

Expression von Einkettenantikörpern gegen das Fungizid Kresoxim-methyl in transgenen Tabakpflanzen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Michael Leps
geb. am 06.02.1974 in Wolfen

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Udo Conrad
2. Prof. Dr. rer. nat. Klaus Grossmann
in Kooperation mit Dr. Andreas Reindl
3. Prof. Dr. rer. nat. Holger B. Deising

Halle (Saale), Juli 2002

Datum der Verteidigung: 11.12.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004755

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004755>]

Abkürzungsverzeichnis:

A.....	Adenin
Abb.....	Abbildung
ABA.....	Abscisinsäure
ABTS.....	2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiaolinsulfonsäure
<i>A.tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ALP.....	alkalische Phosphatase
Amp ^r	Ampicillinresistenz
anti-ABA-scFv.....	Einkettenantikörperfragment gegen das Phytohormon ABA
anti-Kres-scFv.....	Einkettenantikörperfragment gegen das Fungizid Kresoxim-methyl
anti-Kres-Pflanzen.....	transgene Tabakpflanzen, die ein Einkettenantikörperfragment gegen das Fungizid Kresoxim-methyl exprimieren
anti-ox-scFv.....	Einkettenantikörperfragment gegen 4-Ethoxymethylen-2-phenyl-2-oxazolin-5-on (Phenyl-Oxazolon)
AS.....	Aminosäure
ATP.....	Adenosintriphosphat
BAP.....	6-Benzylaminopurin
BAS 490F.....	Kresoxim-methyl (BASF-Codename)
BASF.....	Badische Anilin- und Sodafabriken (Ludwigshafen)
bc ₁ -Komplex.....	Ubihydrochinon-Cytochrom C Oxidoreduktase
bp.....	Basenpaare
BSA.....	Rinderserumalbumin
C.....	Cytosin
CaMV.....	„cauliflower mosaic virus“, Blumenkohl Mosaikvirus
cDNA.....	komplementäre DNA
CDR.....	„complementary determining regions“, hypervariable Bereiche der variablen Antikörperketten
CH.....	konstanter Teil der schweren Antikörperkette
CL.....	konstanter Teil der leichten Antikörperkette
CTAB.....	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-Terminus.....	carboxyterminaler Teil eines Proteins
d.....	desoxy, Tag
Da.....	Dalton
DEPC.....	Diethylpyrocarbonat
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA.....	„enzyme-linked-immunosorbent-assay“, Enzymimmuntest
ELP.....	Elastinartiges Polypeptid

ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
F ₁ bzw. F ₂	erste beziehungsweise zweite Tochtergeneration
FKS	fötales Kälberserum
FR	„framework region“, Gerüst-Region der variable Antikörperketten
Fv	variable Domäne des Antikörpermoleküls
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GLP	gesamtlösliches Protein
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin (Zusätze für die Selektion von Hybridomklonen)
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HT	Hypoxanthin, Tymidin (Zusätze nach der Selektion von Hybridomklonen)
IC ₅₀	Konzentration einer Substanz (z.B. Kompetitor im kompetitiven ELISA), die eine Absenkung des Maximalwertes auf 50% bewirkt
Ig	Immunglobulin
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben
IPTG	Isopropyl-β-thiogalacto-pyranosid
k	kilo
Kan ^r	Kanamycinresistenz
KDEL	Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin-Peptid
KLH	„Keyhole Limpet Hemocyanine“, aus der marinen Schnecke <i>Megathura crenulata</i> gewonnenes Mollusken-Hämocyanin
Kres	Kresoxim-methyl
Kres-BSA	Kresoxim-methyl~BSA-Konjugat
Kres-KLH	Kresoxim-methyl~KLH-Konjugat
KÜ	Kulturüberstand
LacZ-Promotor	Promotor des β-Galactosidase-Genes aus <i>Escherichia coli</i>
LeB4	Legumin B4-Gen
μ	Mikro
m	Meter, milli
M	Mol/Liter
mAK	monoklonaler Antikörper
MES	Morpholinethansulfonsäure
min	Minute
mRNA	„messenger“-RNA, Boten-Ribonukleinsäure
MW	relatives Molekulargewicht
n	nano
NAA	α-Naphtylessigsäure
N-Terminus	aminoterminaler Teil eines Proteine

OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate-buffered saline“, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PBST	PBS mit Zusatz von 0,05% Tween20
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
PDGFR	Rezeptor des menschlichen Blutplättchenwachstumsfaktors
PEG	Polyethylenglykol
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
POD	Peroxidase
poly[A]-RNA	polyadenylierte Ribonukleinsäure
RAM-IgG	Rabbit-Anti Mouse Immunglobulin (Antikörper gegen murines Immunglobulin G, gewonnen aus Kaninchen)
Rel. LF	relative Luftfeuchtigkeit
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
scFv	„single-chain Fv“, Einketten-Antikörperfragment
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
SNN	<i>Nicotiana tabacum</i> , Varietät Samsun NN (Wildtyp)
SP	Signalpeptid
Tab.	Tabelle
TG ₀	Transgen-Generation 0 (Primärtransformanden)
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
Ü/N	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V-P-G-X-G	Pentapeptid aus Valin-Prolin-Glycin-X-Glycin, X steht für die Aminosäuren Valin, Alanin oder Glycin
VH	variabler Teil der schweren Antikörperkette
VL, V _κ	variabler Teil der leichten Antikörperkette
VT	Volumenanteil
WT	<i>Nicotiana tabacum</i> , Varietät Samsun NN (Wildtyp)
9E10	Antikörper 9E10 (Evan et al., 1985), gegen den <i>c-myc</i> -tag
Δ	Änderung einer Größe

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	<i>Gentechnologie zur Verbesserung der Eigenschaften von Pflanzen</i>	1
1.2	<i>Konstruktion von rekombinanten Antikörpern</i>	3
1.3	<i>Nutzung von intrazellulär exprimierten Einkettenantikörpern</i>	6
1.4	<i>Immunmodulation in Pflanzen</i>	7
1.5	<i>Nutzung von Fungiziden in der Landwirtschaft</i>	10
1.6	<i>Eigenschaften und Verwendung von Kresoxim-methyl</i>	12
1.7	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	13
2	Material	15
2.1	<i>Geräte, Chemikalien, Enzyme und Antikörper</i>	15
2.1.1	<i>Geräte</i>	15
2.1.2	<i>Speziallabormaterial</i>	16
2.1.3	<i>Chemikalien, Reagenzien und Kits</i>	17
2.1.4	<i>Enzyme und Antikörper</i>	18
2.2	<i>Medien</i>	18
2.3	<i>Lösungen und Puffer</i>	19
2.4	<i>Oligonukleotide</i>	20
2.5	<i>Plasmide, Vektoren</i>	21
2.6	<i>Bakterien</i>	21
2.6.1	<i>Escherichia coli -Stämme</i>	21
2.6.2	<i>Agrobacterium tumefaciens-Stamm</i>	21
2.7	<i>Mausstamm und Myelomzellen</i>	21
2.7.1	<i>Mausstamm für die Immunisierung</i>	21
2.7.2	<i>Mausmyelomzellstamm</i>	21
2.8	<i>Pflanzenmaterial</i>	21
3	Methoden	22
3.1	<i>Herstellung monoklonaler Antikörper</i>	22
3.1.1	<i>Immunisierung</i>	22
3.1.2	<i>PEG-vermittelte Zellfusion</i>	22
3.1.3	<i>Kultivierung und Selektion der anti-Kresoxim-methyl-mAK produzierenden Hybridomzellen</i>	24
3.1.4	<i>Charakterisierung der Kresoxim-methyl-spezifischen Maus-Immunglobuline im Hybridomzellüberstand und im Serum</i>	24

3.2	Synthese der Einkettenantikörper	25
3.2.1	Isolierung von cDNA aus den Hybridomzellen.....	25
3.2.2	PCR-Amplifikation der variablen Immunglobulingene.....	26
3.2.3	Synthese der anti-Kres scFv durch Fusions-PCR.....	26
3.3	Klonierung und Sequenzierung	27
3.4	Bakterielle Expression der anti-Kres scFv im pIT-Vektorsystem	27
3.5	Transformation von Agrobacterium tumefaciens	28
3.6	Transformation der Tabakpflanzen	28
3.7	Pflanzenanzucht	29
3.7.1	Keimung der Tabaksamen	29
3.7.2	in vitro Anzucht der Tabakpflanzen.....	29
3.7.3	Gewächshausbedingungen.....	29
3.8	Herstellung von pflanzlichen Proteinextrakten	29
3.8.1	Proteinextraktion aus Samen	29
3.8.2	Proteinextraktion aus Blattmaterial	29
3.9	Proteinanalyse mittels „Western-blot“	30
3.10	Nachweis der Proteine nach SDS-PAGE durch Coomassie-Brilliantblau beziehungsweise Silberfärbung	31
3.11	Funktionelle Analyse des anti-Kres Einkettenantikörper durch ELISA	31
3.12	Nachweis der Insertion der DNA mittels „Southern-Blot“	32
3.13	Applikation von Kresoxim-methyl im Zellkulturplatten-System	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Gewinnung und Charakterisierung der Hybridomzellkone anti-Kres-mAK	34
4.1.1	Immunisierung der Balb/C-Mäuse und Bestimmung des spezifischen Serumentiters.....	35
4.1.2	Zellfusion und Selektion von mAK-Kres sezernierenden Hybridomzellklonen...	36
4.1.3	Charakterisierung der beiden anti-Kres mAK 14/8C5 3/2 und 14/1G9 H11H9..	38
4.2	Konstruktion der Einkettenantikörpergene anti-Kres scFv	42
4.2.1	Isolierung der Gene für die variablen Immunglobulinketten VH und V κ	43
4.2.2	Synthese der anti-Kres scFv durch Fusions-PCR.....	44
4.3	Funktionelle Charakterisierung der anti-Kres scFv im bakteriellen Expressionssystem	44
4.3.1	Nachweis der Funktionalität der anti-Kres scFv in ELISA-Experimenten	46
4.3.2	Nachweis der bakteriell exprimierten anti-Kres-scFv im „Western-blot“	50
4.4	Sequenzen der anti-Kres Einkettenantikörpergene A6 und B8	51
4.5	Genkonstrukte zur Expression der anti-Kres scFv in Tabakpflanzen	54
4.5.1	Kassetten für die ubiquitäre zytosolische Expression der anti-Kres scFv.....	54
4.5.2	Vektoren für die ubiquitäre pflanzliche Expression der anti-Kres scFv mit cotranslationaler Translokation und Retention im ER.....	57
4.5.3	Vektoren für die ubiquitäre pflanzliche Expression der anti-Kres scFv mit extrazellulärer Plasmamembranpräsentation.....	58
4.5.4	Kassetten für die samenspezifische Expression des anti-Kres scFv.....	60

4.6	Erzeugung transgener Tabakpflanzen durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelten Gentransfer	62
4.7	Expressionsanalyse der Tabakpflanzen mit den chimären Genkonstrukten für die ubiquitäre und samenspezifische Expression der anti-Kres scFv	64
4.7.1	Expressionsanalyse der transgenen Tabaklinien cytoA und cytoB.....	64
4.7.2	Analyse der transgenen Tabaklinien A und B.....	66
4.7.3	Expressionsanalyse der transgenen Tabaklinien MA und MB.....	68
4.7.4	Analyse der transgenen Tabaklinien UA und UB.....	68
4.8	Phänotyp der regenerierten transgenen anti-Kres Pflanzen	69
4.9	Untersuchungen zur Prüfung der Toleranzeigenschaften der transgenen anti-Kres Pflanzen gegenüber dem Fungizid BAS 490F	70
4.9.1	Ergebnisse der Frischmassebestimmungen nach Applikation von BAS 490F ..	73
4.10	Analyse der Expression der anti-Kres scFv in den Nachkommen der transgenen Pflanzen	79
4.11	Hyperexpression durch Fusion des anti-Kres scFv Proteins mit einem Elastinartigen Polypeptid	81
4.11.1	Konstruktion der Expressionskassetten für die samenspezifische und ubiquitäre Expression eines anti-Kres scFv~ELP-Fusionsproteins	82
4.11.2	Expressionsanalyse der Tabakpflanzen mit den chimären Genkonstrukten für die ubiquitäre und samenspezifische Expression des anti-Kres scFvB8~ELP-Fusionsproteins.....	86
4.11.3	Funktionelle Charakterisierung des anti-Kres scFvB8~ELP Fusionsproteins....	89
5	Diskussion	94
5.1	Notwendigkeit zur Erzeugung von Resistenzen gegenüber phytotoxischen Xenobiotika	95
5.2	Vor- und Nachteile der Gewinnung von Einkettenantikörpern aus Hybridomzellen.....	96
5.3	Expression der anti-Kres scFv in Tabakpflanzen.....	98
5.4	Erzeugung von Toleranz gegenüber den phytotoxischen Eigenschaften des Fungizides Kresoxim-methyl während der Samenkeimung.....	100
5.5	Vor- und Nachteile der Toleranzerzeugung durch Immunmodulation	103
5.6	ELP-Fusion als Möglichkeit zur Erhöhung des Expressionsniveaus von Einkettenantikörpern in der Pflanze	105
6	Zusammenfassung	111
7	Literaturverzeichnis	113

1 Einleitung

Pflanzen bilden aufgrund ihrer Fähigkeit, aus anorganischen Stoffen mit Hilfe von Sonnenenergie organische Verbindungen bilden zu können, die Grundlage des Lebens aller heterotrophen Organismen. Der Mensch begann bereits vor etwa 10.000 Jahren mit der Domestifikation von Pflanzen zur Gewinnung von Nahrungs- und Futtermitteln diese Eigenschaften der Pflanzen effektiv auszunutzen. Neben der Rolle als Produzenten von Nährstoffen erlauben Pflanzen auch die Synthese und Gewinnung verschiedener organischer Chemikalien und Polymere wie beispielsweise Holz, Zellulose, Stärke, Baumwolle, Hanf, Flachs, Harze und Öle, die für die Industrie wichtige Ausgangsstoffe darstellen. Gegenüber anderen biologischen Produktionssystemen für organische Materialien wie Bakterien, Pilze oder Tiere erlaubt hierbei die Bereitstellung der Energie und der Ausgangsstoffe in Form von Sonnenenergie, anorganischen Mineralien, Wasser und Kohlendioxid eine relativ kostengünstige Produktion organischer Substanzen. Die Pflanze stellt somit ein ideales Produktionssystem für die Synthese von organischen Substanzen für die Nahrungsmittel- und für die chemische Industrie dar.

Der stetige Anstieg der Weltbevölkerung erfordert eine effektivere Nutzung der vorhandenen Ackerntzfläche durch Steigerung des Ertrages der angebauten Kulturpflanzen. Dies ist durch Veränderungen des Genotyps der angebauten Nutzpflanzenart und durch den Einsatz von Substanzen, die natürlich vorhandene Phytopathogene und konkurrierende Pflanzen gezielt in ihrer Entwicklung hemmen, möglich. Hierzu gehören hauptsächlich der Einsatz von Herbiziden gegen konkurrierende Unkräuter, Insektiziden gegen pflanzenschädigende Insekten und die Anwendung von Fungiziden zur Bekämpfung phytopathogener Pilze. Die oben genannten Verbesserungen des Erbgutes zur Steigerung des Ertrages und zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber schädigenden Organismen und Pflanzenschutzmitteln sind durch klassische Zuchtmethoden und durch die gezielte Einbringung von rekombinanten Genen mit Hilfe von Transformationsmethoden möglich.

1.1 Gentechnologie zur Verbesserung der Eigenschaften von Pflanzen

Neben der Verbesserung von Nutzpflanzeigenschaften durch klassische Züchtung neuer Sorten mittels Kreuzung, gibt es seit 1983 eine Methode, die den direkten Gentransfer in Pflanzenzellen mit anschließender Regeneration stabiler transgener Pflanzen ermöglicht (*Horsch et al., 1984, De Block et al., 1984, Horsch et al., 1985/I+II*). Die Vorteile der gezielten Einbringung von Fremdgenen in das Pflanzengenom durch gentechnische Methoden sind vielfältig (*Conner & Jacobs, 1999*): (1) Es ist möglich DNA von bisher züchtungstechnisch inkompatiblen Organismen zur Verbesserung der Kulturpflanzeigenschaften zu

kombinieren. Durch die Erweiterung des „Genpools“ auf DNA-Sequenzen anderer Pflanzen, Bakterien, Tiere oder artifiziell erzeugter Gene werden durch klassische Kreuzungsmethoden bisher nicht realisierbare Möglichkeiten der Einbringung neuer Eigenschaften geschaffen. (2) Der wiederholte Transfer neuer Gene in bereits existierende Kultursorten oder Elitelinien ist ebenfalls möglich und erlaubt die Weiterentwicklung von Sorten ohne zeitaufwendige Züchtungsmethoden. (3) Das Zielgen, welches für die gewünschte Eigenschaft kodiert, kann direkt transferiert werden. Die Schwierigkeiten bei der klassischen Züchtung, bedingt durch die Übertragung von flankierenden DNA-Sequenzen mit oftmals unerwünschten Eigenschaften, können dadurch vermieden werden. (4) Neue Gene können durch molekularbiologische Methoden anwendungsspezifisch verändert und konstruiert werden. Seit kurzer Zeit werden auch polycistronische DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen genutzt und damit die Übertragung der Gene für ganze Stoffwechselwege ermöglicht. *Nakashita und Mitarbeiter (2001)* nutzten beispielsweise die Übertragung von bakterieller polycistronischer DNA in Plastiden zur Synthese eines bioabbaubaren Polyesters (Polyhydroxybuttersäure) im Blattgewebe transgener Tabakpflanzen aus. Die Wahl gewebsspezifischer Promotoren und Translokationssequenzen in den Expressionskassetten ermöglicht außerdem die temporär- und lokalspezifische Expression des Zielgenes. Durch den Einsatz induzierbarer Promotoren kann die Expression zudem exogen reguliert werden (*Gatz & Lenk, 1998*). Der Einsatz der sogenannten RBF-Methode („reversible Blockierung der Funktion“), bei der die Vermehrung oder Entwicklung der gentechnisch veränderten Pflanze durch einen konstitutiv exprimierten Hemmstoff blockiert wird, ermöglicht eine relativ sichere Anwendung des Transgens. Nur durch einen exogenen -synthetischen- Stimulus kann die Wirkung dieses endogenen Hemmstoffes aufgehoben werden (*Kuvshinov et al., 2001*). Die Übertragung der Gene in Form von Plasmidkonstrukten in das Genom der Pflanze kann auf unterschiedliche Weise erfolgen (*Hansen & Wright, 1999; Franken et al., 1997; Repellin et al., 2001*). Die am häufigsten genutzte Methode der Genübertragung in dikotyledone Pflanzen ist die des *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfers mit Hilfe des Ti-Plasmidsystems (*Hoekema et al., 1983, Horsch et al., 1984*). Desweiteren ist der direkte Transfer der „nackten“ DNA in pflanzliche Protoplasten über verschiedene Methoden möglich (Elektroporation: *Fromm et al., 1985*; PEG-vermittelter DNA-Transfer: *Paszkowski et al., 1984, Fischer & Hain, 1995*; Kopräzipitierung mit Kalziumphosphat: *Hain et al., 1985*; Mikroprojektil-Bombardierung: *Klein et al., 1987*; und Mikroinjektion: *Griesbach, 1983, Reich et al., 1986*). Der direkte Gentransfer wird hauptsächlich für die Transformation von monokotyledonen Pflanzen, die durch *Agrobacterien*stämme nicht infiziert werden können, angewandt. Es gelang mittlerweile jedoch auch, monokotyledone Pflanzen *Agrobacterium tumefaciens* vermittelt zu transformieren, wodurch größere DNA-Fragmente in diese Pflanzen übertragen werden können (z.B.: Weizen: *Cheng et al., 1997*; Gerste: *Tingay et al. 1997*; Mais: *Ishida et al. 1996*; Übersicht in *Smith et al., 1995*). Ständige Verbesserungen der

pflanzenmolekular- und gewebekulturtechnischen Methoden erlauben die Transformation von vielen Pflanzenarten, deren Regeneration zu stabilen transgenen Pflanzen und demzufolge die Expression einer großen Vielfalt fremder Gene in verschiedenen Pflanzen (*Franken et al., 1997*). Erste Anwendungen des Transfer von Fremdgenen mittels Gentechnologie in Kulturpflanzen, deren Expression und Wirkung im Freilandversuch getestet wurde, betreffen die Resistenzausbildung gegen das Herbizid Glyphosat (*Shah et al., 1986*), einem Pflanzenvirus (*Nelson et al., 1988; Sanders et al., 1992*) und den Schutz vor Insektenfraß (*Fischhoff et al., 1987, Perlak et al., 1990*).

Seitdem wurde eine große Anzahl weiterer Gene isoliert, kloniert und im pflanzlichen Organismus zur Expression gebracht. Die gegenwärtig anwendungsorientierten Forschungsschwerpunkte bilden gentechnisch veränderte Kulturpflanzen, die durch den Transfer von Genen Resistenz gegenüber Krankheiten, Herbiziden, Insektenfraß und Umweltstreß vermitteln. Andere Anwendungsschwerpunkte betreffen Qualitätssteigerungen, wie die verbesserte Lagerfähigkeit und Nährstoffzusammensetzung des Erntegutes, Veränderungen metabolischer Reaktionswege für die Produktion von Polymeren und Polypeptiden für pharmazeutische oder technische Zwecke (*Fiedler & Conrad, 1995; Smith & Glick, 1997, 2000; Arntzen, 1997; Mason et al., 1996; Dalsgaard et al., 1997; May et al. 1995; Conner & Jacobs, 1999; Herbers & Sonnewald, 1999*). Aktuelle Beispiele für die gentechnologische Verbesserung der Eigenschaften von Pflanzen sind das Einbringen ernährungsphysiologisch wichtiger Proteine (*Chakraborty et al., 2000*), die Verbesserung der Frosttoleranz (*Honjoh et al., 2001*), der Resistenz gegenüber Insekten (*Tinjuangjun et al., 2000, Xu et al., 1996, Kumar & Sharma, 1994*), der Virenresistenz (*Fischer et al., 2001, Lam et al., 1996, Hong et al., 1996*) und der Resistenz vor Pilzinfektionen (*Lin et al., 1995, Zhu et al., 1996; Punja, 2001*). Durch die Expression entsprechender, Schwermetallionen bindender oder reduzierender Proteine, können transgene schwermetalltolerante Pflanzen auch zur Entgiftung und Beseitigung von Umweltschadstoffen im Boden genutzt werden (*Ke et al., 2001, Krämer & Chardonnens, 2001*). Der Einsatz von gentechnisch erzeugten, resistenten Kulturpflanzen ermöglicht die Steigerung landwirtschaftlicher Erträge bei gleichzeitig verringertem Einsatz von Agrochemikalien. Dadurch wird eine effektivere Ausnutzung vorhandener Acker nutzflächen und die Minimierung der Menge an Pestizidrückständen im Boden und in der Nutzpflanze möglich. Eine Übersicht über die vielfältigen Möglichkeiten zur biotechnologischen Nutzung von Pflanzen wurde von *Kumar (2001)* veröffentlicht.

1.2 Konstruktion von rekombinanten Antikörpern

Unter dem Begriff Antikörper versteht man humorale und zelluläre multifunktionelle Glykoproteine von Vertebraten, die im Wesentlichen der Abwehr von Mikroorganismen und Viren dienen (*Lottspeich & Zorbas, 1998*). Antikörper sind spezifisch gegen Antigene

gerichtet und binden diese mit hoher Affinität in einer Antikörper-Antigen-Reaktion, die nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip funktioniert. Der antigenbindende Teil des Antikörpers wird hierbei definiert durch das sogenannte Paratop. Das Epitop ist die entsprechende Oberflächenstruktur des Antigens, die mit dem Paratop in Wechselwirkung tritt. Als Antigen kann ein Protein oder eine beliebige andere Substanz fungieren.

Im Säugetierorganismus werden fünf Antikörperklassen (Isotypen) unterschieden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Die am häufigsten auftretenden Antikörpermoleküle gehören der Immunglobulin G-Klasse an. IgG-Moleküle werden von Lymphozyten sezerniert, haben ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa und sind aus zwei identischen glykosilierten schweren sowie zwei identischen nicht glykosilierten leichten Polypeptidketten aufgebaut. Die schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden, Disulfidbrücken verbinden auch jeweils eine leichte Kette mit einer schweren Kette des Immunglobulins.

Die Bindung an das Antigen erfolgt in einem kleinen Bereich des Antikörpers, der variablen Domäne. Innerhalb dieser variablen Region existieren sogenannte hypervariable Bereiche (CDR`s: „complementary determining regions“), die für die Ausbildung der Antigenbindestelle wichtig sind. Der konstante Teil des Antikörpers (F_C -Teil), dient u.a. zur Aktivierung der zellulären Immunantwort und ist für die Bindung des Antigenes entbehrlich. Durch Amplifikation mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion können die Immunglobulingene aus AK-sezernierenden Zellen für Klonierungsschritte isoliert werden (*Winter & Milstein, 1991*). Aus diesen DNA-Sequenzen wurden verschiedene Formen abgeleiteter Antikörpermolekülsequenzen konstruiert, in heterologen Systemen zur Expression gebracht und auf ihre Funktionalität überprüft. Neben vollständigen Antikörpermolekülen zeigen F(ab)-Fragmente, Fv-Fragmente, Einkettenantikörperfragmente (scFv, „single chain Fv“), Disulfidbrückenstabilisierte Fv-Fragmente sowie einzelne VH-Ketten Antigenbindeaktivität. Weitere funktionelle Formen sind multivalente Poly-Einkettenantikörper (Diabody, Triabody, Tetraabody), die durch Zusammenlagerung mehrerer scFv-Moleküle gebildet werden können (*Little et al., 2000*). Einkettenantikörper sind chimäre Polypeptide, die aus den variablen Domänen der schweren (VH) und der leichten Kette (VL) des parentalen Immunglobulins zusammengesetzt sind (*Bird & Walker, 1991*, siehe Abb. 1). Die Domänen sind durch ein kurzes flexibles Linkerpeptid (L) kovalent miteinander verbunden (*Bird et al., 1988*). Beide Orientierungen der variablen Ketten bilden funktionelle Moleküle (VH-L-VL oder VL-L-VH). Der Vorteil von Einkettenantikörpern gegenüber vollständigen Antikörpern, F(ab) und Fv-Fragmenten besteht darin, daß für die Funktionalität eine Zusammenlagerung der einzelnen Polypeptidketten unter oxidativen Bedingungen zur Ausbildung der Disulfidbrücken nicht nötig ist, da sie von einem einzelem Gen codiert werden. Die DNA-Sequenzen der VH- und VL-Domänen sind direkt miteinander verbunden. Hierdurch erfolgt die Expression als zusammenhängendes Polypeptid, welches die VH- und die VL-Domänen in equimolaren Konzentrationen enthält. Durch ihre geringe Größe von ca. 30 kDa sind Einkettenantikörper

vor allem für Anwendungsbereiche geeignet, bei denen der konstante Teil des Antikörpermoleküls nicht benötigt wird oder unerwünscht ist, beispielsweise für medizinische Anwendungen, die eine schnelle Resorption im Zielgewebe voraussetzen.

Neben einzelnen VH-Domänen stellen Einkettenantikörperfragmente die kleinsten antigenbindenden Moleküle dar. Für die Konstruktion der Einkettenantikörper wird die durch reverse Transkription der mRNA aus AK-sezernierenden Hybridomzellen gewonnene cDNA als Matrize für eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) genutzt. Die Gene der variablen Domänen der leichten und schweren Kette werden hierfür im ersten Reaktionsschritt mit degenerierten Oligonukleotiden in separaten Reaktionsansätzen amplifiziert (z.B.: *Chaudhary et al., 1990*). Bei der sich anschließenden Fusions-PCR werden die VL-Gene und die VH-Gene nach spontaner Zusammenlagerung komplementärer Sequenzen im Linkerbereich beider Ketten reamplifiziert. Die erhaltene DNA-Sequenz für das scFv kann anschließend in einem bakteriellen System zur Expression gebracht und die Eigenschaften der chimären Antikörperfragmente untersucht werden (*Dreher et al., 1991, Hoogenboom et al., 1991*).

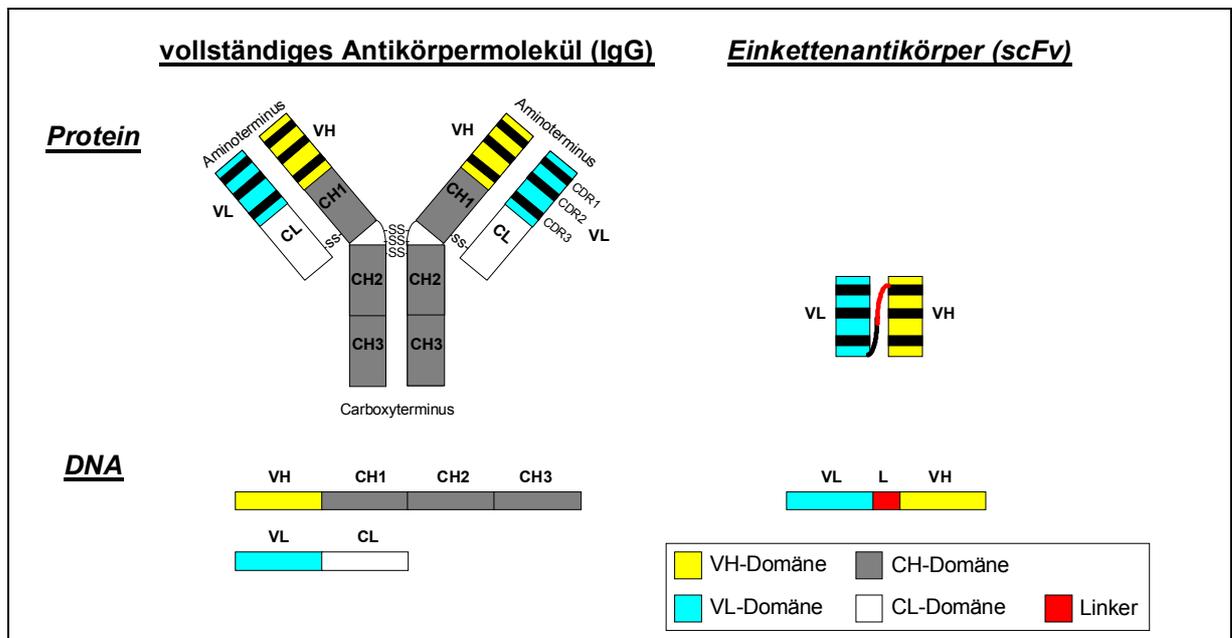


Abb.1.: Schematische Darstellung der Protein- und DNA-Struktur von Immunglobulin G und eines Einkettenantikörpers (VL-L-VH) **CH1-3:** konstante Domänen der schweren Ketten des Antikörpers; **CL:** konstante Domäne der leichten Kette des Antikörpers; **VH:** variable Domäne der schweren Kette des AK; **VL:** variable Domäne der leichten Kette des AK; **CDR 1-3:** hypervariable Regionen der variablen Domänen; **L:** Linker

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von Einkettenantikörpern besteht in der Technik des sogenannten „Phagen-Display“ (z.B.: *Clackson et al., 1991; Winter & Milstein, 1991; Chiswell & McCafferty 1992; Winter et al., 1994; Hoogenboom & Chames, 2000; De Wildt et al., 2000*). Durch Fusion der scFv-Sequenz mit der Sequenz des Hüllproteins eines Bakteriophagen kann das scFv auf der Oberfläche des Phagen exprimiert und durch den Einsatz entsprechender Selektionsbedingungen angereichert werden (*McCafferty et al., 1990*). Mit Hilfe von Phagenbanken, die aus einem großen Repertoire verschiedener scFv-

Gene bestehen, können Antikörper *in vitro* ohne vorherige Immunisierung von tierischen Organismen in relativ kurzer Zeit isoliert werden. Durch zufällige oder gezielte Einführung von Mutationen in die DNA-Sequenz, Ribosomendisplay, „DNA-shuffling“ und „loop grafting“ können Affinität, Stabilität, Löslichkeit und Spezifität von Antikörpern nachfolgend anwendungsspezifisch optimiert werden (*Jung & Plückthun, 1997, Chowdhury et al., 1998, Dooley et al., 1998, Jung et al., 1999, Jermutus et al., 2001, Wörn & Plückthun, 2001*).

1.3 Nutzung von intrazellulär exprimierten Einkettenantikörpern

Rekombinante Antikörper können in tierischen, menschlichen und pflanzlichen Zellen artifiziell exprimiert werden. Dadurch wird die Nutzung ihrer antigenbindenden Eigenschaft auch außerhalb des natürlichen Wirkungsbereiches *in vivo möglich*.

Neben der bereits genannten Eigenschaft der Einkettenantikörper zur funktionellen Expression im Zytosol ist ihre geringe Größe für verschiedenartige medizinische Anwendungen von Vorteil, bei denen eine schnelle Resorption des Antikörpermoleküls erforderlich ist. Der Anwendungsbereich der Einkettenantikörper kann durch Fusion mit Effektorproteinen, wie Toxinen, Enzymen oder DNA-Bindedomänen erweitert werden. Toxingekoppelte Einkettenantikörper beispielsweise können zur gezielten effektiven Vernichtung von Tumorzellen genutzt werden (*Jones & Marasco, 1998*). Durch die intrazelluläre Expression von Einkettenantikörpern können biochemische Reaktionswege modifiziert oder Pathogene in ihrer Entwicklung beziehungsweise Vermehrung gehemmt werden (*Peeters et al., 2001*). Ursprünglich wurden diese sogenannten „Intrabodies“ in menschlichen Zellen zur intrazellulären Immunisierung und zur Modulation von Stoffwechsel- und Regulationsprozessen exprimiert. Die Antikörper ermöglichen hierbei ein breites Anwendungsspektrum, da sie gegen verschiedenste Substanzen wie beispielsweise Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipide, virale Proteine, Wachstumsfaktoren, Signalmoleküle, oder Transkriptionsfaktoren gerichtet sein können (*Marasco et al., 1993, Duan et al., 1994, Richardson et al., 1995, Richardson & Marasco, 1995, Deshane et al., 1995, Graus-Porta et al., 1995, Jones & Marasco, 1998*). Die Effekte der intrazellulären Expression von Einkettenantikörpern sind beispielsweise die Blockierung oder Stabilisierung makromolekularer Wechselwirkungen (Protein-Protein oder Protein-DNA), die Modulation von Enzymaktivitäten durch Bindung des scFv an das aktive Zentrum des Enzymes, an das Enzymsubstrat oder bedingt durch die Bindung an einen entsprechenden Enzymort die Fixierung des Zielproteins in der aktiven beziehungsweise inaktiven Form. Durch die Bindung an ein Protein kann ein scFv auch dazu genutzt werden, dieses Protein vom Zielort fernzuhalten (*Marasco, 1997*). Beispiele für die Nutzung von intrazellulär exprimierten Einkettenantikörpern in menschlichen Zellen sind die Krebsbekämpfung durch Modulation signaltransduktionsbeteiligter Moleküle (*Marasco, 1997*), die Behandlung neurodegenerativer

Erkrankungen aufgrund der Hemmung der Akkumulation und Aggregation von abnormalen neuronalen Proteinen durch Expression eines Einkettenantikörpers gegen dieses Protein (*Lecerf et al., 2001*) oder die Unterdrückung der Replikation des HIV-1 Virus durch intrazelluläre Expression eines gegen das HIV-1-Transaktivatorprotein gerichteten Einkettenantikörpers in HIV-1 suszeptiblen Zellen (*Marasco et al., 1999*).

1.4 Immunmodulation in Pflanzen

Die Anwendung der Immunmodulation und der intrazellulären Immunisierung ist nicht auf das Säugerzellsystem beschränkt. Es gelang bereits mehrfach, verschiedene rekombinante Antikörper in Pflanzen zu exprimieren, um Reaktionswege zu modifizieren beziehungsweise Resistenzen gegenüber Pathogene zu erzeugen. Die Expression kann hierbei durch den Einsatz geeigneter Promotoren und Signalsequenzen in der Pflanze sowohl gewebespezifisch als auch intrazellulär kompartimentspezifisch reguliert werden.

Für die Expression des scFv im Zytosol der Pflanzenzelle sind keine zusätzlichen Signalsequenzen stromabwärts der Promotorsequenz nötig. Eine mitochondriale Expression von Einkettenantikörpern wird durch die Fusion mit einem entsprechenden Signalpeptid am N-Terminus des scFv erreicht (*Biocca et al., 1995, Biocca & Cattaneo, 1995*). Durch die Wahl plastidärer Signalsequenzen können die Einkettenantikörper in dieses Kompartiment geschleust werden (*Bednarek & Raikhel, 1992*). Die Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum und weiterer Kompartimente der pflanzlichen Zelle wird durch ein aminoterminales Signalpeptid ermöglicht, welches die cotranslationale Translokation des gebildeten Polypeptides durch die ER-Membran und nachfolgend die Einschleusung des Einkettenantikörpers in den sekretorischen Weg erlaubt (*Conrad & Fiedler, 1994*). Zusätzliche vakuoläre Transitsequenzen bewirken eine Einschleusung in die Zellvakuole (*Nakamura & Matsuoka, 1993*). Fehlen weitere Targetingsignale, wird das gebildete Protein über das intrazelluläre Transportsystem in den Apoplasten sezerniert. Ein ER-Retentionssignal am carboxyterminalen Ende führt zum Verbleib des Proteins im endoplasmatischen Retikulum (*Denecke et al., 1992, Wandelt et al., 1992, Gomord et al., 1999*). Durch die Fusion des scFv mit einer entsprechenden Transmembrandomäne kann nach dem Eintritt in den sekretorischen Weg die Verankerung des gebildeten Fusionsproteins in der Plasmamembran der exprimierenden Zellen erreicht werden (*Chesnut et al., 1996, Schillberg et al., 2000*).

Die Wahl des Kompartimentes ist für die erfolgreiche Inhibierung des Zielmoleküls, der Immunmodulation, wichtig. Die Immunmodulation ist eine molekulare Technik, die eine Veränderung des zellulären Metabolismus, von Signaltransduktionswegen oder der Pathogeninfektiosität durch die Expression von Antikörperkodierenden Genen verursacht. Die Antikörper erkennen hierbei spezifisch lösliche oder membranassoziierte Moleküle,

Rezeptoren, Enzyme oder DNA-bindende Proteine und interferieren durch Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen mit der Funktion dieser Moleküle. Die möglichen Mechanismen der durch Antikörper vermittelten *in vivo* Immunmodulation von funktionellen Molekülen sind in Abbildung 2 zusammenfassend dargestellt: (1) kompetitive Inhibierung durch Bindung an den Reaktionsort eines Enzymes und infolgedessen Hemmung der Substratbindung, (2) Beeinflussung der korrekten Faltung des Zielproteins, (3) Störung der Bildung von funktionellen Proteinaggregaten bei Proteinkomplexen durch Bindung an eine Untereinheit, (4) allosterische Inhibierung durch die AK-bindungsbedingte Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Zielproteins, (5) Erzeugung von Defizienz durch Bindung von Substrat oder Ligand. Fehltargeting (6) ist ebenfalls eine Möglichkeit der Immunmodulation, bei der eine artifizielle Anreicherung des Antigens (z.B. Substrat) durch gezielte Expression des Antikörpers in einem Zellkompartiment mit der Folge der Defizienz dieses Antigens in anderen Kompartimenten erreicht wird (*De Jaeger et al., 2000, Conrad & Manteuffel, 2001*).

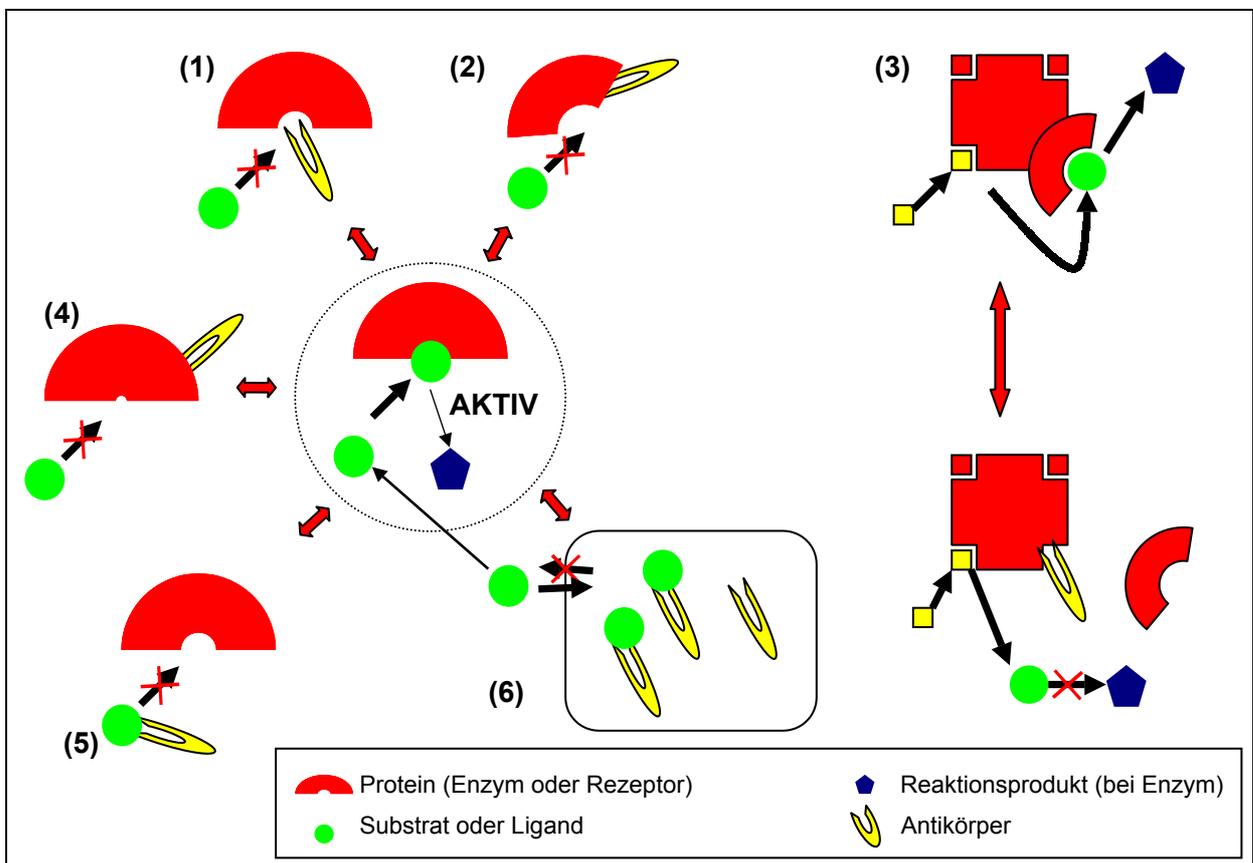


Abb.2.: Mögliche Mechanismen der Immunmodulation (Erläuterung: siehe Text)

Einkettenantikörper sind für die Zwecke der Immunmodulation in Pflanzen besser als vollständige Antikörper geeignet, da die antigenbindenden Eigenschaften häufig auch unter den reduzierenden Bedingungen nach Expression im Zytosol vorhanden sind und damit ein breiteres Anwendungsspektrum ermöglicht wird (*Smith, 1996, De Jaeger et al., 1999*). Beispiele zur Modulation verschiedener Antigene durch Expression von Antikörpern in Pflanzen sind die Reduktion der Aktivität des endogenen Regulatorproteins Phytochrom

durch spezifische Einkettenantikörper (Owen et al., 1992) und die Erhöhung der Resistenz gegenüber Viren oder zellwandlosen Bakterien (Tavladoraki et al., 1993, Voss et al., 1995, Fecker et al., 1997, Le Gall et al., 1998, Zimmermann et al., 1998, Schillberg et al., 2000, Schillberg et al., 2001, Fischer et al., 2001). Neben höhermolekularen Substanzen können auch niedrigmolekulare regulative Substanzen durch gezielte Expression eines spezifischen Einkettenantikörpers immunmoduliert werden (Artsaenko et al., 1995, Shimada et al., 1999). Artsaenko und Mitarbeiter (1995) konnten durch die ubiquitäre Expression eines spezifisch gegen das Pflanzenhormon Abscisinsäure gerichteten Einkettenantikörpers im ER transgener Tabakpflanzen die Symptome von Abscisinsäure defizienten Mutanten, wie welkender Phänotyp und Schließzellfunktionsbeeinträchtigung, erzeugen. Dadurch ist neben der Nutzung von ABA defizienter, beziehungsweise insensitiver Mutanten und der exogenen Gabe von Abscisinsäure oder Abscisinsäuresyntheseinhibitoren eine neue Methode zur Aufklärung der biologischen Funktion dieses Hormones verfügbar (Artsaenko et al., 1998). Neben der ubiquitären Expression des anti-ABA-scFv unter Kontrolle des starken CaMV-35S-Promotors (Franck et al., 1980, Benfay et al., 1989) gelang unter Nutzung des USP-Promotors (Bäumlein et al., 1991/I) eine samenspezifische Expression und Akkumulation dieses Einkettenantikörpers in hohen Konzentrationen im Samen von Tabakpflanzen (Phillips et al., 1997). Die samenspezifische Immunmodulation des Hormones führte zu einem phänotypischen Effekt, der in ähnlicher Weise sonst nur bei starken ABA-insensitiven/defizienten Mutanten beobachtet werden konnte (z.B. Nambara et al., 1992 und 1994: Koorneef et al., 1989). Diese Effekte waren aufgrund der organspezifischen Expression des Antikörpers auf den Tabaksamen beschränkt und äußerten sich in einem Wechsel des Entwicklungsprogrammes von der Samenreifung zur Samenkeimung (Ausbildung grüner Kotyledonen, stark verringerte Einlagerung von Speicherproteinen und Ölkörpern, fehlende Dormanz, Viviparie). Das Hormon Abscisinsäure konnte somit effektiv samenspezifisch in seiner Wirkung gehemmt werden, da die Expression des Einkettenantikörpers zu einem Defizit an biologisch verfügbarer Abscisinsäure in diesem Organ führte (Phillips et al., 1997). Aufgrund der erfolgreichen Inaktivierung endogener Regulatormoleküle sowie der Erzeugung von Resistenz gegenüber phytopathogenen Viren durch die Expression spezifischer Einkettenantikörper in Pflanzen entstand die Idee, der Anwendung dieser Methode auf exogen applizierte Wirkstoffe zu erweitern. Verschiedene landwirtschaftlich genutzte Wirkstoffe zeigen häufig unerwünschte Nebeneffekte, die auf der Interferenz mit dem Stoffwechsel der Pflanze beruhen und zu Störungen in der Entwicklung führen können. Diese Nebeneffekte sollten unter Nutzung der Immunmodulationsmethode durch Expression eines spezifisch gegen diesen exogen applizierten Wirkstoff gerichteten Einkettenantikörper minimiert werden. Als Beispiel zur Prüfung dieser Hypothese sollten Einkettenantikörper, die spezifisch das Fungizid Kresoxim-methyl binden, in Tabakpflanzen exprimiert werden.

1.5 Nutzung von Fungiziden in der Landwirtschaft

Annähernd ein Fünftel der weltweiten Ertragsverluste bei Kulturpflanzen sind auf Schäden, die durch Phytopathogene verursacht werden, zurückzuführen (*Knight et al., 1997*). Als Gegenmaßnahmen zur Verhinderung dieser Verluste und damit zur Steigerung der landwirtschaftlichen Erträge sind die Verwendung von pathogentoleranten Pflanzen und der Einsatz von Pestiziden zu nennen. Die ersten Einsätze fungizider Substanzen zur Bekämpfung phytopathogener Pilze begannen in der Mitte des neunzehnten Jahrhunderts mit der Verwendung der „Bordeaux-Mixtur“, einer wässrigen Mischung aus Kalkhydrat und Kupfersulfat. Seit den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts kommen systemische Produkte zur Anwendung, die nicht nur oberflächlich wirken, sondern das Pflanzengewebe durchdringen und deshalb auch kurativ eingesetzt werden können. Mittlerweile gehören Fungizide neben Herbiziden und Insektiziden zu den wichtigsten Pflanzenschutzmitteln. Allein in Deutschland betrug 1992 der Anteil des Fungizidmarktes in Getreide knapp vierhundert Millionen DM (*Hock et al., 1995*), der Anteil von Fungiziden am gesamten Weltmarkt betrug 1991 ca. fünf Mrd. US\$ (*Lyr, 1995*). Die extensive Applikation von Fungiziden führt jedoch häufig zu einer selektiv bedingten Erhöhung des Anteiles von Pilzstämmen mit verringerter Sensitivität gegenüber den entsprechenden Substanzen. So führte beispielsweise die Anwendung von Sterolinhibitoren in Europa zu einem starken Anstieg resistenter Mehлтаustämme (*Staub, 1991*). Da solche resistenten Stämme häufig mehrere Jahre überdauern können, ist eine Kontrolle der Krankheit durch die entsprechenden Fungizide über einen längeren Zeitraum nicht mehr möglich. Dies macht die ständige Entwicklung fungitoxisch wirksamer Komponenten mit neuen Wirkmechanismen notwendig. Das hohe Investitionsvolumen von 570 Millionen US\$, welches 1997 weltweit von den fünfzehn führenden agrochemischen Firmen (*Knight et al., 1997*) für die Entwicklung von Fungiziden aufgewendet wurde, verdeutlicht dies.

Eine Gruppe von fungitoxisch wirksamen Substanzen mit neuem Wirkmechanismus ist die Gruppe der sogenannten Strobilurine, deren Toxizität auf der Hemmung der mitochondrialen Atmungskettenphosphorylierung durch Bindung an den Q_o -Ort des bc_1 -Komplexes beruht (*Affourtit et al., 2000*). Strobilurine sind ursprünglich natürlich vorkommende Substanzen, die von einigen saprophytisch lebenden Basidiomyceten hauptsächlich gebildet werden, um Nahrungskonkurrenten zu hemmen (*Anke, 1995*). Einige natürliche Vertreter dieser Substanzklasse wurden bereits erfolgreich isoliert (*Daferner et al., 1998, Buchanan et al., 1999, Lange et al., 1993*). Ein wichtiger Vertreter der natürlichen Strobilurine ist Strobilurin A, eine vom Kiefernzapfenrößling^(*) gebildete und von *Anke und Mitarbeitern (1977)* aus dessen Myzelien isolierte Substanz. Strobilurin A wurde bereits synthetisch hergestellt (*Anke et al., 1984, Beutement & Clough, 1987*) und zeigt eine ausgeprägte Fungitoxizität.

(*) *Strobilurus tenacellus*, ein auf verrottenden Kiefernzapfen wachsender Basidiomycet

Die natürliche Substanz, ist jedoch wegen einiger nachteiliger Eigenschaften wie photochemischer Instabilität, leichter Flüchtigkeit und hoher Produktionskosten für den Einsatz in der Agrarwirtschaft ungeeignet (Clough *et al.*, 1997). Durch intensive Forschungsarbeiten konnten jedoch zahlreiche abgeleitete Substanzen mit idealen Eigenschaften für die Applikation auf dem Feld isoliert werden (Beautement *et al.*, 1991, Reuveni, 2000). Ein von der natürlichen Substanz Strobilurin A abgeleitetes Fungizid ist Kresoxim-methyl (Codebezeichnung BAS 490F), dessen erstmalige Darstellung durch die BASF gelang und dessen kommerzielle Nutzung seit 1996 erfolgt (Sauter *et al.*, 1999, Clough, 2000). Wie die Leitsubstanz zeigt auch Kresoxim-methyl ein auf die Bindung an den Q_o -Ort der Ubihydrochinon-Cytochrom-C-Oxidoreduktase (bc_1 -Komplex) und damit der Hemmung der mitochondrialen Atmungskette beruhendes Wirkprofil. Die Bindung des Fungizides am Wirkort ist in der Abbildung 3 veranschaulicht. In Folge der Bindung im Bereich des Ubihydrochinon-Oxidationsortes (Q_o -Ort) kommt es vermutlich aufgrund konformationsbedingter Interaktionen zu einer Störung der Ubihydrochinonoxidation und damit zu einer Hemmung der Elektronenweiterleitung (Brandt *et al.*, 1988, 1991/I und II). Aufgrund des unikalen Wirkortes ist jedoch ein relativ hohes Risiko zur Ausbildung einer Resistenz der pathogenen Pilze gegeben (Chin *et al.*, 2001, Fuji *et al.*, 2000, Sierotzki *et al.*, 2000/I und II). Die natürliche Resistenz des Kiefernzapfenröhlings gegen das Strobilurin A beispielsweise beruht auf einem Aminosäureaustausch im bc_1 -Komplex, wodurch die Bindung der Substanz an den Q_o -Ort verhindert wird (Kraiczky *et al.*, 1996). Für eine effektive Pathogenkontrolle sollten Strobilurinfungizide deshalb nur in Mischung oder alternierend mit anderen Wirkstoffen verabreicht werden (Reuveni *et al.*, 1998, Gisi *et al.*, 2000).

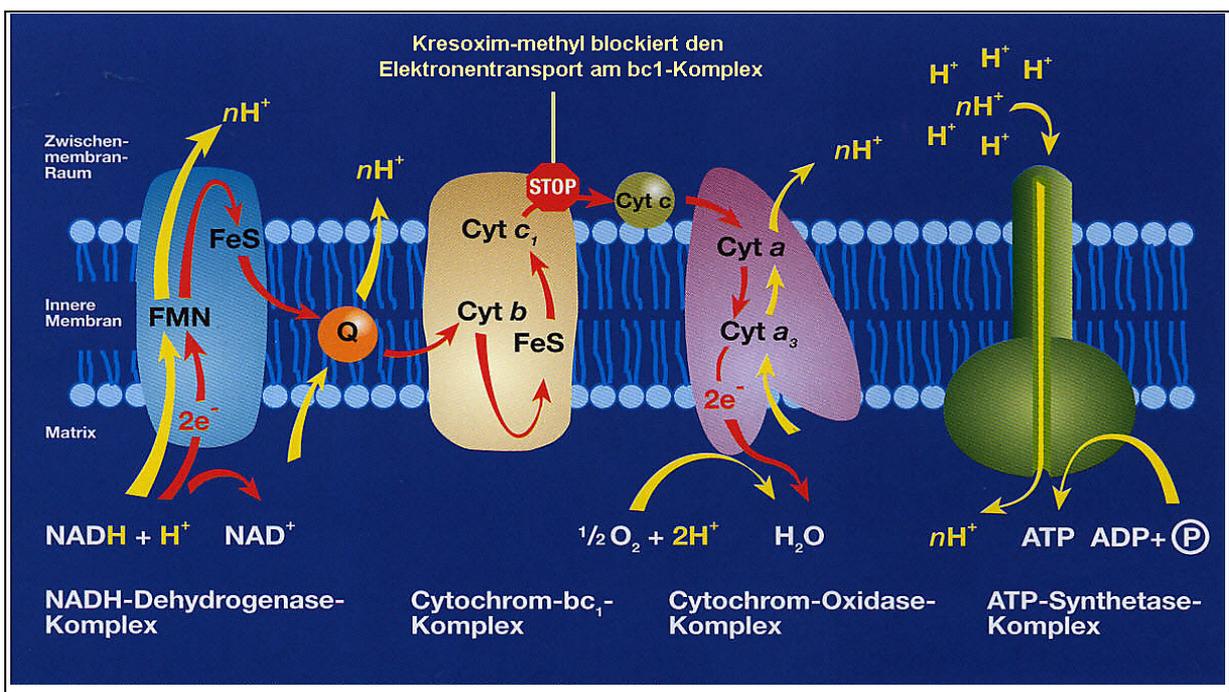


Abb.3.: Schema der mitochondrialen Elektronentransportkette und Angriffspunkt von Kresoxim-methyl am Cytochrom bc_1 -Komplex (nach Gold *et al.*, 1995)

1.6 Eigenschaften und Verwendung von Kresoxim-methyl

Kresoxim-methyl, Methyl-(E)-methoximino [α -(o-tolyloxy)-o-tolyl]-azetat (Abb.4), ist eine feste farb- und geruchlose Substanz mit einer geringen Wasserlöslichkeit von 2mg/l bei 20°C und einem Molekulargewicht von 313,36 g/mol (Ammermann et al., 1992).

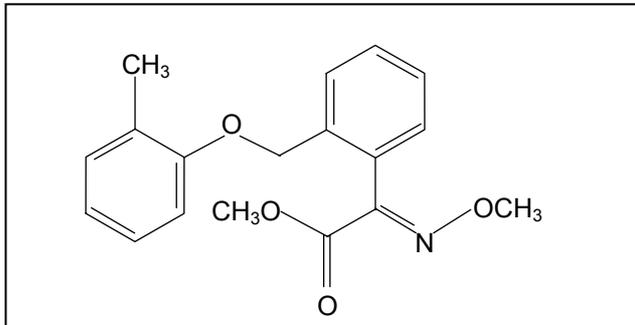


Abb.4.:
Strukturformel von Kresoxim-methyl

Das Fungizid zeigt ein breites Anwendungsspektrum gegen verschiedenartige phytopathogene Pilze (Ammermann et al., 1994, Obst & Steck, 1996, Leinhos et al., 1997, Olaya & Köller, 1999, Wojdyla et al., 1999). Kresoxim-methyl besitzt außerdem ideale Eigenschaften für die Verwendung in der Landwirtschaft, wie quasi-systemisches Translokationsverhalten, verbesserte Fungitoxizität, relativ kurze Verweilzeit innerhalb der Pflanze sowie eine hohe photochemische Stabilität und kann sowohl protektiv als auch kurativ und eradikativ eingesetzt werden (Gold & Leinhos, 1994, Haase et al., 1994, Gold et al., 1995, Cabras et al., 1998). Auf molekularer Ebene konnten nur geringe Unterschiede in der Spezifität bezüglich der Hemmung des ubiquitären mitochondrialen bc_1 -Komplexes von verschiedenen Organismen festgestellt werden (Roehl & Sauter, 1993). Unterschiede in der Toxizität ergeben sich hauptsächlich auf Organismenebene bedingt durch Unterschiede in der Aufnahme, Translokation und dem Metabolismus der Substanz. Neben der ausgeprägten Fungitoxizität zeigt Kresoxim-methyl eine hohe toxische Wirkung gegenüber Fischen, Fischnährtieren und Grünalgen. Für Regenwürmer, Marienkäfer und Raubmilben ist die Substanz hingegen ungefährlich. Kresoxim-methyl zeigt eine geringe Toxizität gegenüber Tieren, da das Fungizid intrazellulär rasch abgebaut wird (Gold et al., 1995). In Säugern kommt es nach dem Eintritt in die Zelle hauptsächlich durch enzymatische Spaltung der Methylestergruppe zur Bildung der freien Säure und damit zu einer raschen Inaktivierung der Substanz (Salmon & Kohl, 1996). Neben einer leichten Toxizität gegenüber jungen Blättern (Ammermann et al. 1992) zeigt Kresoxim-methyl ansonsten einen größtenteils positiven Einfluß auf die Physiologie adulter Pflanzen. Diese Wirkungen betreffen eine Vergrößerung der Blattoberfläche und eine Erhöhung des Korntrages bei Getreidearten (Bayles, 1999, Prigge et al., 1998). Desweiteren wurden effektive Steigerungen der photosynthetischen Effizienz durch die transiente Inhibierung der Atmung, die Verbesserung der Wassernutzungseffizienz sowie ein positiver Einfluß auf die Aktivität der Nitratreduktase und die Verzögerung der Blattseneszenz festgestellt (Gerhard et al., 1998, Glaab & Kaiser, 1999, Grossmann e.al., 1999, Wu & Tiedemann, 2002). Die Hemmung des Chlorophyllabbaus

nach Kresoxim-methyl-Gabe in den Blättern ist vermutlich auf die induzierte Reduktion des Ethylengehaltes sowie der Erhöhung des Cytokiningehaltes und der Aktivierung antioxidativer Enzyme zurückzuführen (Grossmann & Retzlaff, 1997, Wu & Tiedemann, 2002). Ein großer Nachteil ist die negative Beeinflussung des Keimungsprozesses einiger Pflanzen, bei der die Kresoxim-methyl gehemmte Atmungskettenphosphorylierung häufig die wichtigste Quelle für die Lieferung von Energie durch ATP darstellt. Nach Applikation von Kresoxim-methyl zeigten Keimlinge der Kresse eine Hemmung des Keimungsprozesses (Grossmann & Retzlaff, 1997). Deshalb wäre es von Vorteil, die Toleranz von Pflanzen gegenüber Kresoxim-methyl in diesem Entwicklungsstadium verbessern zu können.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die aufgeführten vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Immunmodulation in Pflanzen führten zu der Überlegung, die Möglichkeit des Fehltargetings einer Substanz auch auf exogen appliziertes Kresoxim-methyl erweitern zu können (Übersicht siehe Abb.7).

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Erzeugung von transgenen Pflanzen, die aufgrund der Expression eines spezifisch gegen Kresoxim-methyl gerichteten Einkettenantikörpers eine verbesserte Toleranz gegenüber diesem Fungizid aufweisen. Hierfür sollte im ersten Teil der Arbeit ein Hybridomzellklon, welcher spezifisch Kresoxim-methyl bindende Immunglobuline sezerniert, isoliert werden. Nach der Isolation der Gensequenzen für die Generation eines Einkettenantikörpers aus diesem Hybridomklon und der Expression und Charakterisierung des rekombinanten Proteins im bakteriellen System mußte der Kresoxim-methyl bindende Einkettenantikörper unter Kontrolle des USP-Promotors von *Vicia faba* (Bäumlein et al. 1991/I) beziehungsweise des konstitutiven CaMV 35-S-Promotors (Franck et al., 1980, Benfay et al., 1989) nach dem Gentransfer in Tabakpflanzen samenspezifisch beziehungsweise ubiquitär zur Expression gebracht werden. Durch die samenspezifische Expression sollte der Einkettenantikörper im endoplasmatischen Retikulum und den abgeleiteten Strukturen (den „Protein Bodies“) zur Schaffung eines anti-Kres scFv-Speichers akkumuliert werden. Die ubiquitäre pflanzliche Expression verfolgte durch die Wahl entsprechender Signalpeptide und Targetingsignale und damit Lokalisation des scFv in verschiedenen Kompartimenten der Zelle wie Zytosol, Plasmamembran und endoplasmatischem Retikulum das Ziel zur Testung verschiedener Strategien der Immunmodulation bei konstitutiver Expression des scFv. Für das Endziel, dem Nachweis der Toleranz der transgenen Pflanzen gegenüber den phytotoxischen Effekten von Kresoxim-methyl während der Samenkeimung sollte ein geeignetes System entwickelt und angewandt werden. Die Verbesserung der Toleranz gegenüber dem phytotoxischen Fungizid würde als Modellsystem eine neuartige, relativ einfach zu realisierende Methode zur Erzeugung von Xenobiotikatoleranz darstellen. Effektive aber weniger selektive Mittel mit ausgeprägten phytotoxischen Eigenschaften könnten hierdurch Einsatz in der Landwirtschaft finden.

