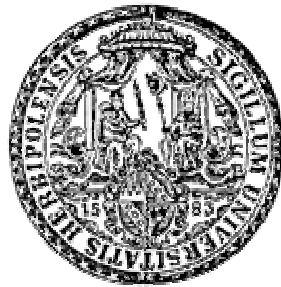


**Entwicklung eines Lipoprotein-Impfstoffes aus  
Pflanzen:  
Produktion des rekombinanten ‘outer surface protein A‘  
(OspA) von *Borrelia burgdorferi* in Tabakchloroplasten**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von  
**Karin Glenz**  
Müllheim/Baden

Würzburg, 2005

Eingereicht am: 29.07.2005.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Scheer.....

Gutachter: Prof. Dr. M. J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. W. Kaiser

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt: .....

*Für Michael*

---

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen allgemein	5
Abkürzungen der Konstrukte und rekombinanten Proteine	7
<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Lyme-Borreliose	8
1.1.1 OspA-Vakzine	9
1.1.2 Wirkmechanismus der OspA-Vakzine	9
1.1.3 OspA-Struktur	10
1.2 Adjuvantien	11
1.3 Bakterielle Lipoproteine	12
1.4 Transgene Pflanzen als Bioreaktoren	13
1.4.1 Zellkerntransformation	15
1.4.2 Transiente Expression	16
1.4.3 Plastidentransformation	17
1.5 Palmitoylierung von Proteinen in eukaryotischen Zellen	19
1.6 Fragestellung	20
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial	22
2.2 Pflanzenmaterial	25
2.3 Bakterienstämme	26
2.4 Plasmide	26
2.5 Nährmedien	27
2.6 Pufferlösungen	29
2.7 Methoden zur Herstellung rekombinanter Plasmide	30
2.7.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.7.2 <i>Taq</i> -Polymerase-Behandlung von mit <i>Pfu</i> produzierten PCR-Produkten und deren Klonierung	32
2.7.3 Spaltung von DNA mittel Restriktionsenzymen	32
2.7.4 Auffüllen von 3'-rezessiven DNA-Enden mittels Klenow-Polymerase	33
2.7.5 Behandlung von DNA mit Mung-Bean-Nuklease	34
2.7.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	34
2.7.7 Agarose-Gelelektrophorese	34
2.7.8 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
2.7.9 Ligation von DNA-Fragmenten	35

---

---

2.7.10	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	36
2.7.11	Transformation von Bakterien	36
2.7.12	Identifizierung transformierter Bakterien „Colony screen“	37
2.7.13	Isolierung von Plasmid-DNA	37
2.7.14	Herstellung von Glycerinkulturen	38
2.7.15	Quantifizierung von DNA bzw. RNA	38
2.7.16	Sequenzierung von DNA-Sequenzen	39
2.7.17	„Annealing-Reaktion“ von antiparallelen Oligonukleotiden	39
2.8	Methoden zur Identifizierung transgener Pflanzen	40
2.8.1	Gewinnung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial (CTAB-Methode)	40
2.8.2	Gesamt-RNA-Präparation aus Pflanzenmaterial	40
2.8.3	Denaturierende Agarosegele zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA	41
2.8.4	DNA-Transfer (Southern-Blot)	42
2.8.5	RNA-Transfer (Northern-Blot)	42
2.8.6	Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin	43
2.8.7	Hybridisierung mit <i>DIG</i> -11-dUTP-markierten Sonden	44
2.9	Proteinbiochemische Methoden	45
2.9.1	Proteinextraktion	45
2.9.2	Bestimmung des Proteingehalts	45
2.9.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.9.4	Färbung von Polyacrylamidgelen	46
2.9.5	Transfer von Proteinen und Immunodetektion (Immuno-Blot)	47
2.9.6	Reinigung von rekombinantem OspAHis	48
2.10	Mikrosomenpräparation	50
2.11	Chloroplastenisolierung	50
2.12	Protoplastenisolierung	51
2.13	<i>In-vivo</i> -Isotopen-Markierung	52
2.13.1	Inkubation von stoffwechselaktiven Protoplasten mit radioaktiv-markierter Palmitinsäure	52
2.13.2	Immunopräzipitation	52
2.13.3	Vorinkubation mit verschiedenen Inhibitoren der Fettsäuremodifikation	53
2.14	Methoden zur Transformation von Pflanzen	53
2.14.1	Transformation von Pflanzen mit der „Gene gun“	53
2.14.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelter Gentransfer	55
2.14.3	Transiente Expression von <i>ospA</i> und <i>ot</i>	57
2.15	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	57
2.16	Immunologische Untersuchungen	57

---

---

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>59</b>
3.1 Expression von <i>ospA</i> und <i>ot</i> in Tabakchloroplasten	59
3.1.1 Klonierung der Expressionsvektoren für die Chloroplasten- transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	59
3.1.1.1 Modifizierung des pNT1-Expressionsvektors	61
3.1.1.2 Modifikationen in den Subklonierungsvektoren pJS25uidA und pJS25OspA	64
3.1.1.3 Klonierung der Chloroplastenexpressionsvektoren pNT2OspA und pNT2OT	64
3.1.2 Transformation von Tabakchloroplasten	67
3.1.3 Identifizierung und Charakterisierung transgener Pflanzenlinien	67
3.1.3.1 Identifizierung transplastomer Pflanzenlinien	67
3.1.3.2 Analyse der transgenen Pflanzen mittels Restriktions- Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)	68
3.1.3.3 Heterologe Expression der Transgene <i>ospA</i> und <i>ot</i> in den transgenen Pflanzen	71
3.1.3.4 Phänotypen der transgenen Pflanzen	72
3.1.3.5 Untersuchungen zur Membranassoziation von rpOspA	73
3.1.3.6 Inkorporation von radioaktiv-markierter Palmitinsäure in rpOspA	75
3.1.4 Reinigung von rpOspA	76
3.1.5 Klonierung eines neues OspA-Expressionsvektors	76
3.1.6 Identifizierung und Charakterisierung der OspAhis-Pflanzenlinie	79
3.1.6.1 Analyse der transgenen Pflanzen mittels Restriktions- Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)	79
3.1.6.2 Expression und Akkumulation von rpOspAhis und rpOT in transgenen Pflanzen	79
3.1.6.3 Phänotypen der transgenen Pflanzen	81
3.1.6.4 Untersuchungen zur Membranassoziation von rpOspAhis	81
3.1.6.5 Lipidierung von rpOspAhis	82
3.1.7 Reinigung von rpOspAhis	85
3.1.8 MALDI-TOF-MS-Untersuchung von plastidärem OspAhis	87
3.1.9 Immunologische Untersuchungen mit plastidärem OspAhis an Mäusen	89
3.2 Poly- und bicistronische Operone	92
3.2.1 Klonierung poly- und bicistronischer Chloroplastenexpressions- vektoren	92
3.2.2 Charakterisierung der transgenen Pflanzenlinien	97
3.2.2.1 Analyse der transgenen Pflanzen mittels RFLP	97
3.2.2.2 Heterologe <i>ospA</i> -Expression in den bi- und polycistronischen Pflanzenlinien	99
3.2.2.3 Phänotypen der bi- und polycistronischen Pflanzenlinien	100

---

---

3.2.3	Untersuchung von rpOspAhis aus den polycistronischen Pflanzen OspAhisIII	101
3.3	Zellkernexpression von <i>ospA</i> und <i>ot</i> in <i>N. tabacum</i> und <i>N. benthamiana</i>	105
3.3.1	Klonierung der OspA und OT-Zellkernexpressionsvektoren	105
3.3.2	Zellkerntransformation von <i>N. tabacum</i>	106
3.3.3	Identifizierung und Charakterisierung der Kerntransformanden	106
3.3.3.1	Identifizierung transgener Pflanzenlinien	106
3.3.3.2	Akkumulation von rekombinantem OspA und OT	107
3.3.3.3	Phänotypen der Kerntransformanden	108
3.3.4	Transiente Expression von <i>ospA</i> und <i>ot</i> in <i>N. benthamiana</i>	109
3.3.4.1	Klonierung der Expressionskonstrukte	110
3.3.4.2	Immunodetektion der OspA- und OT-Akkumulation nach transienter Expression	111
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>114</b>
4.1	Chloroplastenexpression von <i>ospA</i> und <i>ot</i>	115
4.2	Membranassoziation und Lipidierung von plastidärem OspA	117
4.3	Post-transtranslationale Modifikation an plastidärem OspA	120
4.4	Immunogenität von plastidärem OspA	123
4.5	Optimierung der rpOspA-Lipidierung in Tabakchloroplasten	126
4.6	Stabile Kerntransformation mit <i>ospA</i> und <i>ot</i>	130
4.7	„Molekular Farming“	133
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>135</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b>	<b>137</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>139</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>152</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>153</b>
	<b>Publikationsliste und Beiträge zu Tagungsbänden</b>	<b>154</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>155</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>156</b>

---

**Abkürzungen allgemein**

---

<i>aadA</i>	Aminoglycosid-3''-Adenylyltransferase-Gen
<i>accD</i>	Acetyl-CoA-Carboxylase-Gen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
2-BP	2-Bromopalmitat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>DIG</i> -11-dUTP	Digoxygenin-11-Desoxyuridintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
HBsAg	Hepatitis B Antigen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MALDI-TOF	<u>M</u> atrix- <u>A</u> ssisted <u>L</u> aser <u>D</u> esorption <u>I</u> onization- <u>T</u> ime <u>O</u> f <u>F</u> light
MCS	Multiple cloning site
MPL	monophosphoryl lipid A
MS	Massenspektrometrie
MS-Salze	Murashige & Skoog Salze
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
NAA	1-Naphtylessigsäure
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LGP	lösliches Gesamtprotein
Lgt	Phosphatidylglycerin:Prolipoprotein-Diacylglyceryl-Transferase
Lnt	Phospholipid:Apolipoprotein-Transacylase
Lsp	Signal-Peptidase II
LT-B	Untereinheit B des hitzelabilen Toxins von <i>E. coli</i>
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure

---



---

<i>npt II</i>	Neomycinphosphotransferase II-Gen
ORF	open reading frame
OspA	outer surface protein A
OT	OspA truncated
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PAT	Palmityl-Acyl-Transferasen
<i>Prrn</i>	16srRNA-Promoter
<i>psbA</i>	Gen des D1-Proteins
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>rbcL</i>	Ribulosebisphosphatcarboxylase-Gen (große Untereinheit)
RBS	Ribosomenbindestelle
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
<i>Trps 16</i>	Terminator des ribosomalen Proteins S16-Gens
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
TDM	trehalose dimycolate
TFA	Trifluoressigsäure
U	Units
<i>uidA</i>	$\beta$ -Glucuronidase-Gen
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

---

## Abkürzungen der Konstrukte und rekombinanten Proteine

pNT2	<u>C</u> hloroplasten <u>e</u> xpressions <u>v</u> ektor (CEV)
pNT2OspA	CEV mit Volllänge- <i>ospA</i> -Gen
pNT2OspAhis	CEV mit Volllänge- <i>ospA</i> -Gen + His-tag-Nukleotidsequenz
pNT2OspAhisIII	CEV mit Volllänge- <i>ospA</i> -Gen + His-tag-Nukleotidsequenz + drei Gene ( <i>lgt</i> , <i>lsp</i> und <i>lnt</i> ) für die lipidmodifizierenden Enzyme aus <i>E. coli</i>
pNT2OspAlgt	CEV mit Volllänge- <i>ospA</i> -Gen + <i>lgt</i> -Gen aus <i>E. coli</i>
pNT2OspAIII	CEV mit Volllänge- <i>ospA</i> -Gen + die drei Gene <i>lgt</i> , <i>lsp</i> und <i>lnt</i> für die lipidmodifizierenden Enzyme aus <i>E. coli</i>
pNT2OspAisp	CEV mit Volllänge- <i>ospA</i> -Gen + <i>lsp</i> -Gen aus <i>E. coli</i>
pNT2OspAInt	CEV mit Volllänge- <i>ospA</i> -Gen + <i>lnt</i> -Gen aus <i>E. coli</i>
pNT2OT	CEV mit verkürztem <i>ospA</i> -Gen ( <i>ospA truncated</i> , <i>ot</i> ), <i>ot</i> codiert für ein OspA ohne N-terminale Signalsequenz
pPSI	<u>K</u> ern <u>e</u> xpressions <u>v</u> ektor
pPSIOspA	KEV mit Volllänge- <i>ospA</i> -Gen
pPSIOT	KEV mit <i>ot</i> -Gen
rnOspA	rekombinantes, nukleares OspA
rnOT	rekombinantes, nukleares OT (OspA truncated)
rpOspA	rekombinantes, plastidäres OspA
rpOspAhis	rekombinantes, plastidäres OspA mit C-terminalem His-tag aus der OspAhis-Pflanze
rpOspAlgt	rekombinantes, plastidäres OspA aus OspAlgt-Pflanzen
rpOspAIII	rekombinantes, plastidäres OspA aus OspAhisIII-Pflanzen
rpOspAisp	rekombinantes, plastidäres OspA aus OspAisp-Pflanzen
rpOT	rekombinantes, plastidäres OT (OspA truncated)

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Lyme-Borreliose

Lyme-Borreliose ist eine chronische, schubweise verlaufende Multiorganerkrankung, die vorrangig bei Säugetieren auftritt und 1977 von dem Mediziner Allan Steere erstmals beschrieben wurde (Steere et al., 1994, 1977). Als Erreger konnte das zu den schraubenförmigen Spirochäten zählende Bakterium *Borrelia burgdorferi* 1982 von Willy Burgdorfer identifiziert werden (Burgdorfer et al., 1982). Anhand genetischer Analysen wurde *Borrelia burgdorferi* in zehn Genospezies unterteilt, von denen drei (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garnii* und *B. afzelii*) als humanpathogen gelten und unter dem Begriff *Borellia burgdorferi* sensu lato zusammengefasst werden (Baranton et al., 1992). Als Vektor für die Übertragung der Borrelien auf Säugetiere fungieren Schildzecken der Gattung *Ixodes*. Die Borrelien gelangen dabei während der Blutmahlzeit mit dem Speichel in den Wirt.

Im europäischen Raum treten alle drei humanpathogenen Genospezies nebeneinander auf, in Asien wurden bislang nur *B. garnii* und *B. afzelii* nachgewiesen. In Nordamerika kommt hingegen nur *Borrelia burgdorferi* sensu stricto vor (Busch et al., 1996; Demaerschalck et al., 1995). Die Anzahl der Neuerkrankungen an Lyme-Borreliose werden in Europa auf ca. 60000 Fälle pro Jahr geschätzt (O'Connell et al., 1998) und über 17000 Neuerkrankungen wurden im Jahre 2001 in den USA gemeldet.

Lyme-Borreliose ist eine schwer zu diagnostizierende Krankheit, deren Verlauf in drei Stadien unterteilt wird und die überaus variabel sein kann (Steere, 1989). Die ersten Symptome nach einer Infektion sind grippale Infekte, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Fieber sowie Muskel- und Gelenkschmerzen (Steere et al., 1998). Diese unspezifischen Symptome treten jedoch auch bei zahlreichen anderen Krankheiten auf, wodurch eine rechtzeitige Diagnose von Lyme-Borreliose häufig erschwert wird. Grundsätzlich sollte bei jeder Manifestation von Lyme-Borreliose eine Antibiotika-Therapie durchgeführt werden. Der klinische Erfolg dieser Behandlung ist in frühen Infektionsstadien am besten. Bleibt eine rechtzeitige Erkennung und Behandlung der Krankheit aus, kann es zu chronischen Spätfolgen wie Lyme-Arthritis (Steere et al., 1987) und hochgradigen Hautentzündungen (Akrodermatitis chronica atrophicans) kommen (Asbrink & Hovmark, 1988).

### 1.1.1 OspA-Vakzine

In Anbetracht der schwierigen Behandlungsmöglichkeiten und der enormen gesundheitlichen Spätfolgen von Lyme-Borreliose ist es von großem Interesse, Präventivmaßnahmen gegen diese Krankheit durchzuführen. Für den nordamerikanischen Raum konnte in den 90er Jahren eine wirksame Impfung gegen Lyme-Borreliose etabliert werden. Die Hauptkomponente sowohl des Human-Impfstoffes (LYMERix) als auch des Tier-Impfstoffes (Recombitek Lyme) ist das in der äußeren Membran von *B. burgdorferi* lokalisierte Protein OspA (outer surface protein A). OspA erwies sich sowohl in Tierversuchen als auch in klinischen Studien am Menschen als gut verträglich und induzierte die Bildung protektiver Antikörper (Steere et al., 1998; Sigal et al., 1998; Erdile et al., 1993; Fikrig et al., 1992, 1990; Simon et al., 1991). Im Jahr 1998 erhielt der von der Firma SmithKline-Beecham entwickelte Impfstoff die Zulassung für den nordamerikanischen Raum. Nach erfolgreichem Einsatz wurde der Human-Impfstoff in einer Studie jedoch fälschlicherweise für das Auftreten einer Autoimmunerkrankung verantwortlich gemacht (Gross et al., 1998), wonach sich der Hersteller entschloss, das Präparat vom Markt zu nehmen. Der Tier-Impfstoff ist dagegen weiterhin erhältlich. Nach wie vor hat OspA ein hervorragendes Potenzial als Impfstoff und es werden derzeit Versuche unternommen, das potentiell autoreaktive Epitop zu entfernen und somit die Kritik bezüglich möglicher Nebenwirkungen des Impfstoffes zu entkräften (Willet et al., 2004). Im eurasischen Raum konnten diese OspA-Vakzine nicht eingesetzt werden, da die hier auftretenden Unterarten von *B. burgdorferi* eine signifikante Heterogenität innerhalb der OspA-Proteine aufweisen und somit nur ein teilweiser Schutz aufgebaut würde (Wilske et al., 1992; Barbour & Schrupf, 1986; Barbour et al., 1985).

### 1.1.2 Wirkmechanismus der OspA-Vakzine

Der Wirkmechanismus der OspA-Vakzine ist äußerst bemerkenswert, da der Erreger bereits im Darm der Zecken neutralisiert wird und der Wirt somit vor einer Übertragung geschützt ist. Während des Aufenthaltes im Zeckendarm bilden die Borrelien überwiegend das Oberflächenprotein OspA (Burkot et al., 1994). Dessen Genexpression wird nach Beginn der Blutmahlzeit der Zecken auf ein Minimum reduziert. Innerhalb von ca. 48 Stunden migrieren die Borrelien aus dem Darm der Zecken in den Säugetierwirt. In dieser neuen Umgebung beginnen sie mit der Bildung eines anderen Oberflächenproteins, OspC

---

(de Silva et al., 1996; Schwan et al., 1995). Aufgrund des Wechsels im Expressionsmuster der Oberflächenproteine A und C während einer Blutmahlzeit wurde vermutet, dass OspA im Darm der Zecke vorrangig eine Funktion zur Verankerung der Borrelien im Darmepithel ausübt, während OspC seine Funktion erst später im Wirt erfüllt (Pal et al., 2000). Befällt eine mit Borrelien infizierte Zecke einen mit OspA geimpften Wirt, gelangen die OspA-Antikörper während der Blutmahlzeit in den Darm der Zecke und die Borrelien können schon hier und somit außerhalb des Wirts neutralisiert werden.

### 1.1.3 OspA-Struktur

Essentiell für die immunogene Wirkung des OspA-Impfstoffes ist eine post-translationale Lipidmodifikation am N-Terminus des Proteins (Weis et al., 1994; Erdile et al., 1993). Dabei trägt das N-terminale Cystein über eine Thioetherbindung ein Dipalmitylglycerin und über eine Amidbindung einen Palmitylrest, woraus eine so genannte Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur resultiert (Abb. 1.1A; Bouchon et al., 1997; Wu et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass nur lipidiertes OspA eine starke Immunantwort sowohl in Tieren als auch in

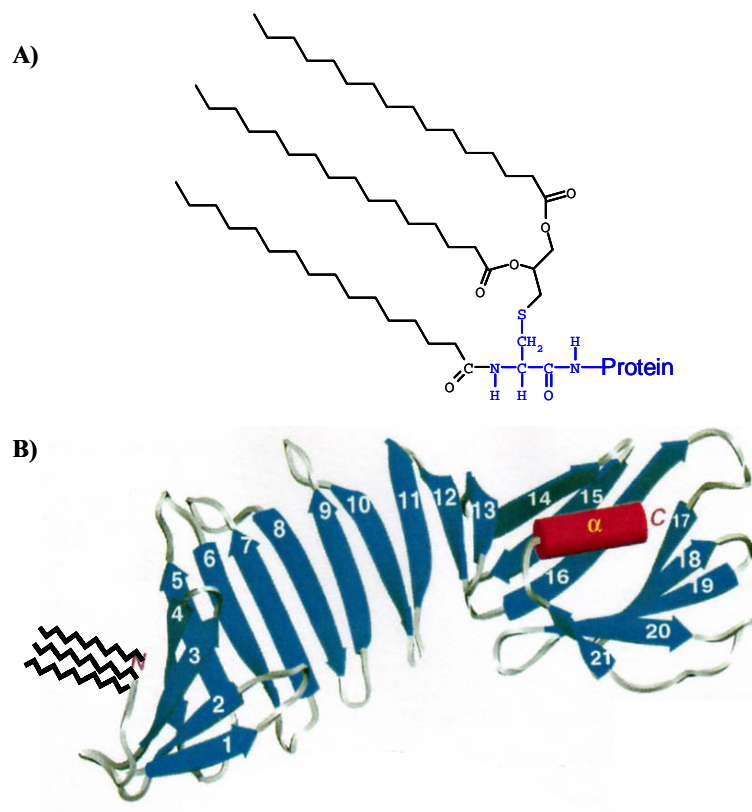


Abb. 1.1. A) Darstellung einer Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur. B) Schematische Darstellung des lipidierten OspA (verändert nach Li et al., 1997).

Menschen erzeugt, während hingegen mit nicht-lipidiertem OspA kein Immunschutz erlangt wurde (Weis et al., 1994; Erdile et al., 1993). Strukturelle Untersuchungen von OspA ergaben, dass das Protein überwiegend aus anti-parallelen  $\beta$ -Faltblättern besteht und zusätzlich eine am C-Terminus exponierte  $\alpha$ -Helix aufweist (Abb. 1.1B; Pham & Koide, 1998; Li et al., 1997). Immunologische Untersuchungen zeigten weiter, dass nicht die N-terminale Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur Ziel des protektiven LA-2-Antikörpers ist, sondern ein Epitop im C-terminalen Bereich (Luft et al., 2002; Sears et al., 1991; Schaible et al., 1990). In mehreren Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine an Peptide gekoppelte Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur eine starke immunstimulatorische Wirkung sowohl auf B-Zellen als auch auf T-Zellen ausübt (Defoort et al., 1992; Schild et al., 1991; Deres et al., 1989; Bessler et al., 1985). Daraus wurde geschlossen, dass die Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur des OspA die Funktion eines internen Adjuvants übernimmt.

## 1.2 Adjuvantien

Adjuvantien sind Substanzen, die die Immunogenität eines Antigens erhöhen (Kaufmann, 2004). Die meisten in Impfstoffen enthaltenen Antigene sind alleine nicht in der Lage das Immunsystem ausreichend zu stimulieren, so dass der Zusatz von Adjuvantien in den meisten Fällen unabdingbar ist. Die einzigen derzeit für Human-Impfstoffe zugelassenen Adjuvantien sind Aluminiumverbindungen ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ,  $\text{AlPO}_4$ ) und Calciumhydrogenphosphat ( $\text{CaHPO}_4$ ). Diese Impfstoffzusätze führen zu einer verzögerten Antigenfreisetzung und bewirken somit eine Art Depot-Effekt für das Antigen. Gleichzeitig bedingen sie eine verstärkte Aufnahme der Antigene durch Makrophagen. Dennoch zeigen diese Komponenten nur eine vergleichsweise schwache immunstimulatorische Wirkung (Gupta, 1998).

Eine weit stärkere Immunstimulation bewirken Bestandteile bakterieller Zellwände. Dazu zählen neben bakteriellen Lipopolysacchariden auch Lipoteichonsäuren, Glycolipide und Lipoproteine. Diese Komponenten werden unter dem Begriff „Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) zusammengefasst (Akira et al., 2001). Die Erkennung dieser PAMPs durch spezielle, sich an der Oberfläche zahlreicher Zellen befindender, Toll-ähnlicher Rezeptoren (Toll-like-receptors, TLR) führt zu einer schnellen Aktivierung der angeborenen Immunität. Dabei wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die schließlich zur Expression zahlreicher Cytokine und Chemokine und damit zur Initiierung von Abwehrreaktionen führt (Janeway & Medzhitov, 2002; Medzhitov, 2001).

---

### 1.3 Bakterielle Lipoproteine

Die für Lipoproteine gram-negativer Bakterien typische Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur (Abb. 1.1A) wird in einem dreistufigen Prozess synthetisiert (Sankaran & Wu, 1994). Unmodifizierte Prolipoproteine weisen ein Signalpeptid von ca. 16 bis 20 Aminosäuren auf, welches essentiell für die weitere Lipidmodifikation ist und sich durch mehrere Merkmale charakterisieren lässt (Dunn et al., 1990; Hayashi & Wu, 1990; Inouye et al., 1977): Es besitzt 1.) einen positiv geladenen N-Terminus, 2.) eine zentrale, hydrophobe Region aus ca. zehn Aminosäuren, 3.) eine Konsensus-Lipobox-Sequenz aus drei Aminosäuren im C-terminalen Bereich sowie 4.) ein konserviertes Cystein in Position +1 ([L, V, I]-[A, S, T, G]-[G, A]-C) (Hayashi & Wu, 1990). In einem ersten Schritt katalysiert das Enzym Phosphatidylglycerin:Prolipoprotein-Diacylglycerin-Transferase (Lgt) die Übertragung eines Diacylglycerins an das Cystein in Position +1 des Prolipoproteins, wobei eine Thioetherbindung ausgebildet wird (Abb. 1.2). Das resultierende Diacylglycerin-Prolipoprotein wird über einen Translokase-Komplex, bestehend aus den Komponenten SecY und SecE auf cytoplasmatischer Seite und den Komponenten SecD und SecF auf periplasmatischer Seite, unter Mithilfe der cytoplasmatischen ATPase SecA sowie unter Energieverbrauch über die Cytoplasmamembran transportiert (Haake, 2000, Hayashi & Wu 1990). Anschließend wird die N-terminale Signalsequenz durch die Signal-Peptidase II (Lsp) proteolytisch abgespalten, wodurch ein Apolipoprotein entsteht (Abb. 1.2). In einem dritten und letzten Schritt wird durch das Enzym Phospholipid:Apolipoprotein-Transacylase (Lnt) eine N-Acylierung an der freien Aminogruppe des Cysteins katalysiert. Endprodukt ist das modifizierte Lipoprotein mit einer Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur (Abb. 1.2; Sankaran & Wu, 1994).

Ein ähnlicher Modifikationsmechanismus wurde auch bei gram-positiven Bakterien beschrieben, hier wird jedoch lediglich ein Diacylglycerin an das Cystein in Position +1 gebunden. Nach proteolytischer Spaltung des Signalpeptides durch die Signal-Peptidase II resultiert ein mit einer Pam<sub>2</sub>Cys-Struktur modifiziertes Lipoprotein (Sutcliffe & Harrington, 2002; Sutcliffe & Russell, 1995).

Die Gene für die lipidmodifizierenden Enzyme Lgt, Lsp und Lnt wurden in zahlreichen prokaryotischen Organismen identifiziert (Leskelä et al., 1999; Prágai et al., 1997; Gan et al., 1995, 1993; Fraser et al., 1995; Yamagata et al., 1983). Durch Sequenzvergleiche konnten teilweise homologe Regionen zwischen den Genen verschiedener Organismen festgestellt werden (Prágai et al., 1997; Qi et al., 1995). Weiterhin stellte sich heraus, dass die Signalsequenzen untereinander austauschbar sind. So werden zum Beispiel die

---

kommerziell erhältlichen OspA-Vakzine mit der borrelien-spezifischen Signalsequenz in *E. coli* produziert und korrekt modifiziert (Steere et al., 1998).

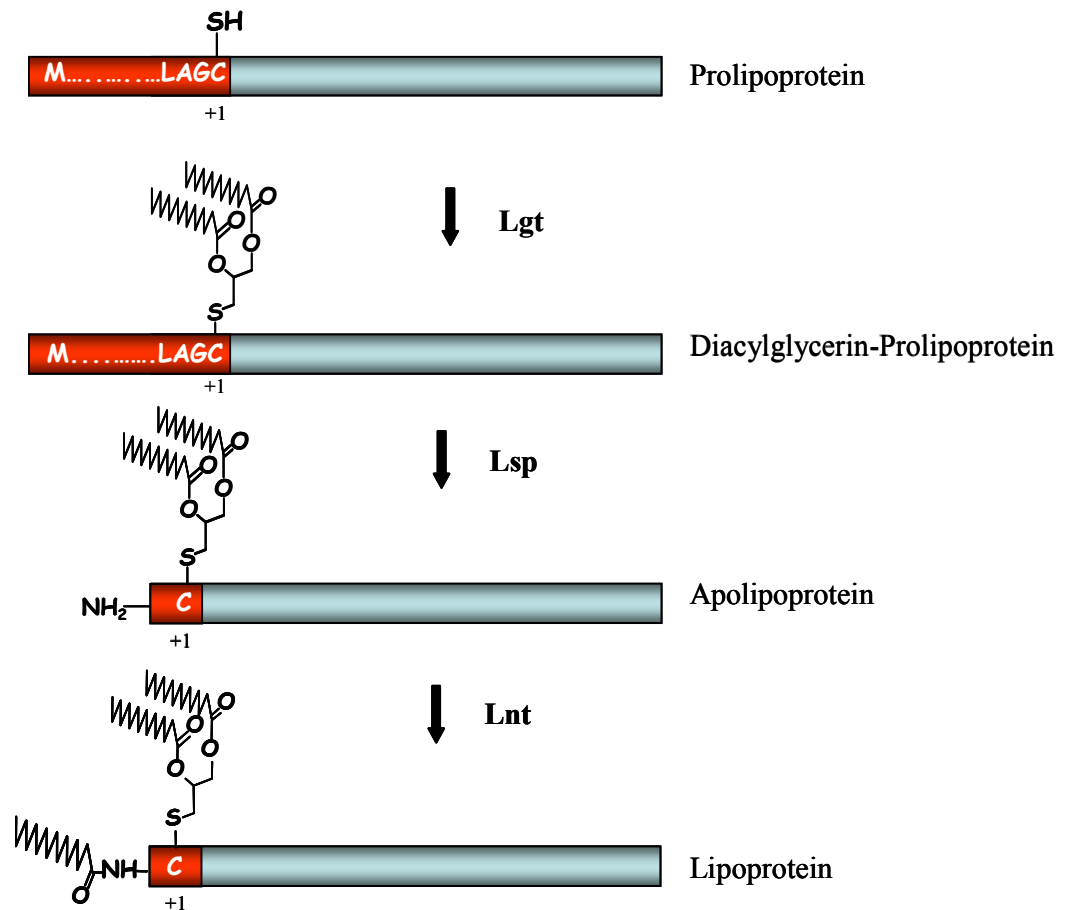


Abb. 1.2. Lipidierung bakterieller Proteine gram-negativer Bakterien am Beispiel des OspA. Erklärung siehe Text. Lgt: Phosphatidylglycerin:Prolipoprotein-Diacylglycerin-Transferase. Lsp: Signal-Peptidase II. Lnt: Phospholipid:Apolipoprotein-Transacylase.

## 1.4 Transgene Pflanzen als Bioreaktoren

Die Herstellung rekombinanter, therapeutischer Proteine (z.B. von Impfstoffen) in prokaryotischen und eukaryotischen Zellkultursystemen ist mit großem technischem und finanziellem Aufwand verbunden. Daher ist es notwendig, alternative Produktionssysteme und Darreichungsformen zu entwickeln. Seit einigen Jahren nehmen neben den herkömmlichen Fermentationstechniken auch transgene Pflanzen einen immer größeren



Stellenwert bei der Produktion therapeutischer Proteine ein, wobei ihre Verwendung einige Vorteile aufweist: Zum einen könnten durch herkömmliche landwirtschaftliche Methoden kostengünstig große Mengen an Pflanzenmaterial zur Anreicherung und Aufreinigung des gewünschten Proteins bereitgestellt werden. Darüber hinaus besteht kein Risiko der Verunreinigung des Produktes mit Humanpathogenen wie z.B. Viren. Zum anderen würde die Bereitstellung der pharmazeutischen Produkte in Form von Saatgut deren Einsatz in Ländern der Dritten Welt erleichtern, da der Anbau der transgenen Pflanzen in entsprechenden Klimaten direkt in der Nähe des Verbrauchers erfolgen könnte. Mit der Produktion des Antigens in essbaren Teilen der Pflanze wäre es darüber hinaus relativ leicht möglich, mit herkömmlichen lebensmitteltechnischen Methoden oral applizierbare Impfstoffe zu entwickeln (Warzecha & Mason, 2003; Mason et al., 2002; Walmsley & Arntzen, 2000). Damit würden Kosten für Aufreinigung und Sterilisierung des Antigens sowie für die ansonsten benötigten Spritzen und Kanülen entfallen. Vor allem für Entwicklungsländer, in denen die Seuchenprävention mittels Impfung durch mangelnde Infrastruktur und bedingt durch hohe Kosten bisher ein großes Problem darstellte, würden pflanzliche Impfstoffe eine wertvolle Alternative zu herkömmlichen Vakzinen bieten. Zahlreiche Studien der letzten Jahre haben bewiesen, dass in Pflanzen produzierte Vakzine sowohl nach parenteraler als auch nach oraler Verabreichung eine Immunantwort in Tieren und Menschen hervorrufen.

So gelang es, das Hepatitis B-Antigen (HBsAg) sowohl in Kartoffeln als auch in Tabak zu exprimieren. In immunologischen Untersuchungen erzeugten dabei parenteral verabreichte HBs-Antigene aus Tabakextrakten sowie oral verabreichte HBsAg-exprimierende Kartoffeln eine primäre Immunantwort in Mäusen (Richter et al., 2000; Mason et al., 1992). Neuere Studien am Menschen bestätigten das Potenzial von in Pflanzen produziertem HBsAg eindrücklich (Thanavala et al., 2005). Ferner wurde die Untereinheit B des hitzelablen Toxins (LT-B) von *E. coli* in Kartoffeln exprimiert. In ersten klinischen Studien am Menschen konnte auch hier die Auslösung einer primären Immunantwort gezeigt werden (Tacket et al., 1998). Selbst Capsidproteine des Norwalk-Virus und des Human Papillom-Virus lagerten sich nach ihrer Produktion in Pflanzen selbstständig zu virusartigen Partikeln zusammen. Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass diese in Pflanzen produzierten Viruspartikel immunogen wirkten (Huang et al., 2005; Warzecha et al., 2003; Mason et al., 1996). In Kartoffeln produzierte Capsidproteine des Norwalk-Virus induzierten nach oraler Verabreichung auch im Menschen eine Immunantwort (Tacket et al., 2000).

---

### 1.4.1 Zellkerntransformation

Um transgene Pflanzen für eine orale Immunisierung verwenden zu können, ist es notwendig, große Menge des jeweiligen Antigens in den zu verwendenden Pflanzenteilen wie Knollen, Samen oder Früchten zu akkumulieren. Dies begründet sich zum einen darin, dass für eine orale Immunisierung auf Grund des Abbaus bei der Magen-Darm-Passage eine ca. 1000-fach höhere Dosis erforderlich ist als bei einer parenteralen Immunisierung (De Aizpurura & Russell, 1988). Zum anderen sollte die für die jeweilige Dosis zu verabreichende Menge an Pflanzenmaterial in einem Rahmen liegen, der eine übliche Mahlzeit nicht übersteigt. Hier liegt eines der großen Probleme der Impfstoffproduktion in Pflanzen, da bei vielen Herstellungsmethoden die zu erreichende Menge an rekombinantem Protein limitiert ist.

Die meisten bislang beschriebenen, in Pflanzen produzierten therapeutischen Proteine wurden nach stabiler Integration des Transgens in das Kerngenom erhalten, wobei der Anteil an rekombinanten Proteinen ca. 0,001-0,5% des löslichen Gesamtproteins (LGP) betrug (Daniell et al., 2001; Kusnadi et al., 1997). Diese Werte liegen jedoch weit unterhalb derer, die durch herkömmliche mikrobielle Fermentationstechniken oder durch Zellkulturtechniken mit gängigen eukaryotischen Zellen (z.B. Säuger-, Insekten- oder Hefezellkulturen) erlangt werden können. Durch die Verwendung unterschiedlicher regulatorischer Elemente („Leadersequenzen“ und Polyadenylierungssignale) in den pflanzlichen Expressionsvektoren sowie durch die Bildung codon-optimierter synthetischer Gene war es möglich, die Expression der Transgene in Pflanzen zu erhöhen (Richter et al., 2000; Tuboly et al., 2000; Mason et al., 1998). Darüber hinaus wurde durch den Einsatz von Signalsequenzen eine gezielte Ablagerung des rekombinanten Proteins in Zellorganellen (z.B. im ER) erreicht, was zu erhöhter Stabilität innerhalb der Pflanzenzelle führte (Richter et al., 2000). Zusätzlich kann eine gewebsspezifische Expression von Transgenen eine höhere Stabilität des Fremdproteins zur Folge haben (Streatfield et al., 2002).

Nichtsdestotrotz konnte auch durch diese Optimierungen ein Maximum des Anteils an rekombinantem Protein von 1-2% am löslichen Gesamtprotein nicht überschritten werden.

---

### 1.4.2 Transiente Expression

Eine Alternative zur stabilen Kerntransformation in Pflanzen bieten transiente Expressionssysteme. Diese basieren auf rekombinanten Pflanzenviren, die neben den eigenen Genen zusätzlich das gewünschte Fremdgen tragen (Gleba et al., 2004; Koprowski & Yusibov, 2001; Scholthof et al., 1996). Die virale Expression führt zu einer wesentlich höheren Akkumulation des rekombinanten Proteins als nach einer stabilen Transformation des Kerngenoms. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist der geringere Zeitaufwand, da das Maximum der Proteinakkumulation schon nach 10-14 Tagen erreicht ist, während die Regeneration stabil transformierter Pflanzen mehrere Monate in Anspruch nimmt. Dennoch gibt es auch hier Einschränkungen. Transiente Systeme erwiesen sich teilweise als recht instabil und Transgene größer als 1 kb werden oft nicht korrekt exprimiert (Gleba et al., 2005).

Einen enormen Fortschritt konnte die Firma ICON Genetics mit ihrem transienten viralen Expressionssystem erzielen. Dieses System basiert darauf, dass sowohl ein virales Amplikon, bestehend aus zwei Fragmenten (5'- und 3'-Pro-Vektor-Modul), als auch ein Amplikon, das für eine Rekombinase codiert, in das Blattgewebe von *Nicotiana benthamiana* mittels *Agrobacterium tumefaciens* coinfiltriert werden. Die T-DNA-Fragmente werden zunächst in den Zellkern geleitet und unter Mitwirkung der Rekombinase zu einem transkribierbaren, funktionsfähigen Amplikon zusammengefügt. Nach erfolgter Transkription werden unerwünschte Elemente wie die Rekombinationsstellen durch Spleißen entfernt und die RNA kann ins Cytoplasma entlassen und dort translatiert werden. Durch die Coexpression viraler Movement-Proteine findet auch eine Verteilung des funktionsfähigen Virusgenoms innerhalb der Pflanze statt. Eine starke Expression der Transgene ist über einen Zeitraum von 12 Tagen hinweg zu beobachten. Mit diesem System ist es gelungen, eine Akkumulation eines rekombinanten Proteins von bis zu 80% des löslichen Gesamtproteins zu erreichen (Marillonnet et al., 2004). Innerhalb von wenigen Wochen ist es daher möglich, mehrere Milligramm oder Gramm an rekombinantem Protein zu gewinnen. Darüber hinaus können durch die Verwendung entsprechender Signalsequenzen die rekombinanten Proteine zu verschiedenen Kompartimenten innerhalb der Pflanzenzelle, wie ER, Golgi-Apparat oder Plastiden geleitet werden, wodurch manche Proteine eine höhere Stabilität erlangen (Marillonnet et al., 2004).

---

### 1.4.3 Plastidentransformation

Die Integration von Transgenen in das Plastidengenom stellt eine weitere Möglichkeit dar, eine hohe Akkumulation der rekombinanten Proteine in Pflanzen zu erreichen. Plastiden sind semiautonome Zellorganellen, die sich von Cyanobakterien herleiten und durch Endosymbiose in eine Eukaryotenzelle aufgenommen wurden. Im Zuge der Integration des Endosymbionten in den Wirtsorganismus erfuhr das Organellengenom durch Genverluste und Gentransfer in das Zellkerngenom eine enorme Größenreduktion (Martin & Hermann, 1998). Plastidengenome stellen zirkuläre, doppelsträngige Plasmide dar. Sie verfügen über eine durchschnittliche Größe von 120-190 kb und codieren für ca. 130 Gene (Bock, 2001). Jedes Plastid besitzt bis zu 100 identische Kopien seines Genoms, so dass in chloroplastenreichen Zelltypen (z.B. Mesophyllzellen) mehrere tausend identische Genom-Kopien vorliegen können.

Die stabile Transformation von Plastidengenomen gelang erstmals bei der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* und wurde durch eine ballistische Methode erzielt (Boynton et al., 1988; Sanford et al., 1987). In einer Weiterentwicklung dieser Technik wird hierbei die zu integrierende DNA an Goldpartikel präzipitiert. Die Goldpartikel werden dann durch einen Helium-Überdruck auf die sich im Vakuum befindlichen Zellen geschossen (Sanford et al., 1991). Ein Meilenstein dieser Technologie gelang Pal Maliga und seinen Mitarbeitern, indem sie diese Methode auch an Höheren Pflanzen (*Nicotiana tabacum*) durchführen konnten (Svab et al., 1990). Inzwischen konnte die Plastidentransformation auch an weiteren Vertretern der Familie Solanaceae wie Kartoffel (*Solanum tuberosum*) (Sidorov et al., 1999) und Tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Ruf et al., 2001) angewendet werden. Vor kurzem ist es ebenfalls gelungen, Plastidengenome von Sojabohnen (*Glycine max*) (Dufourmantel et al., 2001), Karotten (*Daucus carota*) (Kumar et al., 2004) und einigen anderen Pflanzen zu transformieren (Daniell et al., 2005a).

Die Plastidentransformation bietet entscheidende Vorteile gegenüber der Transformation des Zellkerns (Maliga, 2004, 2002; Daniell, 2002; Bock, 2001). Durch den hohen Ploidiegrad des Plastoms wird eine extrem hohe Akkumulation des rekombinanten Proteins ermöglicht. So wurde zum Beispiel für das humane Somatotropin nach einer Plastidentransformation in Tabak eine Akkumulation von 7% des löslichen Gesamtproteins (LGP) erreicht. Mit der Integration des Somatotropin-Gens in das Kerngenom konnte hingegen nur eine Akkumulation von <0,01% des LGP erzielt werden (Staub et al., 2000). Damit vergleichbar führte auch die Expression der Untereinheit B des hitzelablen (LT-B) *E. coli*-Enterotoxins nach Plastidentransformation in Tabak zu einer Akkumulation von

---

3,7% des LGP, während nach einer Integration in das Kerngenom nur ein Gehalt von 0,001-0.01% des LGP erreicht wurde (Kang et al., 2004; Mason et al., 1998; Haq et al., 1995).

Neben dem hohen Ploidiegrad verfügen Plastiden auf Grund ihrer prokaryotischen Herkunft über eine Transkriptions-/Translations-Maschinerie, die zahlreiche Eigenschaften prokaryotischer Organismen konserviert hat. 1.) Die Genorganisation in Operons bietet die Möglichkeit, mehrere Transgene unter der Kontrolle eines Promotors einzubringen. 2.) Chloroplasten besitzen in ihrem Stroma andere Proteinabbaumechanismen als im Cytoplasma, was zu einer größeren Stabilität vieler Proteine führen kann (Adams & Stern, 1990). 3.) Während bei einer Transformation des Kerngenoms die Expression des Transgens von dessen jeweiligem Einbauort auf den Chromosomen abhängt und dieser nicht steuerbar ist, kann bei einer Plastidentransformation der Integrationsort genau bestimmt werden. Die Transgene werden durch doppelte homologe Rekombination gezielt an einem bestimmten Locus in das Plastidengenom eingefügt. Dies setzt voraus, dass die zu integrierende Expressionskassette beidseitig von homologen Sequenzen des Plastidengenoms flankiert ist (Kavanag et al., 1999; Staub & Maliga, 1992). Der Vorteil besteht darin, dass es bei einer Plastidentransformation zu keinerlei Positionseffekten kommen kann, wie sie bei Kerntransformationen oft beschrieben wurden (Gelvin, 2003). Ein weiterer Vorteil liegt in der maternalen Vererbung des Plastoms. Eine Verbreitung der Transgene durch Pollen ist dadurch weitgehend ausgeschlossen, was hinsichtlich des Anbaus transgener Pflanzen im Freiland von enormer Bedeutung ist.

Ferner hat sich gezeigt, dass Plastiden auch in der Lage sind, post-translationale Modifikationen durchzuführen. So werden zum Beispiel Disulfidbrücken in Proteinen ausgebildet, allerdings in einer von *E. coli* abweichenden Weise (Staub et al., 2000). Glykosylierungen, deren Art entscheidend ist für die Wirkung und Verträglichkeit vieler therapeutischer Proteine, konnten in Plastiden bislang noch nicht nachgewiesen werden (Tregoning et al., 2003). Daher ist zu vermuten, dass Chloroplasten offensichtlich eine Mittelstellung zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Expressionssystemen einnehmen. Demzufolge ist bei der Wahl des Expressionsortes innerhalb der Pflanze (Kern- oder Plastidenexpression) darauf zu achten, welche Modifikationen an rekombinantem Protein für dessen korrekte Funktion durchgeführt werden müssen (Gomord & Faye, 2004).

---

## 1.5 Palmitylierung von Proteinen in eukaryotischen Zellen

Post-translationale Modifikationen wie Glykosylierung, Phosphorylierung, proteolytische Spaltungen und Lipidierung regulieren die Lokalisation und die Aktivität zahlreicher Proteine. Im Bezug auf therapeutisch verwertbare Produkte sind diese Modifikation, wie z.B. die Lipidmodifikation bakterieller Proteine, häufig essentiell für deren Wirkung und Verträglichkeit (Weis et al., 1994; Erdile et al., 1993).

Neben der Lipidierung bakterieller Proteine wurden auch vier Hauptformen der Lipidmodifikation in eukaryotischen Systemen beschrieben: 1.) Eine cotranslationale, irreversible, N-terminale Myristylierung cytosolischer Proteine. 2.) Die Modifikation von Plasmamembranproteinen mit einem Glykosylphosphatidyl-Inositol-Anker (GPI). 3.) Eine C-terminale Isoprenylierung von cytosolischen Proteinen und 4.) schließlich die häufigste und vielseitigste Modifikation, die post-translationale Palmitylierung sowohl von integralen als auch von peripheren Membranproteinen (Smotrys & Linder, 2004; Bijlmakers & Marsch, 2003).

Bei der post-translationalen Palmitylierung kann zwischen N-, O- und S-Palmitylierung unterschieden werden. Die N-Palmitylierung wurde zuerst bei dem Signalprotein Sonic hedgehog beschrieben, wo eine Palmitinsäure an das N-terminale Cystein durch eine Amidbindung angebracht wird (Pepinsky et al., 1998). Bei der O-Palmitylierung werden über Esterbindungen Palmitinsäuren an die OH-Gruppen der Aminosäuren Threonin oder Serin gebunden (Branton et al., 1993). Bei der häufigsten Form der Palmitylierung schließlich, der S-Palmitylierung, findet eine Veresterung der Palmitinsäure über die SH-Gruppe (Thioester) von Cystein statt (Linder & Deschenes, 2003). Diese kann dabei sowohl an N-terminalen als auch an internen Cysteinen erfolgen. Die an diesem reversiblen Palmitylierungsprozess beteiligten Enzyme sind Palmityl-Acyl-Transferasen (PATs) und Thioesterasen. PAT-Aktivität wurde zunächst in Plasmamembranen von Rattenlebern lokalisiert (Dunphy et al., 1996). Darüber hinaus konnten PATs sowohl in humanen Erythrozyten (Das et al., 1997) als auch in Hefen identifiziert und charakterisiert werden (Lobo et al., 2002; Roth et al., 2002). Für die Palmitylierung durch PATs werden zahlreiche Sequenzmotive beschrieben (Smotrys & Linder, 2004), eine eindeutige Palmitylierungs-Konsensussequenz konnte aber bislang nur für Mitglieder der Kv1-Ionenkanal-Familie identifiziert werden (Gubitosi-Klug et al., 2005).

Über Palmitylierungsprozesse in Pflanzen hingegen ist bisher nur sehr wenig bekannt. Bei den bislang beschriebenen Beispielen handelte es sich ausnahmslos um eine direkte Bindung der Palmitinsäure über eine Thioesterbindung an Cystein (Martín & Busconi,

2000; Thompson & Okuyama, 2000) oder um einen Glykosylphosphatidyl-Inositol-Anker (GPI) am C-Terminus (Borner et al., 2003). Darüber hinaus konnte von Mattoo & Edelman (1987) gezeigt werden, dass das plastidäre D1-Protein, eine Komponente des Photosystems II, einer dynamischen Palmitoylierung in Chloroplasten unterliegt. Über den dieser Modifikation zu Grunde liegenden Mechanismus sowie über die Natur der Verknüpfung und der daran beteiligten katalysierenden Enzyme ist jedoch nichts bekannt.

## 1.6 Fragestellung

Für zahlreiche therapeutische Proteine (z.B. Impfstoffe) besteht weltweit ein sehr hoher Bedarf. Um diesen decken zu können, muss deren Produktion in ertragreichen Expressionssystemen heterolog verlaufen. Da viele rekombinante Arzneistoffe für ihre Wirkung oder Stabilität eine post-translationale Modifikation (z.B. Lipidierung) benötigen, sollte diese im gewählten Expressionssystem durchführbar sein. So wird beispielsweise das bakterielle Lipoprotein OspA aus *Borrelia burgdorferi* zur Prävention von Lyme-Borreliose eingesetzt und wird in *E. coli* heterolog exprimiert. Die post-translationale Lipidierung von OspA, wodurch der N-Terminus mit einer Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur versehen wird, wird in *E. coli* unter Mitwirkung dreier Enzyme (Lgt, Lsp und Lnt) korrekt durchgeführt (Sankaran & Wu, 1994).

