

Anti-Quinmerac



Einkettenantikörperexpression 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 Britt Leps

geb. am 21.04.1974 in Halberstadt

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. Udo Conrad
2. Prof. Dr. Werner Roos
3. Dr. habil. Jürgen Schubert

Halle (Saale), Mai 2003

Datum der Verteidigung: 27.08.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005961

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005961>]

Abkürzungsverzeichnis:

A	Adenin
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
Amp ^r	Ampicillinresistenz
Anti-ABA-scFv	Einkettenantikörperfragment gegen Abscisinsäure
Anti-ox-scFv	Einkettenantikörperfragment gegen das Hapten Phenyl-Oxazolone
Anti-Quin-scFv	Einkettenantikörperfragment gegen das Herbizid Quinmerac
B 514H-BSA	Quinchlorac~BSA-Konjugat
B 518H-BSA	Quinmerac~BSA-Konjugat
BAP	6-Benzylaminopurin
BAS 518H	Quinmerac (BASF-Codename)
BASF	Badische Anilin- und Sodafabrik (Ludwigshafen)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CaMV 35S	„cauliflower mosaic virus“, Blumenkohl Mosaikvirus
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
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked-immunosorbent-assay“, Enzymimmuntest
ELP	„elastin-like peptid“, elastinartiges Polypeptid
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
F ₁ / F ₂ -Generation	erste bzw. zweite Tochtergeneration

FM	Frischmasse
FR Antikörperketten	„framework region“, Gerüstregion der variablen
Fv	variable Domäne des Antikörpermoleküls
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GLP	gesamtlösliches Protein
h	Stunde
HR-Technik	Technik zur Erzeugung herbizidresistenter Pflanzen
HRP	Horseradish Peroxidase
IAA	Indolyllessigsäure
IC ₅₀	Konzentration eines Effektors bei der die Hälfte eines maximalen Signals nachweisbar ist
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
k	kilo
Kan	Kanamycin
Kan ^r	Kanamycinresistenz
KDEL	Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin-Peptid
QUIN	Quinmerac
LacZ	Promotor des β -Galactosidasegenes aus <i>E.coli</i>
LeB4	Legumin B4-Gen
μ	Mikro
m	Meter, milli
M	Mol/Liter
MES	Morpholinethansulfonsäure
min	Minute
MW	relatives Molekulargewicht
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NAA	α -Naphthyllessigsäure
NPTII	Neomycin-Phosphotransferase II
N-Terminus	aminoterminaler Teil eines Proteine
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	„phosphate-buffered saline“, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	PBS mit Zusatz von 0,05% Tween20
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
PDGFR	Rezeptor des menschlichen Blutplättchenwachstumsfaktors
PEG	Polyethylenglykol
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
POD	Peroxidase
poly[A]-RNA	polyadenylierte Ribonucleinsäure
RAM-IgG	Rabitt-Anti Mouse-Antikörper (Antikörper gegen Maus, gewonnen aus Kaninchen)
Rel. LF	relative Luftfeuchtigkeit
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
scFv	„single-chain Fv“, Einketten-Antikörperfragment
scFv-ox	Einkettenantikörper gegen 4-Ethoxymethylen-2-phenyl-2-oxazolin-5-on (Oxazolon)
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
SNN	<i>Nicotiana tabacum</i> , Varietät Samsun NN (Wildtyp)
SP	Signalpeptid
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TG ₀	Generation der Primärtransformanden
TMB	3,3',5,5'-Trimethylbenzidin
TMD	Transmembrandomäne des menschlichen Blutplättchenwachstumsfaktors-Rezeptors
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
Ü/N	Über Nacht
UV	Ultraviolett
VH	variabler Teil der schweren Antikörperkette
VL, VK	variabler Teil der leichten Antikörperkette
VT	Volumenanteil
WS	Wuchsstoffe, Pflanzenhormone
WT	<i>Nicotiana tabacum</i> , Varietät Samsun NN (Wildtyp)
9E10	Anti-c-myc-Antikörper 9E10 (Evan et.al., 1985)
Δ	Änderung einer Größe

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	1
1.1	PFLANZEN ALS BIOREAKTOREN	2
1.2	„MOLECULAR FARMING“	4
1.3	REKOMBINANTE ANTIKÖRPER UND ANTIKÖRPERFRAGMENTE	5
1.4	EX-SITU UND IN-SITU NUTZUNG VON SCFV-EINKETTENANTI-KÖRPER	9
1.5	ANWENDUNG DER IMMUNMODULATION IN PFLANZEN	10
1.6	HERBIZIDNUTZUNG IN DER LANDWIRTSCHAFT	14
1.7	CHARAKTERISTIKA DER AUXINHERBIZIDE	16
1.8	MODELLHERBIZID QUINMERAC	19
1.9	ZIELSETZUNG	21
2	MATERIAL	22
2.1	GERÄTE, CHEMIKALIEN, ENZYME	22
2.1.1	GERÄTE	22
2.1.2	LABORMATERIAL:	23
2.1.3	CHEMIKALIEN	24
2.1.4	ANTIGENE, ANTIKÖRPER UND ENZYME	26
2.2	PHAGENBIBLIOTHEKEN	27
2.3	OLIGONUKLEOTIDE	27
2.3.1	PCR	27
2.3.2	SEQUENZIERUNG	27
2.3.3	IPCR	28
2.4	PLASMIDE, VEKTOREN	28
2.5	BAKTERIENSTÄMME	28
2.5.1	<i>E. COLI</i> :	28
2.5.2	<i>AGROBAKTERIUM TUMEFACIENS</i> :	28
2.6	PFLANZEN	28
2.7	MEDIEN	29
2.8	LÖSUNGEN UND PUFFER	29
3	METHODEN	31
3.1	ISOLIERUNG SPEZIFISCHER SCFV'S DURCH „PHAGE DISPLAY“	31
3.1.1	HERSTELLUNG EINES HELFERPHAGENSTOCKS UND TITERN DER PHAGENBIBLIOTHEKEN	31
3.1.2	IMMUNSELEKTION (PANNING)	32
3.1.3	ANREICHERUNG UND WEITERE SELEKTION SPEZIFISCH BINDENDER PHAGEN	33
3.1.4	MONOKLONALER PHAGEN-ELISA	33
3.1.5	PRODUKTION UND NACHWEIS LÖSLICHER ANIGENBINDENDER SCFV-ANTI-KÖRPERFRAGMENTE	34
3.2	GEWINNUNG DES SCFV-QUINMERAC AUS <i>E. COLI</i>	35
3.3	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES ANTI-QUIN SCFV'S IM ELISA	35
3.4	KLONIERUNG UND SEQUENZIERUNG	36
3.5	TRANSFORMATION VON <i>AGROBAKTERIUM TUMEFACIENS</i>	37

3.6	DNA-ANALYSE-„SOUTHERN-BLOT“	37
3.7	TRANSFORMATION DER TABAKPFLANZEN	37
3.8	ANZUCHT DER PFLANZEN.....	38
3.8.1	KEIMUNG DER TABAKSAMEN UND IN VITRO ANZUCHT DER TABAKPFLÄNZCHEN.....	38
3.8.2	GEWÄCHSHAUSBEDINGUNGEN.....	38
3.9	HERSTELLUNG PFLANZLICHER PROTEINEXTRAKTE	38
3.9.1	PROTEINEXTRAKTION AUS BLÄTTERN	38
3.9.2	PROTEINEXTRAKTION AUS SAMEN/ KEIMLINGEN	39
3.10	PROTEINANALYSE-„WESTERN-BLOT“	39
3.11	NACHWEIS DER DNA-INSERTION DURCH INVERS- PCR	40
3.12	AFFINITÄTSREINIGUNG DES SCFV-PROTEINS ÜBER DIE PROTEIN-L-SÄULE.....	40
3.13	NACHWEIS DER GEREINIGTEN SCFV-PROTEINE DURCH COOMASSIE- BRILLIANTBLAUFÄRBUNG.....	41
3.14	APPLIKATION VON QUINMERAC IM ZELLKULTURPLATTEN-SYSTEM.....	41
3.15	ABA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG IN NATIVEN PFLANZLICHEN EXTRAKTEN... 42	
3.15.1	HERSTELLUNG NATIVER PFLANZLICHER EXTRAKTE	42
3.15.2	NACHWEIS VON ABA IN NATIVEN PFLANZLICHEN EXTRAKTEN.....	42
4	ERGEBNISSE	44
4.1	ISOLIERUNG ANTI-QUIN SCFV'S AUS MENSCHLICHEN V-GEN-PHAGEMID- BIBLIOTHEKEN	44
4.1.1	HERSTELLUNG EINES HELFERPHAGENSTOCKS UND TITERN DER PHAGEMIDBIBLIOTHEKEN	45
4.1.2	IMMUNSELEKTION, ANREICHERUNG UND VERMEHRUNG QUINMERAC- BINDENDER PHAGEN.....	45
4.1.3	NACHWEIS QUINMERAC BINDENDER PHAGEN MITTELS MONOKLONALEM PHAGEN-ELISA.....	47
4.1.4	ÜBERPRÜFUNG DES SCFV-INSERTS DURCH RESTRIKTIONSANALYSE	49
4.2	GEWINNUNG UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER ANTI-QUIN SCFV'S IM BAKTERIELLEN EXPRESSIONSSYSTEM	50
4.2.1	NACHWEIS DER BINDUNGSAKTIVITÄT/AFFINITÄT AUSGEWÄHLTER SCFV-QUIN IM ELISA	52
4.2.2	NACHWEIS DER EXPRIMIERTEN ANTI-QUIN SCFV'S IM BAKTERIELLEN ÜBERSTAND MITTELS „WESTERN-BLOT“	56
4.3	SEQUENZANALYSE DER ANTI-QUIN SCFV'S B11; C11 UND H12.....	57
4.4	CHIMÄRE GENKONSTRUKTE ZUR EXPRESSION DER ANTI-QUIN-SCFV IN <i>NICOTIANA TABACUM</i>	61
4.4.1	KONSTRUKTION UBIQUITÄRER EXPRESSIONSKASSETTEN	62
4.4.2	KONSTRUKTE FÜR DIE UBIQUITÄRE EXPRESSION MIT EINSCHLEUSUNG IN DEN SEKRETORISCHEN WEG UND RETENTION IM ER	62
4.4.3	KONSTRUKTE FÜR DIE UBIQUITÄRE ZYTOSOLISCHE EXPRESSION	65
4.4.4	KONSTRUKTE FÜR DIE UBIQUITÄRE EXPRESSION MIT RETENTION IN DER PLASMAMEMBRAN.....	67
4.5	ERZEUGUNG STABIL TRANSFORMIERTER TABAKPFLANZEN DURCH <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> VERMITTELTEN GENTRANSFER	69
4.6	ANALYSE DER TRANSGENEN TABAKPFLANZEN MIT DEN CHIMÄREN GENKONSTRUKTEN FÜR DIE UBIQUITÄRE EXPRESSION DER ANTI-QUIN-SCFV.....	71
4.6.1	PHÄNOTYPISCHE ERSCHEINUNG DER TRANSGENEN PFLANZEN	72

4.6.2	ANALYSE DER ANTI-QUIN-SCFV EXPRESSION IN DEN TRANSGENEN TABAKPFLANZENLINIEN ER B11 UND ER H12	73
4.6.3	ANALYSE DER ANTI-QUIN-SCFV EXPRESSION IN DEN TRANSGENEN TABAKPFLANZENLINIEN CYTO B11 UND CYTO H12	74
4.6.4	ANALYSE DER ANTI-QUIN-SCFV EXPRESSION IN DEN TRANSGENEN TABAKPFLANZENLINIEN TMD B11 UND TMD H12	75
4.6.5	EXPRESSIONSANALYSE DER ANTI-QUINMERAC SCFV IN DEN NACHKOMMEN TRANSGENER TABAKPFLANZENLINIEN	76
4.7	AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG DES SCFV-PROTEINS AUS BLÄTTERN	79
4.8	PRÜFUNG DER TOLERANZEIGENSCHAFTEN DER TRANSGENEN ANTI-QUIN-SCFV EXPRIMIERENDEN PFLANZEN GEGENÜBER DEM HERBIZID QUINMERAC	83
4.8.1	ERGEBNISSE DER FRISCHMASSENBESTIMMUNG NACH APPLIKATION VON QUINMERAC	86
4.9	ANALYSE DES ABA-GEHALTES NACH APPLIKATION VON QUINMERAC.....	93
5	DISKUSSION	102
5.1	MODERNE LANDWIRTSCHAFT UND HERBIZIDEINSATZ – WELCHE VOR- UND NACHTEILE HAT DIE ERZEUGUNG UND ANWENDUNG HERBIZIDTOLERANTER BZW. –RESISTENTER KULTURPFLANZEN IM SYSTEM DES „INTEGRIERTEN PFLANZENBAUS“ ?	103
5.2	WELCHE METHODEN DER HERBIZIDTOLERANZ BZW. RESISTENZERZEUGUNG BEI KULTURPFLANZEN SOWIE DEREN ANWENDUNG SIND BISHER ETABLIERT BZW. POSTULIERT WURDEN ODER THEORETISCH MÖGLICH?	105
5.3	WELCHE MÖGLICHKEITEN ERGEBEN SICH AUS DER ANWENDUNG DER METHODE DER IMMUNMODULATION MITTELS SPEZIFISCHER EINKETTENANTIKÖRPERFRAGMENTE IN TIERISCHEN UND PFLANZLICHEN SYSTEMEN?	107
5.4	DIE „PHAGE DISPLAY“ TECHNIK ALS METHODE DER WAHL ZUR ISOLIERUNG HERBIZIDSPEZIFISCH BINDENDER SCFV-ANTIKÖRPERFRAGMENTE?	109
5.5	ERZEUGUNG LEICHTER TOLERANZVERBESSERUNG DURCH DIE EXPRESSION SPEZIFISCHER ANTI-QUIN-SCFV IN TRANSGENEN TABAKPFLANZENLINIEN	113
5.6	KANN DIE METHODE DER IMMUNMODULATION EINE ALTERNATIVE MÖGLICHKEIT DER TOLERANZERZEUGUNG BEI KULTURPFLANZEN SEIN?	121
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	125
7	LITERATURVERZEICHNIS	127

1 Einleitung

Seit dem Wechsel von der sich aneignenden Gesellschaft der Jäger und Sammler zur produzierenden Gesellschaft mit Ackerbau und Viehzucht baut der Mensch Pflanzen an. Pflanzen bilden eine wichtige Grundlage seiner Ernährung, als Tierfuttermittel und zur Produktion und Gewinnung von Biomaterialien und Pflanzeninhaltsstoffen sowie als Ausgangsmaterialien für Handwerk und Industrie wie beispielsweise Holz, Zellulose, Öle und Harze. Die Gewährleistung der Ernährung von Mensch und Tier durch das stetige Wachstum der Bevölkerung bedingt eine sich ständig verbessernde Landwirtschaft mit effektiveren Methoden und Technologien, vor allem leistungsfähigeren sowie krankheits- und pathogenrestistenteren Pflanzen. Um höhere Ernteerträge zu erzielen sollte dabei in erster Linie die natürliche Fähigkeit der angebauten Kulturpflanzen, aus anorganischen Molekülen organische Verbindungen durch Photosynthese zu bilden, optimiert und verbessert werden. Die Produktivität der Pflanzen und daraus resultierend die Kontinuität der Ernteerträge wurde dabei beispielsweise durch Veränderung des Genotyps der Kulturpflanzen mittels Methoden der klassischen Züchtung sowie durch Anwendung von Pestiziden, zur Reduzierung biotischer Einflussfaktoren, qualitativ und quantitativ verbessert und gesteigert. (*Mannion, 1994; Heß, 1992; Kush, 2001; Dekkers et al., 2002; Engel et al., 2002*). Ertragsteigerungen und Pathogenresistenz der Pflanzen wurden beispielsweise durch Einkreuzen landwirtschaftlich interessanter phänotypischer Eigenschaften unter Verwendung exotischer oder Wildtyp-Genpools realisiert (*Bennett et al., 1995; Khush, 2001; Zamir, 2001*). Völlig neue Ressourcen eröffneten sich durch Kombination der klassischen Züchtung mit den Methoden der Gentechnologie. Verbesserungen des Genotyps zur Steigerung der Produktivität und zur Ausbildung von Resistenzen sind hierbei durch den gezielten und kontrollierten Transfer einzelner oder mehrerer definierter Gene in das Pflanzengenom ohne Übertragung ungewollt vieler Gene wie bei der konventionellen Züchtung möglich (*Schärer-Züblin, 1998; Robinson et al., 2000; Kuchuk et al., 2001; Zamir, 2001*). Die Gentechnologie erlaubt dabei einen Transfer einer nahezu unbegrenzten Vielfalt von genetischer Information (*Gasser & Fraley, 1989; Conner & Jacobs, 1999; Nakashita et al., 2001*). Durch die Anwendung gentechnischer Methoden konnten so in den letzten Jahren Verbesserungen in Qualität, Ertragsmenge, Nährgehalt sowie in der Erzeugung von Resistenzen gegenüber biotischen und abiotischen Faktoren wie beispielsweise Pathogenen, Pestiziden, Trockenheit, Temperatur und Salzgehalt bei Kulturpflanzen erzielt werden (*Shah et al., 1986; Nelson et al., 1988; Sanders et al., 1992; Barry et al., 1992; Willmitzer et al., 1992; Sommerville et al., 1994; Mannion, 1994; Schärer-Züblin, 1998; Grover et al., 1998; Reddy et al., 1999; Robinson et al., 2000; Uchimiya et al., 2002; Übersicht in Yan & Kerr, 2002*). Die Anwendung der Pflanzenbiotechnologie in der Landwirtschaft erfolgte in einigen Ländern sehr intensiv. Im Jahre 2000 waren bereits in den USA 25% des landesweit angebauten

Weizens, 54% der landesweit angebauten Sojabohnen und 61% der landesweit angebauten Baumwolle gentechnisch verändert (*Robinson et al., 2000; Lassner & Bedbrook, 2001*). Die Nutzung der Pflanze wird mittels Methoden der Gentechnologie zunehmend erweitert und reicht von der verbesserten und optimierten Produktion von Nährstoffen und Biomaterialien bis hin zur effektiven und kommerziellen Nutzung als Biofabrik im Sinne des „Molecular Farming“ (*Fischer et al., 1999/ I, II; Kumar, 2001*).

1.1 Pflanzen als Bioreaktoren

Durch die stetigen Fortschritte in der Biotechnologie ist es möglich, Pflanzen als Biofabriken für die Produktion von Proteinen, Fetten oder Kohlenhydraten wie beispielsweise Stärke, Saccharose zu nutzen (*Goddijn & Pen, 1995; De Wilde et al., 2000*). Mit Hilfe verschiedenster gentechnischer Methoden können nicht nur pflanzeigene Inhaltsstoffe überproduziert sondern auch Biomoleküle beispielsweise heterologe Proteine und andere Polymere pflanzlichen und nicht pflanzlichen Ursprungs in der Pflanze synthetisiert werden (*Whitelam et al., 1993; Moffat, 1995*). Die Ausnutzung der Pflanze als Biofabrik beinhaltet Methoden der Isolierung geeigneter Gene, des Transfers von Fremdgenen ins Pflanzengenom der Zelle, der Regeneration zu ganzen Pflanzen sowie die effektive, kontrollierte und regulierte Expression des Transgens in der Pflanze (*Grover et al., 1998*). Seit 1983 erstmals stabil transformierte transgene Pflanzen erzeugt werden konnten sind eine Vielzahl von Transformationsmethoden zur Übertragung von Genen in das Pflanzengenom entwickelt worden (*de Block et al., 1984; Horsch et al., 1984, 1985*). Die am häufigsten eingesetzte Transfertechnik für die Transformation von dikotyledonen Pflanzen ist der durch Agrobakterien vermittelte Gentransfer mit Hilfe des Ti-Plasmides (*Hoekema et al., 1983; Horsch et al., 1984; Bevan, 1984*). Vorwiegend für die Transformation von monokotyledonen Pflanzen haben sich Methoden des direkten Transfers „nackter DNA“ in pflanzliche Protoplasten durch Elektroporation, PEG-vermittelten Transfer, Mikroinjektion oder Partikelbombardierung etabliert (*Griesbach et al., 1983; Paszkowski et al., 1984; Fromm et al., 1985; Reich et al., 1986; Klein et al., 1987; Christou, 1993, 1996; Lindsey; Fischer & Hain, 1995; Franken et al., 1997; ; Übersicht in Barcelo et al., 1998; Gheysen et al., 1998; Hansen & Wright, 1999; Repellin et al., 2001*). Unter Verwendung der oben genannten Methoden konnte eine Vielzahl von verschiedensten wichtigen Kulturpflanzen wie beispielsweise Tabak, Weizen, Reis, Gerste, Ackerbohne, Sojabohne, Baumwolle, Mais, Erbse, Zuckerrübe und Maniok mit einer vielfältigen Anzahl von Fremdgenen für die unterschiedlichsten Zielsetzungen transformiert werden (*Firoozabady et al., 1987; Shimamoto, 1994; Smith et al., 1995; Christou, 1995, 1996; Ishida et al., 1996; Cheng et al., 1997; Franken et al., 1997; Tingay et al., 1997; Schärer-Züblin, 1998; Tinjuangjun et al., 2000; Wilkins et al., 2000; Böttinger et al., 2001; Sunilkumar et al., 2001*).

Um die Biosynthesekapazität der Pflanzen effektiv nutzen zu können, ist eine genaue Kenntnis des pflanzlichen Metabolismus sowie der Regulations- und Transportprozesse in der Pflanze erforderlich. Dazu gehört entsprechend der Zielsetzung die Wahl eines geeigneten Kompartimentes für die Expression des rekombinanten Fremdproteins wie beispielsweise der Kern, die Mitochondrien, die Plastiden, das endoplasmatische Retikulum; das Zytosol oder der Apoplast sowie die Möglichkeiten des Transportes und der Speicherung in entsprechenden Geweben und Organen der Pflanze (*Fiedler & Conrad, 1995; Übersicht in Kermode, 1996; Heifetz, 2000; Heifetz & Tuttle, 2001; Saalbach et al., 2001*). In Abhängigkeit von dem verwendeten ubiquitären, gewebespezifischen oder induzierbaren Promotor, sowie den spezifischen Signal- und Translokationssequenzen in der konstruierten pflanzlichen Expressionskassette ist eine zeitlich- und ortsspezifisch kontrollierte und regulierte Expression des eingebrachten Fremdgens möglich (*Benfey & Chua, 1990; Gatz & Lenk, 1998; Schouten et al., 1996; Pagny et al., 1999*).

Eines der ersten Anwendungsgebiete transgener Pflanzen ist die Landwirtschaft. Schwerpunkte sind hierbei zum einen die Verbesserung der Anbaueigenschaften und die Erhöhung der Ernteerträge der Kulturpflanzen durch die Erzeugung von Resistenz oder Toleranz (Input-Eigenschaften) beispielsweise gegenüber Insekten, Krankheiten, Herbiziden sowie gegenüber verschiedenen abiotischen Faktoren (*Sonnewald & Herbers, 2001*). Definierte Beispiele für gentechnische Verbesserungen bei Kulturpflanzen sind die Erzeugung von Krankheitsresistenz (*Übersicht in Fischer & Hain, 1994; Mourgues et al., 1998*) und Insektentoleranz (*Fischhoff et al., 1987; Vaek et al., 1987; Perlak et al., 1990; Xu et al., 1996; Übersicht in Estruch et al., 1997; Schärer-Züblin, 1998; Hilder & Boulter, 1999; Kota et al., 1999; Harcourt et al., 2000; Tinjuangjun et al., 2000; Kumar, 2001*), die Erzeugung von Resistenz gegenüber Viren und Pilzen (*Sanders et al., 1992; Übersicht in Baulcombe, 1994; Lam et al., 1996; Hong et al., 1996; Zhu et al., 1996; Kawchuk & Prüfer, 1999; Schillberg et al., 2001; Bajrovic et al., 2001; Übersicht in Fischer et al., 2001/ I, II; Punja, 2001; Sivamani et al., 2002*), gegenüber Herbiziden (*Shah et al., 1986; Tsiftaris, 1996; Park et al., 2001*) und die Erzeugung von Toleranz gegenüber hohen Salzkonzentrationen, Frost oder Wassermangel (*Kasuga et al., 1999; Honjoh et al., 2001; Kuchuck et al., 2001; Reddy et al., 2001*). Ein weiteres Anwendungsgebiet betrifft die Verbesserung der qualitativen Eigenschaften von Kulturpflanzen wie beispielsweise die Verbesserung der Stickstofffixierung in den Pflanzen, die Qualitätsverbesserung des Erntegutes, insbesondere die allgemeine Nährstoffzusammensetzung und die Erhöhung der Produktion bestimmter Sekundärmetabolite (*Visser et al., 1991; Oeller et al., 1991; Voelker et al., 1992; Stark et al., 1992; Übersicht in Kinney, 1994; Conner & Jacobs, 1999; Herbers & Sonnewald, 1999; Chakraborty et al., 2000; Übersicht in Grotz & Guerinot, 2002; Mehta et al., 2002; Verpoorte & Memelink, 2002*).

Ein neuerer Anwendungsbereich der letzten Jahre ist die stetig zunehmende kommerzielle Verwendung der Pflanze als alternatives Produktionssystem im Sinne des „Molecular farming“ zur Expression heterologer, rekombinanter Proteine.

1.2 „Molecular farming“

Bisher wurden in der Industrie rekombinante Proteine von wirtschaftlich wichtigem Interesse überwiegend unter Nutzung mikrobieller und tierischer Produktionssysteme synthetisiert (*Glick & Pasternak, 1994; Fischer et al., 1999*). Für eine Vielzahl von tierischen Proteinen erweisen sich pflanzliche Systeme gegenüber bakteriellen und tierischen Systemen als besser geeignet. Aufgrund ähnlicher biologischer Prozesse wie beispielsweise posttranslationale Modifizierung, Glykolisierung und Prozessierung ergeben sich Vorteile gegenüber den bakteriellen Expressionssystemen. Gegenüber tierischen Systemen haben pflanzliche Systeme den Vorteil, dass eine Infektion mit tierischen Viren praktisch ausgeschlossen werden kann (*Cramer et al., 1996; Doran, 2000*). Besondere Bedeutung für die Produktion von heterologen rekombinanten Proteinen haben Pflanzen in ökonomischer Hinsicht als attraktive und vor allem kostengünstige Alternative zu mikrobiellen und tierischen Systemen (*Kushnadi et al., 1997; De Wilde et al., 2000*). Im direkten Vergleich mit anderen Produktionssystemen ist die Erzeugung durch die Pflanze aufgrund des Vorhandenseins der technischen Ausstattung für die Ernte und die Verarbeitung großer Mengen an Pflanzenmaterial günstiger im Bezug auf die Produktion und Gewinnung der Proteine. Des Weiteren sind die Pflanzen vielseitig einsetzbar, meist unbegrenzt erneuerbar und eine Langzeitspeicherung der exprimierten rekombinanten Proteine in entsprechenden Geweben ist möglich (*Whitelam et al., 1994; Fiedler et al., 1998; Artsaenko et al., 1998; Conrad et al., 1998/ I, II; Fischer et al., 1999; Giddings et al., 2000; Larrick et al., 2001; Perrin et al., 2000; Ramirez et al., 2001*). In den letzten Jahren wurde eine enorme Vielfalt an heterologen Proteinen (*Goodijn & Pen, 1995; Übersicht Franken et al., 1997; Smith & Glick, 1997, 2000; Giddings, 2001*) in der Pflanze exprimiert. Hierzu gehören unter anderem industriell wichtige Enzyme (*Herbers et al., 1995, Pen, 1992, 1993; Phillipson, 1993; Verwoerd et al., 1995; Übersicht in Ponstein et al., 1996; Ponstein et al., 2002*), abbaubare Biopolymere/Plasten (*Poirer et al., 1992, 1995, 1998*) sowie pharmazeutische Polypeptide (*Miele, 1997; Baez et al., 2000; Übersicht Fischer et al., 2000, 2001; Giddings et al., 2000; Staub et al., 2000; Daniell et al., 2001/ I, II; Andersen & Krummen, 2002*). Das Anwendungsspektrum letzterer ist mittlerweile sehr umfassend und reicht von essbaren Vaccinen zur Immunisierung (*Haq, 1995; Mason et al., 1995, 1996; Ma et al., 1998; McCormick et al., 1999; Dalsgaard et al., 1997; Arntzen, 1997; Übersicht in Giddings, 2001; Landridge, 2000; Walmsley & Arntzen, 2000; Gruber et al., 2001; Mercenier et al., 2001*) über verschiedenste medizinisch interessante Produkte wie beispielsweise Interleukine, Blut- und Wachstumsfaktoren, Serumalbumine, Hormone (*Sijmons et al., 1990; Menassa et al., 2001*) bis hin zu Antikörpern

für die vielfältigsten Anwendungen (*Fischer et al., 2000; Perrin et al., 2000; Stöger et al., 2000, 2002; Ramirez, 2002*). Besonders die Expression von Antikörpern in Pflanzen, erstmals gezeigt von Hiatt (*Hiatt et al., 1989, 1990*), eröffnete neue und interessante Anwendungsgebiete der Pflanzenbiotechnologie für Industrie, Medizin, Landwirtschaft und Forschung.

1.3 Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente

Antikörper sind Glykoproteine, die auch als Immunglobuline bezeichnet werden. Sie sind wesentliche Bestandteile der humoralen und zellulären Immunabwehr von Vertebraten. Im Zuge der humoralen Abwehr werden sie von reifen Plasmazellen sezerniert, die von B-Lymphozyten abstammen. Die B-Lymphozyten wurden vorher durch Bindung eines Fremdmoleküls (Antigens) an ihren Antigