

Tombus 바이러스의 RNAi Suppressor p19 유전자에 의한 *Chlamydomonas reinhardtii*의 형질전환

정원중^{1*}, 유장렬¹, Heriberto Cerutti²
¹한국생명공학연구원, 식물유전체연구센터, ²미국네브라스카대학

Genetic Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with the RNAi Suppressor p19 Gene of Tombus Virus

Won Joong Jeong^{1*}, Jang Ryol Liu¹, and Heriberto Cerutti²

¹Plant Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea

²Biological Sciences and Plant Science Initiative, University of Nebraska, Lincoln, NE 68588, USA.

ABSTRACT *Chlamydomonas reinhardtii* was transformed with the coding sequence of the Tombus virus gene p19 to determine whether the gene functions as an RNAi suppressor in *C. reinhardtii*. Transformants were confirmed to have 1 to several copies of p19 gene in their chromosomes. When an RNAi strain of *C. reinhardtii* generated by transforming the inverted repeat (IR) sequence homologous to the 3'UTR region of the *MAA7* gene was re-transformed with the gene p19, *MAA7* transcript levels of transformants fluctuated and proliferation of transformants on the medium containing 5-FI was suppressed. Overall results suggest that p19-mediated silencing suppression works at a low level in *C. reinhardtii* because of difference in codon usage resulting in weak P19 expression unless p19-mediated silencing suppression in *C. reinhardtii* works in a different manner from higher plants.

서 론

클라미도모나스 (*Chlamydomonas reinhardtii*)는 단세포 녹조류로서 green yeast라 불리며 식물 광합성 연구 및 동물 편모 운동 연구의 모델로서 수 많은 mutant들을 이용한 유전학적 연구의 재료로 사용되어 왔다 (Harris 1989, Harris 2001). 클라미도모나스의 genome 크기는 약 120 M base로서, 최근 genome project가 수행되어 70%의 염기서열 및 15만개의 EST 발표되었으며, 15000개 이상의 유전자가 존재하는 것으로 밝혀졌다. 클라미도모나스에는 다세포 고등생물의 발

달단계에 관련된 유전자를 제외한 모든 유전자가 존재하는 것으로 생각되어 기능 유전체 연구 및 애기장대와의 비교 유전체 연구가 진행 중이다 (Grossman et al. 2003, Gutman and Niyogi 2004, Gonza'lez-Ballester et al. 2005). 클라미도모나스는 핵, 엽록체, 미토콘드리아의 형질전환이 모두 가능한 유일한 모델 식물이다 (Debuchy et al. 1989, Kindle et al. 1989, Boynton et al. 1988, Randolph-Anderson et al. 1993). 이처럼 발달된 형질전환 기술을 적용하여, 재조합 백신생산, 항체생산, 수소생산 등의 bioreactor 및 중금속이 오염된 토양 복원의 bioremediation의 재료로 클라미도모나스를 이용하는 연구가 수행 되고 있다 (Mayfield et al. 2003, Sayre et al. 2003, Melis 2002, Siripornadulsil et al. 2002).

한편, 형질전환 클라미도모나스에서 외래유전자의 발현

*Corresponding author Tel 042-860-4462 Fax 042-860-4608

E-mail: wonjoong@kribb.re.kr

이 억제되는 현상이 자주 관찰 되었는데, 이것은 강력한 gene silencing 기작 때문으로 보고되었다 (Cerutti et al. 1997, Wu-Scharf et al. 2000). Gene silencing 현상은 식물 및 동물 등 진핵생물에 존재하는 기작으로서 생물의 발달단계 및 시기에 따라 자신의 유전자 발현을 조절하고, 외부 유전자 (바이러스, 세균, transposon)의 침입으로부터 자신을 보호한다. 그러나 형질전환에 의해 도입시키고자 하는 외래 유전자의 발현도 억제하는 역할을 하기 때문에, 효율적으로 외래유전자를 발현시키기 위해서는 gene silencing 기작을 이해하고 조절하는 것이 필요하다. 고등식물 및 동물에서는 gene silencing 관련 mutant 및 CMV2b, TBSVP19 TCV-CP, HC/pro 등 virus 유래의 gene silencing suppressor들을 이용한 외래유전자 발현 조절 연구가 보고되었다 (Meins et al. 2005, Anandalakshmi et al. 1998, Voinnet et al.1999, Qu et al. 2003, Kasschau et al. 2003). 클라미도모나스에서 유사한 gene silencing 관련 mutant들이 발견되었다 (Wu-Scharf et al. 2000, Zhang et al. 2002, Ibrahim et al. 2006). 그러나 gene silencing suppressor들이 클라미도모나스에서 동일한 기능을 하는지는 아직 연구되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 외래유전자의 효율적인 발현조절 및 gene silencing 기작을 이해하고자 RNAi suppressor로 알려진 Tombus virus의 P19 단백질 유전자를