Neben prokaryotischen und eukaryotischen Zellkultursystemen bieten auch Pflanzen eine attraktive Alternative zur Herstellung therapeutischer Proteine. Da jedoch über post-translationale Lipidierungsmechanismen in Pflanzen bislang nur sehr wenig bekannt ist, sollte im Rahmen dieser Dissertation das bakterielle Lipoproteine OspA in Tabakpflanzen produziert und auf Lipidierung untersucht werden. Als Expressionsort für das bakterielle *ospA*-Gen wurden zunächst Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana gewählt.

- 1.) Es sollte untersucht werden, inwieweit Chloroplasten aufgrund ihres prokaryotischen Ursprungs in der Lage sind, rekombinantes OspA zu produzieren und Palmitoylierungen an den vorgegebenen Stellen im Protein vorzunehmen. Untersuchungen an Mäusen sollten zeigen, inwieweit das erhaltene rpOspA (rekombinate, plastidäre OspA) immunogen ist.
  - 2.) Weiterhin sollten die Auswirkungen einer Integration der bakteriellen Gene (*lgt*, *lsp*, *lnt*) in das Chloroplastengenom untersucht und die Effekte der daraus resultierenden Enzyme auf die Modifikation von rpOspA geprüft werden. Dazu sollten mehrere
-

Operon-Varianten kloniert werden, die neben dem bakteriellen *ospA*-Gen auch eines oder mehrere der drei bakteriellen Gene (*lgt*, *lsp*, *lnt*) tragen.

- 3.) Um darüber hinaus mögliche Unterschiede zwischen der Prozessierung von rekombinantem OspA in Chloroplasten und im Cytoplasma zu untersuchen, sollte das bakterielle *ospA*-Gen in das Kerngenom von *N. tabacum* integriert werden.

Das vorliegende Projekt sollte somit sowohl der Entwicklung eines pflanzlichen Expressionssystems zur Gewinnung eines Lipoprotein-Impfstoffes als auch dem besseren Verständnis der chloroplastidären Proteinmodifikation dienen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial

Die handelsüblichen Chemikalien wurden in der entsprechenden Reinheit von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt), Merk (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen).

#### Spezielle Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid 37%	AppliChem (Darmstadt)
Agarose	AppliChem (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Amplify-Lösung	Amersham Biosciences (Freiburg)
Bacto-Trypton	AppliChem (Darmstadt)
Bacto-Agar	AppliChem (Darmstadt)
Blockierungsreagenz	Roche Diagnostics (Mannheim)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
2-Bromohexadecanoic acid (2-Bromopalmitat)	Sigma (Deisenhofen)
Cellulase R10	Duchefa (Haarlem, NL)
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	AppliChem (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blau R250	Fluka (Neu-Ulm)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	AppliChem (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merk (Darmstadt)
Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt)
Glycerin 99,5%, wasserfrei	AppliChem (Darmstadt)
Hefeextrakt	AppliChem (Darmstadt)
Imidazol	AppliChem (Darmstadt)
Macerozyme R10	Duchefa (Haarlem, NL)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merk (Darmstadt)
Murashige & Skoog (MS) Salze	Duchefa (Haarlem, NL)
Myo-Inositol	Merk (Darmstadt)
PMSF	Sigma (Deisenhofen)

---

---

Rubidiumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
N-Lauroylsarcosine	Sigma (Deisenhofen)
SDS	AppliChem (Darmstadt)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Triton X-114	AppliChem (Darmstadt)
TRIzol	AppliChem (Darmstadt)

### **Antibiotika**

Ampicillin	AppliChem (Darmstadt)
Gentamycin	AppliChem (Darmstadt)
Globomycin	Sankyo (Japan)
Kanamycin	AppliChem (Darmstadt)
Timentin	Duchefa (Haarlem, NL)
Spectinomycin	Duchefa (Haarlem, NL)

### **Enzyme und entsprechende Puffer**

CIA-Phosphatase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Klenow-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Mung-Bean-Nuklease	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>T4</i> -DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

### **Pflanzenhormone**

6-Benzylaminopurin (BAP)	Duchefa (Haarlem, NL)
1-Naphtylessigsäure (NAA)	Duchefa (Haarlem, NL)

### **Proteinmarker**

Pre-stained Proteinmarker	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
SeeBlue Pre-stained	Invitrogen (Karlsruhe)

---

**Antikörper**

Anti-OspA M492912	Fitzgerald (Concord, USA)
Ziege anti-Maus-HRP-konjugiert	Sigma (Deisenhofen)

**Säulenmaterial für die Proteinreinigung**

<i>MagneHis™ Protein Purification System</i>	Promega (Mannheim)
Nickel-Sepharose, Probond	Invitrogen (Karlsruhe)

**Andere Reagenzien, Materialien und Kits**

<i>BCA Protein Assay Reagent Kit</i>	Pierce (Perbio) (Rockford)
Desoxynucleotide	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA-Leiter 1kb	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
FUJI-Medical X-Ray Film	Fuji (Japan)
Goldpartikel (Micron Gold 0,6µm)	BioRad (München)
Hybridisierungslösung <i>DIG Easy Hyb</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
Hyperfilm™ MP	Amersham Biosciences (Freiburg)
<i>Immunoprecipitation Kit Seize® X</i>	Pierce (Perbio, Rockford, USA)
Microcon	Millipore Corporation (Bedford, USA)
Macrocarrier	BioRad (München)
NuPAGE-Gel 12,5%	Invitrogen (Karlsruhe)
Nylonmembran	Schleicher & Schuell (Dassel)
[ <sup>3</sup> H] markierte Palmitinsäure	Hartmann (Braunschweig)
<i>PCR DIG Probe Synthesis Kit</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
Percoll	Sigma (Deisenhofen)
<i>pGEM®-T-easyVektor</i>	Promega (Mannheim)
PVDF-Membran	Amersham Biosciences (Freiburg)
<i>QIAfilter™ Plasmid Midi Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>QIAquick Gel Extraction Kit,</i>	Qiagen (Hilden)
<i>RNA-Mini plant Isolation Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Roche DIG Labeling Kit</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
Rupture disc	BioRad (München)

SimlyBlue Staining	Invitrogen (Karlsruhe)
West Pico-Chemiluminescent Substrat	Pierce (Perbio, Rockford, USA)

### **Laborgeräte**

Agarose-Gel-Dokumentation	LTF M/WL 312 nm, Kamera: CCD XC-ST-50 Mitsubishi video copy processor P67E
Gene gun	BioRad PDS-1000/He Biolistic
Hybridisierungsöfen	Unitherm 6/12
PCR-Geräte	PCRExpress, Thermo Hybaid (Ulm)
Schwingmühle	Retsch MM 301
Spektrophotometer	Pharmacia Biotech Gene Quant
Ultra-Turrax	Ika-Werke T 25 basic
Ultra-Zentrifuge	Kontron, Centrikon T-1080 (Rotor TFT 65.38.)
SDS-Minigel-Apparaturen	Amersham, Freiburg; Peqlab (Erlangen)
Western -Blot Apparatur	Peqlab (Erlangen)
Zentrifugen	Eppendorf Tischzentrifuge 5414, Eppendorf-Kühlzentrifuge 5417 R und 5804 (Hamburg)

## **2.2 Pflanzenmaterial**

Für die stabile Transformation sowohl von Chloroplasten- als auch von Kerngenomen wurden *Nicotiana tabacum* cv. Petit-Havana-Pflanzen verwendet. Die nach einer Transformation erhaltenen Kalluskulturen wurden bei 26°C unter Dauerlicht kultiviert. Homoplastische Chloroplastentransformanten und Kerntransformanten wurden anschließend im Gewächshaus des Julius-von-Sachs-Institutes bei 22°C Tages- und 16°C Nacht-Temperatur kultiviert. Die Beleuchtungszeit betrug 12 Stunden.

Zur Oberflächensterilisation von Tabaksamen wurden diese für 20 min in einer 1,5%igen (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung, die mit 0,1% Tween 20 versetzt war, inkubiert.

Anschließend wurden die Samen dreimal mit sterilem Wasser gewaschen, um restliches Natriumhypochlorit zu entfernen, und auf MS-Agarplatten bei 26°C unter Dauerlicht kultiviert.

Für die transiente virale Expression von pICH10990ospA und pICH10990OT wurden *Nicotiana benthamina*-Pflanzen verwendet, die ebenfalls im Gewächshaus des Julius-von-Sachs-Institutes kultiviert wurden (s.o.).

## 2.3 Bakterienstämme

### *Escherichia coli* Top 10 (Invitrogen, Karlsruhe)

*E. coli* Top 10 wurden für die Klonierungsarbeiten verwendet. Die Kultivierung von *E. coli*-Bakterien erfolgte entweder in LB-Flüssigmedium im Wasserbadschüttler bei 37°C und 250 rpm oder auf LB-Agarplatten bei 37°C im Wärmeschrank.

### *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101

Mit *A. tumefaciens* GV 3101 wurden sowohl die stabile Kerntransformation von *N. tabacum* als auch die Infiltration (Inokulation) von *N. benthamiana*-Blättern für die transiente Expression durchgeführt. Die Kultivierung von *A. tumefaciens* erfolgte entweder in LB-Flüssigmedium im Wasserbadschüttler bei 28°C und 250 rpm oder auf LB-Agarplatten bei 28°C im Wärmeschrank.

## 2.4 Plasmide

### pGEM-T-easy (Promega, Mannheim)

Dieser linearisierter Klonierungsvektor wurde zur Subklonierung von PCR-Produkten verwendet. Er weist eine Größe von 3015 bp auf und trägt an den 3'-Enden jeweils einen Thymidin-Überhang. Diese sind mit den von der *Taq*-Polymerase erzeugten Adenin-Überhängen kompatibel.

---

### pJS25uidA (P. Maliga)

Der für die Subklonierung der Chloroplastenexpressionsgene verwendete Vektor pJS25uidA (5630 bp) enthält das *uidA*-Gen aus *E. coli*, das mit den regulatorischen Elementen 5'-*psbA*-UTR und 3'-*psbA*-UTR flankiert ist (Staub & Maliga, 1993). Die zu exprimierenden Gene werden durch die Subklonierung mit den entsprechenden regulatorischen Elementen versehen. Zur Selektion positiver Klone trägt dieser Vektor ein Ampicillinresistenz-Gen.

### pNT1 (P. Maliga)

Der Chloroplastenexpressionsvektor pNT1 hat eine Größe von 7163 bp. Die Expressionskassette ist von einem 827 bp großen Bereich des *rbcL*-Gens und einem 1347 bp großen Bereich des *accD*-Gens aus *N. tabacum* flankiert, die den Einbau der Kassette durch doppelte homologe Rekombination in das Chloroplastengenom gewährleisten sollen. Innerhalb der Expressionskassette ist das *aadA* Gen aus *E. coli* unter der Kontrolle des 16S rRNA-Promoters (*Prn*) enthalten. Die zu exprimierenden Transgene wurden hinter dem *aadA*-Gen in den Vektor inseriert.

### pPS1

Für die stabile Kerntransformation von *N. tabacum* wurde der Vektor pPS1 (12554 bp), ein Abkömmling des Vektors pGPTV-Kan, eingesetzt (Becker et al., 1992).

### Genmaterial

Das *ospA*-Gen (822 bp) von *Borrelia burgdorferi* (B31) wurde von Prof. Yung-Fu Chan zur Verfügung gestellt (Cornell University, Ithaca, NY, USA; Chan et al., 1993).

## 2.5 Nährmedien

### Bakterienmedien

**LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):** 10 g/l Bacto-Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
10 g/l NaCl  
pH 7,0  
für Festmedium 15 g/l Bacto-Agar

---

<b>Agrobakterien-Testplatten:</b>	10 g/l Lactose
	1 g/l Hefeextrakt
	20 g/l Bacto-Agar

### Pflanzenmedien

<b>MS-Medium:</b>	4,3 g/l MS-Salze
	30 g/l Saccharose
	0,1 g/l Myo-Inositol
	1 ml/l B5 Vitamine
	pH 5,7 ± 0,3
	7 g/l Phyto-Agar

<b>RMOP Medium:</b>	4,3 g/l MS-Salze
	30 g/l Saccharose
	0,1 g/l Myo-Inositol
	1 ml/l BAP (100mg/ml)
	0,1 ml/l NAA (100 mg/ml)
	pH 5,8 ± 0,3
	7g/l Phyto-Agar

<b>Antibiotika-Stocklösungen:</b>		<b>Endkonzentration</b>
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Gentamycin	25 mg/ml	25 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Spectinomycin	200 mg/ml	500 µg/ml für Pflanzen; 200 µg/ml für Bakterien
Timentin	160 mg/ml	160 µg/ml

Alle Medien wurden für 30 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Die nicht autoklavierbaren Komponenten, wie die verwendeten Antibiotika, wurden vor der Zugabe zum Medium sterilfiltriert.

---

## 2.6 Pufferlösungen

Die folgenden Puffer wurden meistens in zehnfacher Konzentration (10×) angesetzt und autoklaviert (30 min, 121°C, 2 bar) oder sterilfiltriert. Der jeweilige pH-Wert wurde mit NaOH oder HCl eingestellt.

**Tab. 2.1 Puffer-Zusammensetzung**

<b>Puffer</b>	<b>Bestandteile (1×)</b>	<b>pH</b>
<b>FA</b>	20 mM MOPS 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA	7,0
<b>NaPi</b>	1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,5
<b>PBS</b>	23 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 17 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM NaCl	7,4
<b>SSC</b>	150 mM NaCl 15 mM Natriumcitrat	7,0
<b>TAE</b>	40 mM Tris-Acetat 1mM EDTA	
<b>TE</b>	10 mM Tris-HCl 1mM EDTA	7,4
<b>TfB1</b>	100 mM Rubidiumchlorid 50 mM MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O 15 % Glycerin	5,8
<b>TfB2</b>	10 mM MOPS 10 mM Rubidiumchlorid 75 mM CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O 15% Glycerin	6,8



## 2.7 Methoden zur Herstellung rekombinater Plasmide

### 2.7.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die PCR-Methode angewandt (Mullis & Falcon, 1987). Als Matrize (Template) wurden je nach Aufgabenstellung sowohl Plasmid-DNA als auch genomische DNA aus Pflanzen eingesetzt. Durch die Verwendung entsprechend modifizierter Primer war es möglich, Restriktionsschnittstellen in die entstehenden PCR-Produkte einzufügen. Als thermostabile DNA-Polymerase wurden sowohl *Taq*- (*Thermus aquaticus*) als auch *Pfu*-DNA-Polymerase (*Pyrococcus furiosus*) verwendet. Letztere verfügt im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität zur Korrektur falsch eingebauter Nukleotide.

#### Ansatz mit *Taq*-Polymerase (V = 20µl)

Template	10-100 ng
<i>Taq</i> -Puffer	1×
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dNTP- Mix	0,2 mM
Primer 1	0,15 pmol
Primer 2	0,15 pmol
<i>Taq</i> -Polymerase	1-2 U
steriles H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

#### Ansatz mit *Pfu*-Polymerase (V = 50µl)

Template	10-100 ng
<i>Pfu</i> -Puffer	1×
dNTP- Mix	0,2 mM
Primer 1	0,15 pmol
Primer 2	0,15 pmol
<i>Pfu</i> -Polymerase	1-2 U
steriles H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

#### Amplifizierungs-Programm:

Erstmalige Denaturierung	5 min	95°C	
Denaturierung	45 s	95°C	
Annealing	45 s	48-57°C	30 Zyklen
Polymerisation	55 s-2 min	72°C	
Einmalige finale Amplifizierung	10 min	72°C	

Durch die Verwendung eines Thermocyclers mit beheiztem Deckel konnte auf die Überschichtung mit Mineralöl verzichtet werden.

**Tab. 2.2 Primer zur Herstellung von PCR-Fragmenten für die Klonierung**  
CE= Chloroplastenexpression; ZE = Zellkernexpression

Größe (bp)	Primernamen	Primerkombination 5'→3'	Restriktions- schnittstelle
<b>Trps 16</b> (149)	5'- <i>Trps16XbaI</i> 3'- <i>Trps1HindIII</i>	CCT AAT CTA GAG AAA TTC AAT TAA GGA AGA ACA CAA GCT TCA ATG GAA GCA ATG	<i>XbaI</i> <i>HindIII</i>
<b>3'-psbA</b> (230)	5'- <i>psbA3'-UTR</i> 3'- <i>psbA3'-UTR</i>	AAT CTA GAC CTA GTC TAT AGG AGG TTT TG ATT TCA AAG CTT AAA CAA ATA CAA AAT C	<i>XbaI</i> <i>HindIII</i>
<b>ot</b> (777) CE	5'- <i>ot</i> 3'- <i>ospAXbaI</i>	CAT GTG CAA GCA AAA TGT TAG TAG CAG C GGC TTC TAG ATT ATT TTA AAG CG	---- <i>XbaI</i>
<b>ospA</b> (822) ZE	5'- <i>ospAXbaI</i> 3'- <i>ospASacI</i>	ATT TCT AGA ATG AAA AAA TAT TTA TTG GG GAT TCG CGA GCT CTT ATT TTA AAG CG	<i>XbaI</i> <i>SacI</i>
<b>ot</b> (777) ZE	5'- <i>otXbaI</i> 3'- <i>otSacI</i>	CCT TCT AGA ATG TGC AAG CAA AAT GTT AGC AAG C TCG CGA GCT CTT ATT TTA AAG CG	<i>XbaI</i> <i>SacI</i>
<b>ICON</b> <b>ospA</b> (822)	5'- <i>ospABsaI</i> 3'- <i>ospAXbaI</i>	TTT GGT CTC AAG GTA TGA AAA AAT ATT TAT TGG G TCT AGA TTA GTG ATG GTC ATG GTG ATG ACG CTC	<i>BsaI</i> <i>XbaI</i>
<b>ICON</b> <b>ot</b> (777)	5'- <i>otBsaI</i> 3'- <i>otXbaI</i>	TTT GGT CTC AAG GTA TGT TAA GCT AAA TG TCT AGA TTA GTG ATG GTC ATG GTG ATG ACG CTC	<i>BsaI</i> <i>XbaI</i>

**Tab 2.3 Primerkombinationen zur Identifizierung transgener Pflanzen**  
CE= Chloroplastenexpression; ZE = Zellkernexpression

nachzuweisendes Gen (bp)	Primernamen	Primerkombination 5'→3'
<b>psbA</b> (wt 1174)	5'- <i>psbA</i> 3'- <i>psbA</i>	TAG AAA ACT AGT GTG CTT GGG ATT TCA AAG CTT AAA CAA ATA CAA AAT C
<b>ospA</b> (822)CE	5'- <i>ospA</i> 3'- <i>ospAXbaI</i>	CAT GAA AAA ATA TTT ATT GGG GAT AGG GGC TTC TAG ATT ATT TTA AAG CG'
<b>ot</b> (777) CE	5'- <i>ot</i> 3'- <i>ospAXbaI</i>	CAT GTG CAA GCA AAA TGT TAG CAG C GGC TTC TAG ATT ATT TTA AAG CG
<b>ospA</b> (822) ZE	5'- <i>ospAXbaI</i> 3'- <i>ospASacI</i>	ATT TCT AGA ATG AAA AAA TAT TTA TTG GG GAT TCG CGA GCT CTT ATT TTA AAG CG
<b>ot</b> (777) ZE	5'- <i>otXbaI</i> 3'- <i>otSacI</i>	CCT TCT AGA ATG TGC AAG CAA AAT GTT AGC AAG C TCG CGA GCT CTT ATT TTA AAG CG

### 2.7.2 *Taq*-Polymerase-Behandlung von mit *Pfu* produzierten PCR-Produkten und deren Klonierung

Die mit *Pfu*-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte weisen keine 3'-Adenin-Überhänge auf. Die PCR-Produkte müssen daher vor der Ligation mit dem pGEM-T-easy-Vektor mit der *Taq*-Polymerase und dATP behandelt werden, wodurch sie 3'-Adenin-Überhänge erhalten. Um restliche Pufferkomponenten und Salze, die die *Taq*-Behandlung stören könnten zu entfernen, wurden die PCR-Produkte zuvor mittels des *QIAquick Gel Extraction Kits* entsprechend dem Protokoll des Herstellers gereinigt.

#### Reaktionsansatz:

PCR-Produkt (Säuleneluat)	30 µl
10× <i>Taq</i> -Puffer	4 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3,2 µl
2,5 mM dATP	1,6 µl
steriles H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 72°C inkubiert. Im Anschluss daran folgte erneut eine Reinigung der DNA-Fragmente über *QIAquick*-Säulen. Anschließend konnten die Fragmente mit dem linearisierten pGEM-T-easy-Vektor entsprechend der Anleitung des Herstellers ligiert werden.

### 2.7.3 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen

Bakterielle Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische, meist palindromische DNA-Sequenzmotive von 4 bis 10 bp und können diese innerhalb des Erkennungsmotivs oder in einem Abstand von einigen Basenpaaren hydrolysieren. Die dabei entstehenden Schnittstellen können je nach Spezifität der Endonuklease glatte oder überhängende Enden aufweisen.

#### Reaktionsansatz:

DNA	0,5-10 µg
Restriktionsenzym	1-2 U/µg
10× Reaktionspuffer	2-3 µl
steriles H <sub>2</sub> O	ad 20-30 µl

---

Die Inkubation der Enzymsätze erfolgte im Temperaturoptimum der jeweiligen Enzyme über 2-3 Stunden oder über Nacht.

#### *Partielle Restriktion*

Beim mehrfachen Vorkommen einer Schnittstelle innerhalb einer DNA-Sequenz kann die Tatsache genutzt werden, dass bei geringer Konzentration an Restriktionsenzym und kurzen Reaktionszeiten nicht alle möglichen Schnittstellen innerhalb der DNA erkannt und gespalten werden. Für einen partiellen Restriktionsverdau wurden daher die DNA-Sequenzen zunächst mit dem Enzym, das nur einmal schneidet, linearisiert und die Lösung anschließend auf zehn Reaktionsgefäße aufgeteilt. Jedes Gefäß wurde dann mit je 1 µl des Enzyms, für das mehrere Schnittstellen in der DNA enthalten waren, versetzt und unterschiedlich lange inkubiert (0 min (ohne Zugabe des Enzyms) und 1-40 min mit je 4-5 min Differenz). Gestoppt wurden die Reaktionen durch Inkubation der Gefäße bei 80°C für 20 min.

#### **2.7.4 Auffüllen von 3'-recessiven DNA-Enden mittels Klenow-Polymerase**

Die Klenow-Polymerase ist das große Fragment der DNA-Polymerase I. Sie besitzt noch die 5'→3'-Polymeraseaktivität sowie die 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Durch die Polymeraseaktivität können daher Mononukleotide an 3'-OH Enden angefügt werden und somit 3'-recessive DNA-Enden in glatte Enden überführt werden.

##### Reaktionsansatz:

DNA	1-3 µg
2,5 mM dNTP	1 µl
Klenow-Polymerase	1 U/µg DNA
10× Klenow-Puffer	1-3 µl
steriles H <sub>2</sub> O	ad 20-30 µl

Der Ansatz wurde für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA entweder durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt (Kap. 2.7.7), die gewünschten Banden ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (Kap. 2.7.8) oder der Ansatz wurde direkt über eine *QIAquick*-Säule gereinigt und für eine weitere Behandlungen wie unter Kapitel 2.7.6 beschrieben verwendet.

### 2.7.5 Behandlung von DNA mit Mung-Bean-Nuklease

Mung-Bean-Nuklease baut einzelsträngige DNA ab. Dafür wurde die DNA nach einem Restriktionsverdau zunächst über eine *QIAquick*-Säule gereinigt und anschließend mit der Mung-Bean-Nuklease behandelt.

#### Reaktionsansatz:

DNA (Säuleneluat)	27 $\mu$ l
Mung-Bean-Nuklease	1 U/ $\mu$ g DNA
10 $\times$ Mung-Bean-Nuklease-Puffer	4 $\mu$ l
steriles H <sub>2</sub> O	ad 40 $\mu$ l

Das Gemisch wurde für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation des Gefäßes bei 80°C für 20 min gestoppt.

### 2.7.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation von linearisierter Vektor-DNA ohne Einbau des gewünschten DNA-Fragments bei einer Ligation mit glatten Enden zu verhindern, wurde die Vektor-DNA mit CIA-Phosphatase behandelt. Diese Phosphatase entfernt die endständige 5'-Phosphatgruppe. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert.

#### Reaktionsansatz:

DNA	1-3 $\mu$ g
10 $\times$ CIAP-Puffer	2-5 $\mu$ l
CIAP	1 U/ $\mu$ g DNA
steriles H <sub>2</sub> O	ad 20-50 $\mu$ l

### 2.7.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Fragmentgröße wurden 0,7-1,5%ige (w/v in TAE-Puffer) Gele verwendet. Diese wurden mit je 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l Ethidiumbromid versetzt, um nach Abschluss der Elektrophorese die DNA-Banden unter UV-Licht (312 nm) zu lokalisieren. Zur Erhöhung der Dichte der Proben und zur Markierung der Lauffront wurden die DNA-Proben mit 1/5 Volumen 6 $\times$  DNA-Probenpuffer versetzt. Als Elektrophoresepuffer diente 1 $\times$  TAE-Puffer, in dem die mit den

---

DNA-Proben beladenen Gele bei einer Spannung zwischen 80 und 110 V für etwa 1-1,5 h belassen wurden. Anschließend konnte die Auftrennung unter UV-Licht dokumentiert werden.

**50× TAE (Tris-Acetat):** 2 M Tris-Base; 5,7% (v/v) Eisessig; 50 mM EDTA

**6× DNA-Probenpuffer:** 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 30% Glycerin

### 2.7.8 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Im Anschluss an die elektrophoretische Trennung wurden die gewünschten DNA-Banden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* entsprechend der Anleitung des Herstellers aus der Gelmatrix isoliert.

### 2.7.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase verwendet, welche die freien 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA kovalent verbindet. Dabei können sowohl kohäsive als auch glatte Enden verknüpft werden.

#### Reaktionsansatz:

linearisierte Vektor-DNA	0,2 µg
Insert-DNA	0,5-1 µg
T4 DNA-Ligase	1 U/µg DNA
10× Ligase-Puffer	2 µl
steriles H <sub>2</sub> O	ad 20µl

Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Ligation wurde entweder für 2 Stunden bei RT oder für 12 Stunden bei 16°C inkubiert. Im Anschluss daran wurden 10 µl davon zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

---

### 2.7.10 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Durch diese Methode sollte die Fähigkeit von Bakterien, freie DNA aufzunehmen, erhöht werden. Dies wird durch die Modifikation der Zellwand durch  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{RbCl}$  erreicht.

Es wurden 3 ml LB-Medium mit einer *E. coli*-Kolonie inokuliert und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde 1 ml in 100 ml LB-Medium überführt und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

Die Bakterien, die sich nun in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden zunächst für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend durch Zentrifugation bei  $3000\times g$  für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  geerntet. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 15 ml eiskaltem Tfb1-Puffer resuspendiert, für weitere 90 min auf Eis inkubiert und dann bei  $3000\times g$  für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 4 ml kaltem Tfb2-Puffer aufgenommen, in 50  $\mu\text{l}$ -Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

**Tfb1-Puffer:** 100 mM  $\text{RbCl}$ ; 50 mM  $\text{MnCl}_2$ ; 30 mM  $\text{KOAc}$ ; 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1-5% Glycerin; pH 5,8

**Tfb2-Puffer:** 10 mM  $\text{MOPS}$ ; 10 mM  $\text{RbCl}$ ; 75 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 15% Glycerin, pH 6,8 einzustellen mit  $\text{KOH}$

### 2.7.11 Transformation von Bakterien

Zur Transformation kompetenter Bakterien wurden 50  $\mu\text{l}$ -Aliquots auf Eis aufgetaut, mit 10  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes (Kap. 2.7.9) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Plasmide erfolgte durch einen Hitzeschock bei  $42^\circ\text{C}$  für 90 s. Anschließend wurde der Ansatz 5 min auf Eis abgekühlt und dann mit 500  $\mu\text{l}$  LB-Medium versetzt. Zur Regeneration der Zellen folgte eine Inkubation für 45 min bei  $37^\circ\text{C}$  auf einem Schüttler bei 500 rpm. Die Zellsuspension konnte im Anschluss daran auf Selektionsplatten ausgebracht werden. Die Kultivierung transformierter Bakterien erfolgte für 12-16 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  im Wärmeschrank.

---

### 2.7.12 Identifizierung transformierter Bakterien „Colony screen“

Zur Identifizierung transformierter Bakterien wurde eine PCR durchgeführt. Dafür mussten einzelne Bakterienkolonien, die auf den Selektionsplatten über Nacht gewachsen waren, in je 25 µl sterilem Wasser aufgenommen werden. 10 µl davon dienten als Matrize für die folgende PCR. Die verwendeten Primerpaare waren abhängig davon, welches Konstrukt/Transgen untersucht wurde (Tab. 2.2 und 2.3). Die restlichen 15 µl der Bakteriensuspension konnten nach Identifizierung eines positiven Klons direkt zum Animpfen von Selektionsmedium verwendet werden.

#### Reaktionsansatz:

Template	10 µl Bakteriensuspension
<i>Taq</i> -Puffer	1×
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dNTP- Mix	0,2 mM
Primer 1	0,15 pmol
Primer 2	0,15 pmol
<i>Taq</i> -Polymerase	1-2 U
steriles H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

#### Amplifizierungs-Programm:

Erstmalige Denaturierung	5 min	95°C	
Denaturierung	1 min	95°C	
Annealing	1 min	48-57°C	30 Zyklen
Polymerisation	55 s-2 min	72°C	
Einmalige finale Amplifizierung	10 min	72°C	

### 2.7.13 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde die Methode der alkalischen Lyse angewendet. Diese basiert auf dem Prinzip, dass chromosomale DNA in basischem Milieu denaturiert und durch anschließende pH-Absenkung ausfällt, während „supercoiled“ vorliegende Plasmid-DNA stabil bleibt oder sich wieder renaturieren kann.



Dafür wurden 2 ml einer 3 ml-Übernachtskultur bei  $11000\times g$  pelletiert, der Überstand sorgfältig entnommen und der Rückstand in 250  $\mu\text{l}$  Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  Lösung 2 wurde das Reaktionsgefäß 4-5-mal invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die chromosomale DNA sowie Zellfragmente mit 250  $\mu\text{l}$  Lösung 3 für 10 min auf Eis ausgefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei  $20000\times g$  wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und daraus die Plasmid-DNA mit 600  $\mu\text{l}$  Isopropanol präzipitiert. Um restliche Salze zu entfernen, wurde das Pellet anschließend mit 1 ml 70%igem EtOH gewaschen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 25  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen.

**Lösung 1:** 50 mM Glucose, 25 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100  $\mu\text{g/ml}$  RNase

**Lösung 2:** 0,2 M NaOH, 1% SDS

**Lösung 3:** 3 M Kaliumacetat

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA ( $>20 \mu\text{g}$ ) wurde der *QIAfilter<sup>TM</sup> Plasmid Midi Kit* (Qiagen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

### 2.7.14 Herstellung von Glycerinkulturen

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden 500  $\mu\text{l}$  einer frischen Flüssigkultur mit 800  $\mu\text{l}$  einer 50%igen sterilen Glycerinlösung versetzt, gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.7.15 Quantifizierung von DNA bzw. RNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen kann durch photometrische Messung bei 260 nm bestimmt werden. Die Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger RNA.

Die Quantifizierung isolierter Plasmid-DNA, genomischer DNA oder Gesamt-RNA wurde in einer 1:100 Verdünnung an einem entsprechenden Spektrophotometer durchgeführt.

---

### 2.7.16 Sequenzierung von DNA-Sequenzen

Die Sequenzierung von DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) am Lehrstuhl für Botanik I, Julius-von-Sachs-Institut (Würzburg) mit einem Li-COR DNA-Sequencer 4200 (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) durchgeführt.

**Tab 2.4 Primer zur Sequenzierung von DNA-Sequenzen innerhalb von Klonierungsvektoren**

Primernamen	Primersequenz 5' → 3'
<i>T7 ht</i>	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
<i>SP6ht</i>	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC
<i>M13 for</i>	GTA AAA CGA CGG CCA GT
<i>M13 rev</i>	AAC AGC TAT GAC CAT G

### 2.7.17 „Annealing-Reaktion“ von antiparallelen Oligonukleotiden

**Tab 2.5 Nukleotidsequenz der Oligonukleotide für die „Annealing-Reaktion“**

Name	Primersequenz 5' → 3'
<i>5'-His</i>	C ATG GAG CGT CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA T
<i>3'-His</i>	TCT AGA TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG AGC CTC

Reaktionsansatz:

<i>5'-His</i>	2,5 µl
<i>3'-His</i>	2,5 µl
10× Annealing-Puffer	2 µl
steriles H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend sehr langsam abgekühlt. In dieser Zeit fand die Basenpaarung der beiden antiparallelen Stränge statt.

**Annealing-Puffer (10×):** 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 M NaCl

## 2.8. Methoden zur Identifizierung transgener Pflanzen

### 2.8.1 Gewinnung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial (CTAB-Methode)

Für die Untersuchung transgener Pflanzenlinien mittels PCR sowie für DNA-Blot-Analysen wurde genomische DNA aus Pflanzenmaterial mit der CTAB- (Cetyltrimethylammoniumbromid) Methode nach Rogers & Bendich (1985) isoliert. Dafür wurden je 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren und mit 750 µl DNA-Extraktionspuffer und 750 µl Chloroform versetzt. Nach Zugabe zweier Keramikugeln wurden die Proben in einer Schwingmühle für 2 min bei maximaler Frequenz homogenisiert. Im Anschluss daran folgte eine Inkubation der Proben im Wasserbad für 45 min bei 65°C. Nach Zentrifugation bei 7600× g für 10 min wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese wurde zum Fällern genomischer DNA mit 700 µl Isopropanol versetzt und für 15 min bei 7600× g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde anschließend mit 1 ml 70%igem EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

**DNA-Extraktionspuffer:** 1% Sacrosyl; 0,8 M NaCl; 0,022 M EDTA; 0,22 M Tris-HCl, pH 7,8; 0,8% CTAB; 0,14 M Mannitol

Direkt vor der Verwendung des Extraktionspuffers wurden diesem 14 µl β-Mercaptoethanol pro 10 ml Extraktionspuffer zugegeben.

### 2.8.2 Gesamt-RNA-Präparation aus Pflanzenmaterial

Die Isolation von RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte sowohl mit dem TRIzol-Reagenz als auch mit dem *RNA-Mini plant Isolation Kit*.

#### *RNA-Präparation mit der TRIzol-Methode*

Zur Präparation der Gesamt-RNA wurden 100 mg Blattmaterial der jeweiligen transgenen Pflanzen in flüssigem Stickstoff gefroren und mit 1 ml TRIzol-Reagenz versetzt. Nach Zugabe zweier Keramikugeln wurden die Proben in einer Schwingmühle für 2 min bei 30 Hz homogenisiert. Anschließend folgte eine Inkubation der Proben bei Raumtemperatur für 5 min. Die Suspension wurde dann mit 200 µl Chloroform versetzt und für 15 s ausgeschüttelt. Nach einem weiteren fünf-minütigen Inkubationsschritt bei Raumtemperatur wurde

---

das Gemisch bei 4°C für 15 min bei 12000× g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, erneut mit Chloroform (500 µl) extrahiert und zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die RNA aus der oberen Phase mit 700 µl Iso-propanol bei 4°C für 10 min bei 12000× g gefällt. Das Pellet wurde dann mit 1 ml 70%igem EtOH gewaschen, getrocknet, in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und für 10 min bei 60°C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA-Lösung bei -80°C gelagert.

**DEPC-H<sub>2</sub>O:** wurde entsprechend der Anleitung in Sambrook et al. (1989) hergestellt.

#### *RNA-Präparation mit dem RNMini plant Isolation Kit*

Bei der Verwendung des *RNMini plant Isolation Kit* wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers vorgegangen.

### **2.8.3 Denaturierende Agarosegele zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA**

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden denaturierende 1-1,2%ige (w/v in 1x FA Puffer, 2% Formaldehyd) Agarosegele verwendet. Alle Geräte, die mit den RNA-Proben in Berührung kamen, mussten vor ihrem Gebrauch von RNase-Kontaminationen befreit werden. Dies erfolgte durch mehrstündiges Einlegen der Geräte in eine 3%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung. Alle Puffer wurden mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt. Jeweils 3 µg Gesamt-RNA wurden mit ¼ Volumen 5× RNA-Probenpuffer versetzt, für 5 min auf 65°C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt und dann auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V für ca. 1-1,5 Stunden in 1× FA-Laufpuffer.

**1× FA-Laufpuffer:** 20 mM MOPS; 5 mM NaAc; 1 mM EDTA

**5× RNA-Probenpuffer:** 40% (v/v) 10x FA Puffer; 30,8% (v/v) Formamid; 20% (v/v) Glycerin; 7,2% (v/v) Formaldehyd; 0,8% (v/v) EDTA; 0,16% (v/v) Bromphenolblau-Lösung

**DEPC-H<sub>2</sub>O:** wurde entsprechend der Anleitung in Sambrook et al. (1989) hergestellt.

---

### 2.8.4 DNA-Transfer (Southern-Blot)

Das so genannte „Southern-Blotting“-Verfahren wird zur Untersuchung von Restriktionsfragmenten genomischer DNA verwendet. Dabei wird denaturierte DNA mit Hilfe einer diffundierenden Salzlösung durch Kapillarkräfte aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert. Für einen DNA-Transfer wurden jeweils 2 µg genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* für mindestens 14 Stunden bei 37°C hydrolysiert.

#### Reaktionsansatz:

Gesamt-DNA	2 µg
Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	2 µl (50 U/µl)
10× Reaktionspuffer	3 µl
steriles H <sub>2</sub> O	ad 30 µl

Anschließend wurden die entstandenen Fragmente auf einem 0,7%igem Agarosegel (Kap. 2.7.7) aufgetrennt. Zur Auftrennung der DNA in Einzelstränge wurde das Gel für 30 min in Denaturierungslösung inkubiert, anschließend für 2×30 min in Neutralisationslösung neutralisiert und dann in Transferpuffer für 10 min equilibriert.

Im Anschluss daran wurde das Gel auf ein in 10× SSC getränktes Blotting-Papier gelegt, dessen überhängende Enden in eine mit 10× SSC gefüllte Wanne ragten. Auf das Gel wurde eine Transfermembran und darauf zwei Schichten Filterpapier gelegt. Den Abschluss bildete eine ca. 10 cm hohe Schicht aus saugfähigem Papier. Diese gesamte Anordnung wurde mit einem Gewicht (ca. 1 kg) beschwert. Nach einer Transferzeit von ca. 20 Stunden wurde die DNA durch zweistündiges Trocknen bei 80°C an der Membran fixiert.

**Denaturierungslösung:** 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH

**Neutralisierungslösung:** 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4

**Transferpuffer:** 10× SSC (1,5 M NaCl; 0,15 M Natriumcitrat)

### 2.8.5 RNA-Transfer (Northern-Blot)

Die „Northern-Blot-Analyse“ diente dem Nachweis spezifischer mRNA. Damit kann die Expression bestimmter Gene auf der Ebene der Transkription semiquantitativ und qualitativ nachgewiesen werden. Der Transfer von RNA auf Nylonmembranen erfolgt aus denaturierenden Agarosegelen (Kap. 2.8.3), als Transferpuffer diente 25 mM Natrium-Phosphat-Puffer

---

(NaPi, pH 6,5). Der Aufbau des RNA-Kapillarblots war identisch mit dem des DNA-Blots (Kap. 2.8.4). Die Transferzeit betrug auch hier ca. 20 Stunden. Nach einer anschließenden Fixierung der RNA auf die Membran (durch zweistündiges Trocknen bei 80°C) konnte die RNA durch Methylenblau gefärbt und dokumentiert werden.

**Transferpuffer:** 25 mM NaPi, pH 6,5

**RNA-Färbelösung:** 0,3 M NaAc, pH 5,2; 0,25% Methylenblau

### 2.8.6 Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin

Die *DIG*-11-dUTP-markierten Sonden für die Detektion nach DNA-(Southern) und RNA-(Northern) Blots wurden mit dem *PCR DIG Probe Synthesis Kit*, entsprechend dem Protokoll des Herstellers hergestellt. Als Matrize für die PCR dienten jeweils die Plasmide, welche die zu detektierenden Transgene enthielten.

**Tab. 2.6 Primerkombinationen zur Herstellung von DNA-Sonden zur Charakterisierung der transgenen Pflanzen**

DNA-Sonde (bp)	Primernamen	Primerkombination 5'→3'
<i>rbcL</i> (687)	5'- <i>rbcL</i> Sonde 3'- <i>rbcL</i> Sonde	CCT GAA GAA GCA GGG GCC GCG G TAG TAT TTG CGG TGA ATCCCC CCG
<i>ospA</i> (822)	5'- <i>ospA</i> 3'- <i>ospA</i> <i>XbaI</i>	CAT GAA AAA ATA TTT ATT GGG GAT AGG GGC TTC TAG ATT ATT TTA AAG CG
<i>lgt</i> (877)	5'- <i>lgt</i> 3'- <i>lgt</i>	TCC ATG GCC AGT AGC TAT ATG CAT CAG GAT CCG GAA ACG TGT TGC TGT G
<i>lsp</i> (496)	5'- <i>lsp</i> 3'- <i>lsp</i>	TCC ATG GGT CAA TCG ATC TGT TCA AAG GAT CCT TGT TTT TTC GCT CTA GAA GG
<i>lnt</i> (1539)	5'- <i>lnt</i> 3'- <i>lnt</i>	ATG CAT GCC TTT TGC CTC ATT AAT TGA A TCG GAT CCT TTA CGT CGC TGA CGC AGA CT

### 2.8.7 Hybridisierung mit *DIG-11-dUTP*-markierten Sonden

Die Membran mit fixierter DNA oder RNA wurde zunächst für 2 Stunden in 10 ml Prähybridisierungslösung bei 42°C (DNA) bzw. 50°C (RNA) im Hybridisierungssofen vorhybridisiert. Anschließend erfolgte bei gleicher Temperatur über Nacht die Hybridisierung mit der zuvor denaturierten Sonde (5 min, 95°C). Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal in Waschlösung I für je 15 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler gewaschen. Im Anschluss daran folgten drei weitere Waschschrte mit Waschlösung II für je 15 min bei 62°C (DNA) bzw. 68°C (RNA) im Hybridisierungssofen. Anschließend wurde die Membran für 5 min in *DIG*-Waschpuffer equilibriert und für 1 Stunde mit *DIG*-Blockierungslösung bei Raumtemperatur im Hybridisierungssofen blockiert. Nach erfolgter Blockierung wurde 1 µl des AP-konjugierten anti-*DIG* Fab-Fragments zur Lösung hinzugegeben und die Membran für weitere 30 min im Hybridisierungssofen belassen. Ungebundenes Fab-Fragment wurde durch zwei Waschschrte mit *DIG*-Waschpuffer für je 15 min bei Raumtemperatur entfernt. Nach einer Inkubation der Membran in *DIG*-Detektionspuffer für 5 min wurde diese auf eine Folie gelegt und mit einer 1:1000 Mischung aus *CDP*-Star und *DIG*-Detektionspuffer für weitere 5 min inkubiert. Die Detektion erfolgte in der Dunkelkammer mit Röntgenfilmen. Die Expositionszeit war abhängig von der Signalstärke und variierte von 1 min bis zu mehreren Stunden.

**Prä-/Hybridisierungslösung:** *DIG Easy Hyb* (Roche)

**Waschlösung I:** 2× SSC-Puffer; 0,1% SDS

**Waschlösung II:** 0,5× SSC; 0,1% SDS

**10× Maleinsäure-Puffer:** 1 M Maleinsäure, pH 7,5; 1,5 M NaCl

**1× *DIG*-Waschpuffer:** 1× Maleinsäure-Puffer, 0,3% (v/v) Tween 20

**20× SSC:** 3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat; pH 7,0 wurde mit HCl eingestellt

***DIG*-Blockierungslösung:** 1× Maleinsäure-Puffer; 10% (w/v) *Blocking Reagent*

**10× *DIG*-Detektionspuffer:** 1 M Tris-HCl, pH 9.5; 1 M NaCl

---

## 2.9 Proteinbiochemische Methoden

### 2.9.1 Proteinextraktion

Für die Extraktion von Proteinen wurden 100-200 mg unter flüssigem Stickstoff gemörseretes Pflanzenmaterial mit jeweils 100-200 µl Proteinextraktionspuffer versetzt und für 20 min unter gelegentlichem Mischen auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C für 20 min bei 20000× g. Um restliche feste Bestandteile zu entfernen, wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und nochmals unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Im Anschluss daran konnte der Überstand für Gesamtproteinbestimmungen, SDS-PAGE sowie für Immuno-Blot-Analysen eingesetzt werden.

**Proteinextraktionspuffer:** 1× PBS; 1 mM PMSF; 0,5% Triton X-114

**10× PBS:** 0,23 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,17 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 M NaCl, pH 7,4

### 2.9.2 Bestimmung des Proteingehalts

Aufgrund der Verwendung von Detergenzien im Extraktionspuffer wurde die Gesamtprotein-Bestimmung mit dem *BCA Protein Assay Reagent Kit* der Firma Pierce entsprechend der Anleitung durchgeführt. Die Proteinextrakte der verwendeten Pflanzenlinien wurden in zwei unterschiedlichen Verdünnungen (1:1; 1:2) getestet. Von jeder Verdünnung wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

### 2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Bestimmung des Molekulargewichts sowie zur Prüfung der Homogenität und Reinheit von Proteinlösungen diente die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Deren Trennprinzip basiert auf unterschiedlichen Molekülgrößen (Shapiro et al., 1967). Dabei wirken die Poren des SDS-Polyacrylamidgels wie ein Molekularsieb. Die Porengröße hängt vom Mischungsverhältnis der beiden monomeren Komponenten (Acrylamid und Bisacrylamid) ab und wird nach der molaren Masse der zu trennenden Proteine ausgewählt. In dieser Arbeit wurden 12,5%ige Gele verwendet. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat, SDS) lagert sich dabei an die Proteine an und hebt Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen auf. Da mit zunehmender

---



Proteingröße mehr SDS angelagert wird, nimmt die Ladung proportional mit der Molekülgröße zu. Gleichzeitig werden reduzierend wirkende Thiolverbindungen zugegeben, die Disulfidbrücken aufspalten. Proteinkomplexe zerfallen dabei in die einzelnen Komponenten.

Die Trenngele wurden ein bis drei Tage vor der Verwendung hergestellt und mit Trenngelüberschichtungslösung bei 4°C gelagert. Dadurch sollte gewährleistet sein, dass die monomeren Komponenten gut auspolymerisiert sind und somit eine bessere Auftrennung der Proteine erhalten wird. Die Sammelgele wurden ca. 1 Stunde vor Gebrauch gegossen.

Die Proteinproben wurden vor der Auftragung auf das Gel mit 2× Protein-Probenpuffer versetzt und für 10 min auf 95°C erhitzt. Je nach Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurden bis zu 20 µl Proteinlösung in die Probentaschen pipettiert.

#### 12,5%iges Trenngel

3,2 ml Acrylamid-Stammlösung  
1,9 ml 1,5 M Trenngelpuffer pH 8,8  
75 ml 10% (v/v) SDS  
2,4 ml H<sub>2</sub>O  
75 µl 10% APS-Lösung  
5 µl TEMED

#### Sammelgel

0,88 ml Acrylamid-Stammlösung  
1,66 ml Sammelgelpuffer pH 6,8  
66 µl 10% (v/v) SDS  
4,06 ml H<sub>2</sub>O  
33,4 µl 10% APS-Lösung  
5 µl TEMED

**Acrylamid-Stammlösung:** 29,2% (w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) *N,N*-Methylenbisacrylamid

**Trenngelpuffer :** 1,5 M Tris, pH 8,8

**Trenngelüberschichtungslösung:** 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8; 10% SDS

**Sammelgelpuffer:** 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

**Laufpuffer:** 25mM Tris, pH 8,3; 192 mM Glycin; 0,1% (v/v) SDS

**2× Protein-Probenpuffer:** 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 20% (v/v) Glycerin; 4% (v/v) SDS;  
0,02% (w/v) Bromphenolblau

## 2.9.4 Färbung von Polyacrylamidgelen

### *Coomassie Brilliant Blau-Färbung*

Für die Färbung von Proteinen in SDS-Gelen wurde Coomassie Brilliant Blau R250 verwendet. Der Farbstoff bindet nicht-kovalent an die Aminosäurereste der Proteine, die Nachweisgrenze liegt bei dieser Methode bei 200-400 ng Protein pro Bande.

Zur Färbung wurden die Polyacrylamidgele über Nacht bei Raumtemperatur in Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Die anschließende Entfärbung wurde in Entfärbelösung für ca. 1-2 Stunden durchgeführt.

**Färbelösung:** 0,02% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250; 50% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure

**Entfärbelösung:** 50% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure

### 2.9.5 Transfer von Proteinen und Immunodetektion (Immuno-Blot)

Der Immuno-Blot dient der spezifischen Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen. Dabei werden Proteingemische in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert und somit immobilisiert. Der Nachweis des Proteins erfolgt mittels Immunodetektion.

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden nach dem „*Tank-Blotting*“-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Dabei wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran gelangen.

