *downstream* der tmRNA-Sequenz in das Plastom inseriert wurde. Zur Untersuchung des potentiell wirksamen *tagging*-Systems dienten Western Blot Analysen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien lagen in p.a.-Qualität vor und wurden von den Firmen Peqlab, Roth, Sigma, Merck, Roche, J.T. Baker, Agrisera, Fermentas, AppliChem, Biorad und BioMol bezogen.

Die Antikörper, Enzyme und Marker wurden von den Firmen Agrisera, Fermentas, Milteny Biotec und Promega bezogen.

Für die Transformation wurden die Algenzellen auf Membranfilter NL17 (0,45 µm) der Firma Schleicher und Schüll gesaugt.

Alle hitzebeständigen Glas- und Plastikmaterialien sowie Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert (Varioklav®, H + P Labortechnik GmbH).

2.2 Algenstämme und Anzuchtbedingungen

In dieser Arbeit wurden folgende *C. reinhardtii*-Mutanten verwendet:

IL: IL ist eine im *psbA*-Gen intronlose Mutante, die durch Komplementation der Deletionsmutante Fud7 mit der cDNA des *psbA*-Gens erzeugt wurde [122]. Die IL-Mutante synthetisiert ein funktionsfähiges D1-Protein und ist zum photoautotrophen Wachstum befähigt. Sie diene als Referenzstamm.

Del1: Der Deletionsmutante Del1 fehlt die codierende Sequenz für die Aminosäuren Ala 152 bis Ala 294 des *psbA*-Gens. Die Deletionsmutante synthetisiert ein „verkürztes“, funktionsunfähiges D1-Protein und kann nicht photoautotroph wachsen. Sie ist auf Acetat als Kohlenstoffquelle angewiesen [123].

FUD7: Die Deletionsmutante FUD7 enthält in der Plastomsequenz eine ca. 8 kbp große Deletion, die sich vom Intron I des *psbA*-Gens bis zur 5SrDNA erstreckt. Sie ist somit nicht in der Lage photoautotroph zu wachsen und ist auf Acetat als Kohlenstoffquelle angewiesen [124].

AadAh / AadAs: Die AadA-Mutanten enthalten das HA-getaggte *aadA*-Gen *downstream* des *psbA*-Gens in der Plastomsequenz, flankiert von der Promotorsequenz (P) und der 5'-UTR des *psbD*-Gens sowie der 3'-UTR des *psbA*-Gens. Die Mutante AadAs wurde von

Matthias Munder durch Transformation der FUD7 mit dem Plasmid pMM6 im Rahmen seiner Diplomarbeit erzeugt [125]. Sie enthält das *aadA*-Gen aus *E. coli*. Ausgehend von dieser Mutante wurde per *site-directed mutagenesis* die Mutante AadAh, die ein Arg-Codon adaptiertes *aadA*-Gen enthält, ebenfalls durch Transformation der FUD7 erstellt.

GFP5h / GFP5s: Die GFP Mutanten wurden durch Transformation der FUD7 mit Plasmiden erzeugt und enthalten jeweils das *GFP*-Gen, mit einem 10 × His-*tag*, einem HA-*tag*, drei Met-Codons und fünf Arg-Codons (Mutante GFP5h = 5 × CGT, Mutante GFP5s = 5 × CGG), flankiert von der Promotorsequenz und der 5'-UTR des *psbD*-Gens und der 3'-UTR des *psbA*-Gens.

tmGFP5h / tmGFP5s: Die tmGFP-Mutanten sind ebenfalls durch Transformation der FUD7 mit Plasmiden entstanden und enthalten *upstream* der *GFP*-Sequenz die Nucleotidsequenz der tmRNA aus *Synechocystis sp* PCC6803 [126] unter Kontrolle des *rbcL*-Promotors aus *C. reinhardtii* [127].

Leu2h / Leu2s // Ser3h / Ser3s // Gly5h / Gly5s // Ala10h / Ala10s: Diese Mutanten, die durch Transformation der Del1 Mutante erzeugt wurden, sind im *psbA*-Gen mutiert. In die codierende Region des großen stromalen *loops* des D1-Proteins wurden PCR-Fragmente integriert, die Aminosäureinsertionen unterschiedlicher Länge codieren. Hierbei erfolgte zum einen die Insertion der jeweils seltenen, zum anderen die Insertion der jeweils häufig genutzten Codons. Die Mutantenbezeichnung erfolgte entsprechend des Dreibuchstaben-codes der Aminosäuren. Die Zahl gibt die Anzahl der integrierten Codons an, „h“ steht für häufig genutzte Codons, ein kleines „s“ für seltene Codons.

Die Anzucht der Algen sowie der neuen *C. reinhardtii*-Transformanten, erfolgte in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler (GFL 3019) bei 21°C und $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (OSRAM L58W/31-830 Lumilux Plus; *warm white*). Die Messung der Lichtintensitäten wurde mit dem *Quantitherm Light Meter* der Firma Hansatech durchgeführt. Die Algen wuchsen entweder photoautotroph in acetatfreiem HS-Medium [128] oder heterotroph in acetathaltigem TAP-Medium [129]. Die Stammhaltung der Algen erfolgte auf HS-Platten. Dazu wurde HS-Medium mit 1,5 % Agar versetzt.

2.3 Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen

Für die Amplifikation und Mutagenese des *psbA*-Gens wurden *E. coli* Zellen des Stammes DH5 α eingesetzt. Diese enthalten das Plasmid pSHc5 mit der intronlosen *psbA*-Gensequenz [130]. Für die Transformation und Plasmidpräparation wurden *E. coli* Zellen des Stammes TG1 verwendet.

Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agar Platten, die mit 1,5 % Agar-Agar versehen wurden, bei 37°C. Zu Selektionszwecken wurde dem Medium außerdem 100 g/l Ampicillin (Sigma®) zugegeben. (LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l Aqua dest. pH 7 mit NaOH; [131]).

2.4 Messverfahren

2.4.1 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes erfolgte nach Arnon [132]. Die Messung der optischen Dichte (OD) des chlorophyllhaltigen Überstandes erfolgte bei 652 nm (Ultraspec 2000, Pharmacia/Biotech). Die Chlorophyllmenge pro Volumeneinheit wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$OD_{652} \times \text{Verdünnungsfaktor} / 34,5 = \text{mg Chlorophyll}(a + b) / \text{ml} \quad (1).$$

OD (652 nm) = optische Dichte bei 652 nm

molarer Extinktionskoeffizient = 34,5

2.4.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl von Algensuspensionen wurde die Zählkammer nach Thoma verwendet. Die Zählkammer besteht aus 16 Großquadraten, wobei sich jedes Großquadrat wiederum aus 16 Kleinquadraten zusammensetzt.

$$\text{Volumen über einem Kleinquadrat (KQ)} = 0,00025 \text{ mm}^3 \quad (2).$$

$$\text{Volumen über einem Großquadrat (GQ)} = 0,004 \text{ mm}^3 \quad (2).$$

Um auf die Bezugsgröße von 1 ml (= 1000 mm³) zu kommen, müssen die Volumina von Groß- bzw. Kleinquadraten (Gleichung 2) mit dem so genannten Kammerfaktor (Gleichung 3) multipliziert werden.

$$\text{Kammerfaktor eines Kleinquadrates:} \quad 4 \cdot 10^6 \quad (3).$$

$$\text{Kammerfaktor eines Großquadrates:} \quad 2,5 \cdot 10^5 \quad (3).$$

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde 1 ml der jeweiligen Algensuspension abgenommen und mit 10 μl gesättigter Jodlösung versetzt. Auf die Zählkammer wurden 15 μl dieser Suspension aufgetragen. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Carl-Zeiss Jena) wurden die Algenzellen gezählt. Dabei wurden abhängig von der Zelldichte mindestens vier Großquadrate ausgezählt. Für jede Probe wurde die Zellzahl (Gleichung 4) doppelt bestimmt und der Mittelwert gebildet.

$$\text{Zellzahl} = \text{Kammerfaktor} * \text{Mittelwert der gezählten Zellen} \quad (4).$$

2.4.3 Messung des Algenwachstums

Zur Messung des Algenwachstums wurden 300 ml HS-Medium mit $1,5 \cdot 10^7$ Zellen, der jeweiligen Mutante beimpft. Die Anzucht erfolgte in einer Kniese-Apparatur bei einem CO_2 -Luftgemisch von 2,5 - 97,5 %, einer Temperatur von 24°C und einer Lichtintensität von $70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Zur Messung der OD (750 nm), wurde je 1 ml entnommen [133]. Das Wachstum wurde im Doppelansatz bestimmt und das Mittel der erhaltenen Werte gebildet. Als Referenzstamm wurde die IL-Mutante mitgeführt.

Für die Bestimmung der Wachstumsraten der AadA-Mutanten wurden zusätzlich die Antibiotika Streptomycin (Strep) und Spectinomycin (Spec) ins Medium gegeben. Neben der Probe ohne Zusatz von Antibiotika erfolgte die Messung mit 6/12, 12/24, 20/40, 25/50 und 50/100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Strep/Spec. Die Konzentration der Stammlösungen betrug 50 mg/ml Antibiotikum in Wasser. Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.4.4 Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung

Die Bestimmung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung der *C. reinhardtii*-Mutanten erfolgte mit einer "Clark"-Elektrode (Hansatech) nach Walker [134].

In der exponentiellen Wachstumsphase wurden Algenzellen entsprechend 15 μg Chlorophyll sedimentiert (RT, 5 min, 1000 g) und das Pellet in 1 ml frischem Elektrodenpuffer (0,1 % NaHCO_3 , mit Stickstoff begast) resuspendiert. Das NaHCO_3 des Elektrodenpuffers dient den Zellen als CO_2 -Quelle. Die Algensuspension wurde in eine Küvette überführt, in welche die Elektrode hineinreicht. Aus jeweils vier unabhängigen Messungen wurde der Mittelwert gebildet. Die Sauerstoffentwicklung wurde bei 25°C und Lichtintensitäten von 100, 300, 500 und $1000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ gemessen. Diese wurden durch Einsatz verschiedener Grau-Filter eingestellt (Filtersatz FL-400; Walz Mess- und Regeltechnik, Effeltrich,

Deutschland). Die Netto-Sauerstoffproduktionsrate entspricht dem im Licht produzierten Sauerstoff. Dabei wird der von den Zellen veratmete Sauerstoff nicht berücksichtigt.

2.4.5 Messung der Photosystem II-Effizienz

Die Bestimmung der PSII-Effizienz erfolgte durch die Messung der Chlorophyllfluoreszenz (Fv/Fm). Es wurde die Exzitation bei 695 nm (*high pass*) und 780 nm (*low pass*) mit dem *Photon System Instrument* FluorCam 800 MF (Brno, Tschechische Republik) gemäß Nedbal *et al.* [135] gemessen. Für alle Fv/Fm-Messungen unter Standardbedingungen wurden Zellen der mittleren logarithmischen Phase entsprechend einer optischen Dichte (750 nm) = 1 in 1 ml frischem TAP-Medium resuspendiert. Für die Bestimmung der PSII-Effizienz unter Starklichtbedingungen wurden Zellen der mittleren logarithmischen Phase entsprechend 15 µg Chlorophyll / ml zunächst einer Lichtstärke von 1500 µE*m⁻²*s⁻¹ ausgesetzt. Es wurden jeweils Zell-Aliquots von 300 µl in eine 96 well Platte überführt und unmittelbar vor der Messung eine Minute dunkel inkubiert.

2.4.6 Messung der D1-Proteinlevel

Die densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen erfolgte mit der Software AIDA (*Advanced Image Data Analyzer*). Diese ermöglicht die Erfassung der Proteinmenge anhand der Färbungsintensität der Blotbande. Dazu wird die Messfläche (= Blotbande) ausgewählt und innerhalb dieser die Intensität pro Pixel unter Abzug einer neu abgeglichenen Hintergrundintensität gemessen. Die Daten ergeben sich aus: Intensität/Fläche der gemessenen Intensität-Hintergrund. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Excel.

2.5 Oligonucleotide

Die Tabellen 7, 8, 9 und 10 enthalten alle in der Arbeit verwendeten Oligonucleotide enthalten und sind im Anhang I zu finden.

2.6 Plasmide

Alle im Rahmen der Arbeit verwendeten Plasmide entstanden durch Transformation von *E. coli* und basieren auf dem Ausgangsplasmid pMM2, welches durch M. Munder im Rahmen seiner Diplomarbeit erstellt wurde [125]. Abb. 2-1 zeigt dieses schematisch in Bezug zum WT-Plastom von *C. reinhardtii* sowie die resultierenden Plasmide pTrans. Grau unterlegt ist die MCS bzw. das jeweilige *Insert*. Tabelle 2-1 listet alle in dieser Arbeit

erstellten Plasmide mit den entsprechenden inserierten Genen und zusätzlich inserierten Sequenzen.

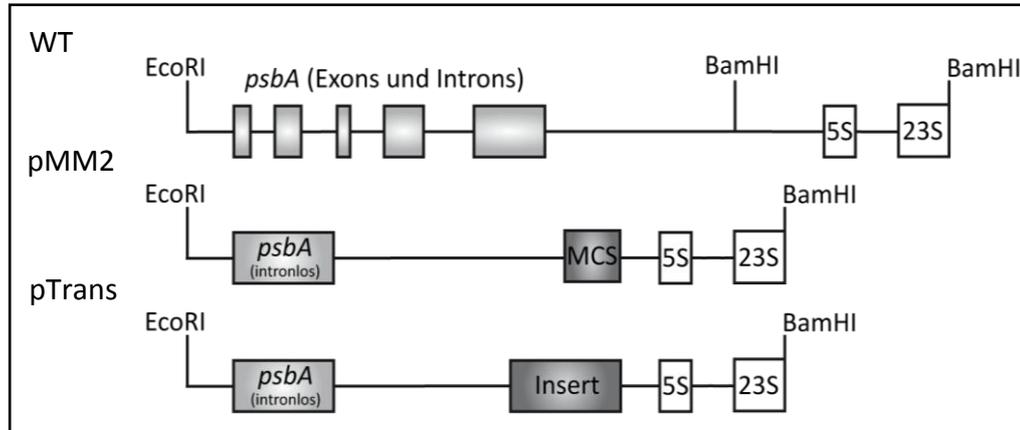


Abb. 2-1| Ausschnitt der Plastomsequenz von Wildtyp *C. reinhardtii* sowie den Plasmiden pMM2 und pTrans. Dargestellt sind jeweils die Plastomsequenzen in 5'→3'-Richtung zwischen den Restriktionsschnittstellen EcoRI und BamHI (gekennzeichnet durch Striche). Grau unterlegt sind in pMM2 die MCS sowie in pTrans das klonierte *Insert* (Tab.2-1). Darstellung nicht maßstabsgetreu.

Tabelle 2-1| Im Rahmen der Arbeit erstellte Plasmide. Neben der Plasmidbezeichnung sind das jeweils enthaltene Gen sowie zusätzlich inserierte Sequenzen aufgelistet.

Bezeichnung	Inseriertes Gen	zusätzlich inserierte Sequenzen
pCW3	<i>GFP</i>	Promotor (P) und 5'-UTR <i>psbD</i> ; HA-tag, 10×His-tag, 3×ATG, 5×CGT am 3'-Ende des <i>GFP</i> , 3'-UTR <i>psbA</i>
pCW4	<i>GFP</i>	P und 5'-UTR <i>psbD</i> ; HA-tag, 10× His-tag, 3×ATG, 5×CGG am 3'-Ende des <i>GFP</i> , 3'-UTR <i>psbA</i>
pCW5	<i>aadA</i>	P und 5'-UTR <i>psbD</i> ; Arg-Codon angepasstes <i>aadA</i> -Gen; HA-tag; 3'-UTR <i>psbA</i>
pCW6	tmRNA	<i>rbcL</i> Promotor, tmRNA aus <i>Synechocystis</i> sp PCC6803 mit Myc-tag; P und 5'-UTR <i>psbD</i> ; <i>GFP</i> + tags (wie pCW3), 3'-UTR <i>psbA</i>
pCW7	tmRNA	<i>Prbcl</i> , tmRNA aus <i>Synechocystis</i> sp PCC6803 mit Myc-tag; P und 5'-UTR <i>psbD</i> ; <i>GFP</i> + tags (wie pCW4), 3'-UTR <i>psbA</i>

2.7 DNA-Methoden

2.7.1 Isolation genomischer DNA aus *C. reinhardtii*

Die Isolation der genomischen DNA erfolgte nach der Methode von Newman *et al.* [136]. Für die Isolation wurden Zellen der mittleren logarithmischen Phase entsprechen 150 µg Chlorophyll pelletiert (RT, 2 min, 16000 g) und das Pellet in 300 µl TEN-Puffer (50 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8, 0,1 M NaCl) aufgenommen. Nach Zugabe von 40 µl 20 % SDS (w/v) und 40 µl 20 % Laurylsarcosyl (w/v) wurde der Ansatz leicht gemischt und 30 µl Pronaselösung zugegeben. Nach erneutem Mischen für ca. 10 min, wurden 650 µl PCI

Lösung (*ready to use*, Roth) zugegeben und der Ansatz 5 min geschüttelt. Nach 5 min Zentrifugation (RT, 16000 g), wurde die obere klare Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die PCI-Fällung wiederholt. Zu dem resultierenden, klaren Überstand wurden 2 Volumina 100 %, eiskaltes EtOH gegeben und der Ansatz für 15 min bei -20°C inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation (4°C, 16000 g) und 2 maligem Waschen mit 70 % EtOH, wurde das Pellet vollständig in 300 µl TE-Puffer (10 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA) gelöst und im Anschluss 30 µl 3 M CH₃COONH₄ und 30 µl 3 M MgCl₂ zugesetzt. Nach Zugabe von 2 Volumina 100 % EtOH, wurde der Ansatz erneut für 30 min bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (4°C, 10 min, 16000 g) und 2 maligem waschen mit 70 % EtOH, wurde das getrocknete Pellet in Aqua dest. gelöst.

2.7.2 Isolation genomischer DNA aus *Synechocystis sp* PCC6803

Zur Isolation genomischer DNA aus *Synechocystis sp* PCC6803 wurde die Methode nach Singh *et al.* verwendet [137].

2.7.3 Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Für die Plasmidpräparation wurde das *PureYield™ Plasmid Miniprep* System von Promega entsprechend Herstellerprotokoll verwendet.

2.7.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration wurde am NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Peglab) gemessen. Es wurden 2 µl Probe eingesetzt.

2.7.5 DNA-Sequenzierung

Alle DNA Sequenzierungen wurden durch die Firma Seqlab (Göttingen) nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt. Dabei kamen nach einem *Cycle Sequencing* Protokoll fluoreszenzmarkierte Terminator-Farbstoffe zur Anwendung. Die Proben wurden entsprechend des Firmenprotokolls aufgearbeitet und abgeschickt. Die erhaltenen Elektropherogramme wurden mit Hilfe der Chromas-Software ausgewertet (www.techne-lysium.com.au/chromas.html). Sequenzvergleiche erfolgten mit der frei im Internet zugänglichen *ClustalW*-Software des *European Bioinformatics Instituts* (www.ebi.ac.uk).

2.7.6 Erzeugung der Plasmide

Die Plasmide pCW3-7 zur Transformation der FUD7 wurden mit der *Golden Gate Cloning* Methode nach Engler [138] erstellt. In Tabelle 2-2 ist ein Beispielprotokoll dargestellt. Es wurden PCR-Konstrukte mit Primern, die Bsal-Schnittstellen enthalten (Anhang I, Tabellen 7-2, 7-3, 7-4) generiert. Das Plasmid pMM2 diente als Empfängervektor. Alle PCR-Fragmente sowie der mit Bsal verdauten Vektor pMM2, wurden wie in 2.7.13 beschrieben isoliert und kloniert.

Tabelle 2-2| Erzeugung der Plasmide. (A) Repräsentative Zusammensetzung des Bsal – Ligationsansatzes für die Klonierung der Fragmente in den Empfängervektor am Beispiel des Ansatzes zur Erzeugung von pCW5. (B) verwendetes *Cycler* Protokoll.

(A) Zusammensetzung		(B) Thermo Cycler Programm			
Bestandteil	Volumen	Schritt	Temp.	Dauer	Grund
10 x Puffer Bsal	2 µl	1	37°C	5 min	Restriktion
10 x Puffer T4 DNA Ligase	2 µl	2	16°C	10 min	Ligation
Bsal (10 U/µl)	1 µl	3	37°C	10 min	Finalrestriktion
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	1 µl	4	65°C	10 min	Hitzeinaktivierung
pMM2 (Bsal verdaut)	50 ng	5	4°C	∞	Kühlung
Fragment P+5'-UTR <i>psbD</i>	1 µl				
Fragment GFP	1µl				
Fragment HA-His-Met-Arg	1 µl	Die Schritte 1 und 2 wurden 50 mal wiederholt.			
Fragment 3'-UTR <i>psbA</i>	1 µl				
H2O	ad 20 µl				

2.7.7 Polymerasekettenreaktion

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem TRIO-Thermoblock™ der Firma Biometra durchgeführt. Die Gradienten PCRs wurden in einem Gradienten Block (TGradient) der Firma Biometra durchgeführt.

2.7.8 Mutagenese zur Erzeugung der *psbA*-Mutanten

Zur Erzeugung der *psbA*-Mutanten wurde die Methode der *site directed mutagenesis* durch *overlap extension PCR* genutzt [139]. Als *Template* diente das pSHc5 Plasmid [130], das ein intronloses *psbA*-Gen enthält. In einer PCR wurde Plasmid-DNA zusammen mit den Primern Dau4 (*forward*) und BstEII (*reverse*) eingesetzt. In einem weiteren PCR-Ansatz, wurde die Plasmid-DNA mit den Primern Dau2 (*reverse*) und BstEII (*forward*) amplifiziert. Es folgten 30 Zyklen mit je 95°C Denaturierung (1 min), 55°C *annealing* (45 sec), 72°C Extension (30 sec) und 5 min Denaturierung bei 95°C im ersten Zyklus sowie ein 10 min Extension Schritt bei 72°C im Finalzyklus. Dadurch entstanden zwei ca. 300 bp große

intronlose *psbA*-Fragmente, die keine überlappenden Bereiche aufweisen. Diese wurden wie unter 2.7.12 beschrieben in einem Agarose-Gel (1 %, (w/v)) separiert, ausgeschnitten und gereinigt (2.7.13). In einem neuen PCR-Ansatz wurden diese kleinen *psbA*-Fragmente zusammen mit Dau4 und Dau2 sowie einem Fünftel der jeweiligen mutagenen Primern (je *forward* und *reverse*) als *Template* eingesetzt. Da die mutagenen Primer überlappende Bereiche aufweisen entstanden nach dem ersten PCR-Zyklus *psbA*-Fragmente, die das gewünschte Konstrukt enthielten und durch den gleichzeitigen Einsatz von Dau2 und Dau4 amplifiziert wurden. Für alle Ansätze wurde eine Gradienten-PCR, bei den Temperaturen 45°C, 50°C, 55°C, 60°C und 65°C durchgeführt, um die optimale *annealing*-Temperatur für die mutagenen Primer heraus zu finden. Im Anschluss erfolgte eine Re-Amplifikation des Produktes mit den Primern Ampl. *forward* und X2 *reverse*.

2.7.9 Mutagenese zur Erzeugung der AadA-Mutanten

Mutante AadAs wurde von M. Munder im Rahmen seiner Diplomarbeit erzeugt [125]. Die Erzeugung und Anpassung der Arg-codon usage von Mutante AadAh erfolgte ausgehend vom Plasmid pMM6 über *site directed mutagenesis* durch *overlap extension* PCR mit spezifischen Primern (Anhang I, Tabelle 7-2).

2.7.10 Mutagenese zur Erzeugung der GFP- sowie tmGFP-Mutanten

Als *Template* für die Amplifikation des Fragmentes Promotor + 5'-UTR *psbD*, *GFP* + HA-tag und 3'-UTR *psbA*-Promotor, diente das Plasmid pMM3, welches die an *C. reinhardtii* adaptierte *GFP*-Sequenz unter Promotor und 5'-*psbD* und 3'-*psbA* Kontrolle enthält. Für die Fragmente 10 × His-tag, 3 × Met- und 5 × Arg wurden Primer erstellt, die selbst als *Template* fungierten (Anhang I, Tabelle 7-3 Tabelle 7-4).

Für die Amplifikation der tmRNA-Sequenz wurde genomische DNA aus *Synechocystis* sp. PCC6803 als *Template* verwendet. Zunächst wurden zwei kleine Fragmente amplifiziert, die die Sequenz des tmRNA-tags flankieren. Durch *overlap extension* PCR mit mutagenen Primern erfolgte ausgehend von diesen kleinen Fragmenten die Amplifikation des Finalfragmentes, welches einen Myc-tag statt des ursprünglichen tmRNA-tags enthält. Genomische DNA von *C. reinhardtii* diente als *Template* für die Amplifikation der *rbcl*-Promotor-Sequenz.

2.7.11 Kolonie-PCR an *C. reinhardtii* Kulturen

Zum Screening der erhaltenen Transformanten wurden je 15 µl Flüssigkultur pelletiert (RT, 1 min, 16000 g) und in 50 µl EDTA Lösung (10 mM) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten auf 100°C erhitzt, gevortext, erneut pelletiert (RT, 5 min, 16000 g) und 2,5 µl des Überstandes in der PCR-Reaktion verwendet. Als Primer wurden in jedem Fall genspezifische Oligonucleotide verwendet. Die Elongationszeit richtete sich nach der Fragmentlänge (1 kb / Minute).

2.7.12 Agarosegelelektrophorese

Die horizontale Flachbett-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe. Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 × TBE (89 mM Borsäure, 89 mM Tris pH 8, 2 mM EDTA) verwendet. Agarose und 1 × TBE wurden in einen Kolben gegeben und in der Mikrowelle erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurde die auf ca. 70°C abgekühlte Agarose mit 1 µl Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) pro 100 ml Agaroselösung versetzt, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Sechs Volumina der aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 1 Volumen 6 × Ladepuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 15 % (w/v) Ficoll; Fermentas) gemischt und in die Probenaschen des erstarrten Gels pipettiert. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde bei jedem Gellauf ein Längenstandard (Marker) aufgetragen. Abhängig von der Gelgröße erfolgte die Elektrophorese bei 70-120 V (Netzgerät: Standard Power Pack P25, Biometra). Anschließend wurden die Gele mit Hilfe des *Gel Imaging System* (raytest Isotopenmessgeräte GmbH) dokumentiert.

2.7.13 Reinigung von PCR-Produkten, DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die Reinigung von PCR-Produkten sowie die Isolierung der DNA aus Agarose-Gelen, erfolgten unter Verwendung des Kits *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* von Promega entsprechend des Herstellerprotokolls.

2.8 RNA-Methoden

2.8.1 Isolation von Gesamzell-RNA aus *C. reinhardtii*

Die Isolation der Gesamzell-RNA wurde nach der Methode von Chomczynski *et al.* [140] durchgeführt. Zellen der logarithmischen Phase, entsprechend 150 µg Chlorophyll,

wurden pelletiert und in 1 ml Trizol (38 % gesättigtes Phenol (v/v), 0,8 M Guanidinthiocyanat, 0,4 M Ammoniumthiocyanat, 0,1 M Na-Acetat pH 5, 0,5 % Glycerol (v/v)) resuspendiert. Nach der Zelllyse für 5 min bei 55°C, wurde 200 µl Chloroform zugegeben, der Ansatz für 15 s auf dem Vortex gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (4°C, 10 min, 16000 g), wurde der Überstand mit 500 µl 100 % Isopropanol für 5 min bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 10 min, 16000 g) wurde das Pellet 2-mal mit 75 % DEPC-EtOH gewaschen, getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst.

2.9 Protein-Methoden

2.9.1 Isolation von Gesamtzell-Protein aus *C. reinhardtii*

C. reinhardtii Zellen der späten logarithmischen Phase wurden sedimentiert und das Pellet mit 1 ml Puffer A (0,1 M Na₂CO₃) gewaschen. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer A, 200 µl Puffer B (5 % SDS (w/v), 30 % Saccharose (w/v)) und 25 µl 2-Mercaptoethanol resuspendiert und 25 min auf einem Schüttler geschüttelt. Nach Zentrifugation (RT, 5 min, 16000 g) erfolgte eine Chlorophyllbestimmung des Überstandes.

2.9.2 Fraktionierte Proteinisolation aus *C. reinhardtii*

Für die fraktionierte Proteinisolation wurden *C. reinhardtii* Zellen der späten logarithmischen Phase zunächst sedimentiert und das Pellet mit Proteinpuffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) gewaschen. Nach Zentrifugation wurde das gewaschene Pellet in 2 ml Proteinpuffer, dem 1 mM AEBSF und 10 µM E64 zugesetzt wurden, resuspendiert und die Zellen per Ultraschall (4 × 15 s, je 15 s auf Eis; Sonifier B12, *Branson Sonic Power Company, Danbury Connecticut*) aufgeschlossen. Nach niedertouriger Zentrifugation (4°C, 2 min, 1000 g) zum Pelletieren der Zelltrümmer wurde der Überstand abgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und größere Membranbestandteile pelletiert (4°C, 30 min, 16000 g). Im Anschluss erfolgte eine Ultrazentrifugation des Überstandes (4°C, 1 h, 100000 g) zur vollständigen Sedimentation der Membranbestandteile. Der Überstand enthält die löslichen Proteine.

2.9.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford [141] erfolgte mit der Roti®- Quant *ready to use* Lösung entsprechend Herstellerprotokoll. Die Bestimmung der Proteinkonzentration

erfolgte durch photometrische Messung von Doppelproben bei OD = 595 nm und dem Abgleich mit einer BSA-Eichgerade.

2.9.4 Reinigung der fraktionierten Proteinproben mit Kit

Zur spezifischen Reinigung der GFP-Proteine der Mutanten GFP5h und GFP5s sowie tmGFP5h und tmGFP5s, wurde das μ MACSTM GFP Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec, entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Es wurden jeweils gleiche Mengen löslichen Proteins eingesetzt. Die IL-Mutante wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

2.9.5 Acetonfällung

Für die Fällung von Proteinproben wurde je ein Volumen proteinhaltige Lösung mit vier Volumina eiskaltem 100 % Aceton versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert (4°C, 30 min, 16000 g) und der Überstand abgenommen. Die Pellets wurden 2-mal mit eiskaltem 80 % Aceton gewaschen (4°C, 10 min, 16000 g), auf Eis getrocknet und im gewünschten Puffer resuspendiert.

2.9.6 SDS-PAGE

2.9.6.1 Verwendete Gele

Die Trennung der Proteine per SDS-PAGE, wurde nach Schägger & von Jagow [142] durchgeführt. Es wurden zur eindimensionalen Gelelektrophorese Gele der Größe 14 cm*14 cm*0,1 cm genutzt. Für die zweidimensionale Gelelektrophorese wurden Gele der Größe 14 cm*14 cm*0,5 cm hergestellt. Zum Verkleben der Glasplatten wurde ein *Plug*-Gel zwischen die Scheibenränder gegossen. Die Auftrennung der Proben erfolgte zunächst im 6 % Sammelgel (0,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (45:1,5), 1,65 ml 3 × Gelpuffer (3 M Tris, 8 % HCL (konz.), 0,3 % SDS (w/v)), 3 ml Aqua dest., 50 µl 10 % Ammoniumpersulfat (w/v), 5 µl TEMED) und anschließend im 12 % Trenngel (7,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (45:1,5); 7,5 ml 3 × Gelpuffer, 7,5 ml Aqua dest., 100 µl 10 % Ammoniumpersulfat (w/v); 10 µl TEMED). In einigen Fällen erfolgte der Zusatz von 6 M Harnstoff sowohl im Sammel- als auch im Trenngel.

2.9.6.2 Eindimensionale SDS-PAGE

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde eine Hoefer Midi-Gel Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Die Gele wurden wie unter 2.9.6.1 beschrieben hergestellt. Die Separation der Proteine erfolgte bei maximaler mA-Leistung und 50 V

über Nacht. Der Kathodenpuffer (10-fach: 1 M Tris, 1 M Tricin, 1 % SDS (w/v)) und der Anodenpuffer (10-fach: 2 M Tris pH 8,9) wurden einfach eingesetzt.

2.9.6.3 Zweidimensionale (2D) SDS-PAGE

Bei der 2D Gelelektrophorese erfolgt zunächst die Auftrennung der Proteine nach dem isoelektrischen Punkt (= 1. Dimension). Daran schließt sich die Trennung nach Molekulargewicht (= 2. Dimension) an. Die 2D Elektrophorese wurde mit Proben der Mutanten tmGFP5h, tmGFP5s und IL durchgeführt.

Probenaufarbeitung

Die Anzucht der *C. reinhardtii* Mutanten erfolgte in 300 ml Minimalmedium, in einer Knie-seapparatur bis zum Ende der logarithmischen Phase (24°C, 2,5 % CO₂). Die Proteinextraktion erfolgte wie unter 2.9.2 beschrieben. Es wurden pro Mutante Aliquots von je 250 µg Protein für die Western Blot Analysen mit Aceton gefällt (2.9.5). Die Pellets wurden in 340 µl IEF-Puffer (7 M Urea, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS (w/v), 30 mM DTT, 0,002 % Bromphenolblau (w/v), pH 7; aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert) resuspendiert (30 min, Schüttler).

erste Dimension - Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde in der *IPGphor Isoelectric Focusing System* Apparatur (Amersham) durch Streifen mit immobilisiertem pH-Gradienten mit pI 5-8 (18 cm, Serva Elektrophoresis GmbH) durchgeführt. Die gefällte, in IEF-Puffer resuspendierte Probe wurde entlang der Kante in das Schiffchen pipettiert. Nach Abziehen der Schutzfolie wurde der immobilisierte pH-Streifen mit der Gelseite nach unten und in richtiger Orientierung luftblasenfrei auf die Probenlösung gelegt. Nach Überschichtung mit Mineralöl um Austrocknen zu vermeiden wurde ein Kunststoffdeckel auf das Schiffchen gelegt und dieses in die IEF-Kammer gelegt. Tabelle 2-3 listet das verwendete Programm auf. Die Streifen wurden sofort nach dem Lauf aus der Kammer entnommen und für die zweite Dimension vorbereitet.

Tabelle 2-3 | Verwendetes Programm der isoelektrischen Fokussierung.