클라미도모나스에 도입하여 이를 분석하였다.

재료 및 방법

p19 유전자를 가지는 형질전환 벡터 제작

Tombus virus의 p19유전자를 가지는 pRTL-TBP19 플라스미드를 네브라스카 대학의 Qu 박사 (Qu et al. 2003)로부터 분양받아 클라미도모나스 형질전환용 벡터를 제작하였다. pRTL-TBP19 플라스미드를 *Xba*I, *Klen*how, *Nco*I 효소로 차례로 처리한 후, 분리한 520 bp의 P19 coding sequence를 *psaD* promoter와 terminator로 이루어진 플라스미드 (NE589)의 *Nco*I/*Eco*RV site에 도입하여 클라미도모나스 형질전환 벡터 589p198를 제작하였다 (Fig. 1A).

배양 및 형질전환

클라미도모나스는 TAP 기본배지 (Tris-acetate-phosphate, Harris 1989)에서 배양하여 25°C, 16시간 명조건으로 유지하였다. Wild type strain CC-124 (mt⁻) (Harris 1989), RNAi strain #33 그리고 #1 strain을 재료로 사용하였다. #33은

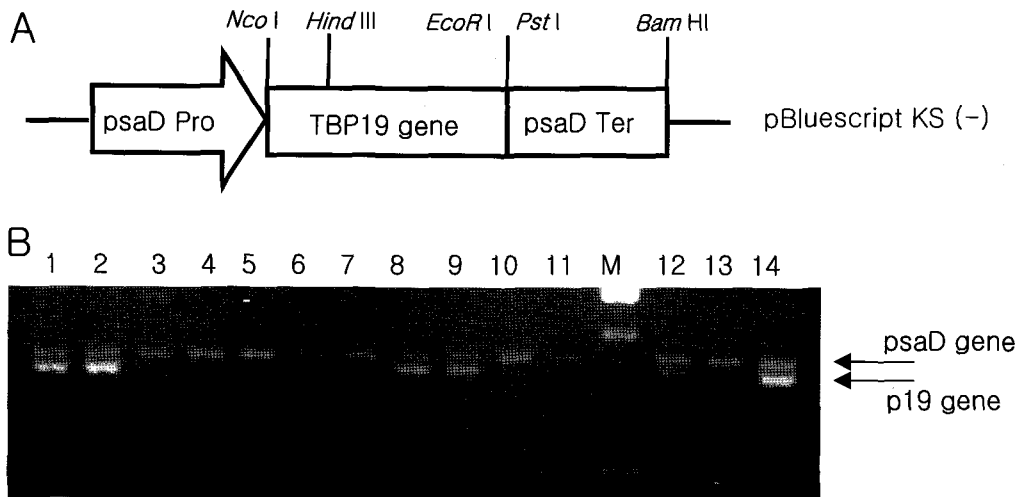


Figure 1. Chlamydomonas transformation vector and PCR analysis of transgenic *C. reinhardtii*. (A) Chlamydomonas transformation vector 589p198 for p19 gene expression. *psaD* Pro, promoter region of *psaD* gene of *C. reinhardtii* TBP19, coding sequence of P19 of Tombus virus ; *psaD* Ter, terminator region of *psaD* gene of *C. reinhardtii* pBluescript KS (-), cloning vector (Stratagene). (B) p19 gene amplification using PCR of transgenic *C. reinhardtii*. M, DNA size marker; lane 1 to 14, hygromycin resistant colonies. p19 gene insertion was confirmed in lanes 1, 2, 8, 9, 11 and 14. Total DNA, primers and the reaction buffers were incubated in a DNA thermal cycler under the conditions of 95°C for 5 min followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 30sec and 71°C for 1 min, and followed by a final 5 min extension at 72°C before electrophoresis. Upper band represented intrinsic *psaD* gene and lower band represented the transgene p19.