Zu diesem Zweck wurde das Trenngel vom Sammelgel abgelöst und für 5 min in Transferpuffer equilibriert. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 30 s in Methanol gegeben, kurz mit H<sub>2</sub>O gespült und ebenfalls für 5 min in Transferpuffer equilibriert. Im Anschluss daran wurde die PVDF-Membran auf das Trenngel gelegt und dann zwischen zwei Filterpapieren in eine Peqlab-Nassblotkammer gegeben. Der Transfer der Proteine wurde in Transferpuffer bei einer Spannung von 100 V und einer maximalen Stromstärke von 320 mA durchgeführt. Freie Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran wurden durch Inkubation in Blockierungs-lösung bei 4°C über Nacht abgedeckt. Am nächsten Tag folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in einer 1:10000 Verdünnung in PBS/Tween für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran viermal für 15 min in PBS/Tween gewaschen und dann mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper in einer Verdünnung 1:20000 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vier weiteren Waschsritten in PBS/Tween für je 15 min konnte die Membran mit West Pico-Chemiluminescent Substrat entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Pierce) behandelt werden. Die Detektion erfolgte in der Dunkelkammer mit Röntgenfilmen (Fuji-Medical X-Ray Film) die zwischen 1 min und mehreren Stunden exponiert und anschließend entwickelt wurden.

---

**Primäre Antikörper:** anti-OspA-Antikörper, M492912

**Sekundärer Antikörper:** Ziege-anti-Maus, HRP-konjugiert.

**1× PBS/Tween:** 1× PBS (23 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 17 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; 0,1% (v/v) 0,05% Tween 20)

**Transferpuffer:** 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol

**Blockierungslösung:** 5% (w/v) Magermilchpulver; 1× PBS/Tween

### 2.9.6 Reinigung von rekombinantem OspAhis

Zur Reinigung des rekombinanten OspAhis aus Pflanzenmaterial wurden zwei aufeinander folgende Metallaffinitäts-Chromatographie-Verfahren durchgeführt. Dabei komplexierte das mit sechs Histidinresten versehene, rekombinante OspAhis zunächst mit den Nickelionen des Trägermaterials. Dieser Komplex konnte nach Auswaschen nicht gebundener Proteine durch einen entsprechenden Kompetitor (Imidazol) wieder aufgehoben werden.

#### *Aufreinigung*

Zur Aufreinigung des OspAhis wurde ein Proteinrohextrakt aus 5 g Blattmaterial hergestellt. Dafür wurde das pulverisierte Blattmaterial mit 30 ml Lysispuffer versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 20000× g. Der Überstand wurde über zwei Lagen Miracloth<sup>®</sup> filtriert. Um restliche feste Bestandteile zu entfernen, wurde der Durchfluss ein weiteres Mal für 20 min bei 4°C und 20000× g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Die Nickel-Sepharose wurde vor Gebrauch mit Lysispuffer äquilibriert. Anschließend wurde das Säulenmaterial zum Proteinrohextrakt gegeben und eine Stunde rotierend bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend auf eine Säule gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule viermal mit je 3 ml Waschpuffer A gewaschen. Im Anschluss daran wurde das gebundene Protein in drei Elutionsschritten mit je 3 ml Elutionpuffer von der Säule eluiert.

**Lysispuffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 0,5 % (v/v) Triton X-114

**Waschpuffer A:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 0,5 % (v/v) Triton X-114

**Elutionspuffer:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 300 mM Imidazol; 0,5 % (v/v) Triton X-

### *Triton X-114-Phasentrennung*

Für die Phasentrennung wurden die gewonnenen Eluate für 30 min bei 37°C im Heizblock oder im Wasserbad inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 30°C für 10 min bei 20000× g erhielt man eine Detergenz- (unten) und eine wässrige (oben) Phase. Die obere, wässrige Phase wurde verworfen, während die Detergenz-Phase, in der sich das gereinigte OspAHis befand, für die zweite Metallaffinitäts-Chromatographie verwendet wurde.

### *Entfernung von Triton X-114 und Imidazol*

Durch die zweite Affinitäts-Chromatographie sollte sowohl das Detergenz Triton X-114 als auch Imidazol entfernt werden, da diese Substanzen bei späteren analytischen Untersuchungen des gereinigten OspAHis stören würden. Dieser Reinigungsschritt wurde mit *MagneHis™ Protein Purification System* (Promega) durchgeführt. Nach einer Bestimmung des Gesamtvolumens der Triton X-114-Phase wurde diese mit 100 mM HEPES 1:25 verdünnt. Dadurch sollte sowohl die Imidazol- als auch die Triton X-114-Konzentration verringert werden.

Diese Suspension wurde mit ca. 100-200 µl *MagneHis™ Ni-Particles* versetzt, für 20 min unter wiederholtem Agitieren auf Eis inkubiert. *MagneHis™ Ni-Particles* sind Magnetpartikel, die über einen Adapter mit Nickelionen komplexiert sind. Somit konnte das zuvor gereinigte OspAHis während der Inkubationszeit wieder einen Komplex mit den Nickelionen bilden. Anschließend wurden durch das Anbringen eines Magnetfeldes die Magnetpartikel inklusive des gebundenen OspA an der Gefäßwand zurückgehalten und die Flüssigkeit konnte entnommen werden. Daraufhin folgten drei Waschschrte mit je 1 ml Waschpuffer B. Im Anschluss daran wurden drei weitere Waschschrte mit 10 mM Ammoniumacetat durchgeführt. Die Elution des gebundenen OspA-Proteins wurde durch vier aufeinander folgende Elutionsschrte mit je 300 µl 0,1% TFA erreicht. Die erhaltenen Eluate wurden anschließend wieder vereinigt. Um den Reinigungserfolg zu überprüfen, wurden je 20 µl des Rohextrakts, des Eluats der ersten Aufreinigung und des Eluats der zweiten Aufreinigung mit 2× Protein-Pobepuffer auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel einer Coomassie-Färbung (Kap.2.9.4) unterzogen.

**HEPES-Puffer:** 100 mM HEPES

**Waschpuffer B:** 100 mM HEPES; 10 mM Imidazol, 0,5% Triton X-114

**Ammoniumacetat-Puffer:** 10 mM Ammoniumacetat, pH 7,5

---

**2× Protein-Probenpuffer:** 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 20% (v/v) Glycerin; 4% (v/v) SDS; 0,02% (w/v) Bromphenolblau

## 2.10 Mikrosomenpräparation

Mikrosomen sind Membranvesikel, die sowohl integrale Membranproteine als auch membranverankerte Proteine enthalten. Die Präparation von Mikrosomen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Bak et al. (2000).

Dafür wurden 1,25 g Blattmaterial in flüssigem Stickstoff sehr fein gemörsert und anschließend in Puffer A aufgenommen. Nach einer Zentrifugation bei 4°C für 10 min und 15000× g konnte der Überstand zur Isolierung der Mikrosomen verwendet werden. Dafür musste dieser erneut für 30 min bei 100000× g zentrifugiert werden. Anschließend wurde der Überstand für spätere Analysen bei -20°C gelagert. Das erhaltene Pellet wurde in 5 ml Puffer B resuspendiert und erneut für 30 min bei 100000× g zentrifugiert. Der zweite Überstand wurde verworfen, während das Mikrosomenpellet in 200 µl Puffer B aufgenommen und bis zur Immuno-Blot-Analyse ebenfalls bei -20 °C gelagert.

**Puffer A:** 250 mM Tricin; 250 mM Saccharose; 100 mM Ascorbinsäure; 2 mM EDTA; 1 mM PMSF; 2 mM DTT; 5 mg/ml BSA

**Puffer B:** 100 mM Tricine; 250 mM Saccharose; 50 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 mM PMSF; 2 mM DTT

## 2.11 Chloroplastenisolierung

Die Isolation von Chloroplasten erfolgte in Anlehnung an die Protokolle von Block et al. (1983) und Corbin et al. (2001).

Vor Beginn der Präparation wurde ein diskontinuierlicher Percoll-Gradient vorbereitet. Dazu wurden 20 ml einer 30%igen Percoll-Lösung mit 4 ml einer 80%igen Percoll-Lösung unterschichtet. Die Percoll-Gradienten konnten bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert werden.

Die verwendeten Pflanzen mussten vor der Ernte zwei Tage lang im Dunklen gehalten werden. Dadurch wurden Stärkeköerner in Chloroplasten abgebaut, die während der Präparation ansonsten die Chloroplastenwand durchschlagen könnten. Pro Präparation wurden 3 g Blattmaterial mit 30 ml GR-Puffer für 30 s mit dem Ultra-Turrax bei 6500 rpm

---

homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch zwei Lagen Miracloth<sup>®</sup> in ein vorgekühltes Zentrifugenröhrchen filtriert. Die Chloroplasten wurden durch eine kurze Zentrifugation für 1 min bei 6000× g pelletiert und in 2 ml GR-Puffer aufgenommen. Diese Chloroplastensuspension wurde auf einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten (s.o.) gegeben und für 10 min bei 5000× g in einem Ausschwingrotor mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Die intakten Chloroplasten sammelten sich am Übergang von der 30%igen zur 80%igen Percoll-Lösung an, während sich die lysierten Chloroplasten an der Grenze zwischen der 30%igen Percoll-Lösung und dem Puffer anreicherten. Beide Fraktionen wurden jeweils in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Um das verbliebene Percoll auszuwaschen, wurden die Suspensionen mit 4 Volumen GR-Puffer verdünnt und erneut durch eine Zentrifugation bei 6000× g bei 4°C für 1 min pelletiert. Anschließend wurden die erhaltenen Pellets in 300 µl PBS aufgenommen. Bis zur Immuno-Blot-Analyse wurden die Suspensionen bei -80°C gelagert.

**5× GR-Puffer:** 250 mM HEPES-KOH, pH 7,5; 1,65 M Sorbit; 25 mM Na-Ascorbat;

0,125 mM BSA (Fraktion 5); 10 mM EDTA; 5 mM MgCl<sub>2</sub>

**1× PBS:** 23 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 17 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; pH 7,4

## 2.12 Protoplastenisolierung

Die Isolation von stoffwechselaktiven Protoplasten erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Treuter et al. (1993).

Dafür wurden 2-3 mittelgroße, junge Blätter steriler Tabakpflanzen in eine Petrischale gegeben, vielfach angeschnitten und anschließend in 20-25 ml Enzymlösung über Nacht bei 26°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Petrischalen geschwenkt, wodurch die Blattstruktur zerfiel und die Protoplasten frei wurden. Die Protoplastensuspension wurde über ein Sieb in ein neues Glasgefäß filtriert. Nach Zentrifugation wurden die oberen, intakten Protoplasten in ein neues Glasgefäß überführt, mit 10 ml Waschlösung W5 versetzt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Protoplastenpellet in 1 ml MSTM aufgenommen. Für das Auszählen der Protoplasten unter einem Mikroskop wurde eine 1:5 Verdünnung hergestellt.

**Enzymlösung:** 0,25 g Cellulase R10; 0,1 g Macerozyme R10; ad 100 ml H<sub>2</sub>O

---

**W5:** 4,8 g CaCl<sub>2</sub> 2× H<sub>2</sub>O; 2,25 g NaCl; 0,1 g KCl; 0,25g Glucose; 25 mg MES; *ad* 250 ml H<sub>2</sub>O; pH 5,8

**MSTS:** 1,1 g MS-Salze; 20 µl 2,4D [0,2 mg/ml in EtOH]; 0,25 g MES; 34,2 g Saccharose; *ad* 250 ml H<sub>2</sub>O; pH 5,7

## 2.13 *In vivo*-Isotopen-Markierung

### 2.13.1 Inkubation von stoffwechselaktiven Protoplasten mit radioaktiv-markierter Palmitinsäure

Für die radioaktive metabolische Markierung wurden 200 µl isolierte Protoplasten (10<sup>6</sup>/ml) für 4 Stunden mit 200 µCi [9,10- <sup>3</sup>H] Palmitinsäure in 1% DMSO bei 500 rpm auf einem Schüttler und unter Beleuchtung inkubiert. Anschließend wurden die Protoplasten durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen lysiert. Daraufhin wurden die Proben mit 0,5% Triton X-100 versetzt, kurz gevortext und bei 4°C für 5 min bei 15000× g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die Immunopräzipitation verwendet.

### 2.13.2 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation ermöglicht eine schnelle und effektive Isolierung von Antigenen aus Zelllysaten. Dafür wurde der *Immunoprecipitation Kit Seize*<sup>®</sup> X der Firma Pierce verwendet. Der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand (Kap. 2.13.1) wurde im Verhältnis 1:1 mit „Binding/Washbuffer“ (siehe Anleitung des Herstellers) versetzt. Nach Zugabe von je 4 µl (0,75 mg/ml) anti-OspA-Antikörper folgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Die anschließende Immunopräzipitation wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt, mit der Ausnahme, dass für die Elution des gebundenen OspA von der Säule der Elutionspuffer mit 1% LDS versetzt wurde. Nach Einengung der Proben über Mikrokonzentratoren (Microcon) wurden je 20 µl über ein 12,5% Bis-Tris NuPAGE-Gel (Invitrogen) getrennt. Die anschließende Fixierung erfolgte in einer Iso-propanol:Essigsäure:Wasser-Lösung (25:10:65) für 30 min. Nach einer weiteren Inkubation des Gels in Amplify-Lösung für 30 min wurde es im Vakuum getrocknet. Anschließend

---

wurde ein beschichteter Röntgenfilm (Hyperfilm™ MP) für mehrere Wochen auf das getrocknete Gel gelegt und die Kassette bei -80°C gelagert.

### **2.13.3 Vorinkubation mit verschiedenen Inhibitoren der Fettsäuremodifikation**

#### *Globomycin*

In einem weiteren Ansatz wurden isolierte Protoplasten mit 10 µl Globomycin (200 µg/ml) für eine Stunde inkubiert und dann mit 200 µCi [9,10- <sup>3</sup>H] Palmitinäure in 1% DMSO versetzt und für weitere vier Stunden bei 500 rpm auf einem Schüttler und unter Beleuchtung inkubiert. Die anschließende Zellyse und die Immunopräzipitation erfolgten wie in Kapitel 2.13.1 und 2.13.2 beschrieben.

#### *2-Bromopalmitat*

In einem parallelen Ansatz erfolgte eine Vorinkubation der Protoplasten mit 2-Bromopalmitat (100 µM in 0,1% DMSO) für 30 min. Anschließend folgte die Zugabe von 200 µCi [9,10- <sup>3</sup>H] Palmitinsäure in 1% DMSO. Die nachfolgende Inkubationszeit betrug 4 Stunden bei 500 rpm auf einem Schüttler und unter Beleuchtung. Alle weiteren Schritte wurden durchgeführt wie unter 2.13.1-2 beschrieben.

## **2.14 Methoden zur Transformation von Pflanzen**

### **2.14.1 Transformation von Tabakpflanzen mit der ‚Gene gun‘ (Genkanone)**

Die Transformation der Chloroplastengenome wurde mit der ‚Gene gun‘ (PDS-1000/He Biolistic; BioRad) nach der Methode von Sanford et al. (1987; 1991) durchgeführt. Diese Methode basiert darauf, dass DNA-beladene Goldpartikel durch einen Helium-Überdruck auf sich im Vakuum befindliche Gewebe geschossen werden. Nach dem Eindringen in die Zelle bzw. in die Chloroplasten kann die DNA dann in Chloroplastengenome integriert werden.

Alle dafür verwendeten Materialien wurden vor Gebrauch entweder in 100% Isopropanol eingelegt oder autoklaviert (30 min, 121°C, 2 bar).

---



### *Beschichtung der Goldpartikel mit DNA*

Für die Transformation von Plastidengenomen eigneten sich Goldpartikel mit einem Durchmesser von 0,6  $\mu\text{m}$ . Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Steriles  $\text{H}_2\text{O}$  und Ethanol wurden ebenfalls auf ca.  $4^\circ\text{C}$  vorgekühlt.

Für das Beschießen von 10 Blättern wurden 2,2 mg Goldpartikel eingewogen und mit 100  $\mu\text{l}$  100% Ethanol versetzt. Die Suspension wurde für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit gevortext und dann für 1 s bei  $4000\times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Partikel in 1 ml sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und erneut für 1 s bei  $4000\times g$  zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 250  $\mu\text{l}$  sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen.

Zu dieser Suspension wurden nacheinander ca. 25  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA (Midiprepkonz. 1-2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 250  $\mu\text{l}$  einer 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und 50  $\mu\text{l}$  einer 0.1 M Spermidin-Lösung zugegeben und gut durchmischt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für ca. 30 min, unter ständigem Schütteln. Anschließend wurden 600  $\mu\text{l}$  EtOH (99%) zugegeben und die Suspension gut durchmischt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 1 s bei  $4000\times g$ . Das erhaltene Pellet wurde nach Entfernung des Überstandes zwei weitere Male mit je 600  $\mu\text{l}$  EtOH gewaschen. Letztlich wurde das Pellet in 70  $\mu\text{l}$  EtOH aufgenommen.

### *Beschießen von Tabakblättern mit DNA-beladenen Goldpartikeln*

Die Transformation von Blättern erfolgte unter optimierten Standardparametern.

#### Standardparameter für die Transformation:

Rupture Disc 1100 psi (75,84 bar) für Chloroplastentransformationen

7  $\mu\text{l}$  Gold-Suspension pro Schuss

Vakuum: 26-27 inches Hg (710 mm Hg)

Macrocarrier mit Goldpartikeln befanden sich in der obersten Einschubebene.

Das zu beschießende Blatt befand sich in der dritten Einschubebene von oben.

Die Blätter von ca. 4-6 Wochen alten, steril gewachsenen *N. tabacum*-Pflanzen wurden mit der Blattunterseite nach oben in eine mit RMOP-Festmedium (Kap. 2.5) gefüllte Petrischale gelegt. Die Blätter wurden nach dem Beschießen zunächst für zwei Tage bei  $26^\circ\text{C}$  unter geringer Beleuchtung belassen. Zur Selektion positiver Transformanden wurden die Blätter anschließend in ca. 1  $\text{cm}^2$  große Stücke zerschnitten und auf RMOP-Festmedium, das mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, kultiviert.

### 2.14.2 *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Gentransfer

Mit Hilfe des gram-negativen Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* ist es möglich, Gene stabil in das Kerngenom zahlreicher Pflanzenspezies einzubauen. In dieser Arbeit wurde neben der „Gene gun“-Methode auch der Agrobakterien-vermittelte Gentransfer zur Transformation von Zellkerngenomen von *N. tabacum* mit einem binären Vektorsystem durchgeführt. Dieses bestand aus einem so genannten „entschärften“ Ti-Plamid, welches für die *vir*-Gene codiert (deren Funktion besteht in der Koordination und Durchführung des T-DNA-Transfers in die Pflanzenzelle) und einem Vektorplasmid (pPS1), das die zu übertragenden Gene enthält.

#### *Herstellung kompetenter Agrobakterien*

In dieser Arbeit wurde der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV 3101 verwendet. Eine Bakterienkolonie wurde in 3 ml LB-Medium (mit 25 µg/ml Gentamycin) über Nacht bei 28°C rotierend kultiviert. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB/Gentamycin (25 µg/ml) mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und für 6 Stunden bei 28°C in einem Wasserbad bei 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 20 min bei 4°C und 5000× g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 5 ml kaltem TE-Puffer aufgenommen und nochmals für 10 min bei 5000× g zentrifugiert. Darauf folgend konnte das Pellet in 10 ml LB-Medium resuspendiert, in 500 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

**TE-Puffer:** 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA

#### *Transformation von Agrobacterium tumefaciens*

Kompetente Agrobakterien mussten nun mit dem Expressionsplasmid transformiert werden, wobei pro Transformation 0,1-1 µg DNA verwendet wurden. Die Agrobakterien wurden nach Zugabe der DNA für 5 min auf Eis belassen und anschließend für 5 min in flüssigen Stickstoff gegeben. Nach einer weiteren Inkubation bei 37°C für 5 min wurden 500 µl LB-Medium zugegeben, so dass die Agrobakterien sich bei 28°C für 4 Stunden vermehren konnten. Danach wurde die Suspension auf LB-Festmedium (mit Antibiotikum) ausplattiert und für 2 Tage bei 28°C selektioniert. Der Erfolg der Transformation wurde mittels einer PCR-Untersuchung der Agrobakterien-Kolonien durchgeführt (2.7.12; Tab.2.3). Eine positive Transformante wurde in 50 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt, für weitere 2 Tage

---

bei 28°C bei 250 rpm inkubiert und anschließend die Bakterien bei 12000× g für 15 min geerntet. Das erhaltene Bakterienpellet wurde in LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen und für die Blattscheibentransformation der Tabakblätter (s. u.) verwendet.

### *3-Ketolactose-Test für Agrobakterien*

Die zur Pflanzentransformation verwendeten Agrobakterien wurden vorab einem 3-Ketolactose-Test für Agrobakterien unterzogen. Dadurch sollte deren Identität und mögliche Kontaminationen mit *E. coli* und anderen Bakterien überprüft werden (van Beeumen & Deley, 1968; Bernaerts & Deley, 1967). Hierzu wurden die zu testenden Bakterien auf Agrobakterien-Testplatten (Kap. 2.5) ausgestrichen und für zwei Tage bei 28°C kultiviert. Im Anschluss daran wurden die gewachsenen Bakterienkolonien für eine Stunde mit Benedicts-Reagenz überzogen. Dabei bildeten Agrobakterien 3-Ketolactose, die durch das Benedicts-Reagenz gelb angefärbt wurde. *E. coli*-Bakterien hingegen bildeten keine 3-Ketolactose und wurden daher nicht gefärbt.

**Benedicts-Reagenz:** 86,5 g Na-Citrat  
50 g Na-Carbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, wasserfrei)  
ad 425 ml H<sub>2</sub>O  
8,7 g CuSO<sub>4</sub>×5 H<sub>2</sub>O in 50 ml H<sub>2</sub>O lösen  
beide Lösungen vereinen.

### *Transformation von Tabakblättern mittels *A. tumefaciens**

Für die Transformation der Pflanzen wurden ca. fünf steril gewachsene Tabakblätter in 1-2 cm große Stücke geschnitten und in der Agrobaktériensuspension (s.o.) für 5 min inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Blattstücke auf einem sterilen Filterpapier von überflüssiger Bakteriensuspension befreit und auf RMOP-Festmedium (50 µg/ml Kanamycin, 160 µg/ml Timentin) gelegt. Die Blattstücke wurden für zwei Tage im Dunklen bei 24°C gehalten, bevor sie ab dem dritten Tag in der Klimakammer bei 26°C unter Dauerlicht kultiviert wurden. Die Blattstücke wurden immer nach sieben Tagen auf neue Selektionsplatten umgesetzt.

### 2.14.3 Transiente Expression von *ospA* und *ot*

Die transiente Expression von *ospA* und *ot* wurde wie in Marillonnet et al. (2004) beschrieben durchgeführt.

## 2.15 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchungen von rpOspAhis mittels MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry) wurden von Frau Dr. B. Bouchon am INSERM in Clermont-Ferrand/Frankreich durchgeführt.

Dafür wurde die eluierte rpOspAhis-Fraktion (Kap. 2.10.6.3) im Vakuum aufkonzentriert. Zu 5 µl des konzentrierten rpOspAhis (250 pmol) wurden 4 µl Formamid zugegeben. Die Probe wurde anschließend mit 36 µl einer Isopropanol-Methanol-Wasser-Mischung (4:4:1, v/v/v) verdünnt. Für die Matrixlösung wurde 3,5-Dimethoxy-4-Hydroxymizsäure in einem Acetonitril/Wasser Gemisch (50:50, v/v) mit 0,1% TFA in einer Konzentration von 7 µg/µl gelöst. Die Proteinprobe wurde 1:1 mit dem gleichen Volumen Matrixlösung vermischt und auf den Träger aufgebracht. Die Kalibrierung erfolgte mit einfach ( $M^+$ ) und doppelt ( $M^{2+}$ ) ionisiertem Rinderserumalbumin (BSA). Die Spektren wurden mit einem Voyager DE-PRO Massenspektrometer (Applied Biosystems) in positiv linear verzögertem Extraktionsmodus unter einer Beschleunigung von 25 kV, einer Pulsverzögerung von 300 ns und einer Gitterspannung von 92% aufgenommen. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurden ca. 200 scans/Spektrum gemittelt.

## 2.16 Immunologische Untersuchungen

Die immunologischen Untersuchungen mit plastidärem OspA wurden am Max-Planck-Institut in Freiburg von Prof. M. Simon und T. Stehle durchgeführt.

Dafür wurden je drei BALB/c Mäuse wiederholt (Tag 1, 14 und Tag 30) mit je 10 µg rpOspA oder rekombinantem OspA aus *E. coli* in Kombination mit 100 µl MPL-TDM-Adjuvans („monophosphoryl lipid A“ (MPL) und „trehalose dimycolate“ (TDM)) subcutan in die Schwanzwurzel immunisiert. Blutentnahmen erfolgten an den Tagen 21, 40, 45 und 56 nach der ersten Injektion. Die Immunsereen wurden mittels „solid-phase“-ELISA auf spezifische OspA-Antikörper untersucht (Kramer et al., 1990). Antikörper der gleichen Spezifität wie der

---

monoklonale Antikörper LA-2, der das protektive Epitop von OspA erkennt, wurden mit einem „competitiven“-ELISA (Simon et al., 1996) detektiert. Immuno-Blot-Analysen mit Zellysat von *B. burgdorferi* Stamm ZS7 ( $2.5 \times 10^6$  Zellen/Spur) oder rekombinantem Protein (250 ng/Spur) wurde wie in Simon et al. (1996) beschrieben durchgeführt.

---

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expression von *ospA* und *ot* in Tabakchloroplasten

##### 3.1.1 Klonierung der Expressionsvektoren für die Chloroplastentransformation von *Nicotiana tabacum*

Für die Chloroplastentransformation von *N. tabacum* wurde zu Beginn dieser Arbeit der tabakspezifische Expressionsvektor pNT1 verwendet (Kap. 2.4). Dieser erlaubt die Integration der Transgene zwischen die benachbarten plastidären Gene *rbcL* und *accD* des Wildtyp-Plastidengenoms durch doppelte homologe Rekombination (Abb. 3.1A). Innerhalb der Expressionskassette liegt das Aminoglycosid-3''-Adenyltransferase-Gen (*aadA*) als Selektionsmarker, welches unter der Kontrolle des *Prrn*-Promoters und des *psbA*-Terminators (3'-*psbA*) steht (Abb. 3.1A). Das Genprodukt von *aadA* transferiert einen AMP-Rest von ATP an das Antibiotikum Spectinomycin und überführt dieses dadurch in seine inaktive Form Adenylspectinomycin (Svab & Maliga, 1993). Die inhibierende Wirkung von Spectinomycin auf die prokaryotische Transkriptionsmaschinerie ist hoch spezifisch und zeigte bisher kaum Nebeneffekte auf die gesamte Pflanzenzelle, wodurch sich Spectinomycin routinemäßig für Chloroplastentransformationen verwenden lässt (Bock, 2001).

Für ein erstes Konstrukt wurde das bakterielle *ospA*-Gen (822 bp) aus *Borellia burgdorferi* (Kap. 2.4) über mehrere Klonierungsschritte in die Expressionskassette des pNT1-Vektors ligiert (H. Warzecha) (Abb. 3.1A). Das *ospA*-Gen wurde dabei mit den regulatorischen Elementen 5'-und 3'-UTR des Tabak-*psbA*-Gens ausgestattet und codiert für ein OspA-Prolipoprotein mit einer N-terminalen Signalsequenz von 16 Aminosäuren (Abb. 3.1B). Dieses Signalpeptid gilt als essentiell für die post-translationale Lipidmodifikation in Bakterien (Dunn et al., 1990; Hayashi & Wu, 1990).

In einem zweiten Konstrukt war eine verkürzte Variante des *ospA*-Gens, *ospA truncated* (*ot*), in die Expressionskassette des pNT1-Vektors integriert (Abb. 3.1A). Das *ot*-Gen codiert für ein OspA-Protein ohne N-terminale Signalsequenz, es besitzt jedoch das konservierte Cystein in Position +2 (Abb. 3.1B). Dieses Cystein ist das einzige in der gesamten OspA- bzw. OT-Aminosäuresequenz. Mit dem pNT1OT-Konstrukt sollte geklärt werden, ob in Pflanzen Palmitinsäure unspezifisch, d.h. unabhängig von der konservierten Signalsequenz an Cystein gebunden werden kann.



das vermehrte Vorkommen der 5'- und 3'-UTR des plastidären *psbA*-Gens in transgenen Chloroplasten kam es daher zu weiteren homologen Rekombinationen innerhalb transgener Genome (Abb. 3.1A). Diese hatten letztlich den Verlust des *ospA*-Gens bzw. *ot*-Gens zur Folge. Um eine stabile Integration der Expressionskassette in Plastidengenomen zu erreichen, mussten daher in dieser Arbeit zunächst die Kontrollelemente in dem Expressionsvektor pNT1 und den Subklonierungsvektoren pJS25uidA und pJS25OspA ausgetauscht oder verkürzt werden.

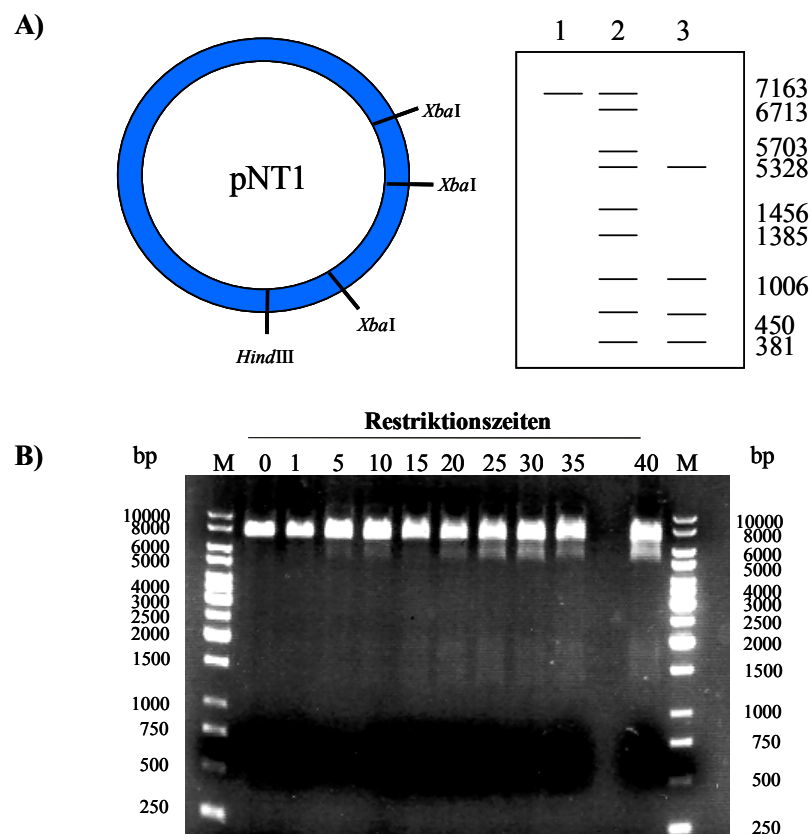
### 3.1.1.1 Modifizierung des pNT1-Expressionsvektors

Die 3'-*psbA*-Region des *aadA*-Gens im Vektor pNT1 (7163 bp) (Abb. 3.3A) wurde durch eine 149 bp große 3'-UTR des plastidären *rps 16*-Gens (*Trps16*) ersetzt. Durch diesen Austausch wurde verhindert, dass es mit dem nun kürzeren Kontrollelement zu unerwünschten Rekombinationen in transgenen Plastidengenomen kommt. Das 149 bp große *Trps16*-Fragment wurde zunächst mittels PCR mit den Primern 5'-*Trps16XbaI* und 3'-*Trps16HindIII* (Tab. 2.2) aus Wildtyp-Tabak-DNA amplifiziert (Kap. 2.7.1). Die für die Klonierung erforderlichen Restriktionsschnittstellen wurden über die Primersequenzen an die codierende Sequenz angefügt. Zur weiteren Handhabung und zur Sequenzierung wurde das erhaltene PCR-Produkt in den Klonierungsvektor pGEM-T-easy ligiert (Kap. 2.7.2; 2.7.16). Für die spätere Ligation mit dem pNT1-Plasmid wurde das *Trps16*-Fragment mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* aus dem Klonierungsvektor ausgeschnitten (Kap. 2.7.3).

Innerhalb des pNT1-Vektors konnte die auszutauschende 3'-*psbA*-Region hinter dem *aadA*-Gen ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *HindIII* entfernt werden. Da dieser Vektor jedoch drei *XbaI*-Schnittstellen aufwies (Abb. 3.2A), musste ein partieller Verdau durchgeführt werden. Dabei konnte die Tatsache genutzt werden, dass bei geringer Konzentration an Restriktionsenzym und kurzen Reaktionszeiten nicht alle möglichen Schnittstellen innerhalb der DNA gespalten werden. Der pNT1-Vektor wurde zunächst mit dem Enzym *HindIII* linearisiert und nach Zugabe des Enzyms *XbaI* folgten die in Kapitel 2.7.3. beschriebenen Verdauzeiten. Anschließend wurden die erhaltenen Fragmentgemische über ein Agarosegel aufgetrennt (Abb. 3.2B). Aufgrund der Anordnung der drei *XbaI*-Schnittstellen waren neun mögliche Fragmente mit je 7163 (linearisierter Vektor), 6713, 5703, 5328, 1456, 1385, 1006, 450 und 381 bp zu erwarten. Das Fragment der Größe 6713 bp entsprach dabei dem pNT1-Fragment, dem nur die 3'-*psbA*-Sequenz fehlte (Abb. 3.2). Diese Bande war nach einer Verdauzeit von 15 min deutlich zu erkennen, konnte aus dem Agarosegel ausgeschnitten



und nach einer Gelextraktion für die Ligation mit der *Trps16*-Sequenz verwendet werden (Kap. 2.7.9). Der Ligationsansatz wurde nach einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet (Kap. 2.7.11). Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte auf spectinomycinhaltigen LB-Agarplatten. Der Transformationserfolg wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer 5'-*Trps16XbaI* und 3'-*Trps16HindIII* verifiziert (Kap. 2.7.12; Tab. 2.2). Das neue, 6850 bp große Plasmid wurde mit dem Namen pNT2 bezeichnet (Abb. 3.3A) und seine Identität durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *Bam*HI überprüft. Die resultierenden Fragmentgrößen entsprachen dabei den errechneten Werten (4464, 1238 und 1148 bp) (Abb. 3.3A). Somit stand der Vektor pNT2 für die weiteren Klonierungen sowie für die spätere Expression der Transgene zur Verfügung.



**Abb. 3.2. Partieller Restriktionsverdau des Vektors pNT1.** A) Schematische Darstellung des partiellen Verdau von pNT1 und der möglichen resultierenden Banden. Spur 1: Mit *Hind*III linearisiertes pNT1-Plasmid. Spur 2: Partieller Verdau des linearisierten pNT1-Plasmids mit *Xba*I. Spur 3: Vollständiger Verdau des linearisierten pNT1-Plasmids. B) Gelelektrophoretische Trennung der unterschiedlich lang durchgeführten Restriktionsverdaue (*Xba*I) des pNT1-Vektors, der zuvor mit *Hind*III linearisiert wurde. Das gewünschte pNT1-Fragment ohne 3'-*psbA* weist eine Größe von 6713 bp auf. Die jeweiligen Verdauzeiten sind über den entsprechenden Spuren notiert. Spur M: Größenstandard.

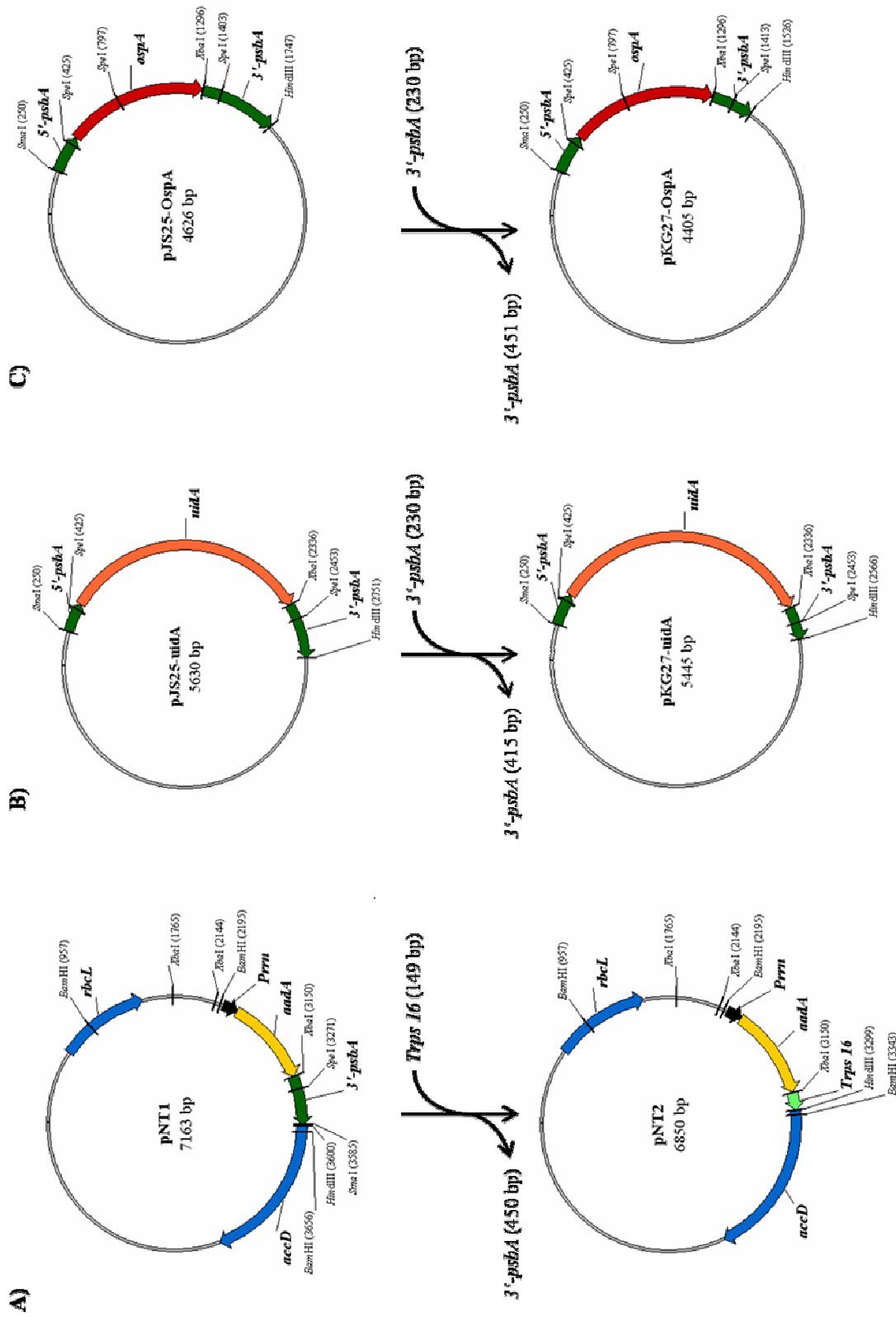


Abb. 3.3. Text siehe Seite 64.

### 3.1.1.2 Modifikationen in den Subklonierungsvektoren pJS25uidA und pJS25OspA

In den Subklonierungsvektoren pJS25uidA (5630 bp) und pJS25OspA (4626 bp) (Abb. 3.3B,C) wurden die bis 450 bp großen 3'-*psbA*-Regionen durch eine verkürzte 3'-*psbA*-Region von 230 bp ersetzt. Diese behält die Funktion als Terminator und RNA-stabilisierendes Element bei, ist jedoch für eine homologe Rekombination zu klein (Bock, 2001). Mittels PCR unter Verwendung der Primer 5'-*psbA3'-UTR* und 3'-*psbA3'-UTR* wurde das verkürzte 3'-*psbA*-Fragment zunächst aus Wildtyp-Tabak-DNA amplifiziert (Tab. 2.2; Kap. 2.7.1), in den pGEM-T-easy-Vektor kloniert und anschließend sequenziert (Kap. 2.7.2; 2.7.16).

Die auszutauschenden 3'-*psbA*-Regionen der Vektoren pJS25uidA und pJS25OspA wurden durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *Xba*I und *Hind*III entfernt. Das verkürzte 3'-*psbA*-Fragment wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Hind*III aus dem Klonierungsvektor herausgeschnitten. Die dafür erforderlichen Restriktionsschnittstellen wurden über die Primersequenzen an die codierende Sequenz angefügt. Anschließend konnte das verkürzte 3'-*psbA*-Fragment mit den Vektoren pJS25uidA und pJS25OspA ligiert werden (Kap. 2.7.9). Nach den jeweiligen Transformationen, Selektionen und Identifikationen positiver *E. coli*-Kolonien ( Kap. 2.7) wurden die neuen Plasmide pKG27uidA (5445 bp) und pKG27OspA (4405 bp) (Abb. 3.3B,C) einem Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *Spe*I unterzogen. Die daraus resultierenden Fragmentgrößen entsprachen dabei den errechneten Werten (pKG27uidA: 3417 und 2028 bp bzw. pKG27OspA: 3417, 616 und 372 bp), so dass die Plasmide als Subklonierungsvektoren weiter verwendet werden konnten (Abb. 3.3B,C).

### 3.1.1.3 Klonierung der Chloroplastenexpressionsvektoren pNT2OspA und pNT2OT

Nach den Modifikationen der Subklonierungs- und Expressionsvektoren (vgl. Kap. 3.1.1.1 und 3.1.1.2, Abb. 3.3.) konnte das *ospA*-Gen inklusive der Kontrollelemente (5'- und 3'-*psbA*-UTR) aus dem Plasmid pKG27OspA mit den Enzymen *Sma*I und *Hind*III ausgeschnitten werden (Abb. 3.4A). Durch eine anschließende Behandlung des Ansatzes mit Klenow-Polymerase wurden die durch den Restriktionsverdau entstandenen überhängenden Enden in

---

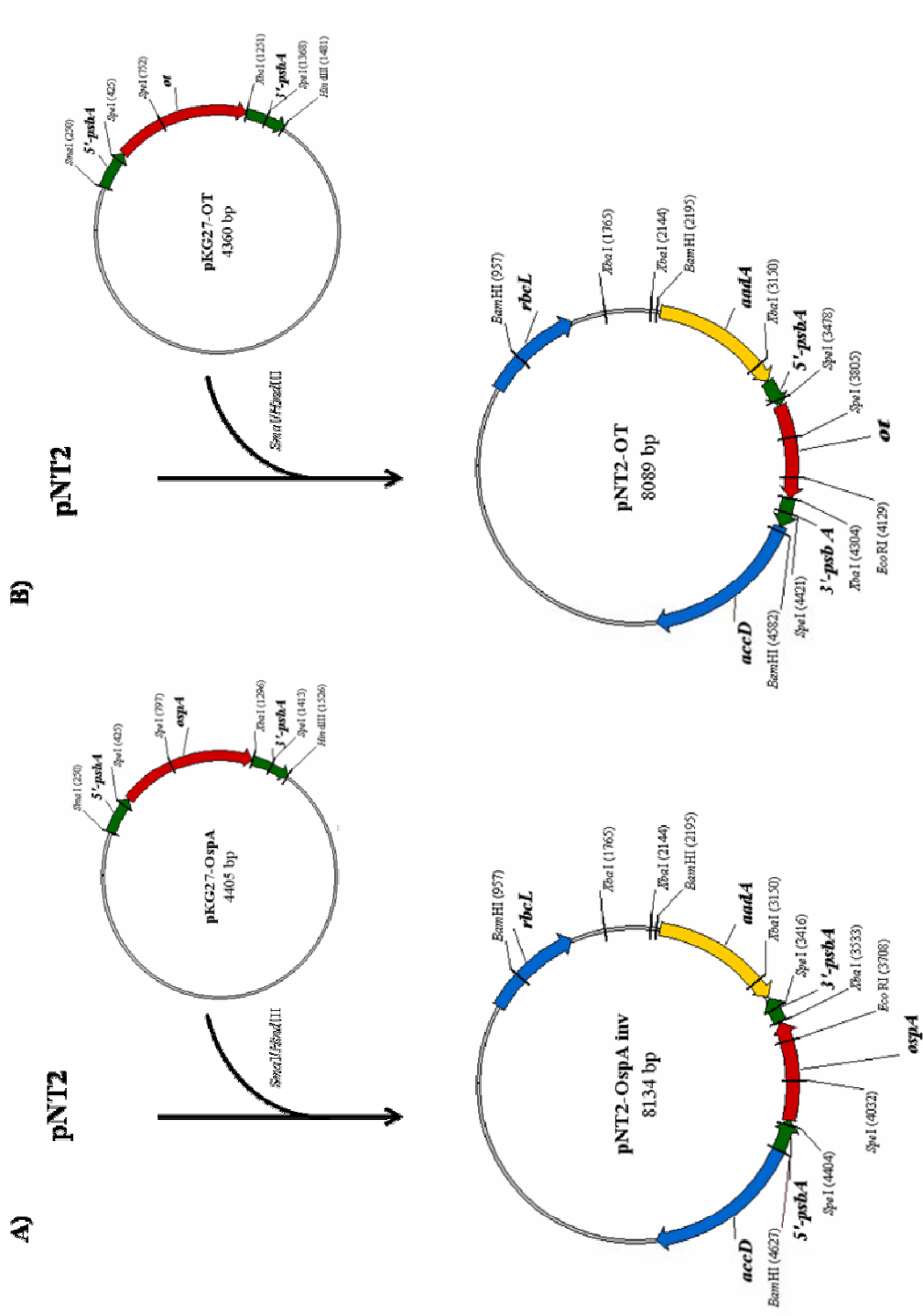
**Abb. 3.3. Klonierungsschema der Subklonierungs- und Expressionsvektoren.** A) Im Vektor pNT1 wurde die 3'-*psbA*-Region des *aadA* Gens durch die 3'-UTR des *rps16*-Gens (*Trps16*) ersetzt. Der neu erhaltene Vektor wurde in pNT2 umbenannt. B) und C) In den Subklonierungsvektoren pJS25uidA und pJS25OspA wurden die 3'-*psbA*-Regionen durch eine verkürzte 3'-*psbA*-Region ausgetauscht. Die daraus resultierenden Vektoren wurden als pKG27uidA und pKG27OspA bezeichnet. Die für die Klonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen sind angezeigt.

---

glatte Enden überführt (Kap. 2.7.4). Parallel dazu wurde der pNT2-Vektor mit dem Restriktionsenzym *Hind*III linearisiert und anschließend ebenfalls zur Bildung glatter Enden mit Klenow-Polymerase behandelt. Das 5'-Ende des linearen Vektors wurde durch eine alkalische Phosphatase dephosphoryliert (Kap. 2.7.6). Dadurch konnte eine Rezirkularisierung des Vektors während der anschließenden „blunt end“-Ligation mit dem *ospA*-Insert verhindert werden. Der neue Vektor pNT2OspA (8134 bp) (Abb. 3.4A) wurde einem Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI unterzogen. Die resultierenden Fragmentgrößen entsprachen den errechneten Werten von 4464, 1513, 1238 und 919 bp. Diese Fragmentierung bestätigte gleichzeitig die invertierte Orientierung des *ospA*-Gens, die auf Grund der regulatorischen Eigenständigkeit des Gens (Promoter und Terminator) jedoch keine Auswirkung auf dessen spätere Expression haben sollte. Daher konnte der neue Expressionsvektor für die Plastidentransformation verwendet werden (Kap. 3.1.2).

Für die Klonierung des OT-Plasmids wurde eine abweichende Strategie angewandt. Das *ot*-Gen wurde zunächst mittels PCR am Plasmid pKG27OspA amplifiziert. Dabei war der sense-Primer 5'-*ot* homolog zu den Basenpaaren in Position +48 bis +66, während der antisense-Primer 3'-*ospAXba*I an die Basen +809 bis +822 des *ospA*-Gens binden konnte und zusätzlich eine *Xba*I-Schnittstelle an die kodierende Region anfügte (Tab. 2.2). Das *ot*-PCR-Produkt wurde dann mit dem Restriktionsenzym *Xba*I verdaut. Der Zwischenvektor pKG27uidA wurde gleichzeitig mit dem Enzym *Nco*I linearisiert und anschließend mit Mung-Bean-Nuklease behandelt (Kap. 2.7.5). Dadurch wurde der entstandene 5'-Überhang entfernt und somit ein glattes Ende erzeugt. Im Anschluss daran folgte ebenfalls ein *Xba*I-Verdau des linearisierten Vektors, was die Entfernung des *uidA*-Gens zur Folge hatte. Die Enden des Vektors pKG27 und des *ot*-PCR-Produktes waren somit kompatibel und konnten ligiert werden. Daraus resultierte der Subklonierungsvektor pKG27OT (4360 bp), der nach einem Kontrollverdau mit dem Enzym *Spe*I die erwarteten Fragmentgrößen von 3417, 616, 327 bp aufwies (Abb. 3.4B). Für die weitere Ligation mit dem Expressionsvektor pNT2 wurde das *ot*-Fragment inklusive seiner Kontrollelemente aus diesem Subklonierungsvektor mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Hind*III ausgeschnitten und wie im vorherigen Abschnitt beschrieben mit dem linearisierten pNT2-Vektor ligiert (Abb. 3.4B). Der daraus entstandene Chloroplastenexpressionsvektor pNT2OT (8089 bp) wurde durch einen Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI überprüft. Die Fragmente zeigten dabei die zu erwartenden Größen von 4464, 1934, 1238 und 453 bp. Somit war auch dieser Vektor für die Plastidentransformation einsetzbar (Kap. 3.1.2).

---



**Abb. 3.4. Schematische Darstellung der Klonierung der Transformationsvektoren pNT2OspA (A) und pNT2OT (B).** Die Transgene (*ospA* bzw. *ot*) wurden inklusive der Kontrollelemente 5'- und 3'-*psbA* aus den Subklonierungsvektoren durch einen Restriktionsverdau mittels *Sma*I und *Hind*III ausgeschnitten und in den pNT2-Vektor ligiert. Die daraus resultierenden Vektoren wurden als pNT2OspA und pNT2OT bezeichnet. Die für die Klonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen sind angezeigt.