Schritt	Volt	Dauer
1 (Rehydrierung)	/	12 h
2 (Stufe)	150 V	3 h
3 (Stufe)	300 V	3 h
4 (Gradient)	1000 V	6 h
5 (Gradient)	8000 V	2 h
6 (Stufe)	8000 V	2,5 h

zweite Dimension - Auftrennung nach Molekulargewicht

Vor der Trennung der Proteine nach Molekulargewicht wurden die IEF-Gelstreifen zunächst in Äquibrierpuffer (50 mM Tris pH 7, 2 % SDS (w/v), 6 M Urea, 30% Glycerin (w/v), 0,0067 % Bromphenolblau (w/v); aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert) bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei erfolgt die Reduktion und Alkylierung der Proteine sowie die Beladung mit SDS. Zuerst erfolgte die Inkubation für 15 min in Puffer I (Äquibrierpuffer + 1 % DTT (w/v)) zur Reduzierung der SH-Gruppen. Im Anschluss wurden die Streifen für 15 min in Puffer II (Äquibrierpuffer + 5 % Iodacetamid (w/v)) inkubiert, um die SH-Gruppen zu alkylieren. Nach der Äquibrierung wurden die Streifen auf zuvor hergestellte SDS-Gele (2.9.6.1) gelegt und mit Agarose (300 mg Agarose, 6 ml 10-fach SDS Puffer, mit Aqua dest. auf 60 ml auffüllen, aufkochen und abkühlen lassen) fixiert. Die Trennung der Proteine erfolgte wie unter 2.9.6.2 beschrieben.

2.9.7 Coomassie kolloidal Färbung

Zum Nachweise der Proteine im SDS-Gel wurde die kolloidale Coomassie-Färbung, basierend auf der Methode nach Kang *et al.*, angewendet [143]. Die Färbelösung setzt sich zusammen aus 0,02 % CBB-G250 (w/v), 5 % Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat (w/v), 10 % Ethanol (v/v) und 2 % ortho-Phosphorsäure (v/v). Dabei muss bei der Herstellung darauf geachtet werden, dass zunächst das Aluminiumsulfat in Wasser gelöst wird. Dann EtOH zugeben, homogenisieren und CBB-G250 beimischen. Erst wenn das Aluminiumsulfat gelöst ist wird Phosphorsäure zugeben und mit Aqua dest. aufgefüllt. Die Lösung ist dunkelgrün-bläulich und weist Farbpartikel auf. Diese sind der kolloidale Zustand von Coomassie und sollten nicht abfiltriert werden. Die Lösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt und aufgrund der geringen Haltbarkeit regelmäßig erneuert. Die Färbung erfolgte über Nacht nach dreimaligem Waschen des Gels für je zehn Minuten mit Aqua dest., um SDS des Laufpuffers aus dem Gel zu entfernen. Nach der Färbung wurden die Gele lediglich ein paar Mal mit Wasser gewaschen und aufbewahrt.

2.10 Blotting Verfahren

2.10.1 Southern und Northern Blot

Southern und Northern Blotting wurden nach Sambrook *et al.* durchgeführt [131]. Die Herstellung DIG-markierter (Roche®) DNA-Sonden erfolgte durch PCR. Hierbei kamen für

die Southern Blot Analyse der AadA, GFP sowie tmRNA-Mutanten 5SrDNA-spezifische Sonden zum Einsatz. Für die Northern Blot Analysen wurden jeweils genspezifische Sonden verwendet. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50°C in Hybridisierungspuffer (5 × SSC, 50 % Formamid (v/v), 0.1 % N-Lauroylsarcosin (w/v), 0.02 % SDS (w/v), 2 % Blockingreagenz (w/v), Boehringer GmbH, Mannheim). Waschen, Blocken, Antikörperreaktion (*Anti-DIG fab fragments* (Roche®) und Detektion wurden mit dem CSPD, *Ready-to-use* Kit (Roche®) entsprechend Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.10.2 Semi Dry Western Blot

Bei dem Western Blot Verfahren nach Towbin *et al.* [144] erfolgt der Transfer von Proteinen aus dem Gel auf die Oberfläche einer Membran (Nitrozellulose oder PVDF) mit einer *Semi-Dry*-Elektrotransferkammer. Whatman Papiere, Membran und Gel werden in Transferpuffer (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 20 % Methanol (v/v), 0,1 % SDS (w/v)) äquilibriert und dann zu einem Sandwich aufgebaut. Durch Anlegen einer Spannung (15 V) für 1 h werden die Proteine an die Oberfläche der Membran gebunden und können durch verschiedenen nachfolgende Techniken sichtbar gemacht werden.

2.11 Transformation

2.11.1 Chloroplastentransformation von *C. reinhardtii*

C. reinhardtii Mutanten wurden durch Transformation geeigneter Deletionsmutanten durch Beschuss mit Partikelkanone erzeugt [145]. Als Rezipient für die Erzeugung der *psbA*-Mutanten diente die Del1-Mutante, die mit PCR-Produkten transformiert wurde [146]. Die Mutante FUD7 diente der Erzeugung der Mutanten AadA, GFP und tmGFP und wurde mit Plasmiden beschossen. Die Selektion der Transformanten erfolgte über Photoautotrophie mit Minimalmedium.

2.11.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen wurde die Rubidiumchlorid-Methode verwendet. 200 ml LB-Medium wurden mit 3 ml einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C auf einem Schüttler bis zu einer OD (600 nm) von 0,6-0,8 angezogen. Nach einer 15 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen pelletiert (4°C, 5 min, 1000 g) und in insgesamt 0,4 Vol. TfbI-Puffer (100 mM RbCl, 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % Glycerin (v/v)) resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis und erneuter Pelletie-

rung (4°C, 5 min, 1000 g), wurden die Zellen in 0,04 Volumen TfbII-Puffer (10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerin (v/v)) aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert. 100 µl Aliquots wurden schließlich in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.11.3 Transformation von *E. coli*

E. coli Zellen (TG1) wurden durch die Hitzeschock-Methode nach Sambrook *et al.* transformiert [131]. 100 µl chemisch kompetente Zellen wurden auf Eis mit 10 µl Ligationsansatz für 30 min inkubiert. Nach einem anschließenden 60 s Hitzeschock (42°C) und 2 min Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 900 µl SOC-Medium (2 % Trypton (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose). Die Zellen wurden unter Schütteln für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Aliquots auf LB-Agar Platten (1,5 % Agar-Agar), mit 100 µg/µl Ampicillin (Sigma) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.12 Physiologische Methoden

2.12.1 Droptest

C. reinhardtii Zellen der mittleren logarithmischen Phase (entsprechend $1,5 \cdot 10^6$ Zellen), wurden auf TAP-Agar Platten (1,5 % Agar-Agar) mit verschiedenen Konzentrationen Spectinomycin und Streptomycin (0/0, 25/50, 50/100, 100/200, 200/400, 400/800 und 800/1600 [µg/ml] Strep/Spec) getropft und für 14 Tage bei 24°C und kontinuierlichem Licht ($50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) inkubiert.

2.12.2 Photoinhibition

C. reinhardtii Zellen entsprechend 1500 µg Chlorophyll wurden sedimentiert (RT, 5 min, 1000 g) und das Pellet in 100 ml frischem TAP-Medium resuspendiert (Endkonzentration 15 µg Chlorophyll/ml). Die Algensuspension wurde im Thermostatisiergefäß für 45 min bei 24°C inkubiert. Die Beleuchtung während des Lichtstresses erfolgte mit Halogenstrahlern (Hedler H25) bei einer Lichtintensität von $2000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Hansatech Quantitherm Light Meter Thermometer). Zu Versuchsbeginn, nach 30, 60 und 90 min wurden Aliquots von je 1 ml Algensuspension entnommen, pelletiert (4°C, 5 min, 16000 g) und das Pellet in 75 µl Puffer A (0,1 M Na₂CO₃), 50 µl Puffer B (5 % SDS (w/v), 30 % Saccharose (w/v))

sowie 6,25 µl Mercaptoethanol für 25 min auf dem Schüttler resuspendiert. Nach Zentrifugation wurde ein Volumen entsprechend 2 µg Chlorophyll auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.12.3 Puls-Markierung

Pulse labeling Experimente wurden wie durch Preiss *et al.* [123] beschrieben durchgeführt. *C. reinhardtii* Zellen wurden in sulphatreduziertem TAP-Medium bis zur mittleren logarithmischen Phase angezogen. Zellen entsprechend 90 µg Chlorophyll wurden pelletiert (RT, 5 min, 1000 g) und in TAP-Medium bei dem alle Sulphatsalze durch Chloridsalze ersetzt wurden auf eine Endkonzentration von 200 µg/ml Chlorophyll resuspendiert. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur im Licht ($30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) erfolgte 15 min vor dem Puls, die Hemmung der cytoplasmatischen Proteinbiosynthese durch Zugabe von 10 µg/ml Cycloheximid. Die Puls-Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µCi/ml [³⁵S]-Sulphat (2 mCi/ml) gestartet. Die Zellen wurden bei 21°C im Licht ($80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) für 20 min in einem Wasserbad inkubiert. Proteinproben entsprechend 9 µg Chlorophyll wurden zu definierten Zeitpunkten entnommen, in 80 % eiskaltem Aceton gefällt und zentrifugiert (4°C, 10 min, 16000 g). Das getrocknete Pellet wurde in 2 × Ladepuffer (100 mM Tris pH 6.8, 200 mM DTT, 4 % SDS (w/v), 0.2 % Bromphenolblau (w/v), 20 % Glycerol (v/v)) resuspendiert, 10 min bei 95°C inkubiert und 3 µg Chlorophyll per SDS-PAGE getrennt. Hierbei erfolgte der Zusatz von 6 M Harnstoff im Gel. Die Gele wurden für 1 h in 45 % Methanol und 9 % Essigsäure fixiert, Vakuumgetrocknet und im *PhosphorImager Screen* exponiert (*Molecular Dynamics*, Sunnyvale CA, USA). Für die Quantifizierung wurde die Software *IMAGE QUANT* v. 1.2 der genannten Firma genutzt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *codon usage* Effekte auf die Expression von Proteinen im Chloroplast der Grünalge *C. reinhardtii* untersucht. Vor allem für die heterologe Genexpression spielt die Codon-Anpassung eine wichtige Rolle, da neben der Beeinträchtigung der Translation auch die Quantität und die Qualität eines synthetisierten Proteins durch bestimmte Codon-Cluster beeinflusst werden [112]. Durch Etablierung eines Codon Test Systems konnte zunächst der Einfluss seltener Codons auf die Synthese eines plastidär codierten *high turnover* Proteins untersucht werden [147]. In anschließenden Experimenten erfolgte die Analyse von *Arg-codon usage* Effekten auf heterolog exprimierte Proteine sowie die Untersuchung des tmRNA-tagging Systems.

3.1 Etablierung eines Codon Test Systems

Die Erzeugung von *psbA*-Codon-Insertionsmutanten und deren physiologische sowie biochemische Charakterisierung sollte klären, welchen Einfluss seltene Codons auf die Synthese des D1-Proteins haben. Diese zentrale Untereinheit des Photosyntheseapparates unterliegt einer hohen *turnover* Rate und stellt daher ein besonders geeignetes Modellprotein dar, um den Einfluss seltener Codons auf dessen Expression zu überprüfen. Es wurden unterschiedlich große Peptide, die durch seltene bzw. häufige Codons ausgewählter Aminosäuren codiert werden, in die D-de *loop*-Region des D1-Proteins inseriert (Abb. 3-1). Für diesen Bereich konnte bereits gezeigt werden, dass ohne Funktionsverlust des Proteins verschiedene Insertionen möglich sind [113,114].

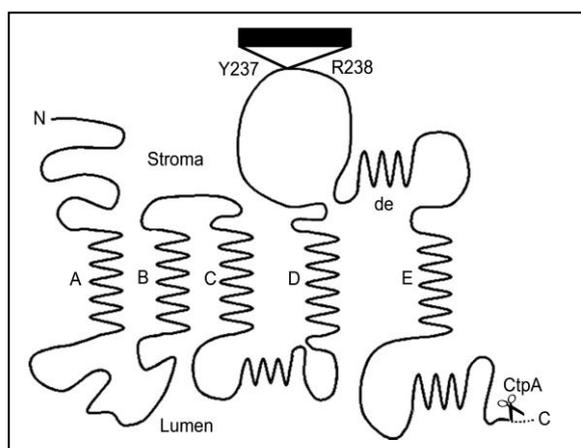


Abb. 3-1| Schematische Darstellung des D1-Proteins. Die Transmembranhelices sind durch die Buchstaben A-E gekennzeichnet. Der N-Terminus (N) ist im Stroma, der C-Terminus (C) im Lumen lokalisiert. Das Scherensymbol deutet die Prozessierung des C-terminalen Telopeptides durch die CtpA an. Das schwarze Viereck markiert die Peptidinsertionen zwischen den Aminosäuren Y237 und R238 in der D-de *loop*-Region.

Anhand der *codon usage* Tabelle des Chloroplasten (Anhang II) wurden die Aminosäuren Arg, Leu, Ser, Ala und Gly für die Insertionskonstrukte ausgewählt, da deren selten

genutzten synonymen Codons im Vergleich zu anderen Aminosäuren die geringste Nutzungsfrequenz im Plastom aufweisen und nicht zur Codierung des *psbA*-Gens verwendet werden. Für die Transformation wurde die Del1-Mutante genutzt [146], die aufgrund einer 425 bp großen Deletion im *psbA*-Gen nicht in der Lage ist photoautotroph zu wachsen. Durch Transformation mit Hilfe der Partikelkanone kann die Deletion ersetzt und Transformanten über photoautotrophes Wachstum auf Minimalmedium selektiert werden. Die Zellen wurden mit PCR-Fragmenten transformiert, die die Codons der gewählten Aminosäuren in unterschiedlicher Anzahl sowie homologe Bereiche zum Plastom der Del1-Mutante enthielten. Tabelle 3-1 fasst das Transformationsergebnis zusammen.

Tabelle 3-1 | Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante. Dargestellt sind die gewählten Aminosäuren und die entsprechenden seltenen sowie häufigen Codons, die in das *psbA*-Gen inseriert werden sollten. Deren Nutzungsfrequenz im Plastom sowie im *psbA*-Gen ist in Prozent angegeben. Außerdem ist die Anzahl der Codons für die Transformationskonstrukte sowie das Ergebnis der Selektion der Transformanten über photoautotrophes Wachstum dargestellt. Die mit Sternchen markierten Aminosäuren bezeichnen zufällig erhaltene Transformanten, die aus dem Beschuss mit 1 × CGG hervorgingen. N.a. = nicht anwendbar.

Aminosäure	Codon	Freq (%) Chloroplast	Freq (%) <i>psbA</i> Gen	Anzahl zu testender inserierter Codons	Anzahl erhaltener inserierter Codons
Arg	CGG	0.052	0	1,2,3,5,10	0
	AGG	0.086	0	1,2,3,5,10	0
	CGT	3.24	4.25	1,2,3,5,10	1,2,3,5,10
Leu	CTC	0.105	0	1,2,3,5,10	1,2
	TTA	7.774	5.1	1,2,3,5,10	1,2,3
Ser	TCC	0.277	0	1,3,5,10	1,3
	TCA	2.2	4.53	1,3,5,10	1,3,5
Ala	GCG	0.329	0	1,5,10	1,5,10
	GCT	3.397	7.08	1,5,10	1,5,10
Gly	GGG	0.37	0	1,5,10	1,5
	GGT	4.403	8.5	1,5,10	1,5
Arg*	CGA	0.337	0	n.a.	n.a.
	CGC	0.412	0	n.a.	n.a.
Gly*	GGG	0.37	0	n.a.	n.a.
Gln*	CAG	0.412	0	n.a.	n.a.
Pro*	CCG	0.236	0.57	n.a.	n.a.
Trp*	TGG	1.35	2.83	n.a.	n.a.

Bereits das Transformationsergebnis lässt Rückschlüsse über den Einfluss der seltenen Codons auf die Translation des *high turnover* Proteins zu. Trotz mehrfacher und unabhängiger Transformationsversuche der Del1-Mutante konnten keine photoautotroph

wachsenden Mutanten mit selten genutzten Arg-Codons (CGG oder AGG) im *psbA*-Gen erzeugt werden. Die Erzeugung von Mutanten mit bis zu zehn häufig genutzten Arg-Codons gelang hingegen problemlos. Aus dem Beschuss von $50 \times 1,5 \cdot 10^7$ Zellen (statt der üblich genutzten $5 \times 1,5 \cdot 10^7$ Zellen) mit den Konstrukten $1 \times$ CGG bzw. $1 \times$ AGG resultierten zwar sechs Transformanten, die Sequenzierungen ergaben aber, dass keine das gewünschte Konstrukt enthielt. In jedem Fall kam es zur Veränderung des CGG-Codons (Tabelle 3-1), entweder zu einem häufiger genutzten Arg-Codon (CGA, CGC) oder zu selten genutzten Codons anderer Aminosäuren (Trp (TGG), Gly (GGG), Pro (CCG) und Gln (CAG)). Offensichtlich haben selten genutzte Arg-Codons einen so drastischen Effekt auf die D1-Synthese, dass keine Selektion der Transformanten über photoautotrophes Wachstum möglich ist. Auch für die Aminosäuren Leu und Ser waren Unterschiede im Ergebnis der Transformation erkennbar. Die Insertion von drei häufig genutzten Leu- und fünf häufig genutzten Ser-Codons war erfolgreich, aber lediglich Mutanten mit zwei selten genutzten Leu- und drei selten genutzten Ser-Codons konnten erzeugt werden. Keine Unterschiede waren für die Mutanten mit Ala- bzw. Gly-Codons zu erkennen. Sowohl die Erzeugung von Mutanten mit zehn häufig als auch zehn selten genutzten Ala-Codons sowie die Erzeugung von Mutanten mit fünf häufig bzw. fünf selten genutzten Gly-Codons waren erfolgreich. Die Insertion von zehn Codons in den *loop*-Bereich des D1-Proteins gelang nur für die Aminosäuren Arg und Ala. Mögliche Konformationsänderungen durch Insertion von Cluster der anderen Aminosäuren könnten zum Funktionsverlust des D1-Proteins führen. Effekte auf mRNA-Level, wie z.B. die Bildung von Sekundärstrukturen, wurden durch die Analyse mit dem mRNA-Vorhersage-Programm *GenBee* [148] weitgehend ausgeschlossen.

Als Voraussetzung für die folgende vergleichende physiologische und biochemische Analyse der Mutanten zur Ermittlung von *codon usage* Effekten, musste jeweils eine Mutante mit Insertion selten genutzter Codons sowie die zugehörige Mutante mit gleicher Anzahl an häufig genutzten Codons vorliegen. Zudem wurden die Mutantenpaare mit der höchsten Anzahl inserierter Codons gewählt, da *codon usage* Effekte vermutlich mit steigender Anzahl Triplets deutlicher ausfallen. Dies war der Fall für die Paare Leu2, Ser3, Gly5 und Ala10. Die Bezeichnung der Mutanten erfolgte gemäß des Dreibuchstabencodes der jeweiligen Aminosäure und die Zahl entspricht der Anzahl inserierter Codons. Im Folgenden bezeichnet ein „s“ Mutanten mit seltenen Codons, „h“ steht für Mutanten mit

häufigen Codons. Für die physiologische Charakterisierung unter Standardbedingungen wurden Wachstumsraten erstellt und die Sauerstoffproduktionsrate sowie die PSII-Effizienz ermittelt. Ein Einfluss der Insertionen auf die physiologische Leistung der Mutanten wird durch den Vergleich der Ergebnisse mit denen der IL-Mutante, die über ein intronloses *psbA*-Gen verfügt, deutlich. Anhand des paarweisen Vergleiches der Mutanten können *codon usage* Effekte analysiert werden.

3.1.1 Sequenzierung und Test auf Homoplasmie

Für die Bestätigung der korrekten Sequenz des *psbA*-Gens der Transformanten wurden PCR-Fragmente amplifiziert und von der Firma SeqLab (Göttingen) sequenziert. Im Anhang III sind die Elektropherogramme der mutierten Bereiche zu finden.

Vor der physiologischen und biochemischen Charakterisierung der Mutanten musste zudem der homoplasmische Zustand des *psbA*-Gens nachgewiesen werden. Da das Plastom in mehrfacher Kopie vorliegt, existieren unmittelbar nach der Transformation sowohl Kopien des Transgens als auch des Rezipientenstammes und man spricht von Heterplasmie. Nach mehreren Generationszyklen unter selektiven Bedingungen erhalten nach und nach alle Kopien des Plastoms das eingebrachte Genfragment und man spricht von Homoplasmie. Der Nachweis dieses Zustandes erfolgte durch PCR mit *psbA*-spezifischen Primern unter Mitführung des Rezipientenstammes Del1 sowie der IL-Mutante. Abb. 3-2 zeigt das ca. 300 bp-Fragment der Del1-Mutante und das ca. 700 bp-große Fragment der IL-Mutante sowie der Transformanten. Das Rezipientenfragment konnte nicht amplifiziert werden, wodurch der homoplasmische Zustand eindeutig nachgewiesen ist.

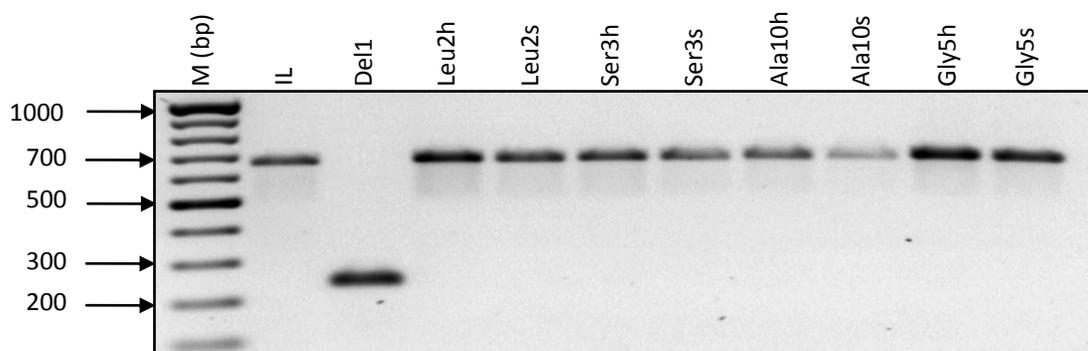


Abb. 3-2 | Test der *psbA*-Mutanten auf Homoplasmie. Dargestellt sind die Ergebnisse der PCR-Reaktionen mit den *psbA*-spezifischen Primern Dau4 (*forward*) & Dau2 (*reverse*) im Agarosegel (1 % Agarose (w/v) + EtBr). Die PCR wurde an genomischer DNA der Transformanten Leu2, Ser3, Ala10 und Gly5 sowie den Kontrollen IL und Del1 durchgeführt. Marker (M) = 100 bp Plus (Fermentas).

3.1.2 Wachstumsraten

Wachstumsraten liefern Aussagen darüber, ob die Insertionen bzw. die unterschiedliche Codon-Nutzung Einfluss auf das photoautotrophe Wachstum der Mutanten haben. Dafür wurden Wachstumskurven in Flüssigkultur erstellt und innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase die Wachstumsraten ($= \Delta OD_{750\text{ nm}} / \text{Zeiteinheit}$) ermittelt.

Im Vergleich der Wachstumsraten der Mutanten mit der Referenzmutante IL zeigen lediglich die Mutanten Ala10h, Ala10s und Ser3s reduzierte Werte von etwa 90 % auf (Abb. 3-3 (A)). Da die Ala-Mutanten zehn zusätzliche Aminosäuren im *loop*-Bereich des D1-Proteins tragen, könnten strukturelle Veränderungen aufgrund der Insertion die reduzierte Wachstumsrate erklären. Die Mutante Leu2h weist eine Wachstumsrate von ca. 110 % auf und die Werte der übrigen Mutanten liegen im Schwankungsbereich der IL-Mutante. Demnach kann ein Einfluss der Insertion auf das photoautotrophe Wachstum ausgeschlossen werden.

Um Aussagen hinsichtlich *codon usage* Effekten zu treffen wurden die Wachstumsraten der jeweiligen Mutanten mit häufigen Codons 100 % gesetzt und die Raten der Mutanten mit seltenen Codons diesem Wert gegenüber gestellt. Aus Abb. 3-3 (B) werden keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Wachstumsraten der Mutantenpaare deutlich, was darauf hinweist, dass die *codon usage* der Mutantenpaare Leu2, Ser3, Gly5 und Ala10 unter Standardbedingungen keinen Einfluss auf das photoautotrophe Wachstum hat.

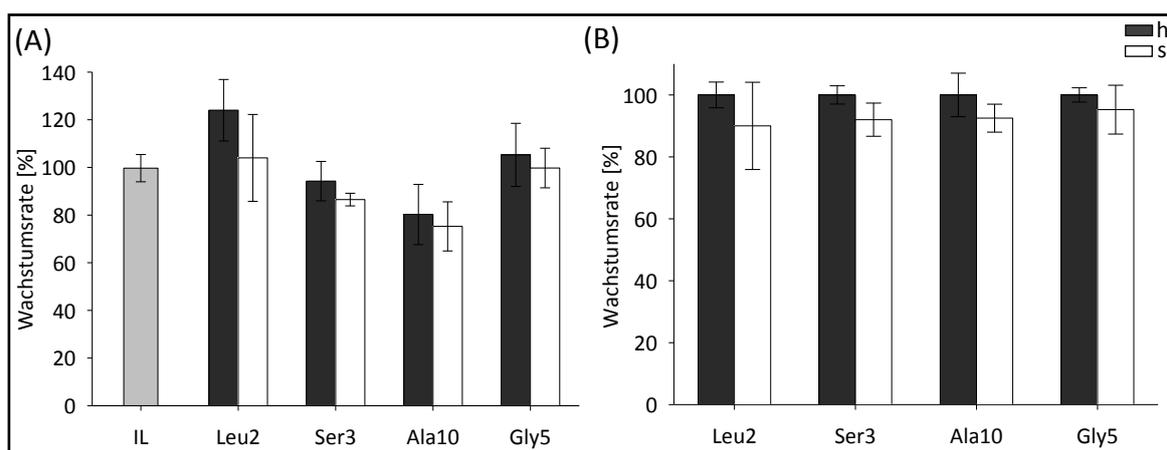


Abb. 3-3 | Wachstumsraten der *psbA*-Mutanten. Ermittelt wurden die Wachstumsraten in Minimalmedium, bei 24°C, unter Schwachlicht ($50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und konstanter Begasung mit CO_2 -Luft (2,5 % - 97,5 %) während der logarithmischen Wachstumsphasen durch Berechnung von $\Delta OD_{750\text{ nm}} / \text{Zeiteinheit}$. (A): Wachstumsraten der Mutanten mit häufigen (graue Balken) und seltenen Codons (weiße Balken) bezogen auf die Wachstumsrate der Referenz IL (100 %, hellgrauer Balken). (B): Wachstumsraten der Mutanten mit seltenen Codons (weiße Balken) bezogen auf die Wachstumsraten der Mutanten mit häufigen Codons (100 %, graue Balken). Die Standardabweichungen resultieren aus vier unabhängigen Messreihen.

3.1.3 Sauerstoffproduktionsrate

Die *psbA*-Insertionen sowie die unterschiedliche *codon usage* können Einfluss auf die Lichtreaktion der Photosynthese und folglich auf die Sauerstoffproduktion der Mutanten haben. Hinweise über negative Auswirkungen der Mutationen auf den Elektronentransport im PSII, liefert die Messung der Sauerstoffproduktion ganzer Zellen mit einer Sauerstoffelektrode. Der von den Algen veratmete Sauerstoff wird dabei nicht berücksichtigt.

Aus Abb. 3-4 (A) wird deutlich, dass die Werte der Sauerstoffproduktionsraten (SPR) der Mutanten Leu2h, Ser3s, Ala10h und Ala10s gegenüber der SPR der IL-Mutante (= 100 %) etwa 10-20 % reduziert sind. Die Werte der Mutanten Gly5, Leu2s und Ser3h liegen im Schwankungsbereich der SPR der IL-Mutante. Die reduzierten Werte beider Ala-Mutanten weisen auf einen Einfluss der Insertion von zehn Aminosäuren in die *loop*-Region des D1-Proteins auf dessen Photosyntheseleistung hin. Die verminderten SPR der Mutanten Leu2h und Ser3s sind nicht durch die Insertion zusätzlicher Aminosäuren zu erklären, da die D1-Sequenzen mit denen der Mutanten Leu2s bzw. Ser3h übereinstimmen.

Vergleicht man die SPR der Mutanten untereinander (Abb. 3-4 (B)) wird der deutliche Unterschied der Werte des Ser-Paares erkennbar. Mutante Ser3s weist eine um etwa 20-30 % verminderte Photosyntheseleistung gegenüber der Mutante Ser3h auf, was auf einen *codon usage* Effekt hindeutet. Aufgrund der seltenen Ser-Codons im *psbA*-Gen könnte die *de novo* Synthese des D1-Proteins in Mutante Ser3s verzögert ablaufen. Die SPR der Mutanten-Paare Ala10 und Gly5 zeigen im Vergleich der Mutanten untereinander keine deutlichen Unterschiede. Der Vergleich des Leu-Paares zeigt eine etwa 20 % bessere SPR von Mutante Leu2s gegenüber der Mutante Leu2h auf.

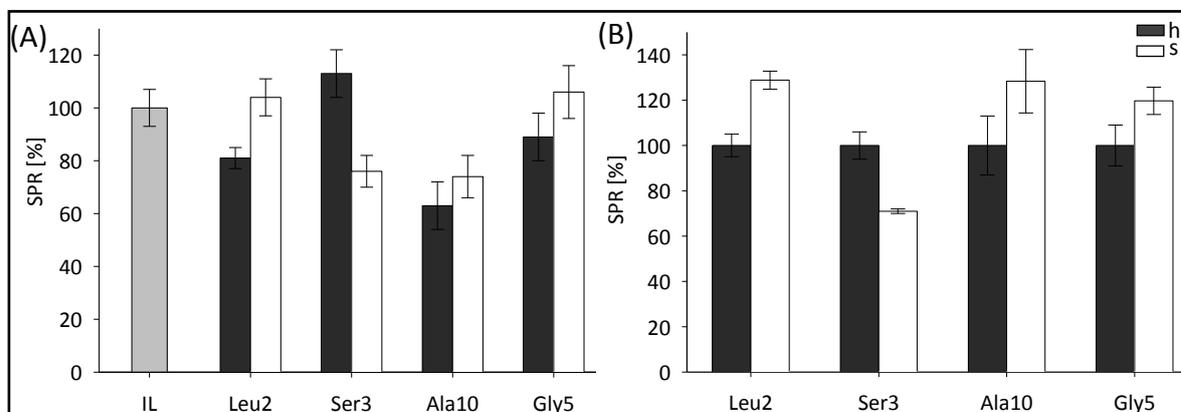


Abb. 3-4 | SPR der Mutanten. Die Messungen erfolgten bei einer Lichtintensität von $250 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und 24°C . (A) Werte der Mutanten (häufige Codons = graue Balken, seltene Codons = weiße Balken) bezogen auf die SPR der IL-Mutante (hellgrauer Balken). (B) Werte der Mutanten mit seltenen Codons (weiß) bezogen auf die SPR der Mutanten mit häufigen Codons (grau). Die Standardabweichungen resultieren aus vier unabhängigen Messungen.

3.1.4 Photosystem II Effizienz

Die Messung der PSII-Effizienz gibt Aufschluss darüber, ob die Insertionen im *loop*-Bereich des D1-Proteins Auswirkungen auf dessen Funktion haben. Die vom Chlorophyll absorbierten Photonen werden nicht nur für die Photochemie genutzt, sondern können sowohl als Wärme als auch in Form von Fluoreszenz abgegeben werden. Erfasst man den Wert der Chlorophyllfluoreszenz, hat man ein Werkzeug zur Ermittlung der maximalen Quantenausbeute des PSII (F_v/F_m) und somit ein Maß für die Photosyntheseleistung [149]. F_v entspricht hierbei der variablen und F_m der maximalen Fluoreszenz. Sollte sich die Insertion der zusätzlichen Aminosäuren negativ auf die Photosyntheseleistung auswirken, sinkt der Wert der Quantenausbeute. Um dies zu überprüfen wurde von allen Mutanten der F_v/F_m Wert ermittelt und mit dem Wert der Referenzmutante IL verglichen (Tabelle 3-2). *Codon usage* Effekte sind anhand dieser Messung nicht zu erwarten, da diese eine Momentaufnahme der PSII-Effizienz darstellt.

Aus Tabelle 3-2 wird deutlich, dass alle Mutanten etwa 10-15 % reduzierte Quantenausbeuten gegenüber der IL-Mutante (75 %) zeigen. Die Insertionen zusätzlicher Aminosäuren vermindern die Effizienz der PSII-Quantennutzung und haben eine schlechtere Photosyntheseleistung des PSII zur Folge. *Codon usage* Effekte werden nicht deutlich, da keine Mutante mit seltenen Codons schlechtere F_v/F_m Werte als die jeweilige Vergleichsmutante mit häufigen Codons zeigt.

Mutante	F_v / F_m
IL	$0,745 \pm 0,021$
Leu2h	$0,64 \pm 0,020$
Leu2s	$0,665 \pm 0,025$
Ser3h	$0,635 \pm 0,005$
Ser3s	$0,625 \pm 0,005$
Ala10h	$0,605 \pm 0,005$
Ala10s	$0,615 \pm 0,005$
Gly5h	$0,66 \pm 0,030$
Gly5s	$0,66 \pm 0,020$

Tabelle 3-2| F_v/F_m -Werte der Mutanten. Die Mutanten wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in TAP-Medium, bei 24°C und einer Lichtintensität von $30 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ angezogen und auf eine OD (750 nm) = 1 verdünnt. Vor jeder Messung erfolgte eine einminütige Dunkeladaption. Die Standardabweichungen (\pm) resultieren aus vier unabhängigen Messungen.

Eine Beeinträchtigung der D1-Proteinexpression durch seltene Leu-, Ser-, Ala-, oder Gly-Codons konnte anhand der Versuche unter Standardbedingungen nicht eindeutig gezeigt werden. Lediglich die Ergebnisse der Serinmutanten weisen auf *codon usage* Effekte hin. Für weitere Analysen wurden darum Versuche unter Stressbedingungen gewählt.