Maa7 유전자의 발현이 억제된 strain으로서 tryptophan-유도체인 5-fluoroindole (5-FI) 과 tryptophan이 첨가된 배지에서 생존한다 (Rhor et al. 2004). #1은 #33 strain에 paromomycin 저항성 유전자가 도입된 strain이다. 형질전환을 위하여 p19 유전자를 가진 589p198 벡터와, 선발마커로 hygromycin에 저항성을 부여하는 hyg3 유전자를 가지는 pHYG3 벡터 (Berthold et al. 2002)를 동시에 사용하였다. 589p198 벡터는 *Bam*HI 처리하고, pHYG3 벡터는 *Hind*III 처리후 정제된 linearized 형태의 DNA를 형질전환에 사용하였다. Autolysin 처리로 분리된 클라미도모나스 원형질체를 형질전환벡터와 혼합하여 Glass beads 방법 (Kindle et al. 1990)으로 형질전환을 수행하였다. 형질전환후 hygromycin 저항성을 가지도록 2 일간 dim light 조건에서 액체 정치배양하고, 이후 10 mg/L hygromycin (Invitrogen, USA) 이 첨가된 TAP배지에서 형질전환체를 선발하였다. 배양 2주 후 선발된 cc-124, #33, #1 colony들을 20 mg/L hygromycin이 첨가된 배지로 옮겨 배양하였다. #33 strain의 경우 20 mg/L의 hygromycin이 첨가된 배지에서 유지하면서, 동일반복 (replica)의 colony들을 10 mg/L 5-FI (Sigma, USA) 와 1.5 mM tryptophan (Sigma, USA) 이 함께 첨가된 배지에 옮겨 느리게 자라는 개체를 선발하였다.

DNA와 RNA 분석

액체배지에서 25°C, 16시간 명조건으로 2-4 일간 배양된 클라미도모나스로부터 DNA와 RNA를 분리하여 분석하였다. Genomic DNA 분리, PCR, 전기영동, Southern 분석은 표준 방법을 사용하였다 (Sambrook and Russell 2001, Wu-Scharf et al. 2000). 형질전환 클라미도모나스로부터 분리한 10 µg의 genomic DNA를 *Hind*III 제한효소로 처리하여 Southern 분석에 이용하였다. 1차적인 형질전환체 확인에 GC-rich system (Roche USA)를 사용하여 PCR을 수행하였으며, psaD 유전자의 promoter와 3'UTR 부위에서 각각 작성한 primer, psaD Pro-int (5'-AGCAAGCCAGGGTTAGGTGTT-3)와 psaD 3UTR-3 (5'-CAAGGATCCATGTGCACAGTCACGCT-3')를 사용하였다. TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 전체 RNA를 분리하였고, 10 µg의 전체 RNA를 Northern분석에 사용하였다. 전체 RNA의 전기영동 및 Northern 분석은 표준방법을 사용하였다 (Sambrook and Russell 2001, Wu-Scharf et al. 2000, Zhang et al. 2002). 형질전환벡터 589p198을 *Hind*III/*Eco*RI으로 처리하여 p19

유전자의 뒷부분 270 bp의 DNA를 분리하고 ³²P로 표지하여 probe로 사용하였으며, imaging plate (Fujifilm, Japan)를 이용하여 Southern 및 Northern 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

형질전환 벡터제작

본 연구에 사용된 p19 유전자는 Tombus virus 에서 분리된 것으로 gene silencing suppressor로서 작동함이 보고되었다 (Qu et al. 2003). 한편 클라미도모나스에서는 고등식물의 조절유전자가 일반적으로 작동하지 않기 때문에 대부분의 연구에서 클라미도모나스 유전자로부터 분리한 rbcS2 promoter, hsp70 promoter, psaD promoter를 사용하는 것이 외래유전자의 발현에 훨씬 효율적인 것으로 보고되었다 (Lumbreras et al. 1998, Schroda et al. 2000, Fischer and Rochaix 2001). 따라서 본 연구에서도 psaD 유전자의 promoter와 terminator를 이용하여 p19 유전자 발현을 조절하도록 벡터를 제작하였다 (Fig. 1A).