### 3.1.2 Transformation von Tabakchloroplasten

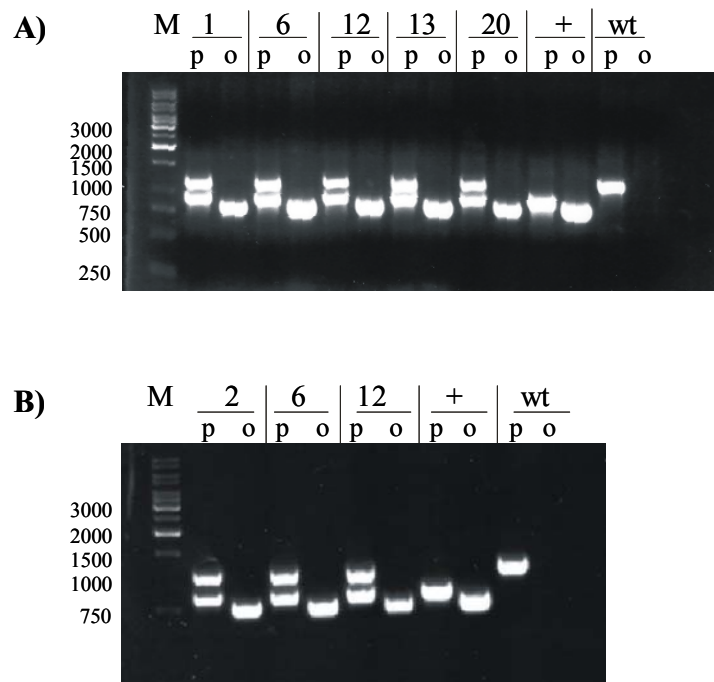
Die Transformation von *N. tabacum*-Chloroplasten mit den neuen Expressionsvektoren pNT2OspA und pNT2OT erfolgte nach der „Gene gun“-Methode (Kap. 2.14.1). Da sich die Transformationsrate mit einem Transformanden aus 10 beschossenen Blättern als sehr gering erwies, wurde die Anzahl der zu transformierenden Blätter von zunächst 10 auf bis zu 40 Blätter erhöht. Der Einbau der Expressionskassette in die Chloroplastengenome erfolgte durch doppelte homologe Rekombination (vgl. Abb. 3.1A) und die Selektion transgener Linien auf spectinomycinhaltigem RMOP-Festmedium (Kap. 2.14.1).

### 3.1.3 Identifizierung und Charakterisierung transgener Pflanzenlinien

#### 3.1.3.1 Identifizierung transplastomer Pflanzenlinien

Vier bis sechs Wochen nach der Transformation bildeten sich erste Kalli aus den Sektionen der Blätter. Jedoch war die Kallusbildung auf Selektionsmedium noch kein eindeutiger Beweis für die Integration des Transgens, da auch eine Mutation im *16s rRNA*-Gen den Pflanzen eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Spectinomycin verleiht (Svab et al., 1990). Daher mussten positive Transformanden zunächst durch eine Voruntersuchung mittels PCR identifiziert werden. Hierfür wurde genomische DNA aus Kallusmaterial isoliert (Kap. 2.8.1) und mit den Primerpaaren 5'-*psbA* und 3'-*psbA* sowie 5'-*ospA* bzw. 5'-*ot* und 3'-*ospAXba* amplifiziert (Tab. 2.3; Kap. 2.7.1).

Die Transgene (*ospA* und *ot*) weisen sowohl die 5'- als auch die 3'-UTR des *psbA*-Gens auf. Daher wurden mit positiven Transformanden unter Verwendung der *psbA*-Primer zwei PCR-Produkte erhalten (Abb. 3.5). Ein ca. 1,2 kb großes Produkt resultierte aus der Amplifikation des endogenen *psbA*-Gens, während ein ca. 0,9 kb Amplifikat den Produkten der Transgene *ospA* bzw. *ot* entsprach. Wildtyp-Pflanzen hingegen zeigten ausschließlich ein ca. 1,2 kb PCR-Produkt, das aus der Amplifikation des endogenen *psbA*-Gens resultierte (Abb. 3.5). Unter der Verwendung Transgen-spezifischer Primer (5'-*ospA* bzw. 5'-*ot* und 3'-*ospAXba*) ergab die PCR-Untersuchung ca. 0,8 kb große Produkte, die das Volllänge-*ospA* (822 bp)- bzw. das verkürzte *ot* (777 bp)-Gen repräsentierten (Abb. 3.5). Insgesamt konnten mit dieser Methode fünf transgene OspA-Pflanzenlinien (Nummer 1; 6; 12; 13; 20) (Abb. 3.5A) und drei transgene OT-Pflanzenlinien (Nummer 2; 6; 12) identifiziert werden (Abb. 3.5B).



**Abb. 3.5. PCR mit isolierter Gesamt-DNA zur Identifizierung transgener Pflanzen.** **A)** OspA-Pflanzen (Linien 1; 6; 12; 13; 20) **B)** OT-Pflanzen (Linien 2; 6; 12). Für die PCR wurden zum einen 5'- und 3'-*psbA*-Primer (p) und zum anderen 5'-*ospA*- (**A**) bzw. 5'-*ot*- (**B**) und 3'-*ospAXbaI*-Primer (o) eingesetzt. Bei transgenen Pflanzen wurde unter Verwendung der *psbA*-Primer (p) eine 1,2 kb Bande, die den PCR-Produkten des endogenen *psbA*-Gens entspricht, und zusätzlich eine 0,9 kb Bande, die das Transgen *ospA* (**A**) bzw. *ot* (**B**) repräsentiert, erhalten. Dies ist auf die Verwendung der 5'- und 3'-UTR des *psbA*-Gens als regulatorische Elemente für die Transgene zurückzuführen. Mit den Transgen-spezifischen Primern (o) wurde eine Bande der Größe 0,8 bp erhalten. Spur M: Größenstandard. Spur +: als Positivkontrolle wurden die Vektoren pNT2OspA (**A**) bzw. pNT2OT (**B**) verwendet. Spur wt: als Negativkontrolle wurde Gesamt-DNA einer Wildtyp-Tabakpflanze eingesetzt.

### 3.1.3.2 Analyse der transgenen Pflanzen mittels Restriktions-Fragment-Längen-Poly-morphismus (RFLP)

Primäre Chloroplastentransformanten befinden sich zunächst in einem heteroplastischen, transplastomen Zustand, d.h. sie besitzen eine gemischte Population aus ursprünglichen und modifizierten Chloroplastengenomen. Dieser Zustand wird als genetisch instabil beschrieben und ohne Selektionsdruck gehen in der Regel die transgenen Genome verloren (Bock, 2001). Um genetisch stabile, transplastome Pflanzen zu erhalten, müssen die Pflanzen vier bis sechs Regenerationszyklen auf Selektivmedium durchlaufen (Bock, 2001). Um zu überprüfen, in welchem Stadium sich die Pflanzen befinden, wurden die zuvor als transgen identifizierten Pflanzenlinien (OspA und OT) nach jedem Regenerationszyklus einer DNA-Blot-Analyse unterzogen. Zu diesem Zweck wurde genomische DNA sowohl von den transgenen Tabak-

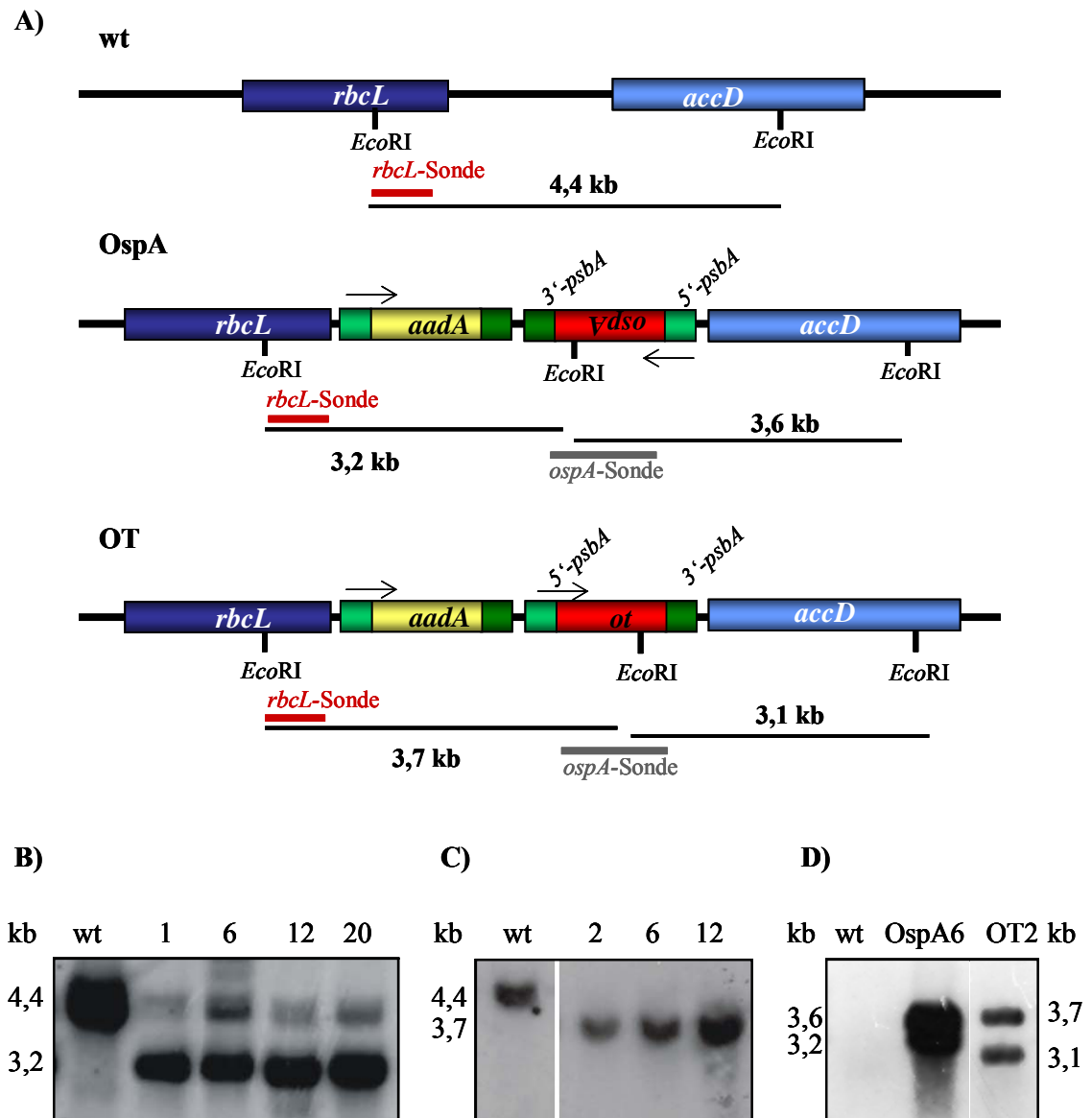
pflanzen als auch von einer Wildtyp-Tabakpflanze isoliert (Kap. 2.8.1). Von dieser DNA wurden jeweils 2 µg mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran wurde diese mit einer *DIG*-11-dUTP markierten *rbcL*-Sonde hybridisiert und anschließend detektiert (Kap. 2.8.4; 2.8.6; 2.8.7). Nach einem *EcoRI*-Restriktionsverdau der Wildtyp-Plastidengenome liegt das *rbcL*-Gen, an welches die Sonde hybridisiert, auf einem 4,4 kb großen Fragment (Abb. 3.6A). In transgenen Plastidengenomen dagegen liegt das *rbcL*-Gen auf Grund einer zusätzlichen *EcoRI*-Schnittstelle im *ospA*- bzw. *ot*-Gen auf Fragmenten der Größe 3,2 kb bei *OspA*-Pflanzen und 3,7 kb bei *OT*-Pflanzen (Abb. 3.6A). Der Größenunterschied zwischen den Restriktionsfragmenten der beiden transgenen Linien resultiert aus dem unterschiedlich gerichteten Einbau des *ospA*- bzw. *ot*-Gens in die Expressionskassette des pNT2-Vektors (vgl. Abb. 3.4).

In einer DNA-Blot-Analyse der *OspA*- und *OT*-Pflanzen nach dem dritten Regenerationszyklus traten bei den *OspA*-Pflanzen zwei Banden mit je 4,4 und 3,2 kb auf (Abb. 3.6B). Dabei repräsentierte die Bande bei 4,4 kb Wildtyp-Plastidengenome und die Bande bei 3,2 kb transgene Plastidengenome. Demzufolge wurde bei den vier untersuchten *OspA*-Pflanzen (1; 6; 12; 20) eindeutig ein heteroplastischer Zustand angezeigt. Im Gegensatz zu den *OspA*-Pflanzen hatten die *OT*-Pflanzen bereits nach drei Regenerationszyklen auf Selektivmedium ein homoplastisches, transplastomes Stadium erreicht. Sie zeigten nur noch ein 3,7 kb großes Fragment, welches transgenen Plastidengenomen entsprach (Abb. 3.6C).

Durch die Hybridisierung mit der *ospA*-Sonde wurde das Vorhandensein der Transgene in den zwei Pflanzenlinien *OspA6* und *OT2* spezifisch nachgewiesen. Auf Grund der *EcoRI*-Schnittstelle im *ospA*- bzw. *ot*-Gen wurden jeweils zwei Fragmente detektiert. Diese zeigten eine Größe von 3,6 und 3,2 kb in der *OspA*-Pflanze, während in der *OT*-Pflanze Fragmente der Größen 3,7 und 3,1 kb detektiert wurden (Abb. 3.6D).

Da bei der Plastidentransformations-Technik durch die zielgerichtete Integration der Expressionskassette in das Plastidengenom, alle erhaltenen Pflanzenlinien nach der Transformation mit einem Transformationsvektor genetisch und phänotypisch identisch sind (Bock, 2001) war es ausreichend, im Folgenden eine Pflanze (*OspA* Nummer 6; *OT* Nummer 2) pro Transformationsvektor beispielhaft zu charakterisieren.



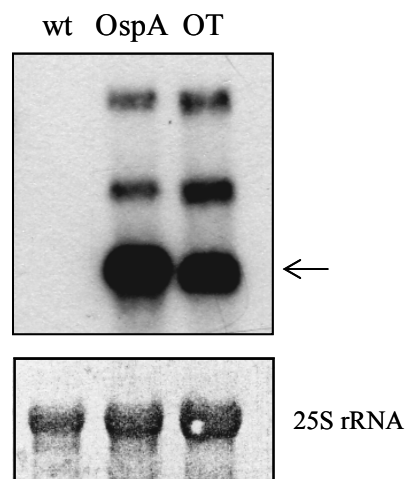


**Abb. 3.6. RFLP-Analyse der transgenen OspA- und OT-Pflanzen.** **A)** Ausschnitt eines Wildtyp-Plastidengenoms und der transgenen Genome von OspA- und OT-Pflanzen. Die nach einem *EcoRI*-Restriktionsverdau resultierenden Fragmente sind dargestellt. **B)** DNA-Blot-Analyse der transgenen OspA-Pflanzen (Individuen Nr. 1, 6, 12 und 20). Unter Verwendung der *DIG*-markierten *rbcL*-Sonde wurden in den transgenen OspA-Pflanzen jeweils zwei Banden der Größen 4,4 und 3,2 kb detektiert, während die Wildtyp-Pflanze (wt) lediglich die Bande der Größe 4,4 kb aufwies. **C)** DNA-Blot-Analyse der transgenen OT-Pflanzen (Individuen Nr. 2, 6 und 12). Unter Verwendung der *DIG*-markierten *rbcL*-Sonde wurde in den OT-Pflanzen nur eine Bande der Größe 3,7 detektiert. **D)** OspA 6 und OT 2. Nach der Hybridisierung mit einer *DIG*-markierten *ospA*-Sonde wurden für die OspA-Pflanze Nr. 6 zwei Fragmente der Größen 3,6 und 3,2 kb und für die OT-Pflanze Nr. 2 zwei Fragmente der Größen 3,7 und 3,1 kb detektiert.

### 3.1.3.3 Heterologe Expression der Transgene *ospA* und *ot* in transgenen Pflanzen

Da das Erreichen eines homoplastischen, transplastomen Stadiums sehr zeitintensiv ist und teilweise bis zu einem Jahr dauern kann, wurden erste Untersuchungen zur Transkription und Translation der Transgene sowie erste Reinigungsversuche des rekombinanten Proteins bereits mit den heteroplastischen OspA-Pflanzen durchgeführt.

Die *ospA*- bzw. *ot*-Expression in den transgenen Linien OspA6 und OT2 wurde zunächst mittels einer RNA-Blot-Analyse unter Verwendung der *DIG*-11-dUTP markierten *ospA*-Sonde untersucht. Dafür wurde die Gesamt-RNA aus 100 mg frischem Blattmaterial isoliert und 3 µg davon über ein denaturierendes Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.8.3). Nach dem Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wurde diese mit der *ospA*-Sonde hybridisiert, wobei in den transgenen Linien je drei Banden detektiert wurden (Abb. 3.7) (Kap. 2.8.5-2.8.7). Die intensiven Banden der Größe 1,1-1,2 kb entsprachen der *ospA*- bzw. *ot*-mRNA (Abb.3.7).

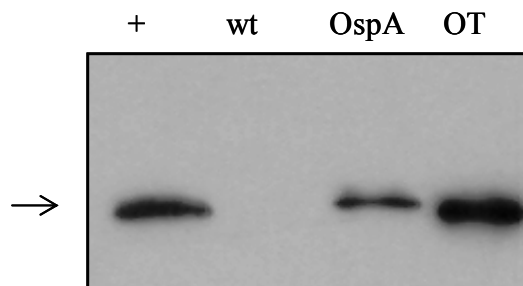


**Abb. 3.7. Akkumulation von *ospA*- bzw. *ot*-mRNA in den transgenen Pflanzen.** Jeweils 3 µg Gesamt-RNA wurden mit einer *ospA*-Sonde hybridisiert. *ospA*- und *ot*-mRNA von ca. 1,1-1,2 kb sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

In einer Immuno-Blot-Analyse wurden die transgenen Pflanzenlinien auf Akkumulation von rekombinantem, plastidärem (rp) OspA bzw. rpOT untersucht. Für diese Methode stand ein monoklonaler anti-OspA-Antikörper zur Verfügung. Als Positivkontrolle wurde lipidiertes rekombinantes OspA aus *E. coli* eingesetzt (Simon et al., 1991).

Zuerst wurde aus 100 mg Blattmaterial ein Proteinrohextrakt hergestellt (Kap. 2.9.1) und 10 µl davon über ein SDS-Gel elektrophoretisch getrennt (Kap. 2.9.3). Anschließend erfolgte

der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran. Die Detektion erfolgte nach Inkubation zunächst mit dem primären anti-OspA-Antikörper und anschließend dem sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper (Kap. 2.9.5). Dabei war in beiden transgenen Linien ein deutliches Signal für rpOspA bzw. rpOT detektierbar, welches in seiner Lage der Positivkontrolle entsprach, während das Signal im Wildtyp-Proteinextrakt vollständig fehlte (Abb. 3.8.). Damit konnte gezeigt werden, dass sowohl rekombinantes OspA als auch rekombinantes OT nach Chloroplastentransformation in *N. tabacum*-Blättern akkumulierte.



**Abb. 3.8. Immuno-Blot zum Nachweis der rpOspA- und rpOT-Akkumulation in den transgenen Pflanzen.** Spur 1: rekombinantes OspA (→) aus *E. coli* diente als Positivkontrolle und ergab ein Signal mit dem monoklonalen anti-OspA-Antikörper. Spur 2: Wildtyp-Proteinextrakt diente als Negativkontrolle. Spur 3: rpOspA-Akkumulation der Pflanze OspA 6. Spur 4: rpOT-Akkumulation der Pflanze OT 2.

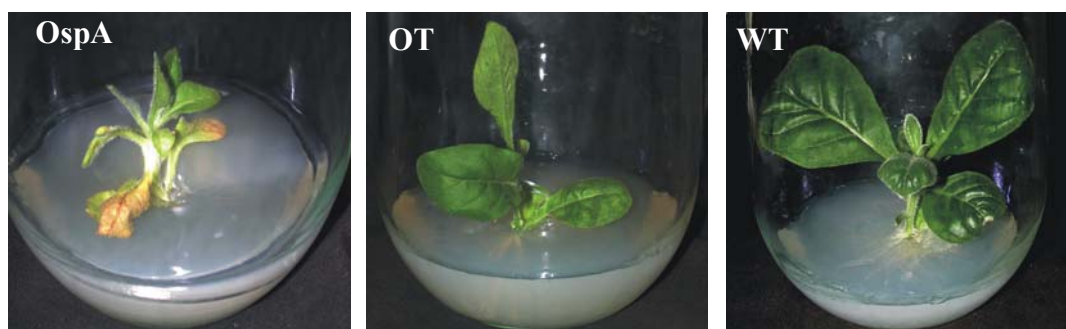
Da Pflanzen in heteroplastischem Zustand eine geringere Genkopienzahl des Transgens aufweisen als in homoplastischem, transplastomem Zustand, war eine aussagekräftige Quantifizierung des rpOspA-Anteils am löslichen Gesamtprotein (LGP) in den OspA-Pflanzen zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchführbar. Die bisherigen Ergebnisse zeigten dennoch deutlich, dass es möglich ist, sowohl das Volllänge-*ospA*-Gen als auch die verkürzte Variante *ot* in Chloroplasten von *N. tabacum* heterolog zu exprimieren.

### 3.1.3.4 Phänotypen der transgenen Pflanzen

Phänotypisch waren deutliche Unterschiede zwischen den OspA- und OT-Pflanzen zu erkennen. So zeichneten sich die OspA-Pflanzen durch einen verkümmerten Wuchs und ein vermehrtes Auftreten von Chlorosen aus (Abb. 3.9), was die Kultivierung dieser Pflanzen im Gewächshaus unmöglich machte. Da die OspA-Pflanzen über einen Zeitraum von mehreren Monaten ihr Wachstum komplett einstellten, konnte während der gesamten Projektdauer kein

homoplastisches, transplastomes Stadium für diese Pflanzen erreicht werden. Sie wurden daher in zahlreichen parallelen Ansätzen in Zellkulturen kultiviert. Bis zum endgültigen Verlust dieser Pflanzen war es dennoch möglich, eine begrenzte Menge an Blattmaterial für die nachfolgenden Untersuchungen zu sammeln.

Die OT-Pflanzen hingegen (Abb. 3.9), für die ein homoplastischer, transplastomer Zustand bereits nach drei Regenerationszyklen beschrieben werden konnte (vgl. Kap. 3.1.3.2), zeigten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.9) zwar ein langsames, aber normales Wachstum und die Kultivierung im Gewächshaus war ebenfalls möglich.



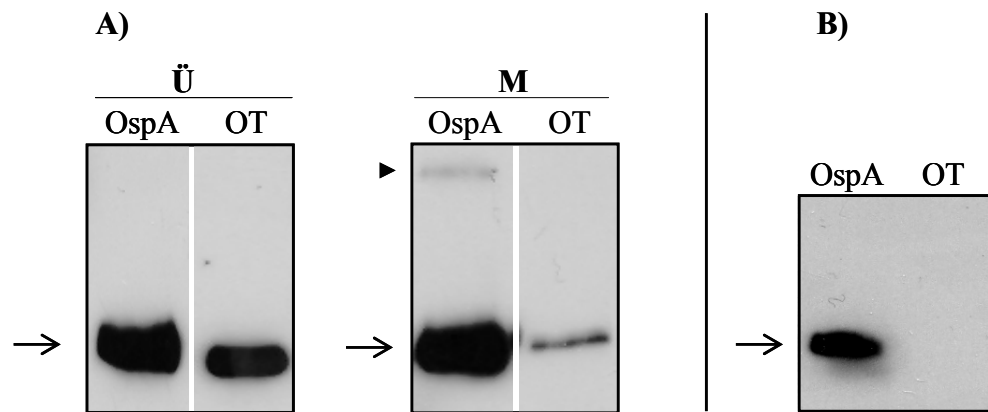
**Abb. 3.9. Phänotypen der transgenen Pflanzen.** OspA-Pflanzen zeigten einen verkümmerten und langsamen Wuchs sowie vermehrte Chlorosen. OT-Pflanzen zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (WT) ein normales, wenn auch langsames Wachstum.

### 3.1.3.5 Untersuchungen zur Membranassoziation von rpOspA

Eine N-terminale Lipidmodifikation wird für zahlreiche bakterielle Proteine beschrieben und dient vorrangig deren Membranverankerung (Hayashi & Wu, 1989). Dies konnte auch durch Untersuchungen mit *ospA*-exprimierenden *E. coli*-Bakterien bestätigt werden (Erdile et al., 1993). *E. coli*, als gram-negatives Bakterium, besitzt die drei für die Lipidierung erforderlichen Enzyme (Lgt, Lsp und Lnt; vgl. Abb.1.2) und kann damit die post-translationale Modifikation an rekombinantem OspA korrekt durchführen. Lipidmodifiziertes OspA wird anschließend in der äußeren Membran verankert. Genprodukte eines verkürzten *ospA*-Gens hingegen, denen die N-terminale Signalsequenz fehlte, wurden in *E. coli* nicht lipidiert und lagen in löslicher, nicht membranassoziiierter Form vor (Erdile et al., 1993; Dunn et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit sollte nun geprüft werden, ob rpOspA und rpOT in den beiden transgenen Pflanzenlinien mit Membranen assoziiert vorliegen. Hierfür wurden Mikrosomen aus OspA- und OT-Pflanzenmaterial isoliert. Mikrosomen sind Membranvesikel, die integrale Membranproteine enthalten. Sie können von löslichen Bestandteilen des Pflanzenmaterials

---

durch Homogenisierung unter Zugabe von Detergenzien und Zentrifugation separiert werden (Kap. 2.10). Die daraus resultierenden Fraktionen, ein lipophiles Mikrosomenpellet (M) und ein wässriger Überstand (Ü) mit löslichen Komponenten, wurden anschließend einer Immuno-Blot-Analyse mit dem anti-OspA-Antikörper unterzogen (Kap. 2.9.5). Dabei zeigten die Proteine rpOspA und rpOT unterschiedliche Verteilungen zwischen den beiden Phasen (Abb. 3.10A). Eine relativ gleichmäßige Verteilung zwischen der wässrigen (Überstand, Ü) und der lipophilen Phase (Mikrosomenpellet, M) wurde für rpOspA festgestellt, während rpOT hingegen vorwiegend in der wässrigen und nur in geringem Maße in der lipophilen Phase zu detektieren war (Abb. 3.10A).



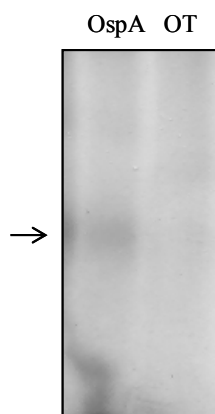
**Abb. 3.10. Membranassoziation von rpOspA und rpOT in den transgenen OspA- und OT-Pflanzen.** **A)** Immuno-Blot der nach einer Mikrosomenpräparation erhaltenen Fraktionen (Ü=Überstand; M=Mikrosomenpellet). Rekombinante OspA- bzw. OT-Monomere (→). Die schwache Bande (▶) in der OspA-Spur des Mikrosomenpellets (M) repräsentiert OspA-Dimere. **B)** Immuno-Blot der Fraktion, die bei der Isolierung von Chloroplasten mit Membranen angereichert wurde. Rekombinante OspA-Monomere (→).

In einem weiteren Experiment wurden Chloroplastenmembranen isoliert und angereichert (Kap. 2.11). Bei der Reinigung von Chloroplasten über einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten wird neben intakten Chloroplasten (zwischen 30%iger und 80%iger Percoll-Lösung) eine zusätzliche Fraktion erhalten (zwischen 30%iger Percoll-Lösung und Puffer), die vorrangig aus Thylakoidmembranfragmenten besteht (Corbin et al., 2001). Dieses Verfahren eignete sich daher, die Lokalisation des in Chloroplasten gebildeten rpOspA bzw. rpOT zu klären. Eine Immuno-Blot-Analyse dieser Fraktion zeigte, dass ausschließlich rpOspA in Membranen lokalisiert war, wohingegen rpOT nicht mit Chloroplastenmembranen assoziierte (Abb. 3.10B).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass rpOspA in zwei Formen d. h. in einer löslichen und in einer membranassoziierten Form in Chloroplasten von *N. tabacum* vorliegt. Demgegenüber liegt rpOT ausschließlich als lösliche Komponente vor. Das Auftreten geringer Mengen rpOT in der lipophilen Phase (M) nach einer Mikrosomenpräparation könnte von Einschlüssen löslichen Proteins in Membranvesikel herrühren. Ob die Membranassoziation von rpOspA auf eine Lipidierung zurückzuführen ist, sollte in weiteren Experimenten geprüft werden (vgl. Kap. 3.1.3.6).

### 3.1.3.6 Inkorporation von radioaktiv-markierter Palmitinsäure in rpOspA

Um zu untersuchen, ob Palmitinsäure in die rekombinanten Proteine rpOspA und rpOT eingebaut wird, wurden Protoplasten der jeweiligen Pflanzenlinien mit [9,10-<sup>3</sup>H]-Palmitinsäure inkubiert (Kap. 2.13.1). Hierfür war es erforderlich, die Protoplastensuspension nach Zugabe von [9,10-<sup>3</sup>H]-Palmitinsäure (200 µCi) für 4 Stunden unter Beleuchtung zu halten. Da die Translation der Transgene durch die 5'-*psbA*-UTR lichtabhängig ist (Staub & Maliga, 1994), sollte so gewährleistet werden, dass eine ausreichende Neusynthese der rekombinanten Proteine stattfand. Durch anschließende Immunopräzipitation (Kap. 2.13.2) wurde rpOspA bzw. rpOT spezifisch aus dem Protoplastenlysat isoliert und über eine SDS-PAGE getrennt (Kap. 2.9.3). Die fluorographische Detektion ergab, dass ausschließlich im Falle von rpOspA ein Signal erhalten wurde, während für rpOT keinerlei Signal detektierbar war (Abb. 3.11). Durch dieses Experiment konnte daher eindeutig gezeigt werden, dass radioaktiv-markierte Palmitinsäure in rpOspA eingebaut wurde. Demgegenüber fand keine Inkorporation des Isotops in rpOT statt.



**Abb. 3.11. *In vivo*-Isotopen-Markierung von OspA- und OT-Protoplasten.** Die fluorographische Detektion nach Immunopräzipitation zeigt, dass radioaktiv-markierte Palmitinsäure ausschließlich in rpOspA (→) eingebaut wurde.

Fasst man die Ergebnisse der Lokalisations- und Inkorporationsexperimente zusammen, zeigt sich, dass die Lipidierung und die daraus folgende Membranverankerung von rekombinantem OspA in Tabakchloroplasten vom Vorhandensein einer N-terminalen Signalsequenz abhängig ist. Daher wird radioaktiv-markierte Palmitinsäure lediglich in rpOspA eingebaut, das somit als Lipoprotein in Tabakchloroplasten vorliegt. Demgegenüber wurde rpOT, das keine Signalsequenz aufweist, nicht lipidiert.

### 3.1.4 Reinigung von rpOspA

Um die Struktur des lipidierten rpOspA über MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry) zu klären und zusätzlich die Immunogenität von rpOspA in Mäusen zu prüfen, musste das rekombinante Protein in reiner Form gewonnen werden. Als Reinigungsstrategie für rpOspA aus Pflanzenmaterial wurde zunächst ein etabliertes Protokoll zur Reinigung von rekombinantem OspA aus *E. coli* herangezogen (Erdile et al., 1993). Nach einer Triton X-114-Phasentrennung des Rohextraktes wurde in einem ersten Schritt die detergente Phase einer Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose unterzogen. In einem zweiten Schritt folgte eine Kationenaustausch-Chromatographie an SP-Sepharose. Anders als für Bakterien beschrieben, konnte mit diesem Reinigungsschema keine ausreichende Anreicherung des rpOspA aus transgenem Pflanzenmaterial erreicht werden. Eine Optimierung des Reinigungsprotokolls wäre daher unabdingbar gewesen, konnte aber auf Grund des schlechten Pflanzenwachstums (vgl. Kap. 3.1.3.4) und der daraus resultierenden begrenzten Menge an Blattmaterial nicht durchgeführt werden. Aus diesem Grund musste eine neue Strategie zur Gewinnung von reinem rpOspA aus Pflanzen entwickelt werden.

### 3.1.5 Klonierung eines neuen OspA-Expressionsvektors

Um rekombinantes, plastidäres OspA einer Affinitätsreinigung zugänglich zu machen, wurden Modifikationen in den verschiedenen Vektoren eingefügt. Das *ospA*-Gen wurde am 3'-Ende mit einer Nukleotidsequenz fusioniert, die für sechs zusätzliche Histidinreste codiert. Dieser „Hexa-Histidin-tag“ sollte die spätere Reinigung des rekombinanten OspAhis auch aus geringen Mengen Blattmaterial effizient ermöglichen.

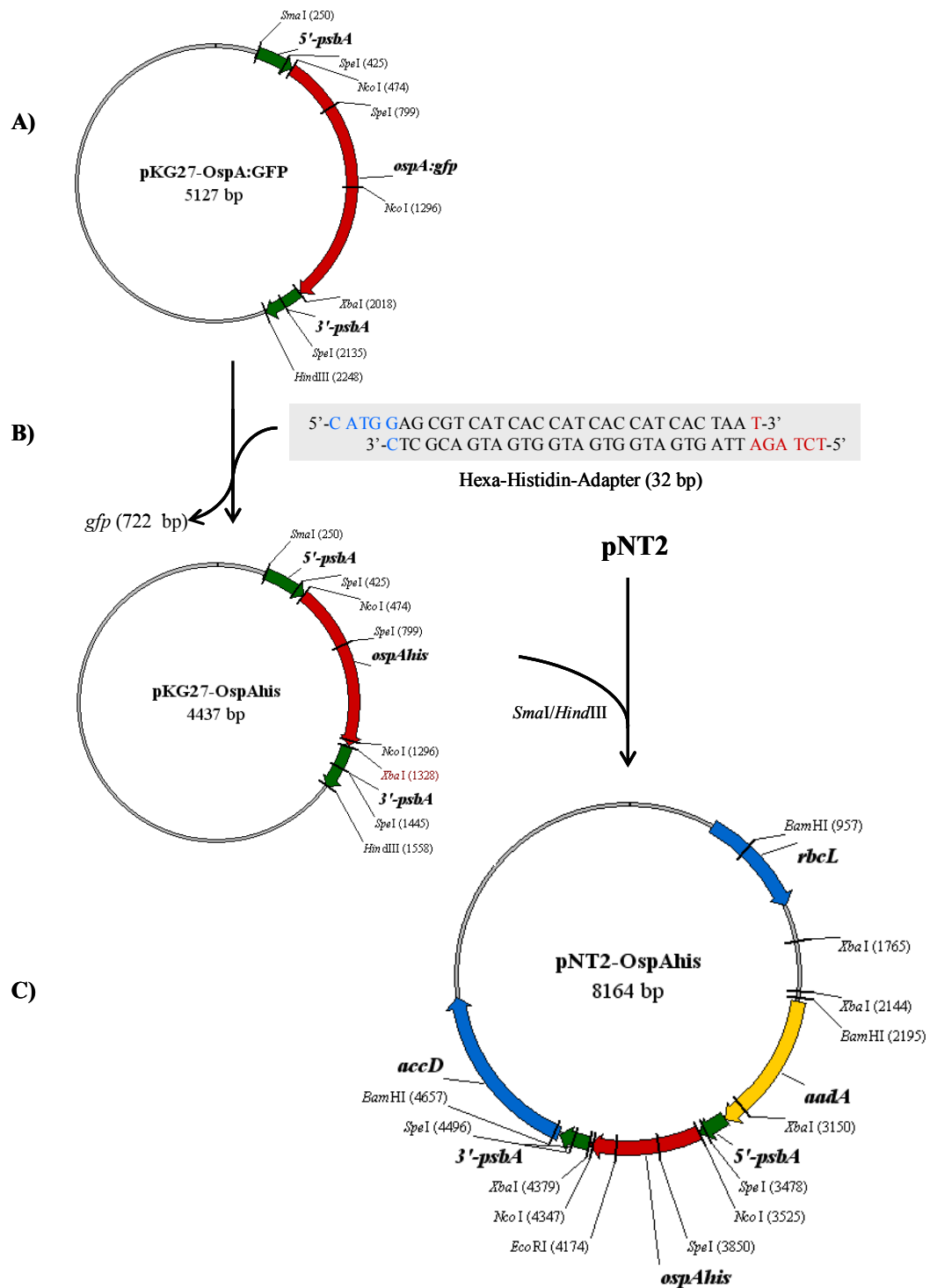
---

Für die Klonierung des neuen Vektors eignete sich der bereits vorhandene Vektor pKG27OspA:GFP (5127 bp), da hier das *ospA*-Gen kein Stopcodon aufwies (Abb. 3.12A). Somit musste lediglich das *gfp*-Gen (722 bp) aus diesem Vektor durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *XbaI* und *NcoI* entfernt und durch eine für sechs Histidine codierende Nukleotidsequenz ersetzt werden (Abb. 3.12B). Auf Grund zweier *NcoI*-Schnittstellen in dem pKG27OspA:GFP-Plasmid (Abb. 3.12A) musste auch hier ein Partialverdau durchgeführt werden. Zuerst wurde das Konstrukt mit dem Restriktionsenzym *XbaI* linearisiert. Nach Zugabe des Enzyms *NcoI* folgten die in Kapitel 2.7.3. beschriebenen Verdauzeiten. Durch die Anordnung der *NcoI*-Schnittstellen waren sechs mögliche Fragmente mit je 5127 (linearisierter Vektor), 4405, 3583, 1544, 822 und 722 bp zu erwarten. Die Bande mit 4405 bp entsprach dabei dem pKG27OspA-Fragment und konnte für die anschließende Ligation mit dem Hexa-Histidin-Adapter verwendet werden. Dieser Adapter wurde durch eine „Annealing-Reaktion“ zweier antiparalleler Oligonukleotide erzeugt (Kap. 2.7.17). Der Adapter wies am 5'-Ende einen *NcoI*-Überhang und am 3'-Ende einen *XbaI*-Überhang auf (Abb. 3.12B). Die überhängenden Enden der Ligationserdukte waren somit kompatibel und konnten miteinander ligiert werden. Der neue Subklonierungsvektor pKG27OspAhis (4437 bp) zeigte nach einem Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *SpeI* die erwarteten Fragmentgrößen (3417, 646 und 374 bp) (Abb. 3.12B).

Die weitere Ligation des *ospAhis*-Fragments mit dem Expressionsvektor pNT2 wurde wie in Kapitel 3.1.1.3 beschrieben durchgeführt. Die Identität des daraus resultierenden Expressionsvektors pNT2OspAhis (8164 bp) wurde durch einen Kontrollverdau mit den Enzymen *BamHI* und *EcoRI* überprüft und die erhaltenen Fragmente zeigten dabei die erwarteten Größen (4464, 1979, 1238 und 483 bp) (Abb. 3.12C). Daher konnte dieser neuklonierte Expressionsvektor für die Chloroplastentransformation von *N. tabacum* verwendet werden.

---





**Abb. 3.12. Schematische Darstellung der Klonierung des pNT2OspAhis-Vektors. A)** Ausgangsvektor pKG27OspA:GFP. **B)** Durch einen Austausch des *gfp*-Gens durch die Nukleotidsequenz des Hexa-Histidin-Adapters, der am 5'-Ende einen *NcoI*-kompatiblen und am 3'-Ende einen *XbaI*-kompatiblen Überhang aufweist, entstand der Vektor pKG27OspAhis. **C)** Chloroplastenexpressionsvektor pNT2OspAhis.

### 3.1.6 Identifizierung und Charakterisierung der OspAhis-Pflanzen

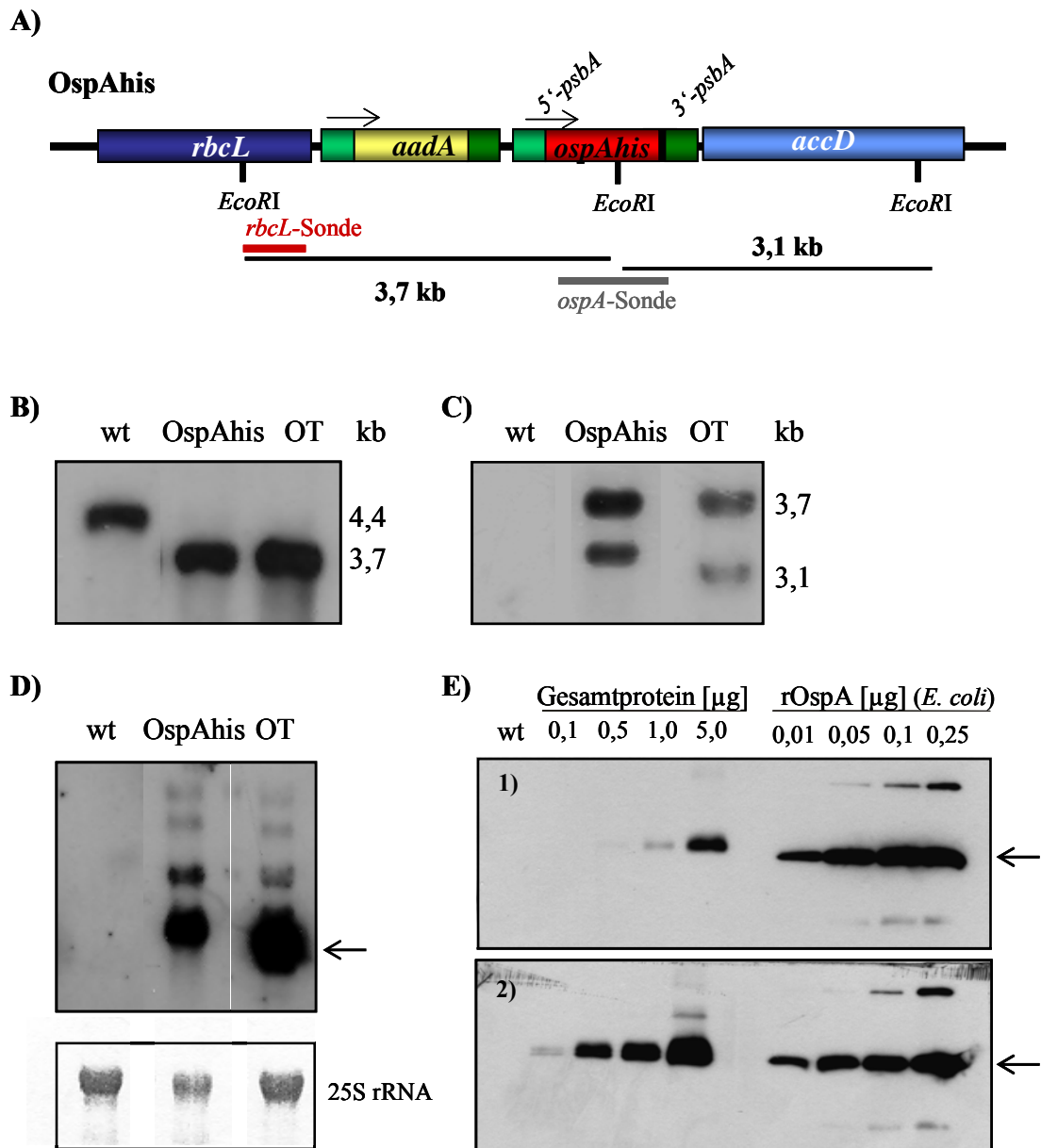
#### 3.1.6.1 Analyse der transgenen Pflanzen mittels Restriktions-Fragment-Längen-Poly-morphismus (RFLP)

Aus der Chloroplastentransformation von 20 sterilen Tabakblättern gingen zwei Transformanten hervor. Eine dieser Pflanzenlinien, OspAhis13, wurde eingehender untersucht und wird im Folgenden beschrieben und mit einer OT-Pflanze verglichen. Eine DNA-Blot-Analyse nach dem dritten Regenerationszyklus und unter Verwendung einer *rbcL*-Sonde, zeigte ausschließlich eine Bande bei 3,7 kb. Dieses Signal war transgenen Plastidengenomen zuzuordnen (Abb. 3.13A,B). Somit hatten OspAhis13-Pflanzen zu diesem Zeitpunkt bereits einen homoplastischen, transplastomen Zustand erreicht. Nach Hybridisierung der DNA mit einer *ospA*-Sonde konnten zudem die spezifischen *ospA*-Fragmente von 3,7 kb und 3,1 kb detektiert und damit die Integration des Transgens bewiesen werden (Abb. 3.13C).

#### 3.1.6.2 Expression und Akkumulation von rpOspAhis und rpOT in transgenen Pflanzen

Über die Expression des Transgens *ospAhis* sollte eine RNA-Blot-Analyse Aufschluss geben (Kap 2.8). Bei Verwendung der *ospA*-Sonde wurden ebenfalls (vgl. Kap. 3.1.3.3) mehrere Hybridisierungssignale unterschiedlicher Größe und Intensität detektiert (Abb. 3.13D). Dabei entsprach das starke Signal der Größe 1,1 -1,2 kb *ospA*- bzw. *ot*-Transkripten.

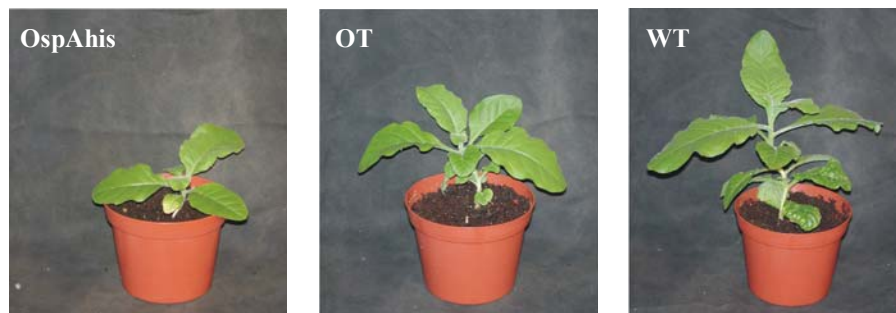
Nachdem die beiden Pflanzenlinien OspAhis und OT in homoplastischer, transplastomer Form vorlagen, wurde eine semiquantitative Bestimmung von rpOspAhis- und rpOT-Protein mittels Immuno-Blot durchgeführt. Nach der Extraktion des Gesamtproteins aus 150 mg OspAhis- und OT-Blattmaterial und anschließender Proteinbestimmung wurden jeweils unterschiedliche Mengen an Gesamtprotein (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 µg) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Zusätzlich dazu wurden als Referenz definierte Mengen von rekombinantem OspA (rOspA) aus *E. coli* aufgetragen (0,01; 0,05; 0,1; 0,25 µg). Im Anschluss an die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde ein Immuno-Blot durchgeführt (Kap. 2.9.5). Die Verdünnungsreihe von rekombinantem OspA aus *E. coli* diente der Abschätzung des rpOspA- bzw. rpOT-Gehalts in den transgenen Pflanzen. Aufgrund der detektierten Signalintensitäten konnte der rpOspAhis-Anteil am löslichen Gesamtprotein (LGP) auf ca. 1% abgeschätzt werden (Abb. 3.13E1). Im Gegensatz dazu wurde in der Pflanzenlinie OT die 10-fache Menge an rekombinantem Protein detektiert. Der rpOT-Anteil beträgt somit ca. 10% des LGP (Abb. 3.13E2).



**Abb. 3.13. Untersuchung der transgenen OspAHis- und OT-Pflanzen.** **A)** Ausschnitt eines transgenen OspAHis-Plastidengenoms. Die nach einem *EcoRI*-Restriktionsverdau resultierenden Fragmente sind dargestellt. **B)** DNA-Blot-Analyse der transgenen OspAHis- und OT-Pflanze. Hybridisierung der DNA mit einer *rbcL*-Sonde. Spur 1: Die Wildtyp-Pflanze zeigte eine Bande bei 4,4 kb. Bei den transgenen Pflanzen (Spur 2: OspAHis. Spur 3: OT) hingegen wurde jeweils ein Signal bei 3,7 kb detektiert. Diese Fragmente repräsentierten transgene Chloroplastengenome. **C)** Hybridisierung der DNA mit einer *ospA*-Sonde. Die transgenen Pflanzen (Spur 2 und 3) zeigten zwei Banden der Größen 3,7 und 3,1 kb, während im Wildtyp (Spur 1) kein Signal detektierbar war. **D)** Akkumulation von *ospAHis*- bzw. *ot*-mRNA in den transgenen Pflanzen. *ospA*- und *ot*-mRNA von ca. 1,1-1,2 kb sind durch einem Pfeil gekennzeichnet. **E)** Immuno-Blot zur Quantifizierung des rpOspAHis- bzw. rpOT-Anteils in den transgenen Pflanzen. Dafür wurden unterschiedliche Mengen [µg] an Gesamtprotein der OspAHis-Pflanze (1) bzw. der OT-Pflanze (2) aufgetragen. Zur Abschätzung des rpOspAHis- bzw. rpOT-Gehalts in den transgenen Pflanzen wurden definierte Mengen [µg] an rekombinantem OspA aus *E. coli* aufgetragen. Die monomere OspA-Form ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

### 3.1.6.3 Phänotypen der transgenen Pflanzen

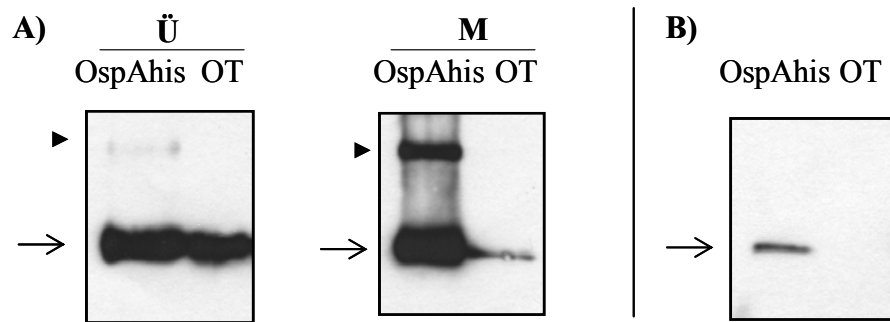
Die OspAhis-Pflanze zeichnete sich im Gegensatz zu Pflanzen mit OspA ohne Histidin-Modifikation (vgl. Kap 3.1.3) durch eine gesteigerte Vitalität aus. Nach Erreichen eines stabilen homoplastischen, transplastomen Zustands konnten OspAhis-Pflanzen im Gewächshaus kultiviert werden. Dabei zeigten sowohl OspAhis-Pflanzen als auch OT-Pflanzen einen langsameren, aber normalen Wuchs im Vergleich zu Wildtyp-Tabakpflanzen (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14. Phänotypen der Pflanzen OspAhis, OT und WT.** Bei der Kultivierung der transgenen Pflanzen im Gewächshaus zeigten sowohl OspAhis- als auch OT-Pflanzen einen verlangsamten Wuchs im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (WT).