3.1.5 Analyse der D1-Level unter Starklichtbedingungen

Die Syntheserate des D1-Proteins steigt bei hohen Lichtintensitäten aufgrund seiner irreversiblen Schädigung durch die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wie Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und dem Superoxidradikal (O_2^-), [107–109,150,151]. Diskutiert wird hierbei auch ein direkter Suppressor-Effekt der ROS auf die Proteinbiosynthese [108]. Um den Elektronentransport über der Thylakoidmembran aufrecht zu erhalten muss das D1-Protein permanent abgebaut und neu synthetisiert werden [110]. Sollten die seltenen Codons einen zusätzlichen inhibierenden Effekt auf die D1-Synthese haben, wird dieser unter Starklichtbedingungen durch eine Abnahme der D1-Level deutlich. Zur Erfassung dieser unter Lichtstress wurden die Mutanten über einen Zeitraum von 90 min mit hoher Lichtintensität bestrahlt und Western Blot Analysen mit anschließender densitometrischer Auswertung der D1-Banden durchgeführt.

In Abb. 3-5 ist auch nach 90 minütiger Bestrahlung in allen Mutanten eine D1-Bande zu erkennen. Eine deutliche Abnahme der Intensität der Blotbande in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit ist vor allem für Mutante Ser3s erkennbar. Die Blots der anderen Mutanten hingegen zeigen kaum Unterschiede der D1-Intensitäten in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit. Da die optische Einschätzung der Blots keine aussagekräftigen Anhaltspunkte über den D1-Gehalt liefert, wurden die densitometrischen Auswertungen der Blots für jede Mutante in Abhängigkeit der Zeit als Balkendiagramm dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden dabei einige Zeitpunkte ausgelassen. Vergleicht man die D1-Level der Leu- (Abb. 3-5 A) oder Gly-Mutanten (Abb. 3-5 D) untereinander, wird kaum ein Effekt der selten genutzten Codons auf die D1-Translation erkennbar. Die D1-Level der Mutanten mit häufigen Codons unterscheiden sich nicht wesentlich von den D1-Level der Mutanten mit seltenen Codons. Das Ala-Paar (Abb. 3-5 C) zeigt einen geringen Einfluss der Insertion auf das *steady-state level* des D1-Proteins, jedoch ist dies kein Effekt der *codon usage*, sondern vermutlich das Resultat der Insertion zehn zusätzlicher Aminosäuren im *loop*-Bereich des D1-Proteins. Vergleicht man den D1-Gehalt von Mutante Ser3s mit dem D1-Gehalt von Mutante Ser3h wird ein deutlicher *codon usage* Effekt auf die D1-Synthese erkennbar (3-5 B). Nach 90 min Starklichtstress ist das D1-Level in Mutante Ser3s um fast 80 % reduziert, wohingegen der D1-Gehalt in Mutante Ser3h nur um knapp 15 % zurück geht.

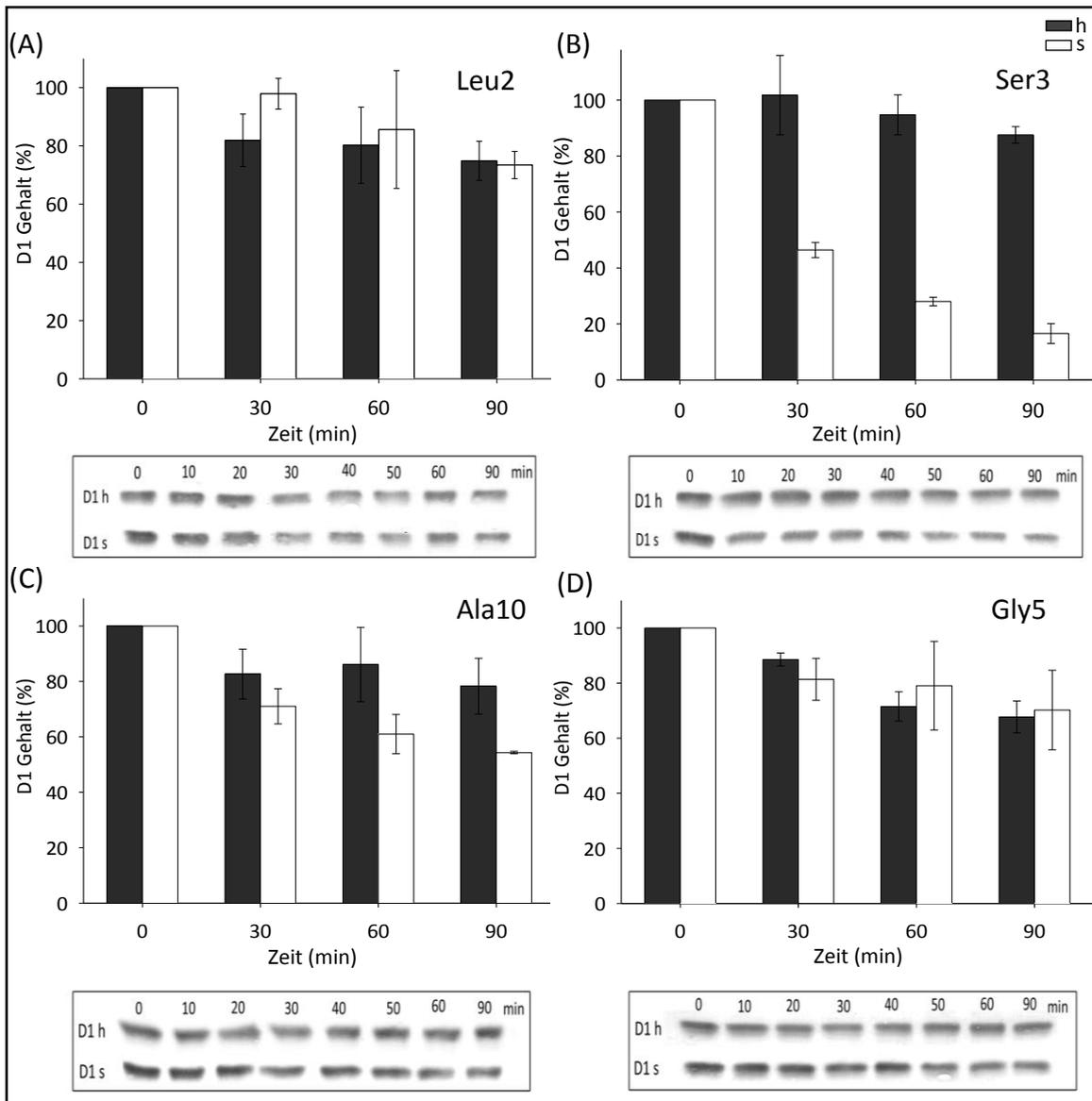


Abb. 3-5] D1-Protein Level der Mutanten mit häufigen (graue Balken) und seltenen (weiße Balken) Codons während Starklichtbestrahlung sowie zugehörige repräsentative Western Blot Analysen. Zellen (entsprechend 15 μg Chlorophyll/ml) der Mutanten (A) Leu2h/Leu2s, (B) Ser3h/Ser3s, (C) Ala10h/Ala10s und (D) Gly5h/Gly5s wurden für 90 min mit Starklicht bestrahlt ($2000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Zu definierten Zeitpunkten wurde Gesamtzellprotein isoliert und Aliquots entsprechend 3 μg Chlorophyll durch SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit D1-spezifischem Antikörper inkubiert. Die Entwicklung erfolgte durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase des sekundären Antikörpers mit NBT/BCIP. Dargestellt ist für jede Mutante die D1-Bande. Die prozentualen D1-Level sind in Abhängigkeit der Zeit angegeben und wurden mit AIDA-Software quantifiziert. Die Standardabweichungen resultieren aus fünf unabhängigen Wiederholungen.

3.1.6 PSII-Effizienz unter Starklichtbedingungen

Die Ser-Mutanten zeigten in den Western Blot Analysen die deutlichsten Unterschiede der D1-Level unter Starklichtbedingungen und somit hinsichtlich *codon usage* Effekten und wurden deshalb in weiteren Experimenten näher analysiert. Die Messung der PSII-Effizienz unter Starklichtbedingungen ($1500 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) sollte den Einfluss seltener Ser-Codons auf die Synthese des D1-Proteins verdeutlichen (Abb. 3-6 (A)).

Diese spiegelt die Ergebnisse der Western Blot Analysen wieder und verstärkt die Annahme, dass in Mutante Ser3s die D1-Synthese sowie der Ersatz des lichtgeschädigten D1-Proteins verzögert ablaufen. Es wird deutlich, dass der Fv/Fm-Wert von Mutante Ser3s schneller und auf einen kleineren Wert sinkt als der von Mutante Ser3h. Mutante Ser3h hingegen kann vermutlich problemlos die geschädigten D1-Proteine effizient durch *de novo* Synthese ersetzen.

Im weiteren Verlauf sollte geklärt werden, ob nach Starklichtstress die D1-Resynthese unter Schwachlichtbedingungen in Mutante Ser3s ebenfalls verzögert ist, oder die seltenen Codons unter den geänderten Bedingungen eine normale D1-Translation ermöglichen. Abb. 3-6 (B) zeigt, dass der Fv/Fm-Wert von Mutante Ser3s zunächst schneller und auf einen kleineren Wert als der Wert der Mutante Ser3h sinkt. Fällt der Stressfaktor Licht aus, erfolgt die D1-Resynthese im Schwachlicht in beiden Mutanten etwa in gleichem Maße. Die Fv/Fm-Werte steigen nach einiger Zeit im Schwachlicht in beiden Mutanten an, was darauf hindeutet, dass der Einfluss der seltenen Ser-Codons auf die Expression des D1-Proteins nur unter Stressbedingungen zum Tragen kommt.

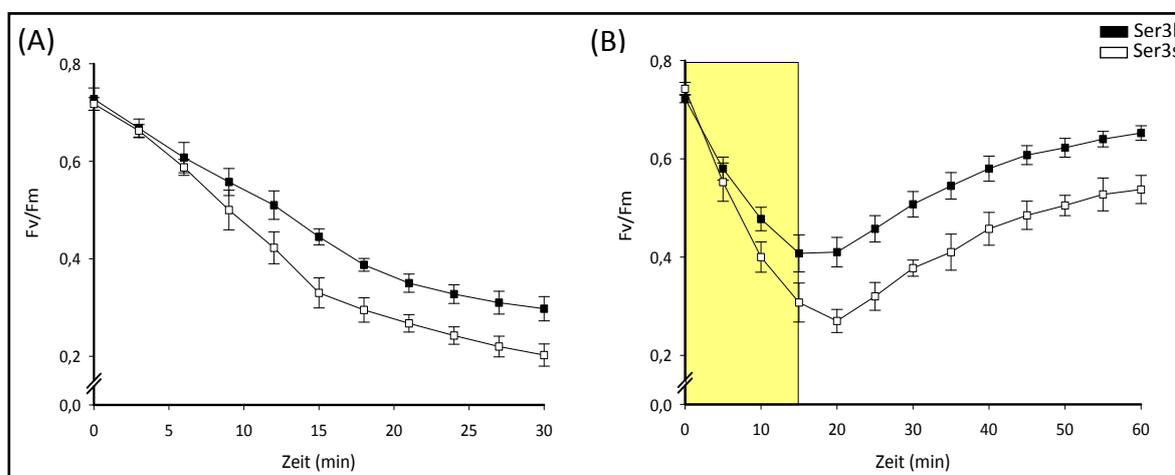


Abb. 3-6| PSII-Effizienz der Mutanten Ser3h (Schwarze Kästchen) und Ser3s (weiße Kästchen) nach Starklichtbestrahlung mit $1500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. (A) 30 min Bestrahlung. (B) Bestrahlung für 15 min mit anschließender Inkubation der Zellen bei $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Das gelbe Kästchen in Abbildung (B) markiert die 15 minütige Bestrahlungszeit. Für die Messung wurden 300 μl Aliquots eingesetzt und vor jeder Messung für eine Minute dunkel inkubiert. Die Standardabweichungen resultieren aus vier unabhängigen Messungen.

3.1.7 *in vivo* Markierung des D1-Proteins

Die *in vivo* Markierung von Proteinen mit radioaktiven Substanzen ist eine sehr sensitive Methode, die genaue Aussagen über Translationsvorgänge in lebenden Zellen liefern kann. Durch Verwendung von radioaktiv markiertem Schwefel, der zu den Zellen gegeben und in *de novo* synthetisierte Proteine eingebaut wird, ist es möglich ein Abbild der

plastidären D1-Synthese zu erstellen. Zur Hemmung der cytoplasmatischen Proteinbiosynthese wurde vor der Inkubation mit Schwefel Cycloheximid zu den Zellen gegeben, wodurch Überlagerungen der D1-Banden mit kerncodierten Proteinen, die der Größe des D1-Proteins entsprechen, ausgeschlossen werden sollten. Führt die Insertion selten genutzter Ser-Codons in der Nucleotidsequenz des *psbA*-Gens zur verzögerten Translation des D1-Proteins, wird die D1-Bande in Mutante Ser3s zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar als in Mutante Ser3h. Führt ein Pausieren der Ribosomen während der Elongation des D1-Proteins zur Akkumulation von Translationsintermediaten können zusätzliche Banden detektiert werden.

In Abb. 3-7 ist die Puls-Markierung nach drei, vier, fünf und zehn Minuten dargestellt. In beiden Mutanten ist nach vier Minuten das D1-Vorläuferprotein (pD1) bei ca. 32 kDa zu sehen. Gut erkennbar ist das Ergebnis der Prozessierung durch die plastidär lokalisierte Protease CtpA, die in *C. reinhardtii* acht Aminosäuren am C-terminalen Ende des D1-Precursors entfernt, um das reife und funktionstüchtige D1-Protein (D1) zu erhalten [152]. Auffällig ist die zusätzliche ca. 20 kDa große Bande (TI), die nach etwa vier Minuten nur in Mutante Ser3s sichtbar wird. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein Translationsintermediat des D1-Proteins, das aufgrund der selten genutzten Ser-Codons akkumuliert. Diese Bande wird in Mutante Ser3h nicht detektiert.

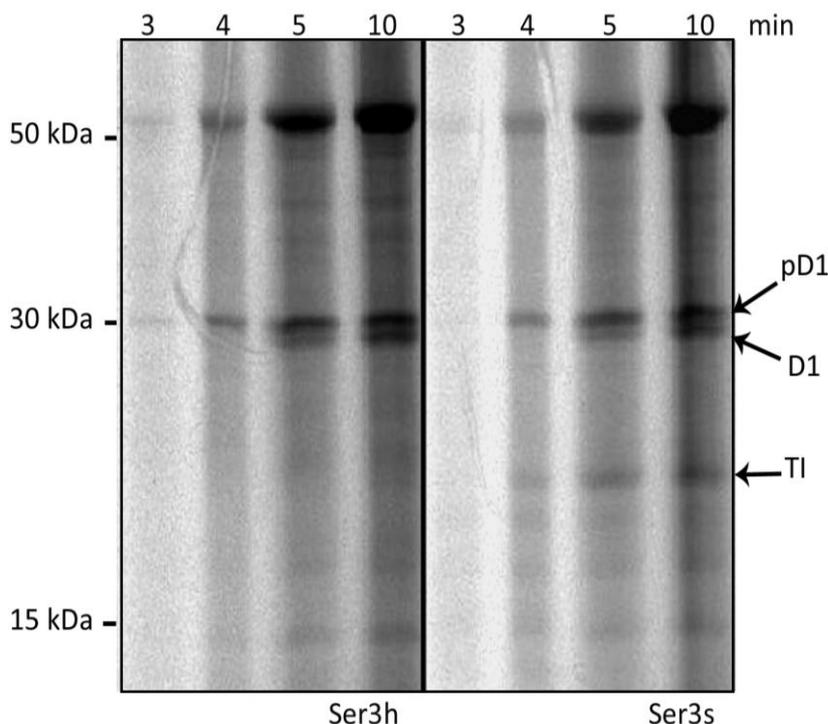


Abb. 3-7| *In vivo* Markierung der plastidären Proteine von Mutante Ser3s (rechts) und Ser3h (links). Mit Cycloheximid vorbehandelte Zellen wurden mit ^{35}S markiertem Schwefel im Licht ($80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) für 3,4,5 und 10 min inkubiert. Zu genannten Zeitpunkten wurden Proben entsprechend $3 \mu\text{g}$ Chlorophyll aufgearbeitet, per SDS-PAGE getrennt und mit der Software *Image Quant v.1.2* ausgelesen. Die Größen des Markers sind am linken Rand eingezeichnet. Der D1-Precursor (pD1), das reife D1-Protein (D1) sowie ein 20 kDa Translationsintermediat (TI) in Mutante Ser3s sind durch Pfeile gekennzeichnet.

3.2 Der Einfluss selten genutzter Arg-Codons auf die heterologe Proteinexpression

Das oben beschriebene Codon Test System zeigte Effekte seltener Ser-Codons auf die Synthese des D1-Proteins unter Stressbedingungen auf und lieferte anhand der Transformationsergebnisse der *psbA*-Mutanten eindeutige Hinweise über *codon usage* Effekte auf die plastidäre Proteinexpression. Hier zeigte sich vor allem ein Einfluss selten genutzter Arg-Codons, deren Insertion in die Sequenz des *psbA*-Gens keine Selektion der Transformanten auf photoautotrophes Wachstum zuließ. Auch in der Literatur gibt es Hinweise auf negative Effekte seltener Arg-Codons, so dass in weiteren Experimenten deren Einfluss auf die plastidäre Proteinbiosynthese näher untersucht werden sollte. Dafür wurden das Marker-gen *aadA* sowie das Reporter-gen *GFP* für eine Expression im Chloroplasten gewählt.

Das *aadA*-Gen ist nicht an die plastidäre *codon usage* adaptiert und enthält demnach seltene Arg-Codons. Zunächst sollten Mutanten erzeugt werden, die ein Arg-Codon adaptiertes *aadA*-Gen exprimieren. Zur Analyse von Arg-*codon usage* Effekten sollten diese physiologisch und biochemisch mit Mutanten verglichen werden, die ein nicht Arg-Codon adaptiertes *aadA*-Gen exprimieren.

Die Fusion von Arg-*tags* unterschiedlicher *codon usage* an die Sequenz des *GFP*-Gens, sollte weitere Hinweise über Arg-*codon usage* Effekte liefern. Da diese auch als Auslöser des tmRNA-*tagging*-Systems fungieren können, sollte zudem Hinweisen zur Existenz dieses Systems im Plastiden nachgegangen werden. Der tmRNA-Mechanismus ist in Bakterien gut untersucht [118,153,154] und stellt meist einen essentiellen Weg des ribosomalen Recyclings dar [155,156]. In einigen Plastiden wird die Existenz dieses Systems vermutet [157,158], doch liegen für den Chloroplasten von *C. reinhardtii* dazu derzeit keine Erkenntnisse vor. Aufgrund des prokaryotischen Ursprungs der Plastiden liegt es jedoch nahe, dass dieses System in den Organellen existierte bzw. noch existiert. Für die tmRNA-Markierung fehlerhafter Peptide sind, neben dem tmRNA-Molekül, Cofaktoren wie das *small protein B* (kurz SmpB) nötig [159]. Der Nachweis eines SmpB-Homologes in Plastomen fehlt bislang, doch wird diskutiert, dass eine kerncodierte Variante dieses Proteins im Chloroplasten wirksam ist oder plastidäre tmRNAs ohne diesen agieren [63]. Sollte das tmRNA-System im Plastiden von *C. reinhardtii* im Verlauf der Evolution verloren

gegangen sein, könnten Cofaktoren noch existieren. Durch die Insertion der tmRNA-Sequenz eines Cyanobakteriums und eines Reporterproteins mit einem *tag* seltener Arg-Codons sollten Hinweise gesammelt werden, ob das *tagging* auch im Chloroplast von *C. reinhardtii* stattfindet.

3.2.1 Erzeugung der AadA-, GFP- und tmGFP-Mutanten

3.2.1.1 Insertion des *aadA*-Gens in das Plastom von *C. reinhardtii*

Das aus *E. coli* isolierte *aadA*-Gen [160,161], codiert für eine Streptomycin-3'-adenylyltransferase, die Aminoacylantibiotika wie Streptomycin oder Spectinomycin entgiftet [115]. Da es ein hohes Maß an Resistenz vermittelt, dient es häufig als Selektionsmarker für die Chloroplastentransformation [87,116,117]. Insgesamt enthält das *aadA*-Gen für *C. reinhardtii* drei sehr selten ($1 \times \text{CGG}$, $2 \times \text{AGG}$) und zwei selten genutzte Arg-Codons ($2 \times \text{CGA}$) sowie seltene Leu- und einige andere seltene Codons. Calderone *et al.* [55] konnten in *E. coli* zeigen, dass lediglich der Austausch selten genutzter Arg-Codons in häufig genutzte eine höhere Proteinausbeute liefert. Um zu prüfen, ob dies auch im Plastiden von *C. reinhardtii* gilt, wurden Mutanten mit einem Arg-Codon adaptierten *aadA*-Gen erzeugt ($\text{AGG, CGG} \rightarrow \text{CGT}$). Dabei wurde auch eines der selten genutzten Arg-Codons (CGA) durch das CGT -Codon ersetzt, da es in unmittelbarer Nähe des CGG -Codons liegt. Die so erhaltenen Mutanten (AadAh) konnten physiologisch und biochemisch mit Mutanten verglichen werden, die das *E. coli* *aadA*-Gen exprimieren (AadAs, [125]). Durch *Golden Gate Cloning* gelang die Erstellung von Plasmiden (pCW5), die neben der Sequenz des *psbA*-Gens zur photoautotrophen Selektion der Transformanten, die Arg-adaptierte *aadA*-Gensequenz enthielten. Als Promotor und 5'-UTR wurden die jeweiligen Sequenzen des *psbD*-Gens gewählt, das für die D2-Untereinheit des PSII codiert. Als 3'-UTR Sequenz diente die Sequenz der *psbA* 3'-UTR. Da zum Zeitpunkt der Erzeugung der Mutanten keine Antikörper gegen das AadA-Protein verfügbar waren, wurde für die spätere Detektion der Proteine ein Hämagglutinin-*tag* (kurz HA-*tag*) an die *aadA*-Gensequenz fusioniert. Für die Transformation wurde die Deletionsmutante FUD7 genutzt und Transformante auf Photoautotrophie selektiert. Abb. 3-8 (S. 54) zeigt schematisch die homologe Rekombination zwischen pCW5 und dem FUD7-Plastom.

3.2.1.2 Insertion des *GFP*-Gens in das Plastom von *C. reinhardtii*

Das aus *Aequorea aequorea* stammende GFP-Protein dient, wie auch in der vorliegenden Arbeit, häufig als Reporter für Untersuchungen der plastidären Genexpression [162–164]. Durch *Golden Gate Cloning* gelang die Erstellung von Plasmiden (pCW3 und pCW4) zur Transformation der Deletionsmutante FUD7 erstellt. Diese Plasmide enthielten neben der *psbA*-Sequenz, für die photoautotrophe Selektion der Transformanten, die Sequenz des *GFP*-Gens [165]. Die *GFP*-Expression erfolgt über den *psbD*-Promotor, die *psbD* 5'-UTR sowie die *psbA* 3'-UTR. Zur Reinigung, zum Nachweis und für eine potentielle Puls-Markierung des GFP-Proteins wurden die Sequenzen eines HA-tags, eines 10 × His-tags und drei Met-Codons an dessen 3'-Ende fusioniert. Um *codon usage* Effekte auf die Expression des Reporters untersuchen zu können, wurde außerdem das C-terminale Ende mit einem fünffach Arg-tag unterschiedlicher *codon usage* versehen. So konnten Mutanten mit fünf häufig genutzten Arg-Codons (GFP5h) physiologisch und biochemisch mit Mutanten verglichen werden, die fünf selten genutzte Arg-Codons aufweisen (GFP5s). Abb. 3-8 (S. 54) zeigt schematisch die homologe Rekombination zwischen pCW3 / pCW4 und dem FUD7-Plastom.

3.2.1.3 Insertion einer tmRNA in das *C. reinhardtii* Plastom

In diesem Versuchsansatz wurde die Deletionsmutante FUD7 mit Plasmiden (pCW6 und pCW7) transformiert, die neben der Sequenz des *psbA*-Gens, die Sequenzen eines Reporterproteins (= GFP) und einer tmRNA enthielten. Die GFP-Sequenz entsprach vollständig der Sequenz der Mutanten GFP5h und GFP5s (ebenfalls unter der Kontrolle des *psbD*-Promotors, der 5'-UTR *psbD* sowie der 3'-UTR *psbA*). Die Sequenz der tmRNA [126] wurde durch PCR an genomischer DNA des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp PCC680 amplifiziert und dabei der ursprüngliche tmRNA-tag durch einen Myc-tag ersetzt. Dadurch sollte der Abbau potentiell *getaggt* GFP-Proteine verhindert und deren Detektion mit Myc-spezifischem Antikörper möglich werden. Das tmRNA-Konstrukt wurde unter Kontrolle des plastidären *rbcl*-Promotors in das Plastom inseriert. Die resultierende Mutante tmGFP5h exprimiert ein GFP-Protein mit einem Arg-tag, der durch häufige Codons verschlüsselt wird und Mutante tmGFP5s exprimiert das GFP-Protein mit einem Arg-tag, der durch seltene Arg-Codons verschlüsselt wird. Durch die vergleichende biochemische Analyse sollte ein potentielles *tagging* untersucht werden. Abb. 3-8 (S. 54) zeigt schematisch die homologe Rekombination zwischen pCW6 / pCW7 und dem FUD7-Plastom.

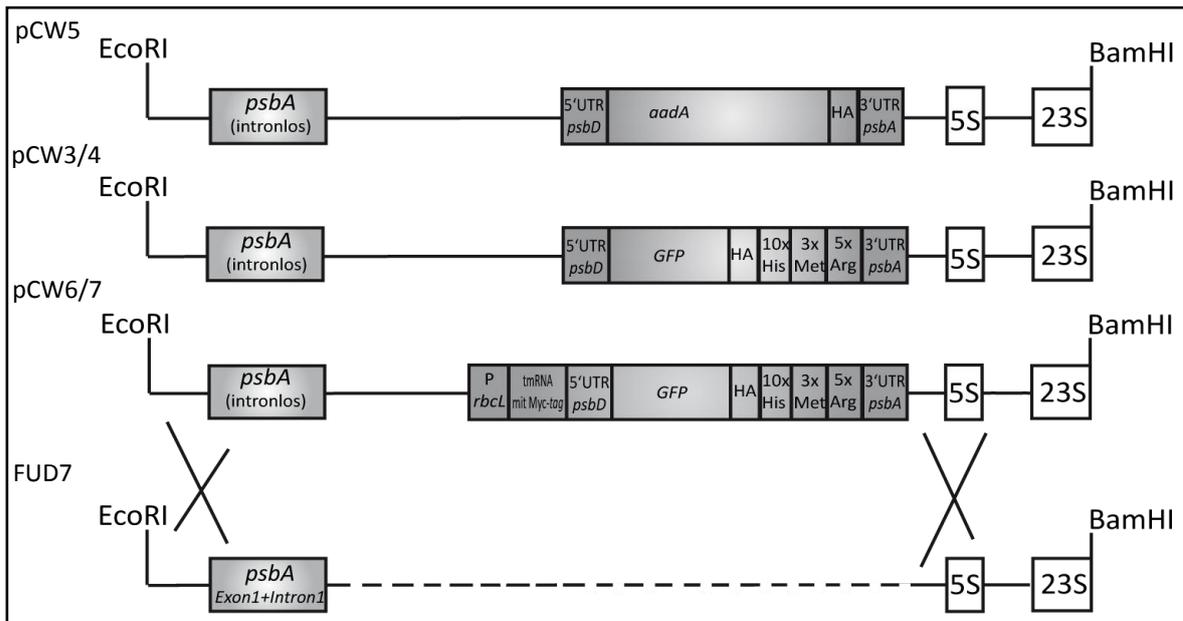


Abb. 3-8| Homologe Rekombination zwischen FUD7-Plastom und den Plasmiden pCW (3-7). Dargestellt sind die Bereiche der Plastomsequenzen zwischen den Restriktionsschnittstellen 5'-EcoRI und 3'-BamHI. Hellgrau = *psbA*-Gen mit 5'-und 3'-UTR. Dunkelgrau = Insert (*aadA* = Arg-Codon adaptiertes *aadA*-Gen, HA = Hämagglutinin-tag, GFP = *GFPct*, 10 × His = 10 fach His-tag, 3 × Met = 3 × ATG, 5 × Arg = 5 × CGT in pCW3 und pCW6 bzw. 5 × CGG in pCW4 und pCW7). 5S = 5SrDNA, 23S = 23SrDNA, P_{*rbcl*} = Promotor *rbcl*, tmRNA mit Myc-tag = tmRNA aus *Synechocystis* sp CC6803 mit Myc-tag. Die cross over Ereignisse im 5'- und 3'-Bereich sind durch zwei Kreuze dargestellt. Der gestrichelte Bereich der FUD7 entspricht der ca. 8 kbp Deletion im Plastom. Abbildung nicht maßstabsgetreu.

3.2.2 Sequenzierung und Test auf Homoplasmie

PCR-Fragmente, die den Bereich der Insertion enthalten, wurden sequenziert und so die korrekte Insertion der Konstrukte bestätigt. Im Anhang III sind alle Elektropherogramme der mutierten Bereiche sowie die vollständigen Alignements zu finden.

Wie unter 3.1.1 beschrieben musste vor der physiologischen und biochemischen Analyse der Mutanten der homoplasmische Zustand des Plastoms bestätigt werden. Eine PCR kam aufgrund der Größe der resultierenden PCR-Fragmente in diesem Fall nicht in Frage, so dass stattdessen eine Southern-Hybridisierung mit markierter 5srDNA-spezifischer Sonde durchgeführt wurde.

In Abb. 3-9 (A) sind schematisch die HindIII-Schnittstellen sowie die resultierenden Größen der Fragmente dargestellt und Abb. 3-9 (B) zeigt das Ergebnis der Southern-Hybridisierung. Für die Mutanten tmGFP5h und tmGFP5s können die erwarteten ca. 2,5 kbp-großen Fragmente nachgewiesen werden und die Mutanten GFP5h, GFP5s, AadAh sowie AadAs liefern Fragmente von ca. 4,5 kbp. Das ca. 750 bp große Signal des Rezipienten FUD7 ist in keinem der transgenen Stämme zu erkennen wodurch der homoplasmische Zustand der Mutanten nachgewiesen ist.

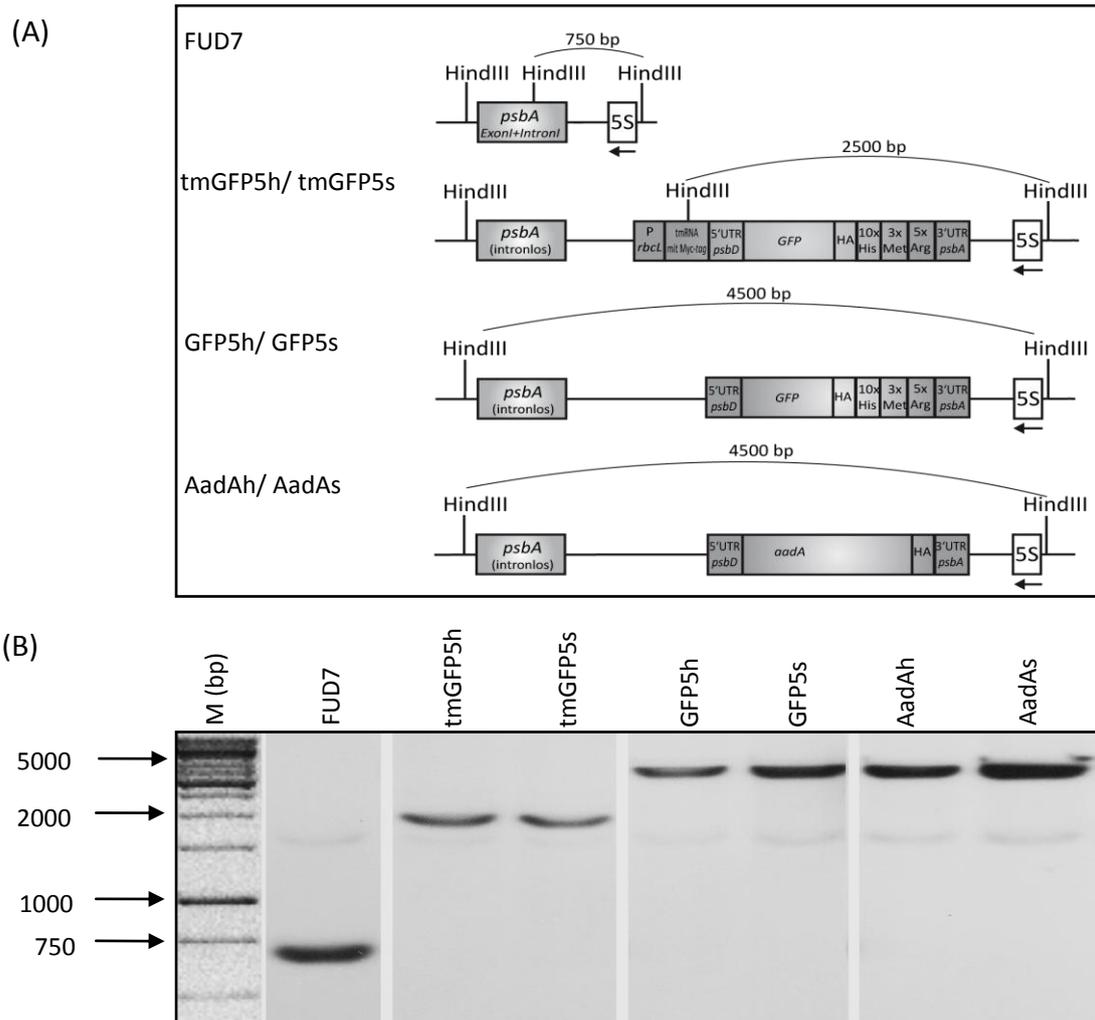


Abb. 3-9| Southern Blot Analyse des FUD7-Stammes sowie der Transformanten tmGFP5h, tmGFP5s, GFP5h, GFP5s, AadAh und AadAs. (A): Schematische Darstellung der Plasmidsequenzen mit: *psbA*-Gen (hellgrau), Insert (dunkelgrau), 5S rDNA (weiß), HindIII-Schnittstellen mit resultierenden Fragmentgrößen in bp sowie 5S rDNA-spezifische Sonde (Pfeil). Abbildung nicht maßstabsgetreu. (B): Southern-Hybridisierung: Je 10 µg genomische DNA wurde mit HindIII verdaut, durch Agarosegelelektrophorese getrennt (1 % Agarose) und die DNA auf Nylonmembran übertragen. Nach Hybridisierung mit markierter 5S rDNA-spezifischer Sonde erfolgte die Detektion mit CSPD Chemilumineszenz (Roche) gemäß Herstellerprotokoll. Der Marker (1 kb Ladder, Fermentas) wurde digital eingefügt.