형질전환체 선발

선발배지에서 2주 경과 후, 각 strain에서 수백 개의 hygromycin 저항성 콜로니가 발생하였다. 이들을 20 mg/L 농도의 hygromycin이 첨가된 TAP 배지에서 2차 선발하였다. Hygromycin 배지에서 잘 자라는 독립 개체들을 5 ml의 액체 TAP 배지에서 배양하여 DNA를 분리한 후, PCR로 p19 유전자 형질전환체를 선발하였다 (Fig. 1B). psaD는 클라미도모나스 자체의 유전자로서 coding region이 약 590 bp이고, p19 유전자는 약 520 bp이다. 두 유전자는 크기가 서로 다르기 때문에 psaD pro-int/psaD 3UTR-3 primer를 이용한 PCR의 경우, hygromycin 유전자만 도입되고 p19 유전자가 도입되지 않은 경우는 1개의 밴드만 나타나지만, p19 유전자가 도입된 형질전환체에서는 2개의 밴드가 나타났다 (Fig. 1B). 모두 48개의 hygromycin 저항성 개체를 분석하여 16개체에서 p19 유전자가 도입되었음이 확인되었다. 분석한 48개체에서 hygromycin 유전자의 도입여부는 조사하지 않았으나, 대부분 hygromycin 저항성 유전자를 가지고 있기 때문에 선발된 것으로 보인다. 따라서 두 개의 서로 다른 벡터를 co-transformation한 결과, 형질전환체의 33%가 2개의 벡터 유래 유전자를 모두 가지고 있음을 알 수 있었다.

p19 유전자 발현 분석

Southern 분석으로 p19 유전자의 copy 수를 조사한 결과 (Fig. 2), p19 유전자를 가진 26개체 중, 1 copy를 가진 경우가 9 개체, 2 copy를 가진 경우가 7 개체, 3 copy를 가진 경우가 3 개체, 4 copy 이상을 가진 경우가 7 개체로 나타났다. 이 중에서 1-3 copy를 가진 9개 line을 선발하여 p19 유전자 mRNA

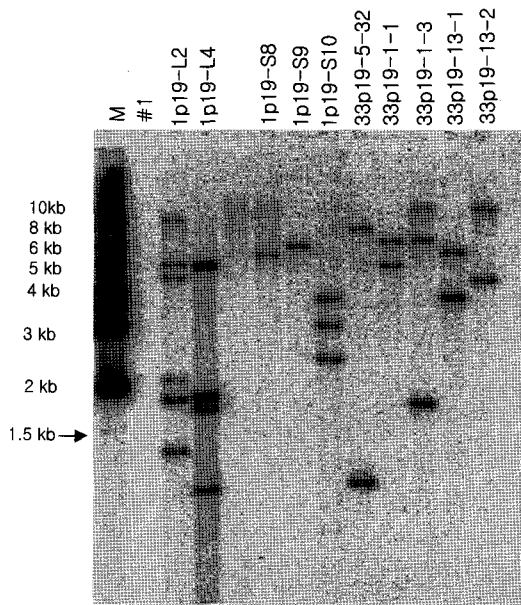


Figure 2. Southern blot analysis of transgenic *C. reinhardtii*. M, 1kb DNA size marker; #1, untransformed #1 strain p19 transformed #1(1p19-L2, 1p19-L4, 1p19-S8, 1p10-S10) and p19 transformed #33 (33p19-5-32, 33p19-1-1, 33p19-1-3, 33p19-13-1, 33p19-13-2).