### 3.1.6.4 Untersuchungen zur Membranassoziation von rpOspAhis

Um zu überprüfen, ob die zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren zu einem unterschiedlichen Verhalten des rpOspAhis-Proteins bezüglich Membranassoziation und Lipidierung führten, wurden auch mit den neuen OspAhis-Pflanzen entsprechende Untersuchungen durchgeführt (vgl. Kap. 3.1.3.5; 3.1.3.6). Nach einer Mikrosomenpräparation zeigte eine Immuno-Blot-Untersuchung, dass rpOspAhis sowohl in der mikrosomalen (M) als auch in der wässrigen Phase (Ü) auftrat (Abb. 3.15A). Darüber hinaus war rpOspAhis auch in Chloroplastenmembranen detektierbar (Abb. 3.15B). Dadurch konnte gezeigt werden, dass auch rpOspAhis sowohl in einer membranverankerten Form als auch in einer löslichen Form in Chloroplasten von *N. tabacum* vorliegt. Rekombinantes OspAhis zeigte somit bezüglich der Membranassoziation ähnliche Charakteristika wie rpOspA ohne Histidin-Modifikation (vgl. Kap. 3.1.3.5).



**Abb. 3.15. Membranassoziation von rpOspAHis und rpOT in den transgenen Pflanzen OspAHis und OT.** A) Immuno-Blot der nach einer Mikrosomen-Präparation erhaltenen Fraktionen (Ü=Überstand; M=Mikrosomenpellet). Rekombinante OspAHis bzw. OT (→) OspAHis-Dimere (▶). B) Immuno-Blot der Membranfraktion, die sich bei der Isolierung von Chloroplasten anreichert. Rekombinante OspAHis-Monomere (→).

### 3.1.6.5 Lipidierung von rpOspAHis

Im Folgenden wurde auch rpOspAHis durch Inkorporation von [9,10-<sup>3</sup>H]-Palmitinsäure auf eventuelle Lipidierung untersucht (vgl. 3.1.3.6). Dabei zeigte die fluorographische Detektion deutlich, dass Palmitinsäure an rpOspAHis gebunden wurde und demnach kein Unterschied zum rpOspA ohne Histidin-Modifikation bestand (Abb. 3.16A, Spur 1).

In weiteren <sup>3</sup>H-Experimenten an Protoplasten sollte geprüft werden, wie sich der Einsatz verschiedener Inhibitoren der Fettsäuremodifikation auf die Einbaurate von Palmitinsäure in rpOspAHis auswirkt. In einem ersten Versuch wurde die Wirkung des zyklischen Antibiotikums Globomycin, einem Inhibitor der prokaryotischen Lipidmodifikation, untersucht. In einem zweiten Ansatz sollte der Effekt eines Inhibitors der eukaryotischen Fettsäuremodifikation, 2-Bromopalmitat, geprüft werden.

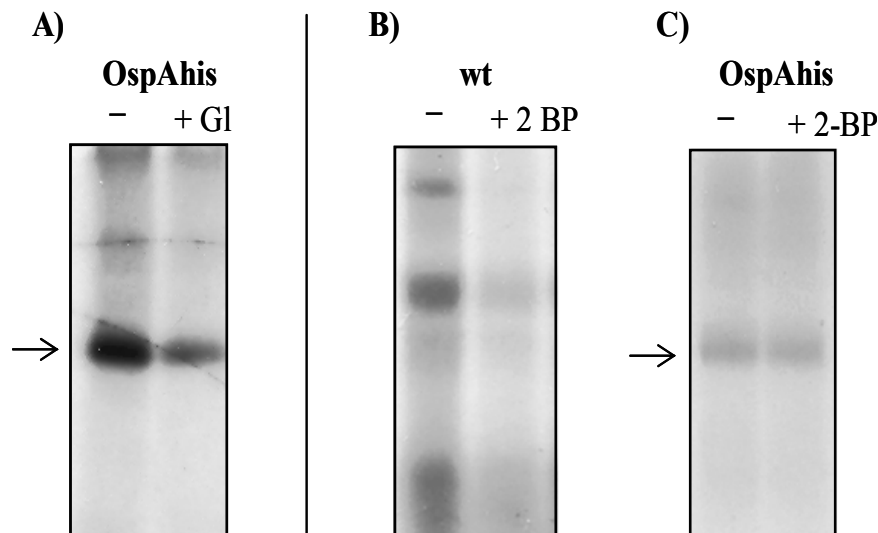
#### Effekt von Globomycin auf rpOspAHis-Lipidierung

Bei der Lipidierung von Proteinen in gram-negativen Bakterien wird ein Prolipoprotein unter Mitwirkung dreier Enzyme (Lgt, Lsp und Lnt) in einem mehrstufigen Prozess mit einer Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur versehen (Abb. 1.2). Das erste Enzym (Lgt) fügt dabei ein Dipalmitylglycerin über eine Thioetherbindung an ein konserviertes Cystein innerhalb einer N-terminalen Signalsequenz. Nach dem Transport über die Cytoplasmamembran und der

Prozessierung der Signalsequenz durch die Signal-Peptidase II (Lsp) wird an die freie Aminogruppe des nun endständigen Cysteins eine weitere Palmitinsäure durch das Enzym Lnt geknüpft. Das daraus resultierende Lipoprotein weist am N-Terminus eine Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur auf (Sankaran & Wu, 1994; vgl. Kap. 1.3, Abb.1.2).

Das zweite Enzym dieses prokaryotischen Modifikationsweges, die Signal-Peptidase II (Lsp), kann durch das zyklische Antibiotikum Globomycin spezifisch gehemmt werden. Bei Inkubation von *ospA*-exprimierenden *E. coli*-Bakterien mit Globomycin ergeben sich nach SDS-PAGE und Immuno-Blot-Analyse zwei Banden unterschiedlicher Größe. Eine davon entspricht dem vollständig lipidierten OspA, die zweite, etwas größere Bande, repräsentiert ein Intermediat des Modifikationsweges. Da bei der Blockierung der Signal-Peptidase II durch Globomycin der Lipidierungsmechanismus nach dem Anheften eines Dipalmityl-glycerins an das Cystein unterbrochen wird, besitzt das resultierende Produkt noch die N-terminale Signalsequenz (vgl. Abb. 1.2). Dieses Intermediat ist folglich um 16-20 Aminosäuren größer und legt daher eine kürzere Wegstrecke auf einem SDS-Gel zurück (Inukai et al., 1986; Hussain & Mizushima, 1980).

Um den Effekt von Globomycin auf die Modifikation des rekombinanten OspA in Chloroplasten zu testen, wurden Protoplasten der Pflanzenlinie OspAhis13 für eine Stunde



**Abb. 3.16. Fluorographische Detektion der *In vivo*-Isotopen-Markierung von OspAhis- und Wildtyp-Protoplasten.** **A)** Einfluss von Globomycin auf rpOspAhis-Palmitylierung. Spur 1: OspAhis-Protoplasten. Spur 2: OspAhis-Protoplasten, die mit dem Antibiotikum Globomycin (Gl) behandelt wurden. rpOspAhis ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. **B)** und **C)** Einfluss von 2-Bromopalmitat (2-BP), einem spezifischen Inhibitor von Palmityl-Acyl-Transferasen (PAT), auf die Palmitylierung von Proteinen in Pflanzen (**B**) und auf rpOspAhis-Palmitylierung. (**C**). **B)** Spur 1: unbehandelte Wildtyp-Protoplasten. Spur 2: mit 2-Bromopalmitat behandelte Wildtyp-Protoplasten. **C)** Spur 1: unbehandelte OspAhis-Protoplasten. Spur 2: mit 2-Bromopalmitat behandelte OspAhis-Protoplasten. rpOspAhis (→).

mit Globomycin vorinkubiert. Im Anschluss daran wurde die Probe mit radioaktiv-markierter Palmitinsäure versetzt (Kap. 2.13.3) und für weitere vier Stunden inkubiert. Nach einer anschließenden Immunopräzipitation wurde rpOspAhis über ein SDS-Gel separiert und fluorographisch detektiert.

Unterliegt rpOspA in Plastiden entsprechend der prokaryotischen Modifikation (Pam<sub>3</sub>Cys), einer vollständigen Lipidierung dann sollte durch den Einsatz von Globomycin, eine größere Bande erhalten werden als in der unbehandelten Kontrolle.

Fluorographisch wurde jedoch ein Signal detektiert, das die gleiche elektrophoretische Mobilität aufwies wie das in der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.16A). Daraus lässt sich schließen, dass der Inhibitor der Signal-Peptidase II, Globomycin, keinen Einfluß auf den plastidären Lipidierungsmechanismus von rekombinantem OspA hat.

Für die Enzyme Lgt und Lnt, die bei prokaryotischer Lipidmodifikation Fettsäuren an die Lipoproteine binden, standen keine geeigneten Inhibitoren zu Verfügung. Daher konnte eine eventuelle Beteiligung von Lgt- oder Lnt-Orthologen an der Lipidierung von rpOspAhis in Chloroplasten auf diesem Wege nicht untersucht werden.

### **Effekt von 2-Bromopalmitat auf rpOspAhis-Lipidierung**

Im Gegensatz zu Prokaryoten werden in Eukaryoten zahlreiche Proteine durch die direkte Bindung einer Palmitinsäure an die SH-Gruppe eines Cysteins über eine Thioesterbindung lipidiert. Diese Modifikation wird von Palmityl-Acyl-Transferasen (PATs) katalysiert (Bijlmakers & Marsch, 2003). Als spezifischer Inhibitor für PATs wurde 2-Bromopalmitat (2-BP) identifiziert (Webb et al., 2000).

Da PATs bislang nur aus Hefen und humanen Erythrozyten isoliert und genauer charakterisiert wurden (Lobo et al., 2002; Roth et al., 2002; Das et al., 1997), musste in einem Vorversuch der allgemeine Einfluß des PAT-Inhibitors 2-BP auf die Palmitylierung von Proteinen in Tabakpflanzen untersucht werden. Dafür wurden Wildtyp-Protoplasten für 40 min mit 2-BP (100 µM in 0,1%igem DMSO) inkubiert (Kap. 2.13.3). In einem parallelen Kontrollansatz wurden Wildtyp-Protoplasten lediglich in 0,1%igem DMSO vorbehandelt. Anschließend wurden beide Proben mit [9,10-<sup>3</sup>H]-Palmitinsäure versetzt. Im Anschluss an eine 4-stündige Inkubation unter Dauerlicht wurden die Proben über ein SDS-Gel aufgetrennt. Für den Fall, dass PATs an der Palmitylierung von Proteinen in Tabakpflanzen beteiligt sind, sollten in der 2-BP-behandelten Probe schwächere oder gar keine fluorographischen Signale detektierbar sein.

Entsprechend dieser Annahme zeigte die mit 2-BP behandelte Wildtyp-Probe schwächere Signale als die unbehandelte Kontrolle (Abb. 3.16B). Daraus lässt sich schließen, dass unter den hier beschriebenen Bedingungen 2-BP zumindest teilweise die Palmytylierung von Proteinen in Pflanzen beeinträchtigt. Allerdings lässt sich gegenwärtig keine Aussage über die Identität der palmytylierten Tabakproteine treffen.

Anschließend wurde der Einfluß von 2-BP auf die Palmytylierung von rpOspAhis untersucht. Dafür wurden isolierte OspAhis-Protoplasten ebenfalls für 40 min mit 2-Bromopalmitat (100  $\mu$ M) inkubiert und anschließend mit  $^3$ H-markierter Palmitinsäure (200  $\mu$ Ci) versetzt (Kap. 2.13.3). Als Kontrolle wurden Protoplasten in 0,1%igem DMSO vorbehandelt. Nach Inkubation der beiden Proben mit [9,10- $^3$ H]-Palmitinsäure für vier Stunden unter Dauerbeleuchtung wurde rpOspAhis spezifisch durch Immunopräzipitation angereichert und über ein SDS-Gel aufgetrennt.

Falls rpOspAhis in Chloroplasten einer Lipidierung durch PATs unterliegt, dann sollte beim Einsatz von 2-BP die Palmytylierungsrate, ähnlich wie bei Wildtyp-Protoplasten zurückgehen und das detektierte Signal schwächer erscheinen als in der unbehandelten Kontrolle oder ganz fehlen.

Die durch die fluorographische Detektion erhaltenen Signale zeigten jedoch für rpOspAhis keinen Intensitätsunterschied zwischen der 2-BP-behandelten Probe und der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.16C). Daraus lässt sich schließen, dass der PAT-Inhibitor 2-BP keinen Einfluss auf die Palmytylierung von rekombinantem OspA in Chloroplasten ausübt.

### 3.1.7 Reinigung von rpOspAhis

Um weitere Untersuchungen an rpOspAhis durchführen zu können, war es erforderlich, das Protein in reiner Form zu gewinnen. Als Reinigungsstrategie für rpOspAhis aus Pflanzenmaterial war ein zweistufiges Reinigungsschema mittels Metallaffinitäts-Chromatographie vorgesehen.

Die erste Affinitäts-Chromatographie diente der Isolierung des gesamten rpOspAhis unabhängig von dessen Lipidierungsstatus. Die Reinigung wurde entsprechend dem Protokoll (Kap. 2.9.6) mit einem Proteinextrakt aus 5 g Blattmaterial an Nickel-Sepharose durchgeführt. Die Elutionsfraktion wurde im Anschluss daran einer Triton X-114-Phasentrennung bei 37°C unterzogen (2.9.6) (Bordier, 1981). Dadurch sollte unmodifiziertes und somit lösliches rpOspAhis aus der Probe entfernt werden. Das Detergenz Triton X-114 bildet bei Erwärmung über 30°C Micellen, in die lipophile Substanzen eingeschlossen werden. Nach

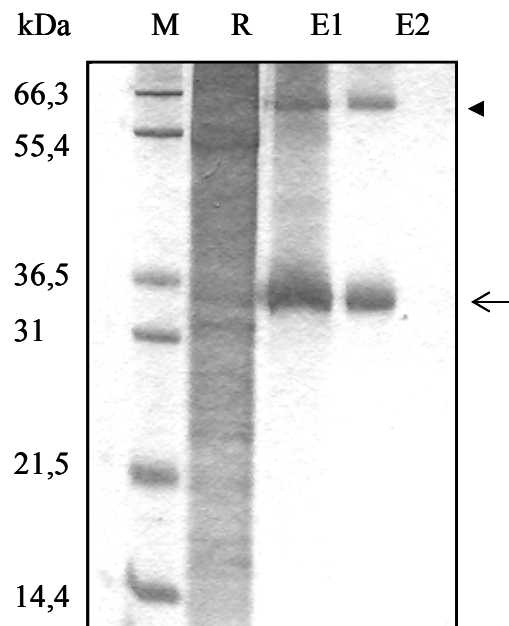
---



Zentrifugation bei 30°C können somit wässrige Bestandteile von lipophilen Komponenten grob getrennt werden. Die detergente Phase, in der sich überwiegend lipidmodifiziertes rpOspAhis befinden sollte, wurde anschließend für die zweite Metallaffinitäts-Chromatographie herangezogen. Diese wurde mit *MagneHis™ Ni-Particles* durchgeführt (Kap. 2.9.6) und diente hauptsächlich der Entfernung des Detergenzes Triton X-114 sowie des hohen Salzanteils (NaCl und Imidazol), der zur Elution des gebundenen rpOspAhis von der Nickel-Sephrose eingesetzt wurde. Der Rohextrakt sowie die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden zur Überprüfung des Reinigungserfolges über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt (Abb. 3.17; Kap. 2.9.3; 2.9.4). Auf Grund des rpOspAhis-Anteils von nur 1% des löslichen Gesamtproteins, war im Rohextrakt keine dem rpOspAhis entsprechende, dominante Bande zu erkennen. In den beiden Elutionsfraktionen hingegen konnten zwei deutlich getrennte Banden dokumentiert werden. Die intensivere Bande, die ein Molekulargewicht von ca. 34 kDa auf dem Gel aufwies, repräsentierte das gereinigte rpOspAhis-Protein. Die zweite, etwas schwächere Bande hingegen zeigte ein Molekulargewicht von ca. 66,0 kDa und repräsentierte ein rpOspAhis-Dimer. Mit diesem Reinigungsprotokoll wurde eine rpOspAhis-Ausbeute von ca. 10% erzielt. Demzufolge erwies sich diese Methode als geeignet, rpOspAhis aus Pflanzenmaterial aufzureinigen.

Gereinigtes rpOspAhis stand nun für Analysen zur Aufklärung der molekularen Masse sowie für immunologische Untersuchungen zur Verfügung (vgl. Kap. 3.1.8; 3.1.9).

---



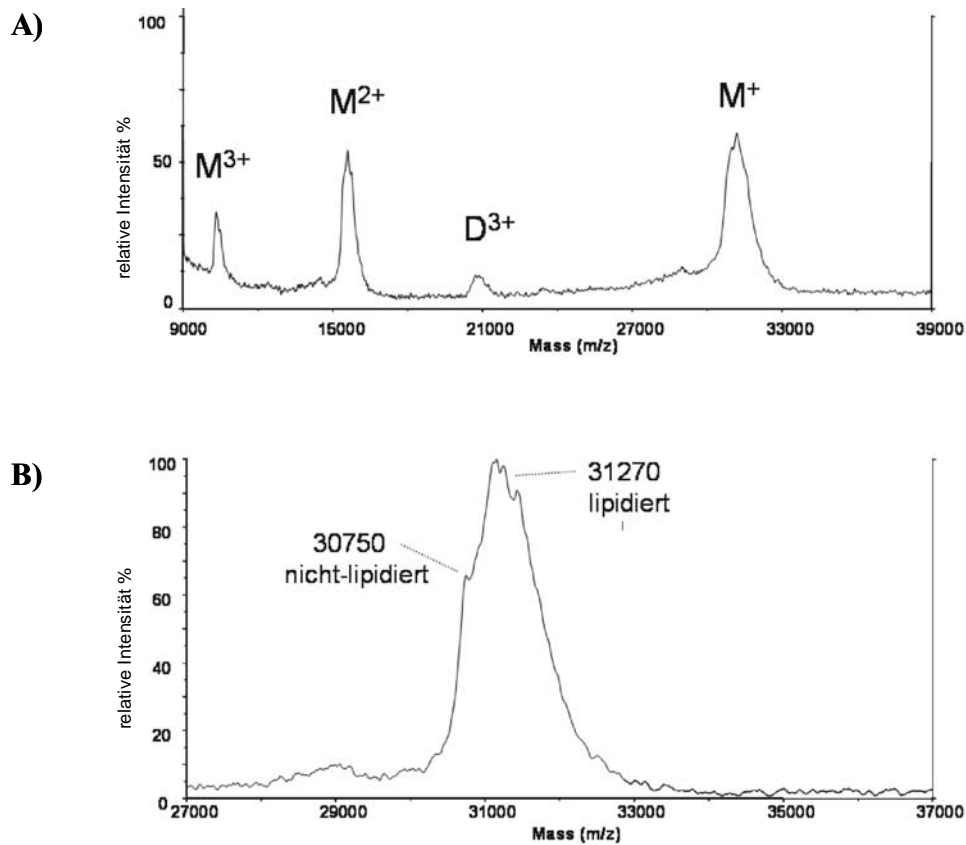
**Abb. 3.17. SDS-Gelelektrophorese der Fraktionen nach der Reinigung von rpOspAHis aus Pflanzenmaterial.** Spur M: Molekulargewichtsgrößenstandard. Spur R: Rohextrakt. Spur E1: Elution nach Nickel-Sepharose. Spur E2: Elution nach *MagneHis*<sup>TM</sup>Ni-Partikeln. Monomeres rpOspAHis (→) dimeres rpOspAHis (▶).

### 3.1.8 MALDI-TOF-MS-Untersuchung von plastidärem OspA

Zur Bestimmung der Molekülmasse von gereinigtem rpOspAHis wurde eine MALDI-TOF-MS-Analyse von Dr. Bernadette Bouchon am INSERM in Clermont-Ferrand durchgeführt (Kap. 2.15). Dabei konnte monomeres rpOspAHis (M) in einfacher ( $M^+$ ), doppelter ( $M^{2+}$ ) und dreifacher ( $M^{3+}$ ) Ionisierung detektiert werden. Zusätzlich wurde ein dreifach ionisiertes Dimer ( $D^{3+}$ ) gefunden (Abb. 18A). Das Massenspektrum des einfach ionisierten Proteins zeigte eine heterogene Zusammensetzung der Komponenten. Eine Komponente davon wies die Masse von nicht-lipidiertem rpOspAHis auf ( $m/z$  30750) (Abb. 18B). Demgegenüber zeigte die Hauptkomponente eine Masse von  $m/z$  31270, die einem rpOspAHis mit Dipalmitylglycerin inklusive der N-terminalen Signalsequenz entsprach (Abb. 18B). Die Heterogenität der Komponenten ist auf den Einbau von Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen und Sättigungsgrade (Palmitinsäure, Palmitoleinsäure, Ölsäure usw.) zurückzuführen. Darüberhinaus ist es denkbar, dass sowohl die Diacylglycerinmoleküle als

auch die Proteinmoleküle in oxidiert Form vorliegen können (Bouchon et al., 1997). Daher war es kaum möglich jede einzelne Komponente exakt zu bestimmen.

Nichtsdestotrotz zeigten diese Analyse von rpOspAhis eindeutig, dass Tabakchloroplasten in der Lage sind, Diacylglycerin an rekombinantes OspA anzufügen. Die durchgeführte Modifikation entspricht dabei dem ersten Schritt des bakteriellen Lipidierungsweges, bei dem das Enzym Lgt ein Diacylglycerin an ein konserviertes Cystein innerhalb einer Signalsequenz bindet.



**Abb. 3.18 MALDI-TOF Massenspektrum von rpOspAhis.** **A)** Im analysierten Massenbereich konnte rpOspAhis als einfach- (+) doppelt- (2+) und dreifach- (3+) ionisiertes Monomer (M) detekiert werden. Darüber hinaus wurde ein dreifach-ionisiertes Dimer (D<sup>3+</sup>) gefunden. **B)** Das Massenspektrum des einfach-ionisierten Monomers zeigte eine heterogene Zusammensetzung der Komponenten. Eine Masse von m/z 30750 konnte nicht-lipidiertem rpOspAhis zugeordnet werden, während die Masse von m/z 31270 rpOspAhis mit Dipalmitylglycerin inklusive der N-terminalen Signalsequenz entsprach.

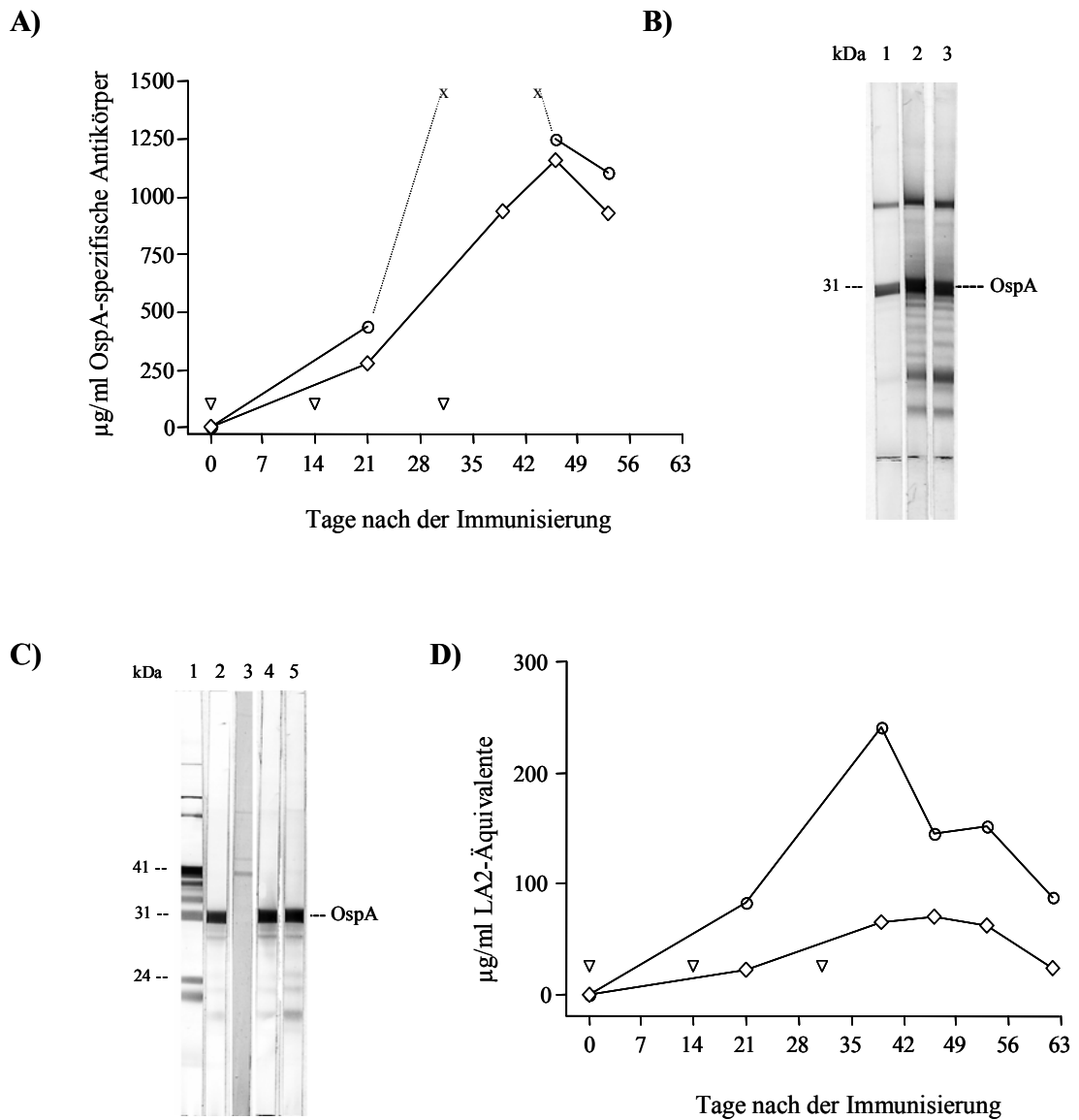
### 3.1.9 Immunologische Untersuchungen mit plastidärem OspA<sub>His</sub> an Mäusen

Ein Hauptziel dieses Projektes war es, eine alternative Impfstoffproduktion für OspA in Pflanzen zu etablieren. Daher wurden mit dem gereinigten rpOspA<sub>His</sub> immunologische Untersuchungen an einem etablierten Mausmodell von Prof. Markus Simon und Herrn Thomas Stehle im Max-Planck-Institut in Freiburg durchgeführt.

Um zu prüfen, ob rpOspA<sub>His</sub> die Bildung neutralisierender Antikörper in Mäusen stimuliert, wurden je drei BALB/c Mäuse mit ca. 10 µg rpOspA<sub>His</sub> oder als Kontrolle mit 10 µg rekombinantem (r) OspA aus *E. coli* (Steere et al., 1998) in Kombination mit MPL-TDM-Adjuvans parenteral immunisiert. Eine Auffrischung erfolgte an den Tagen 14 und 30 nach der ersten Immunisierung (post immunization, pi). Blutproben wurden an den Tagen 21, 40, 45 und 56 nach der ersten Injektion entnommen und auf OspA-spezifische Antikörper untersucht (Kap. 2.16). Die ELISA-Untersuchungen der Blutproben zeigten, dass sowohl bakterielles als auch plastidäres OspA über einen Zeitraum von 56 Tagen OspA-spezifische Antikörper induzierten (Abb. 3.19A). Die durch plastidäres OspA induzierte Immunantwort war im Vergleich zu der von bakteriellem OspA etwas schwächer. Der Verlauf der beiden Immunantworten war jedoch vergleichbar. Lediglich an Tag 40 pi wurde in den Immunsereen der mit bakteriellem OspA immunisierten Mäuse ein stark abweichender Wert gemessen (bakterielles OspA 2900 µg/ml; rpOspA 850 µg/ml) (Abb. 3.19A).

Unter Verwendung sowohl von rekombinantem OspA aus *E. coli* als auch eines *Borellia burgdorferi*-Zelllysats als Antigen wurde die Spezifität der in Versuch-Mäusen gebildeten Antikörper durch einen Immuno-Blot getestet (Abb. 3.19B,C). Dabei konnten, mit Ausnahme des Serums der nicht immunisierten Mäuse (Negativkontrolle), in allen verwendeten Immunsereen OspA-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurden die Blutproben auf LA-2-Äquivalente untersucht. Diese Antikörper sind gegen das protektive LA-2-Epitop von OspA gerichtet (Schaible et al., 1990). Die ELISA-Untersuchungen ergaben dabei, dass bei rpOspA-immunisierten Mäusen diese LA-2-Äquivalente ein Zehntel der gesamten anti-OspA-Antikörpermenge ausmachten, während bei rOspA (*E. coli*)-immunisierten Mäusen, der LA-2-Äquivalent-Anteil ein Fünftel aller OspA-spezifischen Antikörper betrug (Abb. 3.19D).



**Abb. 3.19. Immunologische Untersuchung von rpOspAhis aus Tabakchloroplasten und rekombinantem OspA aus *E. coli*.** BALB/c Mäuse wurden mit rpOspA ( $\diamond$ ) (ca. 10  $\mu\text{g}$ /Maus subkutan, Schwanzwurzel) bzw. rOspA aus *E. coli* ( $\circ$ ) (10  $\mu\text{g}$ /Maus subkutan, Schwanzwurzel) immunisiert. Auffrischungen erfolgten an den Tagen 14 und 30 nach der ersten Immunisierung. Serum-Pools ( $n=3$  pro Gruppe) wurden mittels ELISA auf OspA-spezifische Antikörper (A) sowie auf LA-2-Äquivalente (D) untersucht. Die mit x gekennzeichneten Werte sind Ausreisser. B) Immuno-Blot-Analysen der Serum-Pools von Tag 21 mit rOspA (250 ng/Spur) und C) *Borrelia burgdorferi*-Zelllysate ( $2 \times 10^6$  Zellen/Spur) als Antigen. B) Spur 1: Referenz-Serum von mit OspA-Vakzin immunisierten BALB/c Mäusen. Spur 2: Immunsereum der mit OspA aus *E. coli* immunisierten BALB/c-Mäusen. Spur 3: Immunsereum der mit plastidärem OspAhis immunisierten BALB/c Mäusen. C) Spur 1: Standard Antikörpermix. Spur 2: Referenz-Serum von mit rOspA immunisierten BALB/c Mäuse. Spur 3: Negativkontrolle, Serum nicht-immunisierten BALB/c Mäuse. Spur 4: Immunsereum der mit OspA aus *E. coli* immunisierten BALB/c-Mäusen. Spur 5: Immunsereum der mit plastidärem OspAhis immunisierten BALB/c Mäuse.

Somit konnte mit diesen immunologischen Untersuchungen eindeutig gezeigt werden, dass rekombinantes, plastidäres OspA in Mäusen immunogen wirkt. In Anbetracht dessen, dass bereits 5 µg LA-2-ähnliche OspA-reaktive Antikörper pro Maus ausreichen, die Versuchstiere vor einer *B. burgdorferi*-Infektion zu schützen, stellt plastidäres OspA eine passende Alternative zu bakteriellem OspA-Vakzin dar.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der vorliegenden Arbeit die Bildung des bakteriellen Lipoproteins OspA in Tabakchloroplasten eindeutig gezeigt werden. Dabei akkumulierte OspA sowohl in einer lipidmodifizierten, membrangebundenen als auch in einer löslichen Form in Tabakchloroplasten. Strukturelle Untersuchungen von rpOspA ergaben, dass in Chloroplasten eine Bakterien-ähnliche Lipidierung an dem Protein durchgeführt wurde und diese vom Vorhandensein einer N-terminalen Signalsequenz abhängig ist. Anders als in Bakterien wird jedoch diese Signalsequenz in Chloroplasten nicht proteolytisch abgespalten. Nichtsdestotrotz konnte mit rekombinatem, plastidärem OspA eine Immunantwort in Mäusen induziert werden, die der des kommerziell erhältlichen OspA-Vakzins ähnlich war.

## 3.2 Poly- und bicistronische Operone

Die post-translationale Prozessierung bakterieller Lipoproteine wird in gram-negativen Bakterien von drei Enzymen durchgeführt: Phosphatidylglycerin:Prolipoprotein-Diacylglycerin-Transferase (Lgt), Signal-Peptidase II (Lsp) und Phospholipid:Apolipoprotein-Transacylase (Lnt) (vgl. Abb. 1.2). Durch eine Datenbankanalyse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) wurde geprüft, ob Orthologe der für diese Proteine kodierenden Gene auch in Pflanzen vorkommen. Es konnten jedoch keine offensichtlich homologen Gene unter den bislang veröffentlichten pflanzlichen Genen identifiziert werden.

Aus diesem Grund wurde parallel zu den bisher beschriebenen Experimenten ein polycistronisches Operon kloniert, das sich aus dem *ospA*-Gen und den Genen (*lgt*, *lsp*, *lnt*) der drei lipidmodifizierenden Enzyme zusammensetzte. Durch die gleichzeitige Bereitstellung des Lipoproteins und der drei modifizierenden Enzyme in den Chloroplasten von *N. tabacum* sollte eine korrekte und quantitative Prozessierung des rpOspA gewährleistet werden.

Zusätzlich wurden auch bicistronische Operone kloniert, die sich aus dem *ospA*-Gen und jeweils nur einem Gen der drei modifizierenden Enzyme zusammensetzten. Hierdurch sollte geprüft werden, inwieweit die Präsenz einzelner, modifizierender Enzyme die Palmitylierung von plastidärem OspA verstärken kann. Wie sich durch frühere Arbeiten gezeigt hatte, wird OspA aus *B. burgdorferi* in *E. coli* korrekt prozessiert (Steere et al., 1998; Erdile et al., 1993). Dies zeigt, dass die *E. coli*-Enzyme in der Lage sind, die Signalsequenz von Lipoproteinen anderer Prokaryoten zu erkennen. Aufgrund der leichteren Verfügbarkeit wurden deshalb die Gene *lgt*, *lsp* und *lnt* aus einem *E. coli*-K12-Stamm kloniert und für die Konstruktion der entsprechenden Vektoren herangezogen.

### 3.2.1 Klonierung poly- und bicistronischer Chloroplastenexpressionsvektoren

Als Ausgangspunkt für die Klonierung des polycistronischen Operons eigneten sich die Vektoren pKG27OspA und pKG27OspAhis. Die bakteriellen Gene *lgt* (877 bp), *lsp* (496 bp) und *lnt* (1539 bp) wurden mit Ribosomenbindestellen (RBS) versehen und sukzessive in den Vektor pCR2.1 kloniert (pCR2.1lgt-lsp-lnt, 6790 bp; H. Warzecha). Als RBS wurde die Sequenz GGGAGGG im Kontext AGTTGTAGGGAGGGATCG ausgewählt, da ihre Funktion bereits experimentell in Tabakpflanzen bestätigt wurde (Staub & Maliga, 1995). Aus dem Vektor pCR2.1lgt-lsp-lnt konnte das gesamte Fragment, bestehend aus *lgt*, *lsp* und

---

*Int* (2982 bp), mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Xho*I ausgeschnitten werden. Parallel wurden die Vektoren pKG27OspA und pKG27OspAhis mit dem Enzym *Xba*I linearisiert. Nach einer Behandlung der Vektoren und des zu integrierenden Fragments (*lgt-lsp-Int*) mit Klenow-Polymerase wurden diese ligiert und in *E. coli* transformiert (Kap. 2.7). Zur Überprüfung der Orientierung des eingefügten Fragments, die bei dieser „blunt end“-Ligation für eine korrekte Expression der Gene *lgt*, *lsp* und *Int* entscheidend war, wurden transformierte Bakterien mittels PCR unter Verwendung des Primerpaares 5'-*ospA* und 3'-*lsp* identifiziert (Tab. 2.6). Bei richtiger Orientierung resultierte ein 1,3 kb großes PCR-Produkt, während bei falscher Orientierung kein PCR-Produkt entstand. Die neuen Plasmide (pKG27OspAIII: 7449 bp; pKG27OspAhisIII: 7481 bp) wurden durch einen Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *Spe*I überprüft. Die resultierenden Fragmentgrößen entsprachen dabei den errechneten Werten 3660, 3417 und 372 bp (pKG27OspAIII) (Abb. 3.20A) bzw. 3692, 3417 und 372 bp (pKG27OspAhisIII) (Abb. 3.20B). Die ca. 4,3 kb großen Operonfragmente aus den Genen *ospA* bzw. *ospAhis* sowie *lgt*, *lsp* und *Int* inklusive der Kontrollelemente (5'-*psbA* und 3'-*psbA*) wurden durch einen Verdau mit den Enzymen *Sma*I und *Hind*III aus den Vektoren pKG27OspAIII und pKG27OspAhisIII ausgeschnitten und wie in Kapitel 3.1.1.3 beschrieben mit dem Expressionsvektor pNT2 ligiert. Die neuen Plasmide pNT2OspAIII (11182 bp) (Abb. 3.20A) und pNT2OspAhisIII (11214 bp) (Abb. 3.20B) wurden ebenfalls durch einen abschließenden Kontrollverdau mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RI überprüft. Die resultierenden Fragmentgrößen entsprachen dabei den errechneten Werten (pNT2OspAIII: 4464, 1979, 1899, 1238, 1083, und 519 bp; pNT2OspAhisIII: 4464, 1981, 1899, 1238, 1113 und 519 bp) (Abb. 3.20).

---



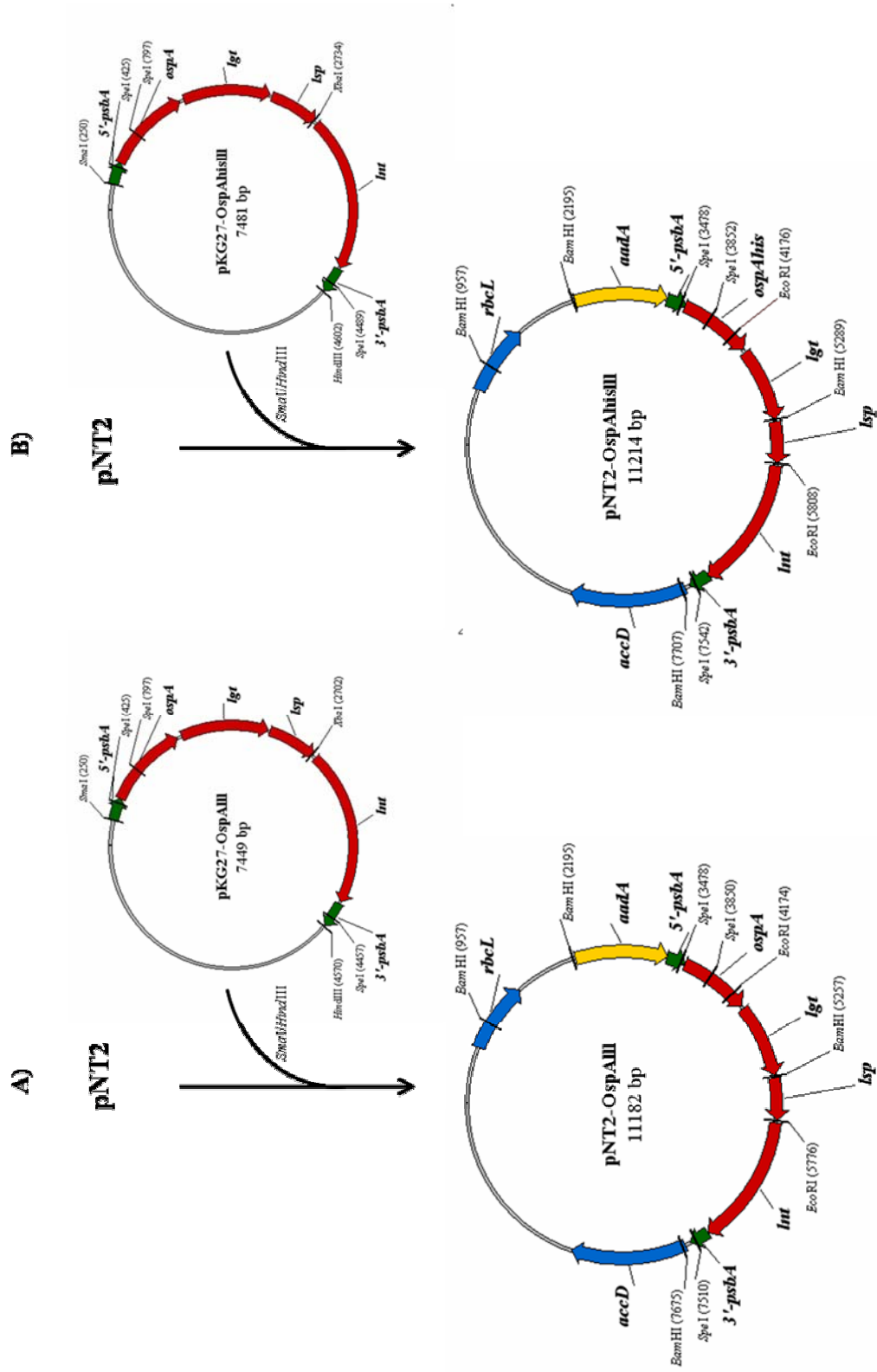


Abb. 3.20. Schematische Darstellung der Klonierung der polycistronischen Expressionsvektoren. A) pNT2OspAIII. B) pNT2OspAHisIII.

Für die Klonierung der bicistronischen Operone, die neben dem *ospA*-Gen jeweils nur ein weiteres Gen aufweisen, wurde der Subklonierungsvektor pKG27OspA verwendet. Da diese Klonierungen zu Beginn dieser Arbeit durchgeführt wurden, stand das Konstrukt pKG27OspAhis als Ausgangsvektor noch nicht zur Verfügung. Die Gene für die einzelnen Enzyme wurden aus den jeweiligen Klonierungsvektoren pCR2.1lgt/11L1 (6317 bp), pCR2.1lsp (4378 bp) und pCR2.1lnt (5420 bp) mit den entsprechenden Enzymen ausgeschnitten (Tab. 3.1). Nach Behandlung mit Klenow-Polymerase wurden die Gene jeweils einzeln mit dem linearisierten pKG27OspA-Plasmid ligiert und in *E. coli* vermehrt. Transformanten wurden durch PCR mit den in Tabelle 3.1 aufgelisteten Primerkombinationen identifiziert und die Plasmide anschließend durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *SpeI* überprüft (Abb. 3.21; Tab. 3.1; Kap. 2.7; Tab. 2.6).

Danach konnten die bicistronischen Fragmente aus den neuen Vektoren pKG27OspAlgt, pKG27OspAlsp und pKG27OspAlnt inklusive der Kontrollelemente mit den Enzymen *SmaI* und *HindIII* ausgeschnitten und in den Vektor pNT2 wie unter 3.1.1.3 beschrieben eingebaut werden (Abb. 3.21). Die Identität der neuen Expressionsvektoren wurde durch Verdau mit den Enzymen *BamHI* und *EcoRI* überprüft. Dabei entsprachen die erhaltenen Fragmente den erwarteten Werten (Tab. 3.1).

**Tabelle 3.1. Klonierung bicistronischer Operone**

Gen (bp)	Restriktion aus pCR2.1	Subklonierungsvektor (bp) und Primerpaar zur Identifizierung	Restriktion des Subklonierungsvektors mit <i>SpeI</i>	Expressionsvektor (bp)	Restriktion des Expressionsvektors mit <i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
<i>lgt</i> (877)	<i>HindIII</i> <i>BamHI</i>	pKG27OspAlgt (5317) 5'- <i>ospA</i> /3'- <i>lgt</i>	3417; 1528; 372 bp	pNT2OspAlgt (9050)	4464; 1979; 1238 1079; 290 bp
<i>lsp</i> (496)	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pKG27OspAlsp (4932) 5'- <i>ospA</i> /3'- <i>lsp</i>	3417; 1143; 372 bp	pNT2OspAlsp (8662)	4464; 1979; 1238 698; 286 bp
<i>lnt</i> (1539)	<i>EcoRI</i> <i>XhoI</i>	pKG27OspAlnt (5979) 5'- <i>ospA</i> /3'- <i>lnt</i>	3417; 2190; 372 bp	pNT2OspAlnt (9712)	4464; 1979; 1238 1852; 179 bp

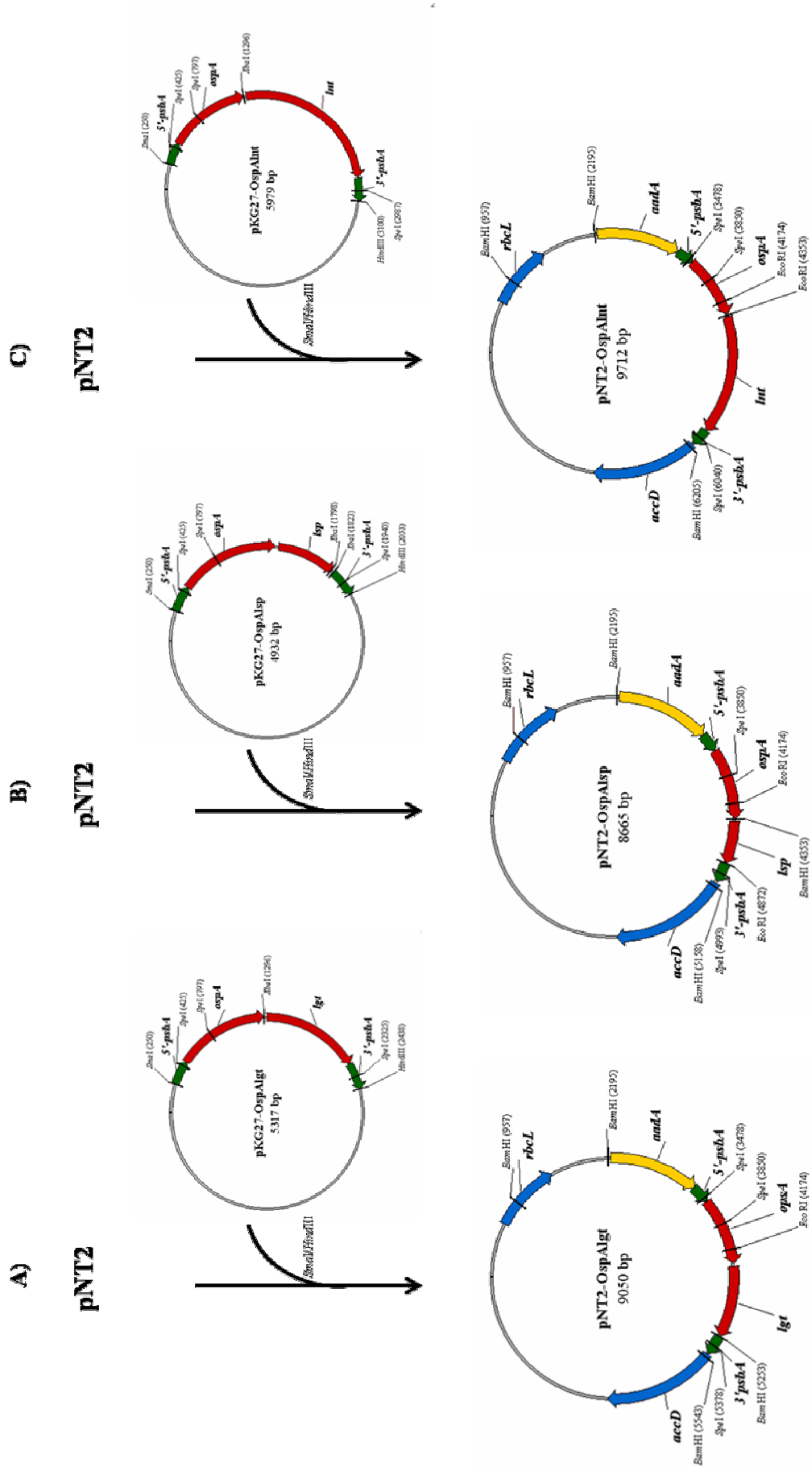


Abb. 3.21. Schematische Darstellung der Klonierung der bicistronischen Expressionsvektoren: A) pNT2OspAlgt. B) pNT2OspAlsp. C) pNT2OspAlnt.