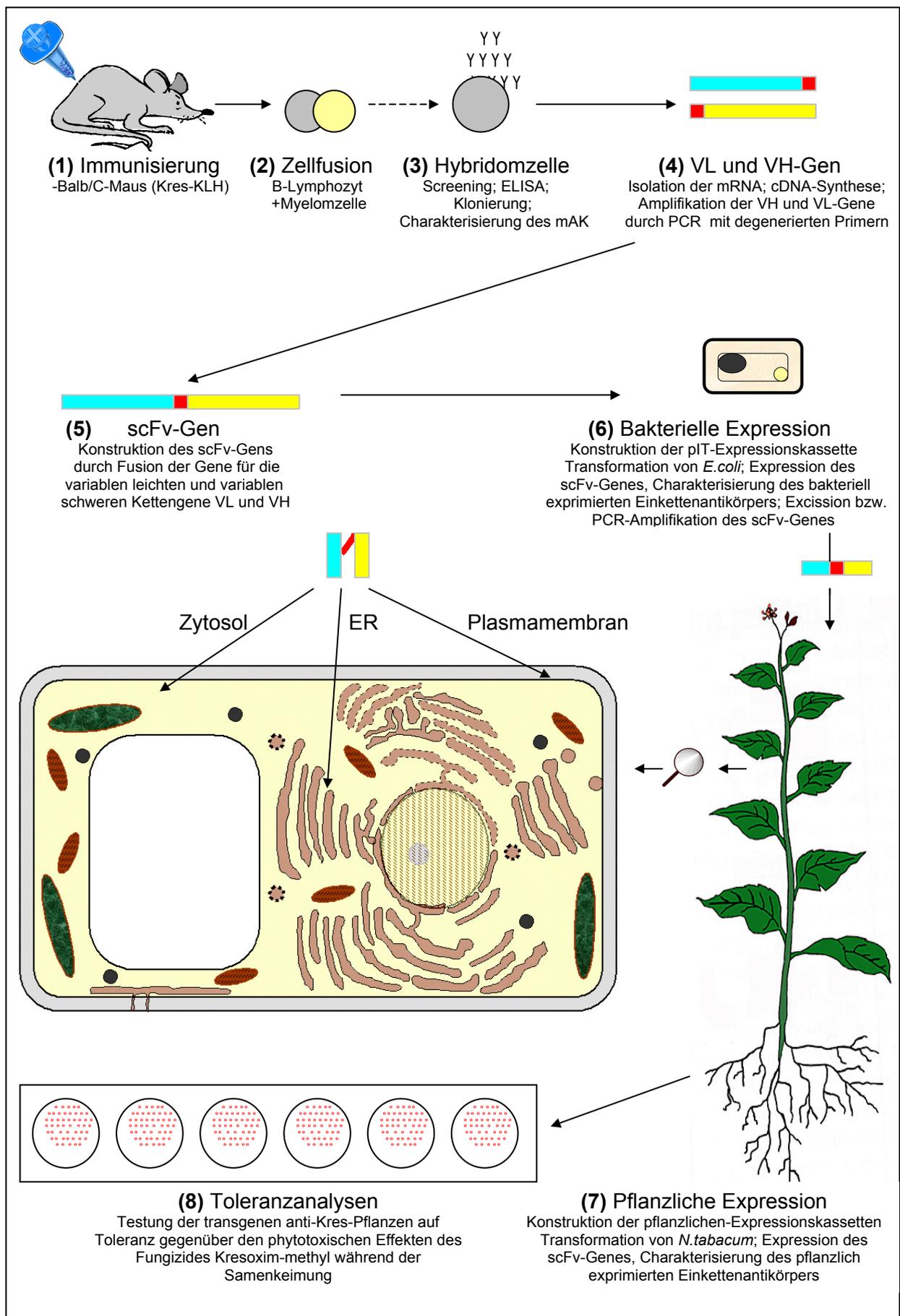


Abb.5.: Übersicht und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

- Raytest:** _____ Computerprogramm „TINA- pcbas2.0“
(Schraubenhardt)
- Sanyo:** _____ Ultratiefkühlschränke
(Bad Nenndorf)
- Schütt:** _____ Vertikalalektrophoresen, Mikropistille, diverse heizbare
(Göttingen) Wasserbäder und Trockenschränke; „Bioclav“;
Transferpipette[®]-8, Pipetus[®]-Standard, Handdispenser,
Präparierbesteck, „Vortex Genie 2“, Mikrowellengerät,
Zählkammer nach Thoma, Filterpapier
- SPSS Science:** _____ Computerprogramm „SigmaStat“
(Chicago.,USA)
- Stovall Life Science:** _____ Schüttelgerät, Wasserbad „The Belly Dancer /
(Greensboro NC.,USA) Hybridisation Water Bath“
- Stratagene:** _____ „UV-Stratalinker[™] 2400“, Geldokumentationsanlage,
(Heidelberg) „Transilluminator 2020UV/White“, Minizentrifuge,
Computerprogramm „Eagleeye“
- Tecan:** _____ Mikrotiterplattenwaschgerät „Columbus Washer“
(Crailsheim)
- InforMax Inc.:** _____ Computerprogramm „Vector NTI Deluxe“
(Maryland, USA)
- DNASTAR Inc.:** _____ Computerprogramm „Lasergene“
(Madison, USA)

2.1.2 Speziallabormaterial

- Amersham:** _____ Nylonmembran (Hybond N⁺)
(Braunschweig)
- Becton Dickinson:** _____ Flachboden-ELISA-Platte „Falcon® 3915 ProBind“
(Franklin Lakes, USA)
- Greiner:** _____ Flachbodenzellkulturplatten (12-, 24-, 48- und 96-Loch)
(Kremsmünster) Zellkulturflaschen (50ml ,250- und 550ml), Tropfpipetten,
15ml und 50ml Reaktionsgefäße
- Kodak:** _____ Biomax MR1-Film
(Göttingen)
- Nalgene[™]:** _____ Syringe filters, 0,2µm, 0,45µm und 0,8µm (Sterilfilter),
(Rochester NY.,USA) Kryokonservierungsröhrchen, Einfriercontainer „5100
Cryo 1°C Freezing Container -Mr. Frosty-“
- Retina:** _____ Röntgenfilm
(Berlin)
- Schleicher und Schüll:** _____ Nitrocellulosemembran (Cellulosenitratmembran BA 85),
(Dassel) Blotting Papier GB 002, Rundfilter (Φ70mm)
- Pall Gelman Sciences:** _____ Spritzenfilter „Acrodisc 0,2µm Dimethylsulfoxid-sicher“,
(Roßdorf) „Serum Acrodisc 5µm/0,2µm“
- K.R. Anderson, Inc.:** _____ Klebeband für die Versiegelung von Mikrotiterplatten
(Morgan Hill, Kanada) „PERMACELL P-422 1“
- NUNC:** _____ 96-Loch- Gewebekulturplatten „TC-Microwell 96F“
(Roskilde, Dänemark)

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits:

- Amersham Life Science:** _____ „ECL Western blotting analysis system“, [α^{32}]dATP, (Braunschweig) „Megaprime™ DNA labelling system“
- Appligene:** _____ Ampicillin (Heidelberg)
- BASF-AG:** _____ BAS 490F (Kres), Kres-KLH, Kres-BSA (Ludwigshafen)
- BioRad:** _____ „BIO-RAD-Protein Assay“ (Bradford Reagenz), (Richmond CA.,USA) „Kaleidoscope Prestained Standards“ (Protein Molekulargewichtsstandard)
- Boehringer Mannheim:** _____ „Maus Hybridoma-Subtyping Kit“ (Mannheim)
- Difco Laboratories:** _____ Hefeextrakt, Bacto®-Agar, Bacto®- Trypton, Bacto®-Pepton, (Detroit,USA) Freund`s komplettes und inkomplettes Adjuvans
- Duchefa:** _____ Murashige-Skoog Vollmedium Festsubstanz, Kanamycin, (Amsterdam, Niederlande) Rifampicin, Cefotaxim, Carbenicillin
- Dynal GmbH:** _____ „Dynabeads mRNA Purification Kit“ (Hamburg)
- Eurogentec:** _____ DNA-SmartLadder (DNA-Längenstandard) (Seraing, Belgien)
- Gibco-BRL:** _____ 100bp Leiter (DNA-Längenstandard), N,N,N',N',-Tetramethyl- (Gaithersburg MD.,USA) ethylendiamin, Agarose, Tris, EDTA, Natriumzitat, RPMI1640-Gutamax I-Medium, HT-Supplement 50x, HAT 50x Supplement, Natriumpyruvat, FKS, Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)
- Lever:** _____ „Domestos“ (Haushaltsreiniger) (Hamburg)
- Merck:** _____ Natriumhydroxid, Natriumchlorid, Magnesiumsulfat, (Darmstadt) Magnesiumchlorid, Polyethylenglykol
- Promega GmbH:** _____ Interleukin-6 (rekombinantes menschliches Protein) (Manheim)
- Qiagen:** _____ „Qiagen Plasmid Mini Kit“, „Qiaquick Gel Extraction Kit“, (Hilden) „Qiagen Plasmid Midi Kit“
- Reanal:** _____ Acrylex P30 (Budapest, Ungarn)
- Riedel de Haën:** _____ Ethanol (reinst, für RNA) (Seelze)
- Roth:** _____ Natriumacetat, Ethidiumbromid, Ethanol, Essigsäure, (Karlsruhe) Chloroform, „Roti-Hybri-Quick“ (Hybridisierungslösung), Phenol/Chloroform, Methanol, Salzsäure, Isopropanol, „Rotiphorese Gel 30“ (Acrylamid/Bisacrylamid {37,5:1}), Fleischextrakt, Glycerin, Sorbitol, Natriumthiosulfat, Silbernitrat, Formaldehydlösung (37%), Kaliumcarbonat, Glycin
- Serva:** _____ Tween-20, SDS, IPTG, BSA, MES, Tris, Quarzsand, (Heidelberg) Dinatriumhydrogenphosphat, β -Mercaptoethanol, Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat

Roche: _____ (Mannheim)	„DIG DNA Labeling and Detection Kit“, „Expand™ Long Template PCR-System“
Sigma: _____ (Louis MO.,USA)	Dimethylsulfoxid, Kaliumnitrat, Triton X-100, DEPC, Saccharose, Bromphenolblau, Maleinsäure
USB: _____ (Cleveland)	N-Laurylsarcosin, Cetyltrimethylammoniumbromid

2.1.4 Enzyme und Antikörper

Boehringer: _____ (Mannheim)	RNase A
Gibco-BRL: _____ (Gaithersburg MD.,USA)	Restriktionsendonukleasen, Superscript II (Reverse Transkriptase); RNaseOUT (RNase-Inhibitor), T4-DNA Ligase, Shrimp Alkalische Phosphatase
Sigma: _____ (Braunschweig)	Rabbit Anti Maus-IgG-POD (mit Peroxidase konjugierter Sekundärantikörper aus Kaninchen, gegen Maus-IgG gerichtet), Rabbit- Anti Maus-IgG-ALP, (mit alkalischer Phosphatase konjugierte Maus-IgG bindende, Sekundärantikörper aus Kaninchen), Lysozym

Der *c-myc*-Antikörper wurde als Konzentrat nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse gegen PBS aus dem Überstand der Hybridomazellen 9E10 (*Evan et al., 1985*) gewonnen, die im Zellzuchtlabor der Arbeitsgruppe „Phytoantikörper“ kultiviert wurden. Das Epitop umfaßt einen Bereich des humanen Proto-Onkogens p62, *c-myc* (*Bernard et al., 1983, Hilpert et al., 2001*).

2.2 Medien:

Die Anzucht der *E.coli*-Stämme erfolgte auf LB-Medium beziehungsweise LB-Agar nach *Sambrook et al. (1989)* mit dem selektiven Antibiotikum. *Agrobacterium tumefaciens* wurde auf CBY-Agarplatten unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika kultiviert. Für die Gewinnung von Plasmid-DNA und für die Transformation von Tabakpflanzen wurden die Bakterien in CBYF-Medium ebenfalls unter Zusatz von Antibiotika selektiv angezogen.

LB-Medium: _____	1% NaCl, 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, (pH 7,0)
LB-Agar: _____	LB-medium mit Zusatz von 2% Agar
2xTY: _____	1,6% Trypton, 1% Hefeextrakt, 0,5% NaCl
CBYF-Medium: _____	0,5% Trypton, 0,5% Saccharose, 0,492% MgSO ₄ , 0,1% Hefeextrakt, 0,5% Fleischextrakt (pH 7,2)
CBY-Agar: _____	0,5% Trypton, 0,5% Saccharose, 0,492% MgSO ₄ , 0,1% Hefeextrakt, 2% Agar (pH 7,2)

Die Kultivierung der Pflanzen unter sterilen Bedingungen erfolgte nach der Methode von *Murashige und Skoog (1962)* auf MS-Medium. Der pH-Wert von 5,8 des Mediums wurde vor dem Autoklavieren eingestellt.

MS-Medium: _____	4,4g/l Murashige und Skoog-Medium mit 0,5g/l MES, 2% Saccharose; MS-Agar: mit Zusatz von 1% Agar
-------------------------	--

Die Medien für die sterile Anzucht der Mausmyelomzellen und der Hybridomzellen basierten auf käuflichem RPMI1640-Glutamax I-Medium der Firma Gibco-BRL.

RPMI-Medium: _____ RPMI1640-Glutamax I-Medium, 10% FKS, 100U/ml Penicillin/Streptomycin, 1mM Natriumpyruvat

HAT-Medium: _____ RPMI-Medium, 1xHAT, 14U/ml Interleukin-6

HT-Medium: _____ RPMI-Medium, 1xHT, 14U/ml Interleukin-6

Kryokonservierungsmedium: _____ RPMI-Medium, 8% Dimethylsulfoxid

2.3 Lösungen und Puffer

10xTBE: _____ 0,89M Tris-Borat, 0,89M Borsäure, 0,02M EDTA

20xSSC: _____ 3M NaCl, 0,3M Natriumzitat pH 7,0

Acrylex P30-Suspension: _____ Acrylex-P30 in TE-puffer

Marvelpuffer: _____ 20mM Tris-HCl, pH8,0, 180mM NaCl

PBS : _____ 0,008M Na₂HPO₄, 0,002M KH₂PO₄, 0,15M NaCl, pH7,5)

Proteinextraktionspuffer: _____ 50mM Tris-HCl, pH8,0, 200mM NaCl, 5mM EDTA, 0,1% Tween-20

Beschichtungspuffer: _____ 200mM Na₂CO₃ / NaHCO₃; pH 9,6

SDS-Elektrophoresepuffer: _____ 0,025M Tris, 0,25M Glycin, pH 8,3, 0,1% SDS

SDS-Gelladepuffer: _____ 1% Glyzerin, 0,14x Trenngelpuffer, 2% SDS, 0,5% β-Mercaptoethanol, 0,2% Bromphenolblau

SDS-Probenpuffer: _____ 36mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 5% Glycerin, 2,5% β-Mercaptoethanol

SDS-Sammelgelpuffer: _____ 0,8% SDS, 12% Tris-HCl, pH6,8

SDS-Trenngelpuffer: _____ 0,8% SDS, 32,3% Tris-HCl, pH8,8

TE-Puffer: _____ 10mM Tris-HCl, pH8,0, 1mM EDTA

Transferpuffer: _____ 1000ml Methanol, 4000ml SDS-Elektrophoresepuffer

Substratpuffer: _____ 9,1M Glycin, 1mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂, pH 10,4

Laufpuffer nach W.Weschke: _____ 40mM Tris, 3mM Natriumazetat, 1mM EDTA, pH 7,9

DNA-Extraktionspuffer: _____ 1% N-Laurylsarcosin, 0,8% CTAB, 0,14M Sorbitol, 0,022M EDTA, 0,8M NaCl, 0,22M Tris-HCl, pH 8,0

Die Zusammensetzung aller anderen Lösungen (zB. für die Waschschritte nach der Hybridisierung) ist im Methodenteil vermerkt. Das für den Nachweis der Proteinexpression im „Western Blot“ zur Absättigung verwendete fettfreie Trockenmilchpulver („Marvel“) wurde von einer Bäckerei bezogen.

2.4 Oligonukleotide

Die folgenden synthetisch erzeugten Oligonukleotide wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen, die Sequenzen sind in 5`-3`-Orientierung dargestellt:

BACK_A	ACA CGT GGA TCC GAC TAC AAA GAT GTT GTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT G
BACK_B	ACA CGT GGA TCC GAC TAC AAA GAT GTT TTG ATG ACC CAG ACT CCA CTC ACC CTG CCT G
FOR TOM1	GTC ACG GGA TCC ATT CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TT
LMB3	CAG GAA ACA GCT ATG AC
PHEN	CTA TGC GGC CCC ATT CA
SC-BACK	TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCG GAC TAC AAA G
SC-FOR _{Not}	TAT GAA TTC TGC GGC CGC T
VLFOR	Gemisch aus LF1,2,4 und 5 in äquivalenten molaren Anteilen
LF1	GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC ACC ACG TTT GAT TTC CAG GTT GG
LF2	GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC ACC ACG TTT TAT TTC CAG CTT GG
LF4	GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC ACC ACG TTT TAT TTC CAA CTT TG
LF5	GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC ACC ACG TTT CAG CTC CAG CTT GG
Uni-Primer	GTA AAA CGA CGG CCA GT
Reverse-Primer	AAC AGC TAT GAC CAT G
LEB73	GCT TTC ACT TTC CTT GCT TC
TAG73	GAG AGA CTG GTG ATT TTT GCG
VHFOR _{Not}	Gemisch aus HF Not1,2,3 und 4 in äquivalenten molaren Anteilen.
HF Not1	TAT GAA TTC TGC GGC CGC TGA GGA AAC GGT GAC CGT GGT
HF Not2	TAT GAA TTC TGC GGC CGC TGA GGA GAC TGT
HF Not3	TAT GAA TTC TGC GGC CGC TGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT
HF Not4	TAT GAA TTC TGC GGC CGC TGA GGA GAC GGT
VHBACK, VLBACK	Für die Amplifikation der schweren und leichten variablen Immunglobulinkette wurden Oligonukleotide mit der von <i>Plückthun et. al. (1996)</i> publizierten Sequenz für die Assemblierung von Maus-Einkettenantikörpern in der Orientierung VL-Linker-VH als VHBack-Primergemisch (HB1 bis HB19) beziehungsweise als VLBack-Primergemisch (LB1 bis LB17) nach den Angaben des Autors verwendet.

2.5 Plasmide, Vektoren

pIT1	Amp ^r (vom MRC Centre, Cambridge bereitgestellt)
pRT RA 7/3	Amp ^r (<i>Artsaenko et al., 1995</i>)
pRT RA SO1~100xELP	Amp ^r (von Dr. J. Scheller, IPK, bereitgestellt)
pBIN 19	Kan ^r (<i>Bevan et al., 1984, Frisch et al., 1995</i>)
pBU10	Amp ^r (<i>Phillips et al., 1997</i>)
pRT_A-Hook	Amp ^r (von Dr. U Conrad, IPK, bereitgestellt)

2.6 Bakterien

2.6.1 *Escherichia coli* -Stämme

HB 2151	ara, Δ (lac-pro), thi/F ⁻ proA ⁺ B ⁺ , lacI ^q Z Δ M15 (<i>Hoogenboom et al., 1991</i>)
TG 1	Δ (lac-pro), supE, thi, hsd Δ 5/F ⁻ traD36, proA ⁺ B ⁺ , lacI ^q , lacZ Δ M15 (<i>Gibson, 1984</i>)

2.6.2 *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm

pGV 2260 in C58C1 (*Deblaere et al., 1985*)

2.7 Mausstamm und Myelomzellen

2.7.1 Mausstamm für die Immunisierung

Balb/c Prob (*Potter, 1985/I+II*)

Die Anzucht der Balb/c-Mäuse erfolgte im IPK-internen Tierstall durch Frau Ulrike Gresch.

2.7.2 Mausmyelomzellstamm

P3x63Ag8.653 (*Kearny et al., 1979*)

Die Anzucht des Myelomzellstammes erfolgte in Zellkulturflaschen mit RPMI-Medium bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Rel.LF.

2.8 Pflanzenmaterial

Nicotiana tabacum Varietät Samsun NN wurde sowohl als Wildtyp-Kontrollpflanze (nicht transgen), als auch für die Erzeugung transgener Pflanzen genutzt. Die transgenen Kontrollpflanzen UF9 (Konstrukt 9) wurden von *Ulrike Fiedler (Dissertation, 1996; Fiedler et al., 1997)* produziert.

3 Methoden:

3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper

3.1.1 Immunisierung

Die Herstellung der gebrauchsfertigen Antigenlösung für die Immunisierung und deren Injektion wurde nach der von *Baumgarten et al. (1990)* beschriebenen Methode durchgeführt. Als Immunisierungsantigen wurde in PBS gelöstes Kresoxim-methyl-KLH-Konjugat verwendet. Die Immunisierungsschritte sowie die Entnahme von Blut der immunisierten Mäuse wurden von Frau U. Gresch am IPK-Gatersleben durchgeführt.

Für die Erstimmunisierung wurde 8 Wochen alten Balb/C-Mäusen eine Lösung von 100µg Antigen als Emulsion in 1VT komplettem Freund`s Adjuvans intraperitoneal injiziert. Die darauffolgenden 6 Immunisierungen wurden im Abstand von jeweils 3 bis 4 Wochen durchgeführt. Hierfür wurde 50µg Antigen als Emulsion mit inkomplettem Freund`s Adjuvans ebenfalls intraperitoneal verabreicht. Das Blut der immunisierten Mäuse wurde nach der von *Wiggenhauser (1990)* beschriebenen Methode mittels retroorbitaler Blutentnahme gewonnen und anschließend der Antikörpertiter des Serums im indirekten ELISA bestimmt. Die letzte intraperitoneale Injektion des Antigens erfolgte ohne Zusatz von Adjuvans am Tag 3 vor der Milzentnahme. Dabei wurden 350µg Immunisierungsantigen verabreicht.

3.1.2 PEG-vermittelte Zellfusion

Sämtliche nachfolgend beschriebene Arbeiten mit tierischen Zellen erfolgten in einem speziell ausgerüsteten Labor für die tierische Zellkultur unter sterilen Bedingungen. Für die Durchführung der Zellfusion wurde eine Lösung von 50% PEG in RPMI1640-Glutamax I hergestellt. Der pH-Wert des PEG-haltigen Mediums wurde durch Zugabe einer 5M NaOH-Lösung auf einen Wert von 8,0-8,2 eingestellt und die Lösung in einem Wasserbad auf 38°C temperiert.

Die für die Fusion verwendeten Myelomzellen (P3x63Ag8.653, vgl 2.7.2.) wurden durch Kultivierung in RPMI-Medium bei 37°C, 5%CO₂ und 95% rel.LF vermehrt und durch eine 10minütige Zentrifugation der Zellkultursuspension bei 1500xg isoliert. Anschließend erfolgte als Waschschrift die Aufnahme der Zellen in 10ml RPMI1640-Glutamax I-Medium und eine nachfolgende Zentrifugation (10min bei 1500xg, RT). Nach der Wiederholung des

Waschschrilles wurden die Myelomzellen in 10ml RPMI1640-Glutamax I- resuspendiert und die Zellanzahl in einer Zählkammer nach Thoma bestimmt.

Die Präparation der Lymphozyten aus der Milz der immunisierten Mäuse erfolgte nach der Methode von *Peters (1990/I)* durch Ausschabung der Zellen aus dem isolierten Organ mit einem Skalpell in 2x 5ml RPMI1640-Glutamax I-. Die gewonnene Zellsuspension wurde zur Entfernung von Geweberesten nachfolgend über ein feines Gazesieb filtriert und für 10min bei 1500xg (RT) zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das Zellsediment in 5ml Ammoniumchloridlösung (150mM) aufgenommen und die erhaltene Suspension für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 25ml RPMI und anschließender Zentrifugation (10min bei 1500xg RT) wurden die sedimentierten Zellen in 4ml RPMI1640-Glutamax I resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit 5ml FKS unterschichtet und für 10min bei 1500xg (RT) zentrifugiert. Nach der Verwerfung des Überstandes wurden die Zellen in 10ml RPMI1640-Glutamax I- aufgenommen und zentrifugiert (10min bei 1500xg, RT). Dieser Waschschrill wurde wiederholt und das erhaltene Milzzellsediment in 5ml RPMI1640-Glutamax I- resuspendiert. Die Menge der gewonnenen Mausmilzzellen wurde durch Auszählung in einer Zählkammer nach Thoma bestimmt.

Für die Fusion wurden beide Zelltypen im Verhältnis von 1:5 (Myelomzellen:Milzzellen) gemischt. Entsprechende Volumina der Zellsuspensionen wurden in einem 50ml Reaktionsgefäß vereinigt und anschließend für 10min bei 1500xg (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Reaktionsgefäß mit dem Zellsediment in ein auf 38°C vortemperiertes Wasserbad überführt. Über einen Zeitraum von 1min wurde 1ml einer 50%igen Lösung von PEG in RPMI1640- Glutamax I- bei kontinuierlicher Rührbewegung über eine Pipette zugegeben. Die Suspension wurde eine weitere Minute bei 38°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 9ml RPMI1640-Glutamax-I- innerhalb eines Zeitraumes von 5min bei ständiger Vermischung der Suspension. Nach dem folgenden Zentrifugationsschritt (10min,1500xg, RT) wurden die Fusionsprodukte in HAT-Medium aufgenommen und die Konzentration auf $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Abschließend wurden jeweils 5ml der Suspension pro Platte gleichmäßig auf die inneren Kavitäten von, mit einer Nährzellschicht („feeder-cell-layer“) vorbereiteten, 96-Loch Zellkulturplatten ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% rel. LF kultiviert. Die Präparation der Nährzellen erfolgte nach der von *Peters (1990/II)* beschriebenen Methode (Makrophagen). Neben peritonealen Makrophagen wurden in weiteren Zellkulturplatten auch Thymuszellen als Nährzellen eingesetzt. Diese wurden durch folgende Prozedur gewonnen: (1) Thymectomie nach *Coligan et al. (1996)*, (2) Präparation der Zellen durch Ausschabung des Organes mit Hilfe eines Skalpells in 10ml RPMI-Medium und anschließender Gazefiltration, (3) Überführung der Zellsuspension in ein 50ml Reaktionsröhrchen und Zugabe von 30ml RPMI-Medium, (4) Zentrifugation (10min, 1500xg, RT), (5) Resuspension der Zellen in HAT-Medium und anschließende Bestimmung der Zellzahl (6) Einstellung der Zellkonzentration auf $0,5 \times 10^6$

Zellen/ml mit HAT-Medium (7) Aussaat der Nährzellen in 96-Well Zellkulturplatten ($0,5 \times 10^5$ Zellen/Kavität) und Kultivierung der Platten bei 37°C, 5% CO₂ und 95% rel. LF. Die Präparation der Nährzellen erfolgte 2-3 Tage vor Durchführung der Zellfusion.

3.1.3 Kultivierung und Selektion der anti-Kresoxim-methyl-mAK produzierenden Hybridomzellen

Die Anzucht der Hybridomzelllinien erfolgte in einem Inkubationsschrank (BBD 2260) der Firma Heraeus bei 37°C, 5% CO₂ und 95% rel. LF mit RPMI-Medium als Basisnährlösung. Die Gewinnung von Hybridomzellen erfolgte mittels HAT-Selektion (*Peters und Gieseler, 1990*). Nach einer mehrwöchigen Selektionsphase wurde das HAT-Medium schrittweise durch HT-Medium und schließlich durch RPMI-Medium ersetzt. Die Zellkulturüberstände wurden in einem indirektem Maus-IgG-ELISA (siehe Abschnitt 3.1.4) mit Anti-Maus-IgG-Antikörper aus Kaninchen, konjugiert mit ALP als Sekundärantikörper auf die Produktion von Kresoxim-methyl bindenden Immunglobulinen getestet. Antikörper gegen Kresoxim-methyl sekretierende Hybridomzellen wurden durch limitierende Verdünnung nach der Methode von *Würzner (1990)* auf Zellkulturplatten mit murinen Thymozyten beziehungsweise Makrophagen als Nährzellen rekloniert. Hierfür wurden die Zellen nach Resuspension in HT-Medium auf die, mit Feederzellen vorkultivierte, 96-Napf-Zellkulturplatten in Konzentration von 1000, 100 und 1. Zelle je Kavität ausgesät und wie oben beschrieben kultiviert. Nach der erfolgreichen Reklonierung erfolgte für die Gewinnung von mRNA sowie für die Bestimmung des Ig-Subtyps eine Kultivierung der Sekundärklone in größerem Maßstab in RPMI-Medium. Zur Kryokonservierung etablierter Klone wurden 2ml der entsprechenden Hybridomzellsuspension in ein 15ml-Reaktionsgefäß transferiert und anschließend für 10min bei 1500xg (RT) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1ml Kryokonservierungsmedium aufgenommen und die Suspension in Kryokonservierungsröhrchen überführt. Die Gefrierkonservierung erfolgte durch langsame Abkühlung auf -80°C (Ultratiefkühltruhe) in einem Einfriercontainer von Nalgene und anschließender Lagerung der Proben bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

3.1.4 Charakterisierung der Kresoxim-methyl-spezifischen Maus-Immunglobuline im Hybridomzellüberstand und im Serum

Die Bestimmung der Immunglobulinklasse, des Ig-Subtyps und des Leichtkettentyps der von den Hybridomklonen sekretierten anti-Kres-mAK erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „Maus Hybridoma Subtyping Kit“ der Firma Boehringer Mannheim. Die immunologische Spezifität der mAK wurde durch indirekten und indirekten kompetitiven ELISA nachgewiesen. Hierfür wurden vorbereitend ELISA-Platten („Falcon® 3915 ProBind“) mit einer Lösung des ELISA-Antigenes (KRES-BSA; 10µg/ml; 100µl/Kavität) in Beschichtungspuffer bei 4°C Ü/N

inkubiert. Nach der Verwerfung der Beschichtungslösung und dem anschließend dreifach durchgeführten Waschschrift mit PBST erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindestellen der ELISA-Platten mit einer 2%igen BSA-Lösung in PBST für 1h bei Raumtemperatur (200µl/Kavität). Nach der Entfernung der BSA-Lösung wurden die so vorbereiteten ELISA-Platten mit Klebeband (PERMACELL P-422 1) versiegelt und bei 4°C gelagert.

Für den indirekten ELISA wurde der Hybridomzellüberstand bzw. das Serum immunisierter Mäuse in Verdünnungen mit PBST mit 1% BSA zugesetzt (100µl/Kavität) und die Platte für 2h bei 25°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente RPMI-Medium. Nach diesem Inkubationsschritt und dem darauffolgenden Waschschrift mit PBST wurde der ALP konjugierte RAM-IgG-Antikörper (1:1000 in PBST verdünnt, 100µl/Kavität) zugegeben und die Platte für 2h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde die ELISA-Platte nochmals mit PBST gewaschen und die Substratlösung (1mg/ml pNPP in Substratpuffer, 100µl/Kavität) zugegeben. Die Platte wurde mit Klebeband versiegelt und bei 25°C bis zur Vermessung der optischen Dichte inkubiert. Die Vermessung des Signales erfolgte in einem Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Die Durchführung des indirekten kompetitiven ELISA erfolgte prinzipiell nach demselben Schema bis auf die Präinkubation des Hybridomzellüberstandes mit freiem Antigen. Hierfür wurde der verdünnte Hybridomzellüberstand, mit einer äquivalenten Menge einer Lösung des freien Antigenes (BAS 490F) in PBST gemischt und für 2h bei 25°C präinkubiert. Anschließend wurden jeweils 100µl/Kavität der vorinkubierten Lösung in die beschichteten ELISA-Platten überführt und die Platten wie oben beschrieben weiterbehandelt. Eine weitere Variante des kompetitiven ELISA sah die Inkubation des Hybridomzellüberstandes auf der ELISA-Platte in Gegenwart von freiem Antigen vor. Hierfür wurden jeweils 50µl/Kavität einer Lösung mit der entsprechenden Konzentration des freien Antigenes (BAS 490F) in PBST für 30min auf der mit Antigen beschichteten und mit BSA nachbeschichteten Platte inkubiert. Anschließend wurde eine äquivalente Menge des verdünnten Hybridomzellüberstandes (50µl) zugegeben, mit der Antigenlösung gemischt und für 10min bei 25°C inkubiert. Die nachfolgenden Inkubationsschritte erfolgten wie oben beschrieben.

3.2 Synthese der Einkettenantikörper

3.2.1 Isolierung von cDNA aus den Hybridomzellen

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den Zellen der Hybridomzelllinien anti-Kres mAK 14/1-G9-H11-H9 sowie 14/8 C5-3-2 erfolgte nach der Methode von *Chomczynski und Sacchin (1987)*. Anschließend wurde die poly[A]-RNA aus der Gesamt-RNA nach dem von *Robert und Farrell (1993)* beschriebenen Protokoll gewonnen. Hierfür wurden Oligo[dT]-gekoppelte magnetische „dynabeads“ der Firma Dynal genutzt.

Die isolierte poly[A]-RNA diente als Matrize für die Umschreibung in cDNA mit einer Reversen Transkriptase unter Befolgung des Herstellerstandardprotokolls (Roche; „SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR“). Für die Initiierung der Erststrangsynthese wurden Oligo dT₍₁₂₋₁₈₎-Primer verwendet. Die erzeugte cDNA diente als Ausgangsmaterial für die darauffolgende Zweitstrangsynthese und PCR-Amplifikation.

3.2.2 PCR-Amplifikation der variablen Immunglobulingene

Für die Amplifikation der Gene für die variablen leichten und schweren Immunglobulinketten wurde die gewonnene cDNA (vgl.3.2.1) als Ausgangsmaterial genutzt. Die Synthese der Zweitstränge und die darauffolgende PCR erfolgte unter Verwendung der degenerierten Primer VHFOR_{Not} und VHBACK für die variablen schweren Ketten beziehungsweise VLBACK und VLFOR für die variablen leichten Ketten. Die Reaktionen wurden für beide Ketten separat durchgeführt. Unter Nutzung des „Expand™ Long Template PCR System“-Kits der Firma Roche wurde folgendes Programm für die Amplifikation in einem automatischen PCR-Gerät (Perkin Elmer) ausgeführt:

1. Denaturierung bei 95°C für 5 min
2. Primeranlagerung bei 65°C für 1,5 min
3. Polymerase-Reaktion bei 68°C für 2 min
4. Denaturierung der DNA bei 93°C für 1,5 min
5. Primeranlagerung bei 65°C für 1,5 min
6. Polymerase-Reaktion bei 68°C für 10 min

Die Schritte 2. bis 4 wurden dreißigmal wiederholt. Die amplifizierten variablen leichten und schweren Ketten der mA-Klone 14/8 C5 3/2 und 14/1 G9 H11H9 wurden anschließend in einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Fragmente durch Gelelution isoliert.

3.2.3 Synthese der anti-Kres scFv durch Fusions-PCR

Die Assemblierung der Antikörperkettengene zu den scFv-Genen erfolgte mittels Fusions-PCR in zwei Teilschritten. Zunächst wurden jeweils 20ng der erzeugten VL- und VH-Ketten sowie die Desoxyribonukleotidtriphosphate vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe der Polymerase zum gepufferten Reaktionsansatz („Expand™ Long Template PCR System“ der Firma Roche) gestartet. Für die Anlagerung der im Linkerbereich komplementären DNA-Sequenzen der VL- und VH-Ketten und die anschließende Verlängerung zum scFv-Gen wurde folgendes Programm ausgeführt: (1): 5min 95°C, (2): 1,5min 66°C, (3): 2min 70°C, (4): 1,5min 93°C. Die Reaktionsschritte (2)-(4) wurden dreimal wiederholt. Die Amplifikation der scFv-Gene erfolgte im zweiten Teil der Reaktion durch Zugabe der beiden Primer

SC-FOR_{Not} und SCBACK bei 93°C und dreißigfacher Wiederholung der Reaktionsschritte (2) bis (4). Abschließend erfolgte die letzte Polymerasereaktion bei 70°C für 10min. Die mit dieser Methode konstruierten Einkettenantikörpergene besitzen die Orientierung VL-Linker-VH.

3.3 Klonierung und Sequenzierung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Standardmethoden wie die Anzucht von Bakterien, die Plasmidisolierung aus *E.coli* Stämmen, Restriktionsspaltungen, DNA-Konzentrationsbestimmungen, die Auftrennung der Nukleinsäuren in Agarosegelen, der Transfer der Nukleinsäuren auf Nylonmembranen und Klonierungsschritte wurden nach den von *Sambrock et al. (1989)* beschriebenen Protokollen durchgeführt. Die Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach Vorschrift des Herstellers mit dem „QIAquick Gel Extraktions Kit“ von Qiagen.

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach *Sanger et al. (1977)* und *Chen and Seeburg (1985)*. Frau S.König (IPK-Gatersleben) führte diesen Service unter Verwendung von Fluoreszein-markierten Oligonukleotiden mit Hilfe eines automatischen Laser Fluoreszenz Sequenziergerätes aus. Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe der Programme „Vector NTI Deluxe“ (InforMax Inc.) und „Lasergene“ (DNASTAR Inc.) durchgeführt.

Die Transformation der verwendeten *E.coli* Stämme HB2151 und TG1 erfolgte durch Elektroporation (*Inoue et al., 1990*). Für die Isolation und Reinigung der Plasmid-DNA zur Transformation der Bakterien sowie für die Sequenzierung wurde der „Quiagen Plasmid Midi Kit“ der Firma Quiagen genutzt.

3.4 Bakterielle Expression der anti-Kres scFv im pIT-Vektorsystem

Die scFv-Gene wurden nach der Spaltung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen als SfiI/NotI-Fragmenten in den bakteriellen Expressionsvektor pIT1 kloniert. Nach der Transformation des *E.coli*-Stammes TG1 erfolgte die Selektion auf LB-Agarplatten mit 1% Glucose und 100µg/ml Ampicillin. Anschließend erfolgte die Isolation von Plasmid-DNA und die Prüfung auf Insertion des scFv-Genes mittels Restriktionsanalyse. Die DNA individueller Klone wurde mit den Fluoreszein-markierten Oligonukleotiden PHEN und LMB3 sequenziert und die Sequenzen computertechnisch ausgewertet. Anschließend erfolgte die Transformation der Plasmid-DNA in den Bakterienstamm HB2151 und die Selektion auf LB-Agarplatten mit 1% Glucose und 100µg/ml Ampicillin. Individuelle Klone wurden durch Kultivierung in 2xTY, 0,1% Glucose und 100µg/ml Ampicillin bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9

herangezogen und die Expression des scFv-Genes durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1mM induziert. Nach der darauffolgenden 20-stündigen Inkubation bei 30°C wurde der bakterielle Überstand isoliert und nach Sterilfiltration für die funktionelle Charakterisierung des darin enthaltenen rekombinanten Antikörperfragmentes im ELISA und „Western-Blot“ genutzt. Für die Charakterisierung im ELISA wurde der Überstand nach Verdünnung mit PBST eingesetzt. Zur Expressionsanalyse im „Western Blot“ wurden die Proteine durch Zugabe eines äquivalenten Volumenteils 2xSDS-Gelladepuffer und nachfolgende 15minütige Inkubation bei 99°C denaturiert. Weitere Schritte erfolgten anschließend wie unter 3.9. beschrieben.

3.5 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der verwendete *Agrobacterium tumefaciens* Stamm pGV 2260 in C58C1 (*Deblaere et al., 1985*) wurde nach der Methode von *Mersereau et al., (1990)* durch Elektroporation mit Plasmid-DNA transformiert. Die Kultivierung erfolgte auf CBY-Agar beziehungsweise in CBYF-Medium unter Zusatz des selektiven Antibiotikums bei 28°C. Der Nachweis der inegrierten pflanzlichen Expressionskassetten erfolgte durch Restriktionsanalyse nach HindIII-Spaltung beziehungsweise durch „Southern-Blot“-Analysen.

3.6 Transformation der Tabakpflanzen

Die Transformation der Tabakpflanzen erfolgte durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer nach der Blattscheiben-Transformationsmethode (angelehnt an *Horsch et al., 1985/1*). Durch 15minütige Inkubation in 30% Domestos oberflächensterilisiertes und mehrfaches Spülen in sterilem Wasser vorbehandeltes Blattmaterial von *Nicotiana tabacum*-Pflanzen (Varietät Samsun NN) war Ausgangsmaterial für die Transformation.

Aus den sterilen Blättern wurden mit Hilfe eines Skalpells kleine Stücke (ca.1cm²) geschnitten, für die Transformation in eine Suspension von transgenen *Agrobacterium tumefaciens* (1VT Ü/N-Kultur mit 10VT MS-Medium) überführt und in dieser Lösung 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Blattstückchen von überschüssiger Bakteriensuspension befreit und für die Kokultivation auf MS-Agarplatten ausgelegt. Die Kokultivation erfolgte Ü/N im Kulturenraum nach lichtdichter Versiegelung der Platten. Am folgenden Tag wurden die Blattstücken auf MS-Agarplatten mit 0,1mg/l NAA, 1mg/l BAP, 50mg/l Kanamycin und 500mg/l Cefatoxim transferiert und die Kultivierung mit einem 16h/8h-Licht/Dunkel-Rhythmus fortgesetzt. Die nach etwa 5-8 Wochen gebildeten Sprosse wurden anschließend zur Wurzelbildung auf MS-Medium mit 50mg/l Kanamycin und 500mg/l Cefatoxim überführt. Nach dieser Methode *in vitro* regenerierte Pflanzen wurden in Erde überführt und im Gewächshaus bis zur Samenbildung kultiviert.

3.7 Pflanzenanzucht

3.7.1 Keimung der Tabaksamen

Reife Tabaksamen von Tabak-Wildtyp sowie von transgenen Tabakpflanzen wurden für 5min in 70%igem Ethanol oberflächensterilisiert und anschließend für etwa 60min in destilliertem Wasser gequollen. Anschließend wurden die Samen mit Hilfe einer Pinzette auf MS-Agarplatten ausgelegt.

3.7.2 *in vitro* Anzucht der Tabakpflanzen

Die Keimlinge wurden in Kulturkammern herangezogen, in denen ein 16h/8h Licht-Dunkelrhythmus bei einer Belichtung von $500\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ eingestellt war. Die Temperatur betrug 22°C .

3.7.3 Gewächshausbedingungen

Nach der *in vitro* Anzucht wurden die Pflanzen in Erde überführt und im Gewächshaus bei einem Belichtungsrythmus von 16h Belichtung und 8h Dunkelheit kultiviert.

3.8 Herstellung von pflanzlichen Proteinextrakten

3.8.1 Proteinextraktion aus Samen

Für die Extraktion der scFv-Proteine aus ganzen Samen wurden ca. 50mg reife Tabaksamen unter flüssigem Stickstoff nach Zusatz von etwas säuregewaschenem Quarzsand mit Mörser und Pistill homogenisiert. Anschließend wurde das erhaltene Pulver in 0,8ml Proteinextraktionspuffer aufgenommen, das Gemisch homogenisiert, die Extrakte nach dem Auftauen in Reaktionsgefäße überführt und bei 4°C , 15000g für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Konzentration der löslichen Proteine in diesem Extrakt nach *Bradford (1976)* bestimmt, wobei BSA als Standardprotein diente. Der Überstand wurde für die Charakterisierung der Bindungseigenschaften des pflanzlich exprimierten scFv im ELISA verwendet. Für die „Western-blot“-Analyse wurden die Extrakte mit äquivalenten Mengen Gelladepuffer versetzt und für 5min bei 99°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe wie unter 3.9 beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt.

3.8.2 Proteinextraktion aus Blattmaterial

Die Extraktion der Proteine aus Blättern von Tabakpflanzen für die „Western-blot“-Analyse erfolgte durch Homogenisierung von ca. 30mg Blattmaterial in einem Reaktionsgefäß mit Hilfe einer Bohrmaschine und eines Plastikmikropistills unter Zugabe von 100 μl SDS-

Probenpuffer. Die Proben wurden anschließend für 5min bei 99°C inkubiert und bei 15000g für 10min zentrifugiert. Nach der Bestimmung des Proteingehaltes im Überstand nach *Bradford (1976)* mit BSA als Standardprotein erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine (vgl.3.9). Für die Bestimmung der Antigenbindungseigenschaften des pflanzlich exprimierten Einkettenantikörpers im ELISA wurden 100mg Blattmaterial in einem Mörser nach Zugabe von flüssigem Stickstoff und Quarzsand zerkleinert. Nach der Zugabe von 0,8ml Proteinextraktionspuffer wurde das Gemisch nochmals homogenisiert und bis zum Auftauen auf Eis gestellt. Danach wurden die Extrakte in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 4°C und 15000g für 10min zentrifugiert. Die Konzentration der löslichen Proteine im Überstand wurde bestimmt und der Überstand für die Charakterisierung der Bindungseigenschaften des scFv im ELISA verwendet. Für die Bestimmung der Konzentration des Einkettenantikörpers im nativen Proteinextrakt mittels „Western-blot“ wurde der Extrakt (definierte Mengen an GLP) mit einer equivalenten Menge Gelladepuffer gemischt, 5min bei 99°C inkubiert und die Proteine anschließend wie unter 3.9 beschrieben aufgetrennt.

3.9 Proteinanalyse mittels „Western-blot“

Die Proteine wurden in einem 10%-, beziehungsweise 12,5%-igen (w/v) SDS-Polyacrylamidgel nach *Laemmli (1970)* in SDS-Elektrophoresepuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer ($\sim 1,2\text{mA}/\text{cm}^2$, 16h) in einer mit Transferpuffer gefüllten Elektrotransferapparatur auf Nitrozellulose (Schleicher und Schuell) übertragen. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit 5%-iger Trockenmilch („Marvel“) in Marvelpuffer für 2h bei RT abgesättigt. Die Bindung des monoklonalen Antikörpers 9E10 (*Evan et al., 1985*) an das *c-myc*-tag-Peptid wurde durch eine zweistündige Inkubation der Membranen bei RT in einer 1:50 mit 0,4%igem Marvel verdünnten Lösung von 9E10-Konzentrat erreicht. Danach wurde der Filter dreimal für jeweils 10min mit 0,4%igem Marvel bei RT gewaschen und für 2h in einer Verdünnung des Sekundäntikörpers (RAM-IgG-POD) von 1:2000 in 0,4%igem Marvel bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den folgenden Waschsritten (einmal 20min und viermal 5min) in PBST erfolgte der Nachweis des scFv- *c-myc*-tag-Proteins durch Chemilumineszenz mit dem ECL-System („Western blotting analysis system“, Amersham). Die Menge an exprimierten scFv wurde durch Vergleich mit einer bekannten Menge gereinigten scFv-Proteins ermittelt. Dazu wurden die auf dem Röntgenfilm erhaltenen Signale mit Hilfe eines Flachbettscanners digitalisiert und anschließend mit dem Programm TINA-pcbas2.0 (Raytest, Schraubenhardt) ausgewertet.

3.10 Nachweis der Proteine nach SDS-PAGE durch Coomassie-Brilliantblau beziehungsweise Silberfärbung

Für den Nachweis der samenspezifisch exprimierten scFvB8~ELP-Fusionsproteine wurden die Proteine nach erfolgter Auftrennung durch PAGE in einem 10%-igem SDS-Polyacrylamidgel durch Coomassie-Brilliantblau- bzw. durch Silberfärbung nachgewiesen.

Für die Coomassie-Brilliantblaufärbung wurden die Gele nach dem Lauf zunächst für eine Stunde in Entfärbelösung gewaschen. Anschließend wurden sie in Färbelösung mit R250-Coomassieblau (R250) für ca. 4h gefärbt. Danach wurde die Färbelösung entfernt und die Gele durch Inkubation in Entfärbelösung, die mehrfach erneuert wurde, über Nacht entfärbt.

Die Silberfärbung erfolgte mittels einem nach *Blum et al.*, (1987) modifizierten Protokoll (www.biologie.uni-rostock.de/pflanzenphysiologie/Teaching/Praktika/PDF/GP1/GP1_Fulda.pdf, S.18f) unter Nutzung der angegebenen Lösungen und Einhaltung der Inkubationszeiten:

1. Fixierung: über Nacht in 50% Methanol, 10% Essigsäure, 40% destilliertem Wasser.
2. Waschen: 3x 20sec in 50% Ethanol.
3. Sensitivierung: 1min in 0,2g/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$.
4. Waschen: 3x 20sec in destilliertem Wasser.
5. Silberfärbung: 20min in 2g/l AgNO_3 , 750 $\mu\text{l/l}$ 37% Formaldehyd.
6. Waschen: 2x 20sec in destilliertem Wasser.
7. Entwicklung: 4-5min in 30g/l K_2CO_3 , 4mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5ml/l 37% Formaldehyd.
8. Stoppen: 30sec in 1% Glycin.
9. Waschen: 30sec in destilliertem Wasser.
10. Stoppen: 10-30min in 1% Glycin.
11. Waschen: 30-120min in destilliertem Wasser.

3.11 Funktionelle Analyse des anti-Kres Einkettenantikörper durch ELISA

Die immunologische Spezifität der bakteriell beziehungsweise pflanzlich exprimierten anti-Kres-Einkettenantikörper wurde durch indirekte und indirekte kompetitive ELISA-Methoden untersucht. Hierfür wurden die ELISA-Platten („Falcon® 3915 ProBind“) mit einer Lösung des ELISA-Antigenes (Kres-BSA; 10 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{l/Kavität}$) in Beschichtungspuffer bei 4°C Ü/N inkubiert. Nach der Verwerfung der Beschichtungslösung und dem anschließend dreifach durchgeführten Waschschrift mit PBST erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindestellen der beschichteten Platten mit einer 2%igen BSA-Lösung in PBST für 1h bei RT (200 $\mu\text{l/Kavität}$). Nach der Entfernung der BSA-Lösung wurden die so vorbereiteten ELISA-Platten mit Klebeband (PERMACELL P-422 1) versiegelt und bei 4°C gelagert.

Für den indirekten ELISA wurden Verdünnungen des scFv-haltigen bakteriellen Zellkulturüberstandes nach der Induktion beziehungsweise der nativen pflanzlichen

Proteinextrakte zugegeben (100µl/Kavität) und die Platten für 2h bei 25°C inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt und dem darauffolgenden Waschschrift mit PBST erfolgte die zweistündige Inkubation mit einer 1:100-Verdünnung des 9E10-Konzentrates (*Evan et al., 1985*). Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift und die Inkubation der Platten mit dem ALP-konjugierten RAM-IgG-Antikörper (1:1000 in PBST verdünnt, 100µl/Kavität, 2h bei 25°C). Danach wurde die ELISA-Platte nochmals mit PBST gewaschen und die Substratlösung (1mg/ml pNPP in Substratpuffer, 100µl/Kavität) zugegeben. Die Platte wurde mit Klebeband versiegelt und bei 25°C bis zur Vermessung der optischen Dichte inkubiert. Die Vermessung des Signales erfolgte im Mikrotiterplattenlesegerät bei 405 nm.

Die Durchführung des indirekten kompetitiven ELISA erfolgte prinzipiell nach demselben Schema bis auf die Inkubation der scFv-haltigen Lösung in Gegenwart von freiem Antigen. Hierfür wurden jeweils 50µl/Kavität einer Lösung des freien Antigenes (BAS 490F) in PBST in der mit Kres-BSA beschichteten und mit BSA abgesättigten ELISA-Platte für 30min bei 25°C präinkubiert. Anschließend wurden jeweils 50µl/Kavität des verdünnten bakteriellen Zellkulturüberstandes bzw. des verdünnten wäßrigen pflanzlichen Proteinextraktes zugegeben und gemischt. Nach einer zehnmütigen Inkubationsdauer bei 25°C erfolgte der dreifache Waschschrift mit PBST und der Nachweis des festphasengebundenen anti-Kres scFv durch Inkubation mit dem 9E10-Antikörper, einem RAM-IgG-ALP-Konjugat und der Umsetzung des zugesetzten Enzymsubstrates pNPP (siehe oben).

3.12 Nachweis der Insertion der DNA mittels „Southern-Blot“

Die Plamid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens* wurde nach der Methode von *Birnboim & Doly (1979)* isoliert und mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen gespalten. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in 1%-igen Agarosegelen in TBE-Puffer erfolgte die Denaturierung (30min in 0,5M NaOH, 1,5M NaCl) und die Neutralisierung (45min, 1M Tris-HCl; pH 8,0; 1,5M NaCl). Anschließend wurde die DNA mittels Saugblot in 20xSSC auf Nylonmembranen transferiert (Hybond N⁺). Die Fixierung der DNA auf den Membranen wurde durch UV-Quervernetzung mit dem „UV-Stratalinker™ 2400“ der Firma Stratagene erreicht. Der Nachweis des scFv-Genes erfolgte durch Hybridisierung der Membranen mit dem „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Roche) unter Verwendung des mit Digoxigenin markierten scFv-DNA-Fragmentes nach den Angaben des Herstellers.

Die Isolation genomischer DNA aus Tabakpflanzen erfolgte in Anlehnung an eine von *Lassner et al. (1989)* beschriebene Methode. Nach der Auftrennung der gespaltenen DNA-Proben in 1%-igen Agarosegelen in Laufpuffer nach W.Weschke erfolgten die weiteren Schritte (Denaturierung, Neutralisierung, Transfer, Fixierung) wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Als Hybridisierungssonden für den Nachweis der Integration des scFv-Genes im Pflanzengenom wurden scFv-spezifische DNA-Fragmente verwendet, die mit

Hilfe des „Megaprime™ DNA labelling system Kits“ der Firma Amersham nach der Methode von *Feinberg & Vogelstein (1983)* mit α -³²P-dATP markiert wurden. Vor der Zugabe zur Hybridisierungslösung erfolgte die Trennung der markierten DNA-Probe von nicht eingebauten Nukleotiden über eine Acrylex-P30-Säule. Die Vorhybridisierung der Membranen erfolgte in „Roti-Hybri-Quick“ (Roth) Ü/N bei 65°C. Am folgenden Tag wurden die Membranen in Hybridisierungslösung („Roti-Hybri-Quick“) überführt, die die radioaktiv markierte Sonde enthielt. Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls über Nacht bei 65°C. Danach wurden die Filter viermal bei Raumtemperatur für je 15min mit 2xSSC, 0,5% SDS und dreimal für je 60min mit 1xSSC, 0,1%SDS bei 65°C gewaschen. Die Filter wurden anschließend in 0,1xSSC, 0,1%SDS gespült, in Folie eingewickelt und in einer Expositionskassette fixiert. Das Signal wurde mit einer Kodak-„Imaging-Plate“ autoradiografisch aufgezeichnet und die „Imaging Plate“ am Phosphorimager „STORM 860“ eingelesen.

3.13 Applikation von Kresoxim-methyl im Zellkulturplatten-System

Für die Applikationsexperimente wurde reines Kresoxim-methyl in Konzentrationen von 1mM bis 50mM als 1000fach-konzentrierte Stammlösung in Dimethylsulfoxid gelöst. Die Applikationslösung wurde durch 1:1000-Verdünnung dieser Kres-Stammlösungen in $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 2% Saccharose hergestellt. Für die Applikation wurden je 1ml der Applikationslösung einer Konzentration von 0 bis 50 μ M Kresoxim-methyl in 24-Well-Zellkulturplatten vorgelegt. Parallel wurden 150mg Tabaksamen der zu untersuchenden Linien in Filterpapiertüten eingewogen, mit Ethanol oberflächensterilisiert, gewaschen und anschließend äquivalente Mengen nach Wägung auf die Kavitäten der mit Kresoxim-methyl-Lösung bzw. Kontrolllösung gefüllten Platten verteilt. Die eingesetzte Menge entspricht ca. 300 Samen je Kavität der Inkubationsplatte (das Tausendkorngewicht für *N. tabacum* beträgt 80mg, *Avery 1933*). Nach einer 28tägigen Inkubationsphase der Platten bei 25°C erfolgte die Bestimmung der Frischmassen der Gesamtheit der jungen Keimlinge aus der entsprechenden Applikationslösung durch Wägung mit einer Feinwaage.

Für die Extraktion der Proteine von Tabakkeimlingen wurden ca. 600mg Keimlingsmaterial unter Zusatz von Sand und flüssigem Stickstoff in einem Mörser homogenisiert. Nach der Zugabe von 1ml 2xExtraktionspuffer zum Homogenat erfolgte eine wiederholte Vermischung. Der Rohextrakt wurde nach dem Auftauen in ein 2ml-Reaktionsgefäß transferiert, für 20min bei 4°C und 14000 RPM zentrifugiert und der Überstand mit den darin enthaltenden löslichen Proteinen abgenommen. Nach der Bestimmung der Gesamtheit der löslichen Proteine wurde eine entsprechende Menge des Extraktes (20 μ g GLP) mit der äquivalenten Menge 2xSDS-Gelladepuffer versetzt und die Proteine durch 15minütige Inkubation bei 99°C denaturiert. Anschließend erfolgte die Analyse dieser Proben im „Western-Blot“ (vgl 3.9).

4 Ergebnisse

4.1 Gewinnung und Charakterisierung der Hybridomzellkone anti-Kres-mAK

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Expression von Kresoxim-methyl bindenden Einkettenantikörperfragmenten in Tabakpflanzen zur Verbesserung der Toleranz gegenüber den phytotoxischen Eigenschaften dieses Fungizides. Da ein BAS 490F-bindendes Einkettenantikörperfragment zu Beginn der Arbeiten nicht zur Verfügung stand, mußte dieses eingehend isoliert und charakterisiert werden. Ausgangspunkt für die Isolierung der variablen leichten und schweren Kettengene zur Synthese der Sequenz eines Kresoxim-methyl-spezifischen scFv sollte eine Maus-Hybridomzelllinie sein. Deshalb war ein Grundanliegen und Teilziel der vorliegenden Arbeit die Gewinnung einer Hybridomzelllinie, deren sekretierte Antikörper spezifisch das Fungizid Kresoxim-methyl binden. Hierfür wurden Balb/C-Mäuse beginnend mit der achten Lebenswoche durch regelmäßige intraperitoneale Injektionen einer Antigenlösung immunisiert (vgl. 3.1.1). Um die Immunantwort zu verstärken, wurde das niedrigmolekulare Hapten, gekoppelt an ein höhermolekulares, immunstimulierendes Trägerprotein, dem „keyhole limpet hämocyantin“ (*Harris & Markl, 1999, 2000*), als Antigen eingesetzt. Nach mehrmaliger Antigenapplikation konnten polyklonale Seren aus den immunisierten Mäusen isoliert werden, deren Kresoxim-methyl spezifischer Antikörper-Titer durch indirekte ELISA-Methoden bestimmt werden sollte. Um die Spezifität der Serum-Antikörper für Kresoxim-methyl zu bestimmen, sollten neben Kresoxim-methyl, gekoppelt an KLH (Immunisierungsantigen) auch Kres-BSA-Konjugat sowie die reinen Trägerproteine (KLH und BSA) als immobilisierte Antigene für die Beschichtung der ELISA-Platte genutzt werden. Die Mäuse mit einem hohen Serumtiter an Kresoxim-methyl-bindenden Immunglobulinen bildeten den Ausgangspunkt für die Erzeugung von Hybridomzellen. Für die Gewinnung dieser Hybridome wurden die Milzzellen immunisierter Mäuse isoliert und mit Myelomzellen fusioniert (vgl.3.1.2.). Durch Vereinzelung und Selektion der erhaltenen Klone sollten stabile Hybridomzelllinien isoliert werden, die Antikörper gegen das Fungizid Kresoxim-methyl produzieren. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche Zellfusionsexperimente durchgeführt. Dabei kam es jedoch häufig zu einem Verlust der Eigenschaft zur Antikörpersekretion in den sekundären Hybridomzellklonen (mögliche Ursachen sind *von Peters, 1990/III* sowie *Taggart & Samlof, 1982* beschrieben worden). Im folgenden wird deshalb nur auf die Ergebnisse der erfolgreich durchgeführten Isolierung der beiden stabilen Hybridomzellklone mAK Kres 14/8C5 3/2 und mAK Kres 14/1G9 H11H9 eingegangen, die den Ausgangspunkt für die im Kapitel 4.2 beschriebene Konstruktion der anti-Kres scFv bildeten.

4.1.1 Immunisierung der Balb/C-Mäuse und Bestimmung des spezifischen Seruntiters

Für die Gewinnung der Hybridomzelllinie wurden insgesamt 20 Balb/C-Mäuse (*Potter, 1985/ und II*) über einen Zeitraum von 18 Monaten immunisiert. Für die Zellfusion waren Milzzellen von Mäusen mit einer ausgeprägten spezifischen Immunantwort erforderlich. Deshalb wurde der spezifische Antikörpertiter des nach Zentrifugation des Blutes als Überstand gewonnenen Serums im ELISA bestimmt. Das Prinzip des hierfür verwendeten indirekten ELISA ist in der Abbildung 6 dargestellt. Für die Beschichtung der ELISA-Platten wurden 100µl je Kavität einer Lösung von 10µg/ml der zu prüfenden Antigene Kresoxim-methyl-BSA-Konjugat, Kresoxim-methyl-KLH-Konjugat, BSA bzw. KLH in Beschichtungspuffer eingesetzt. Die weiteren Schritte des ELISA erfolgten wie in Abschnitt 3.1.4. für den indirekten ELISA zur Charakterisierung der Kresoxim-methyl bindenden Immunglobuline beschrieben. Als Primärantikörper wurde eine in PBST mit 1% BSA verdünnte Lösung des Mausserums unterschiedlicher Konzentration genutzt. Der Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus-IgG-ALP-Konjugat) erlaubte den spezifischen Nachweis von murinem Immunglobulin G, welches hauptsächlich bei der sekundären Immunantwort gebildet wird.

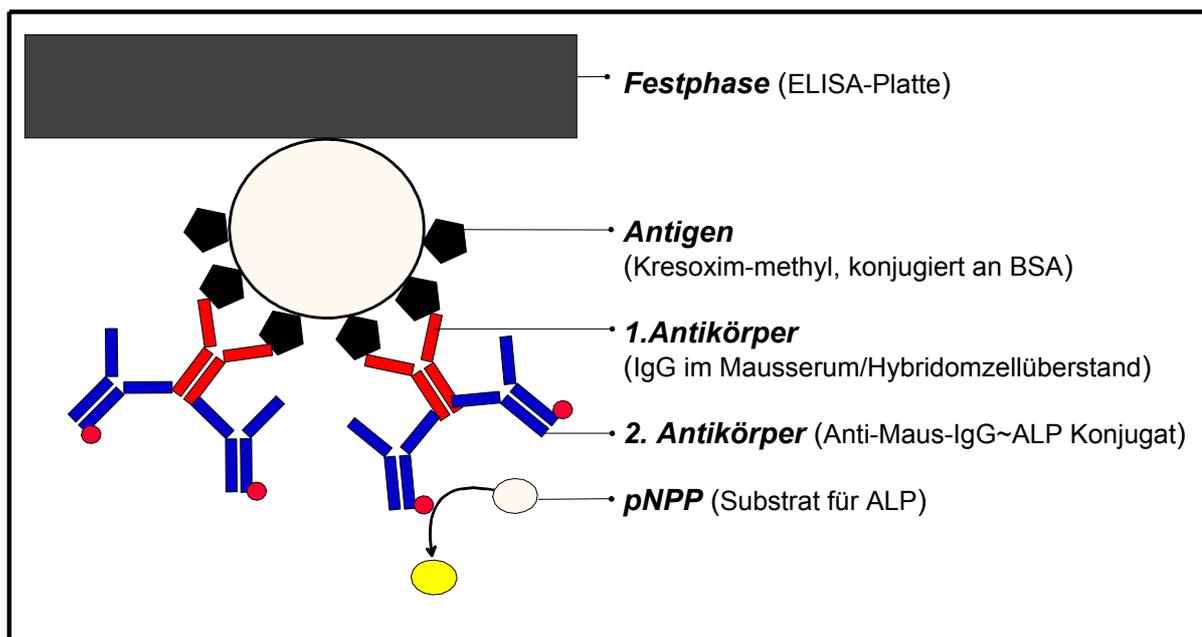


Abb.6.: Prinzip des Enzym-Immuntestes mit immobilisiertem, an BSA-konjugiertem Kresoxim-methyl als Antigen (indirekter ELISA mit Enzym-konjugiertem Sekundärantikörper). Zum Nachweis der Bindung des murinen Immunglobulin G im Serum immunisierter Tiere beziehungsweise im Hybridomzellüberstand an Kresoxim-methyl wurden die Platten mit dem Kresoxim-methyl-BSA Konjugat beschichtet und mit dem Zellkulturüberstand bzw. Serum (Maus-IgG-enthaltend) sowie anschließend einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG-ALP-Konjugat inkubiert. Der Nachweis von enzymgebundenen Anti-Maus-Immunglobulin erfolgte nach dem Umsatz des hinzugefügten Substrates pNPP durch Messung der OD_{405nm} in einem Mikrotiterplattenreader. Analog erfolgte der Immuntest kontrollweise mit den ebenfalls durch Bindung an die Festphase immobilisierten Antigenen Kres-KLH, KLH und BSA.

Wie einleitend bereits erwähnt, wurden mehrere Mäuse immunisiert und deren Milzzellen nach Bestimmung des spezifischen Antikörpertiters für eine Zellfusion mit Maus-Myelomzellen genutzt. Beispielfähig wird im nachfolgenden die Bildung einer spezifischen Immunantwort der immunisierten Maus K14, aus der stabile Hybridomzellklone isoliert werden konnten, aufgezeigt (Tabelle 1). Während im Serum von nicht immunisierten Mäusen (Normal-MS) praktisch kein IgG-Antikörpersignal aufgrund der Bindung an die eingesetzten Festphasen-gebundenen Antigene erhalten wurde, konnte im Serum der immunisierten Maus (K14-MS) ein hoher Kresoxim-methyl-spezifischer IgG-Titer nachgewiesen werden. Die im Serum der Maus K14 enthaltenen Antikörper erkennen spezifisch Kresoxim-methyl-Trägerprotein-Konjugat. Die Immunantwort gegenüber den reinen Trägerproteinen ohne Kresoxim-methyl ist vernachlässigbar gering. Der Titer ist definiert durch den Kehrwert der Serumverdünnung, die den halbmaximalen Signalwert (Substratumsatzrate) im ELISA nach einem bestimmten Zeitintervall hervorruft. Dieser lag im Falle der immunisierten Maus K14 im Bereich von 10^4 bis 10^5 (siehe Tab.1). Somit wurde durch Bestimmung des Kresoxim-methyl spezifischen Antikörpertiters mit Hilfe eines indirekten Enzymimmuntestes die erfolgreiche Immunisierung der Maus K14 nachgewiesen.

Tab.1: Ergebnisse des ELISA zur Bestimmung des IgG Antikörpertiters im Mausserum (MS) einer immunisierten (K14) und einer nicht immunisierten Maus (Normal).

Mausserum	Antigen	OD _{405nm}	OD _{405nm}	OD _{405nm}	OD _{405nm}
		(Verd.:10 ⁻²)	(Verd.:10 ⁻³)	(Verd.:10 ⁻⁴)	(Verd.:10 ⁻⁵)
K14-MS	Kres-BSA	0,569	0,508	0,226	0,03
	Kres-KLH	0,583	0,534	0,574	0,306
	BSA	0,03	0	0	0
	KLH	0,03	0	0	0
Normal-MS	Kres-BSA	0	0	0	0
	Kres-KLH	0,03	0	0	0
	BSA	0	0	0	0
	KLH	0	0	0	0

Dargestellt sind die Signale (OD_{405nm}) abzüglich des Leerwertes (PBS-Puffer anstelle von Serum als Primärantikörper eingesetzt), 30min nach der Zugabe des Substrates (pNPP).

4.1.2 Zellfusion und Selektion von mAK-Kres sezernierenden Hybridomzellklonen

Zur Gewinnung von Hybridomzellen wurde die Milz aus der immunisierten Maus K14 isoliert, die Milzzellen nach der unter 3.1.2 beschriebenen Methode präpariert und anschließend mit Myelomzellen fusioniert. Es wurden $1,5 \times 10^8$ isolierte Milzzellen und 3×10^7 vorkultivierte und entsprechend präparierte Myelomzellen für die Fusion eingesetzt. Als Myelomzellpartner wurde die Zelllinie P3x63Ag8.653 (Kearny et al., 1979) genutzt, welche die Bedingungen für einen idealen Fusionspartner (Baron, 1990), wie fehlende Eigensynthese von Immunglobulinketten und die Option zur Selektion aufgrund eines Enzymdefektes erfüllt.