발현을 조사하였다 (Fig. 3A). Northern 분석결과, 형질전환체 중 3개의 독립개체에서 비교적 뚜렷한 p19 mRNA 발현이 관찰되었으나, 다른 6개체에서는 약하게 발현되거나 발현양이 감지 수준 이하로 나타났다 (Fig. 3A). 한편 #33 strain은 RNAi 기작에 의하여 Maa7 유전자의 발현이 감소한 것으로서, P19 단백질이 고등식물에서처럼 suppressor로서 기능한다면 RNAi 기작이 억제될 것이므로, Maa7 유전자의 발현이 증가할 것으로 예상되었다. p19 유전자를 가진 것으로 선발된 #33 strain 유래의 개체들에서 Maa7 유전자의 발현을 조사한 결과, hyg3 유전자만 도입된 #33 (#33-hyg)과 비교하여 개체들에 따라 Maa7 mRNA의 발현이 다양하게 변화하였다 (Fig. 3B). Northern 분석상에서는 뚜렷하지 않지만 p19 유전자가 발현되고 있을 것으로 추정되는 1-1, 1-3, 13-1, 13-2에서 Maa7의 발현 변화가 상반되게 나타났다. 즉, p19 mRNA의 발현 양과 정확히 일치하지는 않았으나, 1-1과 13-2에서는 Maa7 발현 양이 증가하였고, 1-3과 13-1에서는 오히려 감소하거나 유지된 것으로 나타났다. 이처럼 P19 유전자가 도입된 #33 형질전환체들에서 Maa7 유전자의 발현이 교란되었다. P19 단백질이 고등식물에서와 동일하게 RNAi suppressor로서 작동한다면, #33 strain의 형질전환체들은 5-FI이 첨가된 배지에서 증식이 더디거나 생존하지 못할 것으로 예상된다. 5-FI이 첨가된 배지에서 조사한 결과, #33 유래 형질전환체의 80%가 느리게 증식하였다. 이와 같이 Maa7 유전자의 발현교란, 그리고 p19유전자를 가지는 #33 strain가 5-FI에 민감성을 나타내는 결과들은, P19 단백질이 클라미도모나스에서 작동하고 있을 가능성을 추정하게 한다.

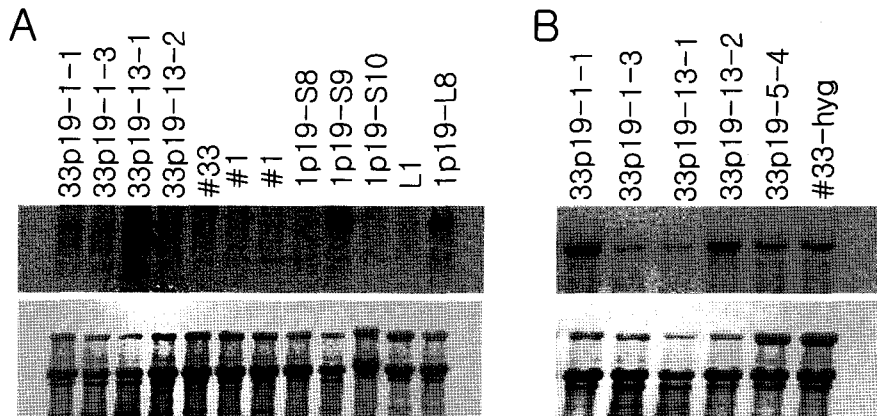


Figure 3. Northern blot analysis of transgenic *C. reinhardtii*. (A) p19 mRNA expression in transgenic *C. reinhardtii*. (B) Maa7 mRNA expression in transgenic *C. reinhardtii*. p19 transformed #33 (33p19-1-1, 33p19-1-3, 33p19-13-1, 33p19-13-2); #33, untransformed #33 strain; #33-hyg : pHYG transformed #33; #1, untransformed #1 strain; p19 transformed #1(1p19-S8, 1p19-S9, 1p19-S10, L1, 1p19-L8). Equal loading was monitored by methylene blue staining of the membranes.