3.2.3 Northern Blot Analyse

Durch Northern Blot Analysen mit genspezifischen *aadA*-, *GFP* bzw. *tmRNA*-Sonden, die jeweils die codierenden Gensequenzen enthielten, erfolgte der Nachweis der *aadA*-, *GFP*- sowie *tmRNA*-Transkripte aus Gesamtzell-RNA (Abb. 3-10). Die Expression des *aadA*- und des *GFP*-Gens erfolgt unter der Kontrolle des *psbD*-Promotors, der *psbD*-5'-UTR sowie der *psbA*-3'-UTR. Daraus ergeben sich Fragmentgrößen von etwa 1400 b, die in Abb. 3-10 (A) und (B) in den Spuren der Mutanten und nicht in der Referenzmutante FUD7 zu erkennen sind. Die Mutanten tmGFP5h und tmGFP5s enthalten die tmRNA-Sequenz des

Cyanobakteriums *Synechocystis sp* PCC6803 unter der Kontrolle des plastidären *rbcl*-Promotors. Sollte die Transkription der Fremd-tmRNA erfolgreich sein, kann nach Hybridisierung mit tmRNA-spezifischer Sonde in beiden Mutanten ein ca. 400 b großes Fragment detektiert werden. Abb. 3-10 (C) zeigt dieses spezifische Signal nur in den Spuren der Mutanten und nicht in der Spur des FUD7-Stammes, so dass die erfolgreiche Transkription der Fremd-tmRNA aus *Synechocystis sp* PCC6803 bestätigt wird. Die Nebensignale weisen auf unspezifische Bindungen der Sonde hin, da sie in der Referenzmutante (ohne tmRNA) ebenfalls zu sehen sind.

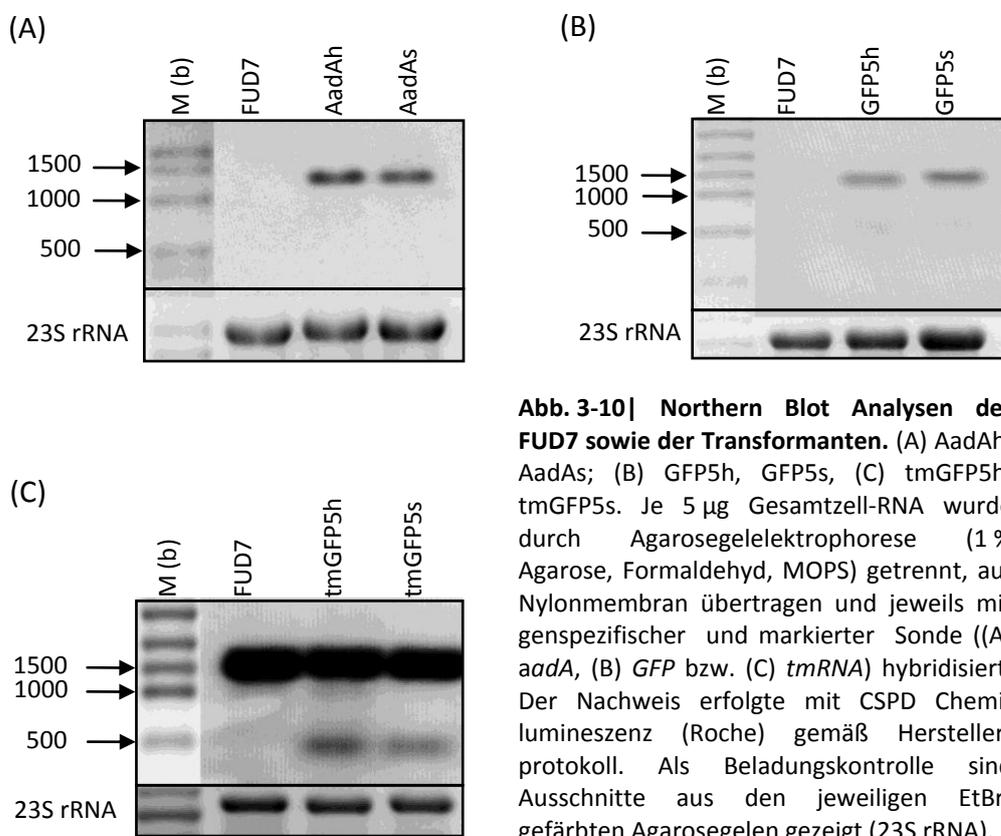


Abb. 3-10| Northern Blot Analysen der FUD7 sowie der Transformanten. (A) AadAh, AadAs; (B) GFP5h, GFP5s, (C) tmGFP5h, tmGFP5s. Je 5 µg Gesamtzell-RNA wurde durch Agarosegelelektrophorese (1 % Agarose, Formaldehyd, MOPS) getrennt, auf Nylonmembran übertragen und jeweils mit genspezifischer und markierter Sonde ((A) *aadA*, (B) *GFP* bzw. (C) *tmRNA*) hybridisiert. Der Nachweis erfolgte mit CSPD Chemilumineszenz (Roche) gemäß Herstellerprotokoll. Als Beladungskontrolle sind Ausschnitte aus den jeweiligen EtBr-gefärbten Agarosegelen gezeigt (23S rRNA).

Die Untersuchungen verifizierten die Sequenzen der inserierten Gene, den homoplasmischen Zustand des Plastoms und bestätigten zudem die Transkription der Fremdgene. In folgenden Experimenten sollte der Einfluss der *Arg-codon usage* auf die heterologe Expression der Proteine im Chloroplasten analysiert werden.

3.2.4 Codon usage Effekte auf die Expression von AadA

3.2.4.1 In vivo Resistenz

In der Literatur ist beschrieben, dass in *E. coli* die Adaption der Arg-codon usage erhöhte Proteinproduktion zur Folge hat [55]. Sollte allein die Anpassung der selten genutzten Arg-Codons des *aadA*-Gens von Mutante AadAh eine verbesserte AadA-Translations-effizienz bewirken, könnten diese möglicherweise höhere Mengen Antibiotika verstoffwechseln als die Vergleichsmutanten ohne Arg-Codon adaptiertes *aadA*-Gen. Wachstumsversuche sowohl auf Festmedium (TAP) als auch in Flüssigkultur (HS) mit und ohne Antibiotika sollten erste Hinweise darauf liefern. Dazu wurden den Medien verschiedene Konzentrationen Strep/Spec zugesetzt, wobei die Verwendung beider Antibiotika die zufällige Entstehung von Punktmutationen der 16SrDNA, die zur Resistenz gegenüber den Antibiotika führen können, ausschließen sollte.

3.2.4.1.1 Drop Test Analyse auf Festmedium

Zellen der Mutanten AadAh, AadAs sowie der IL-Mutante wurden auf antibiotikahaltige TAP-Platten getropft und für einige Zeit im Licht inkubiert. Abb. 3-11 verdeutlicht, dass die IL-Mutante (ohne *aadA*-Gen) bereits bei der geringsten Antibiotikakonzentration nicht mehr wachsen kann. Die AadA-Mutanten hingegen tolerieren eine Konzentration von bis zu 100/200 $\mu\text{g/ml}$ Strep/Spec ungefähr in gleichem Maß. Steigt die Konzentration jedoch auf 200/400 $\mu\text{g/ml}$ Strep/Spec erkennt man auf den Platten der Mutante AadAh (angepasstes *aadA*-Gen) einen deutlichen Algenrasen, wohingegen auf den Platten von Mutante AadAs lediglich einzelne Kolonien zu sehen sind. Verdoppelt man die Antibiotikakonzentrationen auf 400/800 $\mu\text{g/ml}$ Strep/Spec wachsen nur noch Kolonien der Arg-Codon adaptierten Mutante. Mutante AadAs stirbt, da sie vermutlich nicht in der Lage ist genügend AadA-Protein zur Entgiftung der Antibiotika zu synthetisieren.

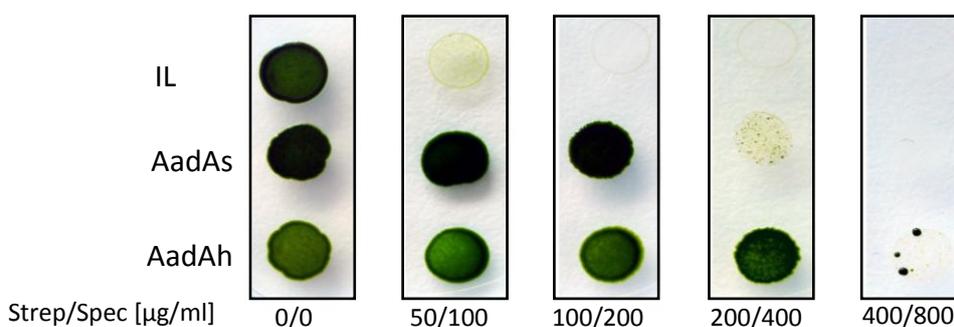


Abb. 3-11| Drop Test Analyse. $1,5 \cdot 10^6$ Zellen der Mutanten AadAh, AadAs bzw. IL wurden auf TAP-Agar-Platten (1,5 %) mit verschiedenen Konzentrationen Strep/Spec getropft und für 14 Tage bei einer Lichtintensität von $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und 24°C inkubiert.

3.2.4.1.2 Wachstum in Flüssigkultur mit und ohne Antibiotika

Die Wachstumsraten ($= \Delta OD_{750 \text{ nm}} / \text{Zeiteinheit}$) wurden innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase aus Wachstumskurven von Flüssigkulturen (Anhang IV) ermittelt.

In Abb. 3-12 (A) sind die Wachstumsraten der AadA-Mutanten ohne Antibiotika bezüglich der IL-Mutante dargestellt (= 100 %, hellgrauer Balken). Es wird deutlich, dass sich die Insertion des *aadA*-Gens in beiden Mutanten negativ auf das photoautotrophe Wachstum auswirkt, da die Wachstumsrate der Mutante AadAs um ca. 10-20 % reduziert ist und die Wachstumsrate von Mutante AadAh sogar um fast 50 %. Abb. 3-12 (B) zeigt den Vergleich der Wachstumsraten der AadA-Mutanten untereinander. Dafür wurden die Werte der Proben ohne Antibiotika für jede Mutante je 100 % gesetzt und die Werte der Proben mit Antibiotika auf diesen bezogen. Die Wachstumsraten beider Mutanten sinken bei der geringsten Konzentration von 6/12 $\mu\text{g/ml}$ Strep/Spec um ca. 40 % und unterscheiden sich dabei kaum voneinander. Bei steigender Antibiotikakonzentration ist Mutante AadAh (graue Balken) jedoch im Vorteil. Die Wachstumsraten dieser Arg-Codon adaptierten Mutante betragen bis zu einer Strep/Spec-Konzentration von 25/50 $\mu\text{g/ml}$ noch ca. 40 %, wohingegen die Werte der AadAs-Mutante stetig sinken und bei dieser Konzentration nur noch bei etwa 1 % liegen. Bei der höchsten eingesetzten Antibiotikakonzentration (50/100 $\mu\text{g/ml}$) ist für Mutante AadAs kein Zellwachstum mehr messbar, die Rate der Arg-adaptierten Mutante AadAh hingegen liegt noch bei ca. 20 %.

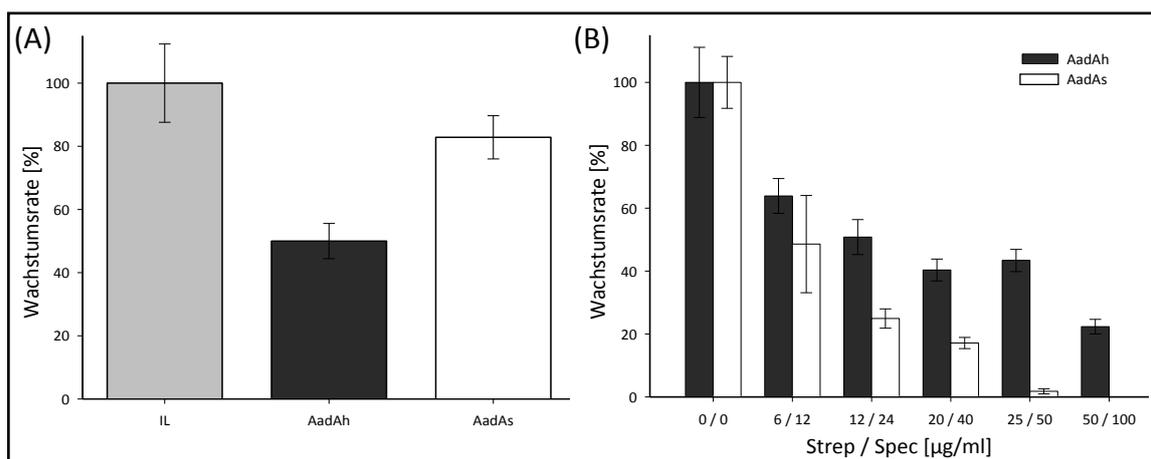


Abb. 3-12 | Wachstumsraten der AadA-Mutanten. Ermittelt wurden die Wachstumsraten in Minimalmedium, bei 24°C, einer Lichtintensität von $70 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und konstanter Begasung mit CO_2 (2,5 %), während der logarithmischen Wachstumsphasen durch Berechnung von $\Delta OD_{750 \text{ nm}} / \text{Zeiteinheit}$. (A): Wachstumsraten der Mutanten (AadAh = grau, AadAs = weiß) ohne Antibiotika bezogen auf die Wachstumsrate der IL-Mutante (hellgrau). (B): Wachstumsraten mit Antibiotika. Der jeweilige Wert der Probe ohne Antibiotika wurde 100 % gesetzt und für jede der Mutanten die Raten mit Antibiotika auf diesen bezogen. Die Standardabweichungen resultieren aus vier unabhängigen Messungen.

3.2.4.2 Quantifizierung von AadA-Protein

Aus den Wachstumsversuchen ergab sich die Frage, ob Mutante AadAh aufgrund der Arg-Codon Anpassung des *aadA*-Gens mehr *aadA*-Genprodukt exprimiert als Mutante AadAs. Dies sollte anhand von quantitativen Western Blot Analysen geklärt werden. Dafür erfolgte die Anzucht beider Mutanten in Flüssigkultur und einer Antibiotikakonzentration von 20/40 µg/ml Strep/Spec. Diese Konzentration wurde gewählt, da die vorangegangenen Wachstumsversuche zeigten, dass Mutante AadAs gerade noch wachsen kann. Als Bezugsprobe diente eine Probe ohne Antibiotika. Zur Erfassung der AadA-Protein Level mit und ohne Antibiotika wurden Western Blot Analysen mit einem HA-spezifischen Antikörper durchgeführt und der relative AadA-Gehalt durch densitometrische Auswertung ermittelt. Zur Verifizierung gleicher Mengen Protein wurde parallel eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung durchgeführt.

Abb. 3-13 (A) zeigt einen repräsentativen Blot sowie die zugehörige Coomassiefärbung, die eine gleiche Beladung bestätigt. Abb. 3-13 (B) zeigt die Werte der densitometrischen Auswertung des AadA-Gehaltes. Dafür wurde der AadA-Gehalt von Mutante AadAs aus der Anzucht ohne Antibiotika je 100 % gesetzt und alle anderen Werte auf diesen bezogen. Mutante AadAh (graue Balken) exprimiert mit einem Wert von ca. 60 % ohne Zugabe der Antibiotika scheinbar weit weniger AadA-Protein als Mutante AadAs (weiße Balken). In der Probe mit Antibiotika steigt jedoch der AadA-Gehalt von Mutante AadAh stark an und erreicht ein Level von ca. 140 %. Der Gehalt an AadA-Protein von Mutante AadAs hingegen steigt nur minimal und unterscheidet sich kaum von dem Wert der Probe ohne Antibiotika. Mutante AadAh synthetisiert demnach mit Strep/Spec ca. 30-40 % mehr AadA-Protein als Mutante AadAs. Dieses Ergebnis könnte die besseren Wachstumsraten dieser Mutante aus den Vorversuchen mit Antibiotika erklären.

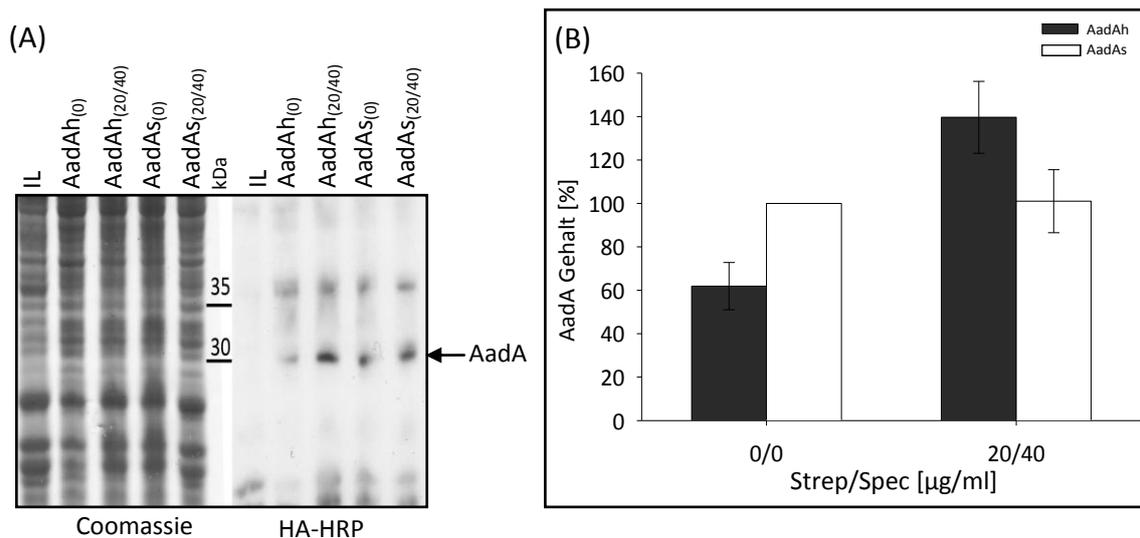


Abb. 3-13 | Quantifizierung von Aada-Protein der Mutanten AadaH und AadaS. Die Anzucht der Algen erfolgte in HS-Medium (0/0 bzw. 20/40 µg/ml Strep/Spec), bei 24°C, einer Lichtintensität von 70 µE*m⁻²*s⁻¹ und unter konstanter Begasung mit CO₂ (2,5 %). Während der späten logarithmischen Wachstumsphase wurde Gesamtzellprotein isoliert, ein Aliquot entsprechend 50 µg Protein durch SDS-PAGE getrennt, auf PVDF-Membran übertragen und mit einem HA-spezifischen Antikörper inkubiert. Der Nachweis des Aada-Proteins erfolgte über Chemilumineszenz. Zur Verifizierung gleicher Beladung wurde je ein Aliquot entsprechend 50 µg Protein durch SDS-PAGE getrennt und das Gel Coomassie gefärbt. (A): Repräsentativer Western Blot (rechts, HA-Antikörper) und coomassie-gefärbtes SDS-Gel (links). (B): Densitometrische Auswertung der Aada-Blotbanden (Grau = AadaH, Weiß = AadaS). Der Aada-Gehalt ist in Prozent in Abhängigkeit der Antibiotikakonzentration angegeben und wurde mit AIDA-Software quantifiziert. Die Standardabweichungen resultieren aus vier unabhängigen Wiederholungen.

3.2.5 Codon usage Effekte auf die Expression von GFP

Das GFP-Protein dient in der Molekularbiologie und Biochemie häufig als Reporter und wurde auch in der vorliegenden Arbeit zur Analyse von *Arg-codon usage* Effekten genutzt. Selten genutzte *Arg*-Codons können ribosomale Pausen während der Translation verursachen, was in *E. coli* zu einer Markierung der Peptidkette durch das tmRNA-*tagging*-System führen kann [57,120,121]. Um Hinweise über dieses System in Chloroplasten nachzugehen wurden die Mutanten GFP5h (GFP + *Arg-tag* mit häufigen Codons) und GFP5s (GFP + *Arg-tag* mit seltenen Codons) erzeugt. Diese dienen sowohl der Analyse von *Arg-codon usage* Effekten auf die heterologe Expression des GFP-Proteins und sollten zudem durch eine C-terminale Sequenzierung des GFP-Proteins Hinweise auf eine Markierung durch ein potentielles tmRNA-System im Plastiden liefern.

Für die Isolierung von Gesamtzellprotein wurden die Algen bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase in acetathaltigem Medium unter konstanter Beleuchtung mit Schwachlicht (40 µE*m⁻²*s⁻¹) auf einem Schüttler angezogen. Da für eine Sequenzierung relativ große Mengen an Protein nötig sind und Überlagerungen mit anderen Proteinen stören,

wurden die Überstandsfractionen (lösliches Protein) zur Reinigung und Anreicherung des GFP vor der SDS-PAGE mit einem GFP-Isolierungskit aufgearbeitet. In Abb. 3-14 (A) ist in den Spuren L_{GFP5h} und L_{GFP5s} oberhalb der 30 kDa-Markerbande ein Coomassie-gefärbtes Signal zu erkennen, das nicht in der Spur der IL-Mutante vorkommt. Aufgrund der Spezifität dieser Signale handelt es sich vermutlich um die 31 kDa großen GFP-Proteine. Zur Absicherung diente die parallel durchgeführte Western Blot Analyse eines Aliquots der Elutionsfraktionen mit GFP-spezifischem Antikörper (Abb. 3-14 (B)). In den Spuren der Membranfraktionen (M_{IL} , M_{GFP5h} und M_{GFP5s}) wird kein Signal detektiert, die Spuren der löslichen Fraktionen der Mutanten GFP5h und GFP5s (L_{GFP5h} und L_{GFP5s}) liefern hingegen deutliche GFP-Signale auf gleicher Höhe der Coomassie-gefärbten Banden. Außerdem werden unterhalb der 30 kDa-Markerbande einige Signale schwächer detektiert, bei denen es sich vermutlich um Abbauprodukte des GFP handelt. Intensitätsunterschiede der GFP-Banden sowie der Abbauprodukte können weder im Coomassie-gefärbten Gel noch in der Western Blot Analyse festgestellt werden. Eine Quantifizierung der Blotbanden kann in diesem Fall nicht erfolgen, da nach der Säulenelution unterschiedliche Proteinmengen vorliegen könnten. Ein negativer Effekt der Arg-Codons auf die Expression des GFP-Proteins kann unter den gewählten Bedingungen (Anzucht auf Schüttler in TAP-Medium) nicht beobachtet werden. Außerdem weisen die Ergebnisse darauf hin, dass kein tmRNA-tagging stattfindet, da sonst erwartungsgemäß zusätzliche größere Banden oder verschiedene Bandenmuster in den Mutanten detektiert werden sollten.

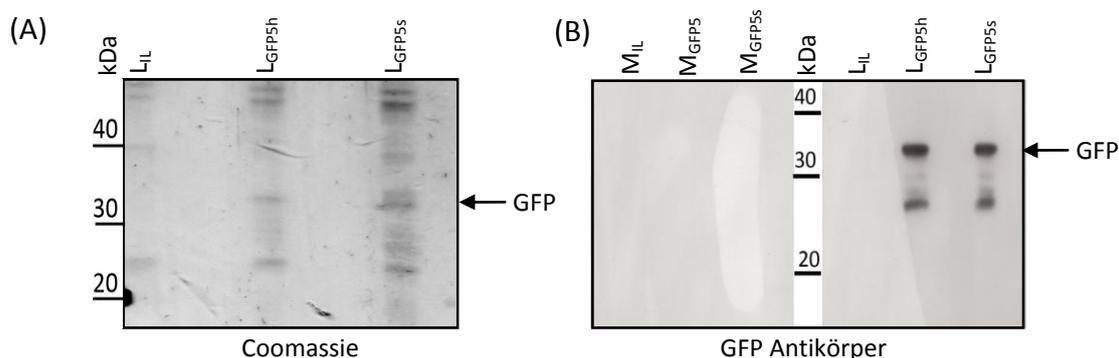


Abb. 3-14| Expression von GFP unter Anzucht der Algen bei 24°C in TAP-Medium und Schwachlicht ($40 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). In der späten logarithmischen Wachstumsphase wurden lösliche und Membranproteine isoliert und zur Reinigung und Anreicherung des GFP-Proteins die gesamte lösliche Fraktion mit *GFP Isolation Kit* (μ MACS) aufgearbeitet, wobei gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden. Die Elutionen wurden anschließend über SDS-PAGE getrennt. (A): Coomassie gefärbtes SDS-Gel und (B): Western Blot mit GFP-spezifischen Antikörper. L_{IL} , L_{GFP5h} und L_{GFP5s} = lösliche Fraktion der jeweiligen Mutante. M_{IL} , M_{GFP5h} und M_{GFP5s} = Membranfraktionen entsprechend 2 μ g Chlorophyll.

Im Anschluss an das beschriebene Experiment wurde getestet, ob bei Anzucht der Mutanten unter photoautotrophen Bedingungen und höherer Lichtintensität Unterschiede im Expressionsmuster auftreten. Die Expression des *GFP* erfolgt unter Kontrolle des lichtabhängigen *psbD*-Promotors. Höhere Lichtintensitäten sowie die Begasung mit CO₂ könnten die GFP-Expressionsrate steigern, sodass ein Einfluss der *Arg-codon usage* unter diesen Bedingungen deutlich wird. Die Anzucht der Algen erfolgte dafür in acetathaltigen-Medium (TAP, Abb. 3-15 (A)) bzw. in Minimalmedium (HS, Abb. 3-15 (B)), unter konstanter CO₂-Begasung (2,5 %) und Bestrahlung mit 80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase. Die isolierten löslichen Proteine wurden mit dem GFP-Isolierungskit gereinigt und die Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE getrennt.

Die Coomassie-Färbung liefert unabhängig von den Anzuchtbedingungen nur in den Spuren der Mutante GFP5h ein GFP-Signal. Dies deutet auf eine effizientere GFP-Synthese in dieser Mutante hin als in Mutante GFP5s. Vermutlich wird die Translation des GFP-Proteins in Mutante GFP5s durch die seltenen Arg-Codons verzögert, so dass folglich die Menge an GFP nicht für eine Färbung mit Coomassie ausreicht. Auch die Western Blot Analysen bestätigen unabhängig der Anzuchtbedingungen nur in Mutante GFP5h ein GFP-Signal oberhalb der 30 kDa Markerbande. Unter Anzucht in TAP-Medium wird mit einem GFP-spezifischen Antikörper in Mutante GFP5s lediglich ein „Schmier“ detektiert und nach Anzucht in HS-Medium liefert diese Mutante ein sehr schwaches GFP-Signal. Ein deutlich stärker detektiertes und kleineres Signal, das auch in Mutante GFP5h schwach zu erkennen ist, deutet auf ein GFP-Abbauprodukt oder Translationsintermediate hin. Die seltenen Arg-Codons des *GFP*-Gens von Mutante GFP5s könnten die GFP-Expression so stark verzögern, dass diese Intermediate oder Abbauprodukte akkumulieren und mit Antikörper detektiert werden können. Für deren Färbung mit Coomassie reicht die Proteinmenge nicht aus.

Da in diesem Versuchsansatz nicht genügend Coomassie-gefärbtes GFP-Protein der Mutante GFP5s angereichert werden konnte, war keine C-terminale Sequenzierung möglich. Hinweise auf den tmRNA-tagging Mechanismus konnten somit nicht gefunden werden.

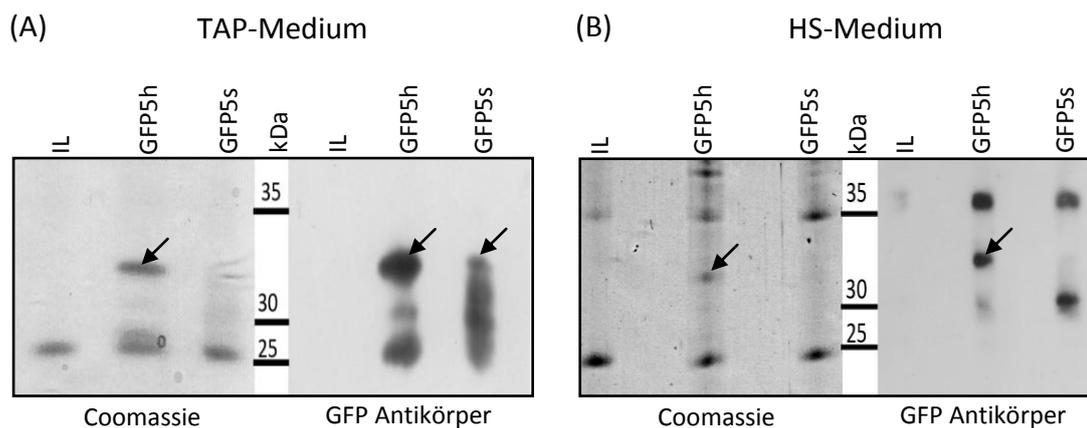


Abb. 3-15 | Expression von GFP unter Anzucht der Algen bei 24°C, konstanter CO₂ Begasung (2,5 %) und einer Lichtintensität von 80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Die löslichen Proteine wurden mit GFP *Isolation Kit* gereinigt, die Elutionen durch SDS-PAGE getrennt und Coomassie gefärbt. Ein Aliquot wurde parallel anhand von Western Blot mit GFP-spezifischen Antikörper analysiert. (A) Anzucht der Algen in TAP-Medium und (B) Anzucht der Algen in HS-Medium. Die Pfeile markieren das GFP-Protein.

3.2.6 Integration einer tmRNA in das Plastom

In den vorangegangenen Experimenten konnten keine Hinweise auf ein tmRNA-*tagging* System gefunden werden. Cyanobakterien, die den tmRNA-Mechanismus nutzen [62], gelten der Endosymbiontentheorie nach als Vorläufer der heutigen Chloroplasten [91] und so könnte ein plastidärer *tagging*-Mechanismus im Verlauf der Evolution verloren gegangen und mögliche Cofaktoren noch vorhanden sein. Theoretisch könnte die Insertion einer fremden tmRNA demnach das *tagging* ermöglichen. In diesem Ansatz der Arbeit wurde die Sequenz der tmRNA des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp PCC680 unter der Kontrolle des *rbcl*-Promotors im Plastom exprimiert und dabei der ursprüngliche tmRNA-*tag* durch einen Myc-*tag* ersetzt. Somit könnte der Abbau potentiell *getaggte* Proteine verhindert werden und diese zudem über Antikörperreaktion sichtbar gemacht werden. Das ebenfalls inserierte GFP-Protein mit Arg-*tags* unterschiedlicher *codon usage* diente als Reporterprotein. Die Vorversuche mit GFP-Mutanten lieferten Hinweise darauf, dass durch Anzucht der Algen in TAP-Medium mit relativ hoher Lichtintensität und Begasung mit CO₂ die GFP-Synthese durch die seltenen Arg-Codons verzögert wird. Durch Anzucht der tmRNA-Mutanten unter diesen Bedingungen kann möglicherweise das *taggen* forciert und anhand von Western Blot Analysen mit Myc- und GFP-spezifischen Antikörpern analysiert werden.

3.2.6.1 1D Gelelektrophorese

Mit einem GFP-spezifischen Antikörper kann in beiden tmRNA-Mutanten das GFP-Protein nachgewiesen werden, wobei nur in der Spur von Mutante tmGFP5h ein eindeutiges Signal zu erkennen ist (Abb. 3-16 A). Mutante tmGFP5s exprimiert das GFP mit einem Arg-tag seltener Arg-Codons, die vermutlich die GFP-Synthese verzögern, wodurch akkumulierte Abbauprodukte oder Translationsintermediate detektiert werden können. In den Spuren der IL-Mutante und den Membranfraktionen werden keine bzw. unspezifische Nebensignale detektiert. Die Analyse mit Myc-spezifischem Antikörper (Abb. 3-16 B) liefert keine Hinweise auf Myc-getaggte Produkte in den tmGFP-Mutanten, da lediglich unspezifische Nebenprodukte in den Spuren der Membranfraktionen detektiert werden.

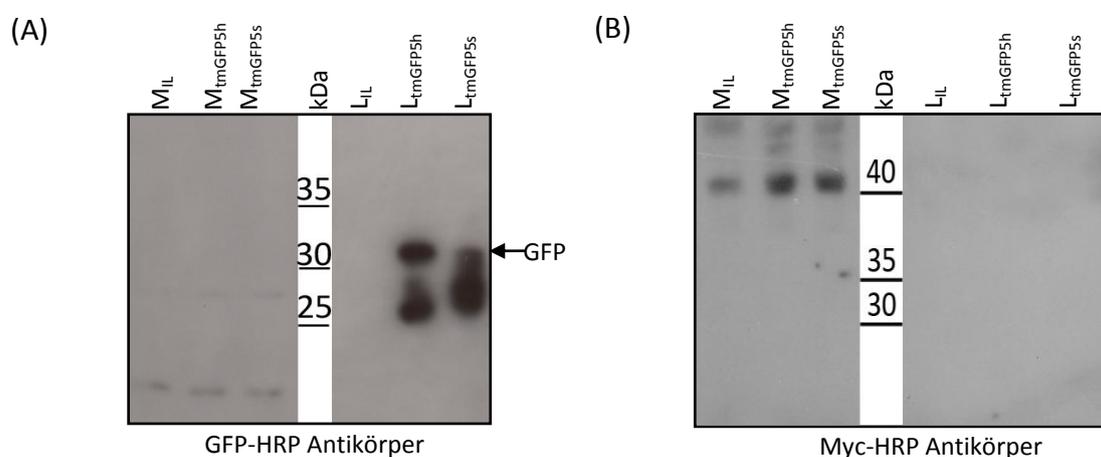


Abb. 3-16| Western Blot Analysen der Mutanten IL, tmGFP5h und tmGFP5s nach eindimensionaler SDS-PAGE. Die Anzucht der Algen erfolgte in TAP-Medium, bei 24°C, unter konstanter Begasung mit CO₂ (2,5 %) und einer Lichtintensität von 70 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Von der Membranfraktion wurde ein Aliquot entsprechend 5 μg Chlorophyll aufgetragen. Die löslichen Proteine wurden mit GFP *Isolation Kit* gereinigt, die Elutionen durch SDS-PAGE getrennt und anhand von Western Blot mit (A) GFP-spezifischen Antikörper und (B) Myc-spezifischen Antikörper analysiert.