Durch die von *Köhler und Milstein (1976)* entwickelte Methode der Zellfusion werden die Eigenschaften beider Zelllinien, unbegrenztes Teilungsvermögen der Krebszelle und die Fähigkeit zur Antikörperproduktion der Milzzelle, in einer sogenannten Hybridomzelle miteinander vereint (*Köhler, 1985*). Durch eine Mutation der Myelomzelllinie, welche einen Defekt im Reservestoffwechselweg der Purinsynthese betrifft (HGPRT⁻), stirbt diese Zelllinie nach der Inhibierung der Hauptstoffwechselwege der Purin- und Pyrimidinsynthese mit Aminopterin und Supplementation des Mediums mit den Vorstufen der Reservestoffwechselwege (Hypoxanthin und Thymidin) in der weiteren Zellkultur ab. Die Milzzelle als Fusionspartner trägt diesen Enzymdefekt nicht, ist also in der Lage supplementiertes Hypoxanthin und Thymidin für die Synthese der essentiellen Purine und Pyrimidine zu verwerten. Sie besitzt aber selbst nicht die Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation. Deshalb können durch Zugabe der genannten Substanzen nach der Zellfusion nur Hybridomzellen überleben, die die Eigenschaften beider Fusionspartner ineinander vereinigen (*Peters & Gieseler, 1990*).

Nach Aufnahme der Fusionsprodukte in 80ml HAT-Medium wurden die Zellen auf insgesamt 960 Kavitäten von 96-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Es wurden nur die inneren 60 Kavitäten nährzellbeschichteter Zellkulturplatten für die Aussaat der Fusionsprodukte genutzt. Die äußeren Kavitäten wurden zum Schutz vor Verdunstungsverlusten und Kontaminationen mit Wasser gefüllt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 95% rel. LF und 5% CO₂ unter Austausch des selektionierenden HAT-Mediums in drei- bis viertägigem Rhythmus. Nach der HAT-Selektion konnten insgesamt 336 Hybridomklone bonitiert werden, was einem Wachstum in 35 Prozent der Kavitäten entspricht. Nach *De Blas et al. (1983)* beträgt die zu erwartende Wahrscheinlichkeit der Monoklonalität der heranwachsenden Hybridomzellen bei dieser Wachstumsrate 80 Prozent. Die Überstände der Klone wurden in einem indirekten ELISA unter Nutzung von Kres-BSA bzw. reinem BSA als immobilisiertes Antigen (vgl. 3.1.4. Prinzip siehe Abb.6) auf den Gehalt von Kresoxim-methyl bindenden Immunglobulinen überprüft. Es wurden insgesamt 20 Hybridome identifiziert, deren Primärüberstand nach der Zellfusion Kresoxim-methyl spezifische Antikörper enthielt. Diese Primärkulturen wurden durch die Methode der limitierenden Verdünnung zur Absicherung der Monoklonalität rekloniert (vgl. 3.1.3). Nach der Bonitierung und mikroskopischen Kontrolle der Monoklonalität wurden die erhaltenen Sekundärzellklone der niedrigsten Aussaatdichte im ELISA auf den Gehalt an anti-Kres-mAK im Kulturüberstand getestet. Im Kulturüberstand von zwei reklonierten Primärklonen konnten Kres-BSA-bindende Immunglobuline ohne Kreuzreaktivität mit reinem BSA nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um die Sekundärklone der beiden primären Hybridome mAK 14/8 C5 und mAK 14/1G9. Zur statistischen Absicherung der Monoklonalität wurden die Näpfe mit Wachstum ausgezählt. Wachsen die Zellen in geringer Anzahl, dann verhält sich der Anteil von Näpfen mit Wachstum nach der Poisson-Verteilung: $f(0)=e^{-\lambda}$, wobei $f(0)$ die Fraktion von Näpfen ohne

Wachstum und λ die durchschnittliche Anzahl der Klone je Napf darstellt. Um eine hohe Wahrscheinlichkeit zu erhalten, daß das Wachstum in den Näpfen auf einzelne Klone zurückzuführen ist ($\lambda=1$), sollten mehr als 37% der Näpfe kein Wachstum zeigen (Goding, 1980). Im Reklonierungsschritt des Klones mAK 14/8 C5 konnte in 42% der Näpfe kein Wachstum beobachtet werden. Der Klon mAK 14/1G9 wurde zweimal rekloniert, dabei waren im ersten Schritt 9% und im zweiten Schritt 22% der Näpfe mit Hybridomzellen bewachsen. Dies erfüllt die genannten Kriterien für die Absicherung der Monoklonalität der beiden isolierten Hybridomzelllinien mAK 14/8C5 3/2 und mAK 14/1G9 H11H9.

4.1.3 Charakterisierung der beiden anti-Kres mAK 14/8C5 3/2 und 14/1G9 H11H9

Die Versuche zur Herstellung von funktionellen, Kresoxim-methyl spezifisch bindenden Antikörperfragmenten setzten für dieses Antigen spezifische Immunglobuline als Vorstufe voraus. Deshalb war es nötig, die funktionellen Eigenschaften der isolierten monoklonalen Antikörper zu untersuchen. Zur Charakterisierung der beiden isolierten monoklonalen Hybridomzelllinien in Bezug auf Aktivität, und Spezifität wurden die in 4.1.2 beschriebenen Linien mAK 14/8C5 3/2 und mAK 14/1G9 H11H9 in größerem Maßstab in RPMI-Medium bei 37°C, 5% CO₂ und 95% rel. LF kultiviert. Die im Zellkulturüberstand enthaltenen Immunglobuline wurden anschließend in ELISA-Experimenten untersucht. Die Bestimmung der Ig-Klasse, des Ig-Subtyps und des Leichtkettentyps der sekretierten anti-Kres-mAK im Kulturüberstand der Hybridomzelllinien mAK 14/8C5 3/2 und mAK 14/1G9 H11H9 erfolgte immunologisch nach Herstellerangaben mit dem „Maus Hybridoma Subtyping Kit“ der Firma Boehringer Mannheim (Prinzip siehe Abb.7) unter Nutzung eines Anti-Maus-Antikörpers als festphasengebundenen Antikörper zur Bindung der murinen Immunglobuline.

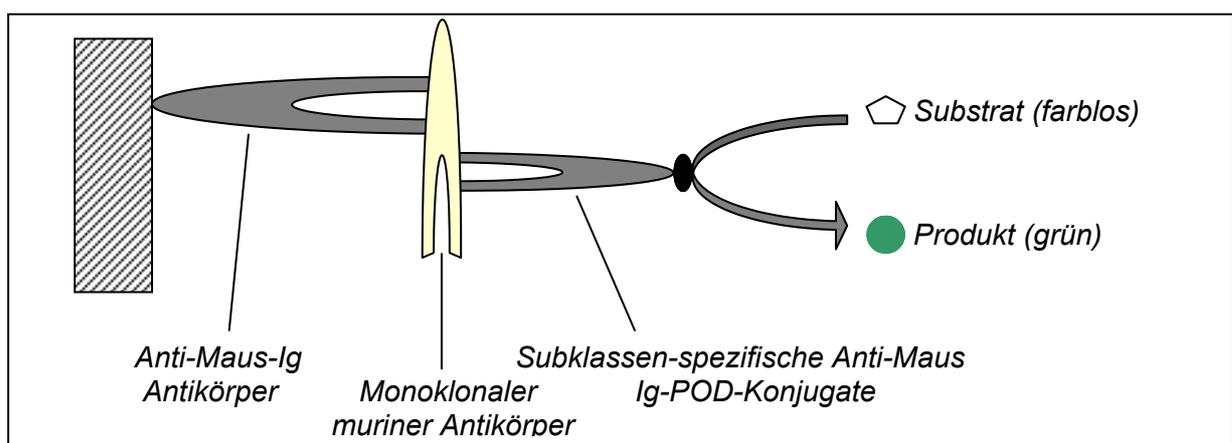


Abb.7.: Prinzip des Enzym-Immuntestes mit immobilisiertem Anti-Maus-Ig als „Wandantikörper“ (indirekter ELISA mit Enzym-konjugiertem Subklassenspezifischen Sekundärantikörpern) zum Nachweis der Ig-Klasse, -Subklasse und des Leichtkettentyps der murinen anti-Kres-Immunglobuline im Hybridomzellüberstand der Klone mAK 14/8C5 3/2 und mAK 14/1G9 H11H9. Der Nachweis von jeweils subklassenspezifischem, enzymgebundenem Anti-Maus-Immunglobulin erfolgte durch den Umsatz des hinzugefügten Substrates ABTS.

Der Umsatz des Substrates wurde durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt. Beide monoklonalen Antikörper gehören der Immunglobulin G-Klasse, Subklasse IgG1 an und besitzen leichte Immunglobulinketten des Typs κ .

Zur funktionellen Charakterisierung der beiden monoklonalen Antikörper wurden ELISA-Experimente durchgeführt. Die Untersuchung der Antigenbindungseigenschaften erfolgte in einem indirekten ELISA (vgl. 3.1.4., Prinzip siehe Abb. 6) mit Kres-BSA als immobilisiertem Antigen und einem Kaninchen-Anti-Maus-ALP-Konjugat als Sekundärantikörper. Als Primärantikörper wurden die Zellkulturüberstände von den mehrtägig kultivierten Hybridomzelllinien mAK 14/8C5 3/2 und mAK 14/1G9 H11H9 nach unterschiedlicher Verdünnung in PBST mit 1% BSA eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 8 dargestellt. Beide Klone, mAK 14/8C5 3/2 und mAK 14/1G9 H11H9, zeigten eine starke Antigenbindung an das Hapten Kresoxim-methyl. Die Bindung der anti-Kres-mAK an das BSA-gebundene Hapten konnte in einer bis zu einhunderttausendfachen Verdünnung des Überstandes der Hybridomzellkultur nachgewiesen werden. Das Kulturmedium (RPMI-Medium, Negativkontrolle) selbst zeigte hierbei erwartungsgemäß keine Reaktion im ELISA.

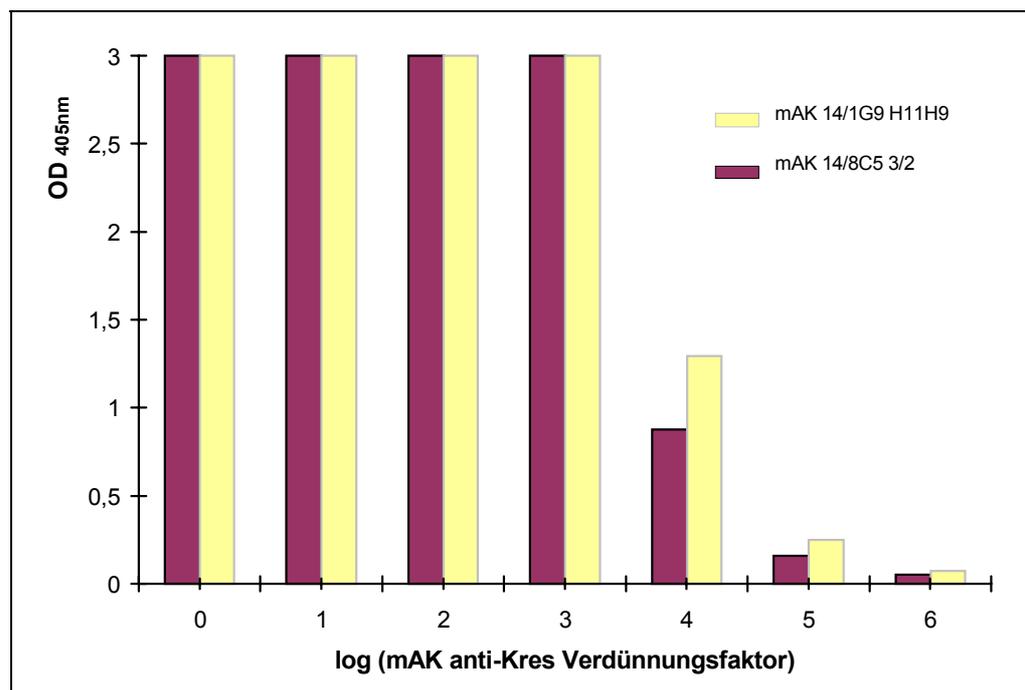


Abb.8.: Nachweis der Antigenbindungsaktivität der mAK 14/8C5 3/2 und 14/1G9 H11H9 an das Hapten Kresoxim-methyl im indirekten ELISA. Die Platten wurden mit BSA-Kresoxim-methyl-Konjugat beschichtet, mit verschiedenen Konzentrationen der Hybridomzellüberstände (anti-Kres-mAK enthaltend), und einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG-ALP-Konjugat inkubiert. Der Nachweis von enzymgebundenen Anti-Maus-Immunglobulin erfolgte durch den Umsatz des hinzugefügten Substrates pNPP. Dargestellt ist der Substratumsatz (OD_{405nm} , abzüglich Hintergrundwert) in Abhängigkeit von der logarithmischen Verdünnung des eingesetzten Hybridomzellüberstandes, der das anti-Kres-IgG enthält.

In weiteren Experimenten sollte die Spezifität der monoklonalen Antikörper für das Hapten Kresoxim-methyl überprüft werden. Hierfür wurden zunächst weitere indirekte ELISA (vgl. 3.1.4) unter Verwendung von verschiedenen immobilisierten Antigenen anstelle des BSA-Kresoxim-methyl Konjugates zur Beschichtung der ELISA-Platten durchgeführt. Dabei wurden folgende Proteine und Hapten-Konjugate als immobilisierte Antigene eingesetzt: Kresoxim-methyl-BSA (Kres-BSA), Kresoxim-methyl-KLH (Kres-KLH), BSA, KLH sowie ein anderes an KLH oder BSA gekoppeltes Hapten: Quinmerac (Quin-KLH, Quin-BSA). Als Primärantikörper wurden einhundertfach verdünnte Zellkulturüberstände der Hybridomzelllinien mAK 14/8C5 3/2 und mAK 14/1G9 H11H9 in PBST mit 1% BSA sowie entsprechend verdünntes RPMI-Medium als Negativkontrolle eingesetzt. Die spezifischen Antigenbindungseigenschaften, die im indirekten ELISA nachgewiesen wurden, sind in der Abb.9 dargestellt. Es wurde keine Kreuzreaktivität mit reinem KLH und BSA beziehungsweise Quin-KLH und Quin-BSA-Konjugat festgestellt. Die sezernierten Antikörpermoleküle der Klone mAK 14/8C5 3/2 und mAK 14/1G9 H11H9 binden selektiv an verschiedene Kresoxim-methyl-Trägerprotein-Konjugate und zeigen somit eine Spezifität für das Hapten Kresoxim-methyl.

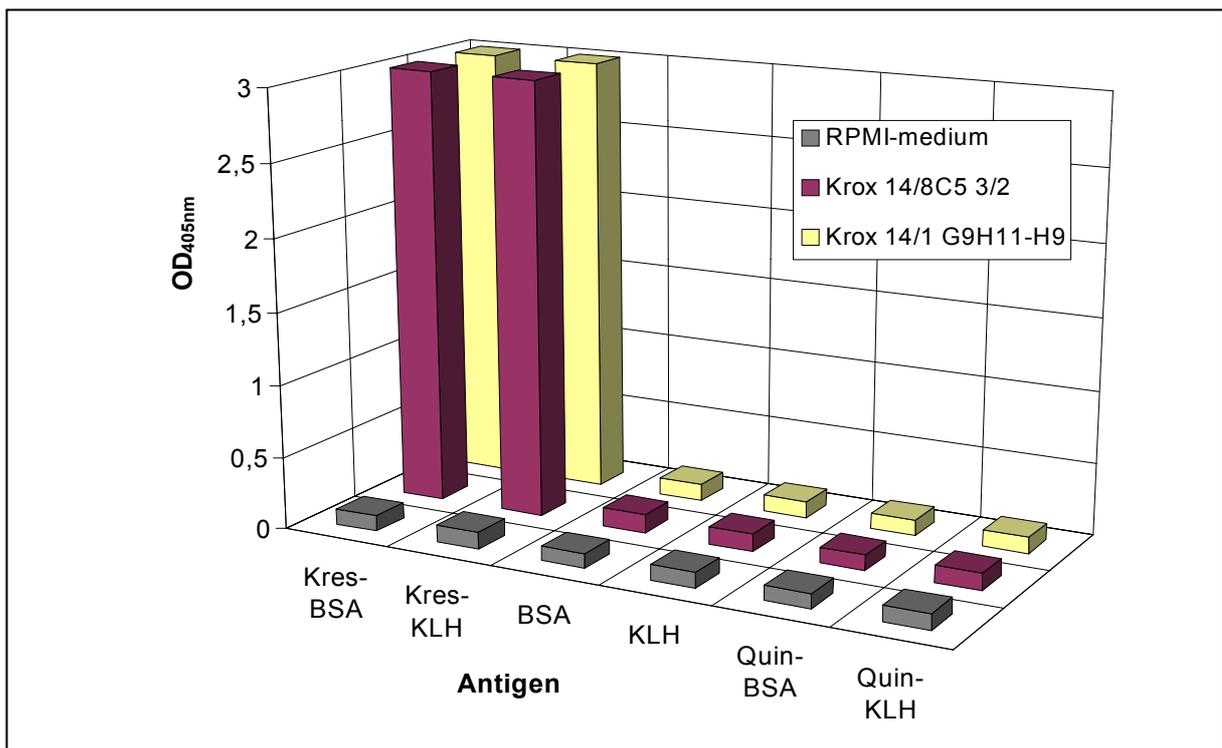


Abb.9.: Nachweis der Bindungsspezifität der mAK 14/8C5 3/2 und 14/1G9 H11H9 an das Hapten Kresoxim-methyl im indirekten ELISA. Die Platten wurden mit verschiedenen Konjugaten bzw. Trägerproteinen beschichtet, mit den 1:100 in PBST mit 1% BSA verdünnten Hybridomzellüberständen (anti-Kres-IgG enthaltend) bzw. RPMI-Medium als Negativkontrolle und nachfolgend einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~ALP-Konjugat inkubiert. Der Nachweis von enzymgekoppeltem Anti-Maus-Immunglobulin erfolgte durch den Umsatz des hinzugefügten Substrates pNPP. Dargestellt ist der Substratumsatz (OD_{405nm}) in Abhängigkeit von dem verwendeten Antigen.

In den zuvor beschriebenen indirekten ELISA-Experimenten wurde das Bindevverhalten der monoklonalen Kresoxim-methyl Antikörper an das Trägerprotein-Antigen-Konjugat geprüft. Dieses Konjugat wurde durch Bindung an die Festphase immobilisiert. Voraussetzung für die Durchführung der weiteren experimentellen Arbeiten war jedoch die Eigenschaft der Antikörper zur Bindung an freies Kresoxim-methyl. Deshalb mußte ausgeschlossen werden, daß beide Antikörper nur spezifisch an immobilisiertes Konjugat binden. Hierfür wurden kompetitive ELISA-Experimente unter Zugabe von freiem Antigen durchgeführt. Kresoxim-methyl (BAS 490F) wurde in verschiedenen Konzentrationen mit einer verdünnten Lösung der mAK 14/8C5 3/2 bzw. mAK 14/1G9 H11H9-haltigen Hybridomzellüberstände, deren optimale Verdünnung in Vorexperimenten nach den von *Djavadi-Ohanian et al. (1996)* beschriebenen Kriterien bestimmt wurde, gemischt und für 2h bei 25°C präinkubiert. Nach diesem Präinkubationsschritt erfolgte der Nachweis der verbleibenden, nicht an das freie Molekül gebundenen, Immunglobuline in einem indirekten ELISA. Durch die Bindung an das freie Antigen können weniger anti-Kres-IgG-Moleküle an die Festphase (Kres-BSA) binden und durch den enzymgekoppelten Sekundärantikörper in der Substratreaktion nachgewiesen werden, die Substratumsatzrate verringert sich. Die Abnahme des enzymatischen Umsatzes nach der Vorinkubierung mit freiem Kresoxim-methyl zeigte, daß beide monoklonalen Antikörper sowohl das an die Festphase (Mikrotiterplatte) gebundene Kresoxim-methyl-Trägerprotein-Konjugat als auch freies Kresoxim-methyl binden. Eine Verringerung des Substratumsatzes um 50 Prozent im Vergleich zur Kontrolllösung (0M BAS 490F) konnte nach Präinkubation der Antikörper mit einer 0,5µM (mAK14/1 G9H11H9) bzw. 1µM (mAK 14/8C5/3/2) Kresoxim-methyl-Lösung gemessen werden. In einem weiteren Experiment wurde der anti-Kres-IgG enthaltende und in PBST verdünnte Hybridomzellüberstand direkt auf der mit Kres-BSA beschichteten und mit Lösungen des freien Antigens vorinkubierten ELISA-Platte gemischt und inkubiert (vgl. 3.1.4.). Auch in diesem experimentellen Aufbau kam es durch Bindung an freies Antigen zu einer Abnahme der Bindung von anti-Kres-Immunglobulinmolekülen an das Kres-BSA-Konjugat und folglich zu einer verringerten Menge von gebundenem Anti-Maus-ALP-Konjugat. Der Nachweis der Kompetition durch das freie Antigen erfolgte ebenfalls durch Messung der verringerten Substratumsatzrate. Beide Klone zeigten auch in dieser experimentellen Anordnung eine Abnahme der Substratumsatzrate im ELISA aufgrund der verringerten Menge an Kres-BSA-bindenden Anti-Kres-IgG-Molekülen in Gegenwart von freiem Kresoxim-methyl im Inkubationsschritt (siehe Abb.10). Im Vergleich zur Inkubation mit Kontrolllösung (0µM) konnte hierbei eine 50%-ige Reduktion der Substratumsatzrate im letzten Schritt des ELISA bei Zugabe von ca. 10µM (mAK14/8C5 3/2) beziehungsweise 1µM (mAK14/1G9 H11H9) Kresoxim-methyl im Inkubationsschritt mit dem IgG-haltigen Hybridomzellüberstand gemessen werden. Die isolierten Hybridomzelllinien mAK 14/8C5 3/2 und mAK 14/1G9H11H9 erwiesen sich somit aufgrund der beschriebenen Untersuchungen hinsichtlich Kreuzreaktivität,

Antigenbindungsaktivität und –spezifität der sezernierten Immunglobulinmoleküle als geeignet für die Gewinnung der Gene der variablen leichten und schweren Kette zur Erzeugung von spezifisch Kresoxim-methyl bindenden Einkettenantikörperfragmenten.

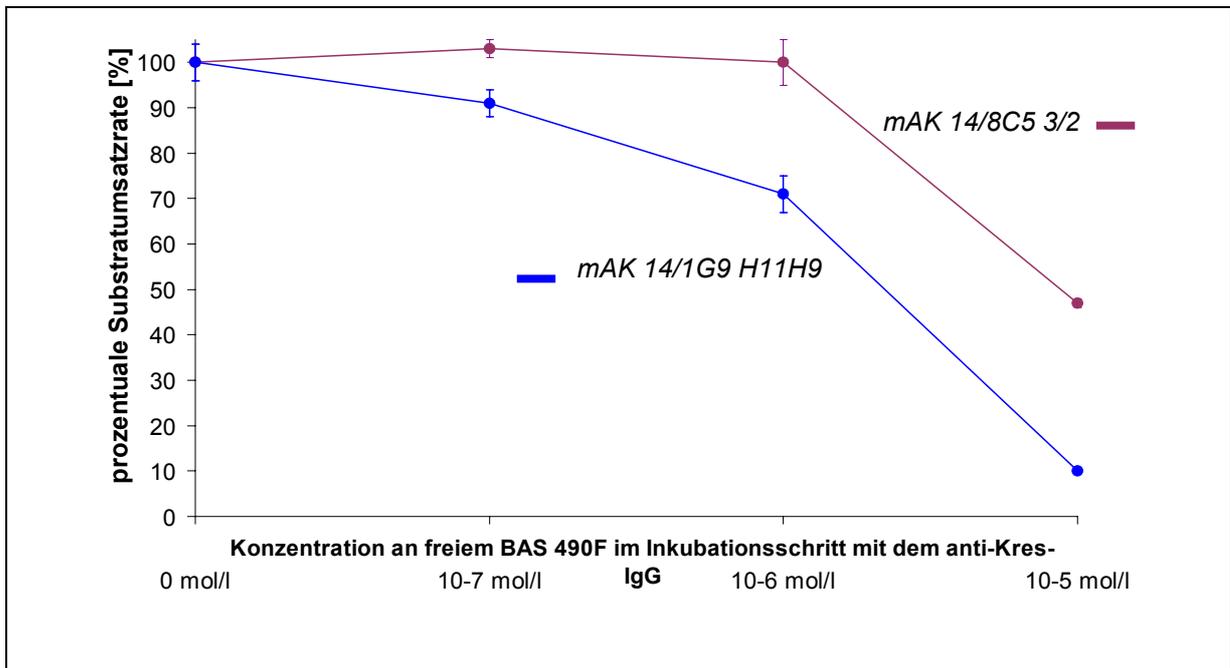


Abb.10.: Spezifität der Bindung der mAK 14/8C5 3/2 und 14/1G9 H11H9 an freies Kresoxim-methyl im indirekten Kompetitions-ELISA. Die Platten wurden mit Kresoxim-methyl-BSA-Konjugat beschichtet und mit der entsprechenden Menge an freiem BAS 490F in PBST im Gemisch mit den in PBST verdünnten Hybridomzellüberständen (anti-Kres-IgG enthaltend) inkubiert. Nach der anschließenden Inkubation mit einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~ALP-Konjugat erfolgte der Nachweis von enzymgekoppeltem Anti-Maus-Immunglobulin durch den Umsatz des hinzugefügten Substrates pNPP. Dargestellt ist die prozentuale Substratumsatzrate in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an freiem Antigen im ersten Inkubationsschritt mit anti-Kres-IgG-haltigem Überstand. Die Umsatzrate bei Abwesenheit von freiem BAS 490F wurde gleich 100% gesetzt.

4.2 Konstruktion der Einkettenantikörpergene anti-Kres scFv

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Erzeugung von transgenen Tabakpflanzen, die durch die Expression von spezifischen Einkettenantikörpern Resistenz gegenüber den phytotoxischen Effekten von Kresoxim-methyl aufgrund von Immunmodulation zeigen sollten (vgl. hierzu auch Abb. 5). Vor der Erzeugung der zur Pflanzentransformation benötigten Expressionskassetten mußten die scFv-Gene konstruiert und nach Expression im bakteriellen System funktionell charakterisiert werden. In diesem Kapitel wird die Konstruktion der Gene für spezifisch Kresoxim-methyl bindende Einkettenantikörper beschrieben. Die beiden, im vorangegangenen Kapitel beschriebenen, Hybridomzelllinien mAK 14/8 C5 3/2 und mAK 14/1G9 H11H9 stellten dabei den Ausgangspunkt zur Synthese dieser scFv-Gene dar. Das Prinzip zur Synthese der Einkettenantikörperfragmente aus der in cDNA umgeschriebenen mRNA der Hybridomzellklone ist in Abb.11 schematisch dargestellt.

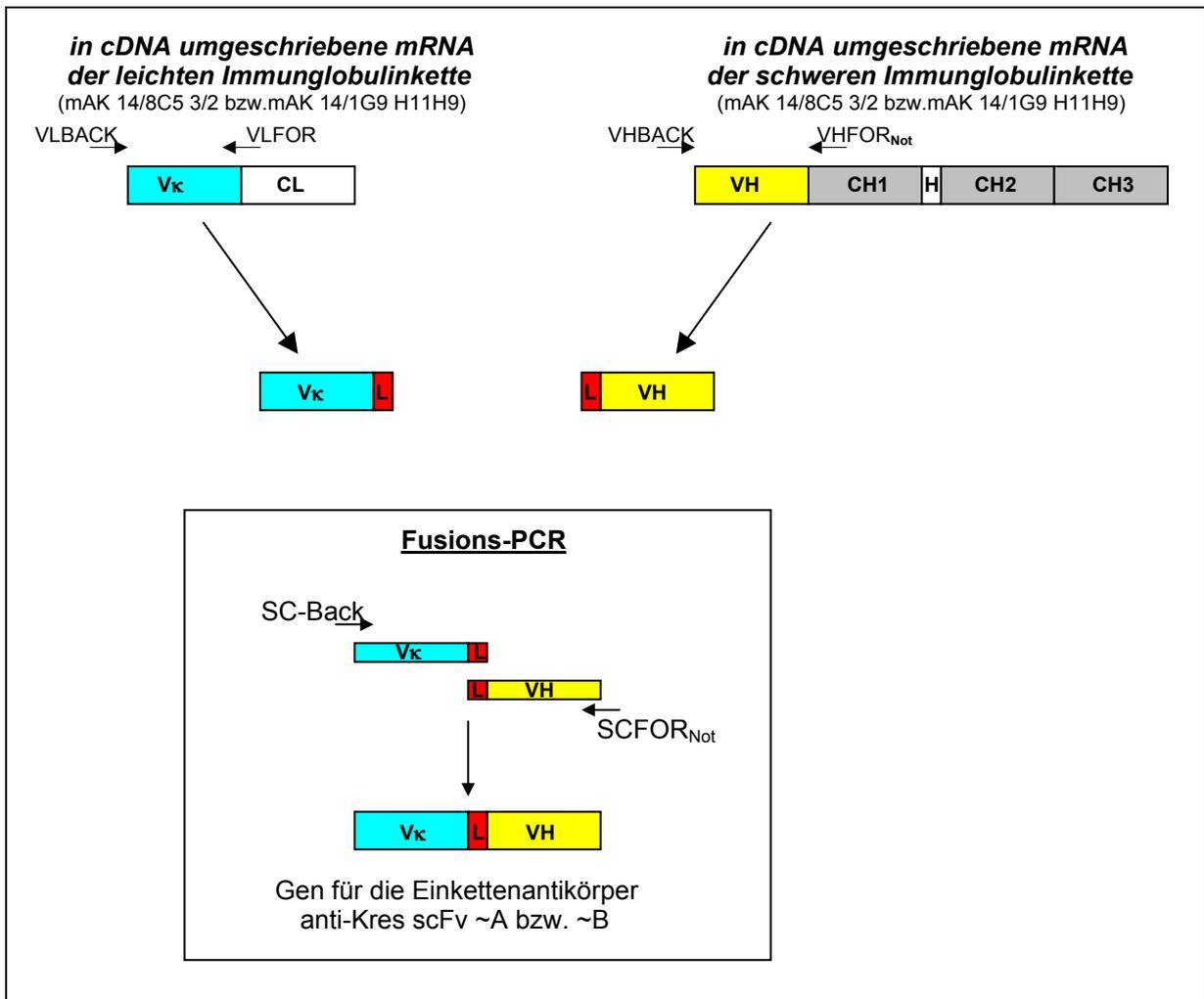


Abb.11.: Schematische Darstellung der Synthese der anti-Kres scFv-Gene (vereinfacht)
CH1-3: Gene für konstante Domänen der schweren Ketten; **CL:** Gen für konstante Domäne der leichten Kette; **VH:** Gen für variable Domäne der schweren Kette; **Vκ:** Gen für variable Domäne der leichten (κ) Kette; **L:** Linkergensequenz

4.2.1 Isolierung der Gene für die variablen Immunglobulinketten V_H und V_κ

Für die Synthese der variablen Gensegmente V_H und V_κ wurde die mRNA aus den Hybridomzellen mAK 14/8 C5 3/2 und mAK 14/1G9 H11H9 isoliert und in cDNA umgeschrieben (vgl. 3.2.1.). Anschließend erfolgte die Amplifikation der Gene für die jeweiligen V_H und V_κ -Ketten durch die Polymerase-Kettenreaktion unter Nutzung dieser cDNA als Matrize und den Primern $VHFoR_{Not}$ und $VHBACk$ für die variablen schweren Ketten und $VLFoR$ und $VLBACK$ für die variablen leichten Ketten (vgl. 3.2.2., Plückthun *et al.*, 1996). Die für die Amplifikation verwendeten Primer führten am 5'-Ende der V_H -Kettengene und am 3'-Ende der V_κ -Kettengene die Sequenz für ein Linkerpeptid ein. Weiterhin wurde am 3' Ende der V_κ -Kettengene eine NcoI/SfiI-Schnittstelle und am 3'- bzw. 5'-Ende der V_H -Kettengene eine BamHI- bzw. NotI-Schnittstelle eingeführt. Die isolierten Gene V_H und V_κ der variablen Immunglobulinketten beider monoklonaler Antikörper waren Ausgangspunkt für die Konstruktion von zwei Einkettenantikörperfragmentgenen.

4.2.2 Synthese der anti-Kres scFv durch Fusions-PCR

Für die Generierung der Einkettenantikörpergene aus den isolierten Genen der variablen Ketten der hybridomzellabgeleiteten Immunglobuline wurden die jeweiligen V_H und V_K -Gene in zwei Reaktionsansätzen vereinigt und die anti-Kres scFv nach der spontanen Zusammenlagerung der V_H und V_K -Gene im komplementären Terminalbereich der Linkersequenz ($5'$ - V_K und $3'$ - V_H) durch PCR mit den Primern SC-FOR_{Not} und SC-Back amplifiziert (vgl. 3.2.3). In den ersten Schritten der PCR-Synthese dienten die variablen Kettengene dabei selbst als Primer. Der Linkerbereich mit der endgültigen Konfiguration $(Gly_4Ser)_4$ enthielt, zur Vermeidung von inkorrekten Überlappungen während der Assemblierungsreaktion, jeweils eine endständige (Gly_4Ser) -Sequenz mit einer von den angrenzenden (Gly_4Ser) -Wiederholungen abweichenden *Kodierung* (Burmeister & Plückthun, 2001). Die gebildeten anti-Kres-scFv Gene hatten eine Größe von 783 bp, scFv-A abgeleitet vom mAK 14/8C5 3/2 und 792 bp, scFv-B: abgeleitet vom mAK 14/1 G9 H11H9. Beide synthetisierten anti-Kres scFv Gene (siehe Abb.12) hatten die Struktur V_K -L- V_H .

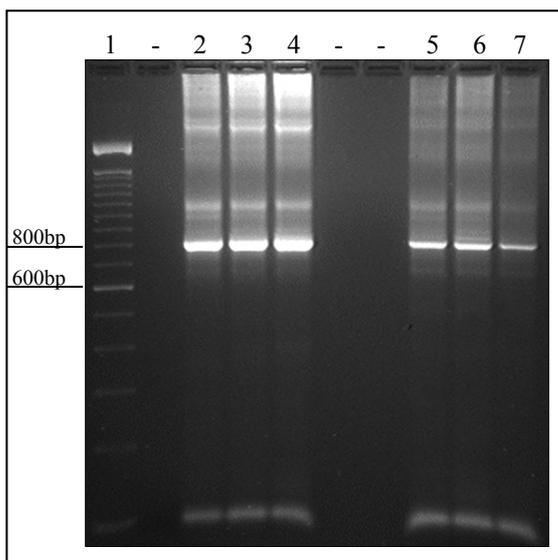


Abb.12.: Darstellung der Produkte der PCR-Reaktion zur Fusion der V_H - und V_K -Kettengene zu den scFv-Genen. Spur 1: Gibco 100bp DNA-Größenstandard, Spur 2-4: Amplikons der PCR-Reaktion zur Regeneration des vom mAK 14/8C5-3/2 abgeleiteten scFv-A, Spur 5-7, Amplikons der PCR-Reaktion zur Regeneration des vom mAK14/1G9 H11H9 abgeleiteten scFv-B. Es wurden jeweils 20ng der entsprechenden V_H - und V_K -DNA-Fragmente gemischt und in einer Assemblierungs-PCR-Reaktion zu den scFv-Genen fusioniert (vgl. 3.2.3). Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igem Agarosegel (mit EtBr) elektrophoretisch aufgetrennt und fotografisch dokumentiert. Die Größen des DNA Standards sind auf der linken Seite angegeben.

4.3 Funktionelle Charakterisierung der anti-Kres scFv im bakteriellen Expressionssystem

Nachdem die Gene für die beiden Einkettenantikörperfragmente synthetisiert wurden, sollten diese im bakteriellen System zur Expression gebracht und funktionell charakterisiert werden. Die Nutzung bakterieller Expressionssysteme ermöglicht eine schnelle und effiziente Kontrolle der funktionellen Eigenschaften der konstruierten Einkettenantikörper. Die anti-Kres scFv sollten als lösliche Proteine von den Bakterien in den periplasmatischen Raum sezerniert werden. Hierfür wurden die konstruierten scFv-Gene A und B als SfiI/NotI-Fragmente in das vom bakteriellen Expressionsvektor pHEN (Hoogenboom et al., 1991) abgeleitete Phagemid pIT1 kloniert. Dieser Vektor enthält die DNA-Sequenz des pelB-

Signalpeptides der *Erwinia cavotovora* Pectatlyase B (Lei et al., 1987). Durch Fusion mit dem scFv-Gen erfolgt die Sekretion des unter der Kontrolle des LacZ-Promotors exprimierten pelB-scFv-Fusionsproteins in den periplasmatischen Raum (und nach partieller Lyse der äußeren bakteriellen Zellmembran im Verlauf der Kultivierung in das umgebende Medium). Die hierfür konstruierten Expressionskassetten sind in Abb.13 dargestellt.

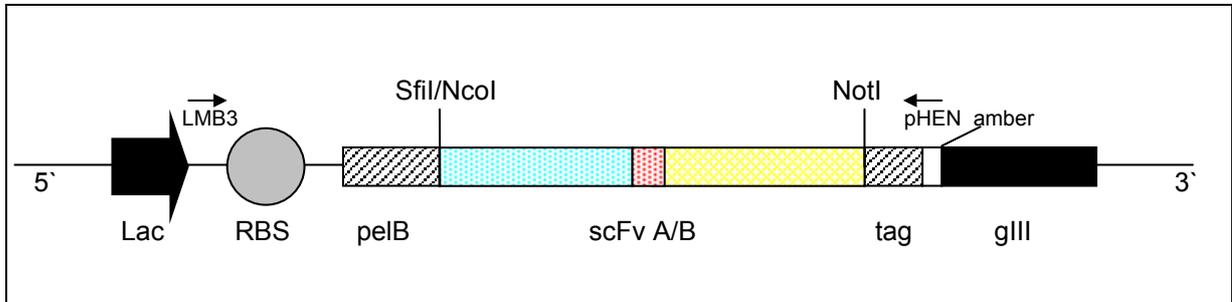


Abb.13.: Schematische Darstellung der Expressionskassetten pITA und pITB für die bakterielle Expression der anti-Kres-Einkettenantikörper als lösliche Proteine (**Lac:** induzierbarer LacZ-Promotor; **RBS:** Ribosomenbindeort (Shine Dalgarno Sequenz); **scFv A/B:** Anti-Kres-Einkettenantikörper A beziehungsweise B; **pelB:** bakterielle Signalpeptidsequenz, **tag:** c-myc-tag; **gIII:** kleines Phagenhüllprotein; **LMB3** und **pHEN:** komplementäre Sequenzbereiche für die Bindung der entsprechenden Sequenzierungsprimer; **amber:** Stoppkodon UAG)

Die DNA der beiden erhaltenen Vektoren pITA und pITB wurde zunächst in *E.coli*-Zellen des Stammes TG1 transformiert und nach Replikation und Isolation der Plasmid-DNA in *E.coli*-Zellen des Stammes HB2151 transformiert. Der Vektor pIT erlaubt bei Expression in *E.coli*-Stämmen mit einer Suppressormutation (supE), die zum Überlesen des Amber-Stoppkodon UAG führt, eine Fusion des translatierten scFv mit dem kleinen Hüllprotein gIII und der Sekretion dieses Fusionsproteins in den periplasmatischen Raum der Bakterienzelle. Bei Infektion der Bakterien mit Helferphagen wird das scFv-gIII-Fusionsprotein in Phagen inkorporiert, die scFv-Proteindomäne nach der Generation der Phagenpartikel auf der Oberfläche des Phagen exponiert und somit für Phagen-Display-Methoden nutzbar. Für die Expression als lösliches Antikörperfragment ist es jedoch erforderlich, daß scFv ohne das gIII-Protein zu exprimieren. Dies ist durch die Nutzung des zwischen scFv-Sequenz und gIII-Proteinsequenz liegenden Stoppkodons UAG möglich. Der *E.coli*-Stamm HB2151 besitzt keine Suppressormutation und erkennt das Stoppkodon am Ende der scFv-Sequenz. Dies führt zum Abbruch der Translation am Amber-Kodon und damit zur Synthese eines löslichen scFv-Fragmentes und dessen Sekretion in den periplasmatischen Raum der Bakterienzelle (Pope et al., 1996). Da der LacZ-Promotor auch im nicht induzierten Zustand bei Abwesenheit des synthetischen Induktors IPTG eine leichte Expressionsaktivität zeigt und somit Antikörperfragmente, die für die Bakterienzelle toxisch sein können, synthetisiert werden, wurden die Bakterien unter Zugabe von Glukose angezogen (De Bellis & Schwartz, 1990). Der Zusatz von Glukose zu Beginn der Kultivierung führt über das Katabolit-

Repressionssystem zu einer Hemmung der Aktivität des LacZ-Promotors (*Knippers, 1995*). Zum Zeitpunkt der Zugabe des Induktors IPTG, welcher die Expression der scFv-Gene induzierte, war die im Medium enthaltene Glukose bereits durch die Bakterien metabolisiert worden. Durch entsprechend gewählte Kultivierungsbedingungen während der Induktionsphase kam es zur teilweisen Zerstörung der Zellwand mit simultaner Freisetzung der im periplasmatischen Raum der Bakterienzelle akkumulierten scFv-Proteine in das Kulturmedium. Die Einkettenantikörper-haltigen bakteriellen Kulturüberstände wurden nachfolgend für weitere Untersuchungen bezüglich des Expressionsniveaus und der funktionellen Charakterisierung der exprimierten scFv-Proteine genutzt. Zum Nachweis der gebildeten Antikörperfragmente wurde das am C-terminalen Ende des scFv-Proteins fusionierte *c-myc*-tag-Peptid (*Munro & Pelham, 1986*) genutzt. Der spezifisch gegen dieses Epitop gerichtete murine Antikörper 9E10 (*Evan et al., 1985*) erlaubt in Verbindung mit enzymgekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörpern den immunologischen Nachweis des korrekt exprimierten scFv-*c-myc*-tag Proteins. Es wurden mehrere HB2151-Klone von pITA und pITB erzeugt und der scFv-haltige bakterielle Überstand nach der Induktion mit IPTG im „Western-blot“ und in ELISA-Experimenten überprüft. Insgesamt konnte die korrekte Expression und Funktionalität dreier vom mAK 14/8C5 3/2 abgeleiteten anti-Kres scFvA (A3, A6 und A9), und zweier vom mAK14/1G9 H11H9 abgeleiteten anti-Kres scFv-B (B3 und B8) Klone immunologisch nachgewiesen werden. Sequenzierungsdaten ergaben identische Einkettenantikörpersequenzen der A-Klone beziehungsweise der B-Klone untereinander, sodaß für die weiteren Experimente nur jeweils ein Klon verwendet wurde (A6 und B8).

4.3.1 Nachweis der Funktionalität der anti-Kres scFv in ELISA-Experimenten

Die Expression der von den monoklonalen Antikörpern mAK 14/8C5 3/2 und mAK 14/1G9 H11H9 abgeleiteten scFv-Proteine im bakteriellen System hatte die funktionelle Charakterisierung der Antigenbindungseigenschaften zum Ziel. Durch die Expression im bakteriellen System ist eine relativ schnelle Prüfung der Eigenschaften der Einkettenantikörperfragmente möglich. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Expression Kresoxim-methyl bindender Einkettenantikörperfragmente im pflanzlichen Gewebe zur Erzielung einer verbesserten Toleranz gegenüber diesem Fungizid. Da die Zeitspanne von der Transformation bis zur Proteincharakterisierung bei Expression im pflanzlichen System in der Regel fünf bis zehn Monate beträgt (*Little et al., 2000*), ist die Charakterisierung im bakteriellen System eine wesentlich effektivere Möglichkeit zur Prüfung der Eigenschaften des rekombinanten Proteins. Die Antigenbindungseigenschaften der anti-Kres scFv sollten in dafür entwickelten indirekten und indirekten kompetitiven ELISA-Experimenten mit immobilisiertem Kres-BSA-Konjugat überprüft werden (Prinzip siehe Abb.14). Hierfür wurden die HB2151-Klone pITA6 (scFvA) und pITB8 (scFvB)

herangezogen und die scFv-haltigen Überstände der Bakterien nach der IPTG-Induktion genutzt. Als Negativkontrolle wurde bakterieller Überstand eines mit dem Vektor pIT transformierten und ebenfalls induzierten HB2151-Klones verwendet. Neben der Bindung an Kresoxim-methyl-BSA Konjugat wurden die im bakteriellen Überstand enthaltenen Einkettenantikörperfragmente auf Kreuzreaktivität mit reinem BSA getestet.

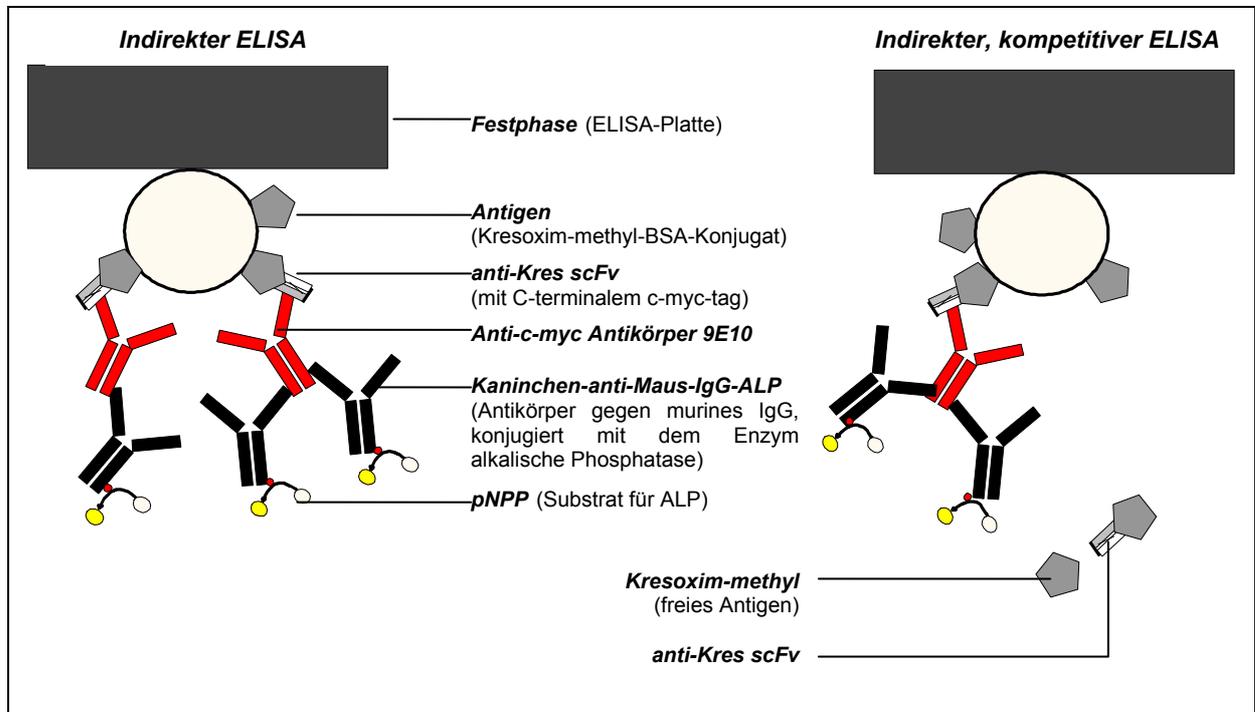


Abb.14.: Indirekter ELISA (links) und indirekter kompetitiver ELISA (rechts) zum Nachweis der Bindung der bakteriell exprimierten anti-Kres-Einkettenantikörper an Kresoxim-methyl. Die Platten wurden mit Kresoxim-methyl-BSA-Konjugat beschichtet, mit dem bakteriellen Überstand (anti-Kres scFv enthaltend), dem c-myc-Antikörper 9E10 und einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG-ALP-Konjugat inkubiert. Der Nachweis von enzymgekoppeltem Anti-Maus-Immunglobulin erfolgte durch Messung des pNPP-Substratumsatzes als ΔOD_{405nm} in einem Mikrotiterplattenreader. Für den kompetitiven ELISA wurde der mit PBST verdünnte, scFv-enthaltende bakterielle Überstand mit einer Lösung von freiem Kresoxim-methyl inkubiert. Dies resultiert in einer Inhibierung der Bindung des anti-Kres scFv an immobilisiertes Kres-BSA-Konjugat und folglich in einer verringerten Substratumsatzrate.

Die scFv-Proteine beider untersuchter Klone zeigten eine sehr starke spezifische Bindung an das Hapten Kresoxim-methyl. Die Einkettenantikörper anti-Kres scFvA6 und anti-Kres scFvB8 waren auch nach Verdünnung des bakteriellen Überstandes in PBST mit 1% BSA nachweisbar und zeigten keine Bindung an das Trägerprotein BSA. Die Ergebnisse des indirekten ELISA zum Nachweis der Bindung der anti-Kres scFv an Kres-BSA-Konjugat sind in Abb.15 dargestellt. Ein spezifisches Signal konnte in einer bis zu eintausendfachen Verdünnung der bakteriellen Kulturüberstände von pITA6 und pITB8 nach Induktion mit IPTG nachgewiesen werden (dies entspricht einer Menge von etwa 0,2ng bis 0,5ng scFv-Protein). Untersuchungen verschiedener Verdünnungen der bakteriellen Überstände ergaben eine höhere spezifische Bindungsaktivität des scFvB8 im Vergleich mit dem scFvA6 an das Kres-

BSA Konjugat. Trotz äquivalenter Menge an scFv-Protein im bakteriellen Überstand zeigte der Überstand des Klonen pITB8 nach Induktion einen höheren spezifischen ELISA-Signalwert ($\Delta OD_{405nm}/ng_{scFv}$). Unter identischen Bedingungen ergab das scFvB8 einen um den Faktor 10 erhöhten spezifischen ELISA-Signalwert ($\Delta OD_{405nm}/ng_{scFv}$). Da diese ELISA-Signalwerte neben der eigentlichen Bindungsaktivität auch den Anteil an aktivem Antikörperprotein am Gesamt-AK-Gehalt widerspiegeln (McGregor et al., 1994), und dieser Anteil individuell variieren kann, sollte die Spezifität und Aktivität beider anti-Kres-Einkettenantikörper im indirekten kompetitiven ELISA überprüft werden.

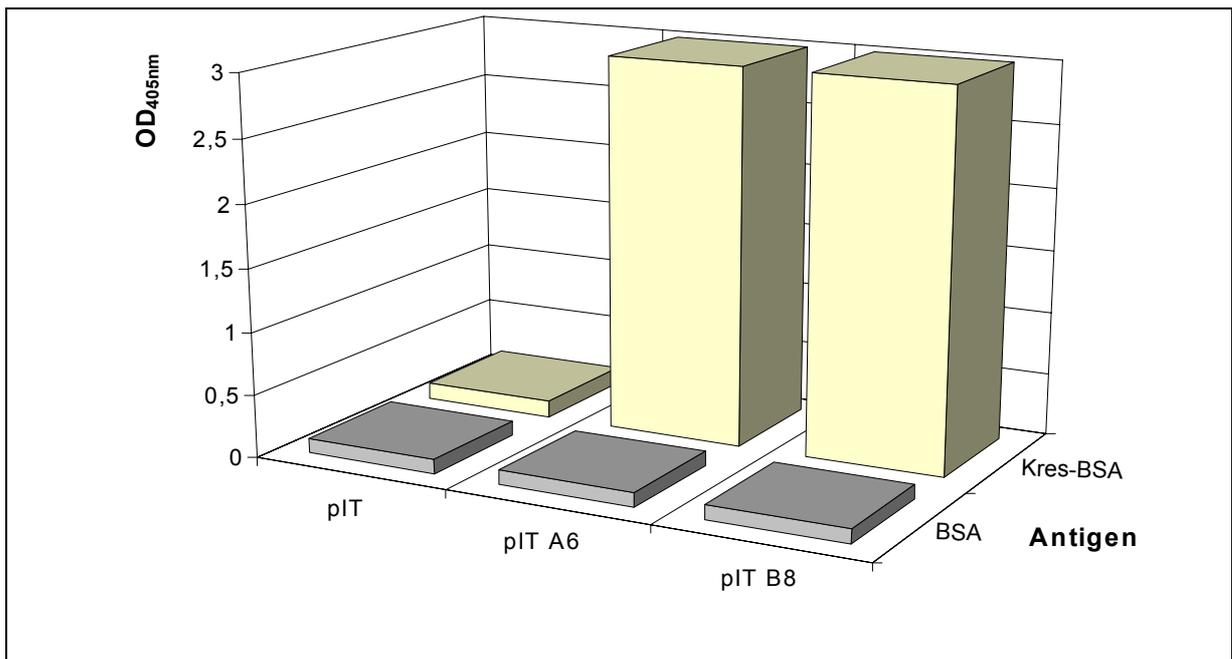


Abb.15.: Spezifität der Bindung der anti-Kres scFvA6 (abgeleitet vom mAK14/8C5 3/2) und scFvB8 (abgeleitet vom mAK 14/1G9 H11H9) an das Hapten Kresoxim-methyl im indirekten ELISA. Die Platten wurden mit Kres-BSA-Konjugat bzw. reinem BSA-Trägerprotein beschichtet, mit den 1:10 in PBS-T mit 1% BSA verdünnten bakteriellen Kulturüberständen nach der Induktion (anti-Kres scFv enthaltend, und pIT1-Kulturüberstand als Negativkontrolle ohne scFv), dem c-myc-Antikörper 9E10 und einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~ALP-Konjugat inkubiert. Der Nachweis von enzymgekoppeltem Anti-Maus-Immunglobulin erfolgte durch den Umsatz des hinzugefügten Substrates pNPP. Dargestellt ist der Substratumsatz (OD_{405nm}) in Abhängigkeit von dem verwendeten Antigen.

Für den indirekten kompetitiven ELISA wurde der verdünnte anti-Kres scFv-haltige bakterielle Kulturüberstand von pITA6 bzw. pITB8 direkt auf der mit Kres-BSA beschichteten und mit Lösungen des freien Antigens vorinkubierten ELISA-Platte gemischt und inkubiert (vgl.3.11). Durch die Bindung des scFv-Proteins an das freie Antigen (Prinzip siehe Abb. 14) kam es zu einer Abnahme der für die Bindung an das immobilisierte Kres-BSA-Konjugat verfügbaren scFv-Moleküle und damit zu einer verringerten Menge von gebundenem 9E10-Antikörper und Kaninchen-Anti-Maus-IgG~ALP-Konjugat. Der Nachweis der Kompetition durch das freie Antigen erfolgte durch Messung der hieraus resultierenden Verringerung der Umsatzrate des zugesetzten Substrates pNPP (siehe Abb.16).

Durch die Abnahme der Substratumsatzrate im kompetitiven ELISA konnte die Fähigkeit zur Bindung von freiem Antigen bei beiden anti-Kres scFv nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, daß der scFv-Klon B8 eine höhere Bindungsaffinität zum freien Antigen hat. Die Zugabe von 1 μ M Kresoxim-methyl während des ersten Inkubationsschrittes mit dem scFv-B8-enthaltenden bakteriellen Induktionsüberstand führte zu einer 50%igen Reduzierung des enzymatischen Umsatzes im letzten Reaktionsschritt des ELISA im Vergleich zur Inkubation mit PBST (0 μ M). Der scFv-Klon A6 hingegen zeigte diese 50%ige Reduktion des enzymatischen Substratumsatzes erst bei Gegenwart einer Konzentration von 10 μ M des freien Antigens im Inkubationsschritt mit dem scFv-enthaltenden bakteriellen Überstand. In beiden Fällen betrug die mittels „Western-Blot“ bestimmte Konzentration der eingesetzten scFv \sim 10nM. Das scFv-KresB8 besitzt somit im Vergleich zum scFv-KresA6 eine um den Faktor 10 verbesserte Antigenbindefähigkeit für Kresoxim-methyl. Beide konstruierten und im bakteriellen Expressionssystem charakterisierten anti-Kres scFv-Gene A6 und B8 erwiesen sich aufgrund der beschriebenen Untersuchungen hinsichtlich Antigenbindungsaktivität und –spezifität als geeignet für die Expression im pflanzlichen Organismus zur Erzeugung von immunmodulationsbedingter Toleranz gegen die phytotoxischen Eigenschaften des Fungizides Kresoxim-methyl. Die anti-Kres scFv A6 bzw. B8 besitzen ähnliche Antigenbindungseigenschaften wie die parentalen mAK14/8C5 3/2 bzw. mAK14/1G9 H11H9.

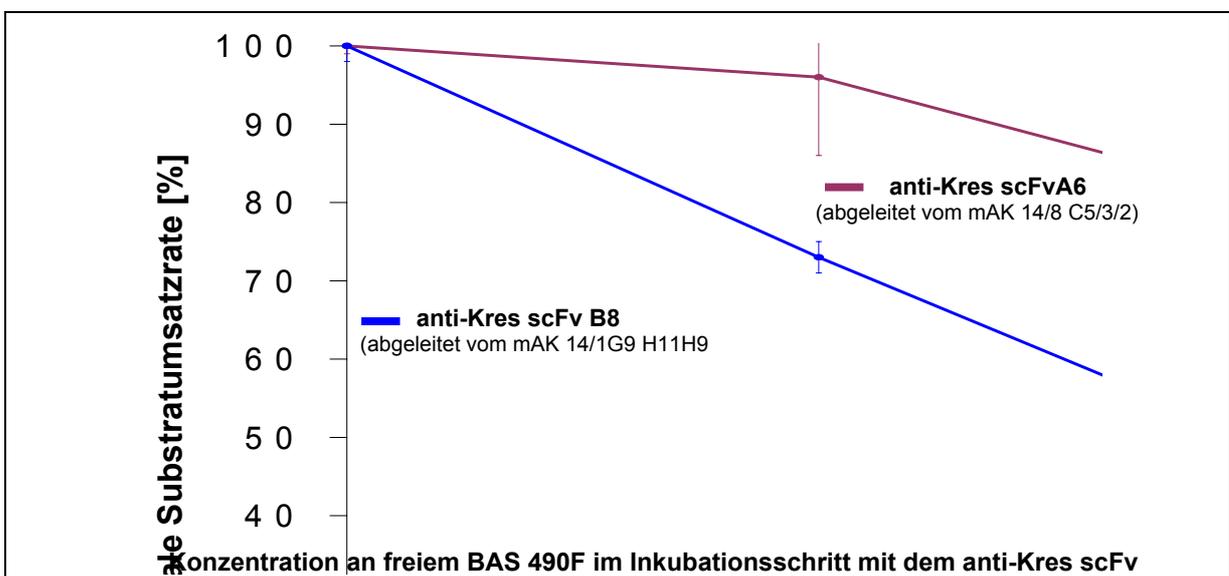


Abb.16.: Nachweis der Bindung der bakteriell exprimierten anti-Kres Einkettenantikörper A6 und B8 an freies Kresoxim-methyl im indirekten Kompetitions-ELISA. Die Platten wurden mit Kres-BSA-Konjugat beschichtet, mit der entsprechenden Menge an freiem BAS 490F in PBST im Gemisch mit den in PBST verdünnten bakteriellen Kulturüberständen der Klone pITA6 und pITB8 (anti-Kres scFv enthaltend), und nachfolgend mit dem c-myc-Antikörper 9E10 und einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~ALP-Konjugat inkubiert. Der Nachweis von enzymgekoppeltem Konjugat erfolgte durch den Umsatz des hinzugefügten Substrates pNPP. Dargestellt ist der Substratumsatz in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an freiem Kresoxim-methyl im ersten Inkubationsschritt mit scFv-haltigem Überstand. Die Umsatzrate bei Abwesenheit von BAS 490F (ΔOD_{405nm}) wurde 100% gesetzt.

4.3.2 Nachweis der bakteriell exprimierten anti-Kres-scFv im „Western-blot“

Um den Gehalt an den entsprechenden Einkettenantikörpern in den für die ELISA-Experimente eingesetzten Kulturüberständen zu bestimmen, wurden die bakteriellen Überstände nach der Kultivierung und Induktion mit IPTG mit Hilfe der „Western-Blot“-Methode analysiert. Hierfür wurden die in den Überständen der Klone pIT-A6 und pIT-B8 enthaltenen Proteine in einem 12,5%-igem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (vgl. 3.4. und 3.9). Nach dem immunologischen Nachweis des *c-myc*-tags am C-Terminus des Einkettenantikörpers mit Hilfe des *c-myc*-Antikörpers 9E10, des Kaninchen-Anti-Maus-IgG~POD-Konjugates und des ECL-Kits, konnte mit dem TINA-Programm durch Vergleich der Signalstärken die Menge des scFv's bestimmt werden (vgl.3.9.). Der scFv-Gehalt wurde in Bezugnahme auf die, auf das Gel aufgetragene, Volumenmenge des Überstandes berechnet (mg scFv je Liter Überstand). Wie in Abbildung 17 (Pfeil) ersichtlich, wurden die scFv-Fragmente mit einer Größe von ca. 28kDa in vergleichbaren Mengen von beiden Klonen im Medium angereichert. Bei dem Klon pITA6 konnten 8,5mg/l und bei dem Klon pITB8 14,5mg/l [mg scFv-Protein je Liter Kulturüberstand] nach einer 20stündigen Induktionsphase nachgewiesen werden. Im Kulturüberstand des bakteriellen Klones pIT1 in *E.coli*-HB2151 wurde demgegenüber erwartungsgemäß kein scFv-*c-myc*-tag Protein nachgewiesen werden.

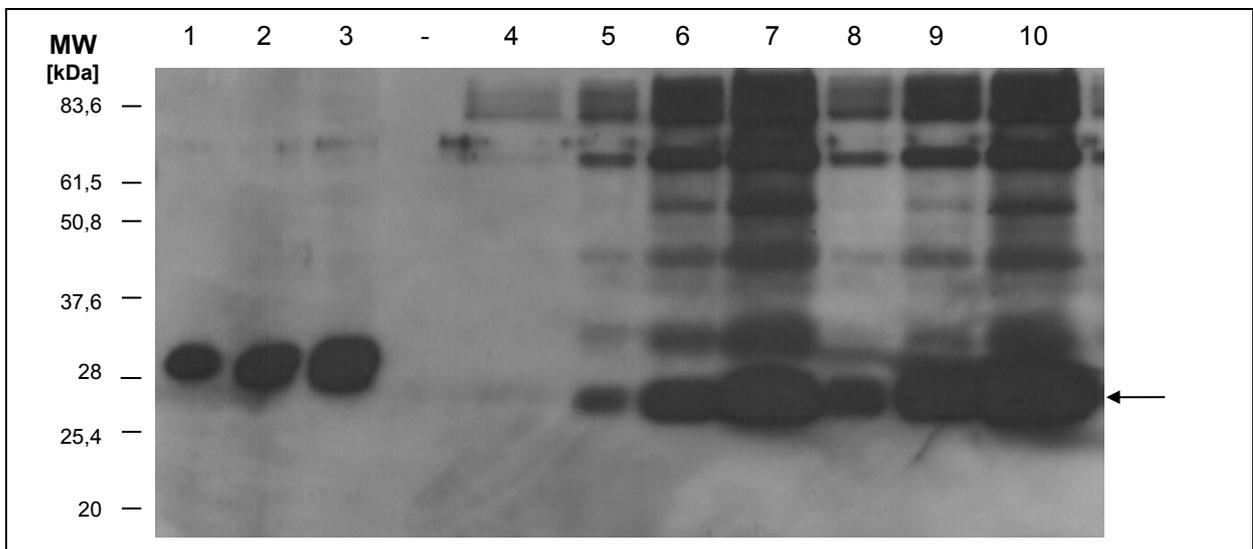


Abb.17.: „Western-Blot“-Analysen der bakteriell exprimierten anti-Kres scFv-Gene A6 und B8. Verschiedene Volumina des Kulturüberstandes (KÜ) der induzierten Klone pITA6, pITB8 und pIT1 in *E.coli* HB2151 wurden in einem 12,5%-igem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und das enthaltene scFv-*c-myc*-tag-Protein immunologisch mit dem 9E10-Antikörper, einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~POD-Konjugat und dem ECL-Kit nachgewiesen. Spur 1-3: Positivkontrolle (bekannte Menge eines anti-ABA-scFv) 1: 25ng, 2: 50ng, 3: 100ng; Spur 4: 50µl KÜ-pIT1 (Negativkontrolle); Spur 5-7 KÜ-pITA6, 5: 2µl, 6: 10µl, 7: 50µl; Spur 8-10 KÜ-pITB8, 8: 2µl, 9: 10µl, 10: 50µl. Auf der linken Seite sind die Größen des Protein-Molekulargewichts-Standards dargestellt.

4.4 Sequenzen der anti-Kres Einkettenantikörpergene A6 und B8

Neben der funktionellen Charakterisierung der beiden im bakteriellen System exprimierten Kresoxim-methyl-bindenden Einkettenantikörper scFvA6 und scFvB8 sollte die Sequenz beider scFv-Gene analysiert werden. Hierzu wurde die DNA der scFv-Gene in den Vektoren pITA6 und pITB8 unter Nutzung der fluoreszenzmarkierten Primer LMB3 und pHEN sequenziert (vgl. Abb.13). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte computergestützt mit Hilfe von Internetsequenzdatenbanken und den Programmen Vector-NTI und Lasergene. Die Nukleotidsequenzen beider anti-Kres scFv-Klone sind in den Abb.18 und 19 dargestellt.

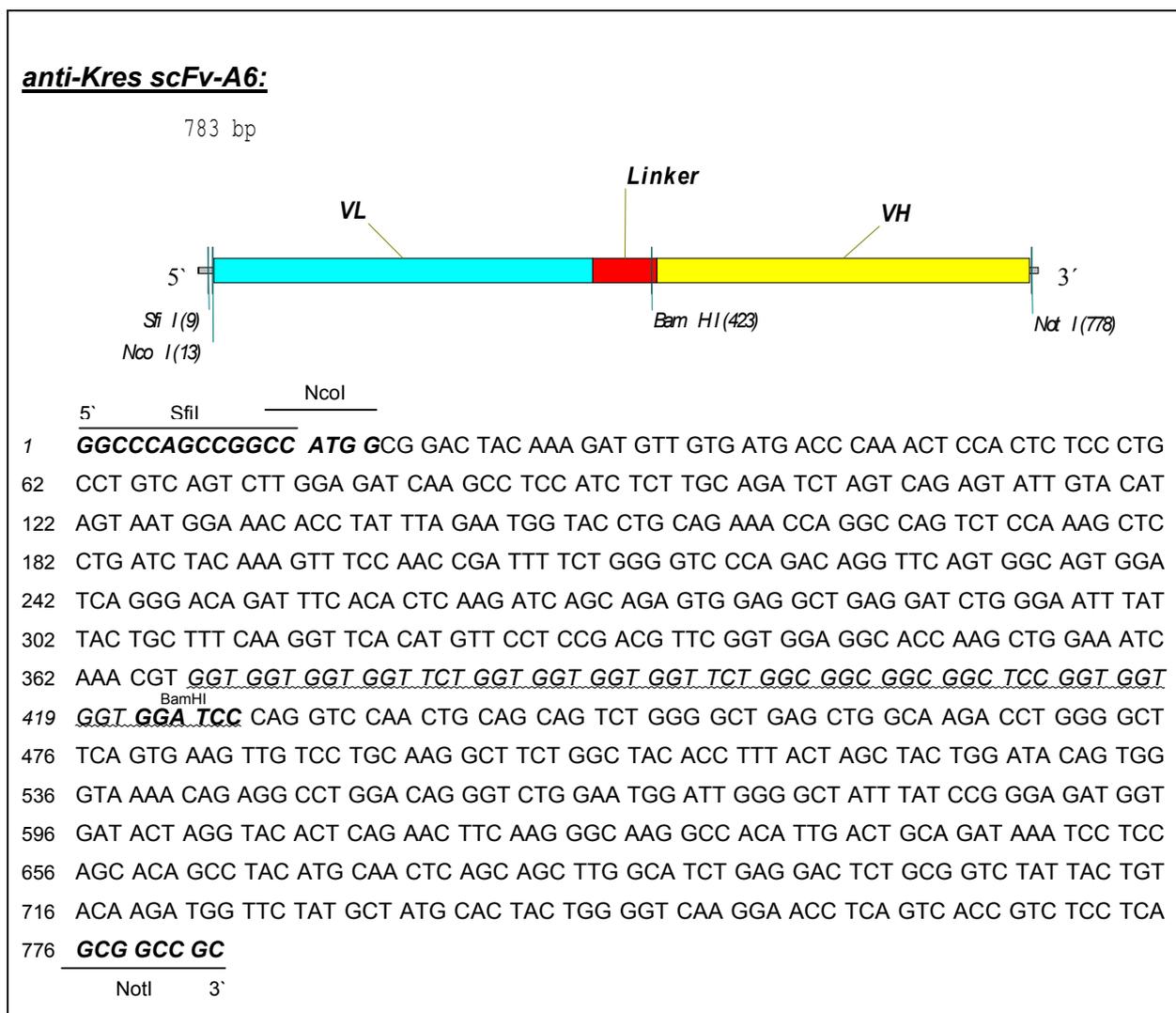


Abb.18.: Nukleotidsequenz des Einkettenantikörpers anti-Kres scFvA6. Dargestellt ist die Sequenz des nichtkodierenden DNA-Stranges als Trinukleotidabfolge im korrekten Leseraster des abgeleiteten scFv-Proteins nach Sequenzierung aus dem Vektor pITA6. Die wichtigsten Restriktionsschnittorte (SfiI, NcoI, BamHI, NotI) wurden durch Fettdruck hervorgehoben. Der Linkerbereich ist durch gewellte Unterstreichung gekennzeichnet. Schematische Darstellung des scFv-Genes oben: **VH:** Gen für die variable Domäne der schweren Kette; **VL:** Gen für die variable Domäne der leichten (κ)-Kette; **Linker:** Linkergensequenz.

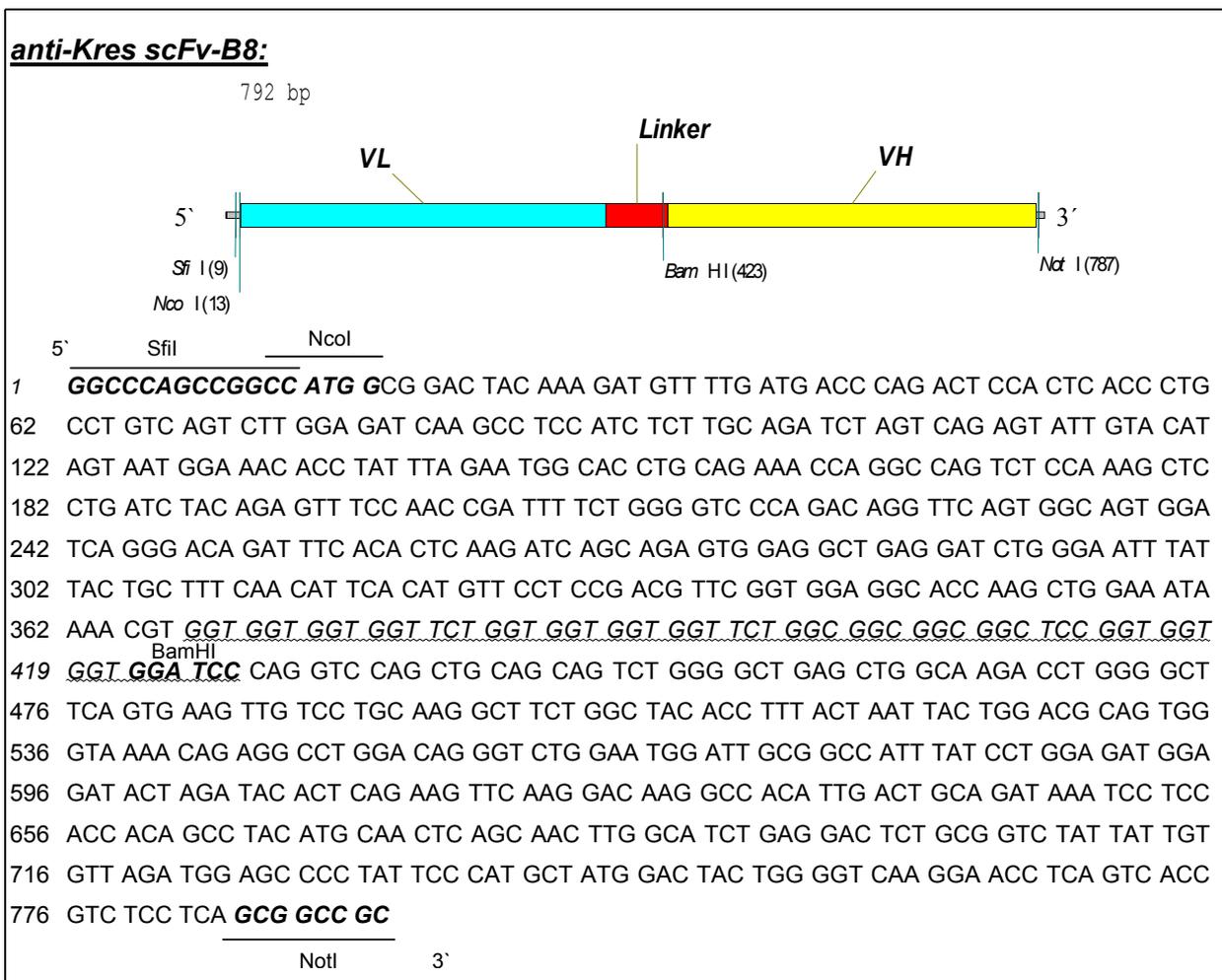


Abb.19.: Nukleotidsequenz des Einkettenantikörpers anti-Kres scFvB8. Dargestellt ist die Sequenz des nichtkodierenden DNA-Stranges als Trinukleotidabfolge im korrekten Leseraster des abgeleiteten scFv-Proteins nach Sequenzierung aus dem Vektor pITB8. Die wichtigsten Restriktionsschnittorte (SfiI, NcoI, BamHI, NotI) wurden durch Fettdruck hervorgehoben. Der Linkerbereich ist durch wellige Unterstreichung gekennzeichnet. Schematische Darstellung des scFv-Genes oben: **VH**: Gen für die variable Domäne der schweren Kette; **VL**: Gen für die variable Domäne der leichten (κ)-Kette; **Linker**: Linkergensequenz.

Die Sequenzanalyse in Internetdatenbanken bestätigte, daß es sich bei den synthetisierten Gensequenzen um murine Immunglobulingene handelte. Die DNA-Sequenzen der beiden konstruierten scFv-Gene wurde in die entsprechende Primärstruktur der Proteine abgeleitet. Der computergestützte Vergleich beider anti-Kres-VH bzw. V κ -Sequenzen mit bereits charakterisierten Immunglobulingensequenzen unter Nutzung der Kabat-Datenbank (<http://immuno.bme.nwu.edu/subgroup.html>) ergab, daß beide variablen leichten Regionen der Untergruppe II der Maus-Ig- κ -Ketten angehören und die schweren variablen Immunglobulinregionen der Untergruppe IIA zuzuordnen sind. Die Bestimmung der Positionen der hypervariablen Bereiche und der Gerüstregionen der variablen Domäne der leichten und schweren Antikörperketten erfolgte in Anlehnung an das von *Kabat et al. (1991)* vorgeschlagene System (*Martin, 2001*). Dabei konnten neben Abweichungen in den Gerüstregionen auch Unterschiede in den CDR's der beiden Einkettenantikörper festgestellt

werden (Abb. 20, rot hinterlegt). Diese Unterschiede betreffen Aminosäureaustausche in den CDR's L2, L3, H1, H2 und H3. Desweiteren weist das CDR-H3 des Klones B8 eine um drei Aminosäuren verlängerte Sequenz gegenüber dem CDR-H3 des Klones A6 auf. Die beschriebenen Unterschiede in der Primärstruktur der abgeleiteten scFv-Proteine können auf die unterschiedliche Quelle der Gensequenzen zurückgeführt werden (scFv-A6 aus mA14/8C5 3/2; scFv-B8 aus mA14/1 G9 H11H9). Das scFv-A6 Protein hat ein theoretisches Molekulargewicht von 26,4 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 8,8. Bei dem scFv-B8 Protein liegt der isoelektrische Punkt bei 8,6 und das MW beträgt 26,9 kDa.

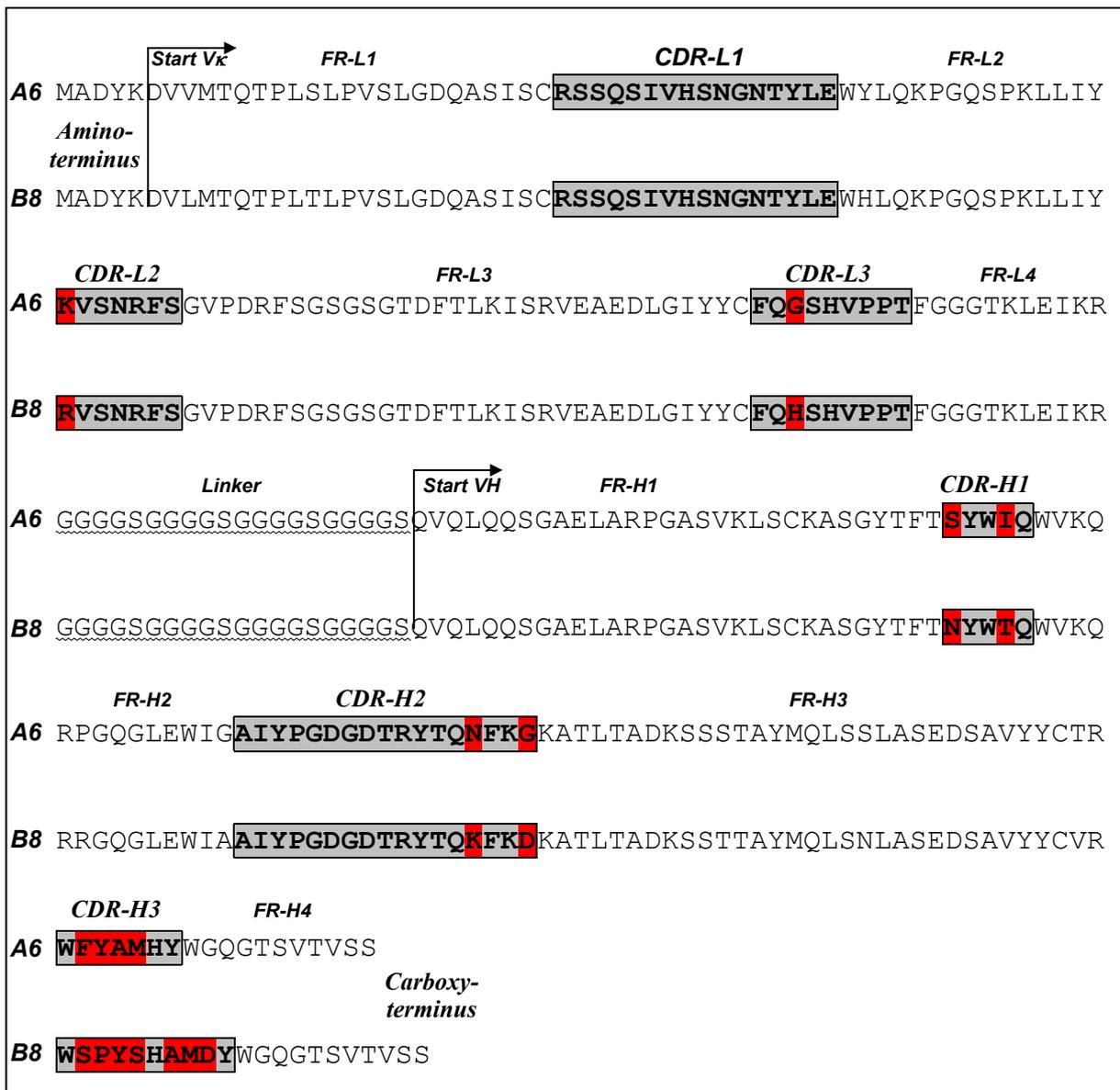


Abb.20.: Primärstruktur der Einkettenantikörper anti-Kres scFvA6 und -B8. Dargestellt ist die von der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz der scFv-Gene. Die hypervariablen Bereiche (CDR's) wurden durch Fettdruck und Einrahmung hervorgehoben. Sequenzunterschiede in diesen Bereichen sind rot hinterlegt. Der durch Unterstrichung gekennzeichnete Abschnitt definiert die Linkerregion. **VH:** Sequenz für die variable Domäne der schweren Kette; **Vκ:** Sequenz für die variable Domäne der leichten Kette; **Linker:** Linkersequenz. **CDR-L1-3 bzw. CDR-H1-3:** hypervariable Bereiche der variablen leichten bzw. schweren Ketten; **FR-L1-4 bzw. FR-H1-4:** Gerüstregionen der variablen leichten bzw. schweren Ketten.

4.5 Genkonstrukte zur Expression der anti-Kres scFv in Tabakpflanzen

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war die Expression spezifisch gegen das Fungizid Kresoxim-methyl gerichteter Einkettenantikörper in Tabakpflanzen. Es sollte in diesem Modellsystem geprüft werden, ob durch die Expression und Akkumulation von Kresoxim-methyl bindenden Einkettenantikörpern im pflanzlichen Gewebe die phytotoxischen Effekte des Fungizides während der Samenkeimung aufgrund von Immunmodulation neutralisiert werden können. Kresoxim-methyl, als Vertreter der Klasse der Strobilurinfungizide, wirkt hemmend auf den Elektronentransport in der *Atmungskette* (Affourtit et al., 2000; Ypema & Gold, 1999). Da die Atmungskette in den Mitochondrien lokalisiert ist, mußte die Akkumulation von exogen appliziertem Kresoxim-methyl in diesem Zellkompartiment verhindert werden. Durch die Erzeugung artifizierender Sinks aufgrund der Expression von anti-Kres scFv in anderen Kompartimenten der Zelle sollte das Fungizid in diesen akkumuliert und dadurch vom Wirkort, den Mitochondrien, ferngehalten werden. Die Wahl entsprechender Signalsequenzen und Retentionssignale erlaubt eine Expression und die Akkumulierung von Einkettenantikörpern in verschiedenen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle (Conrad & Fiedler, 1998). Einleitend wurde bereits erwähnt, daß das Fungizid eine besonders hohe Phytotoxizität während des Keimungsprozesses aufweist (Grossmann & Retzlaff, 1997). Deshalb wurde neben der ubiquitären auch die gewebspezifische Expression der Einkettenantikörper im Samen angestrebt. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits mehrfach über die Hochexpression von Einkettenantikörpern in diesem Speicherorgan berichtet (Fiedler & Conrad, 1995, Phillips et al., 1997, Fiedler et al., 1997, Perrin et al., 2000, Saalbach et al., 2001). Durch den Einsatz eines samenspezifischen Promotors sollten die rekombinanten Antikörper im Samen von Tabakpflanzen akkumuliert werden und zum Zeitpunkt der Keimung zur Neutralisierung des Fungizides in ausreichender Menge vorhanden sein. In diesem Kapitel wird die Konstruktion der Expressionskassetten für die gewebs-, beziehungsweise kompartimentspezifische Expression und Akkumulierung der anti-Kres Einkettenantikörper A6 und B8 in Tabakpflanzen beschrieben.

4.5.1 Kassetten für die ubiquitäre zytosolische Expression der anti-Kres scFv

Wie eingangs erwähnt, sollten die Gene der beiden Einkettenantikörper A6 und B8 ubiquitär in Tabakpflanzen exprimiert und auf subzellulärer Ebene in verschiedenen Kompartimenten akkumuliert werden. Für die ubiquitäre Expression wurde die Gensequenz der anti-Kres Einkettenantikörper stromabwärts der Sequenz des CaMV 35S-Promotors (Franck et al., 1980, Benfay et al., 1989) kloniert. Dieser Promotor erlaubt die starke konstitutive Expression des kontrollierten Gens in der gesamten Pflanze (Odell et al., 1985, Harpster et al., 1988). Um eine Expression im Zytosol zu erreichen, wurden Expressionskassetten ohne den Einsatz einer Signalpeptidsequenz konstruiert. Die schematische Darstellung der

chimären Genkonstrukte für die ubiquitäre zytosolische Expression der anti-Kres Einkettenantikörper in *Nicotiana tabacum* ist in Abbildung 21 ersichtlich.

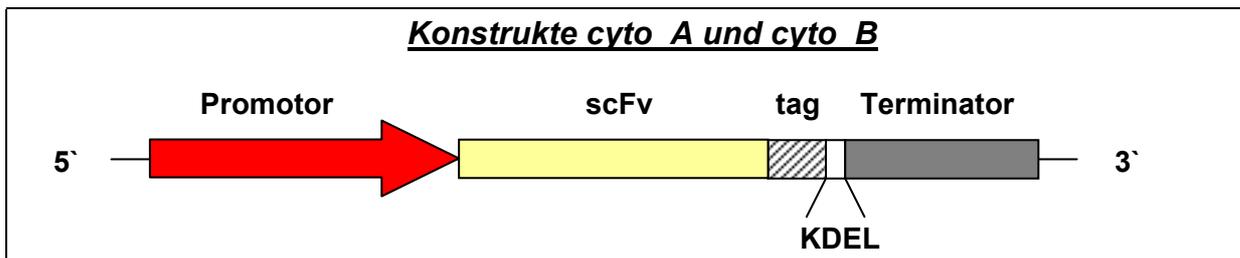


Abb.21.: Schematische Darstellung der für die ubiquitäre, zytosolische Expression der anti-Kres scFvA6 und -B8 verwendeten Kassetten. **Promotor:** Sequenz des CaMV 35S-Promotors; **scFv:** Sequenz für das anti-Kres scFv; Kasse cyto_A: A6-scFv, Kasse cyto_B: B8-scFv; **tag:** Sequenz des c-myc-tag; **KDEL:** Sequenz für das stabilisierende Tetrapeptid KDEL; **Terminator:** CaMV 35S-Terminatorsequenz

Grundlage für die Erzeugung dieser Expressionskassetten war der Vektor pRTRA 7/3 (Artsaenko et al., 1995). Dieses Plasmid ist ein Abkömmling von pRT103 (Töpfer et al., 1993) und enthält die Sequenzen für den CaMV 35S-Promotor, das Signalpeptid des Legumin-B4-Speicherproteins: „LeB4-SP“ (Bäumlein et al., 1986), den c-myc-tag (Munro & Pelham, 1986) sowie für das KDEL-Tetrapeptid und die Sequenz des CaMV 35S-Polyadenylierungssignales (Gardner et al., 1981). Für die Klonierung wurden die scFv-Gene aus den bakteriellen Expressionsvektoren pITA6 bzw. pITB8 (vgl. 4.3) als 765bp bzw. 774bp große NcoI/NotI-Fragmente isoliert und in das 3412 bp große NcoI/NotI-Fragment des Vektors pRTRA 7/3 kloniert (siehe Abb. 22, oben). In den erhaltenen Vektoren pRTML_cytoA (mit anti-Kres scFvA6) bzw. pRTML_cytoB (mit anti-Kres scFvB8) steht die, aufgrund der fehlenden Sequenz eines Signalpeptides, zytosolische Expression des anti-Kres scFv-Genes somit unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors. Im „downstream“-Bereich wird das Antikörpergen durch die Sequenz des c-myc-tags, des Tetrapeptides KDEL, eines Translationsstoppsignales und des Polyadenylierungssignales terminiert. Der c-myc-tag erlaubt den Nachweis des pflanzlich exprimierten Einkettenantikörperproteins mit Hilfe immunologischer Verfahren unter Nutzung des spezifischen c-myc-Antikörpers 9E10 (Evan et al., 1985). Die normalerweise nach Einschleusung in den sekretorischen Weg für die Retention des Proteins im endoplasmatischen Retikulum genutzte Sequenz des Tetrapeptides KDEL am carboxyterminalen Ende des gebildeten Einkettenantikörpers sollte bei zytosolischer Expression zu einer Verbesserung der Proteinakkumulation führen (Schouten et al., 1996, 1997). Aus den Vektoren pRTML_cytoA und _cytoB wurden die Expressionskassetten als 1600bp große HindIII-Fragmente isoliert und anschließend in den Binärvektor pBIN19 (Bevan et al., 1984, Frisch et al., 1995) kloniert. Die resultierenden Konstrukte pBIN_cytoA beziehungsweise pBIN_cytoB waren die Grundlage für den *A.tumefaciens* vermittelten Gentransfer in Tabakpflanzen zur Regeneration der transgenen Pflanzenlinien cytoA und cytoB.

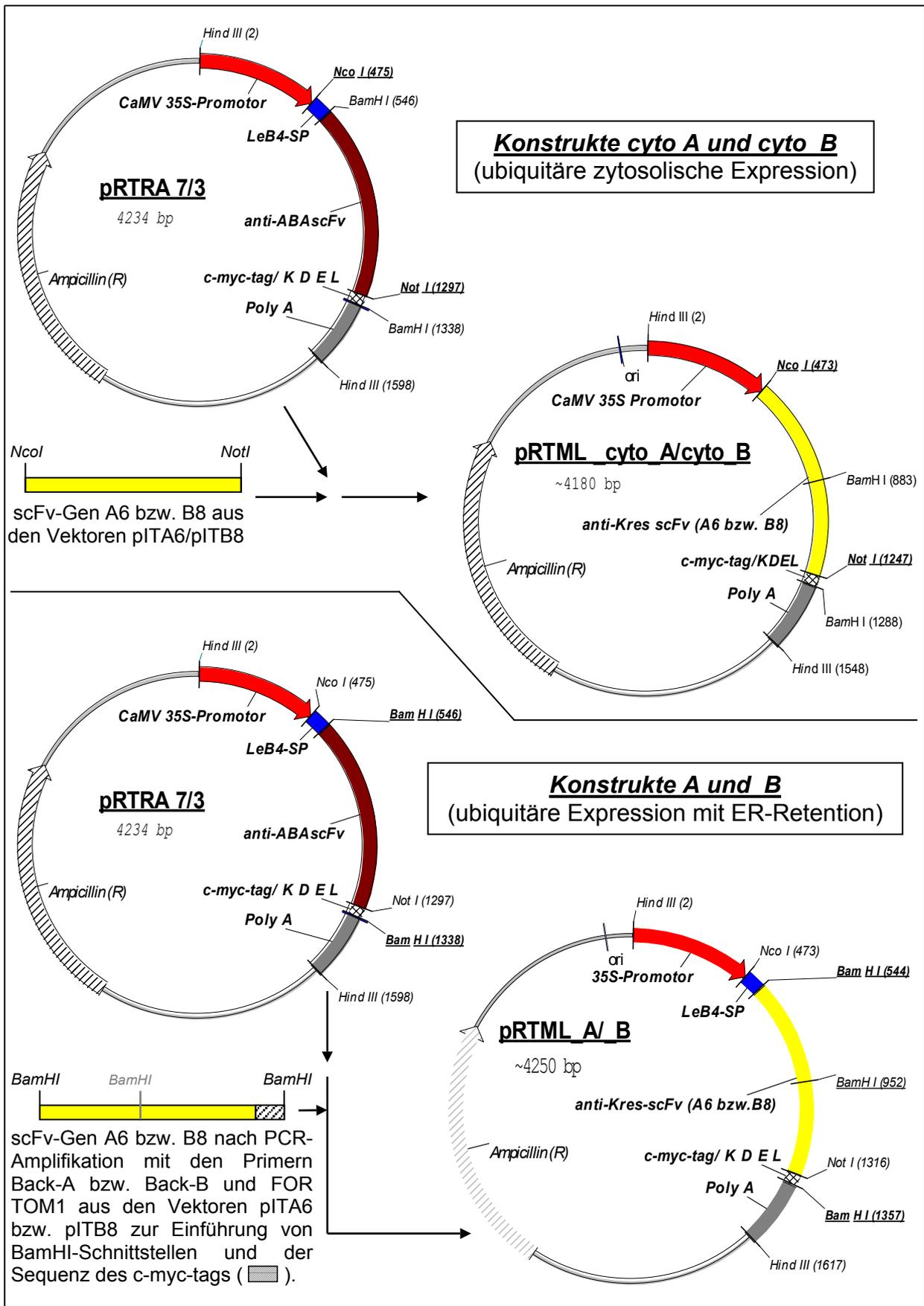


Abb.22.: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Konstruktion der Expressionskassetten für die pflanzliche ubiquitäre zytosolische Expression (oben) sowie für die ubiquitäre Expression der anti-Kres scFv mit Retention im endoplasmatischen Retikulum der Pflanzenzellen (unten). Erklärung: siehe Text.

4.5.2 Vektoren für die ubiquitäre pflanzliche Expression der anti-Kres scFv mit cotranslationaler Translokation und Retention im ER

Für die ubiquitäre Expression der anti-Kres scFv-Gene mit cotranslationaler Translokation und Retention des rekombinanten Proteins im endoplasmatischen Retikulum der pflanzlichen Zelle wurde das scFv-Gen ebenfalls unter die Kontrolle des CaMV 35S-Promotors gestellt. Der Vektor pRTRA 7/3 bildete das Ausgangsplasmid zur Konstruktion der entsprechenden Expressionskassetten. Die schematische Darstellung der, für die ubiquitäre Expression der anti-Kres scFv in *Nicotiana tabacum* mit Retention im endoplasmatischen Retikulum verwendeten, chimären Genkonstrukte ist in Abbildung 23 ersichtlich.

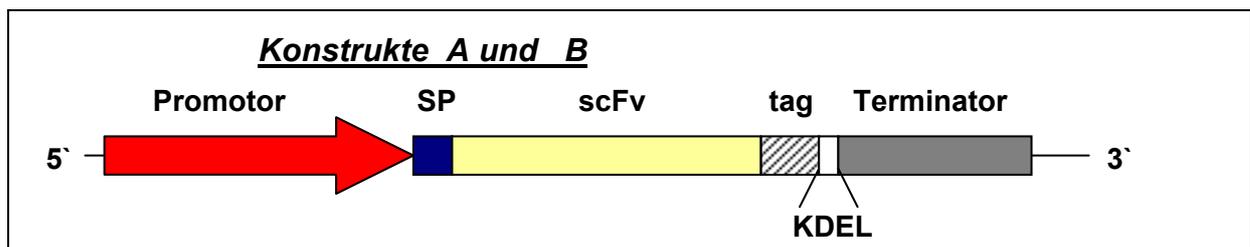


Abb.23.: Schematische Darstellung der für die ubiquitäre Expression der anti-Kresoxim-methyl-Einkettenantikörper A6 und B8 mit Retention im endoplasmatischen Retikulum verwendeten Kassetten. **Promotor:** CaMV 35S-Promotorsequenz; **SP:** Legumin B4-Signalpeptidsequenz; **scFv:** Sequenz für das anti-Kres scFv, Kasette A: A6-scFv, Kasette B: B8-scFv; **tag:** Sequenz des c-myc-tag; **KDEL:** Sequenz für das Tetrapeptid KDEL; **Terminator:** CaMV 35S-Terminatorsequenz

Die Einkettenantikörpergene wurden hierfür als scFv-c-myc-tag Fusion aus den bakteriellen Expressionsvektoren pITA6 bzw. pITB8 durch eine Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung des Oligonukleotides FOR TOM1, welches im Bereich der c-myc-tag Sequenz bindet, und der am 3'-Ende der scFv-Gensequenzen bindenden Oligonukleotide BackA für das anti-Kres scFvA6 beziehungsweise BackB für das anti-Kres scFvB8 amplifiziert. Durch diese PCR wurden die für die Klonierung notwendigen BamHI-Restriktionsschnittstellen in die Gensequenz der scFv eingeführt. Als Amplikons wurden anti-Kres scFv~c-myc-tag Gensequenzen erhalten. Nach erfolgter partieller Restriktion wurden die Gene als ~810 bp große BamHI-Fragmente in das dephosphorylierte 3440bp-Fragment des mit BamHI gespaltenen Vektors pRTRA 7/3 kloniert (siehe Abb.22 unten). Die richtige Orientierung des Inserts wurde durch Restriktionsanalysen überprüft. Außerdem wurde die korrekte Nukleotidabfolge der durch PCR amplifizierten scFv-Gene in den resultierenden Vektoren pRTML_A bzw. pRTML_B überprüft. Die Sequenzierung erfolgte mit dem fluoreszenzmarkierten Primer LEB73, welcher im Bereich des LeguminB4-Signalpeptides bindet, dem Primer TAG73, dessen Bindestelle „downstream“ des c-myc-tags liegt, dem Reverse-Primer, dessen komplementäre Nukleotidabfolge im Vektorarm „upstream“ der Promotorsequenz lokalisiert ist und dem Uni-Primer, der im 3'-Bereich „downstream“ des Terminators bindet. Um die Einschleusung des gebildeten Proteins in das endoplasmatische

Retikulum der pflanzlichen Zelle und die Retention in diesem Kompartiment zu erreichen, wurde das scFv-Gen durch die oben beschriebene Klonierung im 5'-Bereich mit der Gensequenz des Legumin-B4-Signalpeptides von *Vicia faba* (Bäumlein et al., 1986) und im 3'-Bereich mit der Sequenz des Tetrapeptides KDEL fusioniert. Das im N-terminalen Teil der Proteinsequenz befindliche Signalpeptid vermittelt die cotranslationale Translokation des scFv-Proteins in das endoplasmatische Retikulum und wird nach erfolgtem Membrandurchtritt proteolytisch durch eine Signalpeptidase abspalten (Fiedler, 1996). Durch die Präsenz des Tetrapeptides KDEL als Retentionssignal am carboxyterminalen Ende wird das nach der Translation im endoplasmatischen Retikulum befindliche Protein in diesem Kompartiment zurückgehalten (Munro & Pelham, 1987; Pelham, 1990; Bednarek & Raikhel, 1992; Wandelt et al., 1992, Pelham, 1996; Pagny et al., 1999). Aus den Klonierungsvektoren pRTML_A und pRTML_B wurden die Expressionskassetten als ~1600bp große HindIII-Fragmente isoliert und anschließend in den Binärvektor pBIN19 (Bevan et al., 1984, Frisch et al., 1995) kloniert. Die resultierenden Konstrukte pBIN_A bzw. pBIN_B waren nach Transformation in den *A.tumefaciens*-Stamm pGV 2260 in C58C1 (Deblaere et al., 1985) die Grundlage für den *A.tumefaciens*-vermittelten Gentransfer in Tabakpflanzen zur Regeneration der transgenen Pflanzenlinien A (anti-Kres scFvA6) bzw. B (anti-Kres scFvB8).

4.5.3 Vektoren für die ubiquitäre pflanzliche Expression der anti-Kres scFv mit extrazellulärer Plasmamembranpräsentation

Die für die ubiquitäre Expression in *Nicotiana tabacum* mit Einschleusung in den sekretorischen Weg und anschließender Verankerung des gebildeten scFv Proteins in der Plasmamembran genutzten chimären Genkonstrukte sind in der Abb.24 dargestellt. Wie für die bereits beschriebenen ubiquitären Expressionskassetten stehen die Antikörpergene auch für dieses Expressionsziel unter der Kontrolle des starken konstitutiven CaMV 35S-Promotors. Die Ausgangsplasmide zur Konstruktion der entsprechenden Kassetten bildeten die Vektoren pRTML_A, pRTML_B und der Vektor pRT_A-Hook (siehe Abb.25).

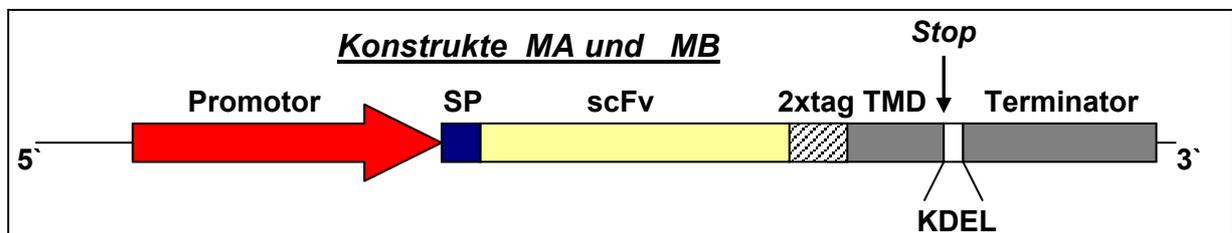


Abb.24.: Schematische Darstellung der für die ubiquitäre Expression der anti-Kres scFv A6 und B8 mit Verankerung in der Plasmamembran der Pflanzenzelle verwendeten Expressionskassetten. **Promotor:** CaMV 35S-Promotorsequenz; **SP:** Legumin B4-Signalpeptidsequenz; **scFv:** Sequenzen für das anti-Kres scFv, Kassetten MA: A6-scFv, Kassetten MB: B8-scFv; **2x tag:** Sequenz des c-myc-tag, zweifach hintereinander kloniert; **TMD:** Sequenz der Transmembrandomäne des PDGFR-Proteins; **Stop:** Stopkodon; **KDEL:** Sequenz für das Tetrapeptid KDEL; **Terminator:** CaMV 35S-Terminatorsequenz

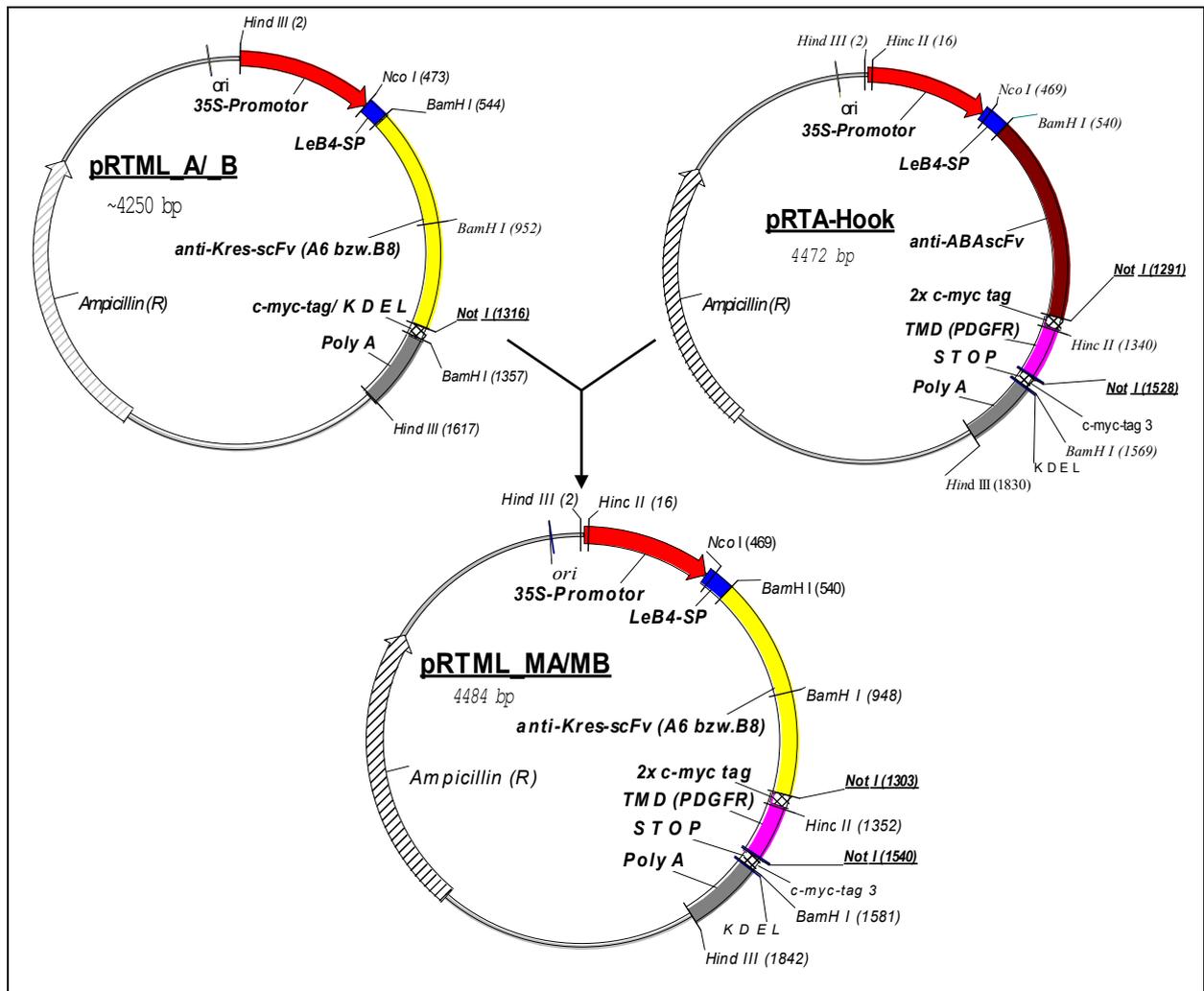


Abb.25.: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Konstruktion der Kassetten für die ubiquitäre pflanzliche Expression der anti-Kres scFv Gene mit Plasmamembranretention des scFv-Proteins. Erklärung: siehe Text.

Der Vektor pRT_A-Hook ist ein Derivat des Vektors pRTRA 7/3, wobei das anti-ABA scFv-Gen im 3'-Bereich mit der Sequenz der PDGFR-Transmembrandomäne (TMD) aus dem Vektor pHook-1 (Chesnut et al., 1996) fusioniert wurde. Die Transmembrandomäne des menschlichen Blutplättchenwachstumsfaktor-Rezeptors (PDGFR, „Platelet Derived Growth Factor Receptor“; Gronwald et al., 1988) bewirkt die Verankerung des in den sekretorischen Weg gelangten Einkettenantikörperproteins in der Plasmamembran der exprimierenden Zellen (Chesnut et al., 1996). Die Einschleusung der anti-Kres scFv in den sekretorischen Weg wird wie bei den Konstrukten für die ubiquitäre Expression mit Retention im endoplasmatischen Retikulum (vgl.4.5.2.) durch das aminotermine Legumin-B4-Signalpeptid erreicht. Die Konstruktion der Vektoren pRTML_MA und pRTML_MB erfolgte durch Klonierung des 237bp großen NotI-DNA Fragmentes des Vektors pRT_A-Hook in die, mit NotI linearisierte und anschließend dephosphorylierte Vektor-DNA der Klone pRTML_A bzw. pRTML_B. Die richtige Orientierung der Transmembrandomänensequenz wurde durch Restriktionsanalyse mit dem Enzym Hinc II überprüft. Bei korrekter Insertion resultierten

hieraus ein ~1340bp und ein ~3150bp-DNA-Fragment der Vektoren pRTML_MA bzw MB. Aus den Klonierungsvektoren pRTML_MA und pRTML_MB wurden die Expressionskassetten als ~1840bp große HindIII-DNA-Fragmente isoliert und anschließend in den Binärvektor pBIN19 kloniert. Die resultierenden Konstrukte pBIN_MA beziehungsweise pBIN_MB waren nach Transformation in den *A.tumefaciens*-Stamm pGV 2260 in C58C1 die Grundlage für den Gentransfer in Tabakpflanzen zur Regeneration der transgenen Pflanzenlinien MA und MB.

4.5.4 Kassetten für die samenspezifische Expression des anti-Kres scFv

Wie eingangs erwähnt, sollte neben der ubiquitären Expression der Kresoxim-methyl bindenden Einkettenantikörperfragmente A6 und B8 auch eine hauptsächlich samenspezifische Genexpression und Akkumulation des scFv-Proteins erreicht werden. Für dieses Vorhaben wurde das scFv-Gen stromabwärts des USP-Promotors kloniert. Dieser Promotor, der aus der Gensequenz für das Unbekannte Samenprotein („USP“, *Bassüner et al., 1988*) der Pflanze *Vicia faba* isoliert wurde, ermöglicht eine hohe Expression des kontrollierten Fremdgenes. Die Expression betrifft hauptsächlich den Samen und findet bereits in den frühen Stadien der Samenentwicklung statt (*Bäumlein et al., 1991/I*, Phillips et al., 1997), ist in *N.tabacum* auf diesen jedoch nicht ausnahmslos beschränkt (*U.Conrad, mündliche Mitteilung*). Der USP-Promotor ist in seiner Eigenschaft, zur Expression von rekombinantem scFv-Protein im Tabaksamen, bis zu neunfach stärker als der ansonsten ebenfalls häufig genutzte samenspezifische Legumin B4-Promotor (*Bäumlein et al., 1991/II*) von *Vicia faba* (*Conrad et al., 1998*). Die Einschleusung in den sekretorischen Weg mit anschließendem Verbleib im endoplasmatischen Retikulum wird bei den samenspezifischen Konstrukten wie bei den entsprechenden Konstrukten für die ubiquitäre Expression (vgl. 4.5.2.) durch das Legumin B4-Signalpeptid am N-Terminus und dem KDEL-Retentionssignal am C-Terminus des Antikörpers erreicht. Die Expressionskassetten für die samenspezifische Expression der anti-Kres scFv sind in der Abb. 26 dargestellt.

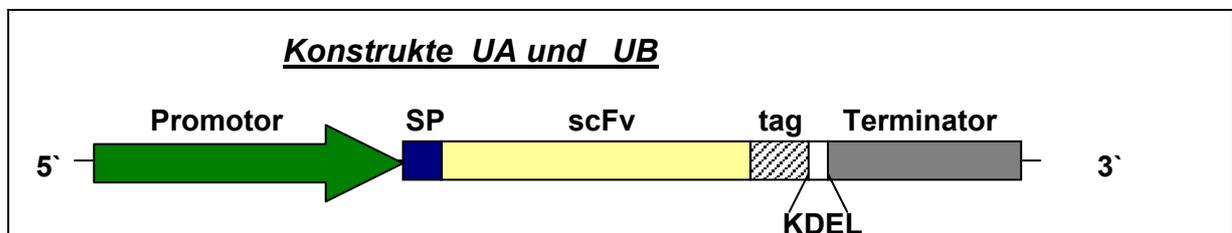


Abb.26.: Schematische Darstellung der, für die samenspezifische Expression der anti-Kresoxim-methyl-Einkettenantikörper A6 und B8 mit Retention im endoplasmatischen Retikulum, verwendeten Kassetten. **Promotor:** Sequenz des USP-Promotors von *Vicia faba*; **SP:** Legumin B4-Signalpeptidsequenz; **scFv:** Sequenzen für das anti-Kres scFv, Kasette UA: A6-scFv, Kasette UB: B8-scFv; **tag:** Sequenz des c-myc-tag; **KDEL:** Sequenz für das Tetrapeptid KDEL; **Terminator:** CaMV 35S-Terminatorsequenz

Grundlage für die Erzeugung der Konstrukte für die samenspezifische Expression war der Vektor pRT-BU10 (Phillipps *et al.*, 1997). Dieser Vektor enthält den USP-Promotor und stellte somit den Donor für dessen Sequenz dar. Für die Konstruktion der Expressionskassetten UA und UB wurden die ~1350 bp großen NcoI/NdeI-DNA-Fragmente der Vektoren pRTML_A bzw. pRTML_B isoliert. Diese Fragmente enthalten mit Ausnahme des CaMV-35S-Promotors die komplette Sequenz der Konstrukte A bzw. B (vgl. Abb.22f). Die Fragmente wurden nachfolgend in den, ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und NdeI gespaltenen und ~3150 bp umfassenden, Vektorarm des Plasmides pRT-BU10 kloniert (siehe Abb.27). Die resultierenden Klonierungsvektoren pRTML_UA und _UB enthalten die chimären Gensequenzen für die samenspezifische Expression der anti-Kres-Einkettenantikörper unter der Kontrolle des USP-Promotors mit Retention im endoplasmatischen Retikulum. Aus den Klonierungsvektoren pRTML_UA und _UB wurden die Expressionskassetten als ~1900bp große HindIII-Fragmente isoliert und anschließend in den mit HindIII linearisierten und dephosphorylierten Binärvektor pBIN19 (Bevan *et al.*, 1984, Frisch *et al.*, 1995) zur Erzeugung der Vektoren pBIN_UA bzw. _UB kloniert.

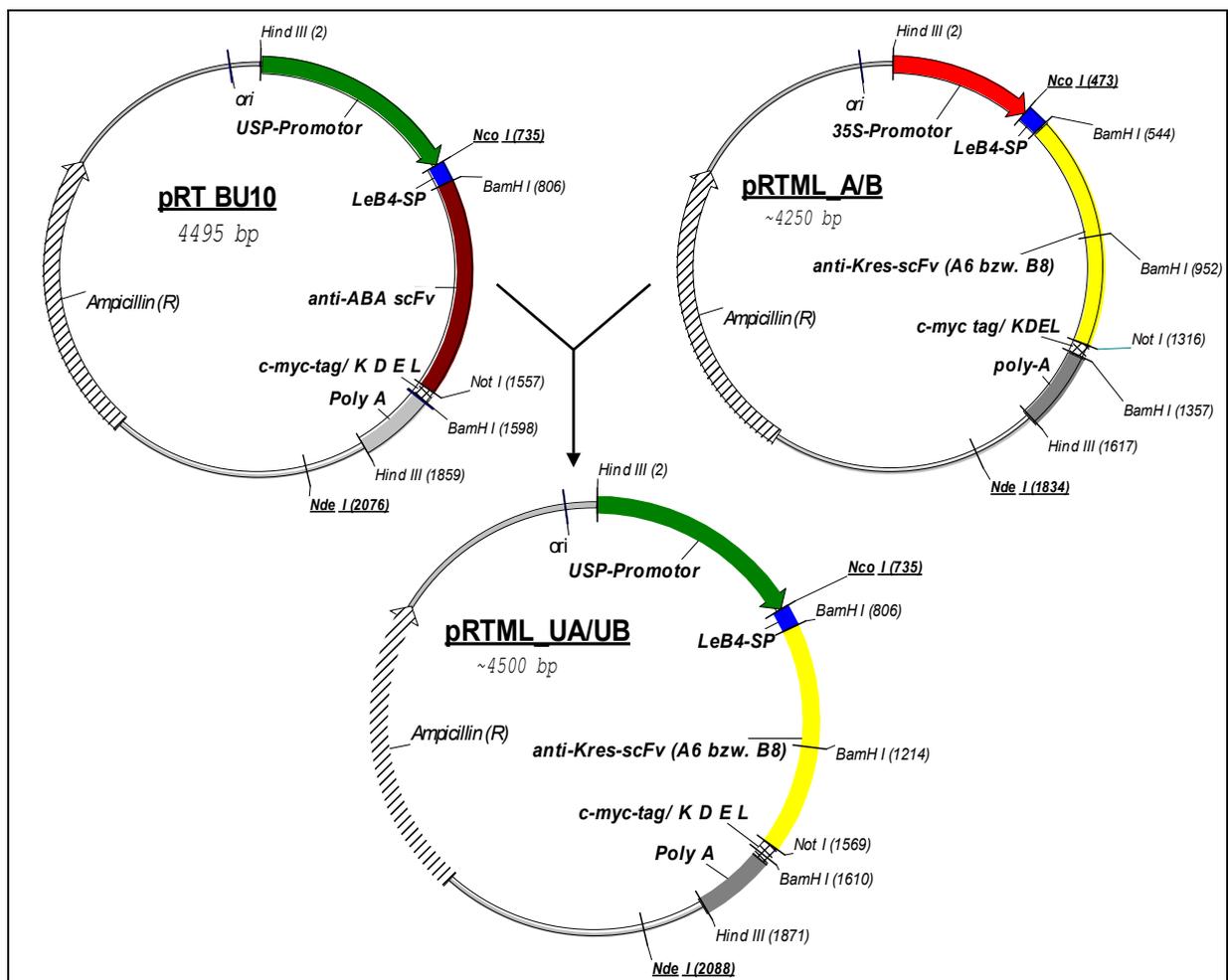


Abb.27.: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Konstruktion der Vektoren für die samenspezifische Expression der anti-Kres scFv Gene mit Retention des Proteins im endoplasmatischen Retikulum. Erklärung: siehe Text.

4.6 Erzeugung transgener Tabakpflanzen durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer

Ziel der Transformation von *Nicotiana tabacum* war die Erzeugung stabiler transgener Linien, die Einkettenantikörper gegen das Fungizid Kresoxim-methyl exprimieren. Hierfür wurden die in den Abb. 21, 23, 24 und 26 dargestellten Genkonstrukte als HindIII-DNA-Fragmente in den Binärvektor pBIN19 (Bevan et al., 1984, Frisch et al., 1995) kloniert. Der binäre Vektor pBIN19 enthält neben den Gensequenzen für eine Insertion der DNA in das Genom der Pflanzenzelle das Gen für die Neomycin-Phosphotransferase-II (NPTII) unter der Kontrolle des Nopalinsynthasepromotors und -terminators. Das NPTII-Gen ermöglicht die Selektion der transformierten Pflanzen auf kanamycinhaltigem Medium. Die resultierenden Vektoren pBIN_cytoA/cytoB/A/B/MA/MB/UA und UB wurden durch Elektroporation in den *A.tumefaciens*-Stamm pGV 2260 in C58C1 (Deblaere et al., 1985) transformiert. Da *A.tumefaciens* verschiedene endogene Plasmide enthält (Hayman & Farrand, 1990), die einen Nachweis des Transgens aufgrund des Bandenmusters erschweren können, wurden positive Klone mittels nichtradioaktiver Southernhybridisierung selektiert (vgl. 3.5 und 3.12, siehe Abb. 28, 29). Die selektierten Klone bildeten die Grundlage für den *A.tumefaciens* vermittelten Gentransfer in Tabakpflanzen zur Regeneration der transgenen Pflanzenlinien cytoA; cytoB; A; B; MA; MB; UA und UB (vgl. 3.6). Pro Konstrukt wurden zwischen 111 und 264 kanamycinresistente *Nicotiana tabacum* Pflanzen *in vitro* regeneriert, anschließend ins Gewächshaus überführt und kultiviert (vgl. 3.7). Die Expression der anti-Kres scFv-Gene wurde durch „Western-Blot“-Analysen der Blatt-, bzw. Samenproteinextrakte der transgenen Pflanzen geprüft (vgl. 3.8 und 3.9). Der bei den verschiedenen Konstrukten bestimmte Anteil der Kan^R-Pflanzen mit nachweislicher Expression des scFv lag zwischen 22 und 61 Prozent.

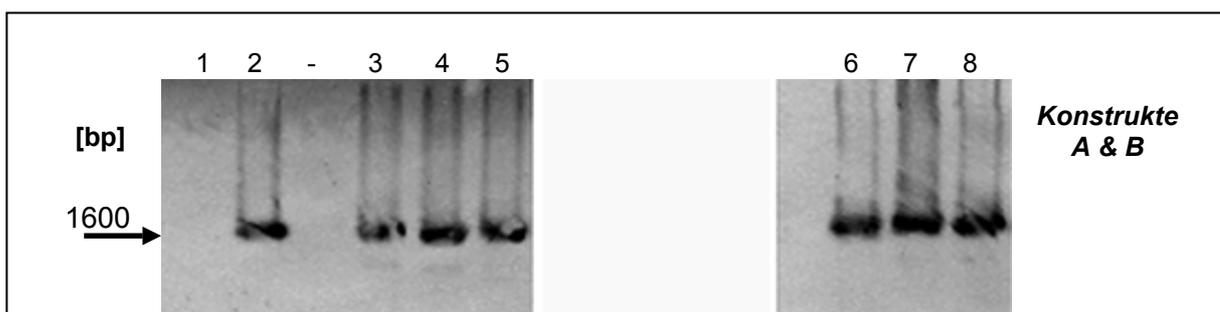


Abb.28.: „Southern-Blot“-Analysen zum Nachweis des anti-Kres scFv-Gens in den transgenen *A.tumefaciens* Klonen der Konstrukte A und B (vgl. 4.5.2). *Agrobacterium* Plasmid-DNA wurde isoliert (vgl.3.12), mit HindIII gespalten, in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf einer Nylonmembran fixiert und mit einem Digoxigenin markierten anti-Kres scFvB8 DNA-Fragment hybridisiert. Der Nachweis der Sonde erfolgte immunologisch mit dem „DIG DNA Labeling and Detection Kit“. Spur 1: Negativkontrolle (Plasmid-DNA pBIN19 aus *E.coli* TG1, HindIII-gespalten); Spur 2: Positivkontrolle (Plasmid-DNA pBIN_A aus *E.coli* TG1, HindIII-gespalten) Spur 3-5: *A.tumefaciens*-Klone **Konstrukt A** (A1-A3) ; Spur 6-9: *A.tumefaciens*-Klone **Konstrukt B** (B13-B15). Die Größe des DNA-Standards entsprechend der zu erwartenden Insertgröße ist links angegeben.

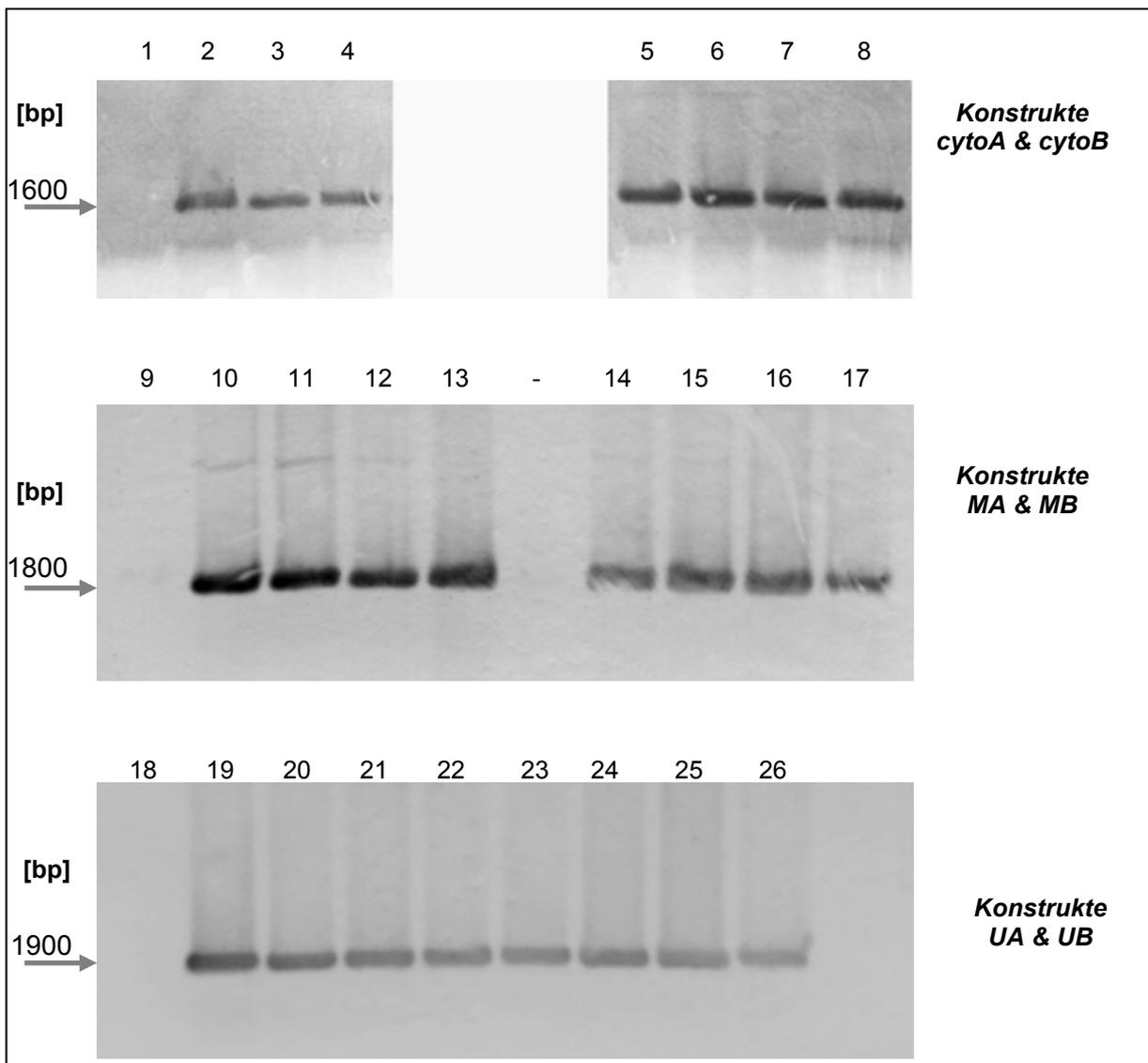


Abb.29.: „Southern-Blot“-Analysen zum Nachweis des anti-Kres scFv-Gens in den für die Pflanzentransformation verwendeten *A.tumefaciens*-Stämmen der Konstrukte cytoA, cytoB (vgl. 4.5.1); MA, MB (vgl. 4.5.3) sowie UA und UB (vgl. 4.5.4). *Agrobacterium* Plasmid-DNA wurde nach der unter 3.12 beschriebenen Methode isoliert, mit *HindIII* gespalten, in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf einer Nylonmembran fixiert und mit einem Digoxigenin-markierten anti-Kres scFvB8 DNA-Fragment hybridisiert. Der Nachweis der Sonde erfolgte immunologisch mit dem „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ der Firma Roche nach Herstellerangaben. Spur 1, 9 und 18: Negativkontrolle (Plasmid-DNA pBIN19 aus *E.coli* TG1, *HindIII*-gespalten); Spur 2: Positivkontrolle (Plasmid-DNA pBIN_cytoA aus *E.coli* TG1, *HindIII*-gespalten) Spur 3-4: Agrobakterienklone Konstrukt cytoA (cytoA1-cytoA2) ; Spur 5-7: Agrobakterienklone Konstrukt cytoB (cytoB1- cytoB3); Spur 8: Positivkontrolle (Plasmid-DNA pBIN_cytoB aus *E.coli* TG1, *HindIII*-gespalten), Spur 10: Positivkontrolle (Plasmid-DNA pBIN_MA aus *E.coli* TG1, *HindIII*-gespalten) Spur 11-13: Agrobakterienklone Konstrukt MA (MA1-MA3); Spur 14: Positivkontrolle (Plasmid-DNA pBIN_MB aus *E.coli* TG1), Spur 15-17: Agrobakterienklone Konstrukt MB (MB1-MB3), Spur 19: Positivkontrolle (Plasmid-DNA pBIN_UA aus *E.coli* TG1, *HindIII*-gespalten) Spur 20-22: Agrobakterienklone Konstrukt UA (UA1-UA3) ; Spur 23-25: Agrobakterienklone Konstrukt UB (UB1- UB3); Spur 26: Positivkontrolle (Plasmid-DNA pBIN_UB aus *E.coli* TG1, *HindIII*-gespalten). Die Größe des DNA-Standards entsprechend der etwa zu erwartenden Insertgröße ist links angegeben.

4.7 Expressionsanalyse der Tabakpflanzen mit den chimären Genkonstrukten für die ubiquitäre und samenspezifische Expression der anti-Kres scFv

Die Pflanzen cytoA/cytoB, A/B, MA und MB exprimierten die Einkettenantikörper unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV-35S-Promotors ubiquitär in verschiedenen Zellkompartimenten. Durch Analyse der Proteinextrakte aus Blattmaterial junger Pflanzen sollten diese Pflanzen auf die Expression und Funktionalität der Einkettenantikörper geprüft werden (vgl. 3.8.2). Neben der Bestimmung der Expressionshöhen und Antigenbindungsaktivität der Kresoxim-methyl spezifischen Einkettenantikörper A6 und B8 im Blatt bei den Konstrukten für die ubiquitäre Expression sollten diese Eigenschaften auch bei den samenspezifisch exprimierten scFv überprüft werden. Hierzu wurden Samenproteinextrakte aus reifen Tabaksamen der Linien UA und UB hergestellt (vgl.3.8.1). Nach der Bestimmung der Konzentration der Gesamtheit der löslichen Proteine in den Blatt-, beziehungsweise Samenproteinextrakten wurde eine bestimmte Menge an gesamtlöslichem Protein in SDS-PAA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (vgl.3.9). Der immunologische Nachweis des *c-myc*-tags am carboxyterminalen Ende des Einkettenantikörpers erfolgte mit dem *c-myc*-Antikörper 9E10 (Evan et al., 1985), einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~POD-Konjugat und dem ECL-Kit. Durch Digitalisierung des Röntgenfilmes mit einem Flachbettscanner und Auswertung der Daten mit dem TINA-Programm konnte anschließend durch Vergleich der Signalstärken von definierten scFv-Mengen mit den Signalstärken der scFv in den Proteinextrakten die Menge des Einkettenantikörpers im Extrakt semiquantitativ bestimmt werden. Der scFv-Gehalt wurde in Bezugnahme auf die auf das Gel aufgetragene, in dem Proteinextraktionspuffer bei der angewandten Methode löslichen, Menge an Gesamtprotein berechnet [%scFv/GLP]. Die Ergebnisse der „Western Blot“-Analysen sind in den Tabellen 2 (ubiquitär) und 6 (samenspezifisch) zusammenfassend dargestellt. Die Antigenbindungseigenschaften der pflanzlich exprimierten Einkettenantikörper wurden durch ELISA mit nativen wässrigen Proteinextrakten aus Blattmaterial bzw. aus Samen hochexprimierender Pflanzen getestet.

4.7.1 Expressionsanalyse der transgenen Tabaklinien cytoA und cytoB

Von den regenerierten transgenen Pflanzen der Konstrukte für die ubiquitäre zytosolische Expression der anti-Kres scFv, cytoA und cytoB (vgl. Abb.21), wurde während der Kultivierungsphase im Gewächshaus Blattmaterial junger Pflanzen geerntet. Die gesamtlöslichen Proteine wurden hieraus durch Extraktion mit SDS-Probenpuffer isoliert (vgl. 3.8.2), nachfolgend in einem 12,5%igem SDS-PAA-Gel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und durch ElektrobloTTing auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der immunologische Nachweis des scFv-Proteins erfolgte durch den Antikörper 9E10 und einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~POD-Konjugat (vgl. 3.9). Es wurden insgesamt

214 Pflanzen des Konstruktes cytoA und 264 Pflanzen des Konstruktes cytoB auf die Expression der Einkettenantikörper überprüft. Die Anzahl unabhängiger Pflanzen mit Expressionshöhen über der Detektionsgrenze von 0,005 % scFv-Protein/GLP [w/w] und die Verteilung der Expressionshöhen bei den einzelnen Konstrukten für die zytosolische Expression der anti-Kres-Einkettenantikörper sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt.

Tab.2: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zur Expressionsanalyse der Pflanzenlinien mit ubiquitärer Expression der anti-Kres Einkettenantikörper. Zytosolische Expression: cytoA bzw. cytoB, ER-Retention: A bzw. B und Verankerung in der Plasmamembran der pflanzlichen Zelle: MA bzw. MB.

Konstrukt	Anzahl der Kan ^R Pflanzen (TG ₀ -Generation)	Anzahl der Pflanzen mit nachweislicher Expression des scFv	Expressionseffizienz (scFv-Expimierer / Kan ^R -Pflanzen x 100)	Expressionsniveau [% scFv/GLP]		
				Min.	Max.	Mittel
CytoA	214	48	22%	0,005	0,02	0,008
CytoB	264	66	25%	0,005	0,03	0,01
A	121	33	27%	0,1	0,35	0,16
B	150	91	61%	0,1	0,8	0,25
MA	150	40	27%	0,02	0,1	0,05
MB	147	58	39%	0,02	0,1	0,04

Gezeigt ist die Anzahl der insgesamt je Konstrukt regenerierten und analysierten Pflanzen, der scFv-exprimierenden Pflanzen sowie deren Expressionsniveauverteilung im Blatt. Das Expressionsniveau wurde mittels „Western-Blot“-Analysen von Proteinextrakten aus Blattmaterial junger Pflanzen semiquantitativ bestimmt.