일반적으로 gene silencing suppressor로 많이 연구된 P19, Hc-pro, P21, CP 등의 단백질이 고등식물에서 발현되면 불임, 2차 줄기의 발생지연, 잎 모양이 좁아지고 굵으며, rosette 형태로 발달하는 등 기형적 표현형이 나타난다 (Kasschau et al. 2003, Chapman et al. 2004). 그러나, p19 유전자가 도입된 클라미도모나스에서 외형적인 변이가 나타나지 않았는데, 이것은 클라미도모나스는 단세포생물로서 고등식물과 같은 복잡한 발달단계를 거치지 않기 때문으로 추정된다. 또한 클라미도모나스에 기존에 사용되는 GFP 유전자와 luciferase 유전자를 도입하면 발현이 매우 약한데, 이는 codon usage의 차이에 기인하여 단백질 발현이 충분치 않기 때문이다 (Fuhrmann et al. 1999, Fuhrmann et al. 2004). 이처럼 p19 유전자의 codon usage도 클라미도모나스에서 발현되는 유전자들의 codon usage와 다르므로 뚜렷한 표현형을 보이기에 충분한 양의 P19 단백질이 발현되지 않았을 가능성도 있다. 클라미도모나스 형질전환체를 선발하는 과정에서 개체들에 따라 증식속도, 세포 크기, 색의 차이 등이 관찰되었으나 이들이 P19의 발현과의 관계는 명확하지 않아 더 분석이 필요하다. 클라미도모나스에서도 고등식물 및 동물과 동일한 gene silencing 기작이 존재하는 것으로 알려져 있다 (Cerutti et al. 1997, Wu-Scharf D et al. 2000, Rhor et al. 2004, Ibrahim et al. 2006).

도입된 p19 유전자가 정상적으로 발현된다면 클라미도모나스의 RNAi 기작에 영향을 줄 것이다. 본 연구에서 #33의 형질전환체가 5-FI가 첨가된 배지에서 증식이 저해되는 표현형을 보였다. 증식이 저해된 것은 p19 유전자에 의한 silencing의 suppression이 일어난 것으로 간주할 수 있다. 그러나 Maa7 mRNA의 발현량이 전반적으로 증가하지 않고 발현량의 교란이 일어났으므로 p19 유전자에 의한 silencing의 suppression으로 보기 어렵게 한다. 따라서 본 연구에 사용된 p19 유전자가 클라미도모나스에서는 codon usage가 상이하여 단백질 발현량이 충분치 않아서 silencing의 suppression을 완전하게 하지 못하거나 일반 진핵세포에서 일어나는 방식과는 다른 방식으로 suppression한다고 할 수 있다. 추후 클라미도모나스에서도 p19 유전자가 고등식물과 동일하게 RNAi suppressor로서 기능하는지를 확정하기 위해서는 본 연구에서 제작된 p19 유전자 형질전환 클라미도모나스를 재료로 보다 자세한 분석을 통하여 miRNA의 발현 변화, gene silencing에 관련된 유전자들의 발현 변화, transposon의 activation 여부 분석 등의 연구를 하여야 할 것이다.

적 요

클라미도모나스 (*Chlamydomonas reinhardtii*)에서 Tombus 바이러스의 p19 유전자가 RNAi suppressor로서 기능하는지는 조사하기 위하여 형질전환을 수행하였다. Southern 분석을 통하여 p19 유전자가 1 copy에서 여러 copy로 도입된 형질전환체를 선발하였다. MAA7 유전자의 3'UTR 부위의 inverted repeat (IR) DNA가 형질전환되어 제작된 #33 strain을 p19 유전자로 다시 형질전환 한 결과, MAA7 mRNA의 발현 양이 변하여 일정하지 않고 교란되었으며, 5-FI가 첨가된 배지에서 증식이 저해되었다. 증식이 저해된 것은 p19 유전자에 의한 silencing의 suppression이 일어난 것으로 간주할 수 있다. 그러나 MAA7 mRNA의 발현량이 전반적으로 증가하지 않고 발현량의 교란이 일어났으므로 p19 유전자에 의한 silencing의 suppression으로 보기 어렵다. 따라서 본 연구에 사용된 p19 유전자가 클라미도모나스에서는 codon usage가 상이하여 단백질 발현량이 충분치 않아서 silencing의 suppression을 완전하게 하지 못하거나 고등식물에서 일어나는 방식과는 다른 방식으로 suppression한다고 할 수 있다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 사업 (과제번호: 20070301034020)과 한국과학재단의 특정기초연구 (과제번호: R0120060001020702007)의 지원으로 수행되었습니다.