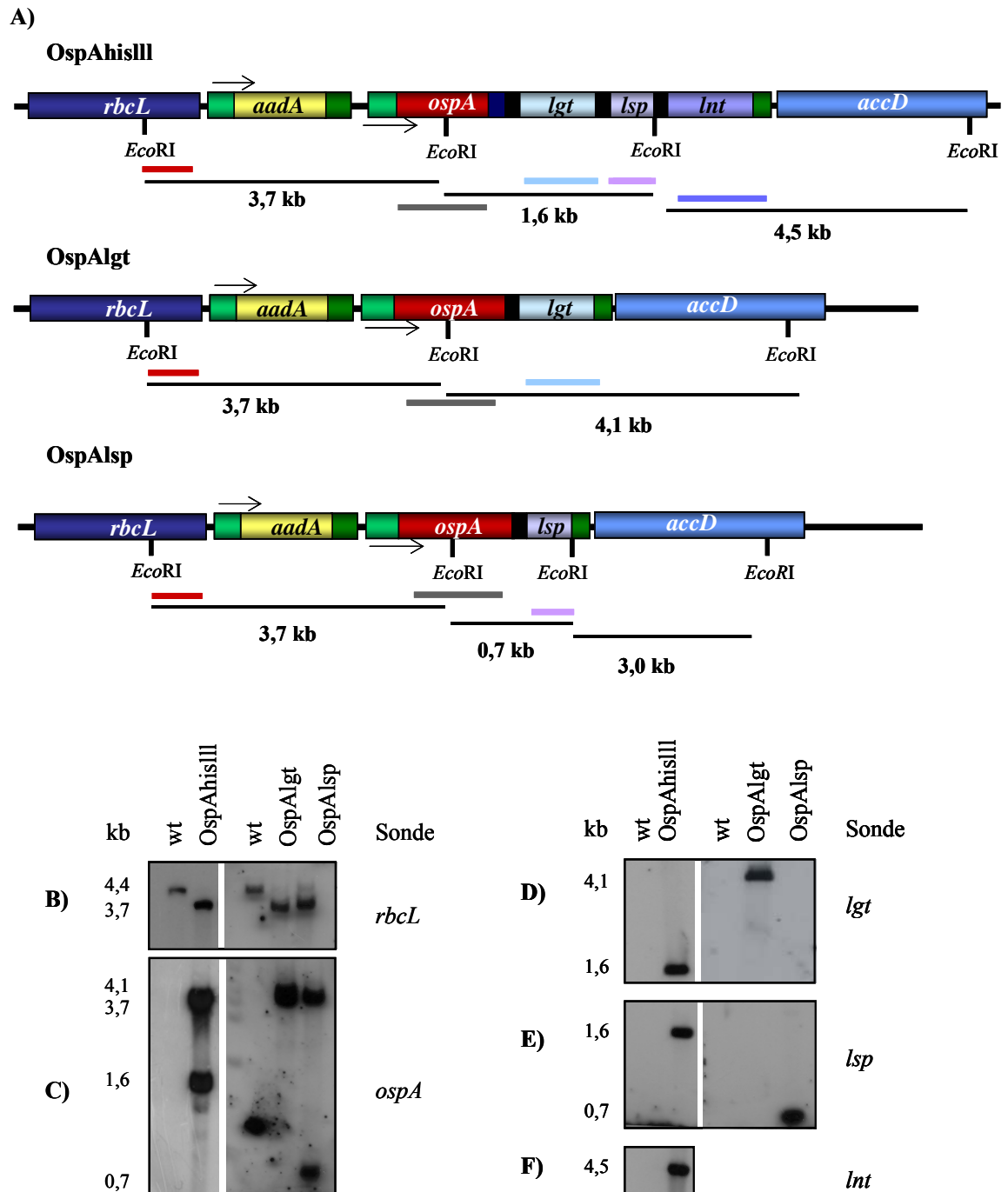
### 3.2.2 Charakterisierung der transgenen Pflanzenlinien

#### 3.2.2.1 Analyse der transgenen Pflanzen mittels RFLP

Die Transformation von je 20 sterilen Tabakblättern mit den fünf neuen Chloroplasten-expressionsvektoren wurde mit der „Gene gun“-Methode durchgeführt (Kap. 2.14.1). Im Anschluss an die Selektion auf spectinomycinhaltigem RMOP-Festmedium, wurde in Voruntersuchungen durch PCR je eine transgene Pflanze für die Konstrukte OspAhisIII, OspAIII, OspAlgt und OspAlsp ermittelt. Für das Konstrukt OspAlnt hingegen konnte keine transgene Pflanze etabliert werden und die OspAIII-Pflanze zeigte anfänglich ein gehemmtes Wachstum. Die folgenden Untersuchungen konnten daher ausschließlich an den OspAhisIII-, OspAlgt- und OspAlsp-Pflanzen durchgeführt werden. Nach dem dritten Regenerationszyklus wurden diese Pflanzen durch eine DNA-Blot-Analyse auf Homoplasmie untersucht (Kap. 2.8). Bei der Hybridisierung der DNA mit der *rbcL*-Sonde wurde für die OspAhisIII-Pflanze eine einzelne Bande bei 3,7 kb detektiert und somit der homoplastische, transplastome Zustand dieser Pflanze angezeigt (Abb. 3.22A,B; Tab 3.2). Die Pflanzen OspAlgt und OspAlsp hingegen zeigten zwei Signale. Ein starkes Signal der Größe 3,7 kb war transgenen Plastidengenomen zuzuordnen. Die zweite, weit schwächere Bande lag auf Höhe von 4,4 kb und resultierte aus Wildtyp-Plastidengenomen (Abb. 3.22A,B; Tab 3.2). Daher befanden sich diese Pflanzen noch in einem heteroplastischen, transplastomen Zustand. Die integrierten Transgene wurden unter Verwendung Transgen-spezifischer Sonden (*ospA*, *lgt*, *lsp* und *lnt*) ebenfalls mittels DNA-Blot nachgewiesen (Abb. 3.22C-F). Dabei konnten je nach Anordnung der *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen innerhalb der Operone (Abb. 3.22) die errechneten Fragmente detektiert werden (Tab. 3.2).

**Tabelle 3.2. Fragmentgrößen nach DNA-Blot Analysen der OspAhisIII, OspAlgt und OspAlsp-Pflanzen**

Pflanzenlinie	<i>rbcL</i>	<i>ospA</i>	<i>lgt</i>	<i>lsp</i>	<i>lnt</i>
<b>OspAhisIII</b>	3,7 kb	3,7 kb 1,6 kb	1,6 kb	1,6 kb	4,5 kb
<b>OspAlgt</b>	4,4 kb 3,7 kb	4,1 kb 3,7 kb	4,1 kb	--	--
<b>OspAlsp</b>	4,4 kb 3,7 kb	3,7 kb 0,7 kb	--	0,7 kb	--

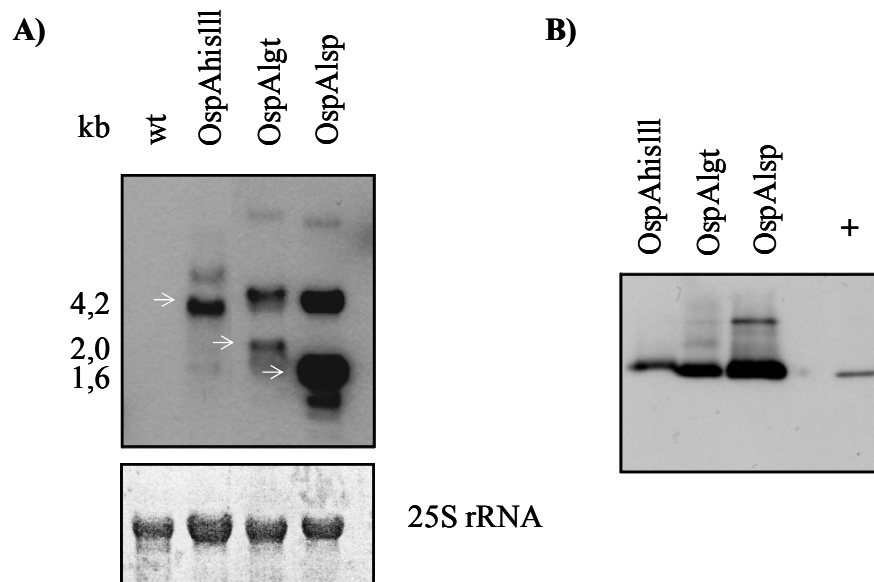


**Abb. 3.22. DNA-Blot-Analyse der transgenen OspAhisIII-, OspAlgt- und OspAlsp-Pflanzen.** A) Ausschnitt aus transgenen OspAhisIII-, OspAlgt- und OspAlsp-Plastidengenomen. Die nach einem *EcoRI*-Restriktionsverdau resultierenden Fragmente sind dargestellt. Die verwendeten Sonden sind farblich markiert. *rbcL*-Sonde:rot; *ospA*-Sonde:grau; *lgt*-Sonde:hellblau; *lsp*-Sonde:violett; *Int*-Sonde:dunkelblau. B) Zur Unterscheidung zwischen einem heteroplastischen bzw. homoplastischen, transplastomen Zustand wurde die DNA mit einer *rbcL*-Sonde hybridisiert. Zum spezifischen Nachweis der Transgene wurden Transgen-spezifische Sonden C) *ospA*; D) *lgt*; E) *lsp* und F) *Int* verwendet. Spur 1: Wildtyp. Spur 2: OspAhisIII. Spur 3: Wildtyp. Spur 4: OspAlgt. Spur 5: OspAlsp. Die Fragmentgrößen sind aus Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Mit diesen DNA-Blot-Analysen wurde somit gezeigt, dass sowohl das polycistronische Operon als auch die bicistronischen Operone in Chloroplastengenome von *N. tabacum* stabil integriert wurden.

### 3.2.2.2 Heterologe *ospA*-Expression in den bi- und polycistronischen Pflanzenlinien

Zur Untersuchung der *ospA*-Expression in diesen neuen transgenen Pflanzen wurden RNA-Blot-Analysen unter Verwendung einer *ospA*-Sonde durchgeführt (Kap. 2.8). Dabei wurden in allen drei Pflanzen mehrere Banden detektiert. Die polycistronische *ospAhisIII*-mRNA zeigte eine Größe von 4,2 kb. Die bicistronische *ospAlgt*-mRNA wies eine Größe von ca. 2,0 kb auf. Eine 1,6 kb Bande entsprach der bicistronischen *ospAlsp*-mRNA (Abb. 3.23A).



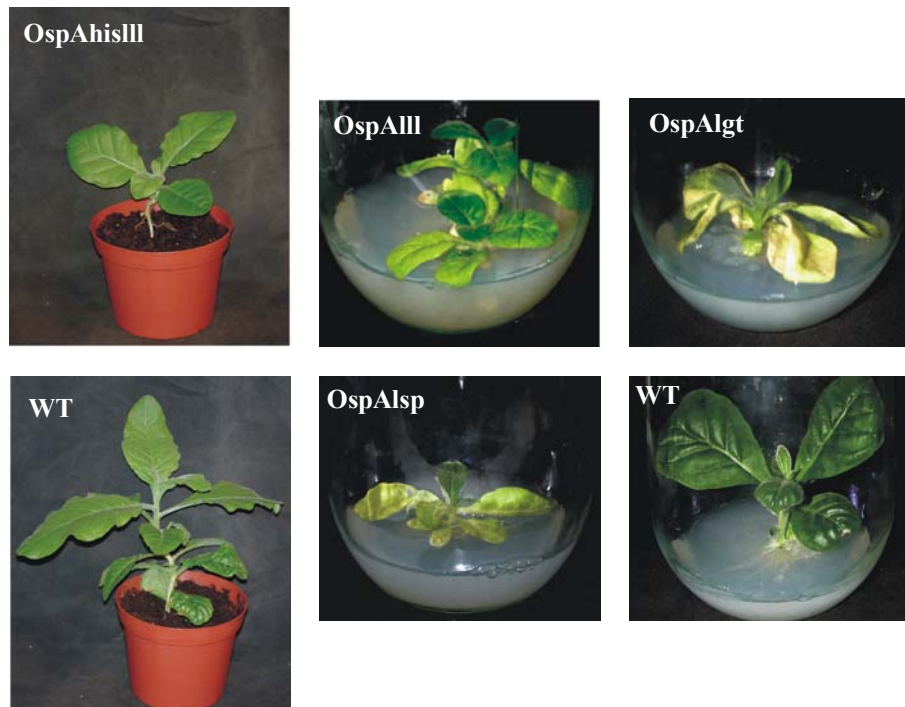
**Abb. 3.23. Heterologe Expression von *ospA* in den transgenen *OspAhisIII*-, *OspAlgt*- und *OspAlsp*-Pflanzen.** A) Akkumulation der poly- und bicistronischen-mRNA. Diese sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Jeweils 3  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden mit einer *ospA*-Sonde hybridisiert. Spur 1: Wildtyp. Spur 2: *OspAhisIII*. Spur 3: *OspAlgt*. Spur 4: *OspAlsp*. B) Immuno-Blot der poly- und bicistronischen Pflanzen. *OspA*-Akkumulation in den transgenen *OspAhisIII*- (Spur 1), *OspAlgt*- (Spur 2) und *OspAlsp*-Pflanzen (Spur 3). Spur +: Als Positivkontrolle wurde rekombinantes *OspA* aus *E. coli* eingesetzt.

Durch eine Immuno-Blot-Untersuchung unter Verwendung des anti-*OspA*-Antikörpers sollten diese transgenen Pflanzenlinien auf *OspA*-Akkumulation getestet werden. Zu diesem Zweck wurden jeweils 4  $\mu$ g Gesamtprotein verwendet (Kap. 2.9.5). Dabei konnte in den drei

transgenen Linien eindeutig OspA-Produktion nachgewiesen werden (Abb. 3.23B). Im Gegensatz zu OspA konnte der immunologische Nachweis der drei lipidmodifizierenden rekombinanten Enzyme Lgt, Lsp und Lnt nicht erfolgen, da für diese Enzyme bisher keine Antikörper oder Antiseren bzw. Aktivitätstests zur Verfügung stehen.

### 3.2.2.3 Phänotypen der bi- und polycistronischen Pflanzenlinien

Bei allen transgenen Pflanzenlinien (OspAhisIII, OspAIII, OspAlgt und OspAlsp) waren deutlich phänotypische Unterschiede gegenüber Wildtyp-Pflanzen zu erkennen (Abb. 3.24). Die OspAhisIII-Pflanzen (Abb. 3.24) zeigten im Vergleich zum Wildtyp zwar ein etwas langsames Wachstum, die Kultivierung der homoplastischen, transplastomen Pflanzen im Gewächshaus war aber problemlos möglich. Die OspAIII-, OspAlgt- und OspAlsp-Pflanzen hingegen ähnelten in ihrem Wachstumsverhalten dem der OspA-Pflanzen (Kap. 3.1.3.4). Die Blätter von OspAIII-, OspAlgt- und OspAlsp-Pflanzen zeigten vermehrt Chlorosen und Wachstum war lediglich für einige Wochen in Zellkultur möglich (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24. Phänotypen der poly- und bicistronischen transgenen Pflanzen.** Bei der Kultivierung im Gewächshaus zeigte die OspAhisIII-Pflanze im Vergleich zum Wildtyp einen verlangsamten, aber normalen Wuchs. Die in der Zellkultur kultivierten Pflanzen OspAIII, OspAlgt und OspAlsp zeichneten sich im Vergleich zum Wildtyp durch einen verkümmerten Wuchs aus.

Infolgedessen waren keine weiteren Untersuchungen an den Pflanzenlinien OspAIII, OspAIs<sub>p</sub> und OspAIs<sub>g</sub> ausführbar. Weitere Charakterisierungen des rekombinanten OspA wurden daher lediglich an polycistronischen OspAHisIII-Pflanzen durchgeführt.

### 3.2.3 Untersuchung von rpOspAHis aus polycistronischen OspAHisIII-Pflanzen

Rekombinantes OspAHis-Protein der polycistronischen OspAHisIII-Pflanzen wird im Folgenden immer mit dem Index III versehen (rpOspA<sub>III</sub>). Dadurch sollen Verwechslungen mit dem unter 3.1. beschriebenen rekombinanten OspA bzw. OspAHis aus den monocistronischen Pflanzen vermieden werden.

Zunächst wurde die OspAHisIII-Pflanze auf Membranassoziation und Lipidierung des rpOspA<sub>III</sub> untersucht. Ein Immuno-Blot der erhaltenen Fraktionen nach einer Mikrosomenpräparation (Kap. 2.10) ergab für rpOspA<sub>III</sub> ausschließlich ein Signal in der lipophilen Phase (M), während in der wässrigen Phase (Ü) keinerlei Signal detektiert werden konnte (Abb. 3.25A1). Dieses Ergebnis steht damit in deutlichem Unterschied zu rpOspA bzw. rpOspAHis aus den monocistronischen OspA- bzw. OspAHis-Pflanzen (vgl. Kap. 3.1.3.5 und 3.1.6.4). In diesen war rekombinantes OspA sowohl in der wässrigen (Ü) als auch in der lipophilen Phase (M) vertreten. Dieser Unterschied legt die Vermutung nahe, dass rpOspA<sub>III</sub> ausschließlich in einer membrangebundenen Form in Chloroplasten der OspAHisIII-Pflanze vorliegt. Bei einem Immuno-Blot der Membranfraktion nach einer Chloroplastenisolierung wurde für rpOspA<sub>III</sub> ebenfalls ein deutliches Signal detektiert (Abb. 3.25A2). Somit konnte durch diese Ansätze gezeigt werden, dass auch rpOspA<sub>III</sub> an Membranen assoziiert vorliegt. Im Gegensatz zu rpOspA und rpOspAHis aus den monocistronischen Pflanzen scheint jedoch die gesamte Menge an rpOspA<sub>III</sub> membrangebunden zu sein.

Ob die Membranverankerung von rpOspA<sub>III</sub> auf eine Lipidierung zurückzuführen ist, wurde durch *In vivo*-Isotopen-Markierung mit [9,10-<sup>3</sup>H]-Palmitinsäure an Protoplasten überprüft (vgl. Kap. 3.1.6.5). Die fluorographische Detektion zeigte dabei ein deutliches Signal für rpOspA<sub>III</sub> (Abb. 3.25B). Demzufolge wurde auch in rpOspA<sub>III</sub> Palmitinsäure eingebaut, das somit als Lipoprotein in Tabakchloroplasten vorlag.

Weiterhin wurde der Einfluß des Antibiotikums Globomycin (Inhibitor der Signal-Peptidase II) und von 2-Bromopalmitat (2-BP, Inhibitor der Palmityl-Acyl-Transferasen) auf die Einbaurate von Palmitinsäure in rpOspA<sub>III</sub> untersucht (vgl. Kap. 3.1.6.5).



Sollte rekombinantes Lsp an der Modifikation von rpOspA<sub>III</sub> in Tabakchloroplasten der OspA<sub>HisIII</sub>-Pflanzen beteiligt sein, würde die Signalsequenz von rpOspA<sub>III</sub> proteolytisch abgespalten werden. Unter Verwendung von Globomycin würde rekombinantes Lsp inhibiert und somit eine größere Bande erhalten werden als in der unbehandelten Kontrolle.

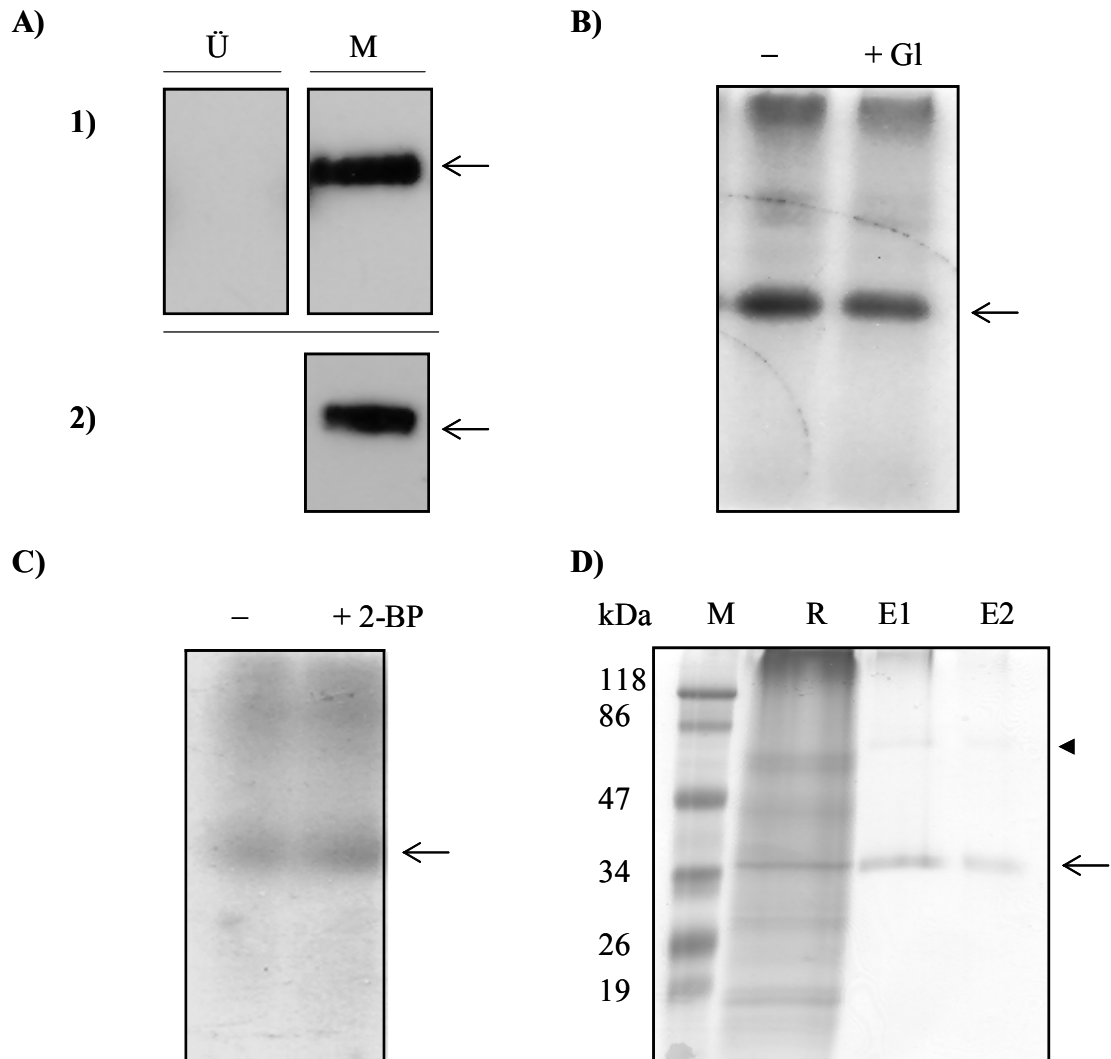
Das durch die fluorographische Detektion erhaltene Signal zeigte in der mit Globomycin behandelten Probe jedoch die gleiche elektrophoretische Mobilität, wie das Signal in der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.25B). Daraus lässt sich schließen, dass die Signal-Peptidase II (Lsp), die auf dem polycistronischen Operon codiert ist, keinen Einfluß auf die plastidäre Lipidmodifikation des rpOspA<sub>III</sub> ausübt.

Unter Verwendung des Inhibitors 2-BP, war bei der fluorographischen Detektion ebenfalls kein Unterschied in der Signalstärke und -lage zwischen der behandelten Probe und der unbehandelten Kontrolle zu erkennen (Abb. 3.25C). Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Lipidierung von rpOspA<sub>III</sub> ebenfalls unabhängig von Palmityl-Acyl-Transferasen (PATs) verläuft.

Über die genaue Struktur von rpOspA<sub>III</sub> sollte eine massenspektrometrische Analyse des gereinigten Proteins Aufschluss geben. Die Reinigung von rpOspA<sub>III</sub> wurde mit dem in Kapitel 2.9.6 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Zur Dokumentation des Reinigungserfolges wurden jeweils 20 µl des Rohextraktes sowie der beiden Elutionsfraktionen auf einem SDS-Gel aufgetrennt und gefärbt (Abb. 3.25D). Dabei wurden zwei Banden in den Elutionsfraktionen erhalten. Wie schon für rpOspA<sub>His</sub> (vgl. Kap. 3.1.7) beschrieben, trat neben der Bande bei ca. 34 kDa auch eine Bande bei ca. 66 kDa auf, die rpOspA<sub>III</sub>-Dimeren entsprach (Abb. 3.25D).

In einer ersten MALDI-TOF-MS-Analyse zur Bestimmung der Molekülmasse von rpOspA<sub>III</sub> konnte monomeres rpOspA<sub>III</sub> in einfacher ( $M^+$ ), doppelter ( $M^{2+}$ ) und dreifacher ( $M^{3+}$ ) Ionisierung detektiert werden. Das Massenspektrum von rpOspA<sub>III</sub> bei einfacher Ladung ergab, ähnlich dem von rpOspA<sub>His</sub> (vgl. Kap. 3.1.8), eine heterogene Zusammensetzung der Komponenten. Der Großteil des rpOspA<sub>III</sub> wies dabei eine Masse von  $m/z$  31270 auf und entsprach dem kompletten Protein mit Dipalmitylglycerin. Die Heterogenität der Komponenten ist auch hier auf den Einbau von Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen und Sättigungsgrade (Palmitinsäure, Palmitoleinsäure, Ölsäure usw.) zurückzuführen. Darüber hinaus ist es denkbar, dass sowohl die Diacylglycerinmoleküle als auch die Proteinmoleküle in oxidierter Form vorliegen können (Bouchon et al., 1997). Es war daher kaum möglich jede einzelne Komponente exakt zu bestimmen.

---



**Abb. 3.25. Untersuchung von rpOspA<sub>III</sub>.** **A)** Membranassoziation von rpOspA<sub>III</sub> (→). 1) Immuno-Blot der nach einer Mikrosomenpräparation erhaltenen Fraktionen (Ü=Überstand; M=Mikrosomenpellet). 2) Immuno-Blot der Membranfraktion, die sich bei der Isolierung von Chloroplasten anreichert. **B)** und **C)** *In vivo*-Isotopen-Markierung von rpOspA<sub>III</sub>. **B)** Die fluorographische Detektion zeigt, dass radioaktiv-markierte Palmitinsäure in rpOspA<sub>III</sub> (→) eingebaut wurde (Spur 1). Einbau von radioaktiv-markierter Palmitinsäure nach Inkubation mit Globomycin (Gl) (Spur 2). **C)** Fluorographische Detektion einer unbehandelten (Spur 1) und einer mit 2-Bromopalmitat (2-BP) behandelten OspA<sub>III</sub>-Protoplasten-Probe (Spur 2) rpOspA<sub>III</sub> (→). **D)** SDS-Gelelektrophorese der erhaltenen Fraktionen bei der Reinigung von rpOspA<sub>III</sub> aus Pflanzenmaterial. Spur M: Molekulargewichtsgrößenstandard. Spur R: Rohextrakt; Spur E1: Elution nach Nickel-Sepharose. Spur E2: Elution nach *MagneHis*<sup>TM</sup> Ni-Partikeln. rpOspA<sub>III</sub>-Monomere (→). rpOspA<sub>III</sub>-Dimere (▴).

Zusammenfassend ergaben die Ergebnisse dieses Kapitels, dass rpOspA<sub>III</sub> aus polycistronischen OspA<sub>III</sub>-Pflanzen das gleiche Lipidierungsmuster (Pam<sub>2</sub>Cys + Signalsequenz) aufweist wie rpOspA aus der monocistronischen Pflanzen (Kap. 3.1). Im Gegensatz zu rpOspA (Kap. 3.1) lag rpOspA<sub>III</sub> jedoch ausschließlich in einer lipidierten Form in Tabakchloroplasten vor. Folglich wurde durch die gleichzeitige Bereitstellung des Lipoproteins und der drei modifizierenden Enzyme (Lgt, Lsp und Lnt) eine quantitative Lipidierung von rpOspA<sub>III</sub> in Tabakchloroplasten erzielt.

---

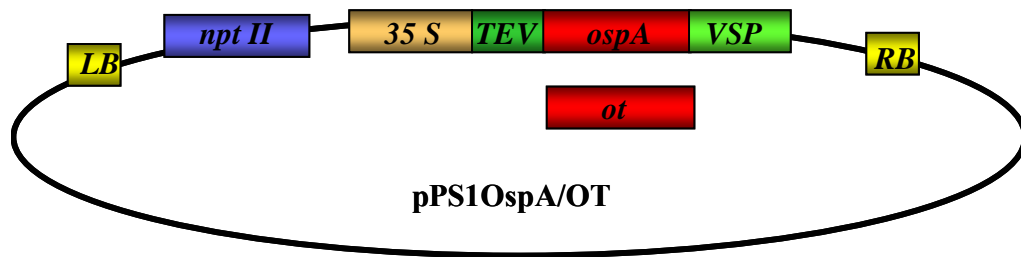
### 3.3 Zellkernexpression von *ospA* und *ot* in *N. tabacum* und *N. benthamiana*

#### 3.3.1 Klonierung der *OspA* und *OT*-Zellkernexpressionsvektoren

In einem weiteren Projektteil sollte untersucht werden, ob bakterielles *OspA* nach heterologer Expression im Zellkern von *N. tabacum* ebenfalls eine Lipidmodifikation erfährt und inwieweit sich diese von der plastidären Modifikation unterscheidet.

Für diese Untersuchungen war es erforderlich, sowohl das *ospA*-Gen als auch die verkürzte Variante *ot* in einen entsprechenden Kernexpressionsvektor zu klonieren. Als geeignet erwies sich das Plasmid pPS1 (12544 bp) (Abb. 3.26). Dieses Plasmid trägt als regulatorische Elemente den 35S Promoter des Blumenkohlmosaik-Virus (Cauliflower mosaic virus, CaMV), die 5'-UTR des Tabak-Etch-Virus (TEV) sowie den Terminator des vegetativen Speicherprotein-Gens (vegetativ storage protein; *vsp*) aus Sojabohnen. Weiterhin verfügt dieser Vektor über das *nptII*-Gen, das für Neomycinphosphotransferase II kodiert und Transformanden Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin verleiht.

Sowohl das *ospA*- als auch das *ot*-Gen wurden über PCR amplifiziert, wobei die für die Klonierung erforderlichen Restriktionsschnittstellen (*XbaI* und *SacI*) durch die Primersequenzen eingefügt wurden (5'-*ospAXbaI* bzw. 5'-*otXbaI* und 3'-*ospASacI*) (Tab. 2.2). Nach der Klonierung der PCR-Produkte (*ospA* bzw. *ot*) in den pGEM-T-easy-Vektor wurden diese durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *XbaI* und *SacI* ausgeschnitten. Parallel dazu wurde der Vektor pPS1 mit den gleichen Enzymen geöffnet und sowohl mit dem *ospA*- als auch dem *ot*-Gen ligiert. Die Identität der Plasmide pPS1OspA (13351 bp) und pPS1OT (13306 bp) wurde durch Restriktion mit den Enzymen *XbaI* und *SacI* überprüft. Dabei entsprachen die erhaltenen Fragmente den erwarteten Werten (pPS1OspA: 12519 und 832 bp; pPS1OT: 12519 und 787 bp). Daher konnten die Vektoren pPS1OspA und pPS1OT für die Kerntransformation eingesetzt werden (Abb 3.26).



**Abb. 3.26. Schematische Darstellung des Zellkernexpressionsvektors pPS1OspA bzw. pPS1OT.** LB: Linke Grenze. *nptII*: Neomycinphosphotransferase II-Gen. 35S: 35S-Promoter des Blumenkohlmosaik-Virus. *TEV*: 5'-UTR des Tabak-Etch-Virus. *VSP*: Terminator des vegetativen Speicherprotein-Gens aus Sojabohnen. RB: rechte Grenze.

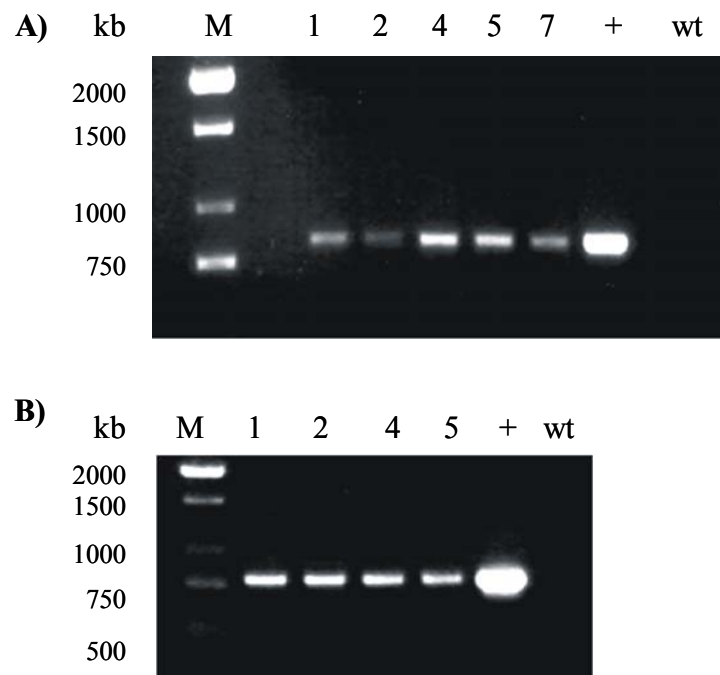
### 3.3.2 Zellkerntransformation von *N. tabacum*

Die Zellkerntransformation von *N. tabacum* wurde durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer durchgeführt (Kap. 2.14.2). Dafür mussten die Plasmide pPS1OspA und pPS1OT zunächst durch Transformation in *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 eingebracht werden (Kap. 2.14.2). Der Transformationserfolg wurde mittels PCR verifiziert. Jeweils eine der daraus resultierenden Kolonien wurde für die anschließende Blattscheibentransformation von *N. tabacum* verwendet (Kap. 2.14.2). Die Selektion positiver Transformanden erfolgte auf kanamycinhaltigem RMOP-Festmedium. Nach ca. vier bis sechs Wochen konnten die erhaltenen Kalluskulturen untersucht werden.

### 3.3.3 Identifizierung und Charakterisierung der Kerntransformanden

#### 3.3.3.1 Identifizierung transgener Pflanzenlinien mittels PCR

Die Identifizierung und Charakterisierung der OspA- und OT-Kerntransformanden verlief analog zu der der Chloroplastentransformanden (Kap. 3.1.3). Genomische DNA aus den transgenen Pflanzenlinien und einer Wildtyp-Pflanze dienten zunächst als Matrize für eine PCR unter der Verwendung Transgen-spezifischer Primer (5'-*ospAXbaI* bzw. 5'-*otXbaI* und 3'-*ospASacI*) (Tab. 2.2). Die erhaltenen PCR-Produkte zeigten dabei eine Größe von ca. 822 bp für *ospA* (Abb. 3.27A) und 777 bp für *ot* (Abb. 3.27B). Durch diese Untersuchung wurden fünf positive OspA- (Individuen 1, 2, 4, 5 und 7) sowie vier positive OT-Kerntransformanden (Individuen 1, 2, 4 und 5) identifiziert. (Abb. 3.27).

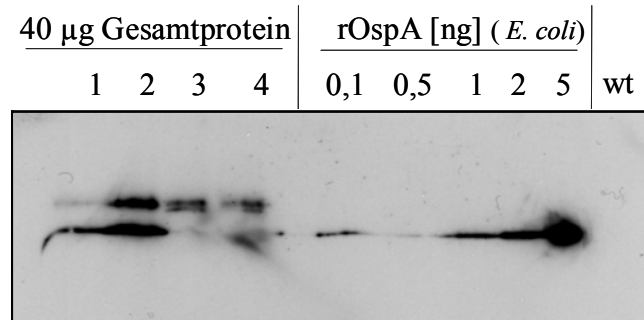


**Abb. 3.27. PCR-Untersuchung genomischer DNA zur Identifizierung transgener Pflanzen.** Für die PCR wurden 5'-*ospA*- (**A**) bzw. 5'-*ot*- (**B**) und 3'-*ospA*-Primer eingesetzt. **A)** Positive *OspA*-Kerntransformanten ergaben eine Bande von 822 bp. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pPS1*OspA* verwendet. Wildtyp-Pflanzen zeigten kein PCR-Produkt. **B)** Positive *OT*-Kerntransformanten zeigten eine Bande der Größe 777 bp. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pPS1*OT* eingesetzt. Wildtyp-Pflanzen zeigten kein PCR-Produkt.

### 3.3.3.2 Akkumulation von rekombinantem *OspA* und *OT*

Die Kerntransformanten sollten mittels einer Immuno-Blot-Untersuchung auf rekombinante nukleare (rn) *OspA*- bzw. rn*OT*-Akkumulation untersucht werden. Dafür wurden 40 µg Gesamtprotein eingesetzt. Unter Verwendung des monoklonalen anti-*OspA*-Antikörpers konnten in den vier untersuchten *OT*-Kerntransformanten spezifische Signale detektiert werden (Kap. 2.9.5). Anhand eines Vergleiches mit einer Verdünnungsreihe von rekombinantem *OspA* aus *E. coli* konnte der rn*OT*-Gehalt in den transgenen Pflanzen auf ca. 0,001-0,005% des löslichen Gesamtproteins (LGP) abgeschätzt werden (Abb. 3.28). Diese Werte liegen weit unterhalb der erreichten rp*OT*-Akkumulation nach Chloroplastentransformation (10% des LGP; vgl. Kap. 3.1.6.2).

Bei der Immuno-Blot-Analyse der OspA-Kerntransformanden konnte hingegen bei keiner der fünf transgenen Pflanzen OspA-Akkumulation nachgewiesen werden. Somit konnte mit der stabilen Integration des *ospA*-Gens in das Kerngenom von *N. tabacum* keine nachzuweisende rOspA-Menge erreicht werden.



**Abb. 3.28. Immuno-Blot zur Quantifizierung des rOT-Anteils in den transgenen OT-Kerntransformanden.** Es wurden 40 µg Gesamtprotein der vier transgenen OT-Pflanzen aufgetragen. Zur Abschätzung des rOT-Gehalts in den transgenen Pflanzen wurden definierte Mengen [ng] von rekombinatem OspA aus *E. coli* aufgetragen.

### 3.3.3.3 Phänotypen der Kerntransformanden

Zwischen den OspA- und OT-Kerntransformanden waren phänotypisch deutliche Unterschiede zu erkennen. Die transgenen OspA-Pflanzen zeichneten sich durch ein normales Wachstum aus, das dem von Wildtyp-Pflanzen vergleichbar war. Sie konnten bereits nach nur sechs bis acht Wochen in Zellkultur im Gewächshaus kultiviert werden. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Kernexpression von bakteriellem *ospA* einen letalen Effekt auf die Pflanzen hat und vermutlich nur die Pflanzen überlebten, die kein oder nur sehr wenig rOspA akkumulierten. Diese zeichneten sich dann durch gute Vitalität aus.

Die OT-Kerntransformanden hingegen konnten lediglich als Kalluskultur gehalten werden, da bei einer Kultivierung auf MS-Medium die Wurzelbildung ausblieb. Daher war eine Kultivierung der OT-Kerntransformanden im Gewächshaus nicht durchführbar und es konnten auch keine weiteren Versuche zur Membranassoziation von rOT durchgeführt werden.

Durch die stabile Kerntransformation von *ospA* und *ot* konnte keine ausreichende Akkumulation der rekombinanten Proteine OspA und OT im Cytoplasma erzielt werden. Demzufolge war es nicht möglich, weitere Untersuchungen zur cytosolischen, post-translationalen Modifikation an diesen beiden OspA-Varianten durchzuführen.

Um dennoch Informationen über eine eventuelle Lipidierung von rekombinantem OspA bzw. OT im Cytosol zu erhalten, wurde eine neue Versuchsreihe mit einem viralen, transienten Expressionssystem durchgeführt (Kap. 3.3.4).

### 3.3.4 Transiente Expression von *ospA* und *ot* in *N. benthamiana*

Dieses virale, transiente Expressionssystem (vgl. Kap. 1.4.2) basiert auf dem Tabakmosaikvirus (TMV), einem RNA-Virus. Der virale Vektor setzt sich dabei aus zwei Modulen (je einem 5'- und 3'-Pro-Vektor-Modul) zusammen, die jedoch erst in der Pflanzenzelle in ein transkribierbares Amplicon überführt werden (Abb. 3.29, 3.30). Der 5'-Pro-Vektor pICH10570 (12576 bp) codiert für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) sowie für ein Movement-Protein (MP) unter der Kontrolle des Arabidopsis Actin 2 Promoters (Act2). Vor dem Terminator der Nopalin-Synthase (*nos*) ist die Integrase-Rekombinationsstelle (AttP) des Streptomyces-Phagen C31 sowie eine Intronsequenz codiert. Diese Intronsequenz ist für den späteren Spleißvorgang zur Entfernung der Rekombinationsschnittstellen in der Pflanze essentiell (Abb. 3.29A). Der 3'-Pro-Vektor pICH10990 (6441 bp) trägt die Integrase-Rekombinationsstelle (AttB) des Streptomyces-Phagen C31, hinter der sich ebenfalls eine Intronsequenz befindet. In die darauf folgende „multiple cloning site“ (MCS) kann das zu exprimierende Transgen in diesen Vektor integriert werden. Den Abschluss bildet wiederum der *nos*-Terminator (Abb. 3.29B).

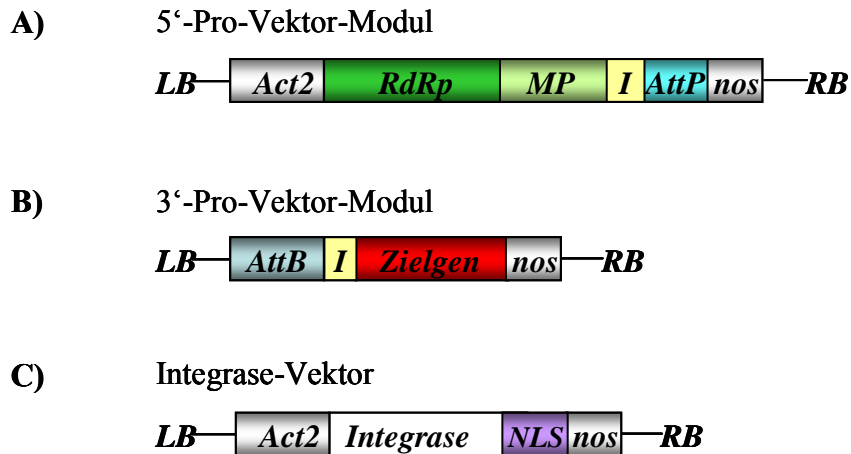
Ein dritter Vektor pICH10881 (12274 bp) codiert für die Integrase. Diese steht unter der Kontrolle des Act2-Promoters. Ferner verfügt das Integrasegen am 3'-Ende über eine Sequenz, die für ein Signalpeptid zur Kernlokalisierung (nuclear localisation sequence, NLS) codiert, sowie über den *nos*-Terminator (Abb. 3.29C).

Diese 5'- und 3'-Pro-Vektoren sowie der Integrase-codierende Vektor werden nach Agrobakterien-Infiltration in *N. benthamiana* in den Zellkern geleitet. Unter Mitwirkung der Integrase, die nach ihrer Translation durch die NLS-Sequenz wieder in den Zellkern gelangt, werden dann die Pro-Vektoren zu einem transkribierbaren Amplicon zusammengefügt (Abb. 3.30). Nach der Transkription dieser Sequenz werden überflüssige Sequenzbereiche durch Splicing herausgeschnitten. Dadurch entsteht das eigentliche funktionsfähige Virusfragment,

---



welches im Cytosol in die entsprechend codierten Proteine translatiert werden kann (Abb. 3.30). Die Expression der Transgene findet vorübergehend von Tag drei bis ca. Tag 14 nach der Infiltration statt (Marillonnet et al., 2004).

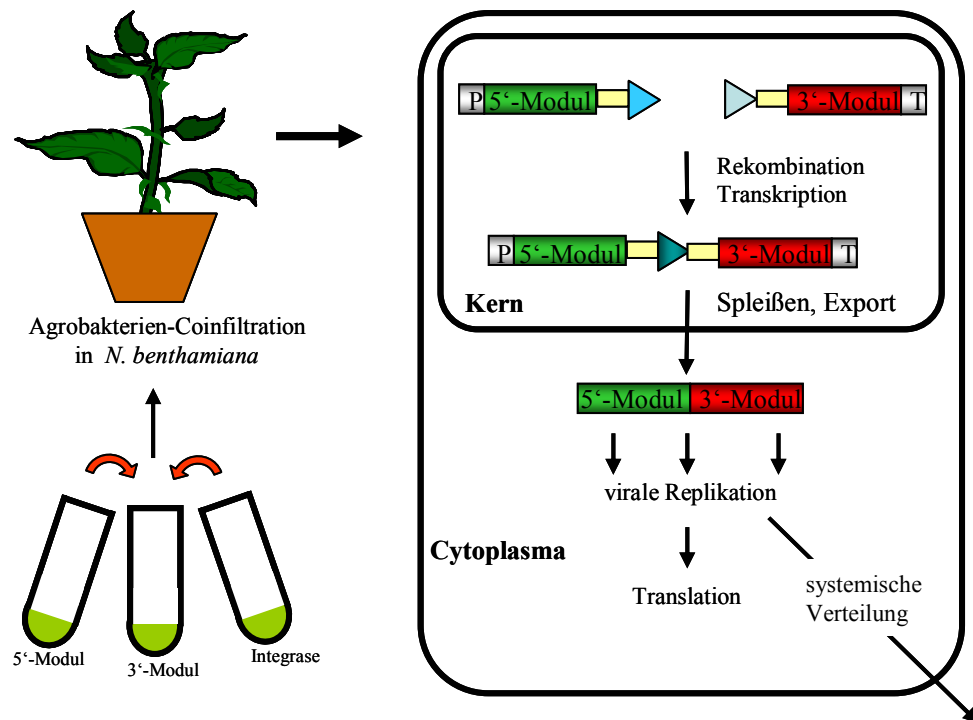


**Abb. 3.29. Schematische Darstellung der Vektoren für die transiente Expression.** **A)** Der 5'-Pro-Vektor codiert für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (*RdRp*) und ein Movement-Protein (*MP*); *AttP*: Integrase-Schnittstelle. **B)** Der 3'-Pro-Vektor codiert für das Zielgen; *AttB*: Integrase-Schnittstelle. **C)** Der Integrase-Vektor codiert für die Integrase. *NLS*: nuclear localisation sequence. LB: linke Grenze; RB: rechte Grenze; *I*: Intronsequenz; *Act2*: Actin 2 Promoter; *nos*: Terminator der Nopalinsynthese.

### 3.3.4.1 Klonierung der Expressionskonstrukte

Für die Klonierung der viralen Expressionsvektoren wurden die Gene *ospA* und *ot* durch PCR unter Verwendung der entsprechenden Primer (5'-*ospA**BsaI* bzw. 5'-*ot**BsaI* und 3'-*ospA**his**XbaI*) amplifiziert (Kap. 2.7.1, Tab. 2.2). Dabei wurden die Gene gleichzeitig am 3'-Ende mit der Hexa-Histidin-codierenden Nukleotidsequenz versehen. Dieser His-tag soll die spätere effiziente Reinigung der rekombinanten Proteine aus dem Pflanzenmaterial ermöglichen. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit dem pGEM-T-easy-Klonierungsvektor ligiert. Im Anschluss an die Sequenzierung konnten die Gene mit den Restriktionsenzymen *BsaI* und *XbaI* ausgeschnitten und in den zuvor ebenfalls mit *BsaI* und *XbaI* verdauten 3'-Pro-Vektor pICH10990 kloniert werden (Kap. 2.7). Nach der Identifikation der neuen 3'-Pro-Vektoren pICH10990ospA (7264 bp) und pICH10990OT (7216 bp) wurden sowohl diese als auch das 5'-Modul pICH10570 und der Integrase-codierende Vektor pICH10881 in kompetente

Agrobakterien des Stammes GV 3101 transformiert (Kap. 2.14.2). Der Transformationserfolg wurde mittels PCR-Untersuchung verifiziert. Im Anschluss daran wurde jeweils eine Agrobakterien-Kolonie pro Konstrukt für die Coinfiltration von Blättern ca. 6 Wochen alter *N. benthamiana*-Pflanzen verwendet. (Kap. 2.14.3). Zur Untersuchung der transienten Expression von *ospA* und *ot* wurden ab dem dritten Tag nach der Infiltration über einen Zeitraum von 11 Tagen täglich ca. 100 mg Blattmaterial entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

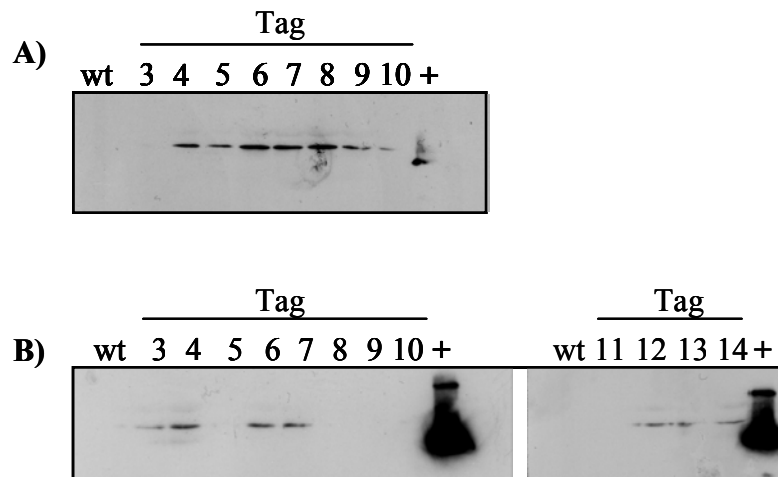


**Abb. 3.30 Schematische Darstellung der transienten Expression.** Die Agrobakterien-Kulturen mit jeweils einem der drei Vektoren (5'-Modul; 3'-Modul bzw. Integrase-Vektor) wurden zunächst vereint. Die erhaltene Suspension wurde in *N. benthamiana*-Blätter coinfiltriert. Nach Rekombination und Transkription wurden überschüssige Sequenzbereiche durch Spleißen entfernt. Das funktionsfähige Virusfragment wird ins Cytoplasma entlassen und in die entsprechenden Proteine translatiert. Durch das auf dem 5'-Modul codierte Movement-Protein sollte eine systemische Verteilung gewährleistet werden.

### 3.3.4.2 Immunodetektion der OspA- und OT-Akkumulation nach transienter Expression

Von den gesammelten Proben wurden Proteinrohextrakte hergestellt (Kap. 2.9.1) und diese über ein SDS-Gel aufgetrennt. Als Positivkontrollen wurde rekombinantes OspA aus *E. coli*

und als Negativkontrolle ein Wildtyp-Pflanzenextrakt aufgetragen. Die Immuno-Blot-Analyse (Kap. 2.9.5) zeigte, dass es mit diesem transienten Expressionssystem möglich war, das Volllänge-*ospA*-Gen im Zellkern zu exprimieren (Abb. 3.31A). Dabei wurde *ospA* von Tag 4 bis Tag 10 exprimiert. An den Tagen 11 bis 14 hingegen waren keine Signale mehr zu erkennen. Die Untersuchungen der OT-Proben zeigten ebenfalls OT-Akkumulation, jedoch war diese nicht kontinuierlich, sondern nur an den Tagen 3, 4, 6, 7 sowie 12 und 14 detektierbar (Abb. 3.31B). Somit konnten mit diesem transienten Expressionsansatz sowohl rekombinantes OspA als auch rekombinantes OT in cytoplasmatischer Umgebung erhalten werden. Die erreichten Akkumulationen der beiden rekombinanten Proteine OspA und OT wurden durch wiederholte Immuno-Blot-Untersuchungen auf ca. 0,001-0,01% des löslichen Gesamtproteins geschätzt.



**Abb. 3.31. Immuno-Blot zur Untersuchung der transienten Expression von *ospA* und *ot*.** A) *OspA*-Pflanze: *OspA*-Akkumulation konnte vom 4. bis zum 10. Tag nach dem Infiltrieren der jeweiligen Konstrukte detektiert werden. B) *OT*-Pflanzen: *OT*-Akkumulation wurde an den Tagen 3, 4, 6, 7, 11-14 nach der Infiltration der Konstrukte detektiert.

Zusammenfassend ergaben die Ergebnisse dieses Kapitels, dass die stabile Kerntransformation von *ospA* und *ot* im Gegensatz zur transienten, viralen Expression nicht geeignet war, rekombinantes *OspA* und *OT* im Cytoplasma zu akkumulieren.

---

In zukünftigen Experimenten sollte die transiente Expression von *ospA* und *ot* wiederholt und erste Untersuchungen auf Membranassoziation der rekombinanten Proteine durchgeführt werden. Anschließende massenspektrometrische Untersuchungen könnten Aufschluss über die Art einer möglichen Modifikation von rekombinatem OspA und OT im Cytoplasma von *N. benthamiana* geben. Dadurch könnten Erkenntnisse über die cytoplasmatische Lipidierungskapazität an rekombinanten, bakteriellen Prolipoproteinen erhalten und eventuelle Unterschiede zur plastidären Modifikation aufgedeckt werden.

---

## 4. Diskussion

Im Jahr 2001 waren in Deutschland ca. 80 rekombinante Arzneimittel mit 60 verschiedenen Wirkstoffen zugelassen (Förstermann, 2003). Es wird prognostiziert, dass mittelfristig jedes vierte Arzneimittel aus gentechnischer Herstellung stammen wird. Gegenwärtig basiert die Produktion rekombinanter Arzneimittel sowohl auf prokaryotischen Expressionssystemen als auch auf Hefen oder tierischen Zellkulturen. Diese Herstellungsverfahren bergen jedoch verschiedene Kontaminationsrisiken, sind technisch aufwendig und erfordern immense finanzielle Investitionen in Produktionsanlagen. Seit einigen Jahren stehen für die Erzeugung rekombinanter Proteine auch pflanzliche Expressionssysteme zur Verfügung. Ein entscheidender Vorteil der transgenen Pflanzen gegenüber anderen Systemen ist die wesentlich kostengünstigere Produktion der Proteine. Nach einer Initialphase, in der geeignete Pflanzenlinien erzeugt werden, könnte die Produktion in industriellem Maßstab mit herkömmlichen landwirtschaftlichen Methoden durchgeführt werden. Darüber hinaus könnte durch die Produktion der rekombinanten Proteine in essbaren Pflanzenteilen eine einfachere Darreichungsform ermöglicht werden. Bei der Wahl des Expressionssystems ist jedoch zu beachten, dass zahlreiche therapeutische Proteine eine post-translationale Modifikation wie Disulfidbrücken oder Lipidierung für ihre Wirkung, Stabilität oder immunogene Eigenschaft benötigen (Wang et al., 2004; Steere et al., 1998). Es muss daher gewährleistet sein, dass die Modifikation im gewählten Wirtsorganismus durchführbar ist bzw. das System dahingehend abgeändert werden kann. Ein Beispiel für den Einsatz eines rekombinanten, post-translational modifizierten Impfstoffes ist das „outer surface protein A“ (OspA) aus *Borrelia burgdorferi*, das zur Prävention der Lyme-Borreliose eingesetzt wird. Dieses OspA-Vakzin induziert ausschließlich in lipidmodifizierter Form einen Immunschutz in Menschen und Tieren. Die post-translationale Lipidierung von OspA besteht dabei aus einem Dipalmitylglycerin und einer einzelnen Palmitinsäure am N-terminalen Cystein (Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur; vgl. Abb. 1.1). Die Produktion der OspA-Vakzine findet derzeit in *E. coli*-Zellkultur statt, wobei die für die Wirkung essentielle Lipidierung von *E. coli* korrekt durchgeführt wird (Steere et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wird die Produktion des bakteriellen Lipoproteins OspA in Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* beschrieben. Die Charakterisierung dieses rekombinanten, plastidären (rp) OspA zeigte dabei, dass eine der bakteriellen Lipidierung ähnliche Modifikation an rpOspA in Tabakchloroplasten durchgeführt wurde. Darüber hinaus konnte mit gereinigtem rpOspA eine Immunantwort in Mäusen induziert werden.

---

## 4.1 Chloroplastenexpression von *ospA* und *ot*

Die stabile Transformation von Plastiden Höherer Pflanzen (z.B. Tabak) konnte erstmals 1990 von Maliga und seinen Mitarbeitern erfolgreich durchgeführt werden (Svab et al., 1990). Die zielgerichtete Integration der Expressionskassette in das Plastidengenom wird dabei durch doppelte homologe Rekombination unter Verwendung der entsprechenden endogenen Sequenzen innerhalb der Expressionsvektoren erreicht (Kavanag et al., 1999; Staub & Maliga, 1992).

Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt, um Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) mit den Vektoren pNT1OspA bzw. pNT1OT stabil zu transformieren. Dabei codierte das *ospA*-Gen für ein Prolipoprotein mit N-terminaler Signalsequenz, während *ot* (*ospA truncated*) eine verkürzte *ospA*-Variante darstellte, dessen Genprodukt keine Signalsequenz aufwies. In ersten Untersuchungen an bereits etablierten transgenen Pflanzenlinien wurde während dieser Arbeit jedoch festgestellt, dass es zu weiteren, unerwünschten Rekombinationen zwischen den in der Expressionskassette verwendeten Regelementen (3'-*psbA*) kam, welche den Verlust der Zielgene (*ospA* bzw. *ot*) zur Folge hatten. Für eine Rekombination zwischen homologen Sequenzen werden mindestens je 400 bp lange Sequenzen an beiden Seiten benötigt (Bock, 2001). Von Shikanai et al. (1998) wurden bereits Rekombinationen zwischen endogenen Regelementen und solchen des Transgens beschrieben. Dabei rekombinierte der 3'-*psbA*-Bereich des *aadA*-Gens innerhalb der Expressionskassette mit dem endogenen 3'-Bereich des *psbA*-Gens was zu einer Inversion des dazwischen liegenden Fragments führte. Demgegenüber wurden keine Rekombinationen zwischen einem endogenen und rekombinanten Promoter (*PpsbA*) bei direkter Nachbarschaft beobachtet (Zoubenko et al., 1994). Aus diesem Grund wurden in den hier verwendeten Expressions- und Subklonierungsvektoren (pNT1, pJS25) die 3'-*psbA*-Bereiche, die eine Größe zwischen 415 und 450 bp aufwiesen, entweder durch den Terminator des *rps 16*-Gens (149 bp) ausgetauscht oder auf 230 bp verkürzt. Der verkürzte 3'-*psbA*-Bereich behält die Funktion als Terminator und RNA-stabilisierendes Element bei, ist jedoch für eine homologe Rekombination zu kurz.

Nach diesen Änderungen in den Vektoren gelang es, sowohl das Volllänge-*ospA*-Gen als auch die verkürzte Variante *ospA truncated* (*ot*) stabil in das Tabakchloroplastengenom zu integrieren (Abb. 3.1A). Die verschiedenen transgenen Pflanzenlinien erreichten nach einigen Monaten einen homoplastischen, transplastomen Zustand. Da durch die zielgerichtete Integration der Expressionskassette in das Plastidengenom alle erhaltenen Pflanzenlinien nach der Transformation mit einem Transformationsvektor genetisch und phänotypisch identisch

---

sind (Bock, 2001) war es ausreichend, im Folgenden eine Pflanze (OspAhis13; OT2) pro Transformationsvektor beispielhaft zu charakterisieren.

Der Gehalt an rekombinantem Protein in den homoplastischen Pflanzen wurde für rekombinantes, plastidäres (rp) OspA auf 1% des löslichen Gesamtproteins (LGP) und für rpOT auf 10% des LGP determiniert und entsprach ca. 0,1 mg rpOspA und 1 mg rpOT pro Gramm Blattmaterial (Frischgewicht). Die erreichten Akkumulationen von rpOspA bzw. rpOT stimmten mit denen überein, die mit anderen rekombinanten Proteinen nach Chloroplastenexpression unter Verwendung desselben Promoters (*psbA*) erreicht werden konnten (Millán et al., 2003; Staub et al., 2000). Hier betrug die Akkumulation ca. 1% des LGP für humanes Somatotropin (Staub et al., 2000) und ca. 11% des LGP für humanes Serumalbumin (Millán et al., 2003).

Für den unterschiedlichen Gehalt der zwei OspA-Varianten in den transgenen Pflanzen, deren Gene (*ospA* und *ot*) unter der Kontrolle der gleichen regulatorischen Elemente (5'- und 3'-UTR-*psbA*) standen, können zwei mögliche Erklärungen in Betracht gezogen werden. Zum einen variieren die codierenden Regionen dieser beiden Gene direkt hinter der Transkriptions-Initiations-Stelle (AUG). Wie schon für das *neo*-Gen beschrieben, führen Mutationen unterhalb des Startcodons zu einer bis zu 35-fach verminderten Translation des Gens (Kuroda & Maliga, 2001). Dieser Effekt könnte daher auch für die unterschiedliche rpOspA- bzw. rpOT-Akkumulation in den transgenen Pflanzen verantwortlich sein. Um diese Hypothese zu prüfen, könnten in weiteren Versuchen stille Mutationen in die *ospA*-Sequenz direkt nach dem Startcodon eingebaut und damit transgene Pflanzen etabliert werden. Immuno-Blot-Untersuchungen dieser transgenen Pflanzen sollten dann Aufschluss über eine erhöhte oder verminderte Akkumulation des rekombinanten Proteins geben können. Zum anderen wurde auch bei der Expression von *ospA* in *E. coli* eine unterschiedliche Akkumulation von lipidiertem OspA und der nicht-lipidierten, löslichen Form beschrieben (Erdile et al., 1993; Dunn et al., 1990). Dabei akkumulierte lipidiertes OspA in geringerem Maße als die lösliche Form. Diese Tatsache wurde dadurch begründet, dass lipidiertes OspA in den Bakterienmembranen verankert wird und eventuell ein toxisches Produkt für die Bakterienzelle darstellt (Erdile et al., 1993; Dunn et al., 1990). Folglich könnte bei plastidärer Expression ebenfalls die Lipidmodifikation, die ausschließlich an rpOspA, jedoch nicht an rpOT ausgeführt wurde, der Grund für die unterschiedliche Akkumulation der beiden OspA-Varianten sein. Phänotypisch waren allerdings keine wesentlichen Unterschiede zwischen den transgenen Pflanzen OspAhis und OT erkennbar, die auf einen toxischen Effekt von lipidiertem OspA hätten hindeuten können. Der Wuchs beider Pflanzenlinien war im Gegensatz zu Wildtyp-

---

Tabakpflanzen zwar etwas verlangsamt, dennoch zeichneten sich die transgenen Pflanzen im Allgemeinen durch eine gute Vitalität aus. Toxische Effekte dieser beiden OspA-Varianten nach plastidärer Expression scheinen daher eher unwahrscheinlich.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die heterologe Expression von bakteriellem *ospA* in Tabakchloroplasten möglich ist. Auf Grund der erreichten Akkumulation von 1% des LGP für rpOspA erscheint es darüber hinaus möglich transgene Pflanzen in dieser Weise für die Herstellung von Lipoprotein-Impfstoffen einzusetzen.

## 4.2 Membranassoziation und Lipidierung von plastidärem OspA

Nachdem transgene OspAhis- und OT-Pflanzen zur Verfügung standen, konnten Untersuchungen zur Lokalisation des Proteins innerhalb der Pflanzenzellen durchgeführt werden. Bei bakterieller *ospA*-Expression wird lipidmodifiziertes OspA in der äußeren Membran verankert (Erdile et al., 1993; Brandt et al., 1990). Führt man eine subzelluläre Fraktionierung durch, unterliegen prozessierte Intermediate der Lipidmodifikation jedoch einer unterschiedlichen Verteilung zwischen einer wässrigen und einer lipophilen Phase (Erdile et al., 1993). Genprodukte eines verkürzten *ospA*-Gens hingegen, denen die N-terminale Signalsequenz fehlt, werden in *E. coli* nicht lipidisiert und liegen somit ausschließlich in löslicher, nicht membranassoziierter Form vor (Erdile et al., 1993; Dunn et al., 1990).

Um zu überprüfen, ob ähnliche Verteilungsverhältnisse auch in den transgenen Pflanzen vorliegen, wurden rpOspA und rpOT zunächst auf Membranassoziation untersucht. Dafür eignete sich neben der Präparation von Mikrosomen auch eine mit Chloroplastenmembranen angereicherte Fraktion, die bei der Isolierung von Chloroplasten neben intakten Organellen erhalten wird. Nach einer Mikrosomenpräparation zeigte eine Immuno-Blot-Untersuchung, dass rpOspA in nahezu gleichen Anteilen sowohl in der mikrosomalen als auch in der wässrigen Phase auftrat. Zusätzlich konnte rpOspA in der Chloroplastenmembran-Fraktion detektiert werden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass rpOspA in zwei unterschiedlichen Formen in Plastiden auftritt. Zum einen liegt rpOspA in einer membranverankerten Form vor, die folglich in Mikrosomen sowie in lysierten Chloroplastenmembranen angereichert wird. Zum anderen scheint rpOspA auch in einer löslichen Form vorzuliegen, die sich bei einer Mikrosomenpräparation dann in der wässrigen Phase befindet.

Im Vergleich zu rpOspA zeigte rpOT nach Mikrosomenpräparation eine ungleiche Verteilung zwischen der wässrigen und der lipophilen Phase und fehlte vollständig in der Chloroplasten-



membran-Fraktion. Daraus lässt sich schließen, dass rpOT nicht mit Membranen assoziiert vorliegt und somit löslich ist. Das Auftreten sehr geringer Mengen von rpOT in der lipophilen Phase könnte von Einschlüssen löslichen Proteins in Membranvesikel kommen

Ob die Membranverankerung von rpOspA auf eine Lipidierung zurückzuführen war, wurde durch *In vivo*-Isotopen-Markierungsexperimente überprüft. Dabei konnte durch den Einbau von radioaktiv-markierter Palmitinsäure in rpOspA eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei rpOspA um ein Lipoprotein handelt. Erstmals konnte somit in dieser Arbeit die Lipidierung eines rekombinanten Proteins in Chloroplasten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu rpOspA fand keine Inkorporation der radioaktiv-markierten Palmitinsäure in rpOT statt, was die Hypothese bestätigte, dass rpOT eine lösliche und daher nicht-modifizierte OspA-Variante darstellt.

In Eukaryoten ist die post-translationale Palmylierung von Proteinen die häufigste und vielfältigste Form der Lipidmodifikation und im Gegensatz zur Myristinylierung ein reversibler Prozess (Smotrys & Linder, 2004; Bijlmakers & Marsch, 2003). Dabei kann zwischen N-, O- oder S-Palmylierung unterschieden werden, wobei die S-Palmylierung am häufigsten auftritt. Diese kovalente Modifikation, bei der eine Palmitinsäure über eine Thioesterbindung an die SH-Gruppe von Cystein gebunden wird, kann sowohl an N-terminalen als auch an internen Cysteinen erfolgen (Linder & Deschenes, 2003). Die an diesem reversiblen Prozess beteiligten Enzyme sind Palmyl-Acyl-Transferasen (PATs) und Thioesterasen (Smotrys & Linder, 2004). PAT-Aktivität wurde zunächst in Plasmamembranen von Rattenlebern lokalisiert (Dunphy et al., 1996). Darüber hinaus konnten PATs sowohl in humanen Erythrozyten (Das et al., 1997) als auch in Hefen identifiziert und charakterisiert werden (Lobo et al., 2002; Roth et al., 2002). Für die Palmylierung durch PATs werden zahlreiche Sequenzmotive beschrieben (Smotrys & Linder, 2004). Einige dieser Sequenzmotive weisen ein Glycin oder ein myristinyliertes Glycin N-terminal vor dem zu palmylierenden Cystein auf (Gly-Cys; Myr-Gly-Cys; Smotrys & Linder, 2004; Alland et al., 1994).

Über Palmylierungsprozesse in Pflanzen ist bislang jedoch nur sehr wenig bekannt. Bei den bisher beschriebenen Beispielen handelte es sich ausnahmslos um eine direkte Bindung der Palmitinsäure über eine Thioesterbindung an Cystein (Martín & Busconi, 2000; Thompson & Okuyama, 2000) oder um einen Glykosylphosphatidyl-Inositol-Anker (GPI) am C-Terminus (Borner et al., 2003). Darüber hinaus konnte von Mattoo & Edelman (1987) gezeigt werden, dass das plastidäre D1-Protein, eine Komponente des Photosystems II, einer dynamischen Palmylierung in Chloroplasten unterliegt. Über den dieser Modifikation zu Grunde

---

liegenden Mechanismus, sowie über die Natur der Verknüpfung und die daran beteiligten katalysierenden Enzyme ist jedoch nichts bekannt.

Um nun zu untersuchen, welchem Lipidierungsmechanismus rpOspA in Chloroplasten unterliegt, wurden in der vorliegenden Arbeit weitere *In vivo*-Isotopen-Markierungsexperimente durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob Palmityl-Acyl-Transferasen (PATs) an der Palmytylierung pflanzlicher Proteine beteiligt sind. Die Behandlung von Wildtyp-Tabakprotoplasten mit dem spezifischen PAT-Inhibitor 2-Bromopalmitat (2-BP) zeigte, dass die Lipidierung mehrerer endogener Proteine vermindert war. Dies legt die Vermutung nahe, dass PATs Palmytylierungen in Pflanzen katalysieren und zumindest teilweise durch 2-BP inhibiert werden können. Allerdings lässt sich hier keine Aussage über die Identität der palmytylierten Tabakproteine treffen.

Im Vergleich zu Wildtyp-Protoplasten war bei OspAhis-Protoplasten kein Unterschied in der spezifischen Signalstärke zwischen der unbehandelten und der mit 2-BP behandelten Probe zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass die Palmytylierung des rpOspA in Plastiden unabhängig von Palmityl-Acyl-Transferasen ist und somit von dem in Eukaryoten beschriebenen Palmytylierungsweg abweicht.

Neben der Enzym-katalysierten Palmytylierung von Proteinen wurde auch eine nicht-enzymatische, spontane Palmytylierung von Proteinen *in vitro* beschrieben (Bijlmakers & Marsch, 2003). Dabei wird bei sehr hoher Palmityl-CoA-Konzentration Palmitinsäure an die SH-Gruppe von Cysteinen transferiert. Ob diese nicht-enzymatische Palmytylierung *in vivo* abläuft, ist jedoch fraglich, da in eukaryotischen Zellen Acetyl-CoA-Bindeproteine (ACBP) die Konzentration an freien Fettsäuren niedrig halten (Leventis et al., 1997). Bei der Aufklärung des Lipidierungsmechanismus von rpOspA kann zumindest eine spontane Palmytylierung ausgeschlossen werden, da rpOT, das keine Signalsequenz, aber dennoch ein Cystein in Position +2 trägt, nicht palmytyliert wurde. Dies legt den Schluss nahe, dass die Lipidierung von rpOspA in Chloroplasten vom Vorhandensein einer N-terminalen Signalsequenz abhängig ist.

Da die bisher bekannten eukaryotischen Palmytylierungsmöglichkeiten für die Modifikation von rpOspA in Chloroplasten ausgeschlossen werden konnten, ließ sich die Hypothese aufstellen, dass die an rpOspA durchgeführte Palmytylierung über einen abweichenden Weg vollzogen wird. Eine Möglichkeit wäre der prokaryotische Lipidierungsweg. Bei dieser Modifizierung wird unter Mitwirkung des Enzyms Phosphatidylglycerin:Prolipoprotein-Diacylglycerin-Transferase (Lgt) ein Diacylglycerin über eine Thioetherbindung an ein

---

konserviertes Cystein innerhalb einer Signalsequenz am N-Terminus des Prolipoproteins gebunden. Nach Prozessierung der Signalsequenz durch die Signal-Peptidase II (Lsp) wird an die freie Aminogruppe des nun endständigen Cysteins eine weitere Palmitinsäure über eine Amidbindung gebunden. Dieser letzte Schritt wird durch die Phospholipid:Apolipoprotein-Transacylase (Lnt) katalysiert (Abb. 1.2) (Sankaran & Wu 1994).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst durch Datenbankanalysen geprüft, ob für die bakteriellen Gene *lgt*, *lsp* und *lnt* orthologe Gene auch in Pflanzen vorkommen. Mit den herkömmlichen, verfügbaren Suchalgorithmen (BLAST) konnten jedoch keine offensichtlich orthologen Gene unter den bislang veröffentlichten pflanzlichen Gensequenzen identifiziert werden. Da auch die Produkte von in der Sequenz abweichenden Genen Lipidmodifikationen in Pflanzen ausführen könnten, wurde in einem weiteren *In vivo*-Isotopen-Markierungsexperiment die Wirkung eines spezifischen Inhibitors der Signal-Peptidase II (Lsp), des Antibiotikums Globomycin, getestet. Dabei zeigte sich, dass Globomycin keinen Einfluss auf die Modifikation des rpOspA hatte. Die bisherigen Ergebnisse lassen daher folgende Interpretationsmöglichkeiten zu: 1.) Chloroplasten enthalten keine Enzyme mit Signal-Peptidase II (Lsp)-ähnlicher Funktion, wodurch die Prozessierung von Lipoproteinen nicht möglich ist. 2.) Chloroplasten enthalten eine Signal-Peptidase II, diese erkennt aber nicht die bakterielle Signalsequenz des rpOspA oder 3.) die Signal-Peptidase II in Chloroplasten ist funktionell, lässt sich aber durch Globomycin nicht hemmen. Für die beiden anderen Enzyme Lgt und Lsp sind gegenwärtig keine geeigneten Inhibitoren bekannt, so dass eine Beteiligung möglicher Orthologe an der Lipidierung von rpOspA in Plastiden auf diesem Wege nicht getestet werden konnte.

Nachdem verschiedene Lipidierungsmechanismen ausgeschlossen werden konnten, sollte nun die genaue Struktur und damit die Art der Lipidmodifikation des plastidären OspA durch massenspektrometrische Analysen aufgeklärt werden.

### **4.3 Post-translationale Lipidmodifikation von plastidärem OspA**

Nach dem rpOspA durch zwei aufeinander folgende Affinitäts-Chromatographie-Verfahren in reiner Form gewonnen werden konnte, sollte eine massenspektrometrische Analyse Aufschluss über die von Plastiden durchgeführte Modifikation an rpOspA geben. Dabei zeigte sich, dass die untersuchte rpOspA-Probe nicht homogen war, sondern wahrscheinlich aus mehreren Fraktionen unterschiedlich modifizierter OspA-Varianten bestand. Der Großteil des

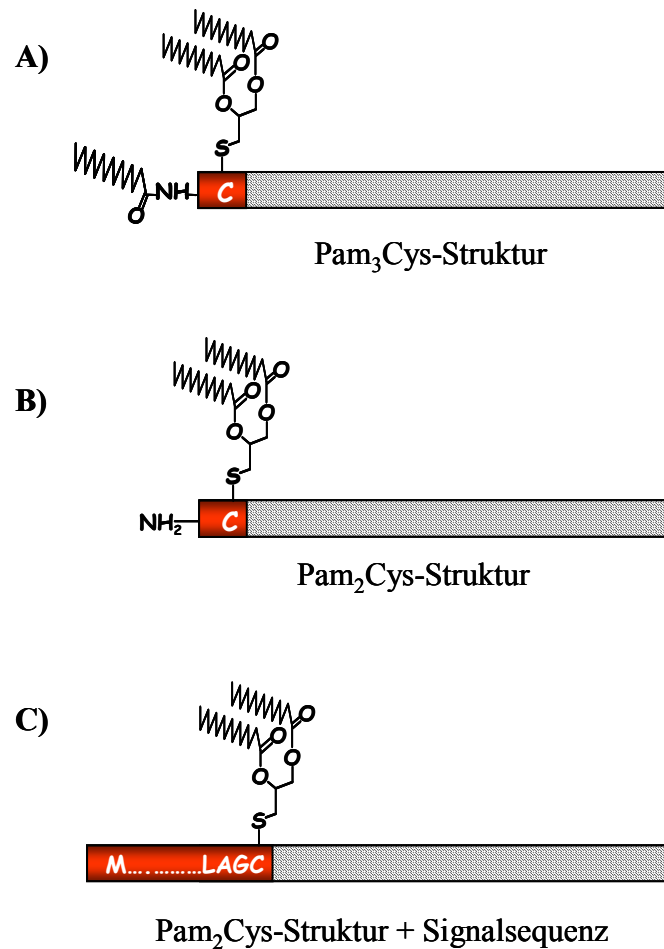
---

rpOspA wies eine Masse von  $m/z$  31270 auf und entsprach dabei dem kompletten Protein mit Dipalmitylglycerin (Abb. 4.1C). Die Heterogenität in der Masse von rpOspA lässt auf den Einbau unterschiedlicher Fettsäuren schließen. Der Nachweis dieser plastidären Modifikation steht damit in Einklang mit früheren Untersuchungen an bakteriellem OspA. Diese zeigten, dass neben Palmitinsäure, die den größten Anteil an OspA-gebundenen Fettsäuren ausmachte auch andere Fettsäuren gebunden sein können (Bouchon et al., 1997). In bakteriellem OspA wurden neben Palmitinsäure auch Myristinsäure, Ölsäure und Palmitoleinsäure in geringen Mengen identifiziert, was zu einer beobachteten Heterogenität der Proteinmasse führte (Bouchon et al., 1997). Daher könnte auch bei plastidärem OspA der Einbau von Myristin-, Öl- oder anderen Fettsäuren die Heterogenität der beobachteten Masse bedingen.

Wie in der Einleitung beschrieben wird bei der Lipidierung von Proteinen in gram-negativen Bakterien das Diacylglycerin-Prolipoprotein von der Signal-Peptidase II prozessiert und erst dann am nun N-terminalen Cystein mit einer dritten Fettsäure versehen (Abb. 1.2; Sankaran & Wu, 1994; Hayashi & Wu, 1990). Aus dieser Modifikation resultiert eine Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur am N-Terminus des Lipoproteins (Abb. 4.1A). In gram-positiven Bakterien existiert ein ähnlicher Lipidierungsmechanismus, dieser ist jedoch bereits nach dem Anfügen eines Diacylglycerins und der darauf folgenden proteolytischen Spaltung des Signalpeptids beendet und resultiert in einer N-terminalen Pam<sub>2</sub>Cys-Struktur (Abb. 4.1B; Sutcliffe & Harrington, 2002; Sutcliffe & Russel, 1995). Anders als in gram-negativen und gram-positiven Bakterien wird die Signalsequenz an plastidär modifiziertem rpOspA nicht abgespalten, wodurch der N-Terminus eine Pam<sub>2</sub>Cys-Struktur + Signalsequenz aufweist (Abb. 4.1C).

Somit konnte gezeigt werden, dass Chloroplasten Höherer Pflanzen offensichtlich noch die Fähigkeit besitzen, den ersten Schritt des prokaryotischen Lipidierungsweges, das Anfügen eines Diacylglycerins an ein Cystein durchzuführen. Im Falle von rpOspA ist das in der Signalsequenz vorkommende Cystein das einzige Cystein in der gesamten OspA-Aminosäuresequenz. Daher besteht kein Zweifel, dass Diacylglycerin an dieses Cystein gebunden wurde und die Signalsequenz für die Lipidierung essentiell war. Rekombinantes OT weist keine Signalsequenz, aber ein Cystein in Position +2 auf und ist ansonsten identisch mit OspA. OT wurde jedoch nicht modifiziert.

---



**Abb. 4.1. Lipidmodifikation an Proteinen.** A) Lipoproteine in gram-negativen Bakterien weisen eine Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur am N-Terminus auf. B) Lipoproteine in gram-positiven Bakterien verfügen über eine N-terminale Pam<sub>2</sub>Cys-Struktur. C) Rekombinantes OspA wurde in Tabakchloroplasten mit einer Pam<sub>2</sub>Cys-Struktur versehen, außerdem besitzt es noch die N-terminale Signalsequenz.

Neben modifiziertem rpOspA wurde auch nicht-modifiziertes rpOspA in der untersuchten Probe detektiert. Dies bestätigte die Vermutung, dass rpOspA in zwei Formen in Chloroplasten vorliegt (Kap. 4.1). Daher scheint diese Lipidierungskapazität in Chloroplasten limitiert zu sein.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass Chloroplasten die Fähigkeit besitzen, eine Bakterien-ähnliche Lipidmodifikation in ein rekombinantes Protein (rpOspA) einzufügen.

#### 4.4. Immunogenität von plastidärem OspA

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, eine alternative Impfstoffproduktion für OspA in Pflanzen zu etablieren. Wie sich in früheren Untersuchungen an bakteriellem OspA zeigte, ist die N-terminale Lipidmodifikation (Pam<sub>3</sub>Cys, Kap. 1.1.1; 1.1.3) essentiell für die Immunogenität des Proteins sowohl in Tieren als auch in Menschen (Sigal et al., 1998; Weis et al., 1994; Erdile et al., 1993). Mit nicht-lipidiertem OspA hingegen, das zudem auch keine Signalsequenz aufwies, konnte kein Immunschutz in Mäusen erzielt werden (Weis et al., 1994; Erdile et al. 1993).

Nachdem in der vorliegenden Arbeit eindeutig gezeigt wurde, dass in Chloroplasten eine Lipidmodifikation von rpOspA stattfand, sollte das immunologische Potenzial von rpOspA an einem etablierten Maus-Modell (Nassal et al., 2005) geprüft werden. Dabei zeigte sich, dass rpOspA eine Immunantwort in Mäusen induzierte und als Antigen das Potenzial besaß, sowohl OspA-spezifische Antikörper als auch protektive LA-2-Äquivalente zu induzieren. Im Vergleich zum etablierten Impfstoff fiel die durch rpOspA induzierte Immunantwort allerdings etwas schwächer aus. Dafür können mehrere Erklärungen in Betracht gezogen werden. Die Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur des bakteriellen OspA wird als essentiell für dessen Immunogenität beschrieben, weshalb die schwächere Immunantwort von plastidärem OspA auf die abgewandelte Modifizierung am N-Terminus von rpOspA (Pam<sub>2</sub>Cys + Signalsequenz) zurückzuführen sein könnte. Darüber hinaus war, wie sich durch die MALDI-TOF-MS-Analyse gezeigt hatte, in der gereinigten rpOspA-Fraktion, die auch für die Immunisierung verwendet wurde, noch ein gewisser Anteil an nicht-modifiziertem rpOspA enthalten, welches keine Immunantwort in Mäusen induziert (Erdile et al., 1993). Somit könnte die geringer ausgeprägte Immunantwort nach Gabe von rpOspA im geringeren Anteil an lipidiertem Protein in der Präparation und der damit geringeren effektiven Dosis begründet sein. Außerdem wurde plastidäres OspA, im Gegensatz zu nativ vorliegendem OspA-Vakzin, den Mäusen in denaturierter Form verabreicht. Die Denaturierung von rpOspA kam durch die Elution des Proteins von den für die Reinigung eingesetzten Magnet-Partikeln mit TFA zu Stande. Durch den Verlust der Konformation von rpOspA könnte speziell das protektive LA-2-Epitop beeinträchtigt sein, welches sich im C-terminalen Teil des Proteins befindet (Luft et al., 2002) und Bereiche der antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter 16-21 einschließt. Daraus könnte schließlich eine verringerte Menge an LA-2-Äquivalenten nach Immunisierung mit rpOspA im Vergleich mit dem OspA-Vakzin resultieren. Überdies musste das eluierte rpOspA vor der Immunisierung zunächst durch Gefriertrocknung von der TFA-Lösung befreit werden. Das Protein konnte nur unvollständig resuspendiert werden, wodurch den Mäusen eine Dispersion

verabreicht wurde. Demgegenüber konnte die verwendete Menge des OspA-Vakzins genau dosiert werden. Infolgedessen könnte die schwächere Immunantwort von rpOspA im Vergleich zu OspA-Vakzin auch in einer geringeren Dosierungsmenge von rpOspA begründet sein.

Neben dem abweichenden Lipidierungsgrad am N-Terminus unterscheidet sich rpOspA zusätzlich durch den C-terminalen His-tag von bakteriellem OspA. In welcher Weise dieser strukturelle Unterschied für die schwächere Immunantwort von rpOspA verantwortlich sein könnte ist unklar. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dieser Unterschied sich auf die Immunogenität auswirken könnte.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten immunologischen Untersuchungen konnte daher eindeutig dargestellt werden, dass in Plastiden produziertes rpOspA eine protektive Immunantwort in Mäusen induziert. Experimente von Prof. Simon zeigten, dass 5 µg von LA-2-ähnlichen OspA-reaktiven Antikörpern pro Maus ausreichen, die Versuchstiere vor einer Infektion mit *Borellia burgdorferi* vollständig zu schützen. Daher stellt das rekombinante, plastidäre OspA, trotz der etwas schwächeren Immunogenität, eine Alternative zu dem in *E. coli* produzierten OspA-Vakzin und somit einen Schutz vor Lyme-Borreliose dar.

Neben der parenteralen Immunisierung können einige Antigene auch oral verabreicht werden und induzieren auf diesem Wege eine Immunantwort. Nach einer oralen Immunisierung werden besonders sekretorische Antikörper (sIgA) gebildet, welche Pathogene schon außerhalb des Körpers, auf den Schleimhäuten neutralisieren können. In vielen Fällen wird aber auch eine systemische Immunantwort induziert. Grundsätzlich ist für die orale Immunisierung eine höhere Dosis an Antigen erforderlich, da ein Teil des Antigens während der Magen-Darm-Passage abgebaut wird (De Aizpurura & Russell, 1988). Erdile und Guy (1997) konnten zeigen, dass auch mit rekombinantem OspA aus *E. coli* nach oraler Immunisierung eine starke Immunantwort in Mäusen induziert wurde. Ob sich die OspA<sub>His</sub>-Pflanzen ebenfalls zur Gewinnung eines oral applizierbaren Impfstoffes eignen, müsste in zusätzlichen Experimenten geklärt werden. Im Anschluss an eine orale Verabreichung von gereinigtem rpOspA müssten ELISA-Untersuchungen von Blutproben zeigen, ob plastidäres OspA sowohl sekretorische Antikörper als auch spezifische Antikörper induzieren kann. Darüber hinaus könnte der Aufreinigungsprozess von rpOspA umgangen werden, in dem ein rpOspA-Pflanzenextrakt für die Immunisierung verwendet würde. Da Tabakblätter jedoch aufgrund der in Wurzeln gebildeten Alkaloide für die Fütterung an Mäuse nicht geeignet sind, könnten Tabak-Sprosse auf Tomaten-Wurzeln gepfropft werden. Dadurch würde verhindert, dass Alkaloide während der Entwicklung der Pflanze aus den Wurzeln in die Blätter transportiert

---

werden. Somit wäre es auch mit an sich giftigen Tabakpflanzen möglich, einen Pflanzenextrakt mit einer entsprechenden Menge an rpOspA Mäusen oral zu verabreichen. Hierbei müsste jedoch bedacht werden, dass rpOspA in den transgenen Pflanzen nicht quantitativ lipidiert ist, wodurch eine größere Menge Pflanzenextrakt notwendig wäre.

Dass ein Antigen eine systemische Immunantwort nach oraler Gabe induzieren muss, ist jedoch nur eine Voraussetzung für die Erzeugung eines essbaren Impfstoffes in Pflanzen. Eine weitere ist, dass die Impfstoffproduktion auch in essbaren Pflanzenteilen erfolgt, z.B. Tomatenfrucht oder Bananen. Dadurch könnte die aufwendige und kostenintensive Aufreinigung der Impfstoffe umgangen werden und der Anbau dieser „Arzneipflanzen“ könnte direkt in der Nähe des Verbrauchers erfolgen. Um eine genaue Dosierung des Antigens zu ermöglichen, könnte durch herkömmliche lebensmitteltechnische Verfahren ein Fruchtbrei hergestellt werden, der die genau benötigte Antigen-Menge enthält. Die Transformation und Regeneration vieler Pflanzen ist jedoch bis heute sehr schwierig. Andere Pflanzen wie die Kartoffel sind wiederum ungeeignet, da sie vor dem Verzehr gekocht werden müssen und die Impfstoff-Moleküle dadurch ihre Struktur und Wirkung verlieren würden. Vor kurzem ist es jedoch gelungen, Plastidengenome von Tomaten (Ruf et al., 2001) und Karotten (Kumar et al., 2004) zu transformieren und transgene Pflanzen zu regenerieren. Die gentechnische Veränderung dieser Pflanzen ist jedoch sehr zeitaufwendig. Daher werden initiale Expressionsversuche und Charakterisierungen rekombinanter Proteine oftmals zuerst an Modell-Pflanzen (z.B. Tabak) durchgeführt.

Sollte sich herausstellen, dass plastidäres OspA aus Tabakpflanzen für eine orale Immunisierung geeignet ist, könnten in weiterführenden Experimenten essbare Pflanzen (z.B. Tomate) mit *ospA* transformiert und daraus transgene, oral zu verabreichende „Arzneipflanzen“ regeneriert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit standen jedoch die Optimierung der Expression sowie die korrekte Modifikation (Pam<sub>3</sub>Cys) von rpOspA im Vordergrund. Wie die MALDI-TOF-MS-Untersuchung gezeigt hatte, wurde rpOspA in Tabakchloroplasten mit einem Diacylglycerin lipidiert. Die durchgeführte Modifikation entspricht dem ersten Schritt des bakteriellen Lipidierungsweges von Lipoproteinen. Die beiden folgenden Schritte, die proteolytische Spaltung des Signalpeptids und die N-Acylierung, konnten von Plastiden jedoch nicht durchgeführt werden. Darüber hinaus scheint die plastidäre Lipidierungskapazität an rpOspA begrenzt zu sein, wodurch in Chloroplasten neben lipidiertem rpOspA auch nicht-lipidiertes rpOspA vorliegt. Da jedoch bei der Verwendung transgener Pflanzen als Bioreaktoren die Ausbeute des rekombinanten Proteins hoch bzw. die Struktur des Proteins authentisch sein

---



sollte, wurden in weiteren Versuchsteilen dieser Arbeit zusätzliche transgene Pflanzen generiert, die eine quantitative und korrekte Lipidierung von rpOspA in Chloroplasten gewährleisten sollten.

#### **4.5 Optimierung der rpOspA-Lipidierung in Tabakchloroplasten**

Die bakterien-ähnliche Organisation einzelner offener Leserahmen (ORF) in so genannten Operons wurde auch für das Chloroplastengenom beschrieben. Dieser Aufbau erlaubt es, mehrere Fremdgene innerhalb einer polycistronischen Einheit zusammenzufassen und in Chloroplastengenome zu integrieren (De Cosa et al., 2001). Durch die synchron gesteuerte Bildung mehrerer Proteine ließen sich auch mehrstufige enzymatische Prozesse in Chloroplasten leichter durchführen.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Möglichkeit gewählt, um rpOspA gleichzeitig mit den bakteriellen, lipidmodifizierenden Enzymen (Lgt, Lsp, Lnt; Abb. 1.2) in Chloroplasten zur Verfügung zu stellen. Dadurch sollte die vollständige und korrekte bakterielle Lipidierung von rpOspA gewährleistet werden. Nach der Identifizierung der transgenen OspA<sub>HisIII</sub>-Pflanzen durch DNA-Blots, konnte bereits nach einigen Monaten ein homoplastischer Zustand dieser Pflanzen erreicht werden. Darüber hinaus war neben polycistronischer RNA auch rekombinantes OspA (rpOspA<sub>III</sub>) in den OspA<sub>HisIII</sub>-Pflanzen detektierbar. Die drei rekombinanten Enzyme Lgt, Lsp und Lnt konnten jedoch nicht spezifisch nachgewiesen werden, da keine Antikörper/Antiseren zur Verfügung standen. Durch Analysen des rpOspA<sub>III</sub> aus den polycistronischen Pflanzen sollte der Einfluss der drei Enzyme (Lgt, Lsp und Lnt) auf die Lipidmodifikation in den Pflanzen untersucht werden. Bei der Untersuchung der nach einer Mikrosomenpräparation erhaltenen Fraktionen zeigte sich für rpOspA<sub>III</sub> ein wesentlicher Unterschied zu rpOspA aus monocistronischen Pflanzen (Kap 4.1). Für rpOspA<sub>III</sub> war ausschließlich ein Signal in der lipophilen Fraktion detektierbar, welche Mikrosomen und die darin integrierten oder verankerten Proteine enthält. Demgegenüber lag rpOspA aus monocistronischen Pflanzen sowohl in der lipophilen als auch in der wässrigen Fraktion in nahezu gleichen Anteilen vor (Kap 4.1). Dass es sich bei rpOspA<sub>III</sub> ebenfalls um ein Lipoprotein handelte, konnte durch den Nachweis der Inkorporation von radioaktiv-markierter Palmitinsäure in rpOspA<sub>III</sub> eindeutig gezeigt werden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass eine quantitative Lipidierung von rpOspA<sub>III</sub> in OspA<sub>HisIII</sub>-Pflanzen stattfand und womöglich auf den Einfluss der modifizierenden Enzyme Lgt, Lsp und Lnt zurückzuführen ist. Ob diese Modifikation dem bakteriellen Lipidierungsmuster (Pam<sub>3</sub>Cys) entspricht, wurde

erneut über die Auswirkung des Inhibitors der Signal-Peptidase II (Lsp) Globomycin auf die Palmytylierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass Globomycin keinen Einfluss auf die Palmytylierung von rpOspA<sub>III</sub> hatte und demnach das zusätzliche Gen *lsp* offensichtlich nicht zu einem funktionellen Protein führte. Dafür können zwei Erklärungen in Betracht gezogen werden. Einerseits ist es möglich, dass das Enzym Lsp, welches zwar auf dem polycistronischen Operon codiert ist und auch in der polycistronischen mRNA nachgewiesen wurde, entweder nicht in ein Protein translatiert oder sehr schnell degradiert wurde. Andererseits könnte Lsp in einer katalytisch inaktiven Form in Chloroplasten vorliegen. In Bakterien interagiert Lsp mit dem Sec-Sekretionsweg, durch den die Diacylglycerin-Prolipoproteine über die Cytoplasmamembran transportiert werden (Haake, 2000; Hayashi & Wu, 1990). Zwar kommen auch Komponenten des Sec-Signalwegs in Chloroplasten vor, allerdings könnte eine fehlende Interaktion mit rekombinantem Lsp die Abspaltung der Signalsequenz von rekombinantem OspA verhindern. Der Einfluss der beiden anderen rekombinanten Enzyme Lgt und Lnt auf die Palmytylierung von rpOspA<sub>III</sub> konnte durch *In vivo*-Isotopen-Markierungsexperimente nicht überprüft werden, da gegenwärtig keine geeigneten Inhibitoren für Lgt und Lnt zur Verfügung stehen. Von gram-negativen Bakterien ist bekannt, dass während der Lipidierung von Proteinen zuerst Diacylglycerin durch das Enzym Lgt an das Cystein gebunden wird. Anschließend erfolgt die Abspaltung der Signalsequenz durch die Signal-Peptidase II (Lsp) und dann erst wird die N-Acylierung durch das Enzym Lnt am nun endständigen Cystein vorgenommen. Da rekombinantes Lsp jedoch keinen Einfluss auf die Modifizierung von rpOspA<sub>III</sub> in Chloroplasten der polycistronischen Pflanze (OspA<sub>HisIII</sub>) hatte, ist voraussichtlich die Signalsequenz von rpOspA<sub>III</sub> ebenfalls noch vorhanden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die quantitative Lipidierung von rpOspA<sub>III</sub> in Chloroplasten der OspA<sub>HisIII</sub>-Pflanze nicht auf die Aktivität von rekombinantem Lnt zurückzuführen ist. Folglich sollte die Modifikation von rpOspA<sub>III</sub> der des rpOspA aus monocistronischen Pflanzen entsprechen. Genauere Erkenntnisse darüber sollte die molekulare Masse von rpOspA<sub>III</sub> geben. Eine erste MALDI-TOF-MS-Analyse von rpOspA<sub>III</sub> ergab ein ähnliches Massenspektrum wie für rpOspA aus der monocistronischen OspA<sub>His</sub>-Pflanze. Der Hauptanteil der Probe wies ebenfalls ein Ion der Masse  $m/z$  31270 auf, welches rekombinantem OspA<sub>III</sub> mit Signalsequenz und Dipalmytylglycerin entsprach. Die Heterogenität der Massen deutete wiederum auf den Einbau unterschiedlicher Fettsäuren hin. Daraus lässt sich schließen, dass rekombinantes Lgt in Pflanzen aktiv ist und einen Dipalmytylglycerin-Rest an das Cystein in rpOspA<sub>III</sub> bindet, wodurch in Chloroplasten der OspA<sub>HisIII</sub>-Pflanzen sämtliches rpOspA<sub>III</sub> in modifizierter Form vorliegt.

---

Zusammenfassend konnte durch die gleichzeitige Expression von *ospA*, *lgt*, *lsp* und *lnt* eine quantitative Lipidierung von plastidärem OspA erreicht werden. Vermutlich geht die gesteigerte Anheftung von Dipalmitylglycerin an das Protein auf die Aktivität der rekombinanten Phosphatidylglycerin:Prolipoprotein-Diacylglyceryl-Transferase (Lgt) zurück. Die Verwendung eines bicistronischen Konstruktes, das neben dem *ospA*-Gen nur noch das *lgt*-Gen trägt, sollte diese Beobachtung bestätigen.

Die in dieser Arbeit generierten bicistronischen Pflanzen (OspAlgt und OspAlsp) zeichneten sich jedoch durch ein sehr schlechtes Wachstum aus und konnten nur wenige Wochen in Zellkultur gehalten werden. Daher war es mit diesen Pflanzen nicht möglich, Untersuchungen des rekombinanten OspA (rpOspA<sub>lgt</sub> und rpOspA<sub>lsp</sub>) auf Membranassoziation und Lipidierung durchzuführen. Die Phänotypen dieser bicistronischen Pflanzen waren dem der OspA-Pflanze ohne His-tag (Kap. 3.1.3) sehr ähnlich. Die Pflanzen zeigten ebenfalls vermehrt Chlorosen und stellten ihr Wachstum nach einigen Monaten komplett ein. Im Gegensatz dazu zeichneten sich die OspAhis- und OspAhisIII-Pflanzen, die ein OspA-Protein mit einem C-terminalen Hexa-Histidin-tag aufwiesen, durch sehr gute Vitalität aus. Somit liegt die Vermutung nahe, dass der C-terminale His-tag einen positiven Effekt auf die OspAhis- und OspAhisIII-Pflanzen ausüben könnte. Dem gegenüber steht jedoch die Tatsache, dass OT-Pflanzen, die keinen His-tag aufwiesen, ein normales Wachstum zeigten. Darüber hinaus lassen sich in der Literatur keine Hinweise auf Einflüsse eines an Proteine angefügten His-tag auf die Vitalität transgener Pflanzen finden.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Pflanzen bestand in der N-terminalen Signalsequenz der rekombinanten OspA-Proteine. Diese Signalsequenz wurde bei plastidärer Modifikation nicht abgespalten und war somit bei modifizierten Proteinen stets vorhanden. Rekombinantes OspA der Pflanzenlinien OspA, OspAlgt und OspAlsp wies dabei als zweite Aminosäure in Position -15 in der Signalsequenz ein Lysin (K) auf (Abb. 4.2A), während rekombinantes OspAhis der Pflanzenlinien OspAhis und OspAhisIII an dieser Stelle die Aminosäure Glutamin (E) trug (Abb. 4.2B). Dieser Unterschied resultierte aus der Klonierungsstrategie, die für die Hexa-Histidin-tragenden Konstrukte angewandt wurde. Dabei wies das *ospA*-Gen im Ausgangsvektor für die His-tag Konstrukte (pKG27OspA:GFP; Kap. 3.1.5) auf Grund einer bereits vorhandenen *NcoI*-Schnittstelle (CC ATG G) im 5'-Bereich einen Basenaustausch von A nach G auf. Dadurch entstand ein Basentriplett, das für ein Glutamin (E) in Position -15 der Aminosäuresequenz codierte (Abb. 4.2B). Die OT-Pflanzen schließlich, bei

---



Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass bakterielles OspA in Tabakchloroplasten einer post-translationalen Lipidierung unterzogen wird. Somit verfügen Chloroplasten neben der Fähigkeit, Disulfidbrücken in rekombinante Proteine einzubauen, (Staub et al., 2000) auch über das Potenzial, Proteine zu lipidieren. Ob noch weitere post-translationalen Modifikationen wie z.B. Glycosylierungen in Chloroplasten stattfinden, ist bislang unklar. Tregoning et al. (2003) beobachteten, dass die Untereinheit C des Tetanus-Toxins (TetC), die sieben potentielle Stellen für eine Asn-Glycosylierung aufweist, nach heterologer Expression in Plastiden keiner Glycosylierung unterzogen wurde. Demgegenüber fanden Glycosylierungen an TetC nach heterologer Expression in Hefe statt (Romanos et al., 1991). Daraus schlossen Tregoning et al. (2003), dass Plastiden generell keine Glycosylierung an rekombinanten Proteinen durchführen können.

Die Fähigkeit der Plastiden, rekombinante Proteine zu lipidieren, erweitert somit das Potenzial transgener Pflanzen als Produktionssystem für rekombinante Proteine bzw. Arzneistoffe enorm. Neben OspA gibt es eine Reihe weiterer Lipoproteine, die als Impfstoff Verwendung finden könnten (Lei et al., 2004; Wallich et al., 2003). Somit wäre es möglich, dass transgene Pflanzen zukünftig ein alternatives Herstellungssystem für diese speziellen Impfstoffe bieten.