3.2.6.2 2D Gelelektrophorese

Da potentiell tmRNA-markierte Proteine vermutlich in sehr geringen Mengen vorliegen, muss eine sehr spezifische Trennung des Proteingemisches erfolgen. Hierfür eignet sich die zwei-dimensionale Elektrophorese, bei der große Mengen Protein zunächst nach ihrer Ladung und anschließend nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden können. Aus der löslichen Fraktion der Mutanten tmGFP5h und tmGFP5s sowie der Referenzmutante IL wurden zunächst durch isoelektrische Fokussierung in einem engen pH-Bereich (pH 5-8) sämtliche Proteine entfernt, die nicht dem isoelektrischen Punkt (pI) des gesuchten GFP bzw. eines potentiell Myc-getaggten GFP (pI = 6,46 – 6,19; www.expasy.org) entsprechen.

In der zweiten Dimension erfolgte im Anschluss die Auftrennung der nach Ladung getrennten Proteine im harnstoffhaltigen SDS-Gel.

Die Western Blot Analyse mit GFP-spezifischem Antikörper (Abb. 3-17 oben) liefert in der Mutante tmGFP5h ein GFP-Signal zwischen den 25 und 35 kDa-Markerbanden, das durch die Trennung in zwei Dimensionen auch erstmals auch in der Mutante mit einem GFP mit seltenen Arg-Codons detektiert wird. Kleinere Proteinspots mit dem gleichen isoelektrischen Punkt deuten auf Abbauprodukte des GFP hin und sind auch in Mutante tmGFP5s sichtbar. Diese kleineren Spots liefern in dieser Mutante allerdings ein wesentlich stärkeres Signal als das GFP-Protein, wohingegen in Mutante tmGFP5h das GFP-Signal dominiert. Die Referenzmutante IL liefert lediglich unspezifische Nebensignale.

Die Inkubation mit einem Myc-spezifischen Antikörper wurde durchgeführt, um potentiell *getaggte* GFP-Produkte zu detektieren (Abb. 3-17 unten), die in Höhe des GFP-Signals bei pH=6 zu finden sein müssten. Allerdings wird in keinem der Blots ein solches Signal detektiert, weshalb keine Hinweise auf ein tmRNA-tagging des GFP-Reporterproteins gefunden werden konnten.

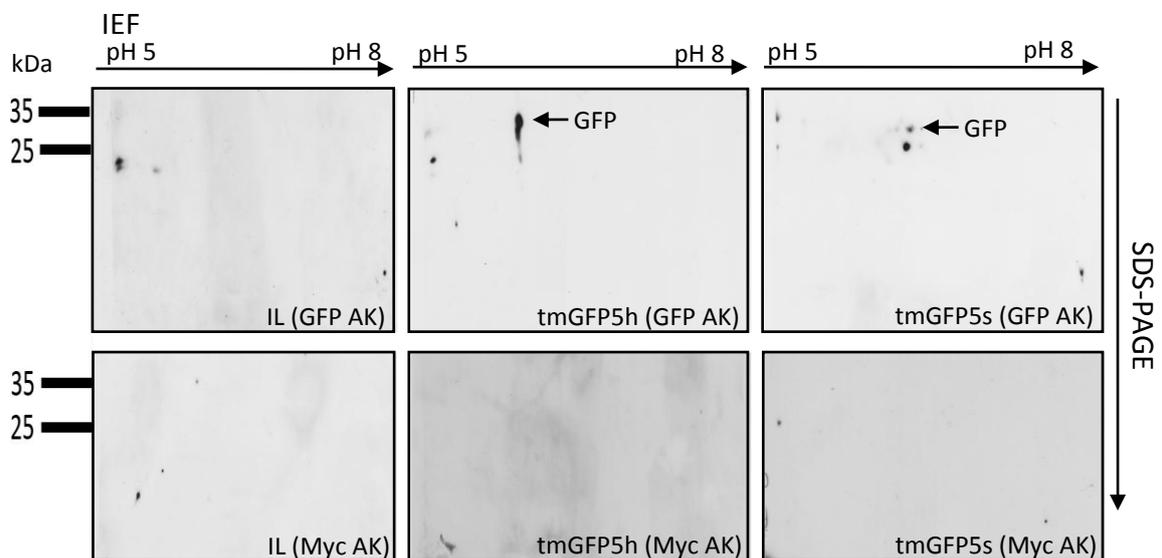


Abb. 3-17 | Western Blot Analysen der Mutanten IL, tmGFP5h und tmGFP5s nach zweidimensionaler SDS-PAGE. Je 250 µg lösliches Protein wurde durch IEF im pH-Gradienten 5-8 nach isoelektrischem Punkt getrennt. Anschließend erfolgte die Trennung nach Molekulargewicht im harnstoffhaltigen Acrylamidgel, die Übertragung der Proteine auf PVDF-Membran und die Immunodecoration mit GFP- (oben) bzw. Myc-spezifischen Antikörper (unten). Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz (GE Healthcare).

4 Diskussion

4.1 Codon Test System

Um den Einfluss seltener Codons auf die Expression des plastidär codierten D1-Proteins *in vivo* zu analysieren, wurde ein Codon Test System etabliert. Das vom *psbA*-Gen codierte Protein ist ein essentieller Faktor der photosynthetischen Lichtreaktion und stellt eines der Haupttranslationsprodukte des Chloroplasten dar [111]. Aufgrund der permanenten Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies unterliegt es einer hohen *turnover*-Rate [166] und eignet sich darum sehr gut als Modell, um den Einfluss seltener Codons auf die Translation zu analysieren. Dafür wurden Mutanten mit seltenen bzw. häufigen Codons im *psbA*-Gen erzeugt und anschließend physiologisch und biochemisch untersucht.

Für die Insertionen wurden anhand der *codon usage*-Tabelle des Chloroplasten (Anhang II) synonyme Codons der Aminosäuren Arg, Leu, Ser, Ala und Gly ausgewählt. Deren selten genutzten Codons weisen die geringste Nutzungsfrequenz im Plastom auf, werden nicht zur Codierung des *psbA*-Gens genutzt und für keines dieser existiert eine plastidär codierte komplementäre tRNA [82]. Da im Gegensatz zu Mitochondrien keine Hinweise auf einen tRNA-Import in Chloroplasten existieren, müssen die im Plastom codierten tRNAs diese Codons durch *two-out-of-three*-, U:N- und/oder *Super-Wobbling* bedienen, wobei die Translationseffizienz verringert ist [42,167,168]. Als Ort der Peptidinsertionen diente die D-de-loop-Region des D1-Proteins (Abb. 3-1), für die gezeigt werden konnte, dass große Veränderungen ohne Funktionsverlust des Proteins möglich sind [113,114].

Durch PCR wurden die Transformationskonstrukte erstellt und die Del1-Mutante, die aufgrund einer 425 bp großen Deletion im *psbA*-Gen nicht in der Lage ist photoautotroph zu wachsen [123], mit der Partikelkanone transformiert [146]. Über homologe Rekombination des Insertionskonstruktes ist es möglich das deletierte *psbA*-Gen zu ersetzen, so dass Transformanten, die trotz der Insertion ein funktionstüchtiges D1-Protein exprimieren, auf Photoautotrophie selektiert werden können. Mit dieser Methode konnten für jede Aminosäure Peptidinsertionen unterschiedlicher *codon usage* und Länge in das D1-Protein inseriert werden (Tabelle 3-1). Dabei ließ bereits das Transformationsergebnis Rückschlüsse hinsichtlich des Einflusses der *codon usage* auf die Expression des D1-Proteins zu. Durch die anschließende physiologische Analyse der Mutanten konnte zum

einen der Einfluss der Peptidinsertion auf die Physiologie der Mutanten untersucht werden. Dazu wurden die Ergebnisse mit denen der IL-Mutante, die über ein unverändertes D1-Protein verfügt, verglichen. Zudem verdeutlichte der paarweise Vergleich der Mutanten mit der größten Anzahl seltener bzw. häufiger Codons *codon usage* Effekte.

Es wurden Wachstumsraten erstellt und die photosynthetische Sauerstoffproduktion (SPR) sowie der Fv/Fm-Wert ermittelt, um Aussagen hinsichtlich der maximalen Quantenausbeute des PSII und der Photosyntheseleistung treffen zu können [149]. Die Durchführung der Versuche erfolgte unter Lichtbedingungen ($50\text{-}250 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), bei denen eine Balance aus D1-Synthese und -Abbau besteht und eine normale D1-Translation möglich ist [151]. Zudem erfolgte die Analyse des D1-Gehaltes unter Starklichtbedingungen ($2000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), so dass die Syntheserate des D1-Proteins nachweislich steigt und ein negativer Effekt der seltenen Codons besonders ausgeprägt wird.

4.1.1 Arginin

Der deutlichste *codon usage* Effekt war für die seltenen Arg-Codons CGG und AGG zu beobachten, die im Plastom die geringste Nutzungsfrequenz aufweisen. Tabelle 4-1 fasst das Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante zusammen:

Tabelle 4-1| Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit den gewählten Arg-Codons.

Codon	Nutzungsfrequenz im Plastom (%)	Nutzungsfrequenz im <i>psbA</i> -Gen (%)	größte Anzahl inserierter Codons
CGG	0,05	0	0
AGG	0,09	0	0
CGT	3,24	4,25	10

Trotz mehrfacher unabhängiger Transformationsversuche gelang es nicht, photoautotroph wachsende Transformanten mit seltenen Arg-Codons im *psbA*-Gen zu selektieren. Aus dem Beschuss von ca. $50 \times 1,5 \cdot 10^7$ Zellen (statt der üblich genutzten $5 \times 1,5 \cdot 10^7$ Zellen) mit dem Konstrukt $1 \times$ CGG gingen zwar sechs Kolonien hervor, aber die Sequenzierungen ergaben, dass keine das gewünschte Codon inseriert hatte. Es kam in jedem Fall zur Veränderung des seltenen Arg-Codons zu einem häufigeren Arg-Codon oder zu Triplets anderer Aminosäuren (Tabelle 3-1). Mit Konstrukten des Codons AGG wurden ca. $20 \times 1,5 \cdot 10^7$ Zellen beschossen, doch auch in diesem Fall konnten keine photoauto-

troph wachsenden Transformanten selektiert werden. Da die Erzeugung von Mutanten mit bis zu zehn häufig genutzten Arg-Codons (CGT) möglich war, kann ein negativer Effekt der Aminosäure Arg auf Proteinebene ausgeschlossen werden. Die Überprüfung der mRNA-Strukturen mit dem Programm *GenBee* ergab keine Hinweise, z.B. auf Sekundärstrukturbildungen, die eine Translation des veränderten D1-Proteins inhibieren könnten.

Die Codons der sechsfach degenerierten Aminosäure Arg unterteilen sich in eine Vierer- und eine Zweiergruppe. Komplementäre tRNAs^{Arg} existieren nur für die Codons CGT und AGA, wobei die Aminosäure Arg durch die Existenz einer tRNA, die komplementär zu einem T an dritter Codon-Position ist, eine Sonderstellung im Plastom einnimmt. [111]. Die *codon usage* des hoch expressiven *psbA*-Gens ist zur Gewährleistung einer effizienten D1-Translation optimal an diese tRNA-Verfügbarkeit adaptiert und das Codon CGT wird als einziges Tripletts zur Codierung des *psbA*-Gens verwendet. Das seltene Codon CGG wird ebenfalls durch die zum CGT-Codon komplementäre tRNA^{Arg} über *Wobble*-Bindung translatiert, so dass die Effizienz der D1-Translation verringert ist [82]. Auch in *E. coli* wird das CGG-Codon am seltensten verwendet (0,54 %) und beeinträchtigt stark die Translationseffizienz hoch expressiver mRNAs [169]. Um dennoch eine effiziente D1-Synthese zu gewährleisten, könnte die Veränderung des geplanten Codons CGG zu anderen Tripletts (Tabelle 3-1) erfolgt sein. Da die Codon-Nutzung mit dem Expressionslevel des jeweiligen Proteins korreliert [40,170], setzten sich unter den gewählten Bedingungen vermutlich nur Mutanten mit einem veränderten Tripletts durch, so dass eine möglichst hohe Syntheserate des D1-Proteins erreicht wird.

Das AGG-Codon zählt zur Gruppe der zweifach degenerierten Tripletts. Von diesen NNR-Codons (NNA und NNG) wird aufgrund der zum AGA-Codon komplementären tRNA^{Arg} im *psbA*-Gen stets das NNA-Codon verwendet [31]. Diese tRNA bedient auch das Codon AGG über *Wobbling* und die D1-Synthese verläuft ineffizient. Folglich könnte die Menge an D1-Protein nicht ausreichen, um Mutanten auf Photoautotrophie zu selektieren. Auch in *E. coli* beeinträchtigen einzelne AGG-Codons die Genexpression [112] und können zu *frameshift*-Mutationen führen. Liegen zwei AGG-Codons in Folge vor, führt ein +1-*frameshift* der mRNA zur Synthese eines fehlerhaften Peptids [56]. Für die *C. reinhardtii psbA*-Deletionsmutante Del1 konnte ebenfalls ein *frameshift* während der D1-Synthese gezeigt werden, der zum raschen Abbau des Proteins führt [123]. Demzufolge könnte ein *frames-*

hft während der D1-Synthese eine Erklärung dafür sein, dass keine Mutanten mit AGG-Codons auf Photoautotrophie selektiert werden konnten.

Hinweise auf eine mögliche Expression des D1-Proteins trotz seltener Arg-Codons liefert eine *C. reinhardtii*-Mutante mit einem *psbA-aadA*-Fusionsgen (D. Fischer, unveröffentlichte Daten). Das *aadA*-Gen codiert für eine Antibiotikaresistenz und enthält seltene Arg-Codons (1 × CGG, 2 × AGG). Der D1-Gehalt dieser Alge ist gegenüber dem des Referenzstammes limitiert, da vermutlich auch in diesem Fall die seltenen Arg-Codons zur verminderten Translationseffizienz des *psbA-aadA*-Fusionsgens führen.

Dennoch finden die Triplets CGG und AGG im Plastom von *C. reinhardtii* Verwendung. Das Codon CGG wird z.B. in der codierenden Sequenz des *ycf3*-Gens genutzt, das für einen PSI-Assemblierungs-Cofaktor codiert [171]. Das AGG-Codon ist z.B. in der codierenden Sequenz des *psbB*-Gens enthalten, das das CP47-Chlorophyllbindeprotein im PSII-Komplex codiert [172]. In beiden Genen sind die Arg-Codons jeweils die einzigen seltenen Triplets und könnten regulatorische Funktionen bei der Bindung von Faltungshelfern oder der gezielten Regulation des Expressionslevels ausüben.

Eine Überlegung zur Erzeugung von Mutanten mit seltenen Arg-Codons in der *psbA*-Sequenz war, die Verfügbarkeit der Aminosäure durch Zugabe zum Medium zu erhöhen und so eine maximale Beladung der tRNAs^{Arg} zu gewährleisten. Doch auch mit dieser Methode konnten keine Kolonien mit einer Arg-Insertion selektiert werden. Ein möglicher Weg Mutanten mit seltenen Arg-Codons zu erhalten, wäre vermutlich die Anzucht der Algen auf mixotrophen Medium, sodass der Selektionsdruck geringer ist. Auch die Co-Expression der fehlenden tRNA-Gene im Plastom könnte der Erzeugung von Arg-Mutanten dienen. Versuche in *E. coli* zeigen, dass so die Expression von Genen mit seltenen Arg-Codons möglich ist [112,173]. Eine andere Option bietet die Co-Transformation eines Antibiotikaresistenzgens zur Selektion der Mutanten über Antibiotikaresistenz.

Die Erzeugung und anschließende physiologische sowie biochemische Analyse seltener Arg-Codon Mutanten wäre hinsichtlich der Untersuchung von *codon usage* Effekten auf die plastidäre Proteinbiosynthese sehr interessant. Da seltene Arg-Codons deutlichen Einfluss auf die Synthese des *high turnover* D1-Proteins haben, könnten Mutanten mit diesen Codons in der *psbA*-Sequenz neue Einblicke in plastidäre Translationsvorgänge und Abbaumechanismen liefern.

4.1.2 Leucin

Tabelle 4-2 fasst das Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit Leu-Codons zusammen:

Tabelle 4-2| Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit den gewählten Leu-Codons.

Codon	Nutzungsfrequenz im Plastom (%)	Nutzungsfrequenz im <i>psbA</i> -Gen (%)	größte Anzahl inserterter Codons
CTC	0,105	0	2
TTA	7,774	5,1	3

Für diese Aminosäure war es möglich, Mutanten mit bis zu drei häufig genutzten Codons (TTA) in der *psbA*-Sequenz zu erzeugen. Das Codon TTA ist eines der meist genutzten im Chloroplasten der Grünalge, wohingegen das seltene Codon (CTC) lediglich eine Nutzungsfrequenz von 0,1 % aufweist und nicht zur Codierung des *psbA*-Gens verwendet wird. Eine komplementäre tRNA existiert nur für die Codons TTA und CTA, wobei letztere das seltene Codon CTC über *Wobbling* bedient. Trotz daraus resultierender verringerter D1-Translationseffizienz gelang es, Mutanten mit bis zu zwei aufeinanderfolgenden CTC-Codons in der *psbA*-Sequenz zu erzeugen. Allerdings war es nicht möglich eine größere Anzahl selten genutzter Leu-Codons in die *psbA*-Sequenz zu inserieren und photoautotroph wachsende Mutanten zu selektieren.

Die Aminosäure Leu wird durch insgesamt sechs synonyme Codons verschlüsselt, wobei das seltene CTC-Codon zu der vierfach degenerierten Gruppe zuzuordnen ist. Im *psbA*-Gen werden aus dieser Gruppe Triplets mit einem T an dritter Basenposition bevorzugt verwendet [47]. Auch die *codon usage* der Aminosäure Leu folgt dieser Regel: nur das aus der Vierergruppe stammende Codon CTT sowie die Codons für die eine komplementäre tRNA existiert (TTA/CTA) werden im *psbA*-Gen genutzt, so dass dessen *codon usage* optimal an die vorhandenen tRNAs^{Leu} angepasst ist. Das CTC-Codon hingegen widerspricht dem üblichen Codon-Gebrauch des *psbA*-Gens und so könnte die D1-Translation durch mehr als zwei CTC-Codons in Folge so beeinträchtigt sein, dass die Menge an reifem D1-Protein nicht für die photoautotrophe Selektion der Transformanten ausreicht.

Die Transformation mit fünf und zehn Codons in Folge scheiterte auch für das häufige TTA-Codon. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Aminosäure Leu könnte die Insertion von mehr als drei dieser Codons in die codierende Sequenz der *D-de-loop*-

Region zu strukturellen Veränderungen auf Aminosäureebene führen. Der gewählte Bereich ist außerhalb der Thylakoidmembran im Stroma lokalisiert und beherbergt die Q_B-Bindenische. Konformationsänderungen, die diese über *long-range*-Effekte destabilisieren, könnten den Elektronentransport über das D1-Protein beeinträchtigen, so dass Mutanten nicht auf Photoautotrophie selektiert werden können.

Zur physiologischen Analyse wurden die Leu-Mutanten mit zwei zusätzlichen Codons im *psbA*-Gen genutzt. Diese zeigen im Wachstumsversuch (Abb. 3-3) im Vergleich zum Referenzstamm IL kaum Unterschiede. Zwar ist die Wachstumsrate der Mutante Leu2h um ca. 10 % gegenüber der des Referenzstammes IL verbessert, die SPR hingegen um 10 % verringert (Abb. 3-4). Eine Erklärung hierfür sind Schwankungen, die erfahrungsgemäß bei physiologischen Messungen auftreten können. Mutante Leu2s zeigt in beiden Versuchen ähnliche Werte wie die IL-Mutante. Nur die Messung der Fv/Fm-Werte beider Leu-Mutanten (Tabelle 3-2) zeigt eine Verminderung der Quantennutzung von etwa 65 % gegenüber der Referenz IL (= 75 %), was auf einen negativen Effekt der Aminosäureinsertion in das D1-Protein hinweist. Diese wirkt sich allerdings nicht negativ auf das Wachstum und die SPR aus. Im Starklichtversuch (Abb. 3-5 A) sinkt der D1-Gehalt beider Mutanten insgesamt um etwa 10-20 %, doch auch nach 90 minütiger Bestrahlung mit Starklicht kann das D1-Protein im Western Blot detektiert werden. Auch die densitometrische Auswertung der Blots liefert für beide Mutanten annähernd gleiche Werte des D1-Gehaltes. Demnach kann ein Effekt der inserierten Leu-Codons sowie ein Effekt der *Leu-codon usage* auf die physiologische Leistung der Mutanten und auf die D1-Synthese unter Standard- und unter Starklichtbedingungen weitgehend ausgeschlossen werden.

4.1.3 Alanin

Tabelle 4-3 fasst das Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit Ala-Codons zusammen:

Tabelle 4-3| Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit den gewählten Ala-Codons.

Codon	Nutzungsfrequenz im Plastom (%)	Nutzungsfrequenz im <i>psbA</i> -Gen (%)	größte Anzahl inserierter Codons
GCG	0,329	0	10
GCT	3,397	7,08	10

Die Insertion seltener und häufiger Codons der Aminosäure Ala lieferte keine Unterschiede im Ergebnis der Transformation. Es konnten sowohl Mutanten mit bis zu zehn häufigen als auch mit bis zu zehn seltenen Ala-Codons in der *psbA*-Sequenz erzeugt werden.

In den physiologischen Untersuchungen unter Standardbedingungen zeigte das Ala-Paar mit zehn zusätzlichen Codons im *psbA*-Gen stets geringere Werte als die IL-Mutante (Abb. 3-3, Abb. 3-4, Tabelle 3-2). Dies deutet auf einen negativen Effekt der Insertion von zehn Aminosäuren auf die Physiologie der Mutanten hin. Diese könnte z.B. lokale Konformationsänderungen der *loop*-Region des D1-Proteins zur Folge haben und diese zu einem verzögerten Elektronentransport und geringerer Leistung des PSII führen. Effekte der *codon usage* können unter Standardbedingungen ausgeschlossen werden, da sich die Werte beider Mutanten nicht voneinander unterscheiden. Unter Starklichtbedingungen hingegen wird ein *codon usage* Effekt deutlich (Abb. 3-5 C). Das D1-Level der Mutante Ala10s sinkt nach 90 minütiger Starklichtbestrahlung deutlich auf ca. 60 %, wohingegen das D1-Level der Mutante mit häufigen Codons nur auf einen Wert von ca. 80 % fällt. Der D1-Gehalt von Mutante Ala10s sinkt somit ca. 20 % mehr als der D1-Gehalt von Mutante Ala10h. Da beide Mutanten auf D1-Aminosäureebene identisch sind, deutet das Ergebnis auf eine Verzögerung der D1-Translation durch seltene Ala-Codons hin. Die D1-Neusyntheserate ist demnach geringer als die Abbaurrate geschädigter D1-Proteine und man detektiert weniger Produkt in der Mutante mit seltenen Ala-Codons. Die D1-Translation der Mutante Ala10h hingegen scheint nicht beeinträchtigt zu sein.

4.1.4 Glycin

Tabelle 4-4 fasst das Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit Gly-Codons zusammen:

Tabelle 4-4 | Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit den gewählten Gly-Codons.

Codon	Nutzungsfrequenz im Plastom (%)	Nutzungsfrequenz im <i>psbA</i> -Gen (%)	größte Anzahl inserierter Codons
GGG	0,37	0	5
GGT	4,403	8,5	5

Codoninsertionen der Aminosäure Gly ermöglichten die Selektion von Transformanten mit fünf häufigen und fünf seltenen Codons, jedoch nicht die Erzeugung von Mutanten

mit zehn häufigen oder zehn seltenen Gly-Codons. Da die Sequenz von aufeinanderfolgenden Gly-Codons sehr G-reich ist, könnte die Bildung von Sekundärstrukturen, wie *hairpins* oder G-Quadruplexen [174–177], die Expressionsrate des *psbA*-Gens herabsetzen. Folglich wird kein funktionstüchtiges D1-Protein synthetisiert und Mutanten können nicht über Photoautotrophie selektiert werden. Aufgrund seiner geringen Größe und der hydrophilen Eigenschaften dieser Aminosäure sollten strukturelle Effekte auf Proteinebene weitgehend ausgeschlossen werden können.

Das Gly-Paar mit fünf zusätzlichen Codons im *psbA*-Gen zeigt nur in der Messung der Quantenausbeute des PSII leicht reduzierte Werte gegenüber der IL-Mutante (Tabelle 3-2). Sowohl im Wachstumsversuch (Abb. 3-3) als auch in der Messung der SPR (Abb. 3-4) sind keinerlei Unterschiede im Vergleich mit der IL-Mutante festzustellen. Auch unter Lichtstress können in beiden Gly-Mutanten gleiche D1-Signale und gleiche Werte der densitometrischen Auswertung ermittelt werden (Abb. 3-5 D). Demzufolge kann ein negativer Effekt der *Gly-codon usage* auf die Physiologie der Mutanten sowie auf die D1-Synthese weitgehend ausgeschlossen werden.

4.1.5 Serin

Tabelle 4-5 fasst das Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit Ser-Codons zusammen:

Tabelle 4-5 | Ergebnis der Transformation der Del1-Mutante mit den gewählten Ser-Codons.

Codon	Nutzungsfrequenz im Plastom (%)	Nutzungsfrequenz im <i>psbA</i> -Gen (%)	größte Anzahl inserterter Codons
TCC	0,277	0	3
TCA	2,2	4,53	5

Die Transformation mit Ser-Codons ließ die Selektion von Mutanten mit fünf häufigen (TCA) aber nur drei seltenen (TCC) Codons zu. Genau wie Leu zählt Ser zu den sechsfach degenerierten Aminosäuren, deren Codons in eine Vierer- und eine Zweiergruppe unterteilt werden. Sowohl das häufige Ser-Codon TCA als auch das seltene Ser-Codon TCC sind Vertreter der Vierergruppe. Die für beide Codons zuständige tRNA^{Ser} ist komplementär zum häufigen Codon TCA [82]. Von den übrigen Codons der Vierergruppe werden im *psbA*-Gen diejenigen bevorzugt verwendet, die ein G/C an zweiter und ein T an dritter

Position inne haben [47], da die G/C-Bindung der zweiten Codon-Position eine *Wobble*-Bindung von T an dritter Stelle verstärkt zulassen könnte und somit eine effizientere Translation möglich ist [111]. Da das seltene Codon TCC an dritter Position ein C besitzt, erfolgt dessen Translation durch U/C-*Wobbling* über ein modifiziertes U in der *Wobble*-Position der tRNA^{Ser} [178], wodurch die Translation ineffizient verläuft. Liegen nun mehr als drei seltene Ser-Codons (TCC) als Cluster im *psbA*-Gen vor, ist vermutlich die Synthese des D1-Proteins so stark beeinträchtigt, dass die Menge an reifem D1-Protein für die photoautotrophe Selektion der Transformanten nicht ausreicht.

Die Versuche, zehn häufige Ser-Codons in das *psbA*-Gen zu inserieren, scheiterten. Aufgrund einer Hydroxylgruppe ist die Aminosäure Ser reaktiv und bildet leicht Wasserstoffbrücken aus. Daraus könnten lokale Konformationsänderungen des D1-Proteins resultieren, die zu dessen Funktionsverlust führen und keine Selektion der Transformanten auf Photoautotrophie ermöglichen.

In den physiologischen Untersuchungen unter Standardbedingungen zeigten die Ser-Mutanten mit drei zusätzlichen Codons im *psbA*-Gen im Vergleich mit der IL-Mutante geringfügige Unterschiede auf. Der Wert der Quantenausbeute ist in beiden Mutanten reduziert (Tabelle 3-2), allerdings entsprechen sowohl die Werte der Wachstumsrate (Abb. 3-12) als auch die der SPR (Abb. 3-4) von Mutante Ser3h den Werten der IL-Mutante. Mutante Ser3s hingegen liefert in allen Messungen schlechtere Werte als die Referenz IL. Ein Effekt der Ser-Codons auf Proteinebene kann durch die Ergebnisse von Mutante Ser3h ausgeschlossen werden, da beide Ser-Mutanten auf Aminosäureebene identisch sind. Die verminderte Photosyntheseleistung der Mutante Ser3s muss demnach andere Gründe haben. Effekte der *Ser-codon usage* könnten sich bereits unter Standardbedingungen negativ auf die physiologische Leistung der Mutante Ser3s auswirken. Drei selten genutzte Ser-Codons verzögern möglicherweise die *psbA*-Expression und somit den Einbau des D1-Proteins in die Thylakoidmembran, so dass der Elektronentransport beeinträchtigt wird.

In der Analyse der D1-Level unter Starklichtbedingungen lieferten die Ser-Mutanten das interessanteste Ergebnis hinsichtlich *codon usage* Effekten (Abb. 3-5 B). Während in Mutante Ser3h nach 90 minütiger Bestrahlung mit $2000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ das D1-Level nur um ca. 10 % reduziert ist, sinkt der Wert von Mutante Ser3s um fast 80 % auf einen D1-Gehalt von lediglich 20 %. Die Mutante mit häufigen Codons kann vermutlich problemlos die

lichtgeschädigten D1-Proteine ersetzen. Ein Cluster von drei seltenen Ser-Codons hingegen hat vermutlich einen negativen Effekt auf die Translation des D1-Proteins, so dass nach langer Bestrahlung mit hoher Lichtintensität kaum noch D1-Protein detektiert wird.

Aufgrund dieser Resultate hinsichtlich *codon usage* Effekten auf die Expression des *high turnover* Proteins wurden die Ser-Mutanten näher analysiert. Die Messung der PSII-Effizienz unter Starklichtbedingungen ($1500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) sollte den Einfluss seltener Ser-Codons auf die Synthese des D1-Proteins verdeutlichen. Dies ist möglich, da eine lineare Korrelation zwischen Fv/Fm-Wert und funktionalen PSII-Reaktionszentren besteht [179].

Die Auswertung dieses Versuches (Abb. 3-6 A) spiegelt die Western Blot Analyse wieder. Nach ca. 10 minütiger Bestrahlung mit Starklicht sinkt der Wert von Mutante Ser3s schneller und auf einen niedrigeren Wert als der von Mutante Ser3h. Vermutlich ist die D1-Synthese in Mutante Ser3s durch die seltenen Codons stark verzögert, so dass geschädigte Proteine nicht schnell genug durch *de novo* synthetisiertes D1-Protein ersetzt werden können. Dadurch stehen dem PSII weniger funktionale Reaktionszentren zur Verfügung und die Quantenausbeute sinkt.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Mutanten nach 15 min Starklichtstress bei $30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ inkubiert (Abb. 3-6 B). Unter diesen Schwachlichtbedingungen steigen die Fv/Fm-Werte beider Mutanten an, doch auch hier wird der Einfluss der seltenen Ser-Codons auf die Proteinbiosynthese deutlich. In Mutante Ser3s fällt der Fv/Fm-Wert auch nach Ende des Starklichtstresses zunächst weiter ab, während in Mutante Ser3h der Wert sofort steigt. Das heißt, dass Mutante Ser3h die geschädigten D1-Proteine effizient ersetzen kann und zum Zeitpunkt der Stresswegnahme vermutlich bereits mehr funktionale Reaktionszentren vorliegen als in Mutante Ser3s. In Mutante Ser3s hingegen stehen dem PSII aufgrund der verzögerten D1-Translation vermutlich weniger Reaktionszentren zur Verfügung, so dass diese „Lücke“ erst durch eine effiziente D1-Synthese unter Schwachlichtbedingungen ersetzt werden muss. Folglich fällt der Fv/Fm-Wert zunächst weiter und steigt erst nach Kompensation der geschädigten PSII-Zentren an. Man erkennt im Anschluss, dass die lichtabhängige D1-Synthese unter Schwachlichtbedingungen auch in Mutante Ser3s nicht durch die *codon usage* beeinflusst wird, da die Fv/Fm-Werte in beiden Mutanten etwa in gleichem Maße steigen.

In vivo Markierung des D1-Proteins

Die Ergebnisse der Ser-Mutanten führten zu großem Interesse die D1-Synthese beider Mutanten *in vivo* zu analysieren. D1-Proteine und D1-Intermediate können sehr leicht in Puls-Experimenten durch radioaktive Markierung nachgewiesen werden. Dafür wurde radioaktiv markierter Schwefel zu den Algen gegeben und die plastidäre Proteinexpression durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie analysiert (Abb. 3-7).

In beiden Ser-Mutanten ist die Synthese des D1-precursors sowie dessen Prozessierung zum reifen D1-Protein nachweisbar. Zudem wird zeitgleich zur Detektion des D1-precursors wird nur in Mutante Ser3s ein ca. 20 kDa großes Translationsintermediat detektiert, das weder in Mutante Ser3h noch in einer anderen untersuchten Mutante sichtbar wird (Daten nicht gezeigt). Somit kann ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um ein D1-Abbauprodukt handelt. Vermutlich bricht die D1-Synthese zwischen den Positionen 237 und 240 an einem der zusätzlich inserierten seltenen Serine ab. Ein solches Intermediat hätte eine Größe von 26 kDa. Da das D1-Protein trotz seiner kalkulierten Größe von 39 kDa aufgrund seines ungewöhnlichen Laufverhaltens im SDS-Gel bei ca. 32 kDa detektiert [180] wird, könnte dieses Intermediat bei ca. 20 kDa detektiert werden. Zudem besteht die Möglichkeit, dass es sich hierbei um ein zum Abbau markiertes Intermediat handelt. Ein solcher Mechanismus ist in Bakterien gut untersucht und meist essentiell für die Trennung blockierter Translationskomplexe (siehe unten) [61,118,181,182].

Eine C-terminale Sequenzierung der Intermediate sollte der näheren Analyse des unbekanntes Peptides dienen. So könnte festgestellt werden, ob die Translation an den Ser-Codons abbricht oder ein tag an das verkürzte D1-Protein synthetisiert wird. Dafür sollten Mutanten erzeugt werden, die sowohl seltene Ser-Codons in der *psbA*-Sequenz als auch einen N-terminalen HA-tag zur Reinigung und Anreicherung der Intermediate tragen. Als Rezipient diente die FUD7-Mutante, da nur diese über eine Deletion im entsprechenden codierenden Bereich verfügt [124]. Ein Ansatz war die Erzeugung von Plasmiden in *E. coli*. Doch trotz mehrfacher und optimierter Klonierungsansätze gelang nur die Erstellung von Plasmiden mit häufigen Ser-Codons und HA-tag. Auch die durchgeführte Transformation mit PCR-Produkten, die die 8 kbp große Deletion umspannen, scheiterte, da vermutlich die Menge an amplifiziertem PCR-Produkt nicht ausreichte, um Transformanten über photoautotrophes Wachstum zu selektieren. Ein weiterer Ansatz stellte daher die Co-Transformation der PCR-Produkte mit einem Plasmid dar, das den Zellen Antibiotika-

resistenz verleiht, so dass die Selektion der Transformanten anschließend auf Spec-haltigen TAP-Platten erfolgen konnte. Doch auch auf diesem Weg gelang die Erzeugung der gewünschten Mutante nicht.