인용문헌

- Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance VB (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13079-13084
- Berthold P, Schmitt R, Mages W (2002) An engineered *Streptomyces hygrosopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist* 153: 401-412
- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, Sanford JC (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538
- Cerutti H, Johnson AM, Gillham NW, Boynton JE (1997) Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear trans-

- formants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 9: 1-22
- Chapman EJ, Prokhnevsky AI, Gopinath K, Dolja VV, Carrington JC (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes and Dev* 18: 1179-1186
- Debuchy R, Purton S, Rochaix JD (1989) The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO J* 8: 2803-2809
- Fischer N, Rochaix JD (2001) The flanking regions of *psaD* drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genomics* 265: 888-894
- Fuhrmann M, Oertel W, Hegemann P (1999) A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 19: 353-361
- Fuhrmann M, Hausherr A, Ferbitz L, Schödl T, Heitzer M, Hegemann P (2004) Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol* 55: 869-881
- González-Ballester D, de Montaigu A, Higuera JJ, Galvañ A, Fernández E (2005) Functional Genomics of the Regulation of the Nitrate Assimilation Pathway in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 137: 522-533
- Grossman AR, Harris EE, Hauser C, Lefebvre PA, Martinez D, Rokhsar D, Shrager J, Silflow CD, Stern D, Vallon O, Zhang Z (2003) *Chlamydomonas reinhardtii* at the Crossroads of Genomics. *Eukaryotic Cell* 2: 1137-1150
- Gutman BJ, Niyogi KK (2004) *Chlamydomonas* and *Arabidopsis*. A Dynamic Duo. *Plant Physiol* 135: 607-610
- Harris EH (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 363-406
- Harris EH (1989) The *Chlamydomonas* Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. Academic Press, Inc., San Diego, CA
- Ibrahim F, Rohr J, Jeong WJ, Hesson J, Cerutti H (2006) Untemplated Oligoadenylation Promotes Degradation of RISC-Cleaved Transcripts. *Science* 314: 1893-1893
- Kasschau KD, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev Cell* 4: 205-217
- Kindle KL, Schnell RA, Fenandez E, Lefebvre PA (1989) Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J Cell Biol* 109: 2589-2601
- Lumbreras V, Stevens DR, Purton S (1998) Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J* 14: 441-447
- Mayfield SP, Franklin SE, Lerner RA (2003) Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 438-442
- Meins Jr F, Si-Ammour A, Blevins T (2005) RNA Silencing Systems and Their Relevance to Plant Development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 297-318
- Melis A (2002) Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. *Intl J Hydrogen Energy* 27: 1217-1228
- Qu F, Ren T, Morris TJ (2003) The Coat Protein of Turnip Crinkle Virus Suppresses Posttranscriptional Gene Silencing at an Early Initiation Step. *J Virol* 77: 511-522
- Randolph-Anderson BL, Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Johnson AM, Dorthu MP, Matagne RF (1993) Further characterization of the respiratory deficient *dum-1* mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Mol Gen Genet* 236: 235-244
- Rohr J, Sarkar N, Balenger S, Jeong BR, Cerutti H (2004) Tandem inverted repeat system for selection of effective transgenic RNAi strains in *Chlamydomonas*. *Plant J* 40: 611-621
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sayre RT, Wagner RE, Siripornadulsil S, Farias C (2003) Transgenic algae for delivering antigens to an animal. USA Patent Application 0211089
- Schroda M, Blocker D, Beck CF (2000) The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J* 21: 121-131
- Siripornadulsil S, Traina S, Verma DPS, Sayre RT (2002) Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* 14: 2837-2847
- Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14147-14152
- Wu-Scharf D, Jeong B-r, Zhang C, Cerutti H (2000) Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* 290: 1159-1162
- Zhang C, Wu-Scharf D, Jeong B-r, Cerutti H (2002) A WD40-repeat containing protein, similar to a fungal corepressor, is required for transcriptional gene silencing in *Chlamydomonas*. *Plant J* 31: 25-36