Diese Lipidierungskapazität der Plastiden ist jedoch auch bei der heterologen Expression von anderen rekombinanten Proteinen zu bedenken. Daher sollten Proteine, die in Plastiden produziert werden, daraufhin untersucht werden, speziell wenn sie als Arzneistoff eingesetzt werden sollen und eigentlich keine Modifikation aufweisen dürften.

#### **4.6 Stabile Kerntransformation mit *ospA* und *ot***

Zahlreiche therapeutische Proteine wurden in den letzten Jahren im Kerngenom verschiedener Pflanzenarten heterolog exprimiert. Dabei zeigte sich, dass Pflanzen fähig sind, post-translationalen Modifikationen (z.B. Glycosylierung) an rekombinanten Proteinen im Cytoplasma durchzuführen (Gomord & Faye, 2004; Faye et al., 2005). Nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass Plastiden eine Bakterien-ähnliche Lipidierung an rekombinantem OspA durchführen können, sollte in einem weiteren Versuchsteil untersucht werden, ob Lipidierungen an bakteriellen Lipoproteinen auch im Cytoplasma von Pflanzen stattfinden und welcher Art diese sind. Dadurch könnten eventuelle Unterschiede zwischen der stromalen und der cytosolischen Lipidierung an rekombinantem OspA bzw. OT aufgeklärt werden.

---

Hierfür wurden sowohl das *ospA*- als auch das *ot*-Gen in das Zellkerngenom von *N. tabacum* integriert und exprimiert.

Im Gegensatz zur Chloroplastentransformation verläuft die Integration von Transgenen in das Kerngenom ungerichtet und die Expressionskassetten werden zufällig in das Genom integriert. Dabei kann der Einbau an einer oder mehreren Stellen, teilweise auch direkt nacheinander (Tandem) oder in invertierter Richtung erfolgen. Folglich ist die Expression des Transgens vom Integrationsort auf den Chromosomen abhängig (Positionseffekt) und kann zwischen den einzelnen Individuen einer Linie sehr stark variieren (Gelvin, 2003; Peach & Velten, 1991). Ferner können Transgene durch ihren Einbau zur Ausschaltung pflanzen-eigener Gene oder Regelelemente führen, was teilweise zu eingeschränktem Wachstum der transgenen Pflanze führen kann. Neben diesen „Positionseffekten“ können außerdem post-transkriptionale Transgeninaktivierungen, die „Transgen-Silencing“ genannt werden, eine ausbleibende Akkumulation der rekombinanten Proteine zur Folge haben (Gelvin, 2003; Kohli et al., 1999). So kann die RNA instabil sein und sehr schnell degradiert werden. Dies ist wiederum häufig mit dem mehrfachen Einbau des Transgens in einer Pflanze verbunden. Daher wird versucht, nach Kerntransformation eine oder mehrere Linien zu erhalten, bei der das Transgen nur an einer Stelle des Genoms eingebaut ist und in einer heterologen Expression resultiert.

Nach der Integration von *ospA* und *ot* in das Kerngenom konnten in dieser Arbeit ebenfalls mehrere unabhängige transgene *OspA*- und *OT*-Pflanzenlinien durch PCR-Untersuchungen identifiziert werden. Die Immuno-Blot-Untersuchung der transgenen *OT*-Pflanzen ergab dabei eine rekombinante nukleare (rn) *OT*-Akkumulation von ca. 0,001-0,005% des löslichen Gesamtproteins (LGP). Diese Werte liegen in der Größenordnung, wie sie bereits für heterologe Expressionen von anderen bakteriellen Genen im Zellkern von Pflanzen (0,001-0,01%) beschrieben wurden (Daniell, 2001; Haq et al., 1995).

In den *OspA*-Pflanzen hingegen konnte keinerlei rn*OspA*-Akkumulation durch Immuno-Blot-Analysen nachgewiesen werden. Setzt man für rn*OspA* nach nuklearer Expression analog zur plastidären Expression ebenfalls nur ein Zehntel der *OT*-Akkumulation voraus, ist die rn*OspA*-Menge von nur 0,0001-0,0005% des LGP mit den hier verwendeten Methoden nicht detektierbar. Die Tatsache, dass *OspA* nach stabiler Integration in das Kerngenom nicht oder nur sehr gering exprimiert wird, könnte bedeuten, dass der Integrationsort keine Expression des Transgens ermöglicht (Positionseffekt). Jedoch ist es unwahrscheinlich, dass dieser Effekt gleichzeitig bei fünf voneinander unabhängigen Linien auftritt. Dies lässt die Vermutung zu, dass *OspA*-Genprodukte nach heterologer Zellkernexpression einen letalen Effekt auf die

---

Pflanzen haben. Somit hätten ausschließlich die transgenen Pflanzen überlebt, die *ospA* nur sehr gering oder gar nicht exprimierten. Diese Pflanzen zeichneten sich dann durch gute Vitalität aus und zeigten phänotypisch keine wesentlichen Unterschiede zu einer Wildtyp-Tabakpflanze.

Anders hingegen verhielt sich der Phänotyp der OT-Kerntransformanden. Diese zeigten weder Blatt noch Wurzelbildung und konnten lediglich als Kallus in Zellkultur über einen begrenzten Zeitraum kultiviert werden. Dies könnte ebenfalls auf einen Positionseffekt zurückzuführen sein, wodurch durch die Integration des Transgens andere, für ein normales Wachstum essentielle Gene, ausgeschaltet wurden.

Zusammenfassend zeigte sich, dass nach stabiler Zellkerntransformation von *ospA* und *ot* nicht genügend rekombinantes Protein (mOspA und mOT) erhalten werden konnte, um die anschließende strukturelle Untersuchung dieser Proteine durchzuführen. Infolgedessen konnte durch diese Experimente keine Information über die cytoplasmatische Lipidierung an rekombinatem OspA bzw. OT gewonnen werden. Ähnliche Schwierigkeiten, *ospA* im Kerngenom von *N. tabacum* zu exprimieren, wurden aus der Arbeitsgruppe von H. Mason berichtet (persönliche Mitteilung).

Da sich zur Aufklärung der Vorgänge bei der cytoplasmatischen Lipidierung von mOspA bzw. mOT die stabile Zellkerntransformation als ungeeignet erwies, wurde ein transientes virales Expressionssystem der Firma ICON Genetics herangezogen. Mit diesem System wurden bereits zahlreiche Proteine in *N. benthamiana* heterolog exprimiert und die damit erreichten Proteinmengen betragen bis zu 80% des LGP (Marillonnet et al., 2004).

Unter Verwendung dieses transienten Expressionssystems war es in dieser Arbeit möglich, sowohl rekombinantes OspA als auch rekombinantes OT im Zellkern von *N. benthamiana* transient zu exprimieren. Die erlangten Akkumulationen dieser beiden rekombinanten Proteine wurden nach ersten Immuno-Blot-Untersuchungen auf ca. 0,001 bis 0,01% des LGP geschätzt. Diese Werte liegen somit weit unter denen, die für dieses System bereits beschrieben wurden (Marillonnet et al., 2004). Auch im Vergleich zur plastidäre Expression von *ospA* und *ot* ist die erreichte Anreicherung der rekombinanten Proteine nach Kernexpression sehr gering, was wiederum den Vorteil von Plastiden im Bezug auf Akkumulation rekombinanter Proteine herausstellt. Dennoch zeigte sich, dass dieser virale, transiente Ansatz für die *ospA*- und *ot*-Kernexpression geeignet ist. In zukünftigen Experimenten könnten die rekombinanten Proteine OspA und OT nach transientscher Expression auf Membranassoziation und Lipidierung untersucht werden. Anschließende massenspektro-

---

metrische Analysen könnten Aufschluss über mögliche Modifikation von rekombinanten OspA und OT im Cytoplasma von *N. benthamiana* geben. Durch diese Untersuchungen könnten Erkenntnisse über die cytoplasmatische Lipidierungskapazität an rekombinanten bakteriellen Prolipoproteinen gewonnen und eventuelle Unterschiede zur plastidären Modifikation aufgedeckt werden.

Es ist davon auszugehen, dass transgene Pflanzen zukünftig eine enorme Bedeutung als Bioreaktoren für rekombinante Proteine darstellen werden. Es ist daher von großem Interesse, das pflanzliche Potential zur Modifizierung von Proteinen besser zu verstehen.

## 4.7 „Molekular Farming“

Mit „Molekular Farming“ wird unter anderem die Produktion rekombinanter Arzneistoffe in transgenen Pflanzen bzw. pflanzlichen Zellkulturen bezeichnet (Ma et al., 2005; Twyman et al., 2003). Durch intensive Grundlagenforschung wurden in diesem Bereich in den letzten 15 Jahren enorme Fortschritte erzielt. Zahlreiche Therapeutika wie Impfstoffe, Wachstumshormone und Antikörper konnten in unterschiedlichen Pflanzenarten heterolog exprimiert und korrekt prozessiert werden (Daniell et al., 2005b, 2001; Streatfield et al., 2001). In ersten Studien sowohl an Tieren als auch teilweise an Menschen wurde ihre Wirksamkeit unter Beweis gestellt (vgl. Kap. 1.4). Die Kultivierung der transgenen Pflanzen wurde für diese initialen Versuche in Forschungsgewächshäusern unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Bei der Verwendung transgener Pflanzen als Bioreaktoren im Großmaßstab ist zukünftig jedoch das Bepflanzen großräumiger Freilandflächen geplant, wobei beim Anbau der gentechnisch veränderten Pflanzen dann unterschiedlichste Risiken minimiert werden müssten. So müsste gewährleistet sein, dass es zu keiner unkontrollierten Verbreitung der Transgene auf andere Organismen wie Wildtyp-Pflanzen, Insekten oder Mikroorganismen kommt. Hier bietet die Expression der Transgene in Chloroplasten einen entscheidenden Vorteil. Durch die maternale Vererbung der Chloroplasten würde keine Verbreitung der Transgene durch Pollen erfolgen. Außerdem besteht die Möglichkeit, die für die Herstellung der transgenen Pflanzen verwendeten Selektionsmarker wieder aus den etablierten Linien zu entfernen (Corneille et al., 2001), wodurch das Risiko einer Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen auf Mikroorganismen minimiert wird. Bei der Produktion pharmazeutischer Proteine in Pflanzen müsste außerdem gewährleistet sein, dass diese nicht unbeabsichtigt in die Nahrungskette gelangen. Sowohl der Anbau als auch die Vermarktung dieser „neuen

---



Arzneipflanzen“ müssten unter sehr strengen Bestimmungen und Kontrollen erfolgen, da nur so eine kontrollierte Verabreichung der nötigen Dosis garantiert werden kann. Eine unkontrollierte Aufnahme von Impfstoffen könnte zum gegenteiligen Effekt, nämlich der Entwicklung von Toleranz gegenüber einem Antigen führen.

Damit die zu verabreichende Dosis an Antigen eine übliche Mahlzeit nicht übersteigt, ist man außerdem bestrebt, große Mengen an rekombinanten Proteinen in Pflanzen zu erzeugen. Große Mengen an Fremdprotein können jedoch das Pflanzenwachstum beeinträchtigen. Hier besteht die Möglichkeit, die Expression der Transgene durch geeignete Promoter erst spät im Entwicklungszyklus zu induzieren oder die Expression auf ein bestimmtes Gewebe zu begrenzen. Bei der Verwendung transgener Pflanzen als Produktions- und Darreichungssystem für therapeutische Proteine ist neben der Menge an akkumuliertem, rekombinantem Protein auch die korrekte Prozessierung der Proteine wichtig. Durch die vorliegende Arbeit wurde ein Beitrag zum Verständnis post-translationaler Lipidmodifizierungen an rekombinanten bakteriellen Prolipoproteinen in Chloroplasten geleistet. Die immunologischen Untersuchungen mit dem gewonnenen rekombinanten, plastidären OspA belegten dabei das Potential von transgenen Pflanzen als Bioreaktor.

---

## 5. Zusammenfassung

Transgene Pflanzen nehmen einen wachsenden Stellenwert bei der Produktion therapeutischer Proteine, besonders von Impfstoffen, ein. Einige dieser Proteine benötigen für ihre Funktionalität verschiedenste post-translationale Modifikation und es ist nicht bekannt, ob Pflanzen zu diesen Stoffwechsellleistungen befähigt sind. In der vorliegenden Arbeit sollte anhand eines bakteriellen Antigens geprüft werden, ob in Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* an einem rekombinanten Protein eine besondere Form der post-translationalen Modifikation, die Lipidierung, durchgeführt wird und ob somit ein alternatives Produktionssystem für einen Lipoprotein-Impfstoff entwickelt werden kann. Basis für diese Untersuchungen war das bakterielle Lipoprotein OspA (outer surface protein A) aus *Borrelia burgdorferi*. Dieses Protein wird zur Prävention von Lyme-Borreliose eingesetzt und frühere Untersuchungen zeigten, dass OspA sowohl in *B. burgdorferi* als auch nach heterologer Expression in *E. coli* einer post-translationalen Lipidierung am N-Terminus unterliegt. Dabei wird das Protein unter Mitwirkung dreier Enzyme (Lgt, Lsp und Lnt) am N-Terminus mit einer Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur versehen und die N-terminale Signalsequenz abgespalten.

In dieser Arbeit konnten nach der Etablierung eines Expressionssystems mehrere unabhängige transplastome OspA-Tabakpflanzen generiert werden. Der Anteil an rekombinanten, plastidärem OspA (rpOspA) am löslichen Gesamtprotein wurde mit ca. 1% bestimmt. Dabei lag rpOspA sowohl in einer lipidierten, membrangebundenen als auch in einer nicht-modifizierten, löslichen Form vor. Strukturelle Untersuchungen an rpOspA ergaben, dass in Chloroplasten eine Bakterien-ähnliche Lipidierung an dem Protein durchgeführt wurde. Dabei wurde am N-Terminus ein Diacylglycerin über eine Thioetherbindung an das einzige in der Sequenz vorkommende Cystein gebunden. Anders als in Bakterien wurde die Signalsequenz in Chloroplasten jedoch nicht abgespalten und infolgedessen keine dritte Fettsäure an das Cystein gebunden. Die plastidäre Modifikation an rekombinanten OspA resultierte daher in einer Pam<sub>2</sub>Cys-Struktur mit Signalsequenz. Untersuchungen zur Immunogenität des rpOspA in Mäusen zeigten eindeutig, dass das rekombinante Protein aus Tabak die Bildung spezifischer Antikörper induziert und damit in seiner Wirkung vergleichbar dem bakteriellen Protein ist.

Um die Lipidierungsrate des akkumulierten OspA in Chloroplasten zu erhöhen, wurden weitere transplastome Tabakpflanzen generiert. Diese wiesen neben dem *ospA*-Gen auch die Gene (*lgt*, *lsp* und *lnt*) der drei modifizierenden Enzyme aus *E. coli* auf. Durch die simultane Bildung von OspA und den drei modifizierenden Enzyme konnte eine quantitative Lipidierung von rpOspA mit einer Pam<sub>2</sub>Cys-Struktur erlangt werden.

---

Als Grundlage für vergleichende Untersuchungen zwischen plastidärer und cytoplasmatischer Lipidmodifikation in Tabak wurden ebenfalls Transformationen des Zellkerns mit *ospA* durchgeführt, wobei jedoch keine heterologe *ospA*-Expression erreicht werden konnte. Erst durch die Anwendung eines transienten, viralen Expressionssystems war es möglich, *ospA* im Zellkern zu exprimieren.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in Chloroplasten Höherer Pflanzen eine Bakterien-ähnliche Modifikation an rekombinantem OspA durchgeführt wird und das resultierende Protein eine spezifische Immunantwort in Mäusen induzieren kann. Das Potential von transgenen Pflanzen als alternatives Produktionssystem für Lipoprotein-Impfstoffe wird diskutiert.

## 6. Summary

Transgenic plants play an increasing role in the production of therapeutical proteins, especially vaccines. Some of those proteins need a posttranslational modification for their activity of immunogenicity and it is still ambiguous if plants are capable of performing these modifications.

In the present study it was investigated by the use of a bacterial antigen if a particular form of posttranslational modification, the lipidation of proteins, is performed in chloroplasts of *Nicotiana tabacum* and if the resulting plants could be further developed into an alternative production system for lipoprotein-vaccines. For this investigation, the bacterial lipoprotein OspA (outer surface protein A) of *Borrelia burgdorferi* was chosen, a protein used as a vaccine against Lyme disease. Previous studies have been shown that OspA is lipidated on its N-terminus both in *B. burgdorferi* and when expressed in *Escherichia coli*. This modification is performed by three different enzymes (Lgt, Lsp and Lnt) which build up a Pam<sub>3</sub>Cys-structure at the N-terminus of the protein while the N-terminal signal sequence is cleaved.

In the present study several independent transgenic plant lines could be generated by the use of a suitable expression system. Analysis showed that the fraction of recombinant plastidal OspA (rpOspA) in transplastomic plants reached approx. 1% of the total soluble protein. Moreover, a lipid modification could be detected in a fraction of the rpOspA which resulted in the membrane association of a portion of the recombinant protein. The structural analysis of rpOspA revealed that in chloroplasts, rpOspA is lipidated in a bacteria-like manner, including the attachment of a diacylglycerol moiety to the sole cysteine via a thioether linkage. Other than in bacteria, the signal peptide is not cleaved in chloroplasts; thus, no additional fatty acid is attached to the cysteine. The plastidal modification on recombinant OspA therefore resulted in a Pam<sub>2</sub>Cys-structure including the signal sequence. Furthermore, the rpOspA from tobacco showed similar immunogenic properties as the recombinant protein from bacteria when tested in mice, showing the potential of plants as a production system for lipoprotein-vaccines.

To further increase and modify the lipidation rate and pattern of tobacco-derived OspA, a new set of transplastomic tobacco plants were generated. These plants not only carried the *ospA* gene, but also the genes encoding for the three modifying enzymes (*lgt*, *lsp* and *lnt*). This simultaneous expression shifted the ratio between lipidated and non-lipidated rpOspA almost quantitatively to the lipidated form.

For further comparisons of the OspA-lipidation either in plastids or in the cytosol transgenic tobacco plants were established. However, after stable integration of *ospA* into the nuclear

---

---

genome, no detectable heterologous expression could be achieved. Only by using a transient viral expression system the nuclear *ospA* expression was feasible.

In this study it has been shown, that in chloroplasts of higher plants a bacteria-like modification on recombinant OspA was performed and that the resulting protein induced a specific immune response in mice. The potential of transgenic plants as an alternative production system for lipoprotein-vaccines is discussed.

---

## 7. Literaturverzeichnis

- Adams C. C. & Stern D. B. 1990. Control of mRNA stability in chloroplasts by 3' inverted repeats: effects of stem and loop mutations on degradation of psbA mRNA *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* 18:6003-6010.
- Akira S., Takeda K. & Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2:675-680.
- Alland L., Peseckis S. M., Atherton R. E., Berthiaume L. & Resh M. D. 1994. Dual myristylation and palmitoylation of scr family member p59<sup>lyn</sup> affects subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 269:16701-16705.
- Asbrin E. & Hovmark A. 1988. Early and late cutaneous manifestations in Ixodes borne borreliosis (erythema migrans borreliosis, Lyme borreliosis). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539:4-15.
- Bak S., Olsen C. E., Halkier B. A. & Møller B. L. 2000. Transgenic tobacco and arabidopsis plants expressing the two multifunctional sorghum cytochrome P450 enzymes, Cyp79A1 and Cyp71E1, are cyanogenic and accumulate metabolites derived from intermediates in dhurrin biosynthesis. *Plant Physiol.* 123:1437-1448.
- Baranton G., Postic D. & Staint Giron J. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS 461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:378-383.
- Barbour A. G., Heil R. A., & Howe T. R. 1985. Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: a molecular analysis of North American and European isolates. *J. Infect. Dis.* 152:478-484.
- Barbour A. G. & Schrupf M. E. 1986. Polymorphism of major surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. (A)* 263:83-91.
- Becker D., Kemper E., Schell J. & Materson R. 1992. New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197.
- Bernaerts M. & DeLey J. 1967. Mechanism of the 3-ketolactose test for *Agrobacterium*. *Arch. Microbiol.* 56:81-90.
- Bessler W. G., Suhr B., Buhning H.-J., Müller C. P., Wiesmüller K.-H., Becker G. & Jung G. 1985. Specific antibodies elicited by antigen covalently linked to a synthetic adjuvant. *Immunobiology* 170:239-244.
- Bijlmakers M.-J. & Marsh M. 2003. The on-off story of protein palmitoylation. *Trends in Cell Biol.* 13:32-42.
-

- Block M. A., Dorne A.-J., Joyard J. & Douce R. 1983. Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 258:13273-13280.
- Bock R. 2001. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J. Mol. Biol.* 312:425-438.
- Bordier C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256:1604-1607.
- Borner G. H. H., Lilley K. S., Stevens T. J. & Dupree P. 2003. Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis* a proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol.* 132:568-577.
- Bouchon B., Klein M., Bischoff R., van Dorsselaer A. & Roitsch C. 1997. Analysis of lipidated recombinant outer surface protein A from *Borrelia burgdorferi* by mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 246:52-61.
- Boynton J. E., Gillham N. W., Harris E. H., Hosler J. P., Johnson A. M., Jones A. R., Randolph-Anderson B. L., Roberson D., Klein T. M., Shark K. B. & Sanford J. C. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240:1534-1538.
- Brandt M. E., Reley B. S., Radolf J. D. & Norgard M. V. 1990. Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infect. Immun.* 58:983-991.
- Branton W. D., Rudnick M. S., Zhou Y., Eccleston E. D., Fields G.B. Bowers L. D. 1993. Fatty acylated toxin structure. *Nature* 365:496-497.
- Burgdorfer W., Barbour A. G., Heyes S. F., Benach J. L., Grunwaldt E. & Davis J. P. 1982. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis. *Science* 216:1317-1319.
- Burkot T. R., Piesman J. & Wirtz R. A. 1994. Quantification of the *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A in *Ixodes scapularis*: fluctuations during the tick life cycle, doubling times and loss while feeding. *J. Infect. Dis.* 170:883-889.
- Busch U., Hizo-Teufel C., Boehmer R., Fingerle V., Nitschko H., Wilske B. & Preac-Mursic V. 1996. Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* and *B. garnii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34:1072-1078.
- Chang Y.-F., Lauderdale T.-L., Lee W. Y., Shin S. J., Jacobson R. H., Appel M. J. & Lein D. H. 1993. Expression and secretion of outer surface protein (OSP-A) of *Borrelia burgdorferi* from *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 109:297-302.
-

- Corbin D. R., Gebenok R. J., Ohnmeiss T. E., Greenplate J. T. & Purcell J. P. 2001. Expression and chloroplast targeting of cholesterol oxidase in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* 126:1116-1128.
- Corneille S., Lutz K., Svab Z. & Maliga P. 2001. Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the Cre-lox site-specific recombination system. *The Plant Journal* 27:171-178.
- Daniell H., Chebolu S., Kumar S., Singleton M. & Falconer F. 2005b. Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine* 23:1779-17783.
- Daniell H., Khan M. S. & Allison L. 2002. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* 7:84-91.
- Daniell H., Kumar S. & Dufourmantel N. 2005a. Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *Trends Biotechnol.* 23:239-243.
- Daniell H., Streatfield S. J. & Wycoff K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Sci.* 6:219-226.
- Das A. K., Dasgupta B., Bhattacharya R. & Basu J. 1997. Purification and biochemical characterization of a protein-palmitoyl acyltransferase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 11021-11025.
- De Aizpurua H. J. & Russell-Jones G. J. 1988. Oral vaccination: identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *J. Exp. Med.* 167:440-451.
- De Cosa B., Moar W., Lee S.-B., Miller M. & Daniell H. 2001. Overexpression of the *Bt cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat. Biotechnol.* 19:71-74.
- De Silva A. M., Telford S. R., Brunet L. R., Barthold S. W. & Fikrig E. 1996. *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine. *J. Exp. Med.* 183:271-275.
- Defoort J.-P., Nardelli B., Huang W., Ho D. D. & Tam J. P. 1992. Macromolecular assemblage in the design of a synthetic AIDS vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3879-3883.
- Demaerschack I., Ben Messaoud A., De Kesel M., Hoyois B., Lobet Y., Hoet P., Bigaignon G., Bollen A. & Godfroid E. 1995. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J. Clin. Microbiol.* 33:602-608.
-



- Deres K., Schild H., Wiesmüller K.-H., Jung G. & Rammensee H.-G. 1989. *In vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature (London)* 342:561-564.
- Dufourmantel N., Pelissier B., Garçon F., Peltier G., Ferullo J.-M. & Tissot G. 2004. Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol. Biol.* 55:479-489.
- Dunn J. J., Lade B. N. & Barbour A. G. 1990. Outer surface protein A (OspA) from Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*: High level expression and purification of a soluble recombinant form of OspA. *Protein Expr. Purif.* 1:159-168.
- Dunphy J. T., Greentree W. K., Manahan C. L. & Linder M. E. 1996. G-Protein palmitoyltransferase activity is enriched in plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 271:7154-7159.
- Erdile L. F., Brandt M., Warakowski D. J., Westrack G. J., Sadziene A., Barbour A. G. & Mays J. P. 1993. Role of attached lipid in immunogenicity of *Borrelia burgdorferi* OspA. *Infect. Immun.* 61:81-90.
- Erdile L. F. & Guy B. 1997. OspA lipoprotein of *Borrelia burgdorferi* is a mucosal immunogen and adjuvant. *Vaccine* 15:988-996.
- Faye L., Boulaflous A., Bechabane M., Gomord V. & Michaud D. 2005. Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* 23:1770-1778.
- Fikrig E., Barthold S. W., Kantor F. S. & Flavell R. A. 1990. Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. *Science* 250:553-556.
- Fikrig E., Barthold S. W., Kantor F. S. & Flavell R. A. 1992. Long-term protection of mice from Lyme disease by vaccination with OspA. *Infect. Immun.* 60:773-777.
- Förstermann U. 2003. Gentherapie: Erste Erfolge - viele noch unerfüllte Hoffnungen. *Deutsches Ärzteblatt* 100:314-318.
- Fraser, C. M., Gocayne J. D., Whithe O. & et al. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270:397-403.
- Gan K., Gupta S. D., Sankaran K., Schmidt M. B. & Wu H. C. 1993. Isolation and characterization of a temperature-sensitive mutant of *Salmonella typhimurium* defective in prolipoprotein modification. *J. Biol. Chem.* 268:16544-16550.
- Gan K., Sankaran K., Williams M. G., Aldea M., Rudd K. E., Kushner S. R. & Wu H. C. 1995. The *umpA* gene of *Escherichia coli* encodes phosphatidylglycerol:prolipoprotein diacylglycerol transferase (*lgt*) and regulates thymidylate synthase levels through translational coupling. *J. Bacteriol.* 177:1879-1882.
-

- Gelvin S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind "Gene-Jockeying" tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:16-37.
- Gleba Y., Klimyuk V. & Marillonnet S. 2005. Magniffection - a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23:2042-2048.
- Gleba Y., Marillonnet S. & Klimyuk V. 2004. Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:182-188.
- Gomord V. & Faye L. 2004. Posttranslational modification of therapeutic proteins plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:171-181.
- Gross D. M., Forsthuber T., Tary-Lehmann M., Etling C., Ito K., Nagy Z. A., Field J. A., Steere A. C. & Huber B. T. 1998. Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis. *Science* 281:703-706.
- Gubitosi-Klug R. A., Mancuso D. J. & Gross R. W. 2005. The human Kv1.1 channel is palmitoylated, modulating voltage sensing: Identification of a palmitoylation consensus sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5964-5968.
- Gupta R.K. 1998. Aluminium compounds as vaccine adjuvants. *Adv. Drug Delivery Rev.* 32:155-172.
- Haake D. A. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 146:1491-1504.
- Haq T. A., Mason H. S., Clements J. D. & Arntzen C. J. 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-716.
- Hayashi S. & Wu H. C. 1990. Lipoproteins in Bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22:451-471.
- Huang Z., Elkin G., Maloney B. J., Beuhner N., Arntzen C. J., Thanavala Y. & Mason H. S. 2005. Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine* 23:1851-1858.
- Hussain M., Ichihara S. & Mizushima S. 1980. Accumulation of glyceride-containing precursor of the outer membrane lipoprotein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* treated with globomycin. *J. Biol. Chem.* 255:3707-3712.
- Inouye S., Wang S., Sekizawa J., Halegoua S. & Inouye M. 1977. Amino acid sequence for the peptide extension on the prolipoprotein of *Escherichia coli* outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:1004-1008.
- Inukai M., Takeuchi M., Shimizu K. & Arai M. 1986. Mechanism of action of globomycin. *J. Antibiot.* 31:1203-1205.
-

- Janeway Jr. C.A., & Medzhitov R. 2002. Innate Immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216.
- Kang T.-J., Han S.-C., Kim M.-Y., Kim Y.-S. & Yang M.-S. 2004. Expression of non-toxic mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco chloroplasts. *Protein Expr. Purif.* 38:123-128.
- Kaufmann S. H. E. 2004. Novel vaccination strategies. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.*
- Kavanag T. A., Thanh N. D., Lao N. T., McGarth N., Peter S. O., Hovárth E. M., Dix P. J. & Medgyesy P. 1999. Homologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics* 152:1111-1122.
- Kohli A., Gahakwa P., Vain P., Laurie D. A. & Christou P. 1999. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta* 208:88-97.
- Koprowski H. & Yusibov V. 2001. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 19:2735-2741.
- Kramer M. D. Schaible U., Wallich R., Moter S. E., Petzold D. & Simon M. M. 1990. Characterization of *Borrelia burgdorferi* associated antigens by monoclonal antibodies. *Immunobiology* 181:357-366.
- Kumar S. Dingra A. & Daniell H. 2001. Plastid-expressed *betaine aldehyde dehydrogenase* gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol.* 136: 2843-2854.
- Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T. & Felix G. 2004. The N-terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *The Plant Cell* 16:3496-3507.
- Kuroda, H. & Maliga P. 2001. Sequences downstream of the translation initiation codon are important determinants of translation efficiency in chloroplasts. *Plant Physiol.* 125:430-436.
- Kusnadi A. R., Nikolov Z. L. & Howard J.A. 1997. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotech. Bioeng.* 56:473-484.
- Lei B., Liu M., Chesney G. L. & Musser J. M. 2004. Identification of new candidate vaccine antigens made by *Streptococcus pyogenes*: Purification and characterization of 16 putative extracellular lipoproteins. *J. Infect. Dis.* 189:79-89.
- Leskelä S., Wahlström E., Kontinen V. P. & Sarvas M. 1999. Lipid modification of prelipoproteins is dispensable for growth but essential for efficient protein secretion in *Bacillus subtilis*: characterization of the *lgt* gene. *Mol. Microbiol.* 31:1075-1085.
-

- Leventis R., Juel G., Knudsen J. K. & Silvius J. R. 1997. Acyl-CoA binding proteins inhibit the nonenzymatic S-acylation of cysteinyl-containing peptide sequences by long-chain acyl-CoAs. *Biochem.* 36:5546-5553.
- Li H., Dunn J. J., Luft B.J., & Lawson C. L. 1997. Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein A complexed with an Fab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3584-3589.
- Linder M. E. & Deschenes R. J. 2003. New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. *Biochemistry* 42:4311-4320.
- Lobo S., Greentree W. K., Linder M. E., & Deschenes R. J. 2002. Identification of a Ras palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277:41268-41273.
- Luft B. J., dunn J. J. & Lawson C. L. 2002. Approaches toward the directed design of a vaccine against *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* 185:46-51
- Ma J. K.-C., Drake P. M. W. & Christou P. 2005. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Gent.* 4:794-805
- Maliga P. 2002. Engineering the plastid genome of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:164-172.
- Maliga P. 2004. Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 55:289-313.
- Marillonnet S., Giritch A., Gils M., Kandzia R., Klimyuk V, & Gleba Y. 2004. *In planta* engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:6852-6857.
- Martin W. & Hermann R. G. 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens and why? *Plant Physiol.* 118:9-17.
- Martín M. L. & Busconi L. 2000. Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *The Plant Journal* 24:429-435
- Mason H. S., Man-Kit Lam D. & Arntzen C. J. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11745-11749.
- Mason H. S., Ball J. M., Shi J. J., Jiang X., Estes M. K. & Arntzen C. J. 1996. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5335-5340.
- Mason H. S., Haq T. A., Clements J. D. & Arntzen C. J. 1998. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 16:1336-1343.
-

- Mason H. S., Warzecha H., Mor T. & Arntzen J. 2002. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol. Med.* 8:324-329.
- Mattoo A. K. & Edelman M. 1987. Intramembrane translocation and posttranslational palmitoylation of the chloroplast 32-kDa herbicide-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1497-1501.
- Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1:135-145.
- Millán A. F. S., Mingo-Castel A., Miller M., & Daniell H. A. 2003. A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *J. Plant Biotech.* 1:71-79.
- Mullis K. B. & Falcon F. A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Ezymol.* 155:335-3350.
- Nassal M., Skamel C., Kratz P.A., Wallich R., Stehle T. & Simon M.M. 2005. A fusion product of the complete *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) and the hepatitis B virus capsid protein is highly immunogenic and induces protective immunity similar to that seen with an effective lipidated OspA vaccine formula. *Eur. J. Immunol.* 35:655-665.
- O'Connell & et al. 1998. Epidemiology of European Lyme Borreliosis. *Zentralbl. Bakteriol.* 287:229-240.
- Pal U., de Silva A. M., Montgomery R. R., Fish D., Anguita J., Anderson J. F., Lobet Y., & Fikrig E. 2000. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J. Clin. Invest.* 106:561-569.
- Peach C. & Velten J. 1991. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol. Biol.* 17:49-60.
- Pepinsky R. B., Zeng C., Wen D. et al. 1998. Identification of a palmitic acid-modified form of human sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* 273:14037-14045.
- Pham T.-N. & Koide S. 1998. NMR studies of *Borrelia burgdorferi* OspA, a 28 kDa protein containing a single-layer  $\beta$ -sheet. *J. Biomol. NMR* 11:407-414.
- Prágai Z., Tjalsma H., Bolhuis A., van Dijl J. M., Venema G. & Bron S. 1997. The signal peptidase II (*lsp*) gene of *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* 143:1327-1333.
- Qi H.-Y., Sankaran K., Gan K., & Wu H. C. 1995. Structure-function relationship of bacterial prolipoprotein diacylglyceryl transferase: Functionally significant conserved regions. *J. Bacteriol.* 177:6820-6824.
-

- Richter L. J., Thanavala Y., Arntzen C. J., & Mason H. S. 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat. Biotechnol.* 18:1167-1171.
- Rogers S. O. & Bendich A. J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5:69-76.
- Romanos M. A., Makoff A. J., Fairweather N. F., Beesley K. M., Slater D. E., Rayment F. B., Payne M. M. & Clare J. J. 1991. Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. *Nucl. Acids Res.* 19:1461-1467.
- Roth A. F., Feng Y, Chen L. & Davis N.G. 2002. The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase. *J. Cell Biol.* 159:23-28.
- Ruf S., Hermann M., Berger I. J., Carrer H. & Bock R. 2001. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat. Biotechnol.* 19:870-875.
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. 1989. Molecular cloning, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY
- Sanford J. C., Devit M. J., Russell J.A., Smith F. D., Harpending P. R., Roy M. K., & Johnston S. A. 1991. An improved helium-driven biolistic device. *Technique* 3:3-16.
- Sanford J. C., Klein T. M., Wolf E. D. & Allen N. 1987. Delivery of substances into cells and tissue using particle bombardment process. *Part. Sci. Technol.* 5:27-37.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Sankaran K. & Wu H. C. 1994. Lipid modification of bacterial prolipoprotein. *J. Biol. Chem.* 269:19701-19706.
- Schaible U. E., Kramer M. D., Eichmann K., Modolell M., Museteanu C. & Simon M. M. 1990. Monoclonal antibodies specific for the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* prevent Lyme borreliosis in severe combined immunodeficiency (scid) mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3768-3772.
- Schild H., Deres K., Wiemüller K.-H., Jung G. & Rammensee H.-G. 1991. Efficiency of peptides and lipopeptides for *in vivo* priming of virus-specific cytotoxic T-cells. *Eur. J. Immunol.* 21:2649-2654.
- Scholthof H. B., Scholthof K. B. & Jackson A. O. 1996. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:299-323.
-

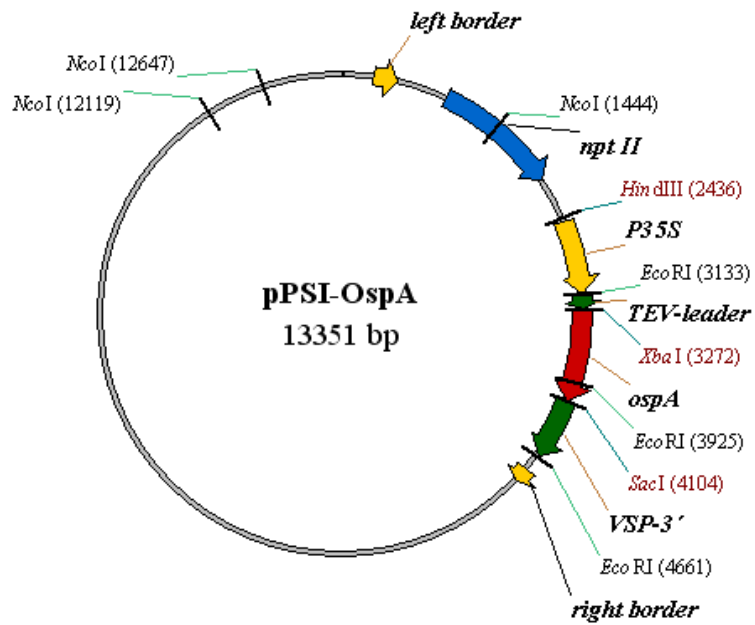
- Schwan T. G., Piesman J., Golde W. T., Dolan M. C., & Rosa P. A. 1995. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2909-2913.
- Sears J. E., Fikrig E., Nakagawa T. Y., Deponte K., Marcantonio N., Kantor F. S. & Flavell R. A. 1991. Molecular mapping of OspA-mediated immunity against *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *J. Immunol.* 147:1995-2000.
- Shapiro A. L., Viñuela E., & Maizel Jr. J. V. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide-gels. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 28:815-820.
- Shikanai T., Endo T., Hashimoto T., Yamada Y. & Asada K. 1998. Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:9705-9709.
- Sidorov V., Kasten D., Pang S.-Z., Hajdukiewicz P. T. J., Staub J. M., & Nehra N. S. 1999. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *The Plant Journal* 19:209-216.
- Sigal L.H. et al. 1998. A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A to prevent Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 339:216-222.
- Simon M. M., Schaible U. E., Kramer M. D., & et al. 1991. Recombinant outer surface protein A from *Borellia burgdorferi* induces antibodies protective against spirochetal infection in mice. *J. Infect. Dis.* 164:123-132.
- Simon M. M. et al., 1996. Protective immunization with plasmid DNA containing the outer surface lipoprotein A gene of *Borreilia burgdorferi* is independent of an eukaryotic promoter. *Eur. J. Immunol.* 26: 2831-40
- Smotrys J. E. & Linder M. E. 2004. Palmitoylation of intracellular signalling proteins: Regulation and function. *Annu. Rev. Biochem.* 73:559-587.
- Staub J. M., Garcia B., Graves J., Hajdukiewicz P. T. J., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlittler M., Carroll J. A., Spatola L., Ward D., Ye G. & Russell D. A. 2000. High-yield production of human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat. Biotechnol.* 18:333-338.
- Staub J. M. & Maliga P. 1992. Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *The Plant Cell* 4:39-45.
- Staub J. M. & Maliga P. 1993. Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the psbA mRNA. *EMBO J.* 12:601-606.
- Staub J. M. & Maliga P. 1994. Translation of psbA mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids. *The Plant Journal* 6:547-553.
-

- Staub J. M. & Maliga P. 1995. Expression of a chimeric *uidA* gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids. *The Plant Journal* 7:845-848.
- Steere A. C., Malawista S. E., Snyderman D. R., Shope R. E., Andiman W. A., Ross M. R. & Steele F. M. 1977. Lyme arthritis: An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum.* 20: 7-17.
- Steere A. C., Schoen R. T., & Tayler E. 1987. The clinical evolution of Lyme arthritis. *Ann. Intern. Med.* 107:725-731
- Steere A. C. 1989. Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 321:586-596.
- Steere A. C. 1994. Lyme disease: a growing threat to urban populations *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2378-2383.
- Steere A.C., Sikanad V. K., Meurice F., Parenti D. L., Fikrig E., Schoen R. T., Noxakaoxsko J., Schmid C. H., Laukamp S., Buscarino C., Krause D. S. & Lyme Disease Vaccine Study Group. 1998. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. *N. Eng. J. Med.* 339: 209-215.
- Streatfield S. J. et al. 2001. Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine* 19:2742-2748.
- Streatfield S. J. et al. 2002. Development of an edible subunit vaccine in corn against enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 38:11-17.
- Sutcliffe I. C. & Harrington D. J. 2002. Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology* 148:2065-2077.
- Sutcliffe I. C. & Russell R. R. B. 1995. Lipoproteins in gram positive bacteria. *J. Bacteriol.* 177:1123-1128.
- Svab Z., Hajdukiewicz P. T. J. & Maliga P. 1990. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530.
- Svab Z. & Maliga P. 1993. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:913-917.
- Tacket C. O., Mason H. S., Losonsky G.A., Estes M. K., Levine M. M., & Arntzen C. J. 2000. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J. Infect. Dis.* 182:302-305.
- Tacket C. O., Mason H. S., Losonsky G., Clements J. D., Levine M. M., & Arntzen C. J. 1998. Immunogenicity in humans of recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nature Medicine* 4:607-609.
-

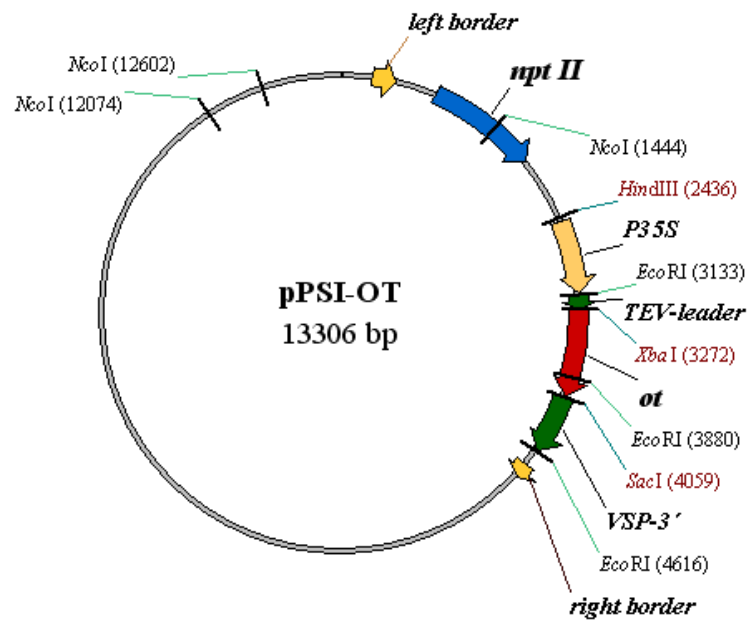


- Thanavala Y., Mahoney M., Pal S., Scott A., Richter L. J., Natarajan N., Goodwin P., Arntzen C. J., & Mason H. S.. 2005. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:3378-3382.
- Thompson Jr. G., A. & Okuyama H. 2000. Lipid-linked proteins of plants. *Prog. Lip. Res.* 39:19-39.
- Tregoning J. S., Nixon P., Kuroda H., Svab Z., Clare S., Bowe F., Fairweather N., Ytterberg J., van Wijk K. J., Dougan G. & Maliga P. 2003. Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucl. Acids Res.* 31:1174-1179.
- Treuter E., Nover L., Ohme K. & Scharf K. D. 1993. Promoter specificity and deletion analysis of three heat stress transcription factors of tomato. *Mol. Gen. Genet.* 240:113-125.
- Tuboly T., Yu W., Bailey A., Degrandis S., Du S., Erickson L., & Nagy É. 2000. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine* 18:2023-2028.
- Twyman R. M., Stoger E., Schillberg S., Christou P. & Fischer R. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnol.* 21:570-578.
- van Beeumen J. & DeLay J. 1968. Hexopyranoside: cytochrome C oxidoreductase from *Agrobacterium tumefaciens*. *Eur. J. Biochem.* 6:331-343.
- Wallich R., Jahraus O., Stehle T., Thao Tran T. T., Brenner C., Hofmann H., Gern L. & Simon M. M. 2003. Artificial-Infection protocols allow immunodetection of novel *Borrelia burgdorferi* antigens suitable as vaccine candidates against Lyme disease. *Eur. J. Immunol.* 33:708-719.
- Walmsley A. M. & Arntzen C. J. 2000. Plants for delivery of edible vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:126-129.
- Wang Z. H., Lui Y., Ji J. G. & Tang J. G. 2004. Effects of deletion and shift of the A29-B19 disulfide bound on the structure, activity, and refolding of proinsulin. *J. Biochem. (Tokyo)* 135:25-31.
- Warzecha H. & Mason H. S. 2003. Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants. *J. Plant Physiol.* 160:755-764.
- Warzecha H., Mason H. S., Lane C., Tryggvesson A., Rybicki E., Williamson A.-L., Clements J. D., & Rose R. C. 2003. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J. Virol.* 77:8702-8711.
- Webb Y., Hermida-Matsumoto L., & Resh M. D. 2000. Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T-cell signalling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 275:261-270.
-

- Weis J. J., Ma Y., & Erdile L. F. 1994. Biological activities of native and recombinant *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A: dependence on lipid modification. *Infect. Immun.* 62:4632-4636.
- Willett T. A., Meyer A. L. & Huber B. T. 2004. An effective second-generation outer surface protein A derived Lyme vaccine that eliminates a potentially autoreactive T-cell epitop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:1303-1308.
- Wilske B., Barbour A.G., Bergstrom S. & et al. 1992. Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp. *Res. Microbiol.* 143:583-596.
- Wu X. D., Marakov K. L., Marinez P. A., McVerry P. H. & Malinzak D. A. 1997. Analysis of lipidation of recombinant Lyme vaccine protein (rOspA) by electrospray mass spectroscopy. *J. Pharm. Biol. Analys.* 16:613-617.
- Yamagata H., Daishima K. & Mizushima S. 1983. Cloning and expression of a gene coding for the prolipoprotein signal peptidase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 158:301-304.
- Zoubenko O. V., Allison L. A., Svab Z. & Maliga P. 1994. Efficient targeting of foreign genes into tobacco plastid genome. *Nucleic Acids Res.* 22:3819-3824.
-



Vektorkarte des Kernexpressionsvektors pPS1OspA



Vektorkarte des Kernexpressionsvektors pPS1OT

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Martin J. Müller danke ich für die Möglichkeit diese Dissertation am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie durchführen zu können.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. H. Warzecha für die Überlassung dieses überaus interessanten und vielseitigen Themas sowie für die Betreuung und Unterstützung während der gesamten Bearbeitung.

Frau Dr. B. Bouchon danke ich für die MALDI-TOF-MS-Analysen sowie für die Kooperationsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. M. Simon und T. Stehle bedanke ich mich für die Immunologischen Untersuchungen und die Kooperationsbereitschaft.

Mein Dank gilt ebenfalls allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie für ihre Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich Frau Dr. Christiane Löffler für das Korrekturlesen.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Botanischen Gartens der Universität Würzburg, insbesondere Herrn Rothenhöfer danke ich für die gute Versorgung der Gewächshauspflanzen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes an Dr. H. Warzecha.

Mein liebevollster Dank gilt meinem Freund Michael für die endlose Geduld und die liebevolle Unterstützung. In gleicher Weise möchte ich meinen Eltern danken, die alles ermöglichten.

---

## Publikationsliste und Beiträge zu Tagungsbänden

### Publikationsliste

Glenz K., Bouchon B., Stehle T., Wallich R., Simon M. & Warzecha H. 2005. A recombinant bacterial lipoprotein vaccine from higher plant chloroplasts. *doi:10.1038/nbt1170*. *Nature Biotechnology* (in press).

### Magazinbeiträge:

Glenz K. & Warzecha H. Essbare Impfstoffe in Pflanzen. Mensch und Medikament. Dezember 2003, 10-12.

### Beiträge zu Tagungsbänden

Glenz K. & Warzecha H. 2003. Production of vaccines in transgenic plants: Expression of the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* in tobacco chloroplasts. Posterpräsentation, 51. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Kiel.

Glenz K. & Warzecha H. 2003. Production of vaccines in transgenic plants: Expression of the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* in tobacco chloroplasts. Posterpräsentation, Tagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Würzburg.

Glenz K., Warzecha H. 2004. Production of vaccines in transgenic plants: Palmitoylation of a bacterial lipoprotein of *Borrelia burgdorferi* in tobacco chloroplasts. Posterpräsentation, Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Vereinigung für angewandete Botanik, Braunschweig.

Glenz K., Bouchon B., Stehle T., Wallich R., Simon M. & Warzecha H. 2005. A recombinant bacterial lipoprotein vaccine from higher plant chloroplasts. Posterpräsentation, Tagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft. Mainz.

---

## Lebenslauf

Karin Glenz

Geburtsdatum: 27. November 1974  
Geburtsort: Müllheim/Baden  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulischer Werdegang

1981-1984 Grundschole in Buggingen  
1985-1991 Alemannen-Realschole in Müllheim  
1991-1995 St. Ursula-Gymnasium in Freiburg; Abschluss: Abitur  
Aug. 1992-Feb. 1993 Au-pair-Aufenthalt in den USA

### Universität

Okt. 1995-Dez. 2001 Studium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i Br. Abschluss: Diplom-Biologin.  
Hauptfach: Zellbiologie  
Nebenfächer: Biochemie (der Pflanzen)  
Zoologie (Entwicklungsbiologie)  
Klinische Chemie und Hämatologie

März 2001-Dez. 2001 Diplomarbeit am Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire in Strasbourg, Frankreich.  
Thema: "Functional characterization of enhancer elements controlling the expression of *sonic hedgehog* and *tiggy-winkle hedgehog* in the zebrafish *Danio rerio*".

Seit März 2002 Promotionsstudium am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg.

---

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Ich erkläre, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den .....

---