Die Ergebnisse des Codon Test Systems lieferten interessante Einblicke hinsichtlich *codon usage* Effekten auf die Synthese eines plastidären *high turnover* Proteins. Stressversuche verdeutlichten, dass seltene Leu-, Ala- und Gly-Codons keinen bzw. einen geringfügigen Einfluss auf die Synthese des D1-Proteins haben. Demnach führen diese vermutlich auch in anderen codierenden Sequenzen nicht zu Translationsproblemen. Cluster seltener Ser-Codons hingegen beeinflussen die Translation des *high turnover* Proteins unter Stressbedingungen deutlich und führen vermutlich aufgrund von ribosomalen Pausen während der Elongation zu verminderten Proteinausbeuten. Hinsichtlich der heterologen Genexpression sollten folglich Cluster seltener Ser-Codons in codierenden Sequenzen an die *codon usage* des Wirtsorganismus angepasst werden. Andererseits könnten Ser-Cluster auch der strategischen Insertion von ribosomalen Pausierungsstellen in codierenden Sequenzen dienen und so z.B. die Bindung von Chaperonen begünstigen oder zur Regulation des Expressionslevels beitragen.

Ein besonders deutlicher Einfluss auf die Expression des D1-Proteins war für seltene Arg-Codons zu beobachten. Die Selektion auf Photoautotrophie von Mutanten mit CGG oder AGG-Codons im *psbA*-Gen gelang nicht, da diese vermutlich zu Translationsproblemen führen. Gerade für die heterologe Expression therapeutisch relevanter Proteine im Chloroplasten ist dies ein interessanter Fakt. In codierenden Plastomsequenzen wird das Arg-Codon CGT am häufigsten und die Arg-Codons CGG und AGG am seltensten verwendet. In Sequenzen von Humanproteinen hingegen (<http://www.kazusa.or.jp/codon>) werden die Codons CGG und AGG am häufigsten und das Codon CGT am seltensten genutzt. Sequenzen therapeutisch relevanter Proteine, die künftig heterolog im Chloroplasten der Grünalge exprimiert werden könnten, enthalten demzufolge viele seltene Arg-Codons.

Basierend auf diesen Daten wurde in anschließender Arbeit der Einfluss der *Arg-codon usage* auf die plastidäre Expression von Proteinen näher untersucht. Dafür wurden das *adaA*- bzw. *GFP*-Gen mit unterschiedlicher *Arg-codon usage* heterolog im Plastom exprimiert und die erzeugten Mutanten vergleichend charakterisiert.

4.2 Anpassung der Arg-codon usage des *aadA*-Gens

Das bakterielle *aadA*-Gen codiert für eine Streptomycin^{3'}-adenylyltransferase und verleiht den Zellen Resistenz gegenüber den Aminoacylantibiotika Strep und Spec [115]. Diese inhibieren die bakterielle Proteinbiosynthese und führen aufgrund des prokaryotischen Ursprunges der Chloroplasten auch zur Hemmung der plastidären Translation. Über Interaktionen durch Wasserstoffbrücken mit konservierten Bereichen der 16SrRNA-Region der A-Stelle der ribosomalen 30S-Untereinheit, führen die Antibiotika zu mRNA-*misreading* und zum Abbruch der Translation während der Elongationsphase [183]. Daher sind die Zellen nicht mehr in der Lage essentielle Proteine zu synthetisieren und sterben. Das AadA-Genprodukt adenyliert die 3'-Hydroxyl-Position von Strep und die 9-hydroxyl-Position von Spec [115,184]. Im Zuge dieser kovalenten Veränderungen der Amino-glykosidstruktur wird die Bindung der ribosomalen 30S-Untereinheit verhindert, so dass der inhibierende Effekt auf die Translation aufgehoben wird. Aufgrund der Resistenzvermittlung dient das *aadA*-Gen häufig als Selektionsmarker für die Chloroplastentransformation [87,116,117]. Da es nicht an die *codon usage* von *C. reinhardtii* angepasst ist und für diesen Organismus seltene Arg-Codons enthält, wurde es zur weiteren Analyse von Arg-*codon usage* Effekten heran gezogen. Bereits Studien mit *E. coli* konnten zeigen, dass allein der Austausch selten genutzter Arg-Codons zu den häufig genutzten die Translationseffizienz steigert und höhere Proteinausbeuten liefert [55,185,186] Um zu prüfen, ob dies auch für ein heterolog exprimiertes Protein im Chloroplasten der Grünalge zutrifft, wurden Mutanten mit einem Arg-adaptierten *aadA*-Gen (AadAh) erzeugt und mit Mutanten verglichen, die das *E. coli aadA*-Gen exprimieren (AadAs)

Zunächst bestätigten Sequenzierungen und eine Southern Blot Analyse die korrekte Insertion und den homoplasmischen Zustand des Plastoms. Außerdem erfolgte die Sequenzierung der 16SrDNA-Region, um zufällige Punktmutationen, die zur natürlichen Resistenz der Algen gegenüber Spec und Strep führen, auszuschließen [187]. Um zu testen, ob sich die Arg-Codon Anpassung positiv auf die *in vivo* Resistenz der Mutanten auswirkt, wurden Wachstumstest mit steigenden Konzentrationen beider Aminoacylantibiotika im Medium durchgeführt. Die Verwendung von Strep und Spec sollte die zufällige Entstehung von zu Resistenz führenden Punktmutationen ausschließen und somit eine Analyse über den Zusammenhang zwischen Arg-*codon usage* und Resistenzlevel ermöglichen. Sollte die

Arg-Codon Anpassung die Translationseffizienz des AadA-Proteins steigern, könnten die Mutanten möglicherweise höherer Konzentrationen beider Antibiotika verstoffwechseln.

Sowohl die Ergebnisse der Wachstumsversuche in Flüssigkultur (HS + Strep/Spec, Abb. 3-12 B) als auch die *Drop Test* Analyse auf Festmedium (TAP + Strep/Spec, Abb. 3-11) zeigen, dass die Arg-adaptierten Mutanten auf deutlich höheren Strep/Spec-Konzentrationen wachsen und demnach mehr Antibiotika verstoffwechseln können als die nicht Arg-adaptierten Mutanten. Zwar vermittelt die heterologe AadA-Expression auch den Mutanten AadAs Resistenz gegenüber beiden Antibiotika, doch sterben sie aufgrund der inhibierenden Wirkung von Strep/Spec auf die Proteinbiosynthese bei deutlich niedrigeren Konzentrationen als die Mutanten AadAh. Die seltenen Arg-Codons könnten die Translationseffizienz des AadA-Proteins verringern, so dass der Zelle weniger AadA-Protein zur Verfügung steht. Folglich ist keine effektive Entgiftung hoher Mengen Antibiotika möglich und die Zellen sterben.

Im Vergleich der Wachstumsraten beider Mutanten ohne Antibiotikazugabe mit der Wachstumsrate der IL-Mutante wird deutlich, dass sich die Insertion des Fremdgens in beiden Mutanten negativ auf die Fähigkeit des photoautotrophen Wachstums auswirkt (Abb. 3-12 A). Auffällig ist der deutlich reduzierte Wert von Mutante AadAh, deren Rate gegenüber der IL-Mutante nur bei ca. 50 % liegt. Die Rate der AadAs-Mutante hingegen liegt bei ca. 80 %. Das sichtlich reduzierte Wachstum von Mutante AadAh könnte durch eine größere Menge an AadA-Protein hervorgerufen werden. Obwohl bislang *in vivo* kein letaler Effekt des *aadA*-Genproduktes gezeigt werden konnte [188,189], besteht die Möglichkeit, dass große Mengen AadA-Protein inhibierend auf zelluläre Vorgänge wirken. Sequenzierungen der *psbA*-Gene beider Mutanten bestätigten identische Sequenzen, so dass die verminderte Wachstumsrate unter photoautotrophen Bedingungen nicht auf Unterschiede im D1-Protein zurück zu führen ist.

Die Wachstumsversuche warfen die Frage auf, ob die erhöhte Antibiotikatoleranz mit der gesteigerten AadA-Translationseffizienz zusammenhängt. Um dies zu analysieren, wurden Flüssigkulturen mit der Konzentration Strep/Spec versetzt für die gezeigt werden konnte, dass Mutante AadAs mit einer Rate von 20 % und Mutante AadAh mit einer Rate von 40 % wachsen kann. In der späten logarithmischen Wachstumsphase wurden quantitative Western Blot Analysen zur Ermittlung der AadA-Level durchgeführt, wobei eine parallel durchgeführte Coomassie-Färbung gleiche Mengen Protein verifizierte (Abb. 3-13). Die

Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass die AadA-Synthese in der Arg-adaptierten Mutante (AadAh) unter Antibiotikazugabe effizienter abläuft als in der nicht Arg-adaptierten Mutante AadAs. In der Probe ohne Antibiotikum ist der AadA-Gehalt von Mutante AadAh zunächst deutlich geringer als in Mutante AadAs, weshalb die verminderte Photosyntheseleistung der Vorversuche nicht auf eine hohe Menge AadA zurück zu führen sein kann. Warum der AadA-Gehalt der AadAh-Mutante zunächst viel geringer ist als der von Mutante AadAs kann nicht geklärt werden. Ein hoher AadA-Gehalt in der Zelle, aufgrund der gesteigerten Translationseffizienz, könnte über Rückkopplungsmechanismen zum Stopp der Synthese führen, wenn kein Genprodukt benötigt wird.

Werden dem Medium Antibiotika zugesetzt, bleibt der AadA-Gehalt von Mutante AadAs auf einem annähernd konstanten Level. In Mutante AadAh hingegen führt die Antibiotikazugabe zu einer effizienteren Proteinbiosynthese des *aadA*-Genproduktes. Vermutlich steigert, wie bereits für *E. coli* gezeigt werden konnte [55,185,186] allein die Arg-Codon-Anpassung die Translationseffizienz und es können größere Mengen an AadA-Protein detektiert werden. Studien an *Salmonella enterica* zeigten zudem erhöhte Resistenzlevel gegenüber Strep/Spec durch die umweltbedingte Aktivierung eines Resistenzgens [190], die auch im Fall der AadA-Mutanten eine Erklärung für den gesteigerten AadA-Gehalt in Mutante AadAh nach Zugabe von Strep/Spec sein könnten. Der erhöhte Antibiotikagehalt des Mediums könnte demnach eine zusätzliche Steigerung der *aadA*-Genexpression bewirken. In Mutante AadAs hingegen könnte dieser Steigerungseffekt der AadA-Synthese aufgrund der nicht angepassten *Arg-codon usage* geringer ausfallen und somit weniger AadA-Protein detektiert werden. Das *aadA*-Gen von *E. coli* enthält ursprünglich einen ungewöhnlich hohen Anteil (10 %) seltener Codons, die auch in *E. coli* zu einem geringen AadA-Expressionslevel führen [161]. Die nahezu gleich bleibende Synthese des AadA-Proteins in Mutante AadAs könnte folglich auf die höhere Anzahl seltener Codons im Vergleich zur Mutante AadAh zurückzuführen sein. Vermutlich besteht keine direkte Korrelation zwischen der Fähigkeit des photoautotrophen Wachstums unter Antibiotikaeinfluss und dem Level an AadA-Protein. Während sich das Wachstum zwischen den Mutanten bei der gewählten Konzentration nur um ca. 20 % unterscheidet, liegt der Unterschied der AadA-Expressionsrate bei annähernd 40 %.

Die Versuche liefern erste Hinweise darauf, dass die Resultate aus *E. coli* auch auf die plastidäre Proteinexpression von *C. reinhardtii* übertragbar sind. Es konnte gezeigt

werden, dass allein der Austausch seltener Arg-Codons (CGG & AGG) im *aadA*-Gen zu dem häufig genutzten (CGT) eine erhöhte Resistenz der Mutanten gegenüber Aminoacylantibiotika zur Folge hat. Vermutlich wird auch im Chloroplasten der Grünalge die AadA-Menge aufgrund der erhöhten Translationseffizienz gesteigert. Zur Bestätigung dieser Annahme müssten Mutanten erzeugt werden, die ein *aadA*-Gen exprimieren, das vollständig an die *codon usage* des Chloroplasten von *C. reinhardtii* adaptiert ist und diese mit den bereits charakterisierten Mutanten verglichen werden. Da das *aadA*-Gen allerdings außer den seltenen Arg-Codons nur selten genutzte Leu-Codons enthält und die Resultate des Codon Test Systems keine Hinweise auf einen negativen Effekt solcher Codons auf die Synthese eines *high turnover* Proteins lieferten, besteht die Möglichkeit, dass eine vollständige *codon usage* Anpassung des *aadA*-Gens keine weitere Steigerung der *aadA*-Translationseffizienz zur Folge hat.

4.3 Effekte der Arg-codon usage auf die Expression von GFP

Das häufig in der Molekularbiologie und Biochemie verwendete Reporterprotein GFP [162–164] wurde auch in der vorliegenden Arbeit zur Analyse von Arg-codon usage Effekten genutzt und heterolog im Chloroplasten der Grünalge exprimiert. Durch Fusion von Arg-tags unterschiedlicher *codon usage* an die GFP-Sequenz konnten anhand von Expressionsstudien Effekte seltener Arg-Codon-Cluster analysiert werden.

Ferner dienten die Versuche auch der Untersuchung eines speziellen *tagging*-Systems, das z.B. in *E. coli* durch selten genutzte Arg-Codons ausgelöst wird [57,121]. Dieser tmRNA-tagging-Mechanismus stellt einen alternativen Weg des Ribosomenrecyclings in Bakterien dar, bei dem blockierte Translationskomplexe von der Zelle erkannt und die tmRNA rekrutiert werden [118,153–155]. Diese vereint sowohl tRNA- als auch mRNA-Eigenschaften, da sie sowohl über eine Aminosäurebindestelle als auch über einen ORF verfügt. In Zusammenarbeit mit dem essentiellen Cofaktor SmpB führt das System zur Degradation der im Ribosomenkomplex gebundenen mRNA und einer Markierung der festhängenden Peptidkette. Dadurch erfolgt die finale Elongation, so dass der blockierte Translationskomplex getrennt wird und neue Translationszyklen möglich werden (Abb. 1-2) [119–121,191]. Auch in einigen Plastiden, z.B. der Grünalgen *Nephroselmis olivacea* [192] und *Mesostigma viride* [193], der Kieselalge *Thalassiosira pseudonana* [158] sowie der Rotalge *Porphyra purpurea* [157], vermutet man die Existenz dieses Systems. Für den

Chloroplasten der Grünalge *C. reinhardtii* liegen derzeit keine Hinweise darauf vor, doch aufgrund des prokaryotischen Ursprungs der Plastiden besteht die Möglichkeit, dass dieses System in den Organellen existierte bzw. noch existiert. Auch Hinweise einer kerncodierten Variante des SmpB-Proteins deuten auf das Vorhandensein eines solchen plastidären Abbaumechanismus hin. Theoretisch könnten plastidäre tmRNAs auch ohne den Cofaktor fungieren [63]. Sollte das Cluster seltener Arg-Codons die Markierung des GFP-Reporterproteins forcieren, könnte diese demnach anhand einer C-terminalen Sequenzierung des GFP-Proteins identifiziert werden.

Sequenzierungen der inserierten Fremd-DNA und eine Southern Blot Analyse bestätigten die korrekte Insertion sowie den homoplasmischen Zustand des Plastoms, so dass im Anschluss durch verschiedene Anzuchtbedingungen der Mutanten der Einfluss der *Arg-codon usage* auf die GFP-Expression analysiert werden konnte.

Die Anzucht der Algen unter Standardbedingungen in acetathaltigem Medium auf einem Schüttler liefert keine Hinweise auf *codon usage* Effekte oder eine tmRNA-Markierung (Abb. 3-14). Die Bandenmuster beider Algen sind sowohl in der Western Blot Analyse sowie in der Coomassiefärbung identisch. In Mutante GFP5s konnten weder größere Banden, die auf die Markierung hindeuten, noch kleinere Banden, die auf Translationsintermediate hinweisen, detektiert werden. Vermutlich wird die GFP-Expression trotz des Clusters aus fünf selten genutzten Arg-Codons in Mutante GFP5s unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt.

Das Gegenteil war nach Anzucht der Algen unter konstanter CO₂-Begasung und erhöhter Lichtintensität zu beobachten (Abb. 3-15). Unter diesen Bedingungen steigt die lichtabhängige GFP-Synthese und *codon usage* Effekte treten auf. Mutante GFP5h kann unabhängig von den Anzuchtbedingungen genügend GFP-Protein synthetisieren, um es sowohl über Antikörperreaktion als auch mit Coomassiefärbung zu detektieren. In Mutante GFP5s hingegen verzögern vermutlich die seltenen Arg-Codons die Translation des GFP-Proteins, so dass nicht genügend Protein für die Färbung angereichert wird. Geringe Mengen GFP-Protein können nur über eine Antikörperreaktion sichtbar gemacht werden, wobei kleinere GFP-Signale deutlich stärker detektiert werden als in Mutante GFP5h. Besonders auffällig wird dieser Effekt nach Anzucht der Algen in Minimalmedium. Offenbar verläuft die GFP-Expression in Mutante GFP5h problemlos, so dass mehr GFP und weniger kleinere Signale auftreten. Das schwache GFP-Signal in Mutante GFP5s sowie die

kleineren Signale weisen drauf hin, dass die seltenen Arg-Codons in Mutante GFP5s die Expression des GFP-Proteins beeinträchtigen, wie es auch für *E. coli* bereits mehrfach beschrieben wurde [56,169,194]. Translationsintermediate oder Abbauprodukte könnten im Chloroplasten akkumulieren und durch Antikörperreaktion detektiert werden. In Mutante GFP5h wird die GFP-Translation hingegen nicht beeinträchtigt, so dass diese Intermediate nicht detektierbar sind.

In keinem der Versuche war es möglich GFP-Banden der Mutante GFP5s aus dem Coomassie-gefärbten Gel zu eluieren, so dass keine C-terminale Sequenzierung des Proteins vorgenommen werden konnte. Demnach konnten keine Hinweise auf eine Markierung durch eine tmRNA analysiert werden. In einem weiteren Ansatz wurden Mutanten erzeugt, die eine Fremd-tmRNA in der Plastomsequenz von *C. reinhardtii* tragen.

4.4 Insertion einer tmRNA in das Plastom der Grünalge

Keiner der Vorversuche lieferte Hinweise auf die Existenz des zuvor beschriebenen tmRNA-Systems im Chloroplasten der Grünalge. Zudem lieferten Softwareanalysen der Plastomsequenz keine Anhaltspunkte über das Vorkommen einer plastidären tmRNA. Mit dem Programm ARAGORN [195], das tRNA- und tmRNA-Gene identifiziert, konnte keine plastidäre tmRNA-Sequenz in *C. reinhardtii* gefunden werden. Allerdings detektierte dieses Programm auch nicht alle plastidären tRNA-Gene. Ebenso führte die Recherche mit der frei im Internet zugänglichen Software „Rfam“ (<http://rfam.sanger.ac.uk>, [196]) nicht zum Erfolg.

Das prokaryotische tmRNA-*tagging*-System könnte evolutionär verloren gegangen sein und kern- oder plastidär codierte Cofaktoren noch existieren. Darum wurde die tmRNA-Sequenz des Cyanobakteriums *Synechocystis sp.* PCC6803 in das Plastom inseriert und die ursprüngliche *tag*-Sequenz dabei durch einen Myc-*tag* ersetzt. Somit könnte statt des Abbausignals die Sequenz eines Myc-*tags* an die festhängende Peptidkette synthetisiert werden. Die Überlegung war, dass dadurch kein Abbau potentiell markierter Proteine stattfindet und deren Detektion mit Myc-spezifischem Antikörper möglich ist. *Downstream* der tmRNA-Sequenz erfolgte zudem die Insertion der GFP5h- bzw. GFP5s-Sequenz, so dass ein interner Reporter vorhanden war. Sollte das System funktionieren und das Cluster der fünf seltenen Arg-Codons des GFP5s-Proteins das *tagging* durch die Fremd tmRNA forcieren, könnten Myc-*tag* markierte GFP-Proteine in Mutante tmGFP5s

detektiert werden. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass der tmRNA-Mechanismus auch im Chloroplasten der Grünalge existierte.

Sequenzierungen und Southern Blot Analysen bestätigten die korrekte Insertion der Fremdgene sowie den homoplasmischen Zustand des Plastoms. Sehr interessante Ergebnisse lieferte die Northern Blot Analyse. Mit tmRNA-spezifischer markierter Sonde wurde ein RNA-Fragment der kalkulierten Größe detektiert (Abb. 3-10), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Expression der Fremd-tmRNA im Chloroplasten unter der Kontrolle des *rbcl*-Promotors erfolgreich ist. Mit der gleichen Methodik könnte es demnach gelingen fehlende tRNA-Gene im Plastom zu exprimieren und so die effiziente Expression von Fremdproteinen mit seltenen Codons zu ermöglichen.

Durchgeführte Western Blot Analysen blieben ohne Ergebnis. Nach der eindimensionalen Gelelektrophorese konnte kein Signal mit Myc-tag spezifischem Antikörper detektiert werden (Abb. 3-16). Die Zugabe von Proteaseinhibitoren, die Arbeit auf Eis sowie die potentielle Stabilisierung markierter Proteine durch den Myc-tag, sollte den Proteinabbau verhindern. Markierte GFP5s-Proteine könnten allerdings in sehr geringen Mengen vorliegen, weshalb im Anschluss an die genannten Versuche eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt wurde. Mit dieser Methode kann wesentlich mehr Protein analysiert werden und zudem wird aufgrund der Trennung in zwei Dimensionen eine spezifischere Trennung der löslichen Proteine erreicht. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einem sehr engen pH-Gradienten (pH 5-8), wodurch alle Proteine, die nicht dem isoelektrischen Punkt des gesuchten Proteins entsprechen, ausgeschlossen werden sollten. Doch auch diese Methodik führte nicht zur erfolgreichen Detektion von GFP-Proteinen mit Myc-tag. Zwar konnte in beiden Versuchsansätzen (ein- und zweidimensionale SDS-PAGE) das GFP-Protein mit GFP-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, doch aufgrund der fehlender Myc-Signale deuten die Ergebnisse darauf hin, dass durch das Einbringen der Fremd-tmRNA kein Protein-tagging stattfindet. Eventuell sind Cofaktoren ebenso wie die tmRNA evolutionär verloren gegangen oder es hat das tmRNA-System im Chloroplasten von *C. reinhardtii* nie gegeben. Zudem wird diskutiert, dass der kerncodierte Faktor RRF (*ribosome recycling faktor*) für das ribosomale Recycling in Chloroplasten verantwortlich sein könnte [28].

Aktuelle Studien an Prokaryoten liefern Hinweise auf verschiedene Recyclingmechanismen auch in Bakterien. So wurden in *E. coli* z.B. kürzlich die Faktoren ArfA und das

Ribosomen assoziierte Protein Yaej entdeckt, die ein tmRNA-unabhängiges Ribosomenrecycling veranlassen [197,198]. In Eukaryoten führen der *nonsense-mediated-decay* (NMD), der *nonstop-decay* (NSD) sowie der *no-go-decay* (NGD) zum ribosomalen Recycling [64]. Der Prozess in Plastiden ist derzeit noch unerforscht. Das plastidäre Recycling könnte prokaryotischen Mustern folgen, doch Abläufe die den eukaryotischen Vorgängen ähneln sind ebenso denkbar. Erst zukünftige Arbeiten werden zur Aufklärung des ribosomalen Recyclings in Plastiden führen.

5 Zusammenfassung

Die Expression von Fremdproteinen im Chloroplasten der Grünalge *C. reinhardtii* für industrielle und therapeutische Zwecke gewinnt zunehmend an Bedeutung. Um hohe Produktausbeuten zu erhalten spielt die Anpassung der *codon usage* heterolog zu exprimierender Gene eine essentielle Rolle, da der unterschiedliche Codon-Gebrauch sowohl die Translationsgeschwindigkeit als auch die Qualität und Quantität synthetisierter Proteine beeinflusst. Selten genutzte Codons verringern meist die Translationseffizienz und können durch ein Pausieren der Ribosomen während der Elongationsphase zum Abbruch der Translation führen. Innerhalb codierender Sequenzen übernehmen einzelne seltene Codons regulatorische Funktionen und tragen z.B. zur korrekten Ausbildung von Proteinstrukturen bei und sind wichtig für die mRNA-Stabilität. Darum wird die Anpassung der *codon usage* als ein Prozess der Codon-Harmonisierung zwischen „Spender“- und „Wirts“-*codon usage* diskutiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *codon usage* Effekte auf die plastidäre Expression von Proteinen der Grünalge *C. reinhardtii* untersucht.

Zunächst wurde ein Codon Test System zur *in vivo* Analyse von *codon usage* Effekten auf die Expression der plastidär codierten D1-Untereinheit des Photosystems II etabliert. Durch Transformation einer Deletionsmutante und Selektion auf Photoautotrophie gelang die Erzeugung von Insertionsmutanten, die Peptide der Aminosäuren Arg, Leu, Ser, Ala und Gly unterschiedlicher Länge und *codon usage* in der D-de-Loop Region des D1-Proteins tragen. Bereits die Erzeugung der Mutanten ließ Rückschlüsse über den Einfluss der *codon usage* auf die Expression des D1-Proteins zu. Besonders deutliche Effekte wurden für die Aminosäure Arg beobachtet. Die Erzeugung von Mutanten mit bis zu zehn häufigen Arg-Codons gelang problemlos, die Erzeugung von Mutanten mit seltenen Arg-Codons hingegen blieb erfolglos. Dies deutet auf eine starke Verzögerung oder den Abbruch der Translation durch seltene Arg-Codons hin. In der Folge wird kein oder nicht genügend D1-Protein synthetisiert, um photoautotrophes Wachstum zu ermöglichen. Bei Insertion von Leu- und Ser-Codons traten ebenfalls *codon usage* Effekte auf, da jeweils eine größere Anzahl häufiger Codons inseriert werden konnte. Keine Unterschiede lieferte die Insertion von Codons der Aminosäuren Ala und Gly. In den physiologischen und biochemischen Analysen der Mutanten wurde deutlich, dass Effekte seltener Leu-, Ala-

und Gly-Codons auf die Synthese des *high turnover* Proteins weitgehend ausgeschlossen werden können. Mutanten mit drei Ser-Codons dagegen zeigten vor allem unter Starklichtbedingungen Effekte der *codon usage* auf. In Puls-Experimenten konnten Translationsintermediate identifiziert werden, die eine strategische Nutzung solcher Codon-Cluster zur Induktion gezielter ribosomaler Pausierungsstellen ermöglichen könnten.

Studien an *E. coli* zeigen, dass allein die *codon usage* Anpassung seltener Arg-Codons die Proteinausbeute steigert. Dies sollte durch die Erzeugung und Charakterisierung von AadA-Mutanten, die sich hinsichtlich der Arg-*codon usage* unterscheiden, für den Chloroplasten von *C. reinhardtii* geprüft werden. Nach erfolgreicher Transformation einer Deletionsmutante erfolgte die physiologische und biochemische Analyse von Mutanten mit *aadA*-Gen mit häufigen Arg-Codons (= AadAh-Mutante) und Mutanten mit *aadA*-Gen mit seltenen Arg-Codons (= AadAs-Mutante). Wachstumsversuche mit steigenden Konzentrationen von Strep/Spec sowie quantitative Western Blot Analysen deuten darauf hin, dass auch für heterolog exprimierte Proteine im Plastiden der Grünalge eine Steigerung der Produktausbeute allein durch die Anpassung der Arg-*codon usage* erreicht werden kann.

Ein weiterer Ansatz dieser Arbeit diente der Untersuchung des tmRNA-*tagging*-Systems, bei dem wachsende Peptidketten an pausierenden Ribosomen C-terminal markiert werden. Die heterologe Expression des GFP-Reporterproteins mit Arg-*tags* unterschiedlicher *codon usage* sollte Hinweise darauf liefern. Durch verschiedene Anzuchtbedingungen der Mutanten sollte ein *tagging* des GFP-Proteins forciert und dieses durch eine C-terminale Sequenzierung des GFP-Proteins nachgewiesen werden. Die biochemische Analyse der Mutanten lieferte Hinweise auf eine starke Beeinträchtigung der GFP-Synthese durch die seltenen Arg-Codons. Es gelang aber nicht, genügend Protein für eine C-terminale Sequenzierung anzureichern. In einem weiteren Ansatz sollte die Insertion einer Fremd-tmRNA eines Cyanobakteriums in Verbindung mit dem Arg-*getaggten* Reporterprotein GFP dem Nachweis markierter GFP-Proteine dienen. Die Transkription der tmRNA war zwar erfolgreich, allerdings konnten keine markierten GFP-Proteine identifiziert werden. Demnach konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Hinweise auf ein tmRNA-*tagging* System im Chloroplasten der Grünalge gefunden werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Watson JD, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737–738. doi:10.1097/BLO.0b013e31814b9304.
2. Crick FHC, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ (1961) General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192: 1227–1232.
3. Tuite MF, Stansfield I (1994) Termination of protein synthesis. *Molecular Biology Reports* 19: 171–181.
4. Lekomtsev SA (2007) Non-standard genetic codes and translation termination. *Molekuliarnaia Biologiya* 41: 964–972.
5. Fixsen SM, Howard MT (2010) Processive selenocysteine incorporation during synthesis of eukaryotic selenoproteins. *Journal of Molecular Biology* 399: 385–396.
6. Ibba M, Söll D (2002) Genetic Code: Introducing Pyrrolysine. *Current Biology* 12: R464–R466. doi:10.1016/S0960-9822(02)00947-8.
7. Vallabhaneni H, Fan-Minogue H, Bedwell DM, Farabaugh PJ (2009) Connection between stop codon reassignment and frequent use of shifty stop frameshifting. *Rna New York Ny* 15: 889–897.
8. Cattaneo R (1990) Messenger RNA editing and the genetic code. *Experientia* 46: 1142–1148.
9. Gelles J, Landick R (1998) RNA polymerase as a molecular motor. *Cell* 93: 13–16.
10. Lloyd G, Landini P, Busby S (2001) Activation and repression of transcription initiation in bacteria. *Essays in Biochemistry* 37: 17–31.
11. Henkin TM (2000) Transcription termination control in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 3: 149–153.
12. Banerjee S, Chalissery J, Bandey I, Sen R (2006) Rho-dependent transcription termination: more questions than answers. *Journal of microbiology Seoul Korea* 44: 11–22.
13. Lykke-Andersen S, Jensen TH (2007) Overlapping pathways dictate termination of RNA polymerase II transcription. *Biochimie* 89: 1177–1182.
14. Marín-Navarro J, Manuell AL, Wu J, P Mayfield S (2007) Chloroplast translation regulation. *Photosynthesis research* 94: 359–374. doi:10.1007/s11120-007-9183-z.
15. Sugita M, Sugiura M (1996) Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Molecular Biology* 32: 315–326.
16. Barkan A (2011) Expression of plastid genes: organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold. *Plant Physiology* 155: 1520–1532.
17. Sidders B, Withers M, Kendall SL, Bacon J, Waddell SJ, et al. (2007) Quantification of global transcription patterns in prokaryotes using spotted microarrays. *Genome Biology* 8: R265.

18. Harris EH, Boynton JE, Gillham NW (1994) Chloroplast Ribosomes and Protein Synthesis. *Microbiological reviews* 58: 700–754.
19. Ramakrishnan V (2011) The Eukaryotic Ribosome. *Science* 331: 681–682. doi:10.1126/science.1202093.
20. Wicke S, Schneeweiss GM, DePamphilis CW, Müller KF, Quandt D (2011) The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. *Plant Molecular Biology* 76: 273–297.
21. Vinogradova E, Salinas T, Cognat V, Remacle C, Maréchal-Drouard L (2009) Steady-state levels of imported tRNAs in *Chlamydomonas* mitochondria are correlated with both cytosolic and mitochondrial codon usages. *Nucleic acids research* 37: 1521–1528. doi:10.1093/nar/gkn1073.
22. Drechsel O, Bock R (2011) Selection of Shine-Dalgarno sequences in plastids. *Nucleic Acids Research* 39: 1427–1438.
23. Londei P (2001) Translation Initiation Models in Prokaryotes and Eukaryotes. *Encyclopedia of Life Sciences*: 1–7.
24. Beligni MV, Yamaguchi K, Mayfield SP (2004) The translational apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Photosynthesis research* 82: 315–325. doi:10.1007/s1120-004-2440-5.
25. Greganova E, Altmann M, Bütikofer P (2011) Unique modifications of translation elongation factors. *The FEBS journal* 278: 2613–2624. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08199.x.
26. Frank J, Gao H, Sengupta J, Gao N, Taylor DJ (2007) The process of mRNA–tRNA translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 19671–19678.
27. Korostelev AA (2011) Structural aspects of translation termination on the ribosome. *Rna* New York Ny 17: 1409–1421.
28. Kiel MC, Kaji H, Kaji A (2007) Ribosome recycling: An essential process of protein synthesis. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 35: 40–44. doi:10.1002/bmb.6.
29. Peske F, Rodnina MV, Wintermeyer W (2005) Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis. *Molecular cell* 18: 403–412. doi:10.1016/j.molcel.2005.04.009.
30. Manuell A, Beligni MV, Yamaguchi K, Mayfield SP (2004) Regulation of chloroplast translation: interactions of RNA elements, RNA-binding proteins and the plastid ribosome. *Biochemical Society transactions* 32: 601–605. doi:10.1042/BST0320601.
31. Morton BR (1993) Chloroplast DNA Codon Use: Evidence for Selection at the *psbA* Locus Based on tRNA Availability. *Journal of Molecular Evolution* 37: 273–280.
32. Hershberg R, Petrov DA (2008) Selection on codon bias. *Annual review of genetics* 42: 287–299. doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091442.

33. Morton BR, Levin J (1997) The atypical codon usage of the plant *psbA* gene may be the remnant of an ancestral bias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 11434–11438.
34. Grantham R (1980) Working of the genetic code. *Trends in Biochemical Sciences* 5: 327–331.
35. Grantham R, Gautier C, Gouy M, Mercier R, Pave A (1980) Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Research* 8: 49–62.
36. Grantham R, Gautier C, Gouy M, Jacobzone M, Mercier R (1981) Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity. *Nucleic Acids Research* 9: 43–74.
37. Ikemura T (1981) Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *Journal of molecular biology* 151: 389–409.
38. Ikemura T (1985) Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Molecular Biology and Evolution* 2: 13–35.
39. Sharp PM, Li WH (1987) The rate of synonymous substitution in enterobacterial genes is inversely related to codon usage bias. *Molecular biology and evolution* 4: 222–230.
40. Kanaya S, Yamada Y, Kudo Y, Ikemura T (1999) Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. *Gene* 238: 143–155.
41. Fredrick K, Ibba M (2010) How the sequence of a gene can tune its translation. *Cell* 141: 227–229. doi:10.1016/j.cell.2010.03.033.
42. Rogalski M, Karcher D, Bock R (2008) Superwobbling facilitates translation with reduced tRNA sets. *Nature structural & molecular biology* 15: 192–198. doi:10.1038/nsmb.1370.
43. Duret L, Mouchiroud D (1999) Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 4482–4487.
44. Coghlan A, Wolfe K (2000) Relationship of codon bias to mRNA concentration and protein length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16: 1131–1145.
45. Castillo-Davis C, Hartl D (2002) Genome evolution and development constraint in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology and Evolution* 19: 728–735.
46. Guillemaut P (1987) Adjustment of the tRNA population to the codon usage in chloroplasts. *Nucleic Acids Research* 15: 1377–1386.
47. Morton BR (1998) Selection on the codon bias of chloroplast and cyanelle genes in different plant and algal lineages. *Journal of molecular evolution* 46: 449–459.
48. Palidwor G a, Perkins TJ, Xia X (2010) A general model of codon bias due to GC mutational bias. *PloS one* 5: e13431. doi:10.1371/journal.pone.0013431.

49. Angov E (2011) Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnology journal* 6: 650–659. doi:10.1002/biot.201000332.
50. Allert M, Cox JC, Hellinga HW (2010) Multifactorial determinants of protein expression in prokaryotic open reading frames. *Journal of Molecular Biology* 402: 905–918.
51. Cannarozzi G, Cannarozzi G, Schraudolph NN, Faty M, von Rohr P, et al. (2010) A role for codon order in translation dynamics. *Cell* 141: 355–367. doi:10.1016/j.cell.2010.02.036.
52. Thanaraj T a, Argos P (1996) Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA. *Protein science: a publication of the Protein Society* 5: 1973–1983. doi:10.1002/pro.5560051003.
53. Clarke TF, Clark PL (2010) Increased incidence of rare codon clusters at 5' and 3' gene termini: implications for function. *BMC genomics* 11: 118. doi:10.1186/1471-2164-11-118.
54. Kurland C, Gallant J (1996) Errors of heterologous protein expression. *Current opinion in biotechnology* 7: 489–493.
55. Calderone TL, Stevens RD, Oas TG (1996) High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* 262: 407–412. doi:10.1006/jmbi.1996.0524.
56. Gurvich OL, Baranov PV, Gesteland RF, Atkins JF (2005) Expression Levels Influence Ribosomal Frameshifting at the Tandem Rare Arginine Codons AGG _ AGG and AGA _ AGA in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 187: 4023–4032. doi:10.1128/JB.187.12.4023.
57. Li X, Hirano R, Tagami H, Aiba H (2006) Protein tagging at rare codons is caused by tmRNA action at the 3' end of nonstop mRNA generated in response to ribosome stalling. *RNA (New York, NY)* 12: 248–255. doi:10.1261/rna.2212606.
58. Kurita D, Muto A, Himeno H (2011) tRNA/mRNA Mimicry by tmRNA and SmpB in Trans-Translation. *Journal of nucleic acids* 2011: 130581. doi:10.4061/2011/130581.
59. Nonin-Lecomte S, Germain-Amiot N, Gillet R, Hallier M, Ponchon L, et al. (2009) Ribosome hijacking: a role for small protein B during trans-translation. *EMBO reports* 10: 160–165. doi:10.1038/embor.2008.243.
60. Ivanova N, Pavlov MY, Bouakaz E, Ehrenberg M, Schiavone LH (2005) Mapping the interaction of SmpB with ribosomes by footprinting of ribosomal RNA. *Nucleic acids research* 33: 3529–3539. doi:10.1093/nar/gki666.
61. Hayes CS, Keiler KC (2010) Beyond ribosome rescue: tmRNA and co-translational processes. *FEBS letters* 584: 413–419. doi:10.1016/j.febslet.2009.11.023.
62. Gueneau de Novoa P, Williams KP (2004) The tmRNA website: reductive evolution of tmRNA in plastids and other endosymbionts. *Nucleic acids research* 32: D104–8. doi:10.1093/nar/gkh102.
63. Jacob Y, Sharkady SM, Bhardwaj K, Sanda A, Williams KP (2005) Function of the SmpB tail in transfer-messenger RNA translation revealed by a nucleus-encoded form. *The Journal of biological chemistry* 280: 5503–5509. doi:10.1074/jbc.M409277200.

64. Harigaya Y, Parker R (2010) No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation. *Wiley Interdisciplinary Reviews - RNA*: n/a-n/a. doi:10.1002/wrna.17.
65. Komar AA, Lesnik T, Reiss C (1999) Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation. *FEBS Letters* 462: 387–391.
66. Sorensen H, Mortensen K (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in. *Journal of Biotechnology* 115: 113–128. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.
67. Menzella HG (2011) Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories* 10: 15. doi:10.1186/1475-2859-10-15.
68. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, et al. (2007) A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315: 525–528. doi:10.1126/science.1135308.
69. Angov E, Hillier CJ, Kincaid RL, Lyon JA (2008) Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. *PloS one* 3: e2189. doi:10.1371/journal.pone.0002189.
70. Angov E, Legler PM, Mease RM (2011) Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding. *Methods In Molecular Biology Clifton Nj* 705: 1–13.
71. Schwartz RE, Hirsch CF, Sesin DF, Flor JE, Chartrain M, et al. (1990) Pharmaceuticals from cultured algae. *Journal of Industrial Microbiology* 5: 113–123. doi:10.1007/BF01573860.
72. Demain AL, Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* 27: 297–306.
73. Farrokhi N, Hrmova M, Burton RA, Fincher GB (2009) Heterologous and cell free protein expression systems. *Methods In Molecular Biology Clifton Nj* 513: 175–198.
74. Rai M, Padh H (2001) Expression systems for production of heterologous proteins. *Current* 80: 1121–1128.
75. Rasala B a, Muto M, Lee P a, Jager M, Cardoso RMF, et al. (2010) Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant biotechnology journal* 8: 719–733. doi:10.1111/j.1467-7652.2010.00503.x.
76. Franklin SE, Mayfield SP (2004) Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas*. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 159–165.
77. Heifetz PB (2000) Genetic engineering of the chloroplast. *Biochimie* 82: 655–666.
78. Dove A (2002) Uncorking the biomanufacturing bottleneck. *Nature Biotechnology* 20: 777–779.
79. Rochaix J-D (1995) *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annual review of genetics* 29: 209–230.

80. Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, et al. (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* (New York, NY) 318: 245–250. doi:10.1126/science.1143609.
81. Popescu CE, Lee RW (2007) Mitochondrial Genome Sequence Evolution in *Chlamydomonas*. *Genetics* 175: 819–826.
82. Maul JE, Lilly JW, Cui L, Claude W, Miller W, et al. (2002) The *Chlamydomonas reinhardtii* Plastid Chromosome : Islands of Genes in a Sea of Repeats. *The Plant Cell* 14: 2659–2679. doi:10.1105/tpc.006155.2.
83. Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, et al. (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534–1538.
84. Mayfield SP, Manuell AL, Chen S, Wu J, Tran M, et al. (2007) *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Current opinion in biotechnology* 18: 126–133. doi:10.1016/j.copbio.2007.02.001.
85. Blowers AD, Bogorad L, Shark KB, Sanford JC (1989) Studies on *Chlamydomonas* chloroplast transformation: foreign DNA can be stably maintained in the chromosome. *The Plant Cell* 1: 123–132.
86. Blowers AD, Ellmore GS, Klein U, Bogorad L (1990) Transcriptional analysis of endogenous and foreign genes in chloroplast transformants of *Chlamydomonas*. *The Plant Cell* 2: 1059–1070.
87. Goldschmidt-Clermont M (1991) Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of *chlamydomonas*. *Nucleic acids research* 19: 4083–4089.
88. Rasala BA, Muto M, Sullivan J, Mayfield SP (2011) Improved heterologous protein expression in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* through promoter and 5' untranslated region optimization. *Plant Biotechnology Journal* 9: 674–683. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00620.x.
89. Specht E, Miyake-Stoner S, Mayfield S (2010) Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology letters* 32: 1373–1383. doi:10.1007/s10529-010-0326-5.
90. Wise RR (2006) The Diversity of Plastid Form and Function. *Differentiation* 23: 3–26. doi:10.1007/978-1-4020-4061-0_1.
91. McFadden GI (2001) Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *Journal of Phycology* 37: 951–959.
92. Marin B, Nowack ECM, Melkonian M (2005) A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist* 156: 425–432.
93. Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hapsmann S, Hasegawa M, et al. (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393: 162–165.

94. Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, et al. (2002) Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 12246–12251.
95. Bock R, Timmis JN (2008) Reconstructing evolution: gene transfer from plastids to the nucleus. *BioEssays news and reviews in molecular cellular and developmental biology* 30: 556–566.
96. Green BR (2011) Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 66: 34–44. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04541.x.
97. Simpson CL, Stern DB (2002) The Treasure Trove of Algal Chloroplast Genomes . Surprises in Architecture and Gene Content , and Their Functional Implications. *Plant Physiology* 129: 957–966. doi:10.1104/pp.010908.2001.
98. Karcher D, Köster D, Schadach A, Klevesath A, Bock R (2009) The Chlamydomonas chloroplast HLP protein is required for nucleoid organization and genome maintenance. *Molecular plant* 2: 1223–1232.
99. Sugiura M, Hirose T, Sugita M (1998) Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annual Review of Genetics* 32: 437–459.
100. Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 8526–8530.
101. Daniell H, Khan MS, Allison L (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in plant science* 7: 84–91.
102. Klein RR, Mason HS, Mullet JE (1988) Light-regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of psaA-psaB, psbA, and rbcL are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *The Journal of Cell Biology* 106: 289–301.
103. Schuster G, Timberg R, Ohad I (1988) Turnover of thylakoid photosystem II proteins during photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Federation of European Biochemical Societies Journal* 177: 403–410.
104. Zhang L, Aro EM (2002) Synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast-encoded D1 protein into photosystem II. *FEBS Letters* 512: 13–18.
105. Reisfeld A, Mattoo AK, Edelman M (1982) Processing of a chloroplast-translated membrane protein in vivo. Analysis of the rapidly synthesized 32 000-dalton shield protein and its precursor in *Spirodela oligorrhiza*. *The Federation of European Biochemical Societies Journal* 124: 125–129.
106. Ivleva NB, Shestakov SV, Pakrasi HB (2000) The Carboxyl-Terminal Extension of the Precursor D1 Protein of Photosystem II Is Required for Optimal Photosynthetic Performance of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 68031. *Plant Physiology* 124: 1403–1412.
107. Tyystjarvi E (2008) Photoinhibition of Photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coordination Chemistry Reviews* 252: 361–376. doi:10.1016/j.ccr.2007.08.021.

108. Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et biophysica acta* 1757: 742–749. doi:10.1016/j.bbabi.2006.05.013.
109. Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et biophysica acta* 1143: 113–134.
110. Haussühl K, Andersson B, Adamska I (2001) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *The European Molecular Biology Organization Journal* 20: 713–722.
111. Morton BR (1996) Selection on the codon bias of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes and the plant *psbA* gene. *Journal of molecular evolution* 43: 28–31.
112. Kane JF (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 494–500. doi:10.1016/0958-1669(95)80082-4.
113. Kless H, Oren-Shamir M, Malkin S, McIntosh L, Edelman M (1994) The D-E Region of the D1 Protein Is Involved in multiple Quinone and Herbicide Interactions in Photosystem II. *Biochemistry* 33: 10501–10507.
114. Johanningmeier U, Bertalan I, Hilbig L, Schulze J, Wilski S, et al. (2006) Engineering the D1 subunit of Photosystem II. Application to Biosensor Technology. *Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices*. Biotechnology Intelligence Unit. pp. 46–56. doi:10.1007/978-0-387-36672-2_5.
115. Jana S, Deb JK (2006) Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied microbiology and biotechnology* 70: 140–150. doi:10.1007/s00253-005-0279-0.
116. Day A, Goldschmidt-Clermont M (2011) The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant biotechnology journal* 9: 540–553. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00604.x.
117. Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 913–917.
118. Keiler KC (2007) Physiology of tmRNA: what gets tagged and why? *Current opinion in microbiology* 10: 169–175. doi:10.1016/j.mib.2007.03.014.
119. Keiler KC, Shapiro L, Williams KP (2000) tmRNAs that encode proteolysis-inducing tags are found in all known bacterial genomes: A two-piece tmRNA functions in *Caulobacter*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 7778–7783.
120. Roche ED, Sauer RT (1999) SsrA-mediated peptide tagging caused by rare codons and tRNA scarcity. *The EMBO journal* 18: 4579–4589. doi:10.1093/emboj/18.16.4579.
121. Hayes CS, Bose B, Sauer RT (2002) Stop codons preceded by rare arginine codons are efficient determinants of SsrA tagging in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 3440–3445. doi:10.1073/pnas.052707199.

122. Johanningmeier U, Heiss S (1993) Construction of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant with an intronless *psbA* gene. *Plant Molecular Biology* 22: 91–99.
123. Preiss S, Schrader S, Johanningmeier U (2001) Rapid, ATP-dependent degradation of a truncated D1 protein in the chloroplast. *European journal of biochemistry / FEBS* 268: 4562–4569.
124. Bennoun P, Masson A, Piccioni R, Chua N (1978) Uniparental mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in photosynthesis. Akoyunoglou A, Argyroudi-Akoyunoglou JH (eds) *Chloroplast Development*. Elsevier / North-Holland Biomedical Press. pp. 721–726.
125. Munder MC (2010) Constitutive and inducible gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts.
126. Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, et al. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA research an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 3: 109–136.
127. Klein U, De Camp JD, Bogorad L (1992) Two types of chloroplast gene promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 3453–3457.
128. Sueoka N (1960) Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 46: 83–91.
129. Gorman DS, Levine RP (1965) Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54: 1665–1669.
130. Heiss S (1992) Untersuchungen zur Transformation des Chloroplasten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* am Beispiel des *psbA*-Gens.
131. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. second. Sambrook J, editor Cold Spring Harbor Laboratory press, New York. p. doi:10.1002/abio.370050118.
132. Arnon DI (1949) Copper Enzymes in isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. *Plant Physiology* 24: 1–15.
133. Sager R, Garnick S (1953) Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 56: 831–838.
134. Walker D, Walker R (1987) The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. *Oxygraphics Limited Produced by University of Sheffield Print Unit*.
135. Nedbal L, Soukupová J, Kaftan D, Whitmarsh J, Trtílek M (2000) Kinetic imaging of chlorophyll fluorescence using modulated light. *Photosynthesis research* 66: 3–12. doi:10.1023/A:1010729821876.

136. Newman SM, Boynton JE, Gillham NW, Randolph-Anderson BL, Johnson AM, et al. (1990) Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics* 126: 875–888.
137. Singh SP, Rastogi RP, Häder D-P, Sinha RP (2010) An improved method for genomic DNA extraction from cyanobacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 1225–1230. doi:10.1007/s11274-010-0571-8.
138. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS one* 3: e3647. doi:10.1371/journal.pone.0003647.
139. Ho S, Hunt HD, Horton RM, Pullen KJ, Peare LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the PCR. *Gene* 77: 51–59.
140. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156–159.
141. Bradford M (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
142. Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins from 1 to 100kDa. *Analytical Biochemistry* 166: 368–379.
143. Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 23: 1511–1512.
144. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology Reading Mass* 24: 145–149.
145. Klein TM, Fromm M, Weissinger A, Tomes D, Schaaf S, et al. (1988) Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 4305–4309.
146. Dauvillee D, Hilbig L, Preiss S, Johanningmeier U (2004) Minimal Extent of Sequence Homology Required for Homologous Recombination at the *psbA* Locus in *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts using PCR-generated DNA Fragments. *Photosynthesis research* 79: 219–224. doi:10.1023/B:PRES.0000015384.24958.a9.
147. Weiß C, Bertalan I, Johanningmeier U (2012) Effects of rare codon clusters on the expression of a high-turnover chloroplast protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.04.008.
148. Brodsky L, Vasiliev A, Kalaidzidis Y, Osipov Y, Tatuzov R, et al. (1992) GeneBee: The program package for biopolymer structure analysis. *Dimacs* 8: 127–139.
149. Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1994) Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze ED, Caldwell MM, editors. *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer-Verlag, Vol. Chapitre 3. pp. 49–70.

150. Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et biophysica acta* 1767: 414–421. doi:10.1016/j.bbabi.2006.11.019.
151. Aro E-m, Zhang L, Suorsa M, Paakkarinen V, Battchikova N (2001) Maintenance of functional Photosystem II by D1 protein turnover. *In Vitro*: 1–8.
152. Schrader S, Johanningmeier U (1992) The carboxy-terminal extension of the D1-precursor protein is dispensable for a functional photosystem II complex in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology* 19: 251–256.
153. Zwieb C, Wower I, Wower J (1999) Comparative sequence analysis of tmRNA. *Nucleic acids research* 27: 2063–2071.
154. Fujihara A, Tomatsu H, Inagaki S, Tadaki T, Ushida C, et al. (2002) Detection of tmRNA-mediated trans-translation products in *Bacillus subtilis*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 7: 343–350.
155. Moore SD, Sauer RT (2007) The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. *Annual review of biochemistry* 76: 101–124. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142733.
156. Yang C, Glover JR (2009) The SmpB-tmRNA tagging system plays important roles in *Streptomyces coelicolor* growth and development. *PloS one* 4: e4459. doi:10.1371/journal.pone.0004459.
157. Reith M, Munholland J (1995) Complete Nucleotide Sequence of the *Porphyra purpurea* Chloroplast Genome. *Plant Molecular Biology Reporter* 13: 333–335.
158. Oudot-Le Secq M-P, Grimwood J, Shapiro H, Armbrust EV, Bowler C, et al. (2007) Chloroplast genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*: comparison with other plastid genomes of the red lineage. *Molecular genetics and genomics* : MGG 277: 427–439. doi:10.1007/s00438-006-0199-4.
159. Weis F, Bron P, Rolland J-P, Thomas D, Felden B, et al. (2010) Accommodation of tmRNA-SmpB into stalled ribosomes: a cryo-EM study. *RNA (New York, NY)* 16: 299–306. doi:10.1261/rna.1757410.
160. Davies J, Smith D (1978) Plasmid determined resistance to antimicrobial agents. *Annual review of microbiology* 32: 469–518.
161. Hollingshead S, Vapnek D (1985) Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase. *Plasmid* 13: 17–30.
162. Li X, Zhao X, Fang Y, Jiang X, Duong T, et al. (1998) Generation of Destabilized Green Fluorescent Protein as a Transcription Reporter. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 34970–34975. doi:10.1074/jbc.273.52.34970.
163. Fuhrmann M, Oertel W, Hegemann P (1999) A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 19: 353–361.

164. Bellucci M, De Marchis F, Mannucci R, Arcioni S (2003) Jellyfish green fluorescent protein as a useful reporter for transient expression and stable transformation in *Medicago sativa* L. *Plant Cell Reports* 22: 328–337.
165. Franklin S, Ngo B, Efuet E, Mayfield SP (2002) Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *The Plant Journal* 30: 733–744.
166. Edelman M, Mattoo AK (2008) D1-protein dynamics in photosystem II: the lingering enigma. *Photosynthesis research* 98: 609–620. doi:10.1007/s11120-008-9342-x.
167. Nakamura M, Sugiura M (2011) Translation efficiencies of synonymous codons for arginine differ dramatically and are not correlated with codon usage in chloroplasts. *Gene* 472: 50–54. doi:10.1016/j.gene.2010.09.008.
168. Pfitzinger H, Weil JH, Pillay DT, Guillemaut P (1990) Codon recognition mechanisms in plant chloroplasts. *Plant Molecular Biology* 14: 805–814.
169. McNulty DE, Claffee BA, Huddleston MJ, Porter ML, Cavnar KM, et al. (2003) Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 27: 365–374.
170. Gouy M, Gautier C (1982) Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Research* 10: 7055–7074. doi:10.1093/nar/gkn1031.
171. Naver H, Boudreau E, Rochaix J-D (2001) Functional Studies of Ycf3. *The Plant Cell* 13: 2731–2746.
172. Berry-Lowe SL, Johnson CH, Schmidt GW (1992) Nucleotide Sequence of the psbB Gene of *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts. *Plant Physiology* 98: 1541–1543.
173. Chen D, Texada DE (2006) Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli*. *Gene Therapy And Molecular Biology* 10: 1–12.
174. Darlow JM, Leach DR (1998) Secondary structures in d(CGG) and d(CCG) repeat tracts. *Journal of molecular biology* 275: 3–16. doi:10.1006/jmbi.1997.1453.
175. Mullen MA, Olson KJ, Dallaire P, Major F, Assmann SM, et al. (2010) RNA G-Quadruplexes in the model plant species *Arabidopsis thaliana*: prevalence and possible functional roles. *Nucleic acids research* 38: 8149–8163.
176. Rawal P, Kummarasetti VBR, Ravindran J, Kumar N, Halder K, et al. (2006) Genome-wide prediction of G4 DNA as regulatory motifs: role in *Escherichia coli* global regulation. *Genome Research* 16: 644–655.
177. Mullen MA, Olson KJ, Dallaire P, Major F, Assmann SM, et al. (2010) RNA G-Quadruplexes in the model plant species *Arabidopsis thaliana*: prevalence and possible functional roles. *Nucleic acids research* 38: 8149–8163. doi:10.1093/nar/gkq804.
178. Agris PF, Vendeix F, Graham WD (2007) tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *Journal of molecular biology* 366: 1–13. doi:10.1016/j.jmb.2006.11.046.
179. Aro EM, McCaffery S, Anderson JM (1993) Photoinhibition and D1 Protein Degradation in Peas Acclimated to Different Growth Irradiances. *Plant physiology* 103: 835–843.

180. Kettunen R, Tyystjärvi E, Aro EM (1996) Degradation pattern of photosystem II reaction center protein D1 in intact leaves. The major photoinhibition-induced cleavage site in D1 polypeptide is located amino terminally of the DE loop. *Plant Physiology* 111: 1183–1190.
181. Ivanova N, Pavlov MY, Felden B, Ehrenberg M (2004) Ribosome rescue by tmRNA requires truncated mRNAs. *Journal of molecular biology* 338: 33–41. doi:10.1016/j.jmb.2004.02.043.
182. Keiler KC (2008) Biology of trans-translation. *Annual review of microbiology* 62: 133–151. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162948.
183. Bockstael K, Aerschot A (2009) Antimicrobial resistance in bacteria. *Central European Journal of Medicine* 4: 141–155. doi:10.2478/s11536-008-0088-9.
184. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH (1993) Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological reviews* 57: 138–163.
185. Ivanov IG, Saraffova AA, Abouhaidar MG (1997) Unusual effect of clusters of rare arginine (AGG) codons on the expression of human interferon alpha 1 gene in *Escherichia coli*. *The international journal of biochemistry cell biology* 29: 659–666.
186. Kane JF, Violand BN, Curran DF, Staten NR, Duffin KL, et al. (1992) Novel in-frame two codon translational hop during synthesis of bovine placental lactogen in a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 20: 6707–6712.
187. Harris EH, Burkhardt BD, Gillhamt NW, Boynton JE (1989) Antibiotic Resistance Mutations in the Chloroplast 16s and 23s rRNA Genes of *Chlamydomonas reinhardtii*: Correlation of Genetic and Physical Maps of the Chloroplast Genome. *Genetics* 123: 281–292.
188. Manimaran P, Ramkumar G, Sakthivel K, Sundaram RM, Madhav MS, et al. (2011) Suitability of non-lethal marker and marker-free systems for development of transgenic crop plants: Present status and future prospects. *Biotechnology advances* 29: 703–714. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.019.
189. Oreifig AS, Kovács G, Jenes B, Kiss E, Scott P, et al. (2004) Development of a non-lethal selection system by using the *aadA* marker gene for efficient recovery of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports* 22: 490–496.
190. Koskiniemi S, Pránting M, Gullberg E, Näsval J, Andersson DI (2011) Activation of cryptic aminoglycoside resistance in *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology* 80: 1464–1478. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07657.x.
191. Dulebohn D, Choy J, Sundermeier T, Okan N, Karzai WA (2007) Trans-translation: the tmRNA-mediated surveillance mechanism for ribosome rescue, directed protein degradation, and nonstop mRNA decay. *Biochemistry* 46: 4681–4693. doi:10.1021/bi6026055.
192. Turmel M, Otis C, Lemieux C (1999) The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 10248–10253.
193. Lemieux C, Otis C, Turmel M (2000) Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma viride* reveals an early branch of green plant evolution. *Nature* 403: 649–652.

194. Ivanov I, Alexandrova R, Dragulev B, Saraffova A, AbouHaidar MG (1992) Effect of tandemly repeated AGG triplets on the translation of CAT-mRNA in *E. coli*. *FEBS letters* 307: 173–176.
195. Laslett D, Canback B (2004) ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic acids research* 32: 11–16. doi:10.1093/nar/gkh152.
196. Griffiths-Jones S, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Eddy SR, et al. (2005) Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes. *Nucleic acids research* 33: D121–4. doi:10.1093/nar/gki081.
197. Himeno H (2010) Novel factor rescues ribosomes trapped on non-stop mRNAs. *Molecular Microbiology* 78: 789–791. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07379.x.
198. Handa Y, Inaho N, Nameki N (2011) YaeJ is a novel ribosome-associated protein in *Escherichia coli* that can hydrolyze peptidyl-tRNA on stalled ribosomes. *Nucleic acids research* 39: 1739–1748. doi:10.1093/nar/gkq1097.

AadA Mutanten:

Tabelle 7-2| Oligonucleotide zur Erzeugung des Plasmides pCW5 sowie zur Analyse der AadA-Mutanten. Unterstrichene Sequenzbereiche = spätere Überhänge der Fragmente für die Klonierung.

Name	Sequenz 5' → 3'	Temp °C	Fragment:
psbD 5' UTR <i>for</i>	TATAGGTCTCAAGGTCAGGCAATTGTCACCTGGGTC	70	P+ 5' UTR <i>psbD</i>
psbD 5' UTR <i>rev</i>	TATAGGTCTCATGGGTGATCTCCAAAATAAAAAACAACCTCATCG	63	
aadA ATG <i>for</i> + Bsa	ATTAGGTCTCTCGCAATGCGTGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCAACTC	73	SOE PCR Fragment I
psbA aadA neu <i>rev</i>	CCAGGGGAAGCCGAAGTTCCAAAAGGTCGTTGATCAAAAGCAGCAGCGTTGTTTCATCAAGACGACGTACCGTACCGTAAC	75	
aadA neu 190 <i>for</i>	CGTCTTGATGAAACAACCGCTGCTTTGATCAACGACCTTTGGAAACTTCGGCTCCCTGG	75	
3' UTR <i>psbA rev</i>	TATAGGTCTCAATTTATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCCTTCACG	68	SOE PCR Fragment II
aadA ATG <i>for</i> + Bsa	ATTAGGTCTCTCGCAATGCGTGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCAACTC	73	aadA Fusion (+II) +
3' UTR <i>psbA rev</i>	TATAGGTCTCAATTTATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCCTTCACG	68	HA-tag + 3' UTR
AadA start <i>for</i>	ATGAGGGAAGCGGTGATCG	50	Screen der
AadA ende <i>rev</i>	TTATTTGCCGACTACCTTGG	50	Transformanten
AadA 352 <i>for</i>	CTTGACGGTATCTTCGAGC	50	Sequenzierung
AadA 496 <i>rev</i>	GCGCCTCAAATAGATCCTG	50	
5S Ende <i>for</i>	AACTTACGGGTCGCCGCTCTGGAAT	65	Amplifikation des Inserts, Sequenzierung

GFP Mutanten:

Tabelle 7-3 | Oligonucleotide zur Erzeugung der Plasmide pCW3 und pCW4 sowie zur Analyse der GFP Mutanten. Unterstrichene Sequenzbereiche = spätere Überhänge der Fragmente für die Klonierung.

Name	Sequenz 5' → 3'	Temp °C	Fragment:
psbD 5' UTR <i>for</i>	TATAGGTCTCAAGGTCAGGCAATTGTCACTGGCGTC	70	P + 5' UTR <i>psbD</i> + GFPct + HA- <i>tag</i> (aus
HATagHis <i>rev</i>	TATAGGTCTCAGATGACCGTAATCAGGAACATCGTAAGGG	63	pMM3)
HisMetArg <i>for</i>	TATAGGTCTCTCATCACCAATCATCACCATCACCATCACCATGATGATGCGGC	75	His- <i>tag</i> + 3 x ATG + 5 x CGG
HisMetArg <i>rev</i>	TATAGGTCTCAATACCGCCGCCCGCCGCATCATGTGGTGATGGTGATGATG	75	
HisMetArgH <i>for</i>	TATAGGTCTCTCATCACCAATCATCACCATCACCATGATGATGCGTC	73	
HisMetArgH <i>rev</i>	TATAGGTCTCAATTAACGAGCAGCAGCATCATGTGGTGATGGTGATGATG	75	His- <i>tag</i> + 3 x ATG + 5 x CGT
3' UTR <i>psbA for</i>	TATAGGTCTCATAAATTTTTTAACTAAAATAAATCTGGTTAACCATACCTGG	60	
3' UTR <i>psbA rev</i>	TATAGGTCTCAATTAATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCCTTTCACG	68	3' UTR <i>psbA</i>
GFP start <i>for</i>	ATGGCTAAAGGTGAAGAATT	50	Screen der Transformanten
GFP ende <i>rev</i>	TATTTGCCGACTACCTTGG	50	
GFP 112 <i>rev</i>	TGCGTCACCTTACCTTCACCA	58	Sequenzierung der Transformanten
GFP 561 <i>rev</i>	TGGTGTGTTTTGTTGATAGTGGTCAGC	58	
5sEnde <i>for</i>	AACTTACGGGTGCCGCTCTGGAAT	65	Amplifikation des Inserts, Sequenzierung

tmRNA Mutanten:

Name	Sequenz 5' → 3'	Temp °C	Fragment:
rbcl Prom for	TATAGGTCTCAAGGIGGCCTCGCTTATCCCCGACAGGAATATAC	55	Amplifikation P <i>rbcl</i>
rbcl Prom rev	TATAGGTCTCACCCAAATATATTATATATTAGAAATAAAAAATAAATGTAAACTAGC	55	
psbD 5' UTRtmRNA for	TATAGGTCTCACCCAGGCAATTGTCACTGGCGTCATAGTATATC	70	P+ 5' UTR <i>psbD</i> + GFPct His/HA/ 3x
3' UTR <i>psbA</i> rev	TATAGGTCTCAATTTATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCCTTTCACG	70	Met/5xArg/3' UTR <i>psbA</i> (aus pCW3 bzw. pCW4)
tmFlank1 +BSAfor	TATAGGTCTCAIGGGCCGCAATGGTTTCGACAGGTTG	65	tmRNA Fragment 1
tmFlank1 rev	GTTATTCGCAGTTACTTTTTTTTGAGCCTTTGATTTGC	65	
tmFlank2 for	TCTGTAAAAGCTACATTTCTTGTCAAAGACCGTTTACTTCT	65	tmRNA Fragment 2
tmFlank2 rev	TATAGGTCTCACTGGAAATGGAGCCGAGCGAATTGAAC	65	
tmFlank1 +BSAfor	TATAGGTCTCAIGGGCCGCAATGGTTTCGACAGGTTG	65	Amplifikation Finalfragment mit Myc- <i>tag</i>
tmFlank2 rev	TATAGGTCTCACTGGAAATGGAGCCGAGCGAATTGAAC	65	
Myc for	AAAAAAGTAACCTGGGAATAACGAAACAAAAATTAATTTTCAGAAG	60	Einfügen Myc- <i>tag</i> in Final PCR
Myc rev	GAAAATGTAGCTTTTACAGATAAATCTTCTCTGAAATTAATTTTGTTC	60	
GFP start for	ATGGCTAAAGGTGAAGAATT	50	Screen der Transformanten
GFP ende rev	TATTTGCCGACTACCTTGG	50	
GFP 112 rev	TGCGTCACCTTCACCTTCACCA	55	Sequenzierung der Transformanten
GFP 561 rev	TGGTGTGTTTTGTTGATAGTGGTCAGC	55	
5s Ende for	AACTTACGGGTCGCCGCTCTGGAAT	65	Amplifikation des Inserts, Sequenzierung

II Codon usage Tabellen für *C. reinhardtii*

Tabelle 7-5| Übersicht über die Codon-Nutzung des Chloroplasten in *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Zahl hinter dem jeweiligen Codon gibt die Frequenz des Vorkommens / 1000 Codons im Chloroplast an. Die Zahl in Klammern steht für die Anzahl des jeweiligen Codons im Chloroplasten. Es wurden 26.731 Codons ausgewertet. Quelle: <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3055.chloroplast>

UUU 33.4 (894)	UCU 17.0 (455)	UAU 24.6 (657)	UGU 7.6 (203)
UUC 17.1 (456)	UCC 2.8 (74)	UAC 10.0 (266)	UGC 1.5 (39)
UUA 77.7 (2078)	UCA 22.0 (588)	UAA 2.9 (78)	UGA 0.1 (3)
UUG 4.3 (114)	UCG 4.0 (107)	UAG 0.4 (12)	UGG 13.5 (361)
CUU 14.3 (383)	CCU 15.5 (414)	CAU 10.1 (270)	CGU 32.4 (866)
CUC 1.0 (28)	CCC 3.4 (90)	CAC 8.8 (235)	CGC 4.1 (110)
CUA 6.4 (170)	CCA 23.6 (630)	CAA 38.4 (1026)	CGA 3.4 (90)
CUG 3.7 (99)	CCG 2.4 (63)	CAG 4.1 (110)	CGG 0.5 (14)
AUU 51.4 (1374)	ACU 24.4 (651)	AAU 42.1 (1126)	AGU 16.0 (428)
AUC 8.2 (219)	ACC 5.1 (135)	AAC 17.7 (472)	AGC 5.4 (144)
AUA 6.9 (184)	ACA 32.4 (865)	AAA 69.1 (1847)	AGA 5.3 (143)
AUG 22.3 (596)	ACG 3.9 (103)	AAG 6.2 (167)	AGG 0.9 (23)
GUU 29.3 (783)	GCU 34.0 (908)	GAU 25.3 (676)	GGU 44.0 (1177)
GUC 2.5 (68)	GCC 5.9 (159)	GAC 9.8 (263)	GGC 6.4 (172)
GUA 26.0 (696)	GCA 20.7 (554)	GAA 41.1 (1098)	GGA 8.6 (229)
GUG 5.6 (149)	GCG 3.3 (88)	GAG 5.7 (152)	GGG 3.7 (99)

Tabelle 7-6| Übersicht über die Codon-Nutzung des *psbA* Gens in *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Zahl hinter dem jeweiligen Codon gibt die Frequenz des Vorkommens / 1000 Codons im *psbA* Gen an. Die Zahl in Klammern steht für die Anzahl des jeweiligen Codons im *psbA* Gen. Es wurden 353 Codons ausgewertet. Quelle: <http://www.kazusa.or.jp/codon>

UUU 5.7 (2)	UCU 34.0 (12)	UAU 0.0 (0)	UGU 8.5 (3)
UUC 68.0 (24)	UCC 0.0 (0)	UAC 36.8 (13)	UGC 2.8 (1)
UUA 51.0 (18)	UCA 45.3 (16)	UAA 2.8 (1)	UGA 0.0 (0)
UUG 0.0 (0)	UCG 0.0 (0)	UAG 0.0 (0)	UGG 28.3 (10)
CUU 22.7 (8)	CCU 11.3 (4)	CAU 2.8 (1)	CGU 42.5 (15)
CUC 0.0 (0)	CCC 0.0 (0)	CAC 25.5 (9)	CGC 0.0 (0)
CUA 17.0 (6)	CCA 22.7 (8)	CAA 19.8 (7)	CGA 0.0 (0)
CUG 0.0 (0)	CCG 5.7 (2)	CAG 0.0 (0)	CGG 0.0 (0)
AUU 14.2 (5)	ACU 34.0 (12)	AAU 2.8 (1)	AGU 0.0 (0)
AUC 65.2 (23)	ACC 0.0 (0)	AAC 68.0 (24)	AGC 5.7 (2)
AUA 0.0 (0)	ACA 11.3 (4)	AAA 0.0 (0)	AGA 0.0 (0)
AUG 34.0 (12)	ACG 0.0 (0)	AAG 0.0 (0)	AGG 0.0 (0)
GUU 14.2 (5)	GCU 70.8 (25)	GAU 2.8 (1)	GGU 85.0 (30)
GUC 0.0 (0)	GCC 0.0 (0)	GAC 17.0 (6)	GGC 2.8 (1)
GUA 45.3 (16)	GCA 19.8 (7)	GAA 42.5 (15)	GGA 0.0 (0)
GUG 0.0 (0)	GCG 0.0 (0)	GAG 11.3 (4)	GGG 0.0 (0)

Sequenzvergleich der Nucleotidsequenz des *aadA*-Gens von Mutante AadAh und AadAs:

(grau = Ausschnitt der 5'-UTR *psbD* & 3'-UTR *psbA*, schwarz = *aadA*, rot = seltene Arg-Codons in Mutante AadAs und häufige Arg-Codons in Mutante AadAh, * = übereinstimmende Sequenz)

AadAh	CATATATATAACTATATATAACCCGTTAAAGATTTATTTAAAAATATGTGTGTAAAAAA	119
AadAs	CATATATATAACTATATATAACCCGTTAAAGATTTATTTAAAAATATGTGTGTAAAAAA	120
AadAh	TGCTTATTTTAAATTTATTTTATATAAGTTATAATATTAATACACAATGATTAATAAT	179
AadAs	TGCTTATTTTAAATTTATTTTATATAAGTTATAATATTAATACACAATGATTAATAAT	180
AadAh	AAATAATAATAAATTTAACGTAACGATGAGTTGTTTTTTATTTTGGAGATACACGCAAT	239
AadAs	AAATAATAATAAATTTAACGTAACGATGAGTTGTTTTTTATTTTGGAGATACACGCAAT	240
AadAh	GCGTGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCAACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGA	299
AadAs	GAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCAACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGA	300
AadAh	GCGCCATCTCGAACCACGTTGCTGGCCGTACATTGTACGGCTCCGCGTGGATGGCGG	359
AadAs	GCGCCATCTCGAACCACGTTGCTGGCCGTACATTGTACGGCTCCGCGTGGATGGCGG	360
AadAh	CCTGAAGCCACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTACGCTTGTGATGAAC	419
AadAs	CCTGAAGCCACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTACGCTTGTGATGAAC	420
AadAh	AACGCGTGGTCTTTGATCAACGACCTTTTGGAACTTCGGCTTCCCTGGAGAGAGCGA	479
AadAs	AACGCGGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGGAACTTCGGCTTCCCTGGAGAGAGCGA	480
AadAh	GATTCCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTA	539
AadAs	GATTCCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTA	540
AadAh	TCCAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTTGCAGGTAT	599
AadAs	TCCAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTTGCAGGTAT	600
AadAh	CTTCGAGCCAGCCACGATCGACATTGATCTGGCTATCTTGTGCTGACAAAAGCAAGAGAACA	659
AadAs	CTTCGAGCCAGCCACGATCGACATTGATCTGGCTATCTTGTGCTGACAAAAGCAAGAGAACA	660
AadAh	TAGCGTTGCCTTGGTAGGTCACGCGCGGAGGAACCTTTGATCCGGTTCCTGAACAGGA	719
AadAs	TAGCGTTGCCTTGGTAGGTCACGCGCGGAGGAACCTTTGATCCGGTTCCTGAACAGGA	720
AadAh	TCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACTCGCCGCCGACTGGGCTGG	779
AadAs	TCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACTCGCCGCCGACTGGGCTGG	780
AadAh	CGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAA	839
AadAs	CGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAA	840
AadAh	AATCGCGCCGAAGGATGTCGCTGCCGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCA	899
AadAs	AATCGCGCCGAAGGATGTCGCTGCCGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCA	900
AadAh	GCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTGGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTC	959
AadAs	GCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTGGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTC	960
AadAh	GCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGT	1019
AadAs	GCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGT	1020
AadAh	CGGCAAAATACCCCTTACGATGTTCTGATTACGCTTAATTTTTTTTAAACTAAAATAAAT	1079
AadAs	CGGCAAAATACCCCTTACGATGTTCTGATTACGCTTAATTTTTTTTAAACTAAAATAAAT	1080
AadAh	CTGGTTAACCATACCTGGTTTATTTTGTAGTTTATACACACTTTTCATATATATATACTTAA	1139
AadAs	CTGGTTAACCATACCTGGTTTATTTTGTAGTTTATACACACTTTTCATATATATATACTTAA	1140
AadAh	TAGCTACCATAGGCAGTTGGCAGGACGTCGCCGCTTGACCCGGGGAAGGGGACGTCCTAAA	1199
AadAs	TAGCTACCATAGGCAGTTGGCAGGACGTCGCCGCTTGACCCGGGGAAGGGGACGTCCTAAA	1200

Sequenzvergleich des AadA-Proteins von Mutante AadAh und AadAs:

(schwarz = *aadA*, * = übereinstimmende Sequenz)

```

AadAh      MREAVIAEVSTQLSEVVGVIERHLEPTLLAVHLYGSAVDGGLKPHSDIDLLVTVTVRLDE 60
AadAs      MREAVIAEVSTQLSEVVGVIERHLEPTLLAVHLYGSAVDGGLKPHSDIDLLVTVTVRLDE 60
            *****

AadAh      TTRRALINDLLETSASPGESEILRAVEVTIVVHDDIIPWRYPAKRELQFGIEWQRNDILAG 120
AadAs      TTRRALINDLLETSASPGESEILRAVEVTIVVHDDIIPWRYPAKRELQFGIEWQRNDILAG 120
            *****

AadAh      IFEPATIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEELFDPVPEQDLFEALNETLTLWNSPPDWA 180
AadAs      IFEPATIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEELFDPVPEQDLFEALNETLTLWNSPPDWA 180
            *****

AadAh      GDERNVVLTLRSRIWYSAVTGKIAPKDVAADWAMERLPAQYQPVILEARQAYLGQEEEDRLA 240
AadAs      GDERNVVLTLRSRIWYSAVTGKIAPKDVAADWAMERLPAQYQPVILEARQAYLGQEEEDRLA 240
            *****

AadAh      SRADQLEEFVHYVKGEITKVVGKYPYDVPDYA 272
AadAs      SRADQLEEFVHYVKGEITKVVGKYPYDVPDYA 272
            *****

```

Sequenzvergleich der Nucleotidsequenzen des *GFP*-Gens von Mutante GFP5h und GFP5s:(grau = 5'-UTR *psbD* & 3'-UTR *psbA*, schwarz = *GFP*, rot = Arg-Codons, * = übereinstimmende Sequenz)

```

GFPArg5h      TTATAGGTCTCAAGGTCAGGCAATTGTCACTGGCGTCATAGTATATCAATATTGTAACA 60
GFPArg5s      TTATAGGTCTCAAGGTCAGGCAATTGTCACTGGCGTCATAGTATATCAGTATTGTAACA 60
*****

GFPArg5h      GATTGACACCCCTTTAAGTAAACATTTTTTTTAGGATTCATATGAAATTAATGGATATTT 120
GFPArg5s      GATTGACACCCCTTTAAGTAAACATTTTTTTTAGGATTCATATGAAATTAATGGATATTT 120
*****

GFPArg5h      GGTACATTTAATTCACAAAAATGTCCAATACTAAAATACAAAATTAAGTATTAGTT 180
GFPArg5s      GGTACATTTAATTCACAAAAATGTCCAATACTAAAATACAAAATTAAGTATTAGTT 180
*****

GFPArg5h      GTAAACTTGACTAACATTTTAAATTTTAAATTTTTTCTAATTATATATTTTACTTGCAA 240
GFPArg5s      GTAAACTTGACTAACATTTTAAATTTTAAATTTTTTCTAATTATATATTTTACTTGCAA 240
*****

GFPArg5h      AATTTTAAAAATTTTATGCATTTTATATCATAATAATAAACCTTTATTCATGGTTTA 300
GFPArg5s      AATTTTAAAAATTTTATGCATTTTATATCATAATAATAAACCTTTATTCATGGTTTA 300
*****

GFPArg5h      TAATATAATAATTGTGATGACTATGCACAAAGCAGTTCTAGTCCCATATATATAACTATA 360
GFPArg5s      TAATATAATAATTGTGATGACTATGCACAAAGCAGTTCTAGTCCCATATATATAACTATA 360
*****

GFPArg5h      TATAACCCGTTTAAAGATTTATTTAAAAATATGTGTGTAAAAAATGCTTATTTTAAATTT 420
GFPArg5s      TATAACCCGTTTAAAGATTTATTTAAAAATATGTGTGTAAAAAATGCTTATTTTAAATTT 420
*****

GFPArg5h      TATTTTATATAAGTTATAATATTAATACACAATGATTAATAATAATAATAATAATTT 480
GFPArg5s      TATTTTATATAAGTTATAATATTAATACACAATGATTAATAATAATAATAATAATTT 480
*****

GFPArg5h      AACGTAACGATGAGTTGTTTTTTTATTTGGAGATACACGCAATGGCTAAAGGTGAAGAA 540
GFPArg5s      AACGTAACGATGAGTTGTTTTTTTATTTGGAGATACACGCAATGGCTAAAGGTGAAGAA 540
*****

GFPArg5h      TTATTCACAGGTGTTGTACCTATTTTAGTAGAATTAGACGGTGATGTAACGGTCACAAA 600
GFPArg5s      TTATTCACAGGTGTTGTACCTATTTTAGTAGAATTAGACGGTGATGTAACGGTCACAAA 600
*****

GFPArg5h      TTTTCAGTTTCTGGTGAAGGTGAAGGTGACGCAACTTATGGTAAATTAACACTTAAATTC 660
GFPArg5s      TTTTCAGTTTCTGGTGAAGGTGAAGGTGACGCAACTTATGGTAAATTAACACTTAAATTC 660
*****

GFPArg5h      ATTTGTACTACAGGTAATTAACAGTACCTTGGCCAACCTTTAGTTACAACCTTTTACATAC 720
GFPArg5s      ATTTGTACTACAGGTAATTAACAGTACCTTGGCCAACCTTTAGTTACAACCTTTTACATAC 720
*****

GFPArg5h      GGTGTACAATGTTTCAGTCGTTACCCGTGATCACATGAAACAACATGACTTTTTCAAACTCT 780
GFPArg5s      GGTGTACAATGTTTCAGTCGTTACCCGTGATCACATGAAACAACATGACTTTTTCAAACTCT 780
*****

GFPArg5h      GCTATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAACGTACTATTTTTTCAAAGATGACGGTAATTAT 840
GFPArg5s      GCTATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAACGTACTATTTTTTCAAAGATGACGGTAATTAT 840
*****

GFPArg5h      AAAACACGTGCTGAAGTAAATTTGAAGGTGATACTTTAGTTAACCGTATTGAATTAATA 900
GFPArg5s      AAAACACGTGCTGAAGTAAATTTGAAGGTGATACTTTAGTTAACCGTATTGAATTAATA 900
*****

GFPArg5h      GGTATTGACTTCAAAGAAGATGGTAATATTTAGGTCACAACTTGAATATAACTACAAT 960
GFPArg5s      GGTATTGACTTCAAAGAAGATGGTAATATTTAGGTCACAACTTGAATATAACTACAAT 960
*****

GFPArg5h      TCACATAACGTATATATATATGGCGGACAAAACAAAAAATGGTATTAAGTAAACTTTAAA 1020
GFPArg5s      TCACATAACGTATATATATATGGCGGACAAAACAAAAAATGGTATTAAGTAAACTTTAAA 1020
*****

GFPArg5h      ATTCGTCATAATATCGAGGATGGTTCTGTACAATTAGCTGACCACTATCAACAAAACACA 1080
GFPArg5s      ATTCGTCATAATATCGAGGATGGTTCTGTACAATTAGCTGACCACTATCAACAAAACACA 1080
*****

GFPArg5h      CCAATTGGTGATGGTCTGTTTACTTCCAGACAATCATTATTTAAGTACTCAATCTGCT 1140
GFPArg5s      CCAATTGGTGATGGTCTGTTTACTTCCAGACAATCATTATTTAAGTACTCAATCTGCT 1140
*****

GFPArg5h      TTATCAAAGATCCTAACGAAAGACGTGACCACATGGTATTACTTGAATTTGTTACAGCA 1200
GFPArg5s      TTATCAAAGATCCTAACGAAAGACGTGACCACATGGTATTACTTGAATTTGTTACAGCA 1200
*****

GFPArg5h      GCTGGTATTACTCACGGTATGGATGAATATACAAATACCCCTACGATGTTCCCTGATTAC 1260
GFPArg5s      GCTGGTATTACTCACGGTATGGATGAATATACAAATACCCCTACGATGTTCCCTGATTAC 1260
*****

GFPArg5h      GCTCATCACCACCATCATCACCATCACCACATGATGATGGCGCGCGCGCGGTAA 1320
GFPArg5s      GCTCATCACCACCATCATCACCATCACCACATGATGATGGCGCGCGCGCGGTAA 1320
*****

GFPArg5h      TTTTTTTTTAACTAAAATAAATCTGGTTAACCATACCTGGTTTATTTTAGTTTATACAC 1380
GFPArg5s      TTTTTTTTTAACTAAAATAAATCTGGTTAACCATACCTGGTTTATTTTAGTTTATACAC 1380
*****

GFPArg5h      ACTTTTCATATATATATACTTAATAGCTACCATAGGCAGTTGGCAGGACGTCCC 1434
GFPArg5s      ACTTTTCATATATATATACTTAATAGCTACCATAGGCAGTTGGCAGGACGTCCC 1434
*****

```

Sequenzvergleich des GFP-Proteins von Mutante GFP5h und GFP5s:

(schwarz = GFP, rot = Arg-tag, * = übereinstimmende Sequenz)

```

GFPArg5h    MAKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTL 60
GFPArg5s    MAKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTL 60
            *****
GFPArg5h    VTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV 120
GFPArg5s    VTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV 120
            *****
GFPArg5h    NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD 180
GFPArg5s    NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD 180
            *****
GFPArg5h    HYQQNTPIGDGPFVLLPDNHYLSTQSALS KDPNERRDHMVLEFVTAAGITHGMDELYKYP 240
GFPArg5s    HYQQNTPIGDGPFVLLPDNHYLSTQSALS KDPNERRDHMVLEFVTAAGITHGMDELYKYP 240
            *****
GFPArg5h    YDVPDYAHHHHHHHHHHMMRRRRR 265
GFPArg5s    YDVPDYAHHHHHHHHHHMMRRRRR 265
            *****

```

Sequenzvergleich der Nucleotidsequenzen *tmRNA* und *GFP* der Mutanten *tmGFP5h* und *tmGFP5s*:

(blau = Promotorsequen *rbcl*, fett = *tmRNA*-Sequenz, grün = *Myc-tag*, grau = 5'-UTR *psbD* & 3'-UTR *psbA*, schwarz = *GFP*, rot = Arg-Codons, * = übereinstimmende Sequenz)

```

tmGFP5h      GGCCTCGCTTATCCCCGACAGGAATATACATGGTTTTAGTAAGTAACTGCGTAAGACGA 60
tmGFP5s      GGCCTCGCTTATCCCCGACAGGAATATACATGGTTTTAGTAAGTAACTGCGTAAGACGA 60
*****
tmGFP5h      CCGACATATACCTAAAGGCCCTTTCTATGCTCGACTGATAAGACAAGTACATAAATTTGC 120
tmGFP5s      CCGACATATACCTAAAGGCCCTTTCTATGCTCGACTGATAAGACAAGTACATAAATTTGC 120
*****
tmGFP5h      TAGTTTACATTATTTTATTTTCTAAATATATAATATATTTGGGGCCGCAATGGTTTCGA 180
tmGFP5s      TAGTTTACATTATTTTATTTTCTAAATATATAATATATTTGGGGCCGCAATGGTTTCGA 180
*****
tmGFP5h      CAGGTTGGCGAAAGCTTGCCCGTGATACAGGTCGAGAGTGAGTCTCCTCTCGCAATCAA 240
tmGFP5s      CAGGTTGGCGAAAGCTTGCCCGTGATACAGGTCGAGAGTGAGTCTCCTCTCGCAATCAA 240
*****
tmGFP5h      AGGCTCAAAAAAGTAAGTAACTGCGAATAACGAACAAAAATTAATTTTCAGAAGAAGATTTAT 300
tmGFP5s      AGGCTCAAAAAAGTAAGTAACTGCGAATAACGAACAAAAATTAATTTTCAGAAGAAGATTTAT 299
*****
tmGFP5h      CTGTAAAAGCTACATTTTCTTGTCAAAGACCGTTTACTTCTTTTCTGACTCCGTTAAGGA 360
tmGFP5s      CTGTAAAAGCTACATTTTCTTGTCAAAGACCGTTTACTTCTTTTCTGACTCCGTTAAGGA 359
*****
tmGFP5h      TTAGAGGTTAACCCCAACGGATGCTTTGTTGGCTCTTCTCTAGTTAGCTAAACAAATCAA 420
tmGFP5s      TTAGAGGTTAACCCCAACGGATGCTTTGTTGGCTCTTCTCTAGTTAGCTAAACAAATCAA 419
*****
tmGFP5h      GACTCAGACTAGAGCATCCACCATCAGGGATAATCGATGGTCCCCTAGGGCTAGA 480
tmGFP5s      GACTCAGACTAGAGCATCCACCATCAGGGATAATCGATGGTCCCCTAGGGCTAGA 479
*****
tmGFP5h      AGGACTAAACCTGTGAATGAGCGGAAAGTTAATACCCAGTTGGACAGCAGTTCAATTCT 540
tmGFP5s      AGGACTAAACCTGTGAATGAGCGGAAAGTTAATACCCAGTTGGACAGCAGTTCAATTCT 539
*****
tmGFP5h      GCTCGGCTCCATTTCCAGGCAATGTCACTGGCGTCATAGTATATCAATATTTGTAACAGA 600
tmGFP5s      GCTCGGCTCCATTTCCAGGCAATGTCACTGGCGTCATAGTATATCAATATTTGTAACAGA 599
*****
tmGFP5h      TTGACACCCTTAAGTAAACATTTTATTTAGGATTCATATGAAATTAATGGATATTTGG 660
tmGFP5s      TTGACACCCTTAAGTAAACATTTTATTTAGGATTCATATGAAATTAATGGATATTTGG 659
*****
tmGFP5h      TACATTTAATTTCCACAAAAATGTCCAATACTTAAAAATACAAAAATTAAGTATTAGTTGT 720
tmGFP5s      TACATTTAATTTCCACAAAAATGTCCAATACTTAAAAATACAAAAATTAAGTATTAGTTGT 719
*****
tmGFP5h      AAACCTTGACTAACATTTTAAATTTTAAATTTTCTTAATATATATTTTACTTGCAAAA 780
tmGFP5s      AAACCTTGACTAACATTTTAAATTTTAAATTTTCTTAATATATATTTTACTTGCAAAA 779
*****
tmGFP5h      TTTATAAAAATTTTATGCATTTTATATCATAATAATAAAAACCTTTATTTCATGGTTTATA 840
tmGFP5s      TTTATAAAAATTTTATGCATTTTATATCATAATAATAAAAACCTTTATTTCATGGTTTATA 839
*****
tmGFP5h      ATATAATAATTGTGATGACTATGCACAAAGCAGTTCTAGTCCCATATATATAACTATATA 900
tmGFP5s      ATATAATAATTGTGATGACTATGCACAAAGCAGTTCTAGTCCCATATATATAACTATATA 899
*****
tmGFP5h      TAACCCGTTTAAAGATTTATTTAAAAATATGTGTGTAAAAAATGCTTATTTTAAATTTTA 960
tmGFP5s      TAACCCGTTTAAAGATTTATTTAAAAATATGTGTGTAAAAAATGCTTATTTTAAATTTTA 959
*****
tmGFP5h      TTTTATATAAGTTATAATATTAATACACAATGATTAATAATAATAATAAATTTAA 1020
tmGFP5s      TTTTATATAAGTTATAATATTAATACACAATGATTAATAATAATAATAAATTTAA 1019
*****
tmGFP5h      CGTAACGATGAGTTGTTTTTTATTTTGGAGATACACGCAATGGCTAAAGGTGAAGAATT 1080
tmGFP5s      CGTAACGATGAGTTGTTTTTTATTTTGGAGATACACGCAATGGCTAAAGGTGAAGAATT 1079
*****
tmGFP5h      ATTCACAGGTGTTGTACCTATTTTAGTAGAATTAGACGGTGATGTAACCGTCACAAAAT 1140
tmGFP5s      ATTCACAGGTGTTGTACCTATTTTAGTAGAATTAGACGGTGATGTAACCGTCACAAAAT 1139
*****
tmGFP5h      TTCAGTTTCTGGTGAAGGTGAAGGTGACGCAACTTATGGTAAATTAACACTTAAATTCAT 1200
tmGFP5s      TTCAGTTTCTGGTGAAGGTGAAGGTGACGCAACTTATGGTAAATTAACACTTAAATTCAT 1199
*****
tmGFP5h      TTGTACTACAGGTAATACCAGTACCTTGGCCAACTTTAGTTACAACCTTTTACATACGG 1260
tmGFP5s      TTGTACTACAGGTAATACCAGTACCTTGGCCAACTTTAGTTACAACCTTTTACATACGG 1259
*****
tmGFP5h      TGTACAATGTTTCAGTCGTACCCGTGATCACATGAAACAACATGACTTTTCAAATCTGC 1320
tmGFP5s      TGTACAATGTTTCAGTCGTACCCGTGATCACATGAAACAACATGACTTTTCAAATCTGC 1319
*****
tmGFP5h      TATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAACGTAATTTTTTTCAAAGATGACGGTAATATAA 1380
tmGFP5s      TATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAACGTAATTTTTTTCAAAGATGACGGTAATATAA 1379
*****
tmGFP5h      AACACGTGCTGAAGTAAAAATTTGAAGGTGATACTTTAGTTAACCGTATTGAATTAAGG 1440
tmGFP5s      AACACGTGCTGAAGTAAAAATTTGAAGGTGATACTTTAGTTAACCGTATTGAATTAAGG 1439
*****

```

```

tmGFP5h      TATGACTTCAAAGAAGATGGTAATATTTTAGGTCACAACTTGAATATAACTACAATTC 1500
tmGFP5s      TATGACTTCAAAGAAGATGGTAATATTTTAGGTCACAACTTGAATATAACTACAATTC 1499
*****
tmGFP5h      ACATAACGTATATATTTATGGCGGACAAACAAAAAATGGTATTAAGTAAACTTTAAAAT 1560
tmGFP5s      ACATAACGTATATATTTATGGCGGACAAACAAAAAATGGTATTAAGTAAACTTTAAAAT 1559
*****
tmGFP5h      TCGTCATAATATCGAGGATGGTTCTGTACAATTAGCTGACCACTATCAACAAAACACACC 1620
tmGFP5s      TCGTCATAATATCGAGGATGGTTCTGTACAATTAGCTGACCACTATCAACAAAACACACC 1619
*****
tmGFP5h      AATGGTGATGGTCCTGTTTACTTCCAGACAATCATTATTTAAGTACTCAATCTGCTTT 1680
tmGFP5s      AATGGTGATGGTCCTGTTTACTTCCAGACAATCATTATTTAAGTACTCAATCTGCTTT 1679
*****
tmGFP5h      ATCAAAGATCCTAACGAAAGACGTGACCACATGGTATTACTTGAATTTGTTACAGCAGC 1740
tmGFP5s      ATCAAAGATCCTAACGAAAGACGTGACCACATGGTATTACTTGAATTTGTTACAGCAGC 1739
*****
tmGFP5h      TGGTATTACTCACGGTATGGATGAATTATACAAATACCCTTACGATGTTCTCTGATTACGC 1800
tmGFP5s      TGGTATTACTCACGGTATGGATGAATTATACAAATACCCTTACGATGTTCTCTGATTACGC 1795
*****
tmGFP5h      TCATCACCACCATCATCATCACCATCACCACATGATGATGCGTCGTCGTCGTCGTTAATT 1860
tmGFP5s      TCATCACCACCATCATCATCACCATCACCACATGATGATGCGGCGGCGGCGGCGGTAATT 1836
*****
tmGFP5h      TTTTTTTAAACTAAAATAAATCTGGTTAACCATACCTGGTTTATTTTAGTTTATACACAC 1920
tmGFP5s      TTTTTTTAAACTAAAATAAATCTGGTTAACCATACCTGGTTTATTTTAGTTTATACACAC 1896
*****
tmGFP5h      TTTTCATATATATATACTTAATAGCTACCATAGGCAGTTGGCAGGACGTCC 1971
tmGFP5s      TTTTCATATATATATACTTAATAGCTACCATAGGCAGTTGGCAGGACGTCC 1947
*****

```

Sequenzvergleich des GFP-Proteins von Mutante tmGFP5h und tmGFP5s:

(schwarz = GFP, rot = Arg-tag, * = übereinstimmende Sequenz)

```

tmGFPArg5h   MAKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTL 60
tmGFPArg5s   MAKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTL 60
*****
tmGFPArg5h   VTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFE GDTLV 120
tmGFPArg5s   VTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFE GDTLV 120
*****
tmGFPArg5h   NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD 180
tmGFPArg5s   NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD 180
*****
tmGFPArg5h   HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNERRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYKYP 240
tmGFPArg5s   HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNERRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYKYP 240
*****
tmGFPArg5h   YDVPDYAHHHHHHHHHMMRRRRR 265
tmGFPArg5s   YDVPDYAHHHHHHHHHMMRRRRR 265
*****

```

IV Wachstumskurven der AadA Mutanten in Flüssigkultur

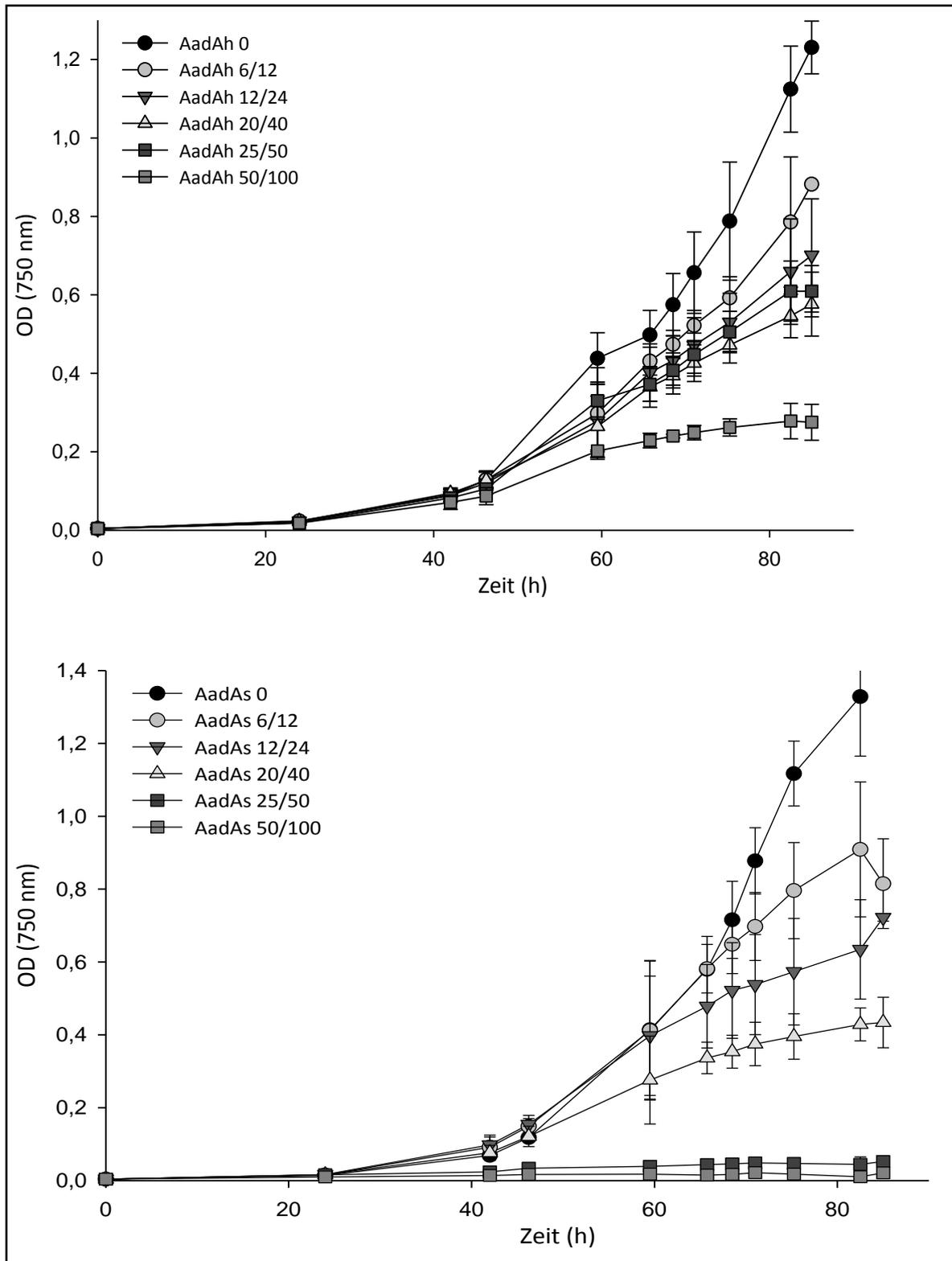


Abb. 7-2| Wachstumskurven der Mutanten AadAh und AadAs. Die Anzucht der Algen erfolgte in Minimalmedium, bei 24 °C, unter konstanter Begasung mit CO₂ und Bestrahlung mit 70 μE*m⁻²*s⁻¹. Für die Messung der OD (750 nm) wurden je 1 ml Aliquots entnommen. Die Kurven resultieren aus 4 unabhängigen Messungen.

Publikationen

Weiß C, Bertalan I, Johanningmeier U (2012) Effects of rare codon clusters on the expression of a high-turnover chloroplast protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.04.008.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Caroline Weiß, an Eides statt, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nutzte und die aus fremden Quellen entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Caroline Weiß

Danksagung

Die vorliegende Arbeit habe ich am Institut für Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Udo Johanningmeier angefertigt. Ich möchte ihm für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit und für die Unterstützung während der Arbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt Ivo Bertalan, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und zudem immer ein offenes Ohr für Probleme aller Art hatte.

Marlies Wolf möchte ich für ihre stete Unterstützung im Laboralltag und für die schönen Pausengespräche danken.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Zellphysiologie danke ich für die schöne Zeit in der AG Johanningmeier und das tolle Arbeitsklima.

Bei den Mitarbeitern der AG Klösgen möchte ich mich für die fachliche Unterstützung in Fragen der Proteinbiochemie bedanken.

Allen Mitarbeitern des Fachbereiches Pflanzen- und Zellphysiologie der MLU möchte ich einen herzlichen Dank für die stets schöne Atmosphäre im Institut sowie der Hilfe bei Problemen aussprechen.

Zudem danke ich allen Studenten, die einen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen größten Dank spreche ich meinen Eltern und meiner gesamten Familie aus, die mir stets den Rücken stärkt, immer für mich da ist und an mich glaubt.

Ein besonderer Dank gilt Christian für die stete Unterstützung und seine grenzenlose Geduld.

Ebenfalls ein großes und herzliches Dankeschön gilt allen Freunden in Nah und Fern, die während der gesamten Zeit in Halle für mich da sind und waren.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name	Caroline Weiß
Geburtsdatum	20.01.1983
Geburtsort	Suhl
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Wohnsitz	Halle / Saale

Schul- und Berufsausbildung:

seit 11/2008	wiss. Mitarbeiterin am Institut für Biologie der MLU Halle-Wittenberg, Anfertigung der Promotion am Lehrstuhl für Zellphysiologie, AG Prof. Dr. U. Johanningmeier
10/2001 – 4/2008	Biologie-Studium an der MLU Halle-Wittenberg mit Abschluss Diplom, Thema der Diplomarbeit: „Der Einfluss des Codon-Gebrauchs auf die Expression eines <i>high turnover</i> Proteins“
6/2001	Abitur am Prof. Carl-Fiedler-Gymnasium, Suhl

Caroline Weiß