Als Expressionsseffizienz wurde der prozentuale Anteil der Pflanzen mit nachweislicher Expression des rekombinanten Proteins an den Pflanzen, die auf kanamycinhaltigem Medium selektiert wurden (NPTII-Gen-enthaltend), bezeichnet. Diese betrug bei dem Konstrukt mit ubiquitärer zytosolischer Expression des anti-Kres scFvA6 22% und des anti-Kres scFvB8 25%. Das durchschnittliche Expressionsniveau der TG₀-Pflanzen war bei beiden zytosolischen Konstrukten vergleichbar hoch und lag im Bereich von etwa 0,01% scFv/GLP. Die maximale Expressionshöhe von 0,03% scFv/GLP wurde bei Pflanzen des Konstruktes cytoB ermittelt und lag damit etwas über dem Maximalwert von 0,02% scFv/GLP bei den Pflanzen des Konstruktes cytoA. Für die Analyse der Antigenbindungseigenschaften der zytosolisch exprimierten Einkettenantikörper wurden native wässrige Blattproteinextrakte von Pflanzen der F₁-Generation mit einem relativ hohen Expressionsniveau hergestellt (vgl. 3.8.2.) und im ELISA analysiert (vgl. 3.11, Prinzip: wie bei den bakteriell exprimierten anti-Kres-scFv in Abb.14). Der Nachweis des aktiven anti-Kres scFv im Blattproteinextrakt der Pflanzen mit zytosolischer Expression gelang trotz vergleichbarer Expressionshöhen (0,03% scFv/GLP) nur bei Pflanzen des Konstruktes CytoB (CytoB19/4). Dabei lagen die erhaltenen Substratumsatzraten gering über der Nachweisgrenze ($\Delta OD_{405nm} \sim 0,1$). In dem Proteinextrakt der Pflanze Cyto A 128/1 konnte trotz vorhandenem scFv-Proteins kein Signal im ELISA detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Tab.3: Zusammenfassende Darstellung der Expressionsniveauverteilung der Pflanzenlinien mit ubiquitärer zytosolischer Expression der anti-Kres scFv A6 (cytoA) bzw. B8 (cytoB).

Konstrukt	Expressionsniveau [%scFv/GLP]					
	<0,005	≥0,005	0,005>0,01	0,01>0,02	0,02>0,03	~0,03
CytoA (Anzahl unabhängiger transgener Pflanzen)	165	48	26	17	5	-
CytoB (Anzahl unabhängiger transgener Pflanzen)	199	66	21	35	7	3

Gezeigt ist die Anzahl der Pflanzen mit dem entsprechend klassifizierten Expressionsniveau im Blatt. Das Expressionsniveau wurde semiquantitativ mittels „Western-Blot“-Analysen von Proteinextrakten aus Blattmaterial junger Pflanzen bestimmt.

4.7.2 Analyse der transgenen Tabaklinien A und B

Wie für die transgenen Tabakpflanzen mit zytosolischer Expression der anti-Kres scFv, wurde auch von den Pflanzen mit ubiquitärer Expression und Retention des Einkettenantikörpers im endoplasmatischen Retikulum (Konstrukte A und B, vgl. Abb. 22) Blattmaterial junger Pflanzen für die Bestimmung des Expressionsniveaus und der Bindungseigenschaften des Einkettenantikörpers isoliert und Blattproteinextrakte hergestellt. Die Verteilung der Expressionshöhen dieser Pflanzen sind in Tab. 2 und 4 zusammengefasst. Das durchschnittliche Expressionsniveau des anti-Kres scFv betrug bei den Pflanzen der Linie A 0,16% und bei den Pflanzen der Linie B 0,25% [scFv/GLP] und lag damit 20-25-fach über den für die zytosolischen Konstrukte bestimmten durchschnittlichen Expressionshöhen. Der maximale Gehalt des anti-Kres scFv im Blatt junger Pflanzen betrug 0,35% (Konstrukt A) bzw. 0,8% (Konstrukt B) und war damit ebenfalls deutlich höher als bei den Pflanzen mit zytosolischer Expression (vgl. 4.7.1.).

Tab.4: Zusammenfassende Darstellung der Expressionsniveauverteilung der Pflanzenlinien mit ubiquitärer Expression und Retention der anti-Kres scFv-A6 (A) bzw. scFv-B8 (B) im endoplasmatischen Retikulum.

Konstrukt	Expressionsniveau [%scFv/GLP]					
	<0,1/≥0,1	0,1>0,2	0,2>0,3	0,3>0,4	0,4≥0,5	>0,5
A	88/33	22	7	3	1	-
B	57/91	19	43	11	15	3

Gezeigt ist die Anzahl der Pflanzen mit dem entsprechend klassifizierten Expressionsniveau im Blatt. Das Expressionsniveau wurde semiquantitativ mittels „Western-Blot“-Analysen von Proteinextrakten aus Blattmaterial junger Pflanzen bestimmt.

Neben der Bestimmung der Expressionshöhen sollte geprüft werden, ob auch die pflanzlich exprimierten Einkettenantikörper funktionelle Aktivität besitzen und somit das Antigen Kresoxim-methyl spezifisch erkennen. Da die anti-Kres Einkettenantikörper A6 bzw. B8 bei den transgenen Pflanzen der Konstrukte A und B in großen Mengen im ER der Blattzellen akkumuliert wurde, schien die Untersuchung der Blattextrakte dieser Pflanzen in Bezug auf die Bestimmung der Bindungseigenschaften des pflanzlich exprimierten scFv vielversprechend. Hierfür wurden die löslichen Proteine nach Extraktion von Blattproben ausgewählter hochexprimierender Pflanzen mit einem wässrigen Puffersystem (vgl. 3.8.2.) sowohl im indirekten ELISA als auch im indirekten kompetitiven ELISA überprüft (vgl. 3.11). Die große Menge an akkumuliertem Einkettenantikörperprotein im Blatt erlaubte eine Bestimmung der Antigenbindungseigenschaften aufgrund der erzielten hohen Substratumsatzraten im letzten Schritt des ELISA. Die pflanzlich exprimierten Einkettenantikörper binden spezifisch Kresoxim-methyl-BSA Konjugat ohne Kreuzreaktivität mit reinem BSA. Desweiteren führt zugesetztes freies Kresoxim-methyl während des Inkubationsschrittes im indirekten kompetitiven ELISA (vgl. 3. 11) zu einer Reduzierung der quantitativen Bindung an das festphasengebundene Kres-BSA Konjugat (siehe Abb. 30). Damit konnte die Antigenbindungsaktivität der pflanzlich exprimierten anti-Kres-Einkettenantikörper für das Molekül Kresoxim-methyl in freier Form nachgewiesen werden.

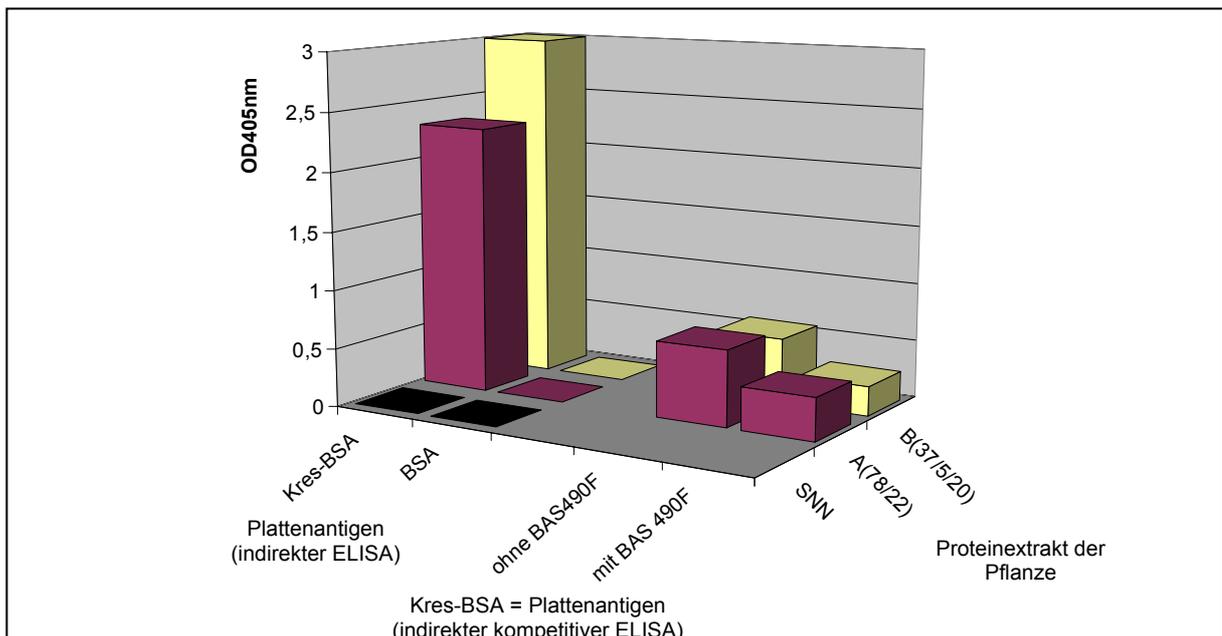


Abb.30.: Nachweis der Funktionalität der pflanzlich exprimierten anti-Kres-Einkettenantikörper A6 und B8 durch indirekte ELISA-Methoden. Die Platten wurden mit Kres-BSA Konjugat bzw. reinem BSA-Trägerprotein beschichtet, mit den 1:10 in PBST + 1% BSA verdünnten pflanzlichen nativen Proteinextrakten von Pflanzen der Linie A und B (anti-Kres scFv enthaltend, bzw. SNN-WT-Negativkontrolle ohne scFv), dem c-myc-Antikörper 9E10 und einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG-ALP-Konjugat inkubiert. Der Nachweis von enzymgekoppeltem Anti-Maus-Immunglobulin erfolgte durch den Umsatz des hinzugefügten Substrates pNPP. Im indirekten kompetitiven ELISA (x-Achse-rechts) wurde der Inkubationsschritt einer Verdünnung des scFv-haltigen Proteinextraktes (entsprechend 2nM scFv) ohne freies Antigen bzw. unter Zugabe einer 10µM BAS 490F-Lösung durchgeführt. Dargestellt ist der Substratumsatz (OD_{405nm}) in Abhängigkeit von dem verwendeten Antigen.

4.7.3 Expressionsanalyse der transgenen Tabaklinien MA und MB

Wie in den vorangegangenen Abschnitten über die Analyse der Pflanzenlinien cytoA/cytoB und A/B sollten auch die Pflanzen der Konstrukte mit ubiquitärer Expression und Retention der Antikörper in der Plasmamembran (Konstrukte MA und MB, vgl. Abb. 22) in Bezug auf das scFv-Expressionsniveau analysiert werden. Hierfür wurden ebenfalls SDS-Proteinextrakte von Blattmaterial dieser Pflanzen angefertigt und im „Western-Blot“ getestet. Die Expressionseigenschaften dieser Pflanzen sind in den Tab. 2 und 5 aufgelistet. Das durchschnittliche Expressionsniveau des anti-Kres scFv betrug bei den Pflanzen der Linie MA 0,05% und bei den Pflanzen der Linie MB 0,04% [scFv/GLP], unterscheidet sich also nicht wesentlich voneinander. Der maximale Gehalt des anti-Kres scFv im Blatt junger Pflanzen betrug bei beiden Konstrukten 0,1% [scFv/GLP]. In ELISA-Experimenten mit nativen Blattproteinextrakten konnte die Funktionalität der Einkettenantikörper beider Konstrukte nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Tab.5: Zusammenfassende Darstellung der Expressionsniveauverteilung der transgenen Pflanzenlinien mit ubiquitärer Expression und Verankerung der anti-Kres scFv-A6 (MA) bzw. scFv-B8 (MB) in der Plasmamembran der pflanzlichen Zelle.

Konstrukt	Expressionsniveau [%scFv/GLP]					
	{<0,02}	{≥0,02}	0,02>0,03	0,03>0,04	0,04>0,05	>0,05
MA	110	40	9	5	18	8
MB	147	58	17	11	23	7

Gezeigt ist die Anzahl der Pflanzen mit dem entsprechend klassifizierten Expressionsniveau im Blatt. Das Expressionsniveau wurde semiquantitativ mittels „Western-Blot“-Analysen von Proteinextrakten aus Blattmaterial junger Pflanzen bestimmt.

4.7.4 Analyse der transgenen Tabaklinien UA und UB

Von den regenerierten transgenen Pflanzen der Konstrukte für die samenspezifische Expression der anti-Kres scFv mit Akkumulation des rekombinanten Proteins im endoplasmatischen Retikulum (UA und UB, vgl. Abb.26) sollte das Expressionsniveau und die Funktionalität des Einkettenantikörperproteins bestimmt werden. Hierfür wurden die reifen Samen nach der Kultivierungsphase im Gewächshaus geerntet. Die Proteine wurden aus diesen Samen durch Extraktion mit einem wäßrigem Puffersystem isoliert (vgl. 3.8.1) und anschließend für die Analysen verwendet. Für die Bestimmung des Expressionsniveaus wurden die Proteine in einem 12,5%igem SDS-PAA-Gel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, durch Elektroblothing auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und über den *c-myc*-tag immunologisch nachgewiesen (vgl. 3.9). Es wurden insgesamt 111 Pflanzen des Konstruktes UA und 119 Pflanzen des Konstruktes UB auf die Expression des Antikörperfragmentes getestet. Die Anzahl unabhängiger Pflanzen mit

Expressionshöhen über 0,1% [scFv-Protein/GLP] und die Verteilung der Expressionshöhen bei den samenspezifischen Konstrukten sind in Tab.6 und Tab.7 dargestellt.

Tab.6: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zur Expressionsanalyse der Tabaklinien mit samenspezifischer Expression und Akkumulation der anti-Kres scFv-A6 (UA) bzw. scFv-B8 (UB) im endoplasmatischen Retikulum der pflanzlichen Zelle.

Konstrukt	Anzahl der Kan ^R Pflanzen (TG ₀ -Generation)	Anzahl der Pflanzen mit nachweislicher Expression des scFv	Expressionseffizienz (scFv-Expimierer / Kan ^R -Pflanzen x 100)	Expressionsniveau [%scFv/GLP]		
				Min.	Max.	Mittel
UA	111	52	47%	0,1	0,5	0,17
UB	119	58	49%	0,1	0,5	0,2

Gezeigt ist die Anzahl der insgesamt je Konstrukt regenerierten und analysierten Pflanzen, der scFv-akkumulierenden Pflanzen sowie deren scFv-Gehalt im reifen Samen. Das Expressionsniveau wurde semiquantitativ mittels „Western-Blot“-Analysen von Samenproteinextrakten bestimmt.

Tab.7: Zusammenfassende Darstellung der Expressionsniveaueverteilung der Tabaklinien mit samenspezifischer Expression und Akkumulation der anti-Kres scFv-A6 (UA) bzw. scFv-B8 (UB) im endoplasmatischen Retikulum der pflanzlichen Zelle.

Konstrukt	Expressionsniveau [%scFv/GLP]					
	{<0,1}	{≥0,1}	0,1>0,2	0,2>0,3	0,3>0,4	0,4≥0,5
UA	111	52	28	17	6	1
UB	119	58	24	21	5	8

Gezeigt ist die Anzahl der Pflanzen mit dem entsprechend klassifizierten Expressionsniveau im Samen. Das Expressionsniveau wurde semiquantitativ durch „Western-Blot“-Analysen von Proteinextrakten reifer Tabaksamen bestimmt.

Etwa die Hälfte der, auf Kanamycin-Medium selektierten Pflanzen mit samenspezifischer Expression zeigte eine Akkumulation der Einkettenantikörper in einem Bereich $\geq 0,1\%$ [scFv/GLP]. Die maximale Expressionshöhe im Samen der transgenen UA und UB-Pflanzen betrug bei beiden Konstrukten 0,5% [scFv/GLP]. Als durchschnittliches Expressionsniveau wurde bei beiden Konstrukten ein Wert von 0,2% [scFv/GLP] bestimmt. Die Analyse der Antigenbindungseigenschaften der anti-Kres scFv beider Linien im ELISA zeigte die Funktionalität der Einkettenantikörper im Samenproteinextrakt (Daten nicht gezeigt).

4.8 Phänotyp der regenerierten transgenen anti-Kres Pflanzen

Nachdem transgene Pflanzen mit ubiquitärer Expression der anti-Kres scFv regeneriert und die Expressionshöhen durch „Western blot“-Analysen bestimmt wurden, sollte untersucht werden, ob es aufgrund der Expression des Einkettenantikörpers im Gewebe dieser Pflanzen zu phänotypischen Unterschieden zum Wildtyp während der Kultivierung im Gewächshaus kommt. Es konnte dabei keine negative Beeinflussung des Wachstums oder

der Entwicklung der Pflanze bzw. einzelner Organe festgestellt werden. Die untersuchten transgenen Linien zeigten im Vergleich mit Wildtyp-Tabakpflanzen (SNN) keine phänotypischen Auffälligkeiten. Ein Vergleich der verschiedenen regenerierten Linien mit ubiquitärer Expression und dem Tabak-Wildtyp ist in Abbildung 31 dargestellt. Bei der samenspezifischen Expression des anti-Kres scFv in den Pflanzen UA und UB konnten ebenfalls keine scFv-bedingte Beeinträchtigungen der Samenentwicklung oder andere Veränderungen des Phänotyps während der Kultivierungsphase festgestellt werden.

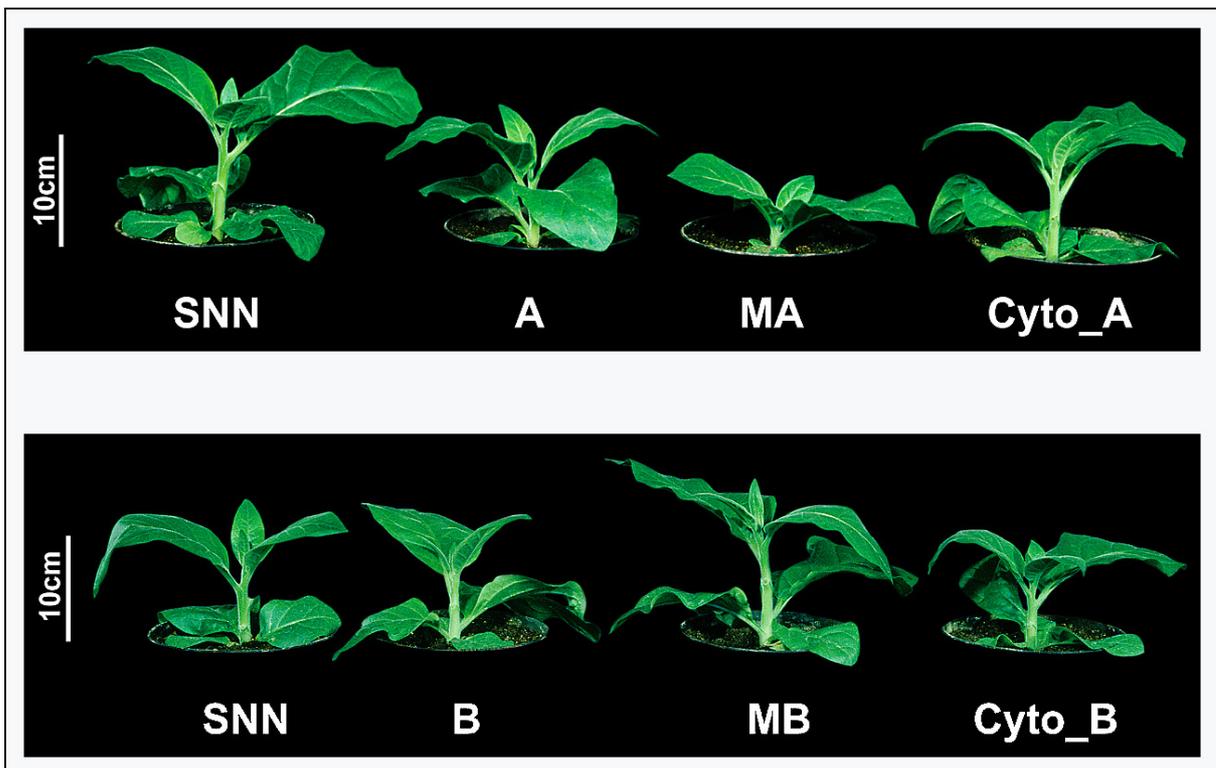


Abb.31.: Vergleich des Phänotyps von transgenen anti-Kres scFv exprimierenden Tabakpflanzen der Linien A , MA, CytoA, B, MB und CytoB mit der Kontrollpflanze Tabak-Wildtyp (SNN).

4.9 Untersuchungen zur Prüfung der Toleranzeigenschaften der transgenen anti-Kres Pflanzen gegenüber dem Fungizid BAS 490F

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Erzeugung von Toleranz gegenüber den toxischen Effekten des Strobilurinfungizides Kresoxim-methyl während der Samenkeimung. Als Modellpflanze für diese Untersuchungen wurde *Nicotiana tabacum* gewählt, da diese relativ einfach zu transformieren ist und, wie in Vorexperimenten gezeigt wurde, eine ausreichende Sensitivität gegenüber dem Fungizid aufweist. Kresoxim-methyl verursacht eine konzentrationsabhängige Verzögerung des Keimungsprozesses von Wildtyp-Tabakpflanzen. Wie einleitend dargestellt, sollte die Transgen-vermittelte Resistenz durch die Bildung artifizierender Sinks des Fungizides Kresoxim-methyl in Kompartimenten der pflanzlichen Zelle erreicht werden, die nicht Wirkort des Toxins darstellen (siehe Abb.5). Die Wirkung von Kresoxim-methyl beruht auf der Hemmung des Elektronentransportes der

Atmungskette durch Bindung an den bc₁-Komplex (vgl. 1.5). Da die Atmungskette in den Mitochondrien lokalisiert ist, sollte der Wirkstoff demzufolge nach dem Eindringen in die Zelle durch den Antikörper in umliegenden Kompartimenten gebunden, zurückgehalten und dadurch in seiner Bindung an den Wirkort gehindert werden. Es wurden verschiedene transgene Linien erzeugt, die Einkettenantikörper gegen das Fungizid ubiquitär im Zytoplasma (vgl. 4.7.1.), im ER (vgl. 4.7.2) und in der Plasmamembran (vgl. 4.7.3) akkumulierten. Desweiteren wurde versucht, durch die hauptsächliche Akkumulation der rekombinanten Antikörper in hoher Konzentration im Tabaksamen eine Art anti-Kres scFv-Speicher zu schaffen, der während der Keimungsphase genügend scFv für die Neutralisierung der toxischen Effekte des Fungizides bereitstellen sollte (vgl. 4.7.4). Die Expressionsanalysen der anti-Kres scFv exprimierenden Pflanzen wurden im vorangegangenen Kapitel beschrieben. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Prüfung der Toleranzeigenschaften der transgenen Pflanzen durch gezielte Applikation des Fungizides während der Keimungsphase. Um eine sichere Aussage in Bezug auf die Toleranzeigenschaften der transgenen anti-Kres Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zu erreichen, wurde ein Applikationssystem gewählt, welches:

1. Die Analyse einer großen Anzahl individueller Linien unter definierten Bedingungen bezüglich der Menge des applizierten Wirkstoffes auf möglichst kleinem Raum und
2. die Untersuchung einer großen Anzahl Keimlinge zur Minimierung der biologisch bedingten Varianz innerhalb einer Linie ermöglichte.

Als System wurde ein Versuchsansatz gewählt, der auf die Inkubation von Samen während der Keimung in Zellkulturplatten mit Lösungen definierter Konzentration des Fungizides beruht (vgl. 3.13). In diesem System konnte eine große Menge individueller Keimlinge (~300/Kavität) durch Inkubation mit unterschiedlichen, definierten Mengen des Wirkstoffes hinsichtlich der Toleranzeigenschaften überprüft werden.

In Initialexperimenten mit einem geringen Probenumfang (jeweils 30-50 Samen) zur Prüfung der Resistenzeigenschaften der transgenen anti-Kres Pflanzen mit ubiquitärer Expression und Retention des gebildeten Einkettenantikörpers im endoplasmatischen Retikulum der Pflanzenzellen (Linie A und B) zeigte sich, daß die durch Immunmodulation erzeugte Kresoxim-methyl-Toleranz nur zu einer partiellen Neutralisierung der Schadwirkung des Fungizides führt. Die Applikation von Kresoxim-methyl resultierte bei den anti-Kres Pflanzen ebenso wie bei den Kontrollpflanzen SNN (Wildtyp) und UF-9 (anti-ox-scFv) in einer Verzögerung des Keimungsprozesses. Einige der transgenen anti-Kres Pflanzen innerhalb der untersuchten Population zeigten eine verbesserte Toleranz gegenüber den Kresoxim-methyl bedingten toxischen Effekten bei gleichem Entwicklungszustand in der Kontrolllösung. Dies äußerte sich in einer im Vergleich zu den Kontrollpflanzen größeren Keimlingslänge nach Inkubation in der Fungizidlösung (vgl. Abb.32).

In Anbetracht des geringen Probenumfangs, der für die eingehenden Experimente zur Resistenzprüfung genutzt wurde, sollte in weiteren Experimenten ein wesentlich höherer Probenumfang je Kresoxim-methyl-Konzentrationsstufe eingesetzt werden, um heterogenitätsbedingte Effekte zu minimieren. Außerdem wurden je untersuchtem Konstrukt mehrere individuelle hochexprimierende Pflanzen verwendet, um Effekte, die durch die zufällige Insertion des Transgens im Pflanzengenom in einzelnen Fällen auftreten können, auszuschließen.

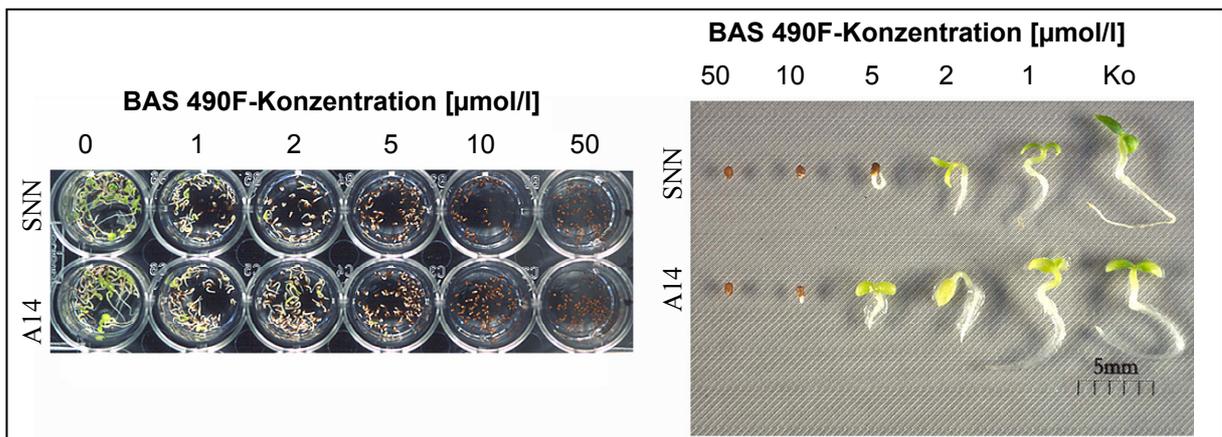


Abb.32.: Darstellung der Ergebnisse aus den Initialexperimenten zur Prüfung der Toleranzeigenschaften der transgenen Linie A mit ubiquitärer Expression und Retention des scFvA6 im endoplasmatischen Retikulum. Es wurden jeweils 30-50 oberflächensterilisierte Samen der Pflanzen SNN (Wildtyp-Kontrolle) und A14 (0,1% [scFv/GLP]) in jeweils 500µl Kresoxim-methyl-Lösung mit einer Konzentration von 0-50µmol/l in $1/2$ MS-Medium+2% Saccharose ausgelegt und die Platten in einem Kulturraum bei einem Hell/Dunkelrhythmus von 16h/8h inkubiert. Acht Tage nach dem Ansatz erfolgte die fotografische Dokumentation des Zustandes der Keimlinge in den Platten (links). Es wurden die jeweils am weitest entwickelten Keimlinge einer Applikationslösung isoliert und dokumentiert (rechts).

Der Keimungsprozeß ist durch einen Anstieg der Biomasse gekennzeichnet. Tests mit Tabakwildtyppflanzen zeigten eine negative Korrelation zwischen der Menge des zugesetzten Kresoxim-methyl während der Keimungsphase und dem resultierenden Frischgewicht der Keimlinge. Je höher die zugesetzte Menge an Kresoxim-methyl während dieses Entwicklungsstadiums war, desto geringer war das am Ende der Keimphase erzielte Frischgewicht. Die Bestimmung der Frischmasse von Pflanzenkeimlingen ist für die Prüfung von toxischen Substanzen eine häufig genutzte Methode, da sie eine sensitive Kontrolle der Phytotoxizität ermöglicht (Mamdouh, 1995; Gong et al., 1999; Guitierrez-Lugo et al., 1999; Gong et al., 2001; Chen et al., 2002). Deshalb wurde als Meßwert für die Hemmung des Keimung durch Kresoxim-methyl die Frischmasse nach einer 28tägigen Inkubationsphase in der Applikationslösung bestimmt. Eine immunmodulationsbedingte Toleranzsteigerung der anti-Kres Pflanzen sollte demzufolge durch eine Erhöhung der Keimlingsfrischmasse nach Inkubation in Kresoxim-methyl-haltiger Lösung im Vergleich zu dem Frischgewicht der Kontrollpflanzen in dieser Lösung meßbar sein.

4.9.1 Ergebnisse der Frischmassebestimmungen nach Applikation von BAS 490F

Zur Prüfung der Toleranzeigenschaften wurde das Frischgewicht einer definierten Menge transgener Keimlinge nach Inkubation in einer Kontrolllösung ohne Kresoxim-methyl bestimmt und mit dem Frischgewicht der äquivalenten Anzahl an Keimlingen nach Inkubation in Kresoxim-methyl-Lösung verglichen. Desweiteren wurde das Experiment parallel mit Wildtyp-Tabakpflanzen und transgenen Kontrollpflanzen (UF9), die einen Einkettenantikörper gegen ein nicht in Pflanzen vorkommendes Hapten (Phenyl-Oxazol) ubiquitär exprimieren und im endoplasmatischen Retikulum akkumulieren, durchgeführt. Da die Keimung durch Kresoxim-methyl gehemmt wird, sollte das Frischgewicht bei den Kontrollpflanzen aufgrund des verminderten Wachstums und damit der verringerten Biomasseproduktion bei Gegenwart des Fungizides während dieses Entwicklungsstadiums gegenüber der Inkubation bei Abwesenheit von BAS 490F vermindert sein. Die erhaltenen Werte für die Kontrollpflanzen und für die transgenen anti-Kres-Pflanzen wurden miteinander verglichen und sollten Aufschluß über den Grad der durch Immunmodulation erzeugten Toleranz gegen das Fungizid während der Keimungsphase geben. Die Ergebnisse der Frischmassebestimmung der Applikationsexperimente sind in den Abb. 34 bis 36 sowie in der Tabelle 8 dargestellt. Das Prinzip des Versuchsaufbaus zur Prüfung der Toleranz der transgenen anti-Kres scFv-exprimierenden Pflanzen gegenüber den toxischen Effekten von Kresoxim-methyl während der Samenkeimung ist in Abb. 33 schematisch dargestellt.

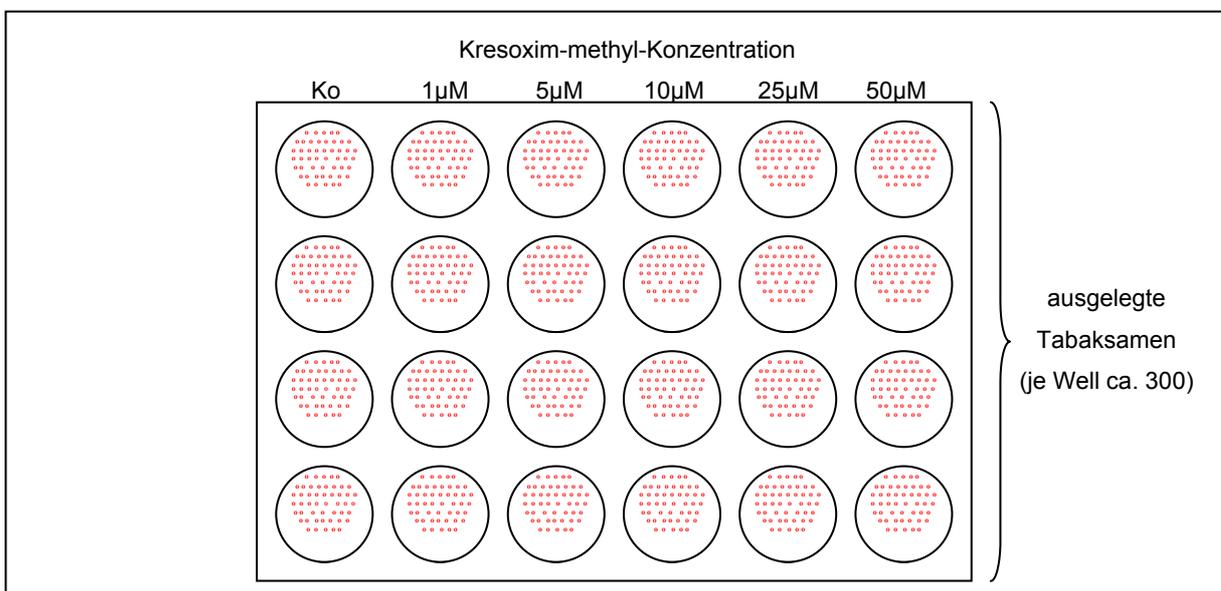


Abb.33.: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Prüfung der Toleranzeigenschaften von transgenen *N.tabacum*-Pflanzen während der Samenkeimung. Die Applikationslösung bestand aus einer Lösung des Fungizides in einer Konzentration von 0 bis 50µM in ½ MS-Medium mit 2% Saccharose. Es wurden jeweils ca. 300 Samen transgener anti-Kres-Pflanzen beziehungsweise von Kontrollpflanzen je Kavität einer 24-Well-Zellkulturplatte zugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 25°C unter stark lichtreduzierten Bedingungen, um die Photosyntheseaktivität zu minimieren und die Nutzung der angebotenen Saccharose als Energiequelle zu maximieren.

Tab.8: Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Frischmassewerte am Tag 28 nach dem Ansatz bei Keimung der Samen von Tabakkontrollpflanzen (WT-SNN und UF-9) sowie von transgenen anti-Kres-Pflanzen in den entsprechenden Lösungen des BAS 490F-Applikationsexperimentes.

Konstrukt	Kresoxim-methylkonzentration in der Inkubationslösung					
	0µM	1µM	5µM	10µM	25µM	50µM
WT-SNN	547±49,5	431±90,5	245±90,5	151±53,5	81,3±33,2	57±5,5
UF-9	587±63,5	443±50,5	300±97,5	205±38	76±16	62±11,5
Cyto_A	542,5±54	485±90,5	273±109	164±66	74±27,5	54±7
Cyto_B	575±38	*552±43,5	*400±78	*263±72	97±26	60±8,5
A	581±47	*553±66,5	*492±57,5	*317±88	140±37	86±24
B	588±38,5	*571±58,5	*494±102	*358±110	109±39	68±12
MA	578±33	*553±33,5	*490±27	*338±89	*170±56	75±21,5
MB	569±31	*536±42	*444±60	*324±63	95±27	60,5±10
UA	578±36,5	*557±40	*473±91	*320±120	*169±59,5	79,5±12,5
UB	600±18	*589±27,5	*532,5±34,	*442±48	*228±83,5	79±15

Die Frischmassen der Gesamtheit der Keimlinge (ca. 300) einer transgenen Linie in der entsprechenden Applikationslösung wurden am Tag 28 nach Applikationsbeginn bestimmt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen berechnet. WT: n=10; UF-9: n= 7; Cyto_A: n=12; cyto_B: n= 11; A: n=11; B: n=12; MA: n=9; MB: n=10; UA: n=9; UB: n=8 (n=Anzahl individueller Pflanzenlinien). Ein Stern und die hervorgehobene Einrahmung kennzeichnet signifikante Unterschiede der Frischmassewerte im Vergleich zu WT-SNN ($p < 0,05$), computergestützt geprüft mit dem Test nach Duncan in „SigmaStat“.

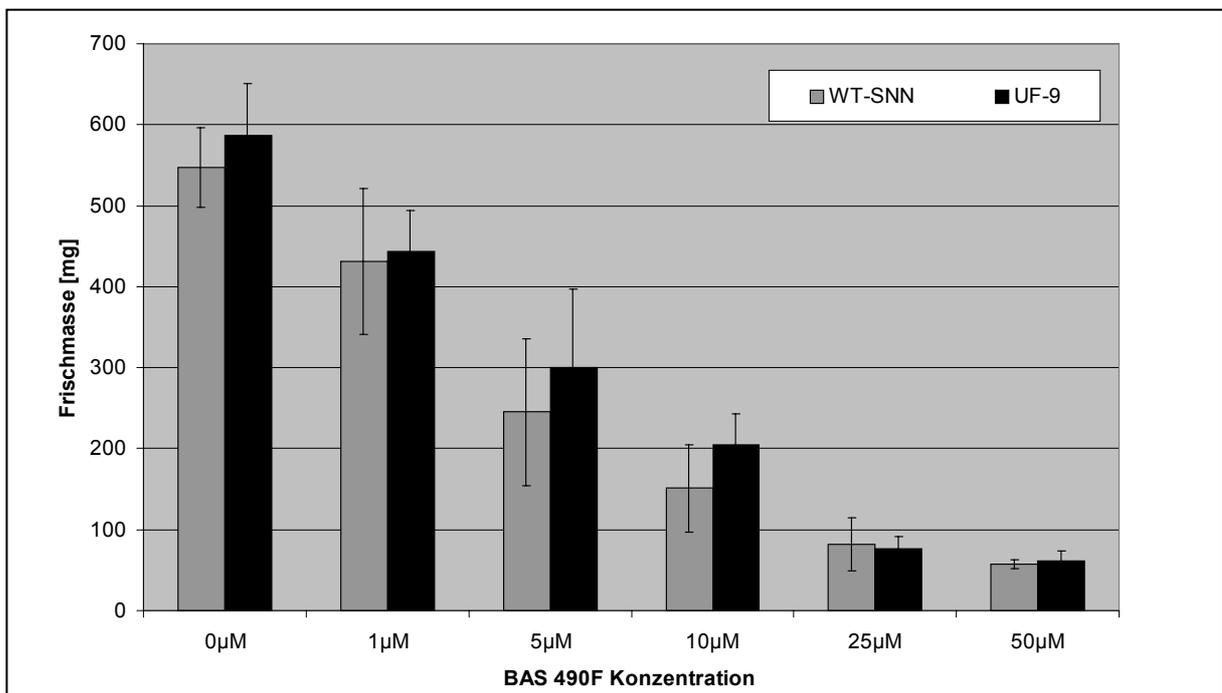


Abb.34.: Darstellung der ermittelten Frischmassewerte aus dem Applikationsexperiment mit Kresoxim-methyl. Die Keimung von Tabak-Kontrollpflanzen (WT-SNN und UF-9) erfolgte in den Lösungen mit verschiedenen Kresoxim-methyl-Konzentrationen (x-Achse). Am Tag 28 nach Applikationsbeginn wurden die Frischmassen der Gesamtheit der Keimlinge (ca. 300) einer Linie in der entsprechenden Applikationslösung bestimmt (y-Achse). Gezeigt ist die durchschnittliche Frischmasse (mit Standardabweichung) der Keimlinge der untersuchten Wildtypkontrollpflanzen (WT-SNN) und der transgenen Kontrollpflanzen (UF-9) nach Inkubation in den entsprechenden Lösungen.

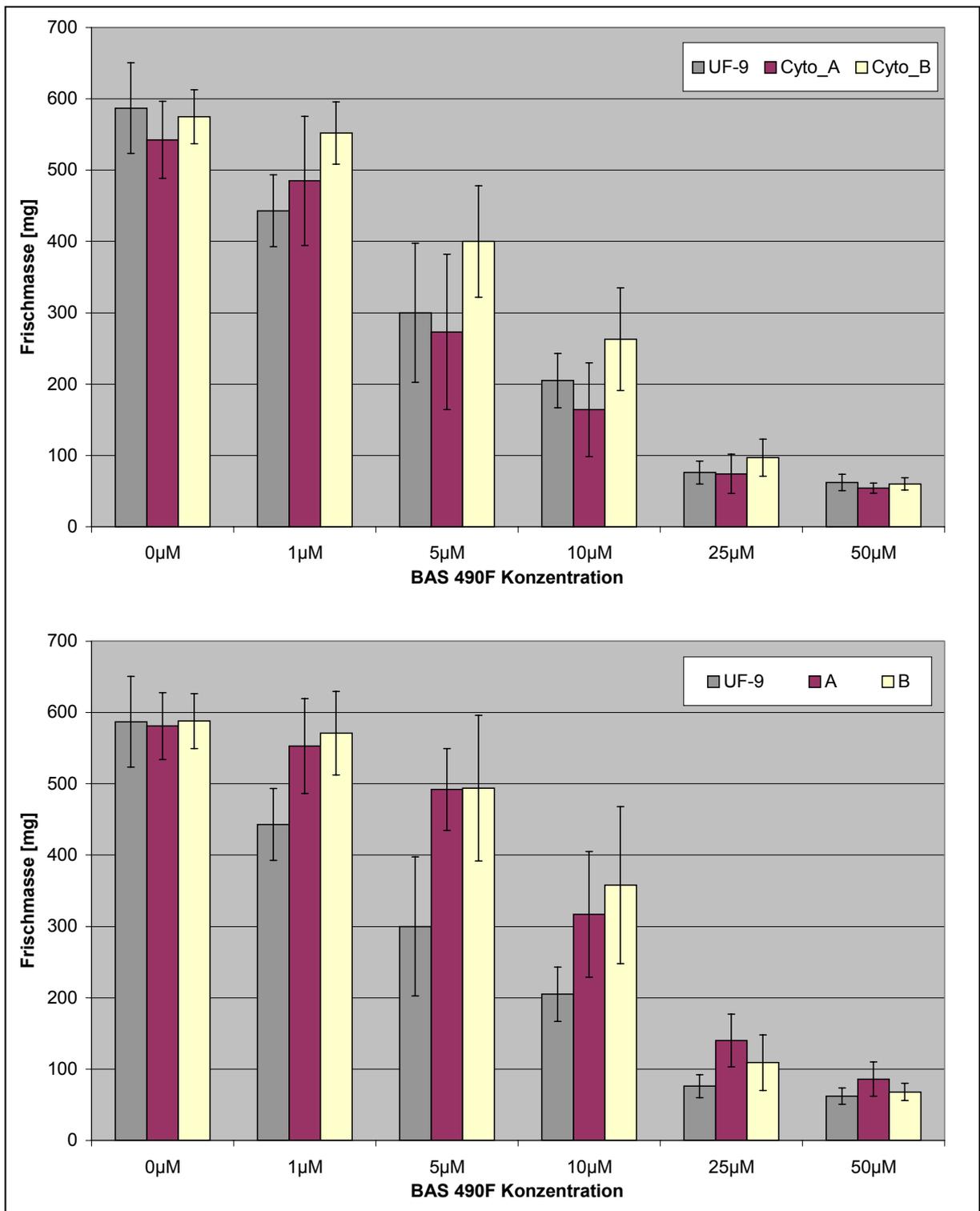


Abb.35.: Darstellung der ermittelten Frischmassewerte aus dem Applikationsexperiment mit Kresoxim-methyl. Die Keimung von transgenen Tabakpflanzen erfolgte in den Lösungen mit verschiedenen Kresoxim-methyl-Konzentrationen (x-Achse). Am Tag 28 nach Applikationsbeginn wurden die Frischmassen der Gesamtheit der Keimlinge (ca. 300) einer Linie in der entsprechenden Applikationslösung bestimmt (y-Achse). Gezeigt ist die durchschnittliche Frischmasse (mit Standardabweichung) der Keimlinge der transgenen Kontrollpflanzen UF-9 und der untersuchten transgenen anti-Kres-Pflanzen mit ubiquitärer zyotosolischer Expression der anti-Kres scFv, CytoA/CytoB, (oben) sowie ubiquitärer Expression und Retention der anti-Kres scFv im endoplasmatischen Retikulum, A/B, (unten).

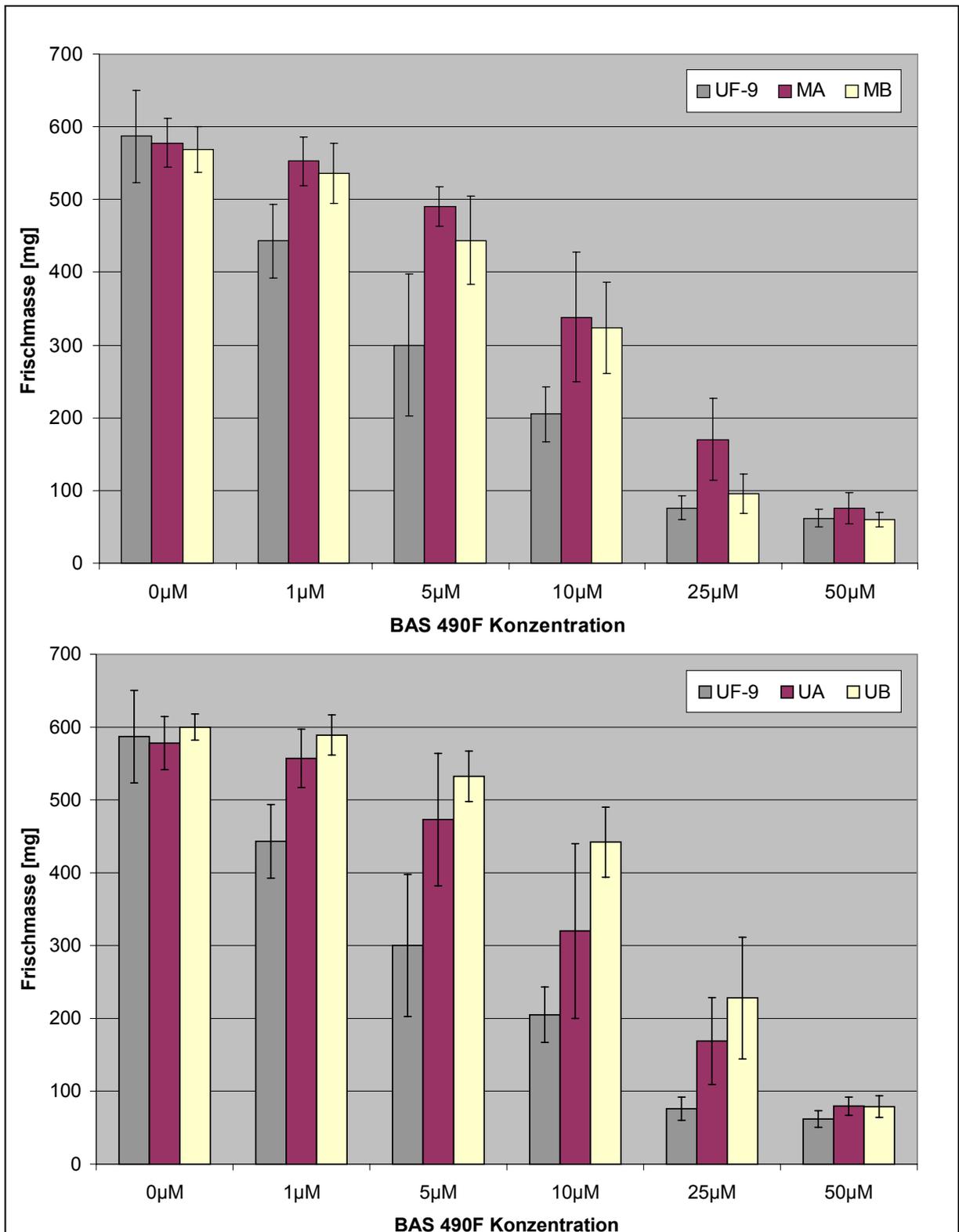


Abb.36.: Darstellung der ermittelten Frischmassewerte aus dem Applikationsexperiment mit Kresoxim-methyl. Die Keimung von transgenen Tabakpflanzen erfolgte in den Lösungen mit verschiedenen Kresoxim-methyl-Konzentrationen (x-Achse). Am Tag 28 nach Applikationsbeginn wurden die Frischmassen der Gesamtheit der Keimlinge (ca. 300) einer Linie in der entsprechenden Applikationslösung bestimmt (y-Achse). Gezeigt ist die durchschnittliche Frischmasse (mit Standardabweichung) der Keimlinge der untersuchten transgenen anti-Kres Pflanzen mit ubiquitärer Expression und Verankerung der anti-Kres scFv in der Plasmamembran der Pflanzenzelle, MA/MB, (oben) sowie samenspezifischer Expression und Retention der anti-Kres scFv im ER der Pflanzenzelle, UA/UB, (unten).

Die Ergebnisse der durchgeführten Frischmassebestimmungen als Biotest zur Prüfung der Toleranzeigenschaften der transgenen anti-Kres Pflanzen zeigen, daß bis auf die Pflanzen der Linie CytoA (zytosolische Expression des anti-Kres scFvA6) durch die Expression von spezifisch BAS 490F bindenden Einkettenantikörpern in verschiedenen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle eine Verbesserung der Toleranz gegenüber den wachstumsverzögernden Effekten des Fungizides erreicht werden kann. Die Kontrollpflanzen (ohne anti-Kres scFv) und die Pflanzen des Konstruktes CytoA zeigten eine um etwa fünfzig Prozent verringerte Biomasseakkumulation bei einer Konzentration des Fungizides von 5µM (siehe Tab.8 und Abb.35, 36). Dieser IC₅₀-Wert lag bei den untersuchten transgenen anti-Kres-Pflanzen der Linien CytoB, A, B, MA, MB, UA und UB in einem Bereich um 10µM BAS 490F, einer Konzentration des Fungizides, die das Wachstum der Kontrollpflanzen um etwa 65% gegenüber dem Wachstum in der Kontrolllösung hemmte. Auch die Pflanzen der transgenen Linien mit Expression der anti-Kres scFv zeigten deutliche Wachstumsverzögerungen nach Applikation des Fungizides (siehe Abb 32). Das Fungizid kann in einem beschränkten Konzentrationsbereich (1-10µM) durch die Expression von spezifischen Einkettenantikörpern nur partiell in seiner phytotoxischen Wirkung während der Keimphase von Tabakpflanzen gehemmt werden. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen und anti-Kres-Pflanzen (vgl. Tab.8) wurde hierbei statistisch unter Nutzung des Programmes „SigmaStat“ mit dem Duncan-Test ($p < 0,05$) überprüft. Bei einer Konzentrationen von 50µM Kresoxim-methyl in der Applikationslösung, konnte kein signifikanter Unterschied im Keimverhalten von transgenen anti-Kres und Kontrollpflanzen (UF, SNN) festgestellt werden. Diese Konzentration führte in allen Fällen zu einer nahezu vollständigen Inhibierung des Keimlingswachstums während der 28-tägigen Inkubationsphase. Von einigen Keimlingen der Applikationsexperimente mit Kresoxim-methyl wurden nach der Bestimmung der Biomasse Keimlingsproteinextrakte durch Extraktion der gesamtlöslichen Keimlingsproteine in einem wäßrigem Puffer gewonnen (vgl. 3.13). Außerdem wurden Proteinextrakte reifer Samen dieser Pflanzen isoliert (vgl. 3.8.1). Die Proteine wurden nach Denaturierung in einem 12,5%-igem PAA-Gel zum Nachweis der Expression des Antikörpers in den Keimlingen beziehungsweise im Samen elektrophoretisch aufgetrennt und die scFv-Proteine immunologisch nachgewiesen (siehe Abb. 37). In Keimlingen und Samen der Pflanzen mit ubiquitärer zytosolischer Expression und ubiquitärer Expression mit Membranverankerung des scFv lag die Menge des scFv-Protein aufgrund der geringen Konzentration der gesamtlöslichen Proteine im Keimlingsextrakt und der damit beschränkten Analysemenge unter der Detektionsgrenze des „Western-Blot“. Bei den Pflanzen mit ubiquitärer Expression und Retention des scFv im endoplasmatischen Retikulum konnten die Einkettenantikörper sowohl im Samen als auch in jungen Keimlingen nachgewiesen werden. Die Pflanzen mit samenspezifischer Expression zeigten erwartungsgemäß eine hohe Akkumulation der Einkettenantikörper im Samen. Aber auch in den Keimlingen dieser Pflanzen wurde das scFv-Protein noch in geringen Mengen experimentell nachgewiesen.

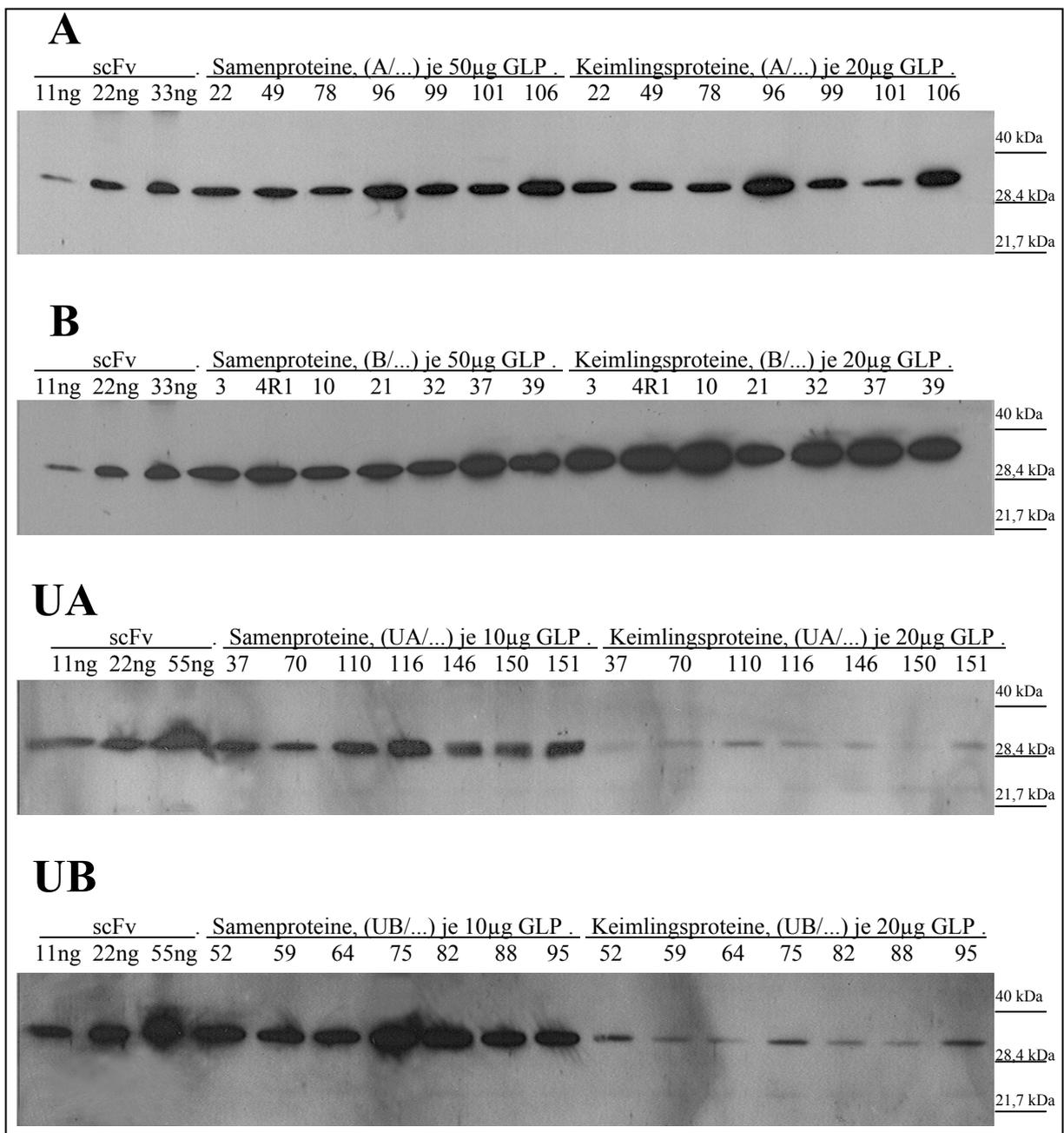


Abb.37.: Nachweis der pflanzlich ubiquitär und samenspezifisch exprimierten und im endoplasmatischen Retikulum akkumulierten anti-Kres scFvA6 und -B8 in Samen und Keimlingen transgener Pflanzen. Es wurden native wäßrige Proteinextrakte von reifen Samen und Keimlingen nach der 28-tägigen Inkubationsphase des Applikationsexperimentes (Keimlingsmaterial entstammte der Kontrolllösung) angefertigt (vgl. 3.8.). Die Proteine wurden nach der Hitzedenaturierung auf einem 12,5%-igem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Elektroblob auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis des scFv-Proteins erfolgte immunologisch durch den Antikörper 9E10, einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG-POD-Konjugat und dem ECL-Kit. Parallel wurden verschiedene Mengen an scFv-Protein bekannter Konzentration als Positivkontrolle mitgeführt (scFv). Aufgetragen wurden jeweils 50µg GLP aus dem Samenproteinextrakt der Pflanzenlinien A und B sowie 10µg GLP aus dem Samenproteinextrakt der Pflanzenlinien UA und UB („Samenproteine“). Außerdem wurden jeweils 20µg GLP aus den Keimlingen der entsprechenden Pflanzen 28 Tage nach dem Inkubationsbeginn aufgetragen („Keimlingsproteine“). Die Größen des MW-Standards sind rechts angegeben.

4.10 Analyse der Expression der anti-Kres scFv in den Nachkommen der transgenen Pflanzen

Ein weiteres Anliegen der vorliegenden Arbeit war die Prüfung der Weitergabe des Transgens an die Nachkommenschaft der Pflanzen und die Stabilität der Genexpression. Hierfür wurde die Insertion des Transgens im Genom der Pflanzenzelle durch „Southern-Blot“-Analysen und die Expression des rekombinanten Proteins durch „Western-Blot“-Analysen von Blattmaterial junger Pflanzen der F₁-, und der F₂-Generation überprüft. Für diese Experimente wurden die Samen der Pflanzen einiger ausgewählter Linien mit einem hohen scFv-Proteinexpressionsniveau in der Elterngeneration (TG₀) auf kanamycinhaltigem MS-Medium zur Keimung gebracht und die genomische DNA von den Kanamycin-resistenten Nachkommen isoliert. Die DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease HindIII gespalten, auf einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, durch Saugblot auf eine Nylonmembran transferiert und die DNA im „Southern-Blot“ durch Hybridisierung mit einem ³²P-markierten DNA-Fragment des scFv-B8 nachgewiesen (vgl. 3.12, siehe Abb.38). Die große Homologie der beiden anti-Kres scFv-Gene A6 und B8 (95,2% Identität auf der Nukleotidebene) erlaubt den Nachweis beider Gene mit der nach *Feinberg & Vogelstein* (1983) markierten Sonde des scFvB8. Die Restriktion der genomischen DNA mit dem Enzym HindIII resultiert in der Bildung eines Fragmentes der Expressionskassette der verschiedenen Konstrukte, da diese von den Schnittstellen dieser Endonuklease am 3' und 5'-Ende flankiert wird (vgl. Abb. 22 und 25). Für die Analyse der Expression des scFv-Proteins wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial dieser Pflanzen gewonnen und im „Western-Blot“ analysiert (vgl. 3.8 und 3.9, siehe Abb. 39).

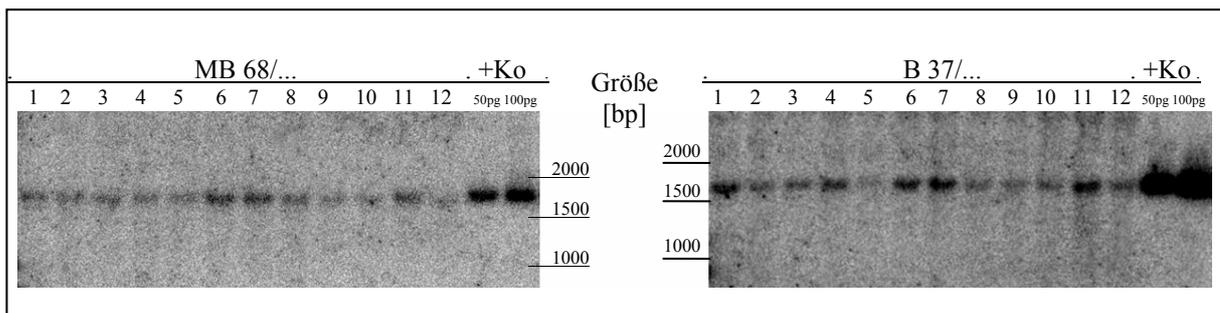


Abb.38.: Nachweis der stabilen Weitergabe der in das Pflanzengenom integrierten Konstrukt-DNA. Genomische DNA verschiedener Nachkommen (MB 68/1-12, linke Seite und B37/1-12, rechte Seite) der Pflanzen MB68 und B37 sowie DNA der für die Transformation verwendeten Binärvektoren („+Ko“: 50pg bzw. 100pg DNA der Plasmide pBIN_MB bzw. pBIN_B aus *E.coli* TG1) wurde mit HindIII gespalten, in einem 1%-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und fixiert. Der Nachweis des Antikörpergens innerhalb der gespaltenen T-DNA erfolgte durch „Southern-Hybridisierung“ mit einem ³²P-markierten anti-Kres-scFvB8-Fragment als Sonde. Die Größen des DNA-Molekulargewichtsstandards sind in der Mitte angegeben.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß das Transgen stabil ist und an die Nachkommenschaft weitergegeben wird. Mit Hilfe von „Southern“-Analysen der Proben nach Spaltung mit einem Enzym, welches nur einen Schnitort im Bereich der integrierten T-DNA aufweist, wie beispielsweise EcoRI, konnte nach Hybridisierung mit einem radioaktiv markierten scFvB8-DNA-Fragment die Kopienzahl des Transgens der entsprechenden Pflanzenlinie ermittelt werden (Daten nicht dargestellt). Dabei zeigte sich, daß bei den Pflanzen B37 und MB68 wahrscheinlich nur ein Integrationsereignis stattfand.

Durch die „Southern“-Analysen der Nachkommenschaft konnte die stabile Weitergabe des Transgens nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob das scFv-Protein in den nachfolgenden Generationen weiterhin stabil exprimiert wird, wurden von den Pflanzen der Nachkommenschaft „Western-Blot“-Analysen durchgeführt (Abb. 39). Die Ergebnisse zeigen, daß das anti-Kres scFv-Gen nicht nur stabil an die Tochtergeneration weitergegeben, sondern auch in den Nachkommen der primären transgenen Tabakpflanzen exprimiert wird. In Abb. 39 ist ersichtlich, daß die Nachkommen der Pflanzen MA95 und MB68 sowohl in der F₁-Generation (z.B. MA95/3, MB68/5) als auch in der F₂-Generation (z.B. MA95/3/7, MB68/5/3) eine stabile Expression der scFv-Proteine zeigen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit anderen Pflanzenlinien (z.B. cytoA128, B37) erhalten (Daten nicht gezeigt).

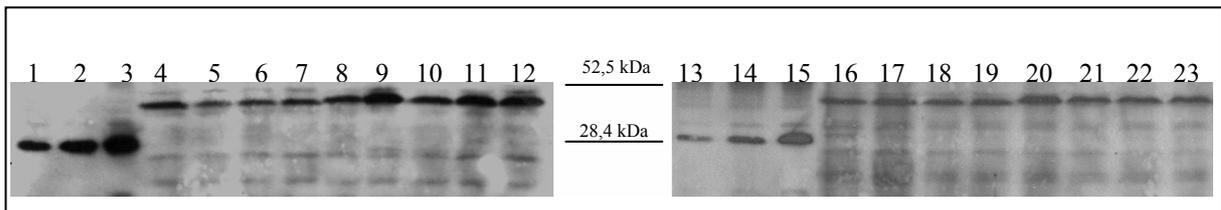


Abb.39.: Nachweis der Genexpression und Vergleich des scFv-Proteingehaltes im Blatt verschiedener Generationen der primären Transformanten MA95 und MB68 mit ubiquitärer Expression und Plasmamembranverankerung des Einkettenantikörpers. Es wurden jeweils 80µg GLP aus Blattmaterial in einem 12,5%-igem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis des scFv-Proteins erfolgte immunologisch mit dem Antikörper 9E10, einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~POD-Konjugat und dem ECL-Kit. Linke Seite: Pflanzen der F₁-Generation (Spur 4-12); rechte Seite: Pflanzen der F₂-Generation (Spur 16-23). Spur 1-3: 10ng, 20ng und 40ng scFv-Protein, Spur 4: MA95/3, Spur 5: MA95/6, Spur 6: MA95/8, Spur 7: MA95/10, Spur 8: MB68/5, Spur 9: MB68/6, Spur 10: MB68/7, Spur 11: MB68/11, Spur 12: MB68/12. Spur 13-15: 11ng, 22ng und 33ng scFv-Protein, Spur 16: MA95/3/7, Spur 17: MA95/3/8, Spur 18: MA95/3/9, Spur 19: MA95/3/10. Spur 20: MB68/5/1, Spur 21: MB68/5/2, Spur 22: MB68/5/3, Spur 23: MB68/5/4. Die Größen des Proteinmolekulargewichtsstandards sind in der Mitte angegeben.

4.11 Hyperexpression durch Fusion des anti-Kres scFv Proteins mit einem Elastinartigen Polypeptid

Da Kresoxim-methyl natürlicherweise nicht in Pflanzen vorkommt und die Expression der gegen dieses Xenobiotika gerichteten Einkettenantikörper zu keinen phänotypischen Veränderungen in Bezug auf die Entwicklung führte (vgl. 4.8), sollte dieses Einkettenantikörperfragment in einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit als Modellantikörper für die Prüfung einer neuartigen Expressionsstrategie sein. Ziel war die Verbesserung des Expressionsniveaus des Einkettenantikörpers durch C-terminale Fusion mit einem synthetischen Elastinartigen Polypeptid (*Chilkoti & Meyer, 1999, Meyer & Chilkoti, 2002*) und damit eine Verbesserung der Toleranz gegenüber höheren Konzentrationen an BAS 490F während der Samenkeimung. Elastinartige Polypeptide besitzen die spezielle Eigenschaft, eine reversible Phasenänderung im Bereich einer sogenannten Transitionstemperatur, deren Höhe von der Sequenz und der Kettenlänge des ELP-Proteins abhängt, zu durchlaufen (*Meyer et al., 2001*). Unterhalb dieser Temperatur ist ihre Löslichkeit in Wasser hoch, darüber aufgrund der Bildung von Proteinaggregaten gering. *Meyer und Chilkoti (1999)* konnten zeigen, daß Thioredoxin-ELP Fusionsproteine durch Nutzung der reversiblen Transitionseigenschaft unter Aktivitätserhaltung der Thioredoxin-Komponente aufgereinigt werden können. In unserer Arbeitsgruppe wurde dieses System für die Aufreinigung von Spinnenseidenproteinen verwendet. Hierfür wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus einem synthetischen Spinnenseidenprotein (Spidroin1, SO1, *Scheller et al., 2001*) und einem ELP definierter Größe ubiquitär in Tabakpflanzen unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimiert und im endoplasmatischen Retikulum akkumuliert. Dabei konnte gegenüber der Expression des SO1-Genes eine Erhöhung der Expressionsrate des SO1-ELP-Fusionsproteins festgestellt werden (*Scheller & Conrad, 2001*). Ähnliche Resultate wurden nach Fusion eines anti-ABA scFv (*Artsaenko et al., 1995*) mit einem ELP erhalten (*U. Conrad, mündliche Mitteilung*). Diese Ergebnisse waren Ausgangspunkt für die Entwicklung spezifischer Expressionskassetten zur ubiquitären Expression und Retention eines anti-Kres scFv-ELP-Fusionsproteins im endoplasmatischen Retikulum mit dem Ziel der Erhöhung des Expressionsniveaus dieses Einkettenantikörpers (B8-scFv). Desweiteren sollte geprüft werden, ob eine gesteigerte Akkumulation des scFv-ELP-Fusionsproteins auch bei ubiquitärer zytosolischer Expression sowie einer samenspezifischen Expression mit ER-Retention festgestellt werden kann. Hierfür wurden ausgehend vom Plasmid pRTRA-SO1~100xELP, der von Dr. Jürgen Scheller erzeugt und zur Verfügung gestellt wurde, anti-Kres scFv-ELP Expressionskassetten erzeugt. Das Plasmid pRTRA-SO1~100xELP enthält das Gen für ein synthetisches Spinnenseidenprotein, fusioniert im 3'-Bereich mit einer synthetischen ELP-Sequenz (siehe Abb. 40). Als ELP-Sequenz diente ein Oligomer aus der einhundertfachen Sequenzwiederholung kodierend für das Pentapeptid [V-P-G-X-G], welches nach den von *Meyer & Chilkoti (1999)* beschriebenen Protokoll synthetisiert wurde.

4.11.1 Konstruktion der Expressionskassetten für die samenspezifische und ubiquitäre Expression eines anti-Kres scFv~ELP-Fusionsproteins

Die samenspezifische Expression des anti-Kres scFv-ELP-Fusionsproteins sollte unter Kontrolle des USP-Promotors erfolgen. Hierfür wurde das bereits beschriebene Konstrukt UB, welches die samenspezifische Expression des anti-Kres Einkettenantikörperfragmentes mit Retention im endoplasmatischen Retikulum ermöglicht (vgl. 4.5.4), als Ausgangsplasmid verwendet. Durch die Einfügung der Sequenz des ELP-Genes als 1572bp großes NotI-Fragment des Vektors pRTRA-SO1~100xELP in den mit NotI linearisierten und anschließend dephosphorylierten Vektor pRTML_UB wurde das Plasmid pRTML_UB~ELP konstruiert (siehe Abb.40). Die korrekte Orientierung der ELP-Gensequenz wurde anschließend durch Restriktionsanalyse nach Spaltung des Plasmides mit den Enzymen DraIII und BamHI überprüft.

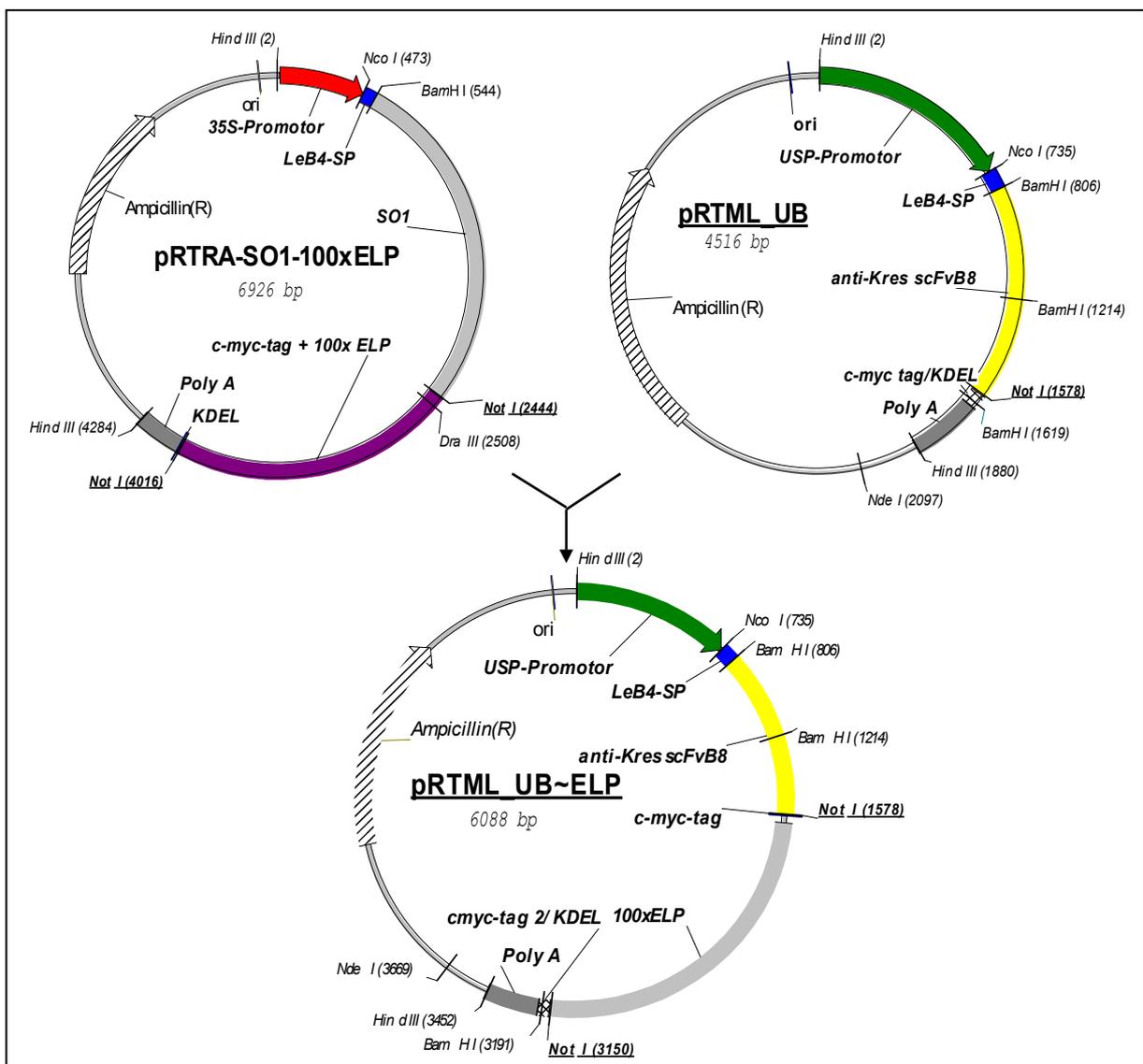


Abb.40.: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Erzeugung des Konstruktes UB~ELP für die samenspezifische Expression des Fusionsproteins mit Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum. Erklärung: siehe Text.

Die Expressionskassetten für die ubiquitäre Expression des anti-Kres scFv-ELP-Proteins unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors wurden durch Austausch der LeB4-Signalpeptid-, und SO1-Gensequenz im Plasmid pRTRA-SO1-100xELP gegen die Gensequenz des anti-Kres scFvB8 beziehungsweise des LeB4-Signalpeptid~scFvB8 erhalten. Hierfür wurde der Vektor pRTRA-SO1-100xELP mit den Enzymen NcoI und NotI gespalten und das resultierende 3383bp große NcoI/NotI-Fragment des Vektorarms (pRTRA) für weitere Klonierungsschritte verwendet. Durch NcoI-NotI-Spaltung des Klonierungsvektors für die ubiquitäre cytosolische Expression des anti-Kres scFvB8, pRTML_cytoB (vgl. 4.5.1) wurde das scFvB8-Gen ohne Legumin-B4-Signalpeptidsequenz als 774bp großes DNA-Fragment isoliert. Das LeB4-SP~scFvB8-Gen wurde durch NcoI/NotI-Spaltung aus dem Klonierungsvektor für die ubiquitäre Expression mit Retention des scFvB8-Proteins im endoplasmatischen Retikulum, pRTML_B (vgl. 4.5.2), als 843bp großes DNA-Fragment erhalten. Die Gensequenz des Elastinartigen Polypeptides (ELP-Gen) wurde aus dem Vektor pRTRA-SO1-100xELP durch NotI-Restriktion erhalten und die 5'-Enden des 1572bp großen DNA-Fragmentes anschließend dephosphoryliert.

Die Erzeugung der Expressionskassette pRTML_cytoB*~ELP, welche durch Fehlen der Sequenz des LeguminB4-Signalpeptides eine pflanzliche zytosolische Expression des scFvB8~ELP-Fusionsproteins unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors ermöglichen sollte, erfolgte in einer 2-Schritt-Ligationsreaktion. Im ersten Schritt wurde das ELP-Gen (NotI-Fragment, dephosphoryliert) an das pRTRA-Fragment (NcoI/NotI) ligiert. Nach diesem Ligationsschritt erfolgte durch Zugabe des anti-Kres scFvB8-Genes als NcoI/NotI-Fragment die Zirkularisierung zum Plasmid pRTML_cytoB*~ELP. Die Kassette zur ubiquitären Expression und Akkumulierung des gebildeten anti-Kres scFvB8~ELP-Fusionsproteins im endoplasmatischen Retikulum der Pflanzenzellen wurde analog konstruiert. Anstelle des anti-Kres scFvB8-Genes wurde hierfür jedoch das 843bp große NcoI/NotI Genfragment LeB4-SP~scFvB8 (Fusion der Gensequenz des LeguminB4-Signalpeptides mit dem anti-Kres scFvB8-Gen) im zweiten Schritt der Ligationsreaktion eingesetzt. Der resultierende Vektor pRTML_B*~ELP enthält die chimäre Gensequenz für die ubiquitäre pflanzliche Expression des anti-Kres scFvB8-Genes mit Retention des gebildeten Fusionsproteins im endoplasmatischen Retikulum aufgrund der Präsenz der Sequenz des LeguminB4-Signalpeptides am 5'-Ende und der KDEL-Sequenz am 3'-Ende des scFvB8-ELP-Genes. Die korrekte Orientierung der ELP-Gensequenz wurde bei beiden Konstrukten durch Restriktionsanalyse mit dem Enzym Bgl I überprüft.

Die Klonierungsstrategie für die Konstruktion der Expressionskassetten für die ubiquitäre Expression des anti-Kres scFvB8~ELP Fusionsproteins ist in Abb. 41 schematisch dargestellt. Die computergestützte Analyse der abgeleiteten Sequenz des nach Expression erhaltenen Fusionsproteins mit dem Programm Lasergene ergab einen theoretisch ermittelten isoelektrischen Punkt von 6,35 und ein Molekulargewicht von 71,2 kDa.

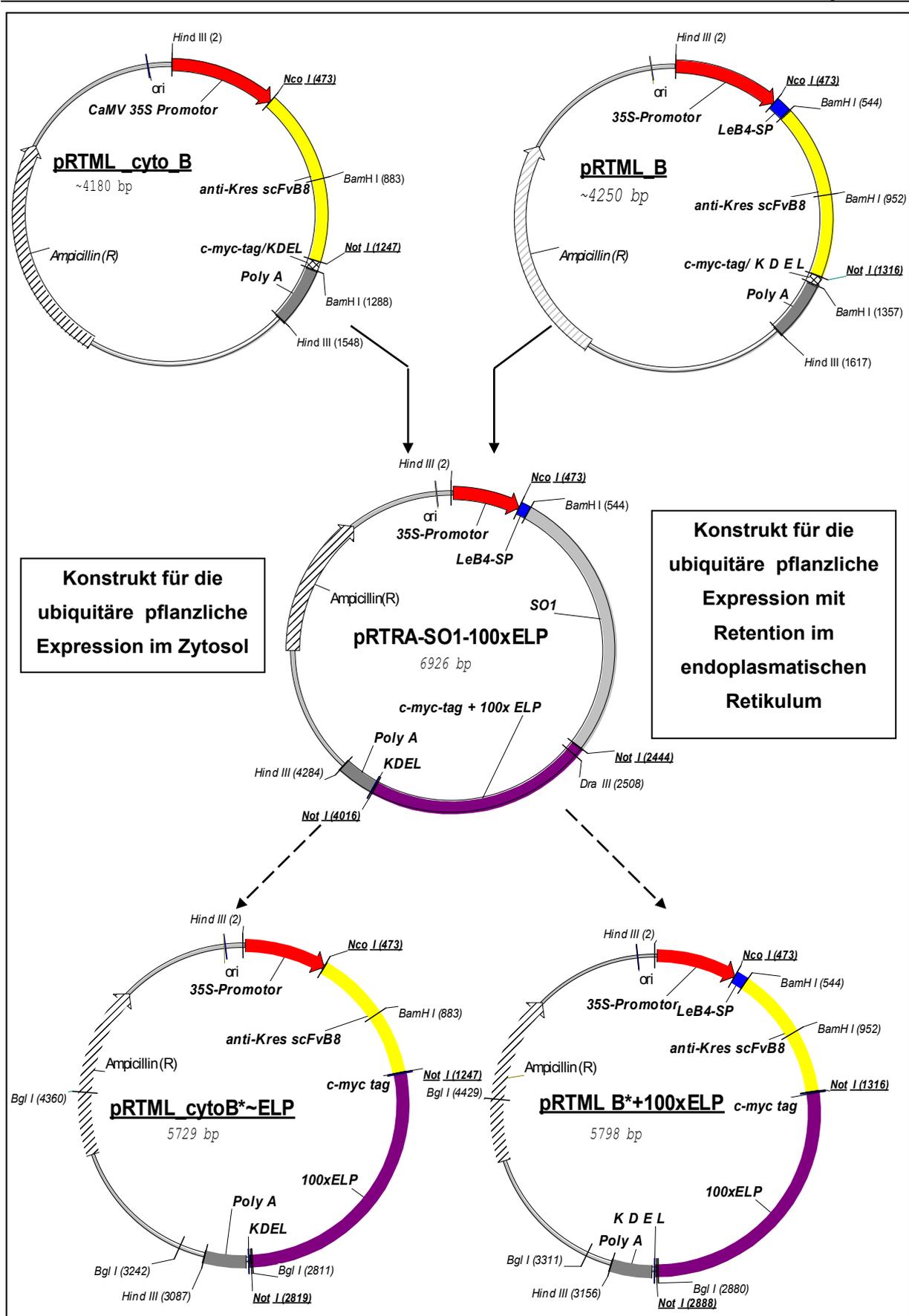


Abb.41.: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Erzeugung der Konstrukte cytoB*~ELP zur ubiquitären cytosolischen Expression (linke Seite) bzw. B*~ELP zur ubiquitären Expression des anti-Kres scFv~ELP-Fusionsproteins mit Retention im endoplasmatischen Retikulum (rechte Seite), Erklärung: siehe Text.

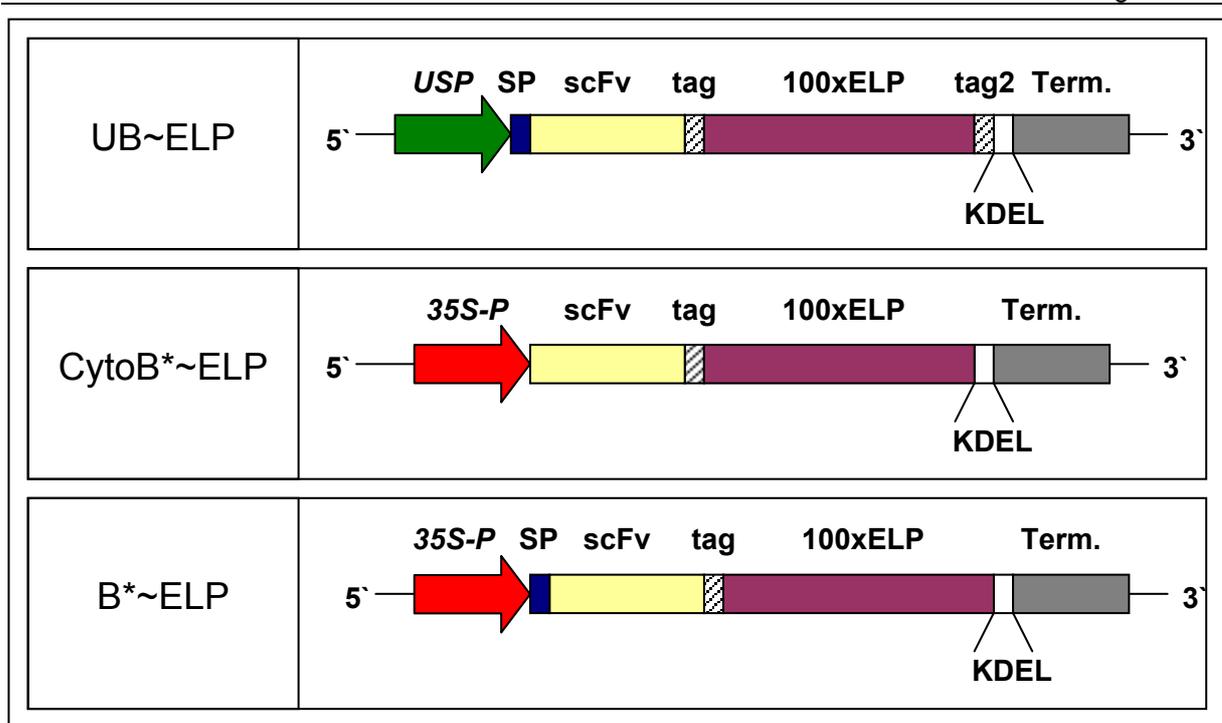


Abb.42.: Schematische Darstellung der für die pflanzliche Expression des anti-Kres scFvB8~ELP-Fusionsproteins erzeugten Konstrukte. UB~ELP: Konstrukt für die samenspezifische Expression und Akkumulation des gebildeten anti-Kres scFvB8-ELP-Proteins im endoplasmatischen Retikulum. CytoB*~ELP: Konstrukt für die ubiquitäre zytosolische Expression des anti-Kres scFvB8-ELP-Proteins. B*~ELP: Konstrukt für die ubiquitäre Expression und Akkumulation des gebildeten Fusionsproteins im ER. **USP:** Sequenz des USP-Promotors von *Vicia faba*; **35S-P:** Sequenz des CaMV-35S Promotors; **SP:** Legumin B4-Signalpeptidsequenz; **scFv:** Sequenz für das anti-Kres scFvB8; **tag/tag2:** Sequenz des c-myc-tag; **KDEL:** Sequenz für das Tetrapeptid KDEL; **100xELP:** Sequenz für das verwendete Elastinartige Polypeptid [V-P-G-X-G]₁₀₀; **Term.:** CaMV 35S-Terminatorsequenz

Aus den Klonierungsvektoren pRTML_UB~ELP; pRTML_cytoB*~ELP und pRTML_B*~ELP wurden die Expressionskassetten (siehe Abb.42) als HindIII-DNA-Fragmente isoliert und in den, mit HindIII linearisierten und anschließend dephosphorylierten, Binärvektor pBIN19 (Bevan *et al.*, 1984, Frisch *et al.*, 1995) kloniert. Die resultierenden Vektoren pBIN_UB~ELP, pBIN_cytoB*~ELP und pBIN_B*~ELP wurden über die Methode der Elektroporation in den *A.tumefaciens*-Stamm pGV 2260 in C58C1 (Deblaere *et al.*, 1985) transformiert (vgl. 3.5). Die erhaltenen Bakterienklone UB~ELP, cytoB*~ELP sowie B*~ELP bildeten die Grundlage für den *A.tumefaciens*-vermittelten Gentransfer in Tabakpflanzen (vgl. 3.6.) zur Regeneration der transgenen Pflanzenlinien UB~ELP mit samenspezifischer Expression und Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum, cytoB*~ELP mit ubiquitärer zytosolischer Expression, sowie B*~ELP mit ubiquitärer Expression und intrazellulärer Akkumulierung des Fusionsproteins im endoplasmatischen Retikulum. Diese Pflanzen wurden nach der Selektion auf kanamycinhaltigem Medium im Gewächshaus kultiviert. Die Analyse der Expressionshöhen des gebildeten Fusionsproteins im Vergleich zum scFvB8-Protein ohne carboxyterminale ELP-Domäne bei entsprechender Lokalisierung des rekombinanten Proteins wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

4.11.2 Expressionsanalyse der Tabakpflanzen mit den chimären Genkonstrukten für die ubiquitäre und samenspezifische Expression des anti-Kres scFvB8~ELP-Fusionsproteins

Im Kapitel 4.7 wurde die Analyse der Pflanzen mit ubiquitärer Expression (cytoA/cytoB, A/B, MA und MB) bzw. samenspezifischer Expression der anti-Kres scFv (UA,UB) beschrieben. Analog sollten durch Analyse der Proteinextrakte aus Blattmaterial der Pflanzen mit ubiquitärer Expression des anti-Kres scFvB8~ELP-Fusionsproteins die Pflanzen der transgenen Linien CytoB*~ELP und B*~ELP hinsichtlich der Expressionshöhe und Funktionalität des Einkettenantikörper~ELP-Fusionsproteins geprüft werden. Um den Gehalt an dem rekombinanten Protein in den transgenen Pflanzen mit ubiquitärer Expression zu bestimmen, wurde Blattmaterial junger Pflanzen dieser Linien geerntet und hieraus Proteinextrakte hergestellt (vgl.3.8.2). Zur Prüfung des Expressionsniveaus und der Funktionalität der scFv-Domäne bei dem samenspezifisch exprimierten scFvB8~ELP-Protein wurden Proteinextrakte aus reifen Samen der transgenen Linie UB~ELP hergestellt (vgl.3.8.1). Nach der Bestimmung der Konzentration der Gesamtheit der löslichen Proteine in den Blatt-, beziehungsweise Samenextrakten wurde eine bestimmte Menge an gesamtlöslichem Protein in einem 10%igem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (vgl.3.9). Der immunologische Nachweis des *c-myc*-tags im rekombinanten Protein erfolgte mit dem Antikörper 9E10 (*Evan et al.1985*), einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~POD-Konjugat und dem ECL-Kit. Anschließend erfolgte die semiquantitative Bestimmung der Menge an *c-myc*-tag haltigem Protein durch Vergleich mit der Signalstärke einer bekannten Menge von aufgetragenem scFv-Protein. Der scFv-Gehalt wurde in Bezugnahme auf die auf das Gel aufgetragene, in dem Proteinextraktionspuffer bei der angewandten Methode löslichen Menge an Gesamtprotein berechnet [%scFv/GLP]. Die Ergebnisse der „Western Blot“-Analysen der Pflanzen mit ubiquitärer beziehungsweise samenspezifischer Expression des scFvB8-ELP-Proteins sind in Tab.9 dargestellt.

Konstrukt	Anzahl der untersuchten Kan ^R Pflanzen	Anzahl der Pflanzen mit Expression	Expressionsniveau [%scFv/GLP]		
			Min.	Max.	Mittel
CytoB*~ELP	45	14	0,5	6	2,3
B*~ELP	8	5	2,5	5	3,5
UB~ELP	14	9	15 ^(**)	20 ^(**)	17 ^(**)

Tab.9: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zur Expressionsanalyse der Pflanzenlinien mit ubiquitärer bzw. samenspezifischer Expression des anti-Kres scFvB8~ELP-Fusionsproteins. Ubiquitäre zytosolische Expression: CytoB*~ELP. Ubiquitäre Expression mit ER-Retention: B*~ELP. Samenspezifische Expression mit Retention im endoplasmatischen Retikulum: UB~ELP. Dargestellt ist die Anzahl der insgesamt je Konstrukt regenerierten und analysierten Pflanzen, der anti-Kres scFvB8~ELP exprimierenden Pflanzen und die Expressionsniveaus im Blatt (cytoB*~ELP und B*~ELP), bzw. im Samen (UB~ELP). Das Expressionsniveau wurde mittels „Western-Blot“-Analysen von Proteinextrakten aus Blattmaterial semiquantitativ bestimmt. Erläuterung (**): siehe Text.

(**) Da das samenspezifisch unter Kontrolle des USP-Promotors exprimierte anti-Kres scFvB8~ELP-Fusionsprotein klonierungsbedingt zwei *c-myc*-tags enthielt (siehe Abb.42), die aufgrund des räumlichen Abstandes zueinander wahrscheinlich die Bindung zweier *c-myc*-tag Antikörpermoleküle je Molekül Fusionsprotein und damit letztendlich auch eine Verdoppelung des in „Western“-Blot Analysen detektierten Signales bewirken, wurde die ermittelte Konzentration nach Vergleich mit scFvB8-Protein bekannter Konzentration (mit einem *c-myc*-tag) mit dem Faktor 0,5 multipliziert. Im Vergleich zu den Pflanzen, die den Einkettenantikörper ohne carboxyterminale ELP-Domäne exprimieren, konnte selbst bei dem recht geringem Probenumfang der untersuchten scFv-B8~ELP exprimierenden Pflanzen eine deutliche Verbesserung des Expressionsniveaus festgestellt werden. Die Analysen der transgenen Pflanzen der Linien CytoB*~ELP und B*~ELP zeigten, daß durch die Fusion des anti-Kres scFv-Proteins mit dem Elastinartigen Polypeptid eine etwa 230-fache Erhöhung der durchschnittlichen Expressionshöhe im Zytosol bzw. eine 14-fache Steigerung dieses Wertes bei Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum erzielt werden konnte. Um diese Unterschiede im Expressionsniveau zu verdeutlichen, wurden die gesamtlöslichen Proteine aus dem Blattextrakt einiger Pflanzen mit ubiquitärer zytosolischer Expression des anti-Kres scFvB8 (Konstrukte CytoB) und der Pflanzen mit ubiquitärer zytosolischer Expression des anti-Kres scFv-B8~ELP-Fusionsproteins auf einem 10%-igem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mittels „Western Blot“ analysiert (Abb.43, links). Auf analoge Weise wurde der Samenproteinextrakt der Pflanzen mit samenspezifischer Expression des anti-Kres scFv B8 (UB) bzw. des Fusionsproteins (UB~ELP) vergleichend analysiert (Abb.43, rechts).

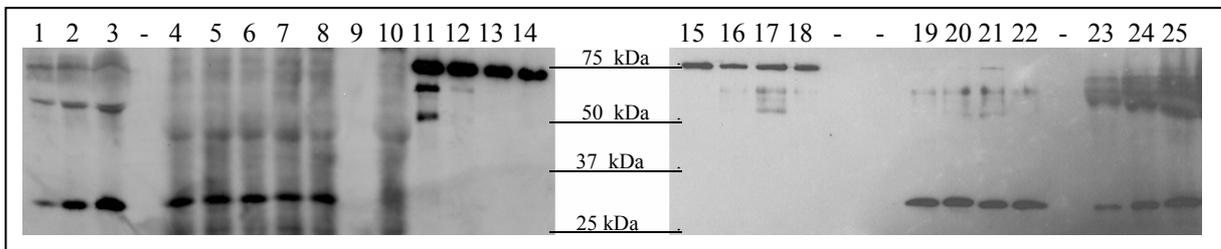


Abb.43.: Vergleichende Darstellung der Expressionshöhen von pflanzlich exprimiertem scFv-B8 und scFv-B8~ELP-Protein nach „Western-Blot“-Analysen. Von den Pflanzen, die das rekombinante Protein ubiquitär im Zytosol exprimierten (CytoB, CytoB*~ELP) wurden die gesamtlöslichen Proteine (GLP) der SDS-Blattproteinextrakte analysiert (linke Seite). Von den Pflanzen mit samenspezifischer Expression (UA, UB, UB~ELP) wurden die Proteine des Extraktes reifer Samen untersucht (rechte Seite). Die entsprechende Menge an GLP wurde nach Denaturierung in einem 10%-igem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und anschließend durch Elektrobplot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der immunologische Nachweis des scFv-Proteins erfolgte mit dem Antikörper 9E10, einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~POD-Konjugat und dem ECL-Kit. Spur 1-3: 10ng, 25ng und 50ng scFv-Protein Spur 4-8 je 80µg GLP: Spur 4: CytoA54/5, Spur 5: CytoA128/1, Spur 6: CytoA128/2, Spur 7: CytoB19/4, Spur 8: CytoB250/4, Spur 9: Wildtyp-SNN, 2µg GLP, Spur 10: Wildtyp-SNN, 80µg GLP, Spur 11-14 je 2µg GLP: Spur 11: CytoB*~ELP 5, Spur 12: CytoB*~ELP 11, Spur 13: CytoB*~ELP 12, Spur 14: CytoB*~ELP 14, Spur 15-18 je 50ng GLP: Spur 15: UB~ELP6, Spur 16: UB~ELP29, Spur 17: UB~ELP48, Spur 18: UB~ELP50, Spur 19-22 je 20µg GLP: Spur 19: UB-64/4, Spur 20: UB-64/9, Spur 21: UA-116/18, Spur 22: UA-116/18/2, Spur 23-25: 10ng, 20ng und 40ng scFv-Protein. In der Mitte sind die Größen des Protein-MW-Standards angegeben.

Die höchste Akkumulation des rekombinanten anti-Kres scFvB8~ELP-Fusionsproteins wurde im Samen ermittelt. Das samenspezifisch exprimierte Protein enthielt klonierungsbedingt zwei *c-myc*-tags (vgl. Abb.42, oben), die durch ihre Entfernung voneinander mit großer Wahrscheinlichkeit die Bindung zweier 9E10-Antikörper zulassen und dadurch eine genaue Quantifizierung erschweren. Das im „Western Blot“, im Vergleich zu samenspezifisch exprimiertem und ebenfalls im endoplasmatischen Retikulum akkumuliertem Einkettenantikörper ohne ELP-Domäne (Konstrukt UB), festgestellte stark erhöhte Expressionsniveau des anti-Kres scFvB8~ELP sollte deshalb mit Hilfe anderer Nachweismethoden verifiziert werden. Hierfür wurde das scFv-ELP-Fusionsprotein aufgrund seiner hohen Akkumulation nach der erfolgten gelelektrophoretischen Auftrennung der Samenproteine der UB~ELP-Pflanzen durch Färbung mit Coomassie-Brilliantblau und durch Silberfärbung (vgl.3.10) als deutliche Proteinbande nachgewiesen (theoretisches MW: ca. 71,2 kDa). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb.44 gezeigt.

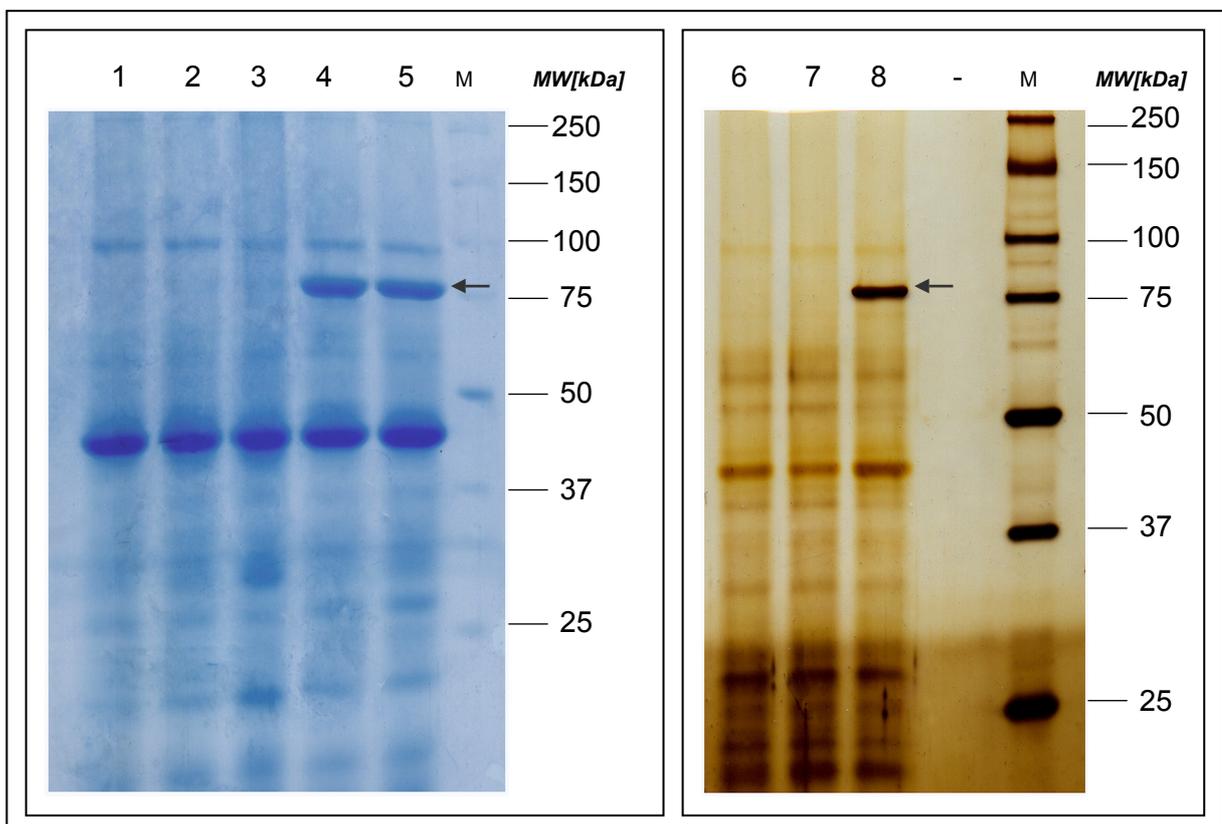


Abb.44.: Nachweis des samenspezifisch exprimierten anti-Kres scFvB8~ELP-Fusionsproteins (Pfeil) durch Färbung mit Coomassie-Brilliantblau (links) bzw. durch Silberfärbung (rechts). Die gesamtlöslichen Proteine (GLP) der Samenproteinextrakte wurden nach Denaturierung in einem 10%-igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend durch Coomassie-Brilliantblau-, beziehungsweise durch Silberfärbung nachgewiesen (vgl. 3.10). Aufgetragen wurden jeweils 50µg denaturiertes GLP für die Coomassieblaufärbung beziehungsweise 5µg GLP für die Silberfärbung. Spur 1: SNN (WT-Kontrolle), Spur 2: UB 64/9 (0,3% scFv/GLP), Spur 3: UA 116/18/2 (0,3 %scFv/GLP), Spur 4: UB~ELP 48, Spur 5: UB~ELP 50 Spur 6: WT-SNN, Spur 7: UB 64/9, Spur 8: UB~ELP29. Die Größen des Protein-Molekulargewichtsstandards sind jeweils rechts angegeben.

4.11.3 Funktionelle Charakterisierung des anti-Kres scFvB8~ELP Fusionsproteins

Nachdem eine stark erhöhte Akkumulation des anti-Kres scFv-Proteins durch Fusion mit einem Elastinartigen Polypeptid festgestellt werden konnte, sollte geprüft werden, ob die scFv-Domäne des pflanzlich exprimierten Fusionsproteins weiterhin funktionell aktiv ist. Hierfür wurden die Antigenbindungseigenschaften des Proteins in indirekten ELISA-Experimenten untersucht. Es wurden native wässrige Proteinextrakte aus Blattmaterial (ubiquitäre Expression, cytoB*~ELP, B*~ELP) bzw. Samen (samenspezifische Expression, UB~ELP) der Pflanzen als scFv-haltiges Reagenz im ELISA mit immobilisiertem Kresoxim-methyl-BSA-Konjugat eingesetzt (vgl.3.11.). Desweiteren wurden kontrollweise die Proteinextrakte aus Blatt bzw. Samen von Pflanzen mit Expression des anti-Kres scFvB8 (scFvB8 ohne ELP-Domäne) und von Wildtyptabakpflanzen (SNN, ohne scFv) eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 45 und Abb.47 dargestellt.

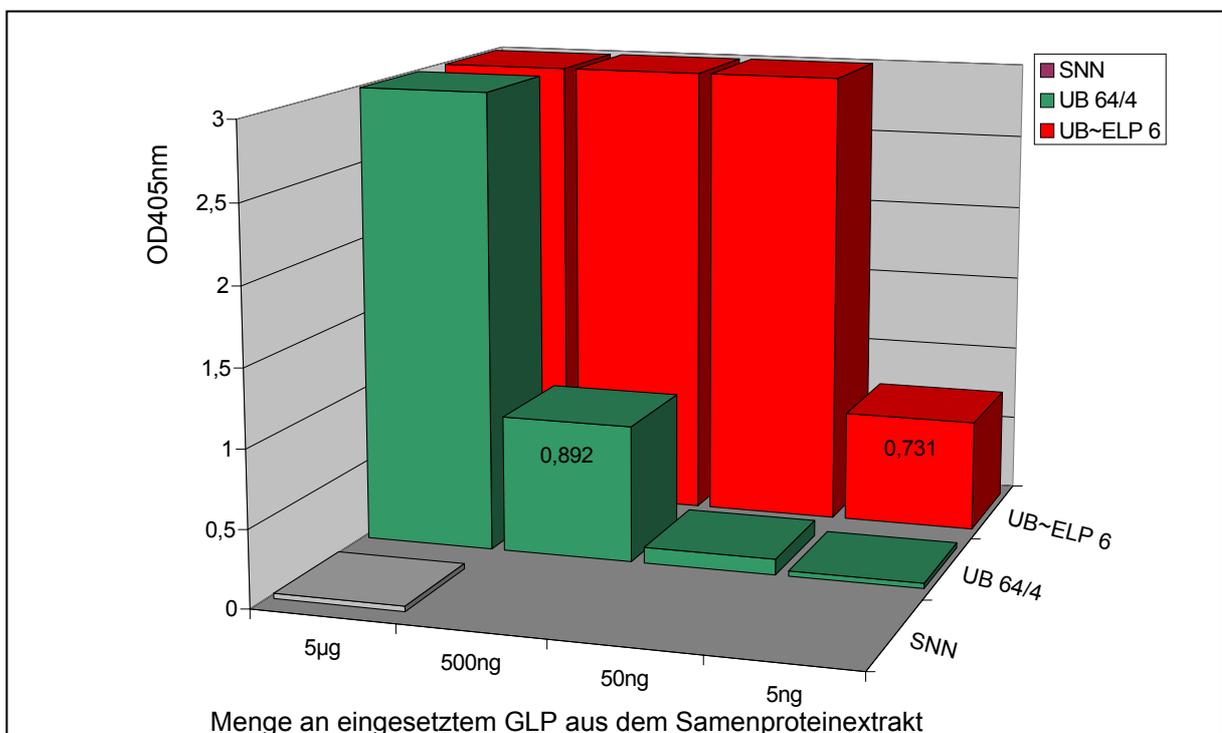


Abb.45.: Vergleich der Antigenbindungseigenschaften des scFv-Proteins mit und ohne ELP-Domäne nach samenspezifischer Expression. Zur Prüfung der funktionellen Eigenschaften der scFv-Domäne des Fusionsproteins wurden native Samenproteinextrakte im indirekten ELISA mit Kres-BSA als immobilisiertem Antigen untersucht. Es wurden verschiedene Mengen an Gesamtlöslichem Protein der nativen Samenproteinextrakte der Pflanzen SNN (Tabak-Wildtyp), UB64/4 (scFv-B8, mit 0,3% scFv/GLP) sowie UB~ELP 6 (scFv-B8~ELP, ~20% scFv/GLP) als scFv-haltige Überstände eingesetzt. Der Nachweis des scFv-Proteins erfolgte nach Inkubation mit dem c-myc-Antikörper 9E10 und einem Anti-Maus-IgG~ALP-Konjugat durch Substratumsatz des zugesetzten pNPP (vgl.3.11). Die Substratumsatzrate wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 405nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt. Dargestellt ist die Substratumsatzrate (OD_{405nm}) im letzten Schritt des ELISA in Abhängigkeit von der eingesetzten GLP-Menge der entsprechenden Samenproteinextrakte (5µg GLP entspricht 2µl des unverd. Extraktes).

Der Samenproteinextrakt der Pflanze UB~ELP 6 zeigt bis zu einer Verdünnung von 1:100.000 (~2,5ng GLP) ein spezifisches Signal durch Bindung an festphasengebundenen Kresoxim-methyl-BSA-Konjugat. Im Vergleich hierzu konnte im Extrakt der Pflanze UB64/4, mit einer Expressionshöhe von 0,3% scFv/GLP, nur in einer Verdünnung von bis zu 1:1000 (~250ng GLP) ein spezifisches Signal detektiert werden. Im Extrakt der Wildtypkontrolle (SNN) wurde erwartungsgemäß kein scFv-Protein nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, daß das durch die Fusion mit einem Elastinartigen Polypeptid in hohen Mengen im Samen akkumulierte scFv-Protein funktionell aktiv ist und Antigenbindungsaktivität besitzt. Desweiteren wurde die Bindung an freies Kresoxim-methyl im indirekten kompetitiven ELISA untersucht. Dabei zeigten das anti-Kres scFvB8 und das anti-Kres scFvB8~ELP Fusionsprotein eine nahezu identische Affinität zum Molekül BAS 490F. Die Inkubation der scFvB8-ELP-Fusionsproteinhaltigen Lösung mit einer Lösung von Kresoxim-methyl in einer Konzentration von $>0,1\mu\text{M}$ führte zu einer Abnahme des Substratumsatzes im letzten Schritt des ELISA aufgrund der veringererten Menge von festphasengebundenem anti-Kres scFvB8~ELP-Protein. Eine etwa 50%ige Inhibierung der Bindung des scFvB8~ELP-Fusionsproteins an festphasengebundenen Kresoxim-methyl-BSA-Konjugat konnte durch Zugabe einer $1\mu\text{M}$ BAS 490F-Lösung erreicht werden (siehe Abb. 46).

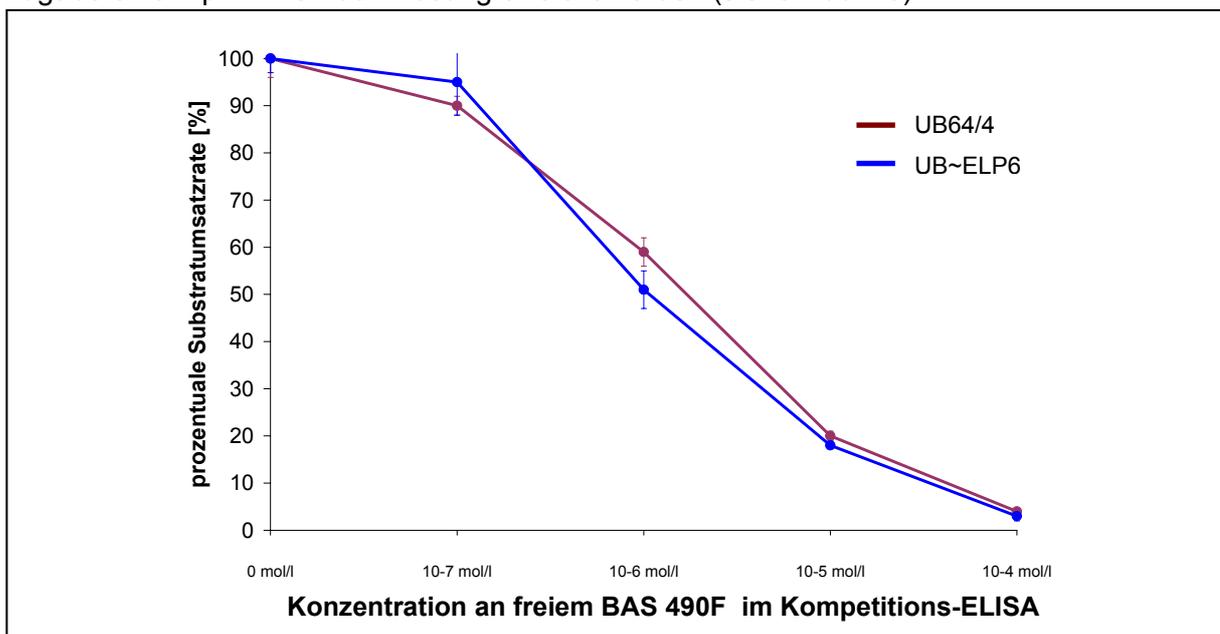


Abb.46.: Vergleich der Antigenbindungseigenschaften von samenspezifisch exprimierten anti-Kres scFv-B8 und anti-Kres scFv-B8~ELP hinsichtlich der Bindung an freies Kresoxim-methyl im indirekten Kompetitions-ELISA. Die Platten wurden mit Kresoxim-methyl-BSA-Konjugat beschichtet, mit der entsprechenden Menge an freiem BAS 490F in PBST im Gemisch mit den in PBST verdünnten Samenproteinextrakten der Pflanzen UB64/4 und UB~ELP6 (anti-Kres scFv enthaltend), und nachfolgend mit dem Antikörper 9E10 und einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~ALP-Konjugat inkubiert. Der Nachweis von enzymgekoppeltem Anti-Maus-IgG erfolgte durch den Umsatz des hinzugefügten Substrates pNPP. Dargestellt ist die prozentuale Inhibierung der Bindung an immobilisiertes Kres-BSA-Konjugat in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an freiem Kresoxim-methyl im ersten Inkubationsschritt mit scFv-haltigem Überstand. Der Umsatz nach Inkubation des scFv-haltigen Überstandes mit 0mol/l Kresoxim-methyl entspricht hierbei 100 Prozent.

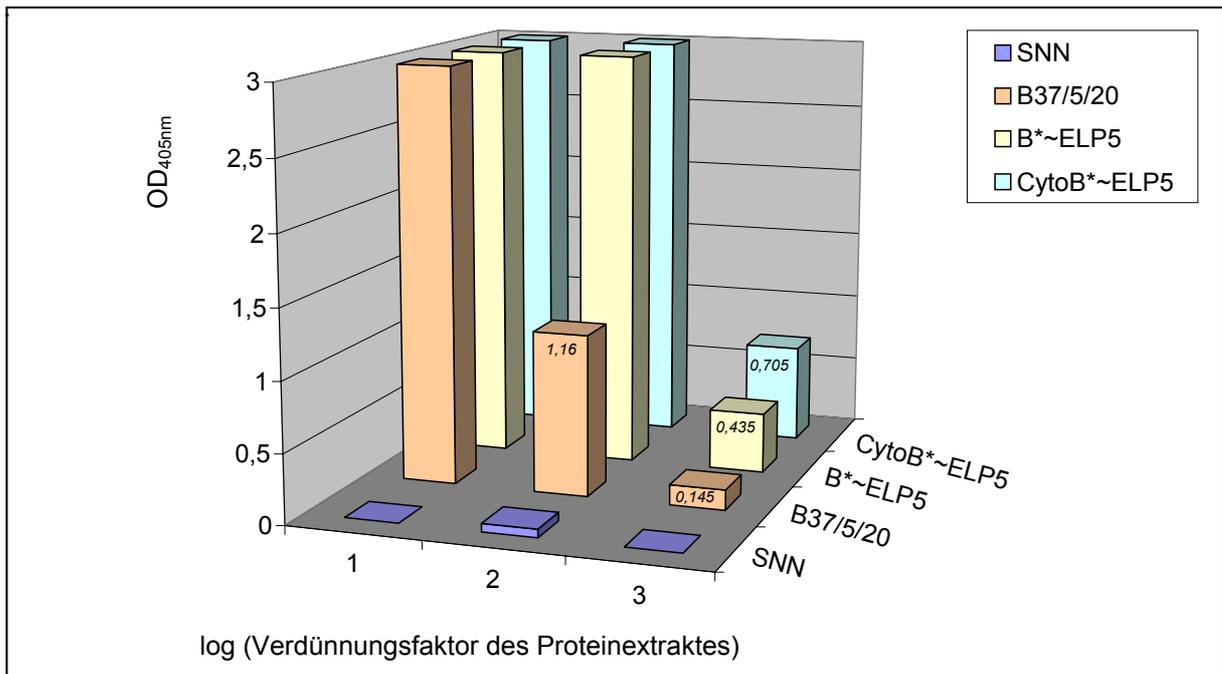


Abb.47.: Vergleich der Antigenbindungseigenschaften des scFv-Proteins mit und ohne ELP-Domäne nach ubiquitärer Expression. Es wurden jeweils verschiedene Verdünnungen der Antikörper-haltigen nativen Proteinextrakte aus Blattmaterial transgener Pflanzen im indirekten ELISA mit Kres-BSA als festphasengebundenem Antigen getestet. Verschiedene Verdünnungen (x-Achse) der wässrigen Blattproteinextrakte der Pflanzen SNN (Tabak-Wildtyp), B37/5/20 (ca. 0,1ng im ELISA eingesetztem scFv bei 10^{-3} -Verdünnung; 0,8% scFv/GLP), B*~ELP 5 (ca. 5ng im ELISA eingesetztem scFv bei 10^{-3} -Verdünnung; 5% scFv/GLP) sowie cytoB*~ELP 5 (ca. 7ng im ELISA eingesetztem scFv bei 10^{-3} -Verdünnung; 6% scFv/GLP) eingesetzt. Der Nachweis des rekombinanten Proteins erfolgte nach Inkubation mit dem c-myc-Antikörper 9E10 und einem Anti-Maus-IgG~ALP-Konjugat durch Umsatz des zugesetzten Substrates pNPP (vgl.3.11). Die Substratumsatzrate wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 405nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt (y-Achse, abzüglich Hintergrundwert).

Der Vergleich der Antigenbindungsaktivität von ubiquitär exprimiertem anti-Kres scFvB8 bzw. anti-Kres scFvB8~ELP-Fusionsprotein zeigte in beiden Fällen eine spezifische Bindung an Kres-BSA-Konjugat bis in einer Verdünnung des scFv-haltigen Überstandes von 1×10^{-3} (siehe Abb.47). Die erhaltenen absoluten Substratumsatzraten im ELISA sind bei den untersuchten Blattproteinextrakten der Linie B*~ELP und cytoB*~ELP aufgrund der höheren Expressionsrate und damit verbunden der etwa 50-70-fach gesteigerten Menge an eingesetztem Antikörperprotein höher als bei einer hochexprimierenden Pflanze der Linie B (siehe Abb.47). Im Gegensatz hierzu ist die spezifische Antigenbindeaktivität, ausgedrückt als Änderung der optischen Dichte bei der verwendeten Wellenlänge von 405nm je Nanogramm eingesetzten scFv-Proteins ($\Delta OD_{405nm}/ng_{scFv}$) unter Einbeziehung der im „Western-Blot“ semiquantitativ ermittelten scFv-Menge bei den untersuchten Blattextraktproben der Pflanzenlinien B*~ELP und cytoB*~ELP unter identischen Bedingungen deutlich niedriger als bei der Linie B. Die spezifische Antigenbindungsaktivität ist bei dem ubiquitär exprimierten und im endoplasmatischen Retikulum der Pflanzenzellen

akkumulierten anti-Kres scFvB8 der Linie B etwa 15-fach höher als bei dem ubiquitär exprimierten scFvB8~ELP-Protein der Pflanzenlinien CytoB*~ELP und B*~ELP. Dieser Wert repräsentiert den Anteil von aktivem Antikörper-Protein am Gesamtgehalt des Einkettenantikörpers im Proteinextrakt. Somit ist dieser Anteil bei dem ubiquitär exprimierten scFv~ELP-Protein deutlich niedriger als bei dem ubiquitär exprimierten scFv ohne ELP-Domäne. Ein großer Anteil des Einkettenantikörperproteins scheint nach Hyperexpression im Blattgewebe durch Fusion mit einem Elastinartigen Polypeptid in inaktiver Form vorzuliegen. Durch einen kompetitiven indirekten ELISA konnte jedoch auch für das ubiquitär exprimierte Protein keine Verschlechterung der Antigenbindeaktivität durch die ELP-Domäne nachgewiesen werden. Sowohl ubiquitär exprimiertes anti-Kres scFvB8 als auch anti-Kres scFvB8~ELP konnte durch Koinkubation des verdünnten scFv-haltigen Extraktes mit freiem Kresoxim-methyl in Konzentrationen von $1\mu\text{M}$ zu etwa fünfzig Prozent in der Bindung an festphasengebundenes Kres-BSA gehindert werden (siehe Abb.48). Die Antigenbindungsaktivität und -spezifität des aktiven Einkettenantikörperproteinanteils im Blattproteinextrakt ist also unverändert.

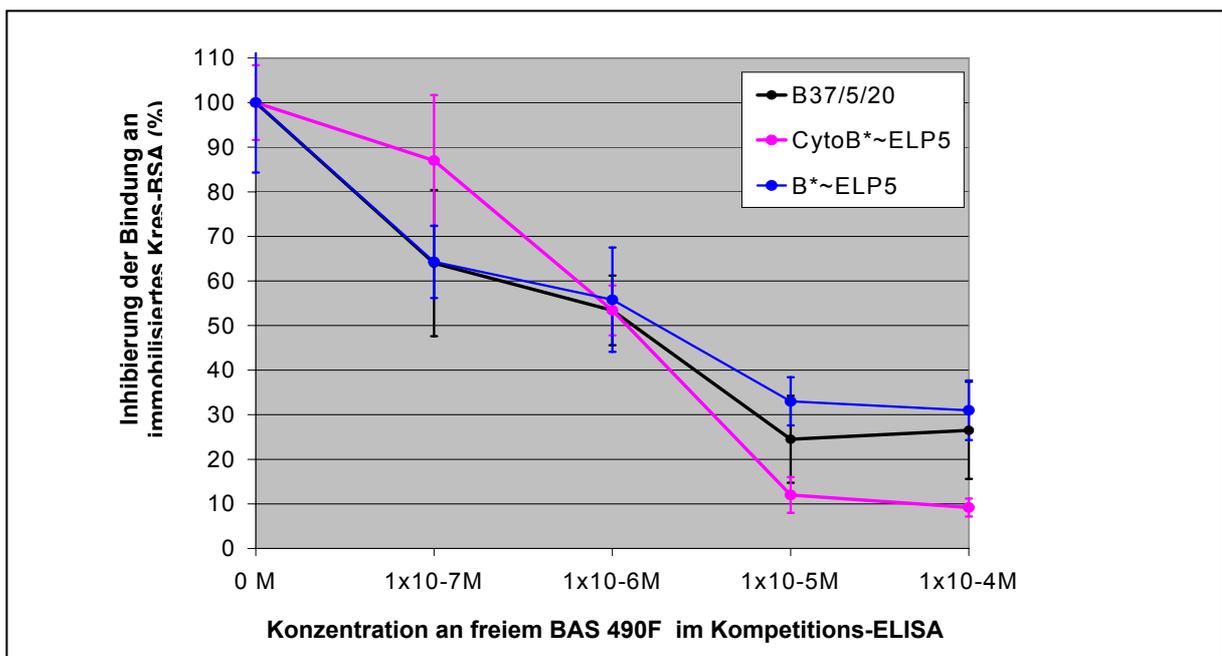


Abb.48.: Vergleich der Bindungseigenschaften von ubiquitär exprimierten anti-Kres scFv-B8 und anti-Kres scFv-B8~ELP hinsichtlich der Bindung an freies Kresoxim-methyl im indirekten Kompetitions-ELISA. Die Platten wurden mit Kresoxim-methyl-BSA-Konjugat beschichtet, mit der entsprechenden Menge an freiem Kresoxim-methyl in PBST im Gemisch mit den in PBST verdünnten Blattproteinextrakten der Pflanzen B37/5/20, CytoB*~ELP 5 und B*~ELP 5 (anti-Kres scFv enthaltend), und nachfolgend mit dem Antikörper 9E10 und einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG-ALP-Konjugat inkubiert. Der Nachweis von enzymgekoppeltem Anti-Maus-IgG erfolgte durch Messung des Umsatzes des hinzugefügten Substrates pNPP ($\Delta\text{OD}_{405\text{nm}}$). Dargestellt ist die prozentuale Inhibierung der Bindung an immobilisiertes Kres-BSA-Konjugat in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an freiem Kresoxim-methyl im ersten Inkubationsschritt mit scFv-haltigem Überstand. Der Umsatz nach Inkubation des scFv-haltigen Überstandes mit 0mol/l Kresoxim-methyl wurde als Bezugsgröße gleich 100 Prozent gesetzt.

Die genauen Ursachen für die niedrigere spezifische Antigenbindungsaktivität und damit dem verringerten Anteil an aktivem Antikörper-Protein trotz erhöhter Menge der ubiquitär exprimierten anti-Kres scFvB8~ELP-Proteine im Vergleich zu anti-Kres scFvB8 ohne ELP-Domäne müssen in weiterführenden Experimenten ermittelt werden. In ELISA-Experimenten, bei denen bakterieller, anti-Kres-scFvB8-haltiger Überstand sowie scFvB8~ELP-Protein haltiger UB~ELP-Samenproteinextrakt mit dem nativen Blattproteinextrakt von Tabak-Wildtyppflanzen und kontrollweise mit dem Puffer PBST präinkubiert wurden, konnte keine Beeinträchtigung der Aktivität durch die im Blattextrakt enthaltenen Inhaltsstoffe festgestellt werden. Die Substratumsatzraten wurden durch den Blattproteinextrakt von Tabak-Wildtyppflanzen nicht verringert. Das von den Pflanzen im Blattgewebe akkumulierte scFvB8~ELP-Protein scheint somit bereits vor dem Zellaufschluß in inaktiver Form vorzuliegen. Bei dem samenspezifisch exprimierten anti-Kres scFvB8~ELP-Protein konnte keine Verschlechterung der spezifischen Antigenbindungsaktivität festgestellt werden. Das im indirekten ELISA erhaltene Signal des eingesetzten UB~ELP-Extraktes (UB~ELP-6) übersteigt in Bezugnahme auf die eingesetzte Menge an gesamtlöslichem Protein das Signal des UB-Extraktes einer Pflanze mit einem Expressionsniveau von 0,3% scFv/GLP (UB64/4) im Samen etwa um den Faktor 90 (vgl. Abb. 45). Dies ist vergleichbar mit den im „Western“-Blot erhaltenen Ergebnissen, bei denen ähnliche Signalstärken entsprechend 10µg gesamtlöslichem Protein aus Samenproteinextrakt der Pflanze UB64/4 und 50ng gesamtlöslichem Protein der Pflanze UB~ELP-6 erhalten wurden.

Aufgrund der vorliegenden Daten kann der Anteil der aktiven scFv-Domäne des rekombinanten Fusionsproteins in den Samen hochexprimierender Pflanze der Linie UB~ELP auf etwa 15-20% am Gesamtproteinanteil geschätzt werden. Genaue Angaben werden nach erfolgter Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins aus Samen der Nachkommen transgener UB~ELP-Pflanzen möglich sein. Das erheblich verbesserte Expressionsniveau des anti-Kres scFvB8 durch Fusion mit einem Elastinartigen Polypeptid könnte möglicherweise auch zu einer im Vergleich bei Expression des anti-Kres scFvB8 ohne ELP verbesserten Toleranz der Keimlinge dieser Linien gegenüber höheren Konzentrationen des Fungizides (>25µM) führen und sollte in weiterführenden Arbeiten geprüft werden. Durch die beschriebene Möglichkeit zur Erhöhung des Expressionsniveaus funktioneller Einkettenantikörper im Samen eröffnen sich mit Hilfe dieser Methode neuartige Möglichkeiten im Bereich der Immunmodulation sowie der kostengünstigen biotechnologischen Gewinnung rekombinanter Einkettenantikörperfragmente.

5 Diskussion

Einkettenantikörper bieten aufgrund ihrer in vielen Fällen mit den parentalen Antikörpern vergleichbaren Antigenbindungseigenschaften (z.B. *Artsaenko et al., 1994, Bird et al., 1988, Bird & Walker, 1991, Devlin et al., 1995*) und ihrer geringen Größe ein breites Anwendungsspektrum in der medizinischen Forschung und Therapie (*Gavilando & Larrick, 2000*). Desweiteren können die rekombinanten Antikörper allgemein für analytische und diagnostische Nachweismethoden verwendet werden (z.B. *Rau et al., 2002; Hill et al., 1999; Xu et al., 1999; Dankwardt, 2000; Terrada et al., 2000; Daly et al., 2001*). Für die genannten Anwendungsgebiete ist eine größere Menge an Protein und damit verbunden die ökonomische Expression der funktionellen Antikörpermoleküle notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde eine deutliche Verbesserung des Expressionsniveaus eines Einkettenantikörpers im Samen von transgenen Tabakpflanzen durch die carboxyterminale Fusion mit einem Elastinartigen Polypeptid erreicht.

Neben der *in vitro* Nutzung biotechnologisch produzierter Einkettenantikörper können diese Moleküle auch *in vivo* für die Zwecke der Immunmodulation genutzt werden. Die Immunmodulation ist eine innovative Technologie zur Modifizierung der biologischen Verfügbarkeit von Molekülen innerhalb der Zelle (*Marasco, 1995; Rondon & Marasco, 1997; Teillaud, 1999, Conrad & Manteuffel, 2001; De Jaeger et al., 2000*). Nachdem diese Strategie erfolgreich im tierischen Zellsystem angewandt wurde, kam dieses System bereits auch mehrfach in Pflanzen zur Anwendung. Durch diese Methode lassen sich neben physiologisch wirksamen endogenen Substanzen, wie beispielsweise Phytohormonen (*Artsaenko et al., 1995; Artsaenko, 1996; Artsaenko et al., 1998; Phillips et al., 1997; Shimada et al., 1999*) auch exogen applizierte und anschließend im Gewebe akkumulierte Antigene durch die Expression spezifischer Antikörper inaktivieren (Übersicht über AK-vermittelte Pflanzenpathogenresistenz siehe *Fischer et al., 2001* sowie *Schillberg et al., 2001*). Durch die Nutzung gewebes-, und entwicklungspezifischer Promotoren sowie intrazellulärer Targetingsignale ist eine spezifische Blockierung des Zielantigens auf Organ-, Gewebe-, und intrazellulärer Ebene zeitlich definiert möglich (*Artsaenko et al., 1998*). In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit zur Verbesserung der Toleranzeigenschaften gegenüber den phytotoxischen Effekten des Fungizides Kresoxim-methyl während der Samenkeimung durch die Expression von funktionellen anti-Kres-Einkettenantikörpern in Tabakpflanzen untersucht. Gegenüber Kontrollpflanzen konnte eine signifikante Verbesserung der Toleranzeigenschaften bei verschiedenen transgenen anti-Kres Einkettenantikörper exprimierenden Pflanzenlinien im Konzentrationsbereich von 1µM bis etwa 10µM BAS 490F nach einer 28-tägigen Applikationsphase festgestellt werden.

5.1 Notwendigkeit zur Erzeugung von Resistenzen gegenüber phytotoxischen Xenobiotika

Aufgrund der ständig zunehmenden Weltbevölkerung und damit verbunden dem stetig wachsenden Bedarf an Nahrungs-, und Futterpflanzen ist eine effektive Nutzung der agrarwirtschaftlichen Flächen notwendig. Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln sichert diese Effektivität durch die Bekämpfung von Phytopathogenen. Neben Insektiziden und Herbiziden zur Bekämpfung von Schadinsekten und kompetitierenden Unkräutern ist der Einsatz von Fungiziden zur Kontrolle von phytopathogenen Pilzen und der Sicherung der Nutzpflanzenqualität notwendig (*Lyr, 1995; Knight et al., 1997*). Moderne landwirtschaftlich genutzte Fungizide sollten selektiv, d.h. spezifisch fungitoxisch und für Mensch, Tier und Umwelt unschädlich sein. Die Ausbildung von Resistenzen phytopathogener Pilze bedingt durch die extensive Anwendung von Fungiziden in der Landwirtschaft und damit einem erhöhten Selektionsdruck macht einen ständigen Fortschritt auf dem Sektor der Erforschung neuer Wirkungsmechanismen von Fungiziden notwendig. Durch Modifizierung einer natürlich vorkommenden Substanz, dem Strobilurin A, begannen Forscher bereits Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts die neue Fungizidgruppe der Strobilurine für die landwirtschaftliche Verwendung zugänglich zu machen (*Beautement et al., 1991, Clough, 1993, Sauter et al., 1999*). Ein synthetischer Vertreter dieser Stoffklasse ist Kresoxim-methyl (vgl. 1.5 und 1.6). Neben hervorragenden fungitoxischen Eigenschaften zur Kontrolle von phytopathogenen Pilzen in Verbindung mit anderen Fungiziden zeigt Kresoxim-methyl einige physiologische Wirkungen auf die Pflanze. Bei adulten Pflanzen konnten ertragssteigernde Effekte nach Kresoxim-methylbehandlung beobachtet werden, die über die fungiziden, gesunderhaltenden Effekte hinausgehen (vgl.1.6). Nachteilig ist jedoch die negative Beeinflussung des Prozesses der pflanzlichen Samenkeimung nach Applikation des Fungizides (*Grossmann & Retzlaff, 1997*). Diese Eigenschaft macht die Entwicklung von Strategien zur Verbesserung der Toleranz von Pflanzen während dieses Stadiums notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Möglichkeit der Toleranzerzeugung durch Modifizierung der Akkumulierung von Kresoxim-methyl am Zielort der pflanzlichen Zelle mittels Expression spezifischer Einkettenantikörper untersucht. Es wird postuliert, daß die Expression von spezifischen Einkettenantikörpern in einem Zellkompartiment aufgrund der Bindung zu einer Anreicherung des entsprechenden Antigenes in jenem Kompartiment führt. Dadurch wird ein Mangel des Antigens in anderen Zellkompartimenten erzeugt (*Conrad & Fiedler, 1998; De Jaeger et al., 2000; Conrad und Manteuffel, 2001*). Durch die Expression spezifischer Einkettenantikörper konnten neben der Modulation von endogenen Wirkstoffen bereits auch Resistenzen gegenüber phytopathogenen Viren erzeugt werden. Dabei wurden die antiviralen scFv-Proteine in verschiedenen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle, wie dem Zytosol (z.B. *Bajrovic et al., 2001, Tavladoraki et al., 1993,*

Zimmermann et al., 1998) und der Zellmembran (Schillberg et al., 2000), mit dem Ergebnis einer verbesserten Resistenz gegenüber den entsprechenden Viren exprimiert. Über die Expression von spezifisch gegen niedrigmolekulare xenobiotische Substanzen gerichtete Antikörper in Pflanzen wurde bisher nur wenig berichtet (Anonym {Porter et al.}, 1997; Longstaff et al., 1998). Die Möglichkeit zur gentechnischen Verbesserung der Resistenz von Pflanzen gegenüber phytotoxisch wirksamen Substanzen erlaubt die Anwendung von ansonsten wirtschaftlich nicht nutzbaren aber äußerst effektiven Pestiziden in der Landwirtschaft. Das Anwendungsspektrum von Substanzen mit ausgeprägter, beziehungsweise mit einer wie im Falle von Kresoxim-methyl entwicklungspezifisch beschränkten, Phytotoxizität könnte dadurch wesentlich erweitert werden. Neben Kresoxim-methyl zeigen auch Fungizide anderer Stoffklassen sowie einige Insektizide teilweise phytotoxische Eigenschaften (Schmitt et al., 1981; Grandmougin et al., 1989; Kahlil & Mercer, 1990; Kahlil & Mercer, 1991; Schaller et al., 1991; Gange et al., 1992; Seymour et al., 1994; Kerkenhaar, 1995; Kuck et al., 1995; Buchenauer, 1995; Hardy et al., 2001; Fairbanks et al., 2000; Taylor et al., 2001; Garcia et al., 2002). Die Auswahl zeigt, daß es nicht immer möglich ist, effektive Pflanzenschutzmittel mit hoher Selektivität für Phytopathogene zu erzeugen. Deshalb wäre es von großem Vorteil, die Toleranz von Pflanzen durch den Transfer entsprechender Gene zu steigern. Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Prinzip der immunmodulationsbedingten Toleranzerzeugung gegenüber den phytotoxischen Effekten des Fungizides Kresoxim-methyl stellt somit ein Modellsystem für die Toleranzerzeugungsteigerung gegenüber eingeschränkt selektiv wirkenden Fungiziden dar.

5.2 Vor- und Nachteile der Gewinnung von Einkettenantikörpern aus Hybridomzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei monoklonale Antikörper sezernierende Hybridomzelllinien (mAK 14/8 C5 3/2 und mAK 14/1G9 H11H9) gewonnen. Diese bildeten die Grundlage für die Gewinnung der Gene für die variablen leichten und schweren Ketten der entsprechenden Immunglobuline für die Synthese der Einkettenantikörper. Beide Hybridomzellen wurden durch Fusion von Milzzellen einer mit Kres-KLH-Konjugat immunisierten Maus mit Maus-Myelomzellen (vgl.4.1.1) erzeugt und sezernierten Immunglobuline des Typs IgG1 mit den leichten Ketten des Typs κ (vgl. 4.1.2 und 4.1.3). In ELISA-Experimenten zeigten beide Immunglobuline eine hohe Antigenbindungsaktivität sowohl für das an Trägerprotein gekoppelte Kresoxim-methyl als auch für das freie Molekül BAS 490F. Es wurde keine Kreuzreaktivität mit den verwendeten Trägerproteinen und einem anderen Trägerprotein-Hapten-Konjugat festgestellt. Durch indirekten kompetitiven ELISA der IgG-haltigen, verdünnten Hybridomzellüberstände konnte die Antigenbindungsaktivität für freies Antigen nachgewiesen werden. Der mAK 14/1G9 H11H9 zeigte dabei gegenüber

dem mAK14/8C5 3/2 eine etwas bessere Affinität und wurde im indirekten kompetitiven ELISA durch geringere Konzentrationen an freiem Kresoxim-methyl in seiner Bindung an immobilisiertes Kres-BSA-Konjugat gehemmt. Der IC_{50} -Wert betrug unter den gewählten Bedingungen beim mAK 14/1G9 H11H9 ca. $1 \times 10^{-6} M$ und bei dem mAK 14/8C5 3/2 ca. $1 \times 10^{-5} M$. Aus der isolierten mRNA wurden durch RT-PCR die Gene für die jeweiligen leichten und schweren Immunglobulinketten isoliert und in einer weiteren PCR-Reaktion zu den Genen der anti-Kres scFvA6 und anti-Kres scFvB8 fusioniert (vgl. 4.2). Durch Fusion des jeweiligen scFv-Genes mit einer Signalpeptidsequenz im Vektor pIT wurden die rekombinanten Antikörpermoleküle in *E.coli* HB2151 als periplasmatische, lösliche und funktionelle Proteine exprimiert (vgl. 4.3). Die im Zytoplasma der Bakterienzelle synthetisierten Einkettenantikörper werden aufgrund der N-terminal mit dem scFv-Gen fusionierten Signalpeptidsequenz in den periplasmatischen Raum translokalisiert und können nach entsprechend langer Kultivierungsdauer aus dem Kulturmedium isoliert werden. Der wichtigste Vorteil der Expression im bakteriellen System ist die schnelle Überprüfung der korrekten Expression der rekombinanten Proteine im „Western Blot“ und die Charakterisierung der Antigenbindungseigenschaften im ELISA. Das gebildete scFv-Protein ist carboxyterminal mit dem *c-myc*-tag fusioniert. Dieses Peptid diente dem einfachen Nachweis mit Hilfe des spezifischen Antikörpers 9E10 (Evan *et al.*, 1985). Hierfür wurden speziell mit diesem Antikörper entwickelte „Western-Blot“ und ELISA-Methoden genutzt. Die im „Western-Blot“ erhaltenen Ergebnisse zeigten die korrekte Expression der anti-Kres scFv-Proteine A6 und B8 (vgl. 4.3.2). In ELISA-Experimenten zeigten beide Einkettenantikörper gegenüber den parentalen Immunglobulinen vergleichbare Antigenbindungseigenschaften (vgl. 4.3.1). Der IC_{50} -Wert nach Zugabe von freiem BAS 490F im kompetitiven ELISA des vom mAK 14/8C5 3/2 abgeleiteten scFv A6 betrug $1 \times 10^{-5} M$, der entsprechende Wert des vom mAK 14/1G9 H11H9 abgeleiteten scFv B8 $1 \times 10^{-6} M$. Somit wurde die Funktionalität der anti-Kres Einkettenantikörper nach korrekter Expression im bakteriellen System nachgewiesen. Neben der von Milstein und Köhler bereits im Jahre 1975 etablierten Methode der Hybridomzelltechnik, die für die Gewinnung der anti-Kres scFv-Gene in der vorliegenden Arbeit erfolgreich angewandt wurde, existieren bereits neuartige verbesserte Verfahren zur Selektion spezifischer scFv-Gene *in vitro*. Diese Methoden sind beispielsweise das Phagen-Display, bei denen das scFv-Protein als Fusionsprotein mit einem Phagenhüllprotein (gIII) auf der Oberfläche eines Bakteriophagen exprimiert wird und aus einem Pool verschiedener scFv's durch Bindung an das Festphasengebundene Antigen angereichert werden kann (z.B.: McCafferty *et al.*, 1990; Hoogenboom *et al.*, 1991; Clackson *et al.*, 1991; Hoogenboom & Winter, 1992; Griffiths, 1993; Griffiths *et al.*, 1993; Griffiths & Duncan, 1998; De Jaeger *et al.*, 1997; Desiderio *et al.*, 2001), das Ribosomendisplay, bei dem die *in vitro* translatierten scFv-Proteine an Ribosomenkomplexen präsentiert vorliegen (Hanes & Plückthun, 1997; Jermutus *et al.*, 2001) sowie das robotergestützte Antikörperarray

(de Wildt et al., 2000). Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der erwähnten Schwierigkeiten bei der Isolation eines stabilen, Kresoxim-methyl bindenden, monoklonalen Antikörpers die Methode des Phagendisplay angewandt. Dabei konnten jedoch keine spezifischen scFv-Proteine mit Affinität zum freien Molekül Kresoxim-methyl isoliert werden (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall erwies sich die klassische Methode der scFv-Gewinnung über die Isolierung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers als geeigneter. Die Entwicklung und Verbesserung der genannten, neuartigen Methoden erleichtert jedoch zukünftige Anwendungen wesentlich, da sie gegenüber dem Verfahren der Hybridomzelltechnik eine wesentlich kostengünstigere Isolation von verschiedenen rekombinanten Einkettenantikörpern in einem kurzen Zeitraum ermöglicht. Durch entsprechend gewählte Bedingungen können mit den Methoden des Phagendisplay, des Ribosomendisplay und des Antikörperarrays außerdem besondere Eigenschaften des Einkettenantikörpers, wie Stabilität, Spezifität und Affinität bereits während der Selektion beeinflusst werden.

5.3 Expression der anti-Kres scFv in Tabakpflanzen

Die im bakteriellen System charakterisierten Einkettenantikörper gegen Kresoxim-methyl wurden für eine pflanzliche Expression nach Erzeugung der entsprechenden Konstrukte mittels *A.tumefaciens* vermittelten Gentransfer in *Nicotiana tabacum* (Var.SNN) zur Expression gebracht. Aufgrund der von *De Jaeger und Mitarbeitern (2000)* sowie *Conrad & Mannteuffel (2001)* postulierten Prinzipien der Immunmodulation (vgl. auch 1.4) wurde das scFv-Protein zur Schaffung artifizierender Sinks des Fungizides in verschiedenen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle exprimiert.

Der Eintritt in den sekretorischen Weg wurde dabei durch das aminoterminal LeB4-Signalpeptid (*Bäumlein et al., 1986*) erreicht. Umfangreiche elektronenmikroskopische Studien in unserer Arbeitsgruppe mit verschiedenen scFv-Gensequenzen bestätigten den Eintritt des rekombinanten Proteins in das endoplasmatische Retikulum der Zellen von Tabakpflanzen und den KDEL-vermittelten Verbleib in diesem Kompartiment sowie davon abgeleiteten Kompartimenten, wie der Kernmembran (*Fiedler, 1996; Artsaenko, 1996*). Fehlt eine derartige Signalpeptidsequenz, kommt es zur Expression und Akkumulation des scFv im Zytoplasma der Zelle (*Biocca et al., 1995*).

Die ubiquitäre pflanzliche Expression der anti-Kres Einkettenantikörper wurde durch den starken konstitutiven CaMV 35S-Promotor kontrolliert. Das höchste Expressionsniveau wurde bei den Pflanzen mit Retention des Einkettenantikörpers im endoplasmatischen Retikulum erreicht (siehe Tab.2, Konstrukte A, B: Abb.23). Das hohe Expressionsniveau kann auf die Fähigkeit zur Bildung von stabilisierenden Disulfidbrücken mit Hilfe des im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Enzyms Proteindisulfidisomerase und die Präsenz

von faltungsunterstützenden Chaperonen (*Gething & Sambrook, 1992; Galili et al., 1998*) zurückgeführt werden. Das höchste Expressionsniveau des Einkettenantikörpers wurde bei den Pflanzen des Konstruktes B mit 0,8% und bei den Pflanzen des Konstruktes A mit 0,5% exprimiertem Einkettenantikörper am gesamtlöslichen Protein bestimmt. Es lag damit deutlich über dem maximalen Expressionsniveau der Pflanzen mit ubiquitärer zytosolischer Expression der anti-Kres scFv (Konstrukte cyto_A und cyto_B, Abb.21). Diese Pflanzen akkumulierten die Einkettenantikörper in Mengen bis zu 0,03% [scFv/GLP] im Blattgewebe. In den meisten publizierten Fällen konnten die entsprechenden Einkettenantikörper ebenfalls nur in geringen Konzentrationen nach zytosolischer Expression nachgewiesen werden (z.B. *Owen et al., 1992, Tavladoraki et al., 1993, Zimmermann et al., 1998, Xiao et al., 2000*). Für die geringe Akkumulierung der Einkettenantikörper im Zytosol der pflanzlichen Zelle sind verschiedene Gründe anzuführen. Der reduzierende Redoxzustand dieses Kompartimentes (*Hwang et al., 1992*) kann zu einer teilweise inkorrekten Faltung und damit zur Instabilität des rekombinanten Proteins führen. Proteasen die zu einer Verkürzung der Halbwertszeit und damit zu einer höheren Umsatzrate und einer verkürzten Lebensdauer des rekombinanten Proteins führen, können ebenfalls die Menge des akkumulierten Proteins herabsetzen (*Biocca et al., 1995*). Desweiteren wurde berichtet, daß die Stabilität von Einkettenantikörpern nach Expression im Zytosol sequenzspezifisch verschieden ist und demzufolge stark variieren kann (*De Jaeger et al., 1999*).

Das Expressionsniveau der Pflanzenlinien A und B war auch höher als das der Pflanzen mit Verankerung des scFv-Proteins in der Plasmamembran (Konstrukte MA und MB, Abb.24). Da die Plasmamembran als Abgrenzung nach außen nur einen geringen Prozentsatz des Volumens der Pflanzenzelle einnimmt, kann trotz des im Vergleich zu den Pflanzen mit ER-Retention niedrigeren Expressionsniveaus von durchschnittlich 0,05% scFv/GLP mit einer lokal hohen Konzentration der Einkettenantikörper in der Plasmamembran gerechnet werden. Die Verankerung in der Plasmamembran mit extrazellulärer Präsentation der Einkettenantikörper wird durch die carboxyterminale Fusion des Antikörperproteins mit der Transmembrandomäne des menschlichen Blutplättchen-Wachstumsfaktorrezeptors (PDGFR, *Gronwald et al., 1988*) erreicht. Der Transport von Proteinen in den extrazellulären Raum erfolgt über das endoplasmatische Retikulum im sogenannten sekretorischen Weg (*Chrispeels 1991, Bednarek & Raikhel, 1992*). Dabei gelangen die Proteine, vermittelt durch ein hydrophobes Signalpeptid am N-Terminus, in das endoplasmatische Retikulum. Anschließend erfolgt über das Golgi-Netzwerk der Transport durch Vesikel an die Zelloberfläche und bei Vorhandensein eines entsprechenden Ankersignales die Verankerung in der Plasmamembran. Nachdem in unserer Arbeitsgruppe erstmalig Versuche zur Nutzung der Transmembrandomäne des PDGFR zur membranspezifischen Verankerung eines Einkettenantikörpers gegen Abscisinsäure durchgeführt wurden (*U.Conrad, mündliche Mitteilung*), untersuchten *Schillberg et al. (2000)* den Einfluß dieser Transmembrandomäne

auf die Kompartimentierung eines antiviralen scFv-Proteins in Tabakpflanzen. Ursprünglich erfolgreich zu Selektionszwecken von membranverankerten Einkettenantikörpern im tierischen Zellen eingesetzt (*Chesnut et al., 1996*), werden die scFv-Proteine in Pflanzen nach carboxyterminaler Fusion mit der PDGFR-TMD nur zum Teil in der Plasmamembran zurückgehalten. Ein Teil des Proteins wird nach der Verankerung in der Membran vermutlich durch extrazellulär lokalisierte pflanzliche Proteasen abgespalten und liegt anschließend im Apoplasten vor. So konnten *Schillberg et al. (2000)* sowohl das membranständige rekombinante Protein als auch prozessiertes Protein in der extrazellulären Flüssigkeit nachweisen. Die Untersuchungen der Blattproteinextrakte von Pflanzen der Linien MA und MB im „Western-Blot“ zeigten kein entsprechend prozessiertes scFv-Protein ohne Transmembrandomäne, sondern nur das größere anti-Kres scFv~TMD-Fusionsprotein (siehe Abb.39). *Schillberg und Mitarbeiter (2000)* postulieren eine proteolytische Schnittstelle im Bereich des *c-myc*-tags, so daß im Apoplasten vorliegendes scFv für einen Nachweis mit dem Antikörper 9E10 (*Evan et al., 1985*) aufgrund des fehlenden *c-myc*-tags nicht mehr zugänglich ist. Die zusätzliche Präsenz der anti-Kres scFv-Proteine im Apoplasten kann jedoch aufgrund der von Schillbergs Arbeitsgruppe ermittelten experimentellen Befunde als sehr wahrscheinlich angenommen werden.

Kresoxim-methyl zeigt eine hauptsächlich auf den Keimprozeß beschränkte Phytotoxizität, die sich in einer konzentrationsabhängigen Verzögerung der Keimung äußert. Deshalb wurde neben der ubiquitären Expression auch die samenspezifische Expression des anti-Kres Einkettenantikörpers in Pflanzen angestrebt. Die „upstream“ vom scFv-Gen eingefügte regulatorische DNA-Sequenz des USP-Genes (*Bäumlein et al., 1991/1*) sollte eine starke Akkumulierung des scFv-Proteins im Samen transgener Tabakpflanzen ermöglichen (Konstrukte UA und UB, vgl. Abb.26). Das erzielte maximale Expressionsniveau im Samen lag bei 0,5% scFv/GLP. Die Akkumulierung im endoplasmatischen Retikulum und abgeleiteten „protein bodies“ wurde durch das aminoterminal LeB4-Signalpeptid und dem carboxyterminalen Retentionssignal KDEL erreicht. Bisherige Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe mit ebenfalls durch den USP-Promotor kontrollierter Expression von Einkettenantikörpern gegen Phenyl-Oxazolone und Abscisinsäure erzielten nach Retention im endoplasmatischen Retikulum deutlich höhere Expressionsniveaus (*Conrad et al., 1998*). Deutliche Unterschiede im Expressionsniveau zwischen den beiden genannten Einkettenantikörpern (anti-ox-scFv und anti-ABA-scFv) lassen jedoch auf eine individuelle, sequenzabhängige maximale Akkumulationsrate schließen.

5.4 Erzeugung von Toleranz gegenüber den phytotoxischen Eigenschaften des Fungizides Kresoxim-methyl während der Samenkeimung

Intrazellulär sind die in der vorliegenden Arbeit erzeugten und funktionell charakterisierten anti-Kres scFv bei den jeweiligen Pflanzenlinien im Zytoplasma (Konstrukte cyto A,B), im

endoplasmatischen Retikulum (Konstrukte A,B) und in der Plasmamembran/Apoplast (Konstrukte MA,MB) lokalisiert. Die samenspezifische Expression und Akkumulierung im endoplasmatischen Retikulum erfolgte unter dem Aspekt der temporär beschränkten Anwendung der Immunmodulation. Das Ziel war die Erreichung einer verbesserten Toleranz gegenüber den phytotoxischen Effekten von Kresoxim-methyl während der Samenkeimung durch Nutzung des im Samen akkumulierten anti-Kres scFv.

Kresoxim-methyl wirkt durch die Hemmung des mitochondrialen bc_1 -Komplexes und damit verbunden der Inhibierung der Atmungskette. Im Gegensatz zur erwartenden breiten bioziden Aktivität zeigt BAS490F eine relativ hohe Selektivität auf Organismenebene. Als Ursachen für diese Selektivität werden artspezifische Unterschiede in den Aufnahme-, Verteilungs- und Detoxifikationsraten und damit Unterschiede in der Bioverfügbarkeit angeführt (Ammermann *et al.*, 1994). Ein weiterer Aspekt für das Ausmaß der Selektivität des Fungizides ist die physiologische Bedeutung der Atmung auf die Vitalität der Organismen in dem jeweiligen Entwicklungszustand. Fettspeichernde Samen zeigen eine Abhängigkeit der Keimung gegenüber Sauerstoff, die Atmungskettenphosphorylierung ist bei diesen Samen zur Bereitstellung der für den Keimprozeß notwendigen Energie wichtig (Raymond *et al.*, 1985). Demzufolge ist eine Hemmung der Keimung dieser Samen durch Inhibitoren der Atmungskette, wie beispielsweise Kresoxim-methyl, zu erwarten. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß Tabak (*Nicotiana tabacum*, SNN) gegenüber dem Fungizid Kresoxim-methyl während der Keimungsphase suszeptibel ist. Es wurde eine konzentrationsabhängige Verzögerung des Keimprozesses dieser Pflanze beobachtet, wobei nach 28tägiger Inkubation in 50µM BAS 490F-Lösung eine nahezu vollständige Hemmung der Keimung festgestellt wurde. Durch Expression von Kresoxim-methyl bindenden Einkettenantikörpern in transgenen Tabakpflanzen wurde eine Verbesserung der Toleranz gegenüber den phytotoxischen Effekten von Kresoxim-methyl während der Samenkeimung erreicht. Dies äußerte sich in einer im Vergleich zu Kontrollpflanzen signifikanten Erhöhung der Frischmasse am Ende der Applikationsphase. Eine Hemmung des Keimprozesses war zwar auch bei diesen Pflanzen eindeutig feststellbar, fiel im Vergleich zu den Kontrollpflanzen jedoch schwächer aus. Im Vergleich zu bisher in Tabakpflanzen durchgeführten Ansätzen der teilweise nahezu vollständigen Immunmodulation von endogenen Regulatorsstoffen (Artsaenko *et al.*, 1995; Artsaenko, 1996; Phillips *et al.*, 1997; Artsaenko *et al.*, 1998; Shimada *et al.*, 1999) wurde eine schwache und auf einen engen Konzentrationsbereich von 1µM bis 10µM beschränkte Wirkung festgestellt. Verschiedene Möglichkeiten können hierfür als Ursachen in Erwägung gezogen werden. Zum einen handelt es sich bei der applizierten Substanz um einen im Vergleich zu endogen vorkommenden pflanzlichen Hormonen in hohen Konzentrationen applizierten Stoff. Das Expressionsniveau der anti-Kres scFv in den transgenen Pflanzen war im Vergleich zu beispielsweise anti-ABA-Pflanzen mit bis zu 10fach höheren Expressionsraten eher niedrig.

Möglicherweise ist die Menge des intrazellulären anti-Kres scFv nicht ausreichend für eine vollständige Neutralisierung des Fungizides. Eine weitere Ursache könnte eine, für die vollständige Bindung und damit Neutralisierung des Wirkstoffes, unzureichende Affinität der Antikörper für das Antigen sein. Hierdurch könnten trotz genügend vorhandener Antikörpermoleküle einige Moleküle des Fungizides in bioverfügbarer Form vorliegen und dementsprechend phytotoxische Wirkung zeigen.

Da die Expression des Einkettenantikörpers gegen Kresoxim-methyl in den gewählten Ansätzen jeweils auf ein Zellkompartiment beschränkt war, ist eine unvollständige Sequestration des Fungizides in diesen artifiziellen Sinks und damit die Möglichkeit des teilweisen Erreichens des Wirkortes ebenfalls ein möglicher Grund der nur partiell ausgeprägten Toleranz. Für eine Verbesserung der Toleranzeigenschaften gegenüber einem phytotoxischen Fungizid durch Immunmodulation sollten aufgrund der genannten möglichen Gründe in zukünftigen Experimenten folgende Punkte berücksichtigt und angestrebt werden:

1. Erhöhung des Expressionsniveaus des Einkettenantikörpers.
2. Verbesserung der Antigenbindungseigenschaften des rekombinanten Antikörpers.
3. Simultane Expression des scFv in verschiedenen Zellkompartimenten zur Schaffung verzweigter artifizieller Sinks.

Ansätze zur Verbesserung des Expressionsniveaus (Punkt 1) werden im nachfolgenden Kapitel diskutiert. Die Antigenbindungseigenschaften (Punkt 2) können beispielsweise durch sogenanntes „grafting“, bei denen die Gensequenzen der hypervariablen Bereiche (CDR) durch gezielte Mutationen und anschließende Selektion der hochaffinen scFv verändert werden oder durch „chain shuffling“ verbessert werden. Beim „chain shuffling“ wird die für die Bindung an das Antigen hauptsächlich verantwortliche VH-Domäne (*Liddell & Weeks, 1996*) eines scFv mit einem Pool diverser VL-Ketten eines Genrepertoires kombiniert (*Marks et al., 1992*). Nach Expression der Proteine und Selektion kann die verbesserte Antikörpergensequenz isoliert und für weitere Zwecke verwendet werden (*Marks et al., 1992*). Die simultane Expression des scFv in verschiedenen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle (Punkt 3) könnte durch die Kreuzung homozygoter Pflanzen verschiedener Linien mit der entsprechenden Lokalisation des rekombinanten Proteins erreicht werden. So könnten beispielsweise durch Kreuzung von MB-Pflanzen mit CytoB-Pflanzen neue transgene Pflanzen regeneriert werden, die den Antikörper gegen Kresoxim-methyl sowohl im Zytosol als auch in der Plasmamembran akkumulieren. Die Zelle würde demzufolge durch die extrazelluläre Präsentation des scFv in der Plasmamembran ein von *Schillberg und Mitarbeitern (2001)* sowie *Fischer und Mitarbeitern (2001)* postuliertes Schutzschild tragen und zusätzlich könnten in die Zelle eingetretene Antigenmoleküle durch intrazellulär vorhandene scFv-Moleküle neutralisiert werden. Bisherige Ansätze zur Immunmodulation durch Expression spezifischer Antikörper in Pflanzen gegen exogen applizierte Antigene wie

beispielsweise Pflanzenviren zeigten meist nur partielle Resistenzeffekte (*Tavladoraki et al., 1993; Voss et al., 1995; Fecker et al., 1997*). Nur in einem Fall ist von einer vollständigen Unempfindlichkeit gegenüber einem Pflanzenvirus durch scFv-vermittelte Immunmodulation berichtet worden (*Bajrovic et al., 2001*). Die in der vorliegenden Arbeit und von anderen Gruppen erhaltenen Daten zeigen, daß sich die Methode der immunmodulationsbedingten Resistenzzeugung noch in der Entwicklungsphase befindet und weitere Verbesserungen notwendig sind.

Bei den Pflanzen der Linie CytoA wurde im Applikationsexperiment keine signifikante Verbesserung der Toleranzeigenschaften festgestellt. In dieser Linie konnten trotz äquivalenter scFv-Expressionshöhen (0,03% scFv/GLP) im Vergleich zu CytoB-Pflanzen keine aktiven Antikörpermoleküle nachgewiesen werden. Bei den Pflanzen der Linie CytoB gelang hingegen der Nachweis von aktivem scFv-Protein in geringen Konzentrationen. Die korrekte Faltung des Proteins in ektopischer Umgebung kann durch kritische Aminosäurereste in den variablen Regionen limitiert werden (*Knappik & Plückthun, 1995; Biocca, 1995*). Beide scFv-Gene weisen Unterschiede in der Primärstruktur auf. Diese Differenzen könnten aufgrund abweichender Faltungseigenschaften zum aktiven Protein im Zytosol die Ursache für den unterschiedlichen Aktivitätsgrad in diesem Kompartiment sein. Desweiteren kann die Aktivität von Einkettenantikörpern im Zytosol aufgrund der Notwendigkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken für die korrekte Faltung des nativen Proteins von scFv zu scFv verschieden sein (*De Jaeger et al., 1999*). Beide Einkettenantikörper tragen jeweils zwei Cysteinreste in den Gerüstregionen der variablen leichten und schweren Ketten. Der fehlende Nachweis der Funktionalität des anti-Kres scFvA6 nach Expression im Zytosol der Pflanzenzelle läßt auf die Notwendigkeit der Ausbildung von Disulfidbrücken für die Aktivität dieses Einkettenantikörpers schließen. Das anti-Kres scFvB8 hingegen ist auch nach Expression im Zytosol in der Lage, das Antigen zu binden. Bei den Pflanzen der Linie CytoB genügte die Menge an aktivem Einkettenantikörper trotz des niedrigen Expressionsniveaus zur Ausbildung einer Toleranz. Im Zytosol von Pflanzenzellen exprimierte Einkettenantikörper wurden trotz niedriger Akkumulationsraten auch von anderen Forschergruppen erfolgreich zur Erzeugung von Toleranzen gegenüber Pflanzenviren angewandt (z.B. *Tavladoraki et al., 1993; Zimmermann et al., 1998*). Es wurde gezeigt, daß neben der Menge an aktivem scFv-Protein auch die zelluläre Lokalisation entscheidend für das Zustandekommen des Antigen-Antikörper-Kontaktes und damit für die Erzeugung von immunmodulationsbedingter Resistenz ist.

5.5 Vor- und Nachteile der Toleranzerzeugung durch Immunmodulation

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Verbesserung der Toleranzeigenschaften von transgenen Tabakpflanzen gegenüber einem entwicklungspezifisch phytotoxisch wirkenden Fungizid durch die Expression von Einkettenantikörpern in verschiedenen

Kompartimenten der pflanzlichen Zelle gezeigt werden. Der Grad der erzielten Toleranz liegt dabei in einem Bereich von etwa zwei. Die transgenen anti-Kres Pflanzen zeigten ein, im Vergleich zu Kontrollpflanzen ohne funktionellen anti-Kres scFv, um den Faktor 2 erhöhtes Frischgewicht nach Keimung in 10µM BAS490F-Lösung sowie einen doppelt so hohen IC₅₀-Wert (10µM gegenüber 5µM). Der Hauptvorteil der Toleranzerzeugung durch Immunmodulation besteht darin, daß der durch die Substanz gehemmte Stoffwechselweg nicht bekannt sein muß. Es genügt, wenn die Substanz in ausreichend reiner Form vorliegt, um spezifisch bindende Antikörper zu selektieren und anschließend in der Pflanze zu exprimieren. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit von physiologischen Nebenwirkungen aufgrund der hohen Spezifität des exprimierten Einkettenantikörpers für die nicht natürlich vorkommende Substanz gering. Neben dieser Form der Toleranzerzeugung existieren weitere Mechanismen zur Verbesserung der Toleranz gegenüber phytotoxisch wirksamen Substanzen durch biotechnologische Methoden. Diese sind primär für die Toleranz gegenüber Herbiziden entwickelt wurden, können aber aufgrund des ähnlichen Verhaltens in der Pflanze prinzipiell auch auf phytotoxische Fungizide übertragen werden (*nach Tsiftaris, 1996; Schulz, 1990; Hock et al., 1995*):

1. Amplifikation der internen Gene (Überexpression des Zielenzymes).

Beispiele für diese Strategie sind beispielsweise die Überexpression des Zielenzymes der Herbizide Glyphosat oder Phosphinotricin. Trotz reduzierter Wachstumsraten konnte hierdurch eine vierfach gesteigerte Toleranz gegenüber den Herbiziden erreicht werden.

Da der Wirkort von Kresoxim-methyl erforscht wurde, wäre die Anwendung dieses Mechanismus zur Toleranzerzeugung ebenfalls denkbar. So könnte eine Überexpression der entsprechenden Komponente des bc₁-Komplexes, dem Q_o-Ort, in Mitochondrien zu einer verbesserten Toleranz der transgenen Pflanzen gegenüber Strobilurinfungiziden führen.

2. Transfer von Genen für Xenobiotikaresistente Proteine (verändertes Zielenzym mit niedriger Suszeptibilität).

Ein Beispiel hierfür ist die Expression eines mutierten Enolpyruvyl-Shikimat-3-Phosphat-Synthase Genes aus *Salmonella typhimurium* in transgenen Tabakpflanzen. Dies führte zu einem höheren Grad der Toleranz (bis hin zur völligen Unempfindlichkeit) gegenüber dem Herbizid Glyphosat als durch die obengenannte Überexpression des natürlichen Zielproteins erreicht wurde. Der Nachteil dieser Methode ist eine häufig verringerte Funktionalität des modifizierten Zielproteins aufgrund von Veränderungen am aktiven Zentrum.

Punktmutationen im Cytochrom b-Gen wurden bereits mehrfach als Ursache für die Bildung einer natürlichen Resistenz ehemals suszeptibler phytopathogener Pilze gegenüber Strobilurinen angegeben (z.B. *Kraiczky et al., 1996; Gisi et al., 2000; Sierotzki et al., 2000/I & II*). Für die Erzeugung einer Toleranz gegenüber BAS 490F wäre analog die mitochondriale Expression eines mutierten Cytochrom-b-Genes in transgenen Pflanzen denkbar.

3. Transfer von Genen, die für Xenobiotika-modifizierende Enzyme kodieren und entweder die Modifikation, den Metabolismus oder die Konjugation des Herbizides katalysieren. Das Resultat ist die Detoxifikation der Substanz.

Der Vorteil dieser Strategie ist, daß die Aktivität des Zielenzymes nicht beeinträchtigt wird, wie dies bei der Strategie (2) der Fall sein kann. Nachteilig könnte eine eventuelle Interferenz mit dem pflanzlichen Stoffwechsel aufgrund der simultanen Metabolisierung eines endogenen Substrates sein. Beispiele für modifizierende Enzyme sind Oxidasen, Amidasen, Decarboxylasen oder konjugative Systeme wie z.B. die Glutathion-S-Transferase. Durch die Expression einer Phosphinotricinacetyltransferase (PAT) aus *Streptomyces hygroscopicus* in transgenen Tabakpflanzen konnte eine Toleranz gegenüber Phosphinotricin erzeugt werden, die der 10fachen Menge der für Feldapplikationen notwendigen Menge entspricht. Ein anderes Beispiel ist die Expression der Blasticidin S-Deaminase aus *Aspergillus terreus*, die in *N. tabacum* und *A. thaliana* zur Blasticidin S-Toleranz führt (Tamura et al., 1995).

4. Reduktion der Substanzaufnahme durch Überexpression von Proteinen, die den Austransport fördern oder die Aufnahme hemmen (theoretische Überlegung).

Das „Multidrug Resistance Protein 1“ (MRP1) beispielsweise ermöglicht den Austransport von toxischen Xenobiotika (Leslie et al., 2001) und könnte demzufolge nach Überexpression eine Erniedrigung der Konzentration von toxischen Substanzen in der Zelle bewirken.

Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Resistenzfaktor von zwei zeigt, daß der durch die Methode der Immunmodulation erreichte Grad der Toleranz im Vergleich mit konventionellen Methoden der Toleranzverbesserung gegenüber Xenobiotika (Resistenzfaktoren von 4-fach bis >>10fach) als verhältnismäßig niedrig einzustufen ist. Demzufolge ist diese Strategie vermutlich nicht auf eine landwirtschaftliche Anwendung ohne weitere Verbesserungen, die in 1.4. diskutiert wurden, übertragbar.

5.6 ELP-Fusion als Möglichkeit zur Erhöhung des Expressionsniveaus von Einkettenantikörpern in der Pflanze

Da der Grad der erzielten Toleranz in dem engen Konzentrationsbereich von 1µM bis 10µM aufgrund der hohen Aufwandmenge an Kresoxim-methyl zur Kontrolle von phytopathogenen Pilzen für eine kommerzielle Anwendung der Strategie vermutlich nicht vertretbar ist, sollte für zukünftige experimentelle Untersuchungen durch die Erhöhung des Expressionsniveaus des anti-Kres scFv eine Erweiterung des Toleranzbereiches angestrebt werden.

Für die Erhöhung des Expressionsniveaus rekombinanter Proteine gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die Stabilität des Proteins kann durch gezielte Veränderungen der Gensequenz bei Beibehaltung der funktionellen Eigenschaften erhöht werden. Im Falle der Einkettenantikörper ist dies u.a. beispielsweise durch sogenanntes „loop grafting“ möglich. Bei dieser Methode werden die Gensequenzen der hypervariablen Bereiche (CDR) eines

isolierten, instabilen scFv mit der DNA-Sequenz der Gerüstregionen (FR) eines bereits als stabil charakterisierten scFv kombiniert (*Jung & Plückthun., 1997*). Das anschließend exprimierte rekombinante scFv-Protein besitzt die Eigenschaft der Antigenbindung des „CDR-Donors“ und die Eigenschaft der verbesserten Stabilität des „FR-Donors“. Der Nachteil dieser Methode liegt in dem relativ hohen experimentellen Aufwand. Weitere Möglichkeiten zur Verbesserung der Stabilität und damit der Erhöhung des Expressionsniveaus bestehen in der gezielten Selektion von stabilen Einkettenantikörpern unter entsprechenden Bedingungen während des Selektionsvorganges im „Phagen-Display“ oder nach Einführung von Mutationen in die Gensequenz eines bereits isolierten scFv und nachfolgender Selektion stabiler Proteine durch „Ribosomendisplay“ (*Jermutus et al., 2001*).

Eine experimentell einfacher zu realisierende Methode ist die Kombination der rekombinanten Gene mit bestimmten RNA-stabilisierenden/translationsfördernden Sequenzen (z.B. 5`-oder 3`-untranslatierte Bereiche der mRNA geeigneter Gene). Durch die Verbesserung der mRNA-Stabilität beziehungsweise der Translationseffizienz konnte hierdurch eine deutlich Verbesserung des Expressionsniveaus erreicht werden (*Gallie, 1996; Ali & Taylor, 2001; Chaubet-Gigot et al., 2001; Hulzink et al., 2002; Xu et al., 2002*). Neben einer Verbesserung auf Transkriptionsebene kann auch die Stabilität der rekombinanten Proteine direkt durch die Fusion mit bestimmten Proteinsequenzen erhöht werden. Hieraus resultiert ebenfalls ein erhöhtes Expressionsniveau. Durch die aminoterminal Fusion von verschiedenen Proteinen mit Ubiquitin konnte beispielsweise eine deutliche Erhöhung des Expressionsniveaus der Fremdproteine in Tabakpflanzen erreicht werden (*Hondred et al., 1999*). Versuche mit Einkettenantikörpern zeigten eine Verbesserung des zytosolischen Expressionsniveaus nach Fusion mit einem stabilisierenden Protein. *Schouten und Mitarbeiter (1996 und 1997)* konnten beispielsweise durch die carboxyterminale Fusion eines Einkettenantikörpers mit dem Tetrapeptid KDEL eine starke Verbesserung des Expressionsniveaus des rekombinanten Proteins im Zytosol erreichen. *Spiegel und Mitarbeiter (1999)* erreichten eine drastische Steigerung der Menge an akkumulierten Antikörperprotein durch Fusion eines antiviralen scFv mit dem, im Zytosol sehr stabilen, Hüllprotein des Tabakmosaikvirus. Als Hauptgrund für die verbesserte Expressionsrate im Zytosol wird die Verbesserung der Stabilität der scFv-Domäne durch einen vom Hüllprotein vermittelten Schutz vor Proteasen angenommen. Die Antigenbindungseigenschaft wurde durch die Fusion mit dem Fremdprotein nicht beeinträchtigt.

In unserer Arbeitsgruppe konnte eine Verbesserung des Expressionsniveaus im Blatt sowohl eines pflanzlich ubiquitär exprimierten und im endoplasmatischen Retikulum akkumulierten synthetischen Spinnenseidenproteins (*Scheller et al., 2001*), als auch eines Einkettenantikörpers gegen ABA (*Artsaenko et al., 1994*) durch die Fusion mit einem Elastinartigen Polypeptid erreicht werden (*U.Conrad und J.Scheller, mündliche Mitteilung*). Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde diese Expressionsstrategie auf das

anti-Kres scFvB8 übertragen. Hierbei kam es ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung des Expressionsniveaus in den Pflanzen mit ubiquitärer Expression und Retention des rekombinanten Proteins im endoplasmatischen Retikulum. Die durchschnittliche Menge an akkumuliertem scFv-Protein im Blatt transgener Pflanzen wurde dabei um den Faktor 14 gesteigert. Das aufgrund des Fehlens einer aminoterminalen Signalpeptidsequenz zytosolische Expressionsniveau des anti-Kres scFvB8 war durchschnittlich um das 230-fache erhöht. Die genaue intrazelluläre Lokalisation des rekombinanten Proteins muß jedoch durch elektronenmikroskopische Verfahren überprüft werden, da bisher noch keine Daten in Bezug auf die Kompartimentierung eines scFv-ELP-Fusionsproteins vorliegen. Festgehalten werden kann jedoch, daß es gelang, durch die carboxyterminale Fusion eines Einkettenantikörpers mit der Sequenz eines Elastinartigen Polypeptides das Expressionsniveau im Blattgewebe unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors deutlich zu erhöhen. Die Ursachen für die Erhöhung des Expressionsniveaus müssen in weiterführenden Projekten untersucht werden. Wahrscheinlichster Grund hierfür ist die ELP-vermittelte Verbesserung der Proteinstabilität. Elastin (*Foster et al., 1973, Gray et al., 1973*), welches ein wichtiger Bindegewebsbestandteil von Arterien, Lungen und der Haut ist, ist ein äußerst stabiles Protein. *Kobatake und Mitarbeiter (2000)* erreichten durch die alternierende Kombination der Proteinsequenzen eines zelladhäsiven Peptides mit der Sequenz eines synthetischen ELP eine generelle Verbesserung der Proteinstabilität. Dabei zeigte das Fusionsprotein eine gegenüber dem Protein ohne ELP-Sequenz stark erhöhte Thermostabilität. Eine verbesserte Thermostabilität ist oft mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Proteasen verbunden. Die Erhöhung des Expressionsniveaus an anti-Kres scFv~ELP-Fusionsprotein aufgrund der genannten proteinstabilisierenden Ursachen ist demzufolge als Grund für das erhöhte Expressionsniveau im Blattgewebe transgener Tabakpflanzen anzunehmen. Sequenzanalysen der von der DNA abgeleiteten Primärstruktur des anti-Kres scFvB8~ELP Fusionsproteines zeigen, daß mögliche Enzymschnittstellen verschiedener Proteasen hauptsächlich in der scFv-Domäne lokalisiert sind, während diese Schnittstellen in der ELP-Domäne fast gänzlich fehlen (Daten nicht gezeigt). Die am carboxyterminalen Ende des scFv angefügte ELP-Domäne stellt mengenmäßig den größten Teil des Fusionsproteines dar, könnte demzufolge den Angriff von Proteasen an die scFv-Domäne verhindern und damit proteinstabilisierend wirken. Sie könnte, ähnlich wie dies von *Schouten und Mitarbeitern (1997)* für die KDEL-Sequenz am Carboxy-Terminus postuliert wurde, einen Schutz vor C-terminalem Proteinabbau oder einen sterischen Schutz der Protease-suszeptiblen scFv-Domäne bieten. Eine weitere Möglichkeit ist die Erhöhung der Stabilität bzw. der Translationseffizienz des Transkriptes durch die hochrepetitive Sequenz des ELP-Genes im 3'-Bereich der mRNA des Fusionsproteins.

Die funktionelle Analyse des ubiquitär exprimierten anti-Kres scFvB8~ELP-Fusionsproteins ergab, daß die aminoternale scFv-Domäne im scFv~ELP-Fusionsprotein ihre Aktivität

beibehält. Die Bindung an Kres-BSA-Konjugat konnte im indirekten ELISA ebenso nachgewiesen werden wie die Bindung an freies Kresoxim-methyl im indirekten kompetitiven ELISA (vgl. 4.11.3). Die Antigenbindungsaktivität des scFvB8-ELP-Fusionsproteines für freies BAS490F ist mit der des scFvB8-Proteins vergleichbar. Durch Zugabe einer 1 μ M Kresoxim-methyl-Lösung kam es zu einer 50%igen Hemmung der Bindung des Einkettenantikörpers an das immobilisierte Kres-BSA-Konjugat. Durch „Western Blot“-Analyse der nativen Blattproteinextrakte konnte die Menge des im ELISA eingesetzten scFv semiquantitativ ermittelt werden. Die anschließend aus dem Quotienten $\Delta OD_{405nm}/ng_{scFv}$ ermittelte spezifische Antigenbindungsaktivität des, im endoplasmatischen Retikulum von Blattzellen akkumulierten, scFvB8~ELP-Fusionsproteins war im Gegensatz zu diesem Wert des scFvB8 jedoch stark erniedrigt. Die erzielte Substratumsatzrate je ng scFv-Protein war im Falle des scFvB8-ELP-Fusionsproteines deutlich niedriger (Faktor 15) als für das scFvB8. Die Menge des aktiven anti-Kres scFv am Gesamtgehalt des anti-Kres scFv im Blatt ist somit bei den Pflanzen mit ubiquitärer Expression des scFv-ELP Fusionsproteins niedriger als bei den Pflanzen mit ubiquitärer Expression des scFv ohne ELP-Domäne. Die eingehenden Untersuchungen lassen darauf schließen, daß nur ein Teil des akkumulierten rekombinanten Proteins aufgrund des hohen Anteils am Gesamtproteingehalt von bis zu 6% scFv-Domäne je gesamtlöslichem zellulären Blattprotein bereits vor dem Aufschluß in korrekt gefaltener und damit aktiver Form vorlag. Das Blattgewebe von *N.tabacum*-Pflanzen erwies sich demzufolge für eine wirtschaftliche Produktion großer Mengen an scFv-ELP~Fusionsprotein mit aktivem scFv-Anteil als weniger geeignet. Das erzielte erhöhte ubiquitäre Expressionsniveau ermöglicht jedoch vor allem bei der, aufgrund der fehlenden aminoterminalen Signalpeptidsequenz, wahrscheinlich zytosolischen Expression des rekombinanten Antikörpers wesentlich verbesserte Möglichkeiten der Immunmodulation. Der stark erhöhte Gehalt des Einkettenantikörpers im Zytosol durch Fusion mit dem Elastinartigen Polypeptid geht mit einer Verbesserung der Menge an aktivem scFv-Protein in diesem Kompartiment einher und könnte möglicherweise eine deutliche Verbesserung der immunmodulationsbedingten Toleranz bewirken.

Eine wesentliche Erhöhung der Menge an akkumuliertem, funktionellem anti-Kres scFvB8 konnte durch die samenspezifische Expression des scFv-ELP-Fusionsproteins mit Retention im endoplasmatischen Retikulum erreicht werden. Im Vergleich zum Expressionsniveau des anti-Kres scFv ohne ELP-Domäne konnte eine drastisch erhöhte Akkumulierung des Fusionsproteins im Samen von Tabakpflanzen nachgewiesen werden. Der Samen stellt für die Anreicherung von Proteinen ein ideales natürliches Speicherorgan dar. Die durch cotranslationale Translokation am rauhen endoplasmatischen Retikulum synthetisierten und im ER akkumulierten natürlichen Speicherproteine werden nachfolgend in speziellen abgeleiteten Strukturen, den „protein bodies“ für die Langzeitspeicherung kompartimentiert. Auch rekombinante scFv-Proteine sind in den „protein bodies“ über einen langen Zeitraum in

aktiver Form lagerfähig (*Fiedler & Conrad, 1995*). Dadurch ist eine hohe Konzentrierung der Proteine im Samen möglich. So wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits verschiedene Einkettenantikörper unter Kontrolle des USP-Promotors im Samen bis zu einem Expressionsniveau von 4% scFv/GLP exprimiert. Das anti-Kres scFvB8 zeigte unter Kontrolle des USP-Promotors ein mittleres Expressionsniveau von 0,2% und eine maximale Expressionshöhe von 0,5% scFv/GLP. Durch Fusion mit dem verwendeten Elastinartigen Polypeptid konnte das Expressionsniveau jedoch drastisch gesteigert werden. Das rekombinante Protein im Samenproteinextrakt transgener UB~ELP-Pflanzen konnte nach gelelektrophoretischer Auftrennung bereits in einer Menge von 50ng GLP immunologisch nachgewiesen werden. Das scFvB8~ELP-Fusionsprotein enthielt klonierungsbedingt zwei, der für diesen Nachweis genutzten, *c-myc*-tags. Deshalb sind die ermittelten Werte Schätzwerte für den Gehalt an scFv-Protein. Sie wurden durch Halbierung des experimentell durch Vergleich mit einer bekannten Menge scFvB8 (mit einem *c-myc*-tag) ermittelten Signalwertes erhalten. Neben dem Nachweis mit immunologischen Methoden wurde der extrem hohe Anteil des rekombinanten Proteins an dem Gesamtproteingehalt des Samenextraktes durch entsprechende Färbemethoden nachgewiesen (vgl.4.11.2). Das Fusionsprotein stellte bei der Silberfärbung den Hauptteil der wasserlöslichen Proteine des Extraktes von UB~ELP-Samen dar. Die Silberfärbung ist jedoch für vergleichende quantitative Aussagen hinsichtlich des Gehaltes des rekombinanten Proteins am Gesamtprotein aufgrund von Unterschieden in der Anfärbbarkeit verschiedener Proteine weniger geeignet (*Merril, 1990; Saxena & Bamezai, 1988*). Deshalb erfolgte ein weiterer Nachweis des rekombinanten Fusionsproteins durch Färbung der im SDS-PAA-Gel aufgetrennten Proteine des Samenextraktes mit Coomassie-Brilliantblau. Mit dieser Methode, die auch einen Nachweis der Speicherproteine des Tabaksamen ermöglicht, konnte ebenfalls eine starke Proteinbande von etwa 75kDa im Extrakt von UB~ELP-Samen detektiert werden, die im Extrakt von Wildtyp-Samen und transgenen UB-Samen (scFvB8 ohne ELP-Domäne) fehlte. Die Proteinfärbung mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau beruht auf der Interaktion des Farbstoffes mit positiv geladenen Aminosäuren (Arginin, Histidin, Lysin) des nachzuweisenden Proteins. Neben der absoluten Menge des gefärbten Proteins ist die Intensivität der Färbung abhängig vom Gehalt dieser interagierenden AS-Reste am Gesamtprotein (*Tal et al., 1985*). Die im Samenproteinextrakt enthaltenen natürlichen Speicherproteine besitzen aufgrund ihrer stickstoffspeichernden Funktion einen hohen Argininanteil (*Müntz, 1998*), werden also durch den Farbstoff Coomassie-Brilliantblau besonders gut angefärbt. Computergestützte Sequenzanalysen zeigten, daß das scFvB8~ELP-Fusionsprotein 33 (Arg:11; Lys:16; His:6) das scFvB8-Protein 31 (Arg:11; Lys:15; His:5) dieser farbstoffbindenden Reste enthält. Demzufolge ist das durch die Coomassie-Brilliantblaufärbung erhaltene Signal größtenteils (zu 94%) auf den scFv-Anteil des Fusionsproteins zurückzuführen und spiegelt quantitativ hauptsächlich den Anteil des

Einkettenantikörpers wider. Die hauptsächlich aus der Wiederholung des Pentapeptides [V-P-G-X-G] bestehende Domäne des Elastinartigen Polypeptides trägt aufgrund des fast vollständigen Fehlens der für die Coomassie-Brilliantblaufärbung notwendigen Aminosäurereste bei dieser Methode kaum zur Färbung des Proteins bei.

Aufgrund der erhaltenen Daten wurde die Hyperexpression eines rekombinanten Einkettenantikörpers im Samen durch Fusion mit einem Elastinartigen Polypeptid gezeigt. Die Analyse der Funktionalität des rekombinanten Fusionsproteins in ELISA Experimenten ergab eine hohe Antigenbindungsaktivität der Antikörperdomäne. Der Anteil an akkumuliertem, funktionellen Einkettenantikörper im Samen war im Gegensatz zu dem im Blatt exprimierten Fusionsprotein unverändert. Das im ELISA ermittelte verstärkte Signal entsprach etwa dem durch „WesternBlot“-Analysen ermittelten erhöhtem Expressionsniveau. Der Anteil von aktivem Einkettenantikörper im Samenproteinextrakt von UB~ELP-Pflanzen (scFvB8~ELP) ist demzufolge als sehr hoch einzustufen und mit dem entsprechenden Anteil an aktiven scFv/Gesamt-scFv im Samenproteinextrakt von UB-Pflanzen (scFvB8) vergleichbar. Das auf Proteinakkumulierung und -lagerung programmierte Gewebe des reifenden Samens erlaubt unter Nutzung des während der Reifungsphase hochaktiven USP-Promotors (*Phillips et al., 1997*) eine effektive Akkumulierung hoher Mengen an funktionellem Antikörperprotein im endoplasmatischen Retikulum beziehungsweise abgeleiteten „protein bodies“. Mögliche Ursache könnte ein hoher Gehalt an faltungsunterstützenden Enzymen in den Zellen des Samens sein oder die Abwesenheit von deaktivierenden Substanzen, die nach Zellaufschluß mit dem in den Strukturen des endoplasmatischen Retikulum akkumulierten rekombinanten Protein in Kontakt kommen können. Möglicherweise existiert eine natürliche Grenze für die Menge an akkumuliertem, aktivem rekombinanten Protein in der Pflanzenzelle, die organabhängig ist. Demzufolge wäre eine Expression extrem hoher Mengen von korrekt gefaltetem, funktionellen Protein im Blattgewebe eingeschränkt, im Samen jedoch (fast) uneingeschränkt möglich.

Die mit dieser Methode erzielte Verbesserung des Expressionsniveaus von rekombinantem scFv-Protein im Samen von Tabakpflanzen eröffnet aussichtsreiche biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten für eine äußerst kostengünstige Gewinnung funktioneller Antikörper. Da es sich bei dem für diese Methode verwendeten Fusionspartner um ein synthetisches Pendant des natürlichen Gerüstproteins Elastin (*Foster et al., 1973, Gray et al., 1973*) handelt, welches beispielsweise beim Verzehr von tierischen Lebensmitteln aufgenommen wird, kann für das Fusionsprotein eine geringe toxikologische Potenz erwartet werden. Für die industrielle Anwendung der Strategie sollte das rekombinante Protein jedoch in Pflanzen mit einem niedrigen Gehalt an toxischen Inhaltsstoffen, wie beispielsweise Erbse oder Getreidearten exprimiert werden. Daß die Expression von funktionellen Einkettenantikörpern in diesen Pflanzen prinzipiell möglich ist, zeigen beispielsweise Arbeiten von *Saalbach et al., (2001)* und *Stöger et al., (2000)*.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob in transgenen Pflanzen exprimierte Kresoxim-methyl bindende Einkettenantikörper eine Verbesserung der Toleranz gegenüber den phytotoxischen Eigenschaften dieses Strobilurinfungizides während der Samenkeimung hervorrufen. Die Ergebnisse der Arbeit können in einigen Punkten zusammengefaßt werden:

1. Es wurden zwei murine monoklonale Hybridomzellklone isoliert und charakterisiert. Die sezernierten Immunglobuline binden spezifisch mit mittlerer Antigenbindungsaffinität das Molekül Kresoxim-methyl. Diese Antikörper könnten beispielsweise die Grundlage für eine immunologische Quantifizierung des Fungizides BAS 490F bilden.
2. Die Gene für die variablen leichten und schweren Ketten der beiden mAK wurden isoliert und zu funktionellen Einkettenantikörpern arrangiert. Beide abgeleiteten Einkettenantikörper zeigten nach bakterieller Expression ähnliche Antigenbindungseigenschaften für das Fungizid Kresoxim-methyl wie die parentalen Immunglobuline.
3. Nach der Charakterisierung der rekombinanten Einkettenantikörper im bakteriellen System wurden transgene anti-Kres Tabakpflanzen regeneriert. Die ubiquitäre Expression in verschiedenen Zellkompartimenten (Zytosol, endoplasmatisches Retikulum, Plasmamembran/Apoplast) erfolgte unter Nutzung entsprechender Signalsequenzen und Targetingsignalen unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors. Die samenspezifische Expression wurde durch den USP-Promotor erreicht. In allen erzeugten transgenen *Nicotiana tabacum* Linien wurde die Akkumulation der Antikörper nachgewiesen. Die Funktionalität der Einkettenantikörper konnte mit Ausnahme des Konstruktes CytoA in allen Konstrukten nachgewiesen werden.
4. Die transgenen Pflanzen zeigten unter normalen Kultivierungsbedingungen bei Abwesenheit von Kresoxim-methyl einen dem Wildtyp entsprechenden Phänotyp. Ein vom Wildtyp abweichender Phänotyp wurde nach Zugabe von Kresoxim-methyl in Applikationsexperimenten festgestellt. Das Resultat zeigt die immunmodulationsbedingte Verbesserung der Toleranz gegenüber Kresoxim-methyl in einem begrenzten Konzentrationsbereich. Kresoxim-methyl ist hauptsächlich während der Keimphase von Pflanzen phytotoxisch und verzögert beispielsweise auch bei *Nicotiana tabacum* den Keimprozeß. In einem entsprechend gewählten Versuchssystem wurde nach einer 28tägigen Keimungsphase in Gegenwart des Fungizides (1 bis 10µM) eine signifikante Verbesserung der ermittelten Frischmasse bei den meisten untersuchten hochexprimierenden transgenen anti-Kres-Linien im Vergleich zu Kontrollpflanzen festgestellt. Kresoxim-methyl hemmte auch bei den anti-Kres-Pflanzen die Keimung,

allerdings in einem verringertem Ausmaß als beim Wildtyp und den transgenen Kontrollpflanzen. Bei Konzentrationen $\geq 25\mu\text{M}$ trat auch bei den transgenen anti-Kres Linien eine dem Wildtyp entsprechende (nahezu vollständige) Hemmung der Samenkeimung ein. Durch die Expression funktioneller, Kresoxim-methyl bindender, Einkettenantikörper konnte somit eine partielle Verbesserung der Widerstandsfähigkeit gegenüber den phytotoxischen Wirkungen des Fungizides während der Samenkeimung von Tabakpflanzen erreicht werden.

5. Es wurden verschiedene Konstrukte für die ubiquitäre und samenspezifische Expression eines anti-Kres scFvB8~ELP-Fusionsproteins in Tabakpflanzen erzeugt. Die Analyse nach ubiquitärer Expression dieses Fusionsproteins ergab eine stark erhöhte Akkumulation des rekombinanten Proteins durch die carboxyterminale ELP-Domäne im Blattgewebe. Dabei war zwar die Affinität des scFv zum freien Antigen unverändert, jedoch der Anteil an funktionellen Einkettenantikörperprotein nicht proportional erhöht.
6. Die samenspezifische Expression des scFvB8~ELP-Fusionsproteins führte zu einer stark erhöhten Akkumulationsrate (bis etwa 20% scFv/GLP im Vergleich zu 0,5% scFv/GLP). Der Anteil an funktionellem Einkettenantikörper war im Gegensatz zu dem im Blattgewebe akkumulierten Protein proportional zum Anstieg des Expressionsniveaus. Das erzielte Expressionsniveau des Einkettenantikörpers im Samen von Tabakpflanzen durch die Fusion mit einem Elastinartigen Polypeptid liegt deutlich über den bisher veröffentlichten Ergebnissen zur Hochexpression von Einkettenantikörperfragmenten. Inwieweit die Toleranz gegenüber dem Fungizid durch die erhöhte Menge des anti-Kres scFvB8 verbessert ist, muß in weiterführenden Experimenten geprüft werden.

Durch die, anti-Kres Einkettenantikörper vermittelte, Immunmodulation des phytotoxischen Fungizides Kresoxim-methyl in der Modellpflanze *Nicotiana tabacum* wurde eine partielle Verbesserung der Toleranz während der Keimungsphase in einem begrenzten Konzentrationsbereich erreicht. Damit konnte eine neue Möglichkeit der Resistenzerzeugung gegenüber einem phytotoxisch wirksamen Fungizid gezeigt werden, welche nach weiterer Optimierung als Modell für weitere Fungizide beziehungsweise phytotoxische Pestizide genutzt werden kann. Desweiteren wurde in der vorliegenden Arbeit eine Verbesserung des Expressionsniveaus eines Einkettenantikörpers im Samen von Tabakpflanzen durch die Fusion mit einem Elastinartigen Polypeptid erzielt. Dieses System kann als Modellsystem für eine äußerst wirtschaftliche Produktion und kostengünstige Gewinnung großer Mengen an funktionellen Einkettenantikörpern genutzt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Affourtit, C., Heaney, S.P., Moore, A.L.,** (2000), „Mitochondrial Electron Transfer in the Wheat Pathogenic Fungus *Septoria tritici*: on the Role of Alternative Respiratory Enzymes in Fungicide Resistance“, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1459: 291-298
- Ali, S., Taylor, W.C.,** (2001), „Quantitative Regulation of the *Flaveria Me1* Gene is controlled by the 3'-untranslated Region and the Sequences near the Aminoterminalus“, *Plant Molecular Biology*, 46: S.251-262
- Ammermann, E., Lorenz, G., Schelberger, K., Wenderoth, B., Sauter, H., Rentzea, C.,** (1992), „BAS 490F-A Broad-Spectrum Fungicide with a new Mode of Action“, *Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases*, 5-2: 403-410
- Ammermann, E., Lorenz, G., Schelberger, K., Wenderoth, B., Sauter, H., Rentzea, C.,** (1994), „BAS 490F-Ein breitwirksames fungizides Strobilurin“, *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Braunschweig*, 301: S.397
- Anke, T.,** (1995), „The Antifungal Strobilurins and their Possible Ecological Role“, *Can. J.Bot.*, 73(Suppl.1): S940-S945
- Anke, T., Oberwinkler, F., Steglich, W., Schramm, G.,** (1977), „The Strobilurins-New Antifungal Antibiotics from the Basidiomycete *Strobilurus tennacellus*“, *The Journal of Antibiotics*, Vol.XXX (10): 806-810
- Anke, T., Schramm, G., Schwalge, B., Steffan, B., Steglich, W.,** (1984), „Antibiotika aus Basidiomyceten XX. Synthese von Strobilurin A und Revision der Stereochemie der natürlichen Strobilurine“, *Liebigs Ann.Chem.*, 9: S.1616-1625
- Anonym {Porter et al.},** (1997), „Plantibodies to Root out Herbicides“, *Chemistry and Industry*, 17: S.670
- Arntzen C.J.,** (1997), „High-Tech Herbal Medicine: Plant-based Vaccines“, *Nature Biotechnology*, 15 (3): 221-222
- Artsaenko, O., Weiler, E.W., Müntz, K., Conrad, U.,** (1994), „Construction and functional Characterisation of a Single chain Fv Antibody binding to the Plant Hormone Abscisic Acid.“ *Journal of Plant Physiology* 144:427-429
- Artsaenko, O., Peisker, M., zur Nieden, U., Fiedler, U., Weiler, E.W., Müntz, K., Conrad, U.,** (1995), „Expression of a Single-chain Fv Antibody against Abscisic Acid creates a Wilty Phenotyp in transgenic Tobacco“, *Plant Journal* 8(5): S.745-750
- Artsaenko, O.,** (1996), „Immunomodulation of ABA-activity in transgenic Tobacco Plants“, *Dissertation, Universität Halle*
- Artsaenko, O., Kettig, B., Fiedler, U., Conrad, U., Düring, K.,** (1998), „Potato Tubers as Biofactory for Recombinant Antibodies“, *Molecular Breeding*, 4: S.313-319
- Avery, G.S. Jr.,** (1933), „Structure and Germination of Tobacco Seed and the developmental Anatomy of the Seedling Plant.“ *American Journal of Botany*, 20:309-327
- Bajrovic K., Erdag B., Atalay E.O., Cirakoclu B.,** (2001), „Full Resistance to Tobacco Mosaic Virus Infection conferred by the transgenic Expression of a Recombinant Antibody in Tobacco“, *Bioechnology and Biotechnology Equipment*, 15 (1): 21-27
- Baron, D.,** (1990), „Eigenschaften und Herstellung von Myelom- und Tumorlinien“, in Peters, J.H., Baumgarten, H., „Monoklonale Antikörper-Herstellung und Charakterisierung“, *Springer-Verlag*: S.139-141

- Bassüner R., Bäumlein H., Huth A., Jung R., Wobus U., Rapoport T.A., Saalbach G., Müntz K.,** (1988), „Abundant embryonic messenger-RNA in Field Bean (*Vicia faba* L.) codes for a New Class of Seed Proteins-cDNA, Cloning and Characterization of the primary Translation Product“. *Plant Molecular Biology*, 11 (3): 321-334
- Baumgarten, H., Schulze, M., Hebell, T.,** (1990), „Methodik der Maus-Immunisierung“, in Peters, J.H., Baumgarten, H., „Monoklonale Antikörper-Herstellung und Charakterisierung-“, Springer-Verlag: S.51-57
- Bäumlein H., Wobus U., Pustell J., Kafatos F.C.,** (1986), „The Legumin Gene Family: Structure of a B type Gene of *Vicia faba* and a possible Legumin Gene specific regulatory Element“, *Nucleic. Acids Res.*, 25;14(6):2707-2720
- Bäumlein H., Boerjan, B., Nagy, I., Bassüner, R., van Montagu, M., Inze, D., Wobus U.,** (1991/I), „A Novel Seed Protein Gene from *Vicia faba* is developmental regulated in transgenic Tobacco and *Arabidopsis* Plants“, *Molecular and General Genetics*, 225: 459-467
- Bäumlein H., Boerjan, W., Nagy, I., Panitz, R., Inze, D., Wobus U.,** (1991/II), „Upstream Sequences regulating Legumin Gene Expression in Heterologous Transgenic Plants“, *Molecular and General Genetics*, 225: 121-128
- Bayles, R.,** (1999), „The Interaction of Strobilurin Fungicides with Cereal Varieties“, *Plant Var. and Seeds*, 12: S.129-141
- Bednarek, S.Y., Raikhel, N.V.,** (1992), „Intracellular trafficking of secretory Proteins.“, *Plant Molecular Biology* 20:133-150
- Benfay, P.N., Ren, L., Chua, N.,** (1989), „The CaMV 35 S Enhancer contains at least two Domains which can confer different developmental and Tissue specific Expression Patterns“, *The EMBO Journal*, 8: S.2195-2202
- Bernard O., Cory S., Gerondakis S., Webb E., Adams J.M.,** (1983), „Sequence of the murine and human cellular *myc* Oncogenes and two modes of *myc* Transcription resulting from Chromosome Translocation in B lymphoid tumours“, *The EMBO J.*; 2(12):2375-2383
- Beutement, K., Clough, J.M.,** (1987), „Stereocontrolled Synthesis of Strobilurin A and its (9-E)-Isomer“, *Tetrahedron Letters* 28(4):475-478
- Beutement, K., Clough, J.M., de Fraine, P.J., Godfrey, C.R.A.,** (1991), „Fungicidal β -Methoxyacrylates: From Natural Natural Products to Novel Synthetic Agricultural Fungicides“, *Pestic Science*, 31: 499-519
- Bevan, M.,** (1984), „Binary *Agrobacterium* Vectors for Plant Transformation“, *Nucleic Acid Research*, 12 (22): S.8711-8721
- Biocca, S., Cattaneo, A.,** (1995), „Intracellular Immunization: Antibody Targeting to subcellular Compartments“, *Trends in Cell Biology*, 5, S.248-252
- Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Pierandrei-Amaldi, P., Cattaneo, A.,** (1995), „Redox State of Single Chain Fv Fragments targeted to the Endoplasmatic Reticulum, Cytosol and Mitochondria“, *Bio/Technology*, 13: S.1110-1115
- Bird R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., Whitlow, M.,** (1988), „Single-chain Antigen Binding-Proteins“, *Science* 242, S.423-426
- Bird R.E., Walker, B.W.,** (1991), „Single chain Antibody Variable Regions“, *Trends in Biotechnologie*, 9, S.132-137

- Birnboim, H.C., Doly, J.**, (1979), „Rapid alkaline Extraction Procedure for Screening recombinant Plasmid DNA“, *Nucleic Acids Research*, 7(6): 1513-1523
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J.**, (1987), „Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels“, *Electrophoresis*, 8: S.93-99
- Bradford M.M.**, (1976), „Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing Principle of Protein-Dye Binding“, *Analytical Biochem.*, 72(1-2): S.248-254
- Brandt, U., Schagger H., von Jagow, G.**, (1988), „Characterication of Binding of the Methoxyacrylate Inhibitors to Mitochondrial Cytochrome c Reductase“, *European Journal of Biochemistry*, 173: S. 499-506
- Brandt, U., Hasse, U., Schagger H., von Jagow, G.**, (1991/I), „Significance of the „Rieske“ Iron Sulfur Protein for Formation and Function of the Ubiquinol-Oxidation Pocket of Mitochondrial Cytochrome c Reductase (bc₁-complex)“, *The Journal of Biological Chemistry.*, 266 (30): S.19958-19964
- Brandt, U., von Jagow, G.**, (1991/II), „Analysis of Inhibitor Binding to the Mitochondrial Cytochrome c Reductase by Fluorescence Quench Titration“, *Eur.J.Biochem*,195: S.163-170
- Buchanan, M.S., Steglich, W., Anke, T.**, (1999), „Strobilurin N and Two Metabolites Related to Chorismic Acid from the Fruit Bodies of *Mycena crocata* (Agaricales)“, *Z.Naturforsch.*, 54c: S. 463-468
- Buchenauer, H.**, (1995), „DMI-Fungicides – Side Effects on the Plant and Problems of Resistance“, in Lyr, H. (ed.), „Modern Selective Fungicides, Properties, Applications, Mechanisms of Action“, Gustav Fischer Verlag, S.259-290
- Burmeister, J., Plückthun, A.**, (2001), „Construction of ScFv-Fragments from Hybridoma or Spleen Cells by PCR-Assembly“, in Kontermann, R, Dübel, S. (eds.), „Antibody Engineering“, Springer Verlag Berlin
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Pirisi, F.M., Espinoza, J., Mendoza, A., Cabitza, F., Pala, M., Brandolini, V.**, (1998), „Fate of Azoxystrobin, Fluazinam, Kresoxim-methyl, Mepanipyrim, and Tetraconazole from Vine to Wine“, *J. Agric. Food Chem.*, 46: S.3249-3251
- Chakraborty S., Chakraborty N., Datta A.**, (2000), „Increased nutritive Value of transgenic Potato by expressing a nonallergenic Seed Albumin Gene from *Amaranthus hypochondriacus*“, *Proceedings of the National Acedamy of Sciences of the United States of America* 97 (7): 3724-3729
- Chaubet-Gigot, N., Kapros, T., Flenet, M., Kahn, K., Gigot, C., Waterborg, J.H.**, (2001), „Tissue-Dependent Enhancement of Transgene Expression by Introns of Replacement of Histone H3 Genes of *Arabidopsis*“, *Plant Molecular Biology*, 45: S.17-30
- Chaudhary, V.K., Batra, J.K., Gallo, M.G., Willingham, M.C., Fitzgerald, D.J., Pastan, I.**, (1990), „A Rapid Method of Cloning Functional Variable-Region Antibody-Genes in *Escherichia coli* as Single Chain Immunotoxins“ *Proceedings of the National Acedamy of Sciences of the United States of America*, 87: S.1066-1070
- Chen E.Y., Seeburg, P.H.**, (1985), „Supercoil Sequencing – a Fast and Simple Method for sequencing Plasmid DNA“, *DNA- A Journal of Molecular & Cellular Biology*, 4(2): S.165-170
- Chen Y.X., Zhu G.W., Tian G.M., Zhou G.D., Luo Y.M., Wu S.C.**, (2002), „Phytotoxicity of dredged sediment from urban canal as land application“, *Environ. Pollution*, 117(2):233-241

- Cheng M., Fry J.E., Pang S.Z., Zhou H.P., Hironaka C.M., Duncan D.R., Conner T.W., Wan Y.C.,** (1997), „Genetic Transformation of Wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*“, *Plant Physiology*, 115 (3): 971-980
- Chesnut J.D., Baytan A.R., Russell M., Chang M.P., Bernard A., Maxwell I.H., Hoeffler J.P.,** (1996), „Selective Isolation of transiently transfected Cells from a mammalian Cell Population with Vectors expressing a Membrane anchored Single-chain Antibody“, *Journal of immunological methods*, 193 (1): S. 17-27
- Chilkoti A., Meyer D.E.,** (1999), „Synthesis and Characterization of genetically-encoded Elastin-like Biopolymers“, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 217: S.073-BTEC Part 2
- Chin K.M., Chavaillaz, D., Kaesbohrer, M., Staub, T., Felsenstein, F.G.,** (2001), „Characterizing Resistance Risk of *Erysiphe graminis* f.sp. *Tritici* to Strobilurins“, *Crop Protection* , 20: 87-96
- Chiswell, D.J., McCafferty, J.,** (1992), „Phage Antibodies: will new „Coliclonal“-Antibodies replace Monoclonal Antibodies ?“, *Trends in Biotechnology*, 10: S.80-84
- Chomczynski und Sacchin,** (1987), „Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction“, *Analytical Biochemistry* , 162 (1): 156-159
- Chowdhury, P.S., Vasmatzis, G., Beers, R. Lee, B., Pastan, I.,** (1998), „Improved Stability and Yield of a Fv-Toxin-Fusion Protein by Computer Design and Protein Engineering of the Fv“, *Journal of Molecular Biology*, 281: S.917-928
- Chrispeels, M.J.,** (1991), „Sorting of Proteins in the Secretory System“, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: S.35-49
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Winter, G.,** (1991), „Making Antibody Fragments using Phage Display libraries“, *Nature*, 352: S.624-628
- Clough, J.M.,** (1993), „The Strobilurins, Oudemansins and Myxothiazols, Fungicidal Derivatives of Beta-Methoxyacrylic Acid“, *Natural Product Reports*, 10 (6): S. 565-574
- Clough, J.M.,** (2000), „The Strobilurin Fungicides-from Mushroom to Molecule to Market“, *Special Publication Royal Society of Chemistry London*, 257: S.277-282
- Clough, J.M., Fraine, P.J., Godfrey, C.R.A., Rees, S.B.,** (1997), „Strobilurin Analogues as Inhibitors of Mitochondrial Respiration in Fungi“, *Special Publication Royal Society of Chemistry London*, 198: S.176-179
- Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D. H., Shevach, E.M., Strober, W.,** (1996), „Removal of Lymphoid Organs“ in „*Current Protocols in Immunology*“, John Willey & Sons Inc. S.1.9.1.-1.9.3.
- Conner A.J., Jacobs J.M.E.,** (1999), „Genetic engineering of Crops as potential Source of genetic Hazard in the human Diet“, *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443 (1-2): 223-234
- Conrad, U., Fiedler, U.,** (1994), „Expression of engineered Antibodies in Plants“, *Plant Molecular Biology* , 26: 1023-1030
- Conrad, U., Fiedler, U.,** (1998), „Compartment-specific Accumulation of Recombinant Immunoglobulins in Plant Cells: an essential Tool for Antibody Production and Immunomodulation of physiological Functions and Pathogen Activity“, *Plant Molecular Biology*, 38 (1-2): 101-109

- Conrad, U., Fiedler, U., Artsaenko, O., Phillips, J.,** (1998), „High-Level and Stable Accumulation of Single-chain Fv Antibodies in Plant Storage Organs“, *Journal of Plant Physiology* , 152 : 708-711
- Conrad, U., Manteuffel, R.,** (2001), „Immunomodulation of Phytohormones and Functional Proteins in Plants“, *Trends in Plant Science* , 6(9): S.399-402
- Daferner, M., Anke, T., Hellwig, V., Steglich, W., Stemer, O.,** (1998), „Strobilurin M, Tetrachloropyrocatechol and Tetrachloropyrocatechol Methyl Ether: New Antibiotics from a *Mycena spec*“, *The Journal of Antibiotics*, 51(9): 816-822
- Dalsgaard K., Uttenthal A., Jones T.D., Xu F., Merryweather A., Hamilton W.D.O., Langeveld J.P.M., Boshuizen R.S., Kamstrup S., Lomonossoff G.P., Porta C., Vela C. ,** (1997), „Plant-derived Vaccine protects Target Animals against a viral Disease“, *Nature Biotechnology*, 15 (3): 248-252
- Daly S.J., Dillon P.P., Brennan J., Dunne L., Fitzpatrick J., O'Kennedy R.,** (2001), „Production and analytical Applications of ScFv Antibody Fragments“, *Analytical Letters* , 34 (11): 1799-1827
- Dankwardt, A.,** (2000), „Immunochemical Assays in Pesticide Analysis“, in Meyers, A., (ed.) „Encyclopedia of Analytical Chemistry, Applications, theorie and instrumentation“, John Wiley & Sons Ltd., Chichester www.wiley.co.uk/wileychi/eac/pdf/A1714-W.PDF
- De Belis, D., Schwartz, I.,** (1990), „Regulated Expression of Foreign Genes Fused to Lac: Control by Glucose Levels in the Growth Medium“, *Nucl. Acid Research*, 18: S.1311
- De Blas A.L., Ratnaparkhi M.V., Moismann J.E,** (1983), „Estimation of the Number of monoclonal Hybridomas in a Cell-Fusion Experiment“, *Methods in Enzymol*,92(Part E): 36-39
- De Block, M., Herrera-Estralla, L., Van Montagu, M., Schell, J., Zambryski, P.,** (1984), „Expression of foreign Genes in regenerated Plants and in their Progeny“, *The EMBO Journal*, 3 (8): 1681-1689
- De Jaeger, G., Buys, E., Eeckhout, D., Bruyns, A.-M., De Neeve, M., De Wilde, C., Gerats, T., van Montagu, M., Fischer, R., Depicker, A.,** (1997), „Use of Phage Display for Isolation and Characterization of Single-Chain Variable Fragments against Dihydroflavonol 4-Reductase from *Petunia hybrida*“, *FEBS Letters*, 403: S.116-123
- De Jaeger, G., Buys, E., Eeckhout, D., De Wilde, C., Jacobs, A., Kapila, J., Angenon, G., van Montagu, M., Gerats, T., Depicker, A.,** (1999), „High Level Accumulation of Single-Chain Variable Fragments in the Cytosol *Petunia hybrida*“, *European Journal of Biochemistry*, 259: S.426-434
- De Jaeger, G., De Wilde, C., Eeckhout, D., Viers, E., De Picker, A.,** (2000), „The Plantibody-Approach: Expression of Antibody Genes in Plants to modulate Plant Metabolism or to obtain Pathogen Resistance“, *Plant Molecular Biol.*, 43: S.419-428
- De Wildt R.M., Mundy C.R., Gorick B.D., Tomlinson I.M.,** (2000), „Antibody Arrays for high-throughput Screening of Antibody-Antigen Interactions“, *Nature Biotech.*, 18(9):989-994
- Deblaere R., Bytebier B., Degreve H., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M., Leemans J.,** (1985), „Efficient Octopine Ti-Plasmid-derived Vectors for *Agrobacterium*-mediated Gene-Transfer to Plants“, *Nucleic Acids Research*, 13(13): S.4777-4788
- Dennecke, J., De Rycke, R., Botterman, J.,** (1992), „Plant and Mammalian Sorting Signals for Protein Retention in the Endoplasmatic Reticulum contain a conserved Epitop“, *The EMBO Journal*, 11(6): S.2345-2355

- Deshane, J., Cabrera, C., Grim, J.E., Siegal, G.P., Pike, J., Alvarez, R.D., Curiel, D.T.,** (1995), „Targeted Eradication of Ovarian Cancer mediated by Intracellular Expression of anti-erbB-2 Single-Chain Antibody“, *Gynecologic Oncology*, 59: S.8-14
- Desiderio, A., Franconi, R., Lopez, M., Villani, M.E., Viti F., Chiaraluce, R., Consalvi, V., Neri, D., Benvenuto, E.,** (2001), „A Semi-Synthetic Repertoire of Intrinsically Stable Antibody Fragments derived from a Single-Framework Scaffold“, *Journal of Molecular Biology*, 310: S.603-615
- Devlin C.M., Bowles M.R., Gordon R.B., Pond S.M.,** (1995), „Production of a Paraquat-Specific Murine Single Chain Fv Fragment“, *Journal of Biochemistry*, 118 (3): 480-487
- Djavadi-Ohanian, L., Goldberg, M., Friguet, B.,** (1996), Measuring Antibody Affinity in Solution“, in McCafferty, J., Hoogenboom, H.R., Chriswell, D.J., (eds.), „Antibody Engineering A Practical Approach“, Oxford University Press: S. 77-97
- Dooley, H., Grand, S.D., Harris, W.J., Porter, A.J.,** (1998), „Stabilization of Antibody Fragments in Adverse Environments“, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28: S.77-83
- Dreher, M.L., Gherardi, E., Skerra, A., Milstein, C.,** (1991), „Colony Assay for Antibody Fragments expressed in Bacteria“, *Journal of Immunological Methods*, 139: S.197-205
- Duan, L., Bagasra, O., Laughlin, M.A., Oakes, J.W., Pomerantz, R.J.,** (1994), „Potent Inhibition of Human Immunodeficiency Virus-Type 1 Replication by Intracellular Anti-Rev Single-chain Antibody“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: S.5075-5079
- Evan, G., Lewis, G.K., Ramsay, G., Bishop, M.,** (1985) „Isolation of Monoclonal Antibodies Specific for Human *c-myc* Proto-Oncogene Product“, *Molecular and Cellular Biology*, 5 (12), S.3610-3616
- Fairbanks, M.M., Hardy, G.E.St.J., McComb, J.A.,** (2000), „Comparisons of Phosphite Concentrations in *Corymbia (Eucalyptus) callophylla* Tissues after Spray Mist or Soil Drench Applications with the Fungicide Phosphite“, *Australasian Plant Pathology*, 29: S.96-101
- Fecker, L.F., Koenig, R., Obermeier, C.,** (1997) , „*Nicotiana benthamiana* Plants Expressing Beet Necrotic Yellow Virus (BNYVV) Coat Protein-specific scFv are partially protected against the Establishment of the Virus in the early Stages of Infection and its Pathogenic Effects in the Late Stages of Infection.“, *Archives of Virology* 142: S.1857-1863
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B.,** (1983) , „A Technique for radiolabelling DNA Restriction Endonuclease Fragments to high specific Activity.“, *Analytical Biochemistry*, 132: S.6-13
- Fiedler, U., Conrad, U.,** (1995), „High-Level Production and long-term Storage of engineered Antibodies in transgenic Tobacco Seeds“, *Bio-Technology*, 13 (10): S.1090-1093
- Fiedler U.,** (1996) „Hochexpression rekombinanter Antikörperfragmente in transgenen Pflanzen“, Dissertation, Universität Halle
- Fiedler, U., Phillips, J., Artsaenko, O., Conrad, U.,** (1997), „Optimization of scFv Antibody Production in transgenic Plants“, *Immunotechnology*, 3 (3): S.205-216
- Fischer, R., Hain, R.,** (1995), „Tobacco Protoplast Transformation and Use for Functional Analysis of Newly Isolated Genes and Gene Constructs“, *Methods in Cell Biology*, 50: S.401-410
- Fischer, R., Emans, N., Schillberg, S.,** (2001), „Achieving Plant Disease Resistance by Antibody Expression“, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23: S.236-245

- Fischhoff D.A., Bowdish K.S., Perlak F.J., Marronne P.G., McCormick S.M., Niedermeyer J.G., Dean D.A., Kusanokretzmer K., Mayer E.J., Rochester D.E., Rogers S.G., Fraley R.T.,** (1987), „Insect Tolerant Transgenic Tomato Plants“, *Biotechnology*, 5: S.807-813
- Foster, J.A., Bruenger, E., Gray, W.R., Sandberg, L.B.,** (1973), „Isolation and Amino Acid Sequences of Tropoelastin Peptides“, *The Journal of Biological Chemistry*, 248(8): S.2876-2879
- Franck A, Guilley H, Jonard G, Richards K, Hirth L.,** (1980), „Nucleotide Sequence of Cauliflower Mosaic Virus DNA.“, *Cell*, ;21(1):285-94
- Franken E., Teuschel U., Hain R.,** (1997), „Recombinant Proteins from transgenic Plants“, *Current Opinion in Biotechnology*, 8 (4): 411-416
- Frisch, D.A., Harris-Haller, L.W., Yokubaitis, N.T., Thomas, T.L., Hardin, S.H., Hall, C.,** (1995), „Complete Sequence of the Binary Vector Bin19“, *Plant Mol. Biol.*(27), S.405-409
- Fromm M., Taylor L.P., Walbot V.,** (1985), „Expression of Genes transferred into monocot and dicot Plant Cells by Electroporation“, *Proceedings of the National Acedamy of Sciences of the United States of America*, 82 (17): S.5824-5828
- Fujii, M., Takeda, T., Uchida, K., Amano, T.,** (2000), „The Latest Status of Resistance to Strobilurin Type Action Fungicides in Japan“, *The BCP Conference-Pests and Diseases*, 4D4: S.421-426
- Galili G., Sengupta-Gopalan C., Ceriotti A.,** (1998), „The endoplasmic Reticulum of Plant Cells and its Role in Protein Maturation and Biogenesis of Oil Bodies“, *Plant Molecular Biology*, 38(1-2): S.1-29
- Gallie, D.R.,** (1996), „Translational Control of Cellular and Viral mRNA`s“, *Plant Molecular Biology*, 32: S.145-158
- Gange, A.C., Brown, V.K., Farmer, L.M.,** (1992), „Effects of Pesticides on the Germination of Weed Seeds: Implications for manipulative Experiments“, *Journal of Applied Ecology*, 29: S.303-310
- Garcia, P.C., Ruiz, J.M., Rivero, R.M., Lopez-Levebre, L.R., Sanchez, E., Romero, L.,** (2002), „Is the Application of Carbendazim harmful to healthy Plants? Evidence of weak Phytotoxicity in Tobacco.“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2): S.279-283
- Gardner, R.C., Howarth, A.J., Hahn, P., Brown-Luedi, N., Shepherd, R.J., Messing, J.,** (1981), *The Complete Nucleotide Sequence of an Infectious Clone of Cauliflower Mosaic Virus by M13 MP7 Shotgun Sequencing*“, *Nucleic Acid Research*, 9: S. 2871-2888
- Gatz C., Lenk I.,** (1998), „Promoters that respond to chemical Inducers“, *Trends in Plant Science*, 3 (9): 352-358
- Gavilando, J.V., Larrick, J.W.,** (2000), „Antibody Engineering at the Millenium“. *Biotechniques*, 29: 128-145
- Gerhard, M., Habermeyer, J., Zinkernagel, V.,** (1998), „Ertragsphysiologische Effekte strobilurinhaltiger Fungizide an Weizen“, *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. H.*, 357: S.131
- Gething, M.-J., Sambroock, J.,** (1992), „Protein Folding in the Cell“, *Nature*, 355: S.33-45
- Gibson, T.J.,** (1984), „Studies on the Eppstein-barr virus genome“, *Ph.D. thesis*, Cambridge university, England

- Gisi, U., Chin, K.M., Knapova, G., Kühng Färber, R., Mohr, U., Parisi, S., Sierotzki, H., Steinfeld, U.,** (2000), „Recent Developments in elucidating Modes of Resistance to Phenylamide, DMI and Strobilurin Fungicides“, *Crop Protection*, 19: S.863-872
- Glaab, J., Kaiser, W.M.,** (1999), „Increased Nitrat Reductase Activity in Leaf Tissue after Application of the Fungicide Kresoxim-methyl“, *Planta*, 207: S.442-448
- Goding, J.W.,** (1980), „Antibody Production by Hybridomas“, *Journal of Immunological Methods*, 39: S.285-308
- Gold, R.E., Leinhos, G.M.E.,** (1994), „Histological Studies on the Fungicidal Activity of the Strobilurin BAS 490F“, *Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases*, 3D-11
- Gold, R., Köhle, H., Gall, A., Steiniger, M., Wiede, K., Leinhos, G., Schelberger, K.,** (1995), „Kresoxim-methyl. Der neue Wirkstoff nach dem Vorbild der Natur.“, *Informationsheft*, BASF AG, Limburgerhof
- Gomord, V., Wee, E., Faye, L.,** (1999), „Protein Retention and Localization in the Endoplasmatic Reticulum and the Golgi Apperatus“, *Biochimie*, 81 : 607-618
- Gong P., Wilke B., Fleischmann S.,** (1999), „Soil-based Phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to terrestrial higher Plants“, *Archives of Environ. Contam. Toxicol.*, 36(2):152-157
- Gong P., Wilke B.M., Strozzi E., Fleischmann S.,** (2001), „Evaluation and Refinement of a continuous Seed Germination and early Seedling Growth Test for the use in the ecotoxicological Assessment of Soils“, *Chemosphere*, 44(3):491-500
- Grandmougin, A., Bouvier-Navè, P., Ullmann, P., Benveniste, P., Hartmann, M.-A.,** (1989), „Cyclopropyl Sterol and Phospholipid Composition of Membrane Fraction from Maize Roots treated with Fenpropimorph“, *Plant Physiology*, 90: S.591-597
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Hynes, N.E.,** (1995), „Single-Chain Antibody-mediated intracellular Retention of ErbB-2 impairs *neu* Differentiation Factor and epidermal Growth Factor signaling“, *Molecular and Cell Biology*, 15: 1182-1191
- Gray, W.R., Sandberg, L.B., Foster, J.A.,** (1973), „Molecular Modell for Elastin Structure and Function“, *Nature*, 246: S.461-466
- Griesbach R.J.,** (1983), „Protoplast Microinjection“, *Hortscience*, 18 (4): 616-616
- Griffiths, A.D.,** (1993), „Production of Human Antibodies using Bacteriophage“, *Current Opinion in Immunology*, 5: S.263-267
- Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Marks, J.D., Bye, J.M., Embleton, M.J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K.P., Gorick, B.D., Hughes-Jones, N.C., Hoogenboom, H.R., Winter, G.,** (1993), „Human Anti-Self Antibodies with High Specificity from Phage Display Libraries“, *The EMBO Journal*, 12(2): S.725-734
- Griffiths, A.D., Duncan, A.R.,** (1998), „Strategies for Selection of Antibodies by Phage Display“, *Current Opinion in Biotechnology*, 9: S.102-108
- Gronwald R.G., Grant F.J., Haldeman B.A., Hart C.E., O'Hara P.J., Hagen F.S., Ross R., Bowen-Pope D.F., Murray M.J.,** (1988), „Cloning and Expression of a cDNA coding for the human Platelet-derived Growth Factor Receptor: Evidence for more than one Receptor Class“, *Proceedings of the National Acedamy of Sciences of the United States of America*, 85(10):3435-3439

- Grossmann, K., Retzlaff, G.,** (1997), „Bioregulatory Effects of the Fungicidal Strobilurin Kresoxim-methyl in Wheat (*Triticum aestivum*)“, Pestic Science, 50: S.11-20
- Grossmann, K., Kwiatkowski, J., Caspar, G.,** (1999), „Regulation of Phytohormone Levels, Leaf Senescence and Transpiration by the Strobilurin Kresoxim-methyl in Wheat (*Triticum aestivum*)“, Journal of Plant Physiology, 154: S.805-808
- Gutierrez-Lugo M.T., Lotina-Hennsen B., Farres A., Sanchez S., Mata R.,** (1999), „Phytotoxic and photosynthetic Activities of Maduramicin and Maduramicin Methyl Ester“, Zeitschrift für Naturforschung, 54 (5-6): 325-332
- Haase, U., Brandt, U., von Jagow, G.,** (1994), „Wirkungsmechanismus des Strobilurinderivates BAS 490F“, Mitt.a.d.Biol.Bundesanst.H., 301: S.411
- Hain, R., Stabel, P., Czernilofsky, A.P., Steinbiß, H.H., Herrera-Estrella, L., Schell, J.,** (1985), „Uptake, Integration, Expression and genetic Transmission of a selectable chimaeric Gene by Plant Protoplasts“, Molecular and General Genetics, 199: S.161-168
- Hanes, J., Plückthun, A.,** (1997), „*In vitro* Selection and Evolution of Functional Proteins by Using Ribosome Display“, Proceedings of the National Acedamy of Sciences of the United States of America, 94: S.4937-4942
- Hansen G., Wright M.S.,** (1999), „Recent Advances in the Transformation of Plants“, Trends in Plant Science, 4 (6): 226-231
- Hardy, G.E.St.J., Barrett, S., Shearer, B.L.,** (2001), „The Future of Phosphite as a Fungicide to Control the Soilborne Plant Pathogen *Phytophthora zinnamomi* in natural Ecosystems“, Australasian Plant Pathology, 30. S.133-139
- Harpster M.H., Townsend J.A., Jones J.D., Bedbrook J., Dunsmuir P.,** (1988), „Relative Strengths of the 35S Cauliflower Mosaic Virus, 1', 2', and Nopaline Synthase Promoters in transformed Tobacco Sugarbeet and Oilseed Rape Callus Tissue“, Molecular and General Genetics, 212(1): S.182-90
- Harris J.R., Markl J.,** (1999), „Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH): a biomedical Review.“, Micron, 30(6):597-623
- Harris J.R., Markl J.,** (2000), „Keyhole Limpet Hemocyanin: molecular Structure of a potent marine Immunoactivator. A Review.“, Eur.Urol., 37, Suppl 3:24-33
- Hayman, G.T., Farrand, S.K.,** (1990), „*Agrobacterium* Plasmids encode structurally and functionally different Loci for Catabolism of Agropine-type Opines“, Mol. Gen. Genet., 223: 465-473
- Herbers K., Sonnewald U.,** (1999), „Production of new/modified Proteins in transgenic Plants“, Current Opinion in Biotechnology, 10(2): 163-168
- Hill A.S., Giersch T.M., Loh C.S., Skerritt J.H.,** (1999), „Immunoassay for Wheat processing Quality: Utilization of a Sandwich Assay incorporating an immobilized Single-Chain Fragment“, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(10): 4484-4490
- Hilpert K., Hansen G., Wessner H., Kuttner G., Welfle K., Seifert M., Hohne W.,** (2001), „Anti-*c-myc* antibody 9E10: Epitope key Positions and Variability characterized using Peptide Spot Synthesis on Cellulose“, Protein Engineering, 14(10):803-806
- Hock, B., Fedtke, C., Schmidt, R.R.,** (1995), „Herbizide, Entwicklung, Anwendung, Wirkung, Nebenwirkungen“, Georg Thieme Verlag Stuttgart

- Hoekema A., Hooykaas P.J., Schilperoort R.A.**, (1983), „A Binary Plant Vector Strategy based on Separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-Plasmid“, *Nature*, 303 (5913): 179-180
- Hondred D., Walker J.M., Mathews D.E., Vierstra R.D.**, (1999), „Use of Ubiquitin Fusions to Augment Protein Expression in transgenic Plants“, *Plant Physiology*, 119 (2): S. 713-723
- Hong Y., Saunders K., Hartley M.R., Stanley J.**, (1996), „Resistance to Geminivirus Infection by Virus-induced Expression of Dianthin in transgenic Plants“, *Virology*, 220 (1): S.119-127
- Honjoh K., Shimizu H., Nagaishi N., Matsumoto H., Suga K., Miyamoto T., Iio M., Hatano S.** (2001), „Improvement of freezing Tolerance in transgenic Tobacco Leaves by expressing the *hlc6* Gene“, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65 (8): 1796-1804
- Hoogenboom H.R., Griffiths A.D., Johnson K.S., Chiswell D.J., Hudson P., Winter G.**, (1991), „Multisubunit Proteins on the Surface of filamentous Phage-Methodologies for displaying Antibody (FAB) heavy and light-Chains“, *Nucleic Acids Research*, 19(15): S.4133-4137
- Hoogenboom, H.R., Winter, G.**, (1992), „By-Passing Immunisation Human Antibodies from Synthetic Repertoires of Germline VH Gene Segments rearranged *in vitro*“, *Journal of Molecular Biology*, 27: S. 381-388
- Hoogenboom H.R., Chames P.**, (2000), „Natural and designer binding Sites made by Phage Display Technology“, *Immunology Today*, 21(8): 371-378
- Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G., Sanders P.R., Lloyd A., Hoffmann N.**, (1984), „Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants“, *Science* 223 (4635): S. 496-498
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.**, (1985/I), „A simple and general Method for transferring Genes into Plants“, *Science* 227(4691): S.1229-1231
- Horsch, R.B., Rogers, S.G., Fraley, R.**, (1985/II), „Transgenic plants“, *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology*, 50: S.433-437
- Hulzink, R.J.M., De Groot, P.F.M., Croes, A.F., Quaedvlieg, W., Twell, D., Wullems, G.J., van Herpen, M.M.A.**, (2002), „The 5'-untranslated Region of the *ntp303* Gene strongly enhances Translation during Pollen Tube Growth, but not during Pollen Maturation“, *Plant Physiology*, 129: S.342-353
- Hwang, C., Sinskey, A.J., Lodish, H.F.**, (1992), „Oxidized Redox State of Glutathione in the endoplasmic Reticulum“, *Science* 257: S.1496-1502
- Inoue H, Nojima H, Okayama H.**, (1990), „High Efficiency Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids“, *Gene* 96(1): 23-28
- Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T., Kumashiro T.**, (1996), „High Efficiency Transformation of Maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*“, *Nature Biotechnology*, 14 (6): 745-750
- Jermutus, L., Honneger, A., Schwesinger, F., Hanes, J., Plückthun, A.**, (2001), „Tailoring *in vitro* Evolution for Protein Affinity or Stability“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1): S: 75-80
- Jones, S.D., Marasco, W.A.**, (1998), „Antibodies for targeted Gene Therapy: extracellular Gene Targeting and intracellular Expression“, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31 S:153-157

- Jung, S., Plückthun, A.**, (1997), „Improving *in vivo* Folding and Stability of a Single Chain Fv-Antibody Fragment by Loop crafting“, *Protein Engineering* 10(8): S: 959-966
- Jung, S., Honegger, A., Plückthun, A.**, (1999), „Selection for improved Protein Stability by Phage Display“, *Journal of Molecular Biology*, 294: S: 163-180
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., Foeller, C.**, (1991), „Sequences of Proteins of Immunological Interests“, 5th Edit.US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health
- Ke, H.Y., Sun, J.G., Feng, X.Z., Czako, M., Marton, L.**, (2001), „Differential Mercury Votalization by Tobacco Organs expressing a modified bacterial *merA*-Gene“, *Cell Research*, 11(3): S. 231-236
- Kearney J.F., Radbruch A., Liesegang B., Rajewsky K.**, (1979) „New Mouse Myeloma Cell-Line that has lost Immunoglobulin Expression but permits the Construction of Antibody secreting Hybrid Cell-Lines“, *Journal of Immunology* 123 (4): S.1548-1550
- Kerkenhaar A.**, (1995), „Mechanism of Action of Cyclic Amine Fungicides: Morpholines and Piperidines“, in Lyr, H. (ed.), „Modern Selective Fungicides, Properties, Applications, Mechanisms of Action“, Gustav Fischer Verlag, S.185-204
- Khahlil, I.A., Mercer, E.I.**, (1990), „Effect of some Sterol-Biosynthesis-inhibiting Fungicides on the Biosynthesis of Polyisoprenoid Compounds in Winter Wheat Seedlings“, *Phytochemistry*, 29(2): S.417-424
- Khahlil, I.A., Mercer, E.I.**, (1991), „Accumulation of 9- β ,19-Cyclopropyosterols in Cereals treated with Fenpropimorph“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: S.404-407
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sandford, J.C.**, (1987) „High-velocity Microprojectiles for delivering Nucleic Acids into living Cells“, *European Journal of Biochemistry*, 235: S.54-63
- Knappik A., Plückthun A.** (1995), „Engineered Turns of a recombinant Antibody improve its *in vivo* Folding“, *Protein Engineering*, 8(1):81-89
- Knight, S.C., Anthony, V.M., Brady, A.M., Greenland, A.J., Heaney, S.P., Murray, D.C., Powell, K.A., Schulz, M.A., Spinks, C.A., Worthington, P.A., Youle, D.**, (1997), „Rationale and Perspectives on the Development of Fungicides“, *Annual Rev. of Phytopat.*, 35: 349-372
- Knippers, R.**, (1995), „Molekulare Genetik“, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Kobatake, E., Onoda, K., Yanagida, Y., Aizawa, M.**, (2000), „Design and Gene Engineering Synthesis of an extremely thermostable Protein with biological Activity“, *Biomacromolecules*, 1: S.382-386
- Köhler, G., Milstein**, (1976) „Derivation of specific Antibody-producing Tissue Culture and Tumor Lines by Cell Fusion“, *European Journal of Immunology* 6: S.511
- Köhler, G.**, (1985) „Herstellung und Diversifizierung von monoklonalen Antikörpern (Nobel-Vortrag)“, *Angewandte Chemie* 97: S. 829-836
- Koorneef, M., Hanhart, C.J., Hilhorst, H.W.M., Karszen, C.M.**, (1989) „*In Vivo* Inhibition of Seed Development and Reserve Protein Accumulation in Recombinants of Abscisic Acid Biosynthesis and Responsiveness Mutants in *Arabidopsis thaliana*“, *Plant Physiology*, 90: S.463-469
- Kraiczky, P., Haase, U., Gencic, S., Flindt, S., Anke, T., Brandt, U. von Jagow, G.**, (1996) „The Molecular Basis for the Natural Resistance of the Cytochrome bc₁-complex from Strobilurin-producing Basidiomycetes to Center Q_P Inhibitors“, *European Journal of Biochemistry*, 235(1-2), S.54-63

- Krämer, U., Chardonens A.N.**, (2001) „The Use of Transgenic Plants in the Bioremediation of Soils contaminated with Trace Elements“, Applied Microbiology Biotechnology, 55: S. 661-672
- Kuck K.H., Scheinpflug, H., Pontzen, R.**, (1995), „DMI Fungicides“, in Lyr, H. (ed.), „Modern Selective Fungicides, Properties, Applications, Mechanisms of Action“, Gustav Fischer Verlag, S.205-258
- Kumar P.A., Sharma R.P.**, (1994), „Genetic-Engineering of Insect-Resistant Crop Plants with *Bacillus-thuringiensis* Crystal Protein Genes“, Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 3(1): S.3-8
- Kumar, A.**, (2001), „Plant Biotechnology: Future Perspectives“, Defence Science Journal, 51(4): S.353-366
- Kuvshinov, V., Koivu, K., Kanerva, A., Pehu, E.**, (2001), „Molecular Control of transgene Escape from Genetically modified Plants“, Plant Science, 160: S.517-522
- Laemmli, U.K.**, (1970), „Cleavage of structural Proteins during Assembly of the Head of Bacteriophage T4“, Nature, 227(259): S.680-685
- Lam, J.H., Wong, J.S., Wang, B., Wong, R.N.S., Yeung, H.W., Shaw, P.C.**, (1996), „Use of Trichosanthin to reduce Infection by Turnip mosaic Virus“, Plant Science, 114: S.111-117
- Lange, L., Breinhold, J., Rasmussen, F.W., Nielsen, R.I.**, (1993), „Microbial Fungicides-the Natural Choice“, Pestic Science, 39: S.155-160
- Lassner, M.W., Peterson, P., Yoder, J.I.**, (1989), „Simultaneous Amplification of multiple DNA Fragments by Polymerase chain Reaction in the Analysis of transgenic Plants and their Progeny“, Plant Molecular Biology Reporter, 7(2): S.116-128
- Le Gall, F., Bove, J.M., Garnier, M.**, (1998), „Engineering of a Single-Chain Variable Fragment (scFv) Antibody specific for the Stolbur Phytoplasma (Mollicute) and its Expression in *Escherichia coli* and Tobacco Plants“, Appl.Environ.Microbiol. 64: S. 4566-4572
- Lecerf, J.M., Shirley, T.L., Zhu, Q., Kazantsev, A., Amersdorfer, P., Housman, D.E., Messer, A., Huston, J.S.**, (2001), „Human Single-Chain Fv Intrabodies counteract *in situ* Huntingten Aggregation in Cellular Models of Huntingtens Disease“, Proceedings of the National Acedamy of Sciences of the United States of America, 98(8): S. 4764-4769
- Lei S.P., Lin H.C., Wang S.S., Callaway J., Wilcox G.**, (1987), „Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB Gene and its Product Pectate Lyase“, Journal of Bacteriology 169(9): S. 4379-4383
- Leinhos, G.M.E., Gold, R.E., Düggelin, M., Guggenheim, R.**, (1997), „Development and Morphology of *Uncinula necator* following Treatment with the Fungicides Kresoxim-methyl and Penconazole“, Mykologischer Research, 101(9): S.1033-1046
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.E.C.**, (2001), „Toxicological Relevance of the Multidrug Resistance Protein 1, MRP1 (ABCC1) and the related Transporters“, Toxicology, 167: S.3-23
- Liddell, E., Weeks, I.**, (1996), „Die Humanisierung von Nagerantikörpern.“, in „Antikörper-Techniken“, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, S.69-72
- Lin, W., Anuratha C.S., Datta, K., Potrykus, I., Muthukrishnan, S., Datta, S.K.**, (1995), „Genetic Engineering of Rice for Resistance to Sheath Blight“, Biotechnology, 13: S.686-691
- Little, M., Kipriyanov, S.M., Le Gall, F., Moldenhauer, G.**, (2000), „Of Mice and Man: Hybridoma and Recombinant Antibodies“, Immunology Today, 21(8): S.-364-370

- Longstaff, M., Newell, C.A., Boonstra, B., Strachan, G., Learmonth, D., Harris, W.J., Porter, A.J., Hamilton, W.D.O.**, (1998), „Expression and Characterization of Single-Chain Antibody Fragments produced in Transgenic Plants against the Organic Herbicides Atrazine and Paraquat“, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1381: S.147-161
- Lottspeich, F., Zorbass, H.**, (1998), „Immunologische Techniken“, in „Bioanalytik“ Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin, S.67-75
- Lyr, H.**, (1995), „Selectivity in modern Fungicides and its Basis“, in Lyr, H. (ed.), „Modern Selective Fungicides, Properties, Applications, Mechanisms of Action“, Gustav Fischer Verlag, S.13-22
- Mamdouh, M.N.A.**, (1995), „Glutathione Regulation of Glutathione S-transferase and Peroxidase Activity in Herbicide-treated *Zea mays*“, *Plant Physiol.Biochem.*, 33(2): 185-192
- Marasco, W.A., Haseltine, W.A., Chen, S-Y**, (1993), „Design, intracellular Expression, and Activity of human anti-HIV GP 120 Single Chain Antibody“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90:7889-7893
- Marasco, W.A.**, (1995), „Intracellular Antibodies {Intrabodies} as Research Reagents and Therapeutic Molecules for Gene Therapy“, *Immunotechnology* ,1(1): 1-19
- Marasco W.A.**, (1997), „Intrabodies: turning the humoral Immune System outside in for intracellular Immunization“, *Gene Therapy*, 4(1):11-15
- Marasco W.A., LaVecchio, J., Winkler, A.**, (1999), „Human Anti-HIV-1 tat sFv Intrabodies for Gene Therapy of advanced HIV-1-Infection and AIDS“, *Journal of Immunological Methods*, 231: S.223-228
- Marks J.D., Griffiths A.D., Malmqvist M., Clackson T.P., Bye J.M., Winter G.** (1992), „By-passing Immunization: building high Affinity human Antibodies by Chain Shuffling“, *Biotechnology* 10(7):779-783
- Martin, A., C., R.**, (2001), „Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody variable Domains“, in Kontermann & Dübel (eds.), „Antibody Engineering“, Springer-Verlag Berlin: S.422-439
- 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“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (11): 5335-5340
- May G.D., Afza R., Mason H.S., Wieko A., Novak F.J., Arntzen C.J.**, (1995), „Generation of transgenic Banana (*Musa acuminata*) Plants via *Agrobacterium*-mediated Transformation“, *Bio-Technology*, 13 (5): 486-492
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J.**, (1990), „Phage Antibodies: Filamentous Phage displaying Antibody Variable Domains“, *Nature*, 348: S.552-554
- McGregor, D.P., Molloy, P.E., Cunningham, C., Harris, W.J.**, (1994), „Spontaneous Assembly of bivalent Single Chain Antibody Fragments in *Escherichia coli*“, *Molecular Immunology*, 31 (3): S.219-226
- Merril, C.R.**, (1990), „Gel-Staining Techniques“, *Methods in Enzymology*, 182: S.477-488
- Mersereau M., Pazour G.J., Das A.**, (1990), „Efficient Transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by Electroporation“, *Gene*; 90(1):149-51

- Meyer D.E., Chilkoti A.**, (1999), „Purification of recombinant Proteins by Fusion with thermally-responsive Polypeptides“, *Nature Biotechnology*, 17 (11): 1112-1115
- Meyer D.E., Trabbic-Carlson K., Chilkoti A.**, (2001), „Protein Purification by Fusion with an environmentally responsive Elastin-like Polypeptide: Effect of Polypeptide Length on the Purification of Thioredoxin“, *Biotechnology Progress*, 17 (4): 720-728
- Meyer D.E., Chilkoti A.**, (2002), „Genetically encoded Synthesis of Protein-based Polymers with precisely specified molecular Weight and Sequence by recursive directional Ligation: Examples from the Elastin-like Polypeptide System“, *Biomacromolecules*, 3 (2): 357-367
- Munro S., Pelham H.R.**, (1986), „An Hsp70-like Protein in the ER: Identity with the 78 kd Glucose-regulated Protein and Immunoglobulin Heavy Chain binding Protein“, *Cell*, 46(2): S.291-300
- Munro S., Pelham H.R.**, (1987), „A C-terminal Signal prevents Secretion of luminal ER Proteins“, *Cell*, 48(5): S.899-907
- Müntz, K.**, (1998), „Deposition of Storage Proteins“, *Plant Molecular Biology*, 38: S.77-99
- Murashige, T., Skoog, F.**, (1962), „A revised Medium for rapid Growth and Biosassays with Tobacco Tissue Cultures“, *Physiolica Plantarum*, 15: S.473-497
- Nakamura, K., Matsuoka, K.**, (1993), „Protein Targeting to the Vacuole in Plant Cells“, *Plant Physiology*, 101: S.1-5
- Nakashita H., Arai Y., Shikanai T., Doi Y., Yamaguchi I.**, (2001), „Introduction of bacterial Metabolism into higher Plants by polycistronic transgene Expression“, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65 (7): 1688-1691
- Nambara, E., Naito, S., McCourt, P.**, (1992), „A Mutant of *Arabidopsis* which is defective in Seed Development and Storage Protein Accumulation is a New *abi3* Allele“, *The Plant Journal*, 2: 435-441
- Nambara, E., Keith, K., McCourt, P., Naito, S.**, (1994), „Isolation of an Internal Deletion Mutant of the *Arabidopsis thaliana ABI3*-Gene“, *Plant Cell Physiology*, 35(3): 509-513
- Nelson, R.S., McCormick, S.M., Delannay, X.**, (1988), „Virus Tolerance, Plant Growth and Field Performance of Transgenic Tomato Plants expressing Coat Protein from Tobacco Mosaic Virus“, *Biotechnology*, 6: 403-409
- Obst, A., Steck, U.**, (1996), „Strobilurin-Fungizide gegen Getreideschadpilze“, *Getreide* 2.Jg. (2): S.26-28
- Odell JT, Nagy F, Chua NH.**, (1985), „Identification of DNA Sequences required for Activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter“, *Nature*, 313(6005):810-812
- Olaya, G., Köller**, (1999), „Baseline Sensitivities of *Venturia inaequalis* Populations to the Strobilurin Fungicide Kresoxim-methyl“, *Plant Disease*, 83(3): S.274-278
- Owen, M., Gandecha, A., Cockburn, B., Whitelam, G.**, (1992), „Synthesis of Functional Anti-Phytochrome Single-Chain Fv Protein in Transgenic Tobacco“, *Bio-Technology*, 10: S.790-794
- Pagny S., Lerouge P., Faye L., Gomord V.**, (1999), „Signals and Mechanisms for Protein Retention in the endoplasmic Reticulum“, *Journal of Experimental Botany*, 50 (331): 157-164
- Paszkowski J., Shillito R.D., Saul M., Mandak V., Hohn T., Hohn B., Potrykus I.**, (1984), „Direct Gene-Transfer to Plants“, *The EMBO Journal*, 3 (12): 2717-2722

- Peeters, K., DeWildt, C., Jaeger, G., Angenon, G., Depicker, A.,** (2001), „Production of Antibodies and Antibody Fragments in Plants“, *Vaccine*, 19: 2756-2761
- Pelham H.R.,**(1990), „The Retention Signal for soluble Proteins of the endoplasmic Reticulum“, *Trends Biochem. Sci.*, 15(12):483-486
- Pelham H.R.,**(1996), „The dynamic Organisation of the secretory Pathway“, *Cell Struct Funct.*, 21(5):413-419
- Perlak, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, T.A.,** (1990), „Insect Resistent Cotton Plants“, *Biotechnology*, 8: 939-943
- Perrin Y., Vaquero C., Gerrard I., Sack M., Drossard J., Stöger E., Christou P., Fischer R.,** (2000), „Transgenic Pea Seeds as Bioreactors for the Production of a Single-chain Fv Fragment (scFv) Antibody used in Cancer Diagnosis and Therapy“, *Molecular Breeding*, 6 (4): 345-352
- Peters, J.H.,** (1990/I), „Präparation von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten“, in Peters, J.H., Baumgarten, H.: „Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung“, Springer-Verlag: S.78-80
- Peters, J.H.,** (1990/II), „Präparation von Maus Peritonealmakrophagen als Feederzellen“ in Peters, J.H., Baumgarten, H.: „Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung“, Springer-Verlag: S.86-87
- Peters, J.H.,** (1990/III), „Fehlersuche bei der Herstellung und Aufzucht von Hybridomen“ in Peters, J.H., Baumgarten, H.: „Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung“, Springer-Verlag: S.198-203
- Peters, J.H., Gieseler, R.K.H.,** (1990), „Selektionsprinzipien“ in Peters, J.H., Baumgarten, H.: „Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung“, Springer-Verlag: S.141-149
- Phillips J., Artsaenko O., Fiedler U., Horstmann C., Mock H.P., Müntz K., Conrad U.,** (1997) „Seed-specific Immunomodulation of Abscisic Acid Activity induces a developmental Switch.“ *The EMBO Journal* 1;16(15):S. 4489-4496
- Plückthun, A., Krebber, A., Krebber, C., Horn, U., Knüpfer, U., Wenderoth, R., Nieba, L., Proba, K., Riesenberger, D.,** (1996), „Producing Antibodies in *Escherichia coli*: from PCR to Fermentation“, in „Antibody Engineering a practical approach“, Oxford Univ. Press: 203-252
- Pope, A.R., Embleton, M.J., Mernaugh, R.,** (1996), Construction and use of antibody gene repertoires“, in McCafferty, J., Hoogenboom, H.R., Chriswell, D.J., (eds.) „Antibody Engineering A Practical Approach“, Oxford University Press: S. 1-40
- Potter M.,** (1985/I), „Preface“, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 122: S.V-VII
- Potter M.,** (1985/II), „History of the Balb/c-family“, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 122: S.1-5
- Prigge, G., Rademacher, G., Menck, B.H.,** (1998), „Neue Erkenntnisse zur physiologischen Wirkung von Juwel[®]“, *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. H.*, 357: S.132
- Punja, Z.K.,** (2001) „Genetic engineering of Plants to enhance Resistance to fungal Pathogens - a Review of Progress and future Prospects“, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23 (3): 216-235
- Rau D., Kramer K., Hock B.,** (2002) „Single-chain F-v Antibody-alkaline Phosphatase Fusion Proteins produced by one-Step cloning as rapid Detection Tools for ELISA“, *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 23 (2): 129-143

- Raymond, P., Al-Ani, A., Pradet, A.,** (1985), „ATP Production by Respiration and Fermentation, and Energy Charge during Aerobiosis and Anaerobiosis in Twelve Fatty and Starchy germinating Seeds“, *Plant Physiology*, 79: S.879-884
- Reich T.J., Iyer V.N., Miki B.L.,** (1986) „Efficient Transformation of Alfalfa Protoplasts by the intranuclear Microinjection of Ti-Plasmids“, *Bio-Technology*, 4 (11): 1001-1004
- Repellin A., Baga M., Jauhar P.P., Chibbar R.N.,** (2001) „Genetic Enrichment of cereal Crops via Alien Gene Transfer: New challenges“, *Plant Cell Tissue And Organ Culture*, 64 (2-3): 159-183
- Reuveni, M., Harpaz, M., Reuveni, R.,** (1998), „Integrated Control of Powdery Mildew on Field-Grown Mango Trees by Foliar Sprays of Mono-Potassium Phosphate Fertilizer, Sterol Inhibitor Fungicides and the Strobilurin Kresoxim-methyl“, *European Journal of Plant Pathology*, 104: S.853-860
- Reuveni, M.,** (2000) „Efficiency of Trifloxystrobin (Flint) a new Strobilurin Fungicide, in controlling Powdery Mildews on Apple, Mango and Nectarine and Rust on Prune Trees“, *Crop Protection*, 19: 335-341
- Richardson, J.H., Marasco, W.A.,** (1995), „Intracellular Antibodies: Development and Therapeutic Potential“, *Trends in Biotechnology*, 13: S.306-310
- Richardson, J.H., Sodroski, J.G., Waldmann, T.A., Marasco, W.A.,** (1995), „Phenotypic Knockout of the High-Affinity Human Interleukin-2 Receptor by Intracellular Single-Chain Antibodies against the Alpha-Subunit of the Receptor“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: S.3137-3141
- Robert E., Farrell, J.R.,** (1993), „Purification of mRNA from Total Cellular or Total Cytoplasmic RNA, Using Magnetic Beads“ in „RNA Methodologies-A Laboratory Guide for Isolation and Characterization“ Academic Press, Inc. , San Diego: S.107-108
- Roehl, F., Sauter, H.,** (1993), „Species Dependence of Mitochondrial Respiration Inhibition by Strobilurin Analogus“, *Biochemical Society Transactions*, 22(1): S.63S-S63S
- Rondon, I.J., Marasco, W.A.,** (1997), „Intracellular Antibodies {Intrabodies} for Gene Therapy of Infectious Diseases“, *Annual Review of Microbiology*, 51: S.257-283
- Saalbach I., Giersberg M., Conrad U.,** (2001), „High-level expression of a Single-Chain Fv Fragment (scFv) Antibody in transgenic Pea Seeds“ *Journal of Plant Physiology*, 158 (4): 529-533
- Salmon, F., Kohl, W.,** (1996) „Use of fresh and cryopreserved Hepatocytes to study the Metabolism of Pesticides in Food-producing Animals and Rat“, *Xenobiotika*, 26 (8), S.803-811
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F.,** (1989) „Molecular Cloning: A laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanders, P.R., Sammons, B., Kaniewski, H.,** (1992), „Field Resistance of Transgenic Tomatos expressing the Tobacco Mosaic Virus Coat Protein Genes“, *Phytopathology*, 82: S.683-690
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.,** (1977), „DNA sequencing with chain-terminating Inhibitors“ *Proceeding of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 74(12): S.5463-5467
- Sauter H., Steglich W., Anke T.,** (1999), „Strobilurins: Evolution of a new Class of active Substances“, *Angewandte Chemie-International Edition*, 38 (10): S.1329-1349

- Saxena, A.K., Bamezai, R.**, (1988), „Visualization and Comparison of Protein Bands in the Same SDS-PAG with simultaneous use of three different Stains“, *Indian Journal of Experimental Biology*, 26: S.866-868
- Schaller, H., Maillot-Vernier, P., Benveniste, P., Belliard, G.**, (1991), „Sterol Composition of Tobacco Calli selected for Resistance to Fenpropimorph“, *Phytochemistry*, 30(8): S.2547-2554
- Scheller J., Gührs K.H., Grosse F., Conrad U.**, (2001), „Production of Spider Silk Proteins in Tobacco and Potato“, *Nature Biotechnology*, 19 (6): 573-577
- Scheller, J., Conrad, U.**, (2001), „Isolation and Purification of Spider Silk Proteins from transgenic Plants“, Poster, IPK-Gatersleben, Corrensstraße 3, D-06466, Gatersleben
- Schillberg S., Zimmermann S., Findlay K., Fischer R.**, (2000), „Plasma Membrane Display of anti-viral Single chain Fv Fragments confers Resistance to Tobacco Mosaic Virus“, *Molecular Breeding*, 6 (3): 317-326
- Schillberg S., Zimmermann S., Zhang, M-Y., Fischer R.**, (2001), „Antibody-based Resistance to Plant Pathogens“, *Transgenic Research*, 10: 1-12
- Schmitt, P., Benveniste, P., Leroux, P.**, (1981), „Accumulation of 9 β ,19-Cyclopropylsterols in Suspension Cultures of Bramble Cells cultured with Tridemorph“, *Phytochemistry*, 20(9): S.2153-2159
- Schouten, A., Roosien, J., van Engelen, F.A., De Jong, G.A.M.I., Borst-Frenssen, A.W.M.T., Zilverentant, J.F., Bosch, D., Stiekema, W.J., Gommers, F.J., Schotts, A., Bakker, J.**, (1996), „The Terminal KDEL Sequence increases the Expression Level of a Single-Chain Antibody designed to be targeted to Both the Cytosol and the Secretory Pathway in Transgenic Tobacco“, *Plants Molecular Biology*, 30: S.781-793
- Schouten, A., Roosien, J., De Boer, J.M., Wilmlink, A., Rosso, M.A., Bosch, D., Stiekema, W.J., Gommers, F.J., Bakker, J., Schotts, A.**, (1997), „Improving scFv Antibody Expression Levels in the Plant Cytosol“, *FEBS Letters*, 415(2): S.235-241
- Schulz, A., Wengenmayer, F., Goodman, H.M.**, (1990), „Genetic Engineering of Herbicide Resistance in Higher Plants“, *Critical Reviews in Plant Science*, 9(1): S.1-15
- Seymour, N.P., Tomphson, J.B., Fiske, M.L.**, (1994), „Phytotoxicity of Fosetyl AI and Phosphonic Acid to Maize during Production of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Inoculum“, *Plant Disease* 78: S.441-446
- Shah D.M., Horsch, R.B., Klee, H.J.**, (1986), „Engineering Herbicide Tolerance in transgenic Plants“, *Science*, 233: 478-481
- Shimada, N., Suzuki, Y., Nakajima, M., Conrad, U., Murofushi, N., Yamaguchi, I.**, (1999), „Expression of a Functional Single-Chain Antibody against GA_{24/19} in transgenic Tobacco“, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63(4): 779-783
- Sierotzki, H., Wullschleger, J., Gisi, U.**, (2000/I), „Point Mutation in Cytochrome *b* Gene conferring Resistance to Strobilurin Fungicides in *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* Field Isolates“, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68: S.107-112
- Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poirey, S., Gisi, U.**, (2000/II), „Mode of Resistance to Respiration Inhibitors at the Cytochrome bc₁ Enzyme Complex of *Mycosphaerella fijiensis* Field Isolates“, *Pest Management Science*, 56: S.833-841
- Smith M.D.**, (1996), „Antibody Production in Plants“, *Biotechnology Advances*, 14 (3): S.267-281

- Smith M.D., Glick B.R.**, (1997), „Production and Applications of Plant-produced Antibodies“, *Food Technology and Biotechnology*, 35 (3): S.183-191
- Smith M.D., Glick B.R.**, (2000), „The Production of Antibodies in Plants: An Idea whose Time has come ?“, *Biotechnology Advances*, 18 (2): S.85-89
- Smith R.H., Hood E.E.** (1995), „*Agrobacterium tumefaciens* Transformation of Monocotyledons“, *Crop Science*, 35 (2): S.301-309
- Spiegel, H., Schillberg, S., Sack, M., Hulzem, A., Nähring, J., Monecke, M., Liao, Y.-C., Fischer, R.**, (1999), „Accumulation of Antibody Fusion Proteins in the Cytoplasm and ER of Plant Cells“, *Plant Science*, 149: S.63-72
- Staub, T.**, (1991), „Fungicide Resistance: Practical Experience with Antiresistent Strategies and the Role of Integrated Use“, *Annual Review of Phytopathology*, 29: S. 421-442
- Stöger E., Vaquero C., Torres E., Sack M, Nicholson L., Drossard J., Williams S., Keen D., Perrin Y., Christou P., Fischer R.**, (2000), „Cereal Crops as viable Production and Storage Systems for pharmaceutical scFv Antibodies“, *Plant Molecular Biol.*, 42(4):583-590
- Taggart, T.R., Samlof, M.I.**, (1982), „Stable Antibody Producing Murine Hybridomas“, *Science*, 219: S.1228-1230
- Tal, M., Silberstein, A., Nusser, E.**, (1985), „Why Does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different Proteins ?“, *The Journal of Biol. Chemistry*, 260(18): S.9976-9980
- Tamura, K., Kimura, M., Yamaguchi, I.**, (1995), „Blasticidin S Deaminase Gene (*BSD*): a New Selection Marker Gene for Transformation of *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*“, *Biosci.Biotech.Biochem.*59(12): S.2336-2638
- Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinka, S., De Martines, D., Catteneo, A., Galeffi, P.**, (1993), „Transgenic Plants Expressing a Functional Single-Chain Fv Antibody are Specifically Protected from Virus Attack“, *Nature*, 366: S.469-472
- Taylor, A.G., Eckenrode, C.J., Straub, R.W.**, (2001), „Seed Coating Technologies and Treatments for Onion: Challenges and Progress“, *Hortscience*, 36(2): S.199-205
- Terrada, E., Kerschbaumer, R.J., Giunta, G., Galeffi, P., Himmler, G., Cambra, M.**, (2000), „Fully Recombinant Enzyme-Linked Immunosorbent Assays“ Using Genetically Engineered Single-Chain Antibody Fusion Proteins for Detection of *Citrus tristeza virus*“, *The American Phytopathological Society*, 90(12): S.1337-1344
- Teillaud J.L.**, (1999), „A therapeutic Trojan horse: intracellular Antibodies“, *Pathologie Biologie (Paris)*, 47(8): S.771-775
- Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang MB., Thornton S., Brettell R.**, (1997), „*Agrobacterium tumefaciens*-mediated Barley Transformation“, *Plant J.*, 11 (6): S.1369-1376
- Tinjuangjun P., Loc N.T., Gatehouse A.M.R., Gatehouse J.A., Christou P.**, (2000), „Enhanced Insect Resistance in Thai rice Varieties generated by Particle Bombardment“, *Molecular Breeding*, 6 (4): S.391-399
- Töpfer, R., Maas, C., Hörnicke-Grandpierre, C., Schell, J., Steinbiss, H.H.**, (1993), „Expression Vectors for High-Level Expression in Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants“, *Methods in Enzymology* 217: 66-78
- Tsaftaris, A.**, (1996), „The Development of Herbicide-Tolerant Transgenic Crops“, *Field Crops Research*, 45: S.115-123

- Voss, A., Niersbach, M., Hain, R., Hirsch, H.J., Liao, Y.C., Kreuzhaller, F., Fischer, R.,** (1995), „Reduced Virus Infectivity in *N.tabacum* secreting a TMV-specific Full-Size Antibody“, *Molecular Breeding* 1: S. 39-50
- Wandelt, C.I., Kahn, M.R.I., Craig, S., Schroeder, H., Spencer, D., Higgins, T.J.V.,** (1992), „Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic Reticulum and accumulates to high Levels in the Leaves of transgenic Plants.“, *The Plant Journal* 2(2): S.181-192
- Wiggenhauser, A.,** (1990), „Blutentnahme bei Versuchstieren“, in Peters, J.H., Baumgarten, H., „Monoklonale Antikörper-Herstellung und Charakterisierung“, Springer-Verlag: S 71-78
- Winter G., Griffiths A.D., Hawkins R.E., Hoogenboom H.R.,** (1994), „Making Antibodies by Phage Display Technology“, *Annual Review of Immunology*, 12:433-455
- Winter G., Milstein C.,** (1991), „Man-made Antibodies“, *Nature*, 349(6307): 293-299
- Wojdyla, A.T., Orlikowski, L.B.,** (1999), „Strobilurin Compounds in the Control of Rust, Powdery Mildew and Black Spot on some Ornamental Plants“, *Med. Fac. Land. Bouw. Univ. Gent*, 64/3b: S.539-545
- Wörn, A., Plückthun, A.,** (2001), „Stability Engineering of Antibody Single-Chain Fv Fragments“, *Journal of Molecular Biology*, 305: S.989-1010
- Wu, Y.-X., von Tiedemann, A.,** (2002), „Impact of Fungicides on Active Oxygen Species and the Antioxidant Enzymes in Spring Barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to Ozone“, *Environmental Pollution*, 116: S.37-47
- Würzner, R. ,** (1990), „Limiting-Dilution-Klonierung“ in Peters, J.H., Baumgarten, H., „Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung“, Springer-Verlag: S.204-206
- Xiao, X.W., Chu, P.W.G., Frenkel, M.J., Tabe, L.M., Shukla, D.D., Hanna, P.J., Higgins,T.J.V., Müller, W.J., Ward, C.W.,** (2000), „Antibody-Mediated improved Resistance to CIYVV and PVY Infections in transgenic Tobacco Plants expressing a Single Chain Variable Region Antibody“, *Molecular Breeding*, 6: S.421-431
- Xu D.P., Xue Q.Z., McElroy D., Mawal Y., Hilder V.A., Wu R.,** (1996), Constitutive Expression of a Cowpea Trypsin Inhibitor Gene, CpTi, in transgenic Rice Plants confers Resistance to two major Rice Insect Pests“, *Molecular Breeding*, 2(2): S.167-173
- Xu, B., Kriangkum, J., Nagata, L.P., Fulton, R.E., Suresh, M.R.,** (1999), „A Single Chain Fv specific against Western Equine Encephalitis Virus“, *Hybridoma*, 18(4): S.315-323
- Xu H., Montoya F.U., Wang Z., Lee J.M., Reeves R., Linthicum D.S., Magnuson N.S.,** (2002), „Combined Use of Regulatory Elements within the cDNA to Increase the Production of a Soluble Mouse Single-Chain Antibody, scFv, from Tobacco Cell Suspension Cultures.“, *Protein Expression and Purification*, 24(3): S.384-394
- Ypema, H.L., Gold, R.E.,** (1999), „KRESOXIM-METHYL: Modification of a naturally occurring compound to Produce a new Fungicide“, *Plant Disease*, 83(1): S.4-19
- Zhu, B., Chen, T.H.H., Li, P.H.,** (1996), „Analysis of Late Blight Disease Resistance and Freezing Tolerance in Transgenic Tomato Plants Expressing Sense and Anti-Sense Genes for an Osmotin like Protein“, *Planta*: 189: 70-77
- Zimmermann, S., Schillberg, S., Liao, Y-C., Fischer, R.,** (1998), „Intracellular Expression of TMV-specific Single-Chain Fv Fragments leads to improved Virus Resistance in *Nicotiana tabacum*“, *Molecular Breeding*, 4: 369: 379

Lebenslauf

Name	Michael Leps
Geburtsdatum	06.02.1974
Geburtsort	Wolfen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung und Beruf

Seit Mitte 1998-2002 „IPK-Gatersleben“ Gatersleben

Durchführung der experimentellen Arbeiten zum Thema der Dissertation „Expression von Einkettenantikörpern gegen das Fungizid Kresoxim-methyl in transgenen Tabakpflanzen“. Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben.

- Berufseinstieg, Promotion

1992-1998 „Martin Luther Universität“ Halle-Wittenberg

Von 1997 bis 1998 Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema: „Immunmodulation der Samenreifung in transgenen Tabakpflanzen“ am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben.

- Studium der Biologie

1990-1992 Gymnasium „Wolfen Stadt“
Wolfen

1980-1990 POS „Max Lademann“
Wolfen

- Schulbildung

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Phytoantikörper“ am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben, für die die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Meinem Doktorvater, Herrn Dr. habil. Udo Conrad, danke ich besonders für die Überlassung dieses interessanten Themas, seine kompetente Unterstützung und die hilfreichen Anregungen sowie für die Selbstständigkeit, die er mir zugestand.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Wobus möchte ich für die Ermöglichung, die Arbeit am IPK in Gatersleben anfertigen zu dürfen, danken. Herrn Dr. Achim Möller sei herzlichst gedankt für die überaus hilfreiche Unterstützung in Sachen Hybridomatechnologie, ohne welche die Kontinuität dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Herrn Dr. Jürgen Scheller möchte ich für die Überlassung der ELP-Sequenz und die gute Zusammenarbeit danken. Ein Dankeschön an Herrn Dr. habil. Armin Meister für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung. Frau Isolde Tillack sei gedankt für die Einarbeitung in die Hybridomzelltechnik. Frau Ulrike Gresch danke ich für die Durchführung der Immunisierungen. Frau Susanne König sei gedankt für die immer sehr gut ausgeführten Sequenzierungsarbeiten. Bei Frau Ursula Schumann möchte ich mich für die überaus hilfreiche Unterstützung bei der Regeneration der transgenen Tabakpflanzen bedanken. Frau Christine Helmold danke ich für die exzellente Unterstützung bei der Regeneration und Analyse der ELP-Pflanzen. An Frau Heike Ernst geht ein Dankeschön für für die Anfertigung der Fotoarbeiten. Großer Dank gilt auch den Gärtnern des IPK, Abteilung „Molekulare Genetik“ für die Anzucht und Versorgung der Pflanzen. Den Mitarbeitern der Bibliothek des IPK sei ebenfalls gedankt für die freundliche Unterstützung.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich auch bei meiner Familie für die Unterstützung bedanken.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Gatersleben, im Juni 2002

Michael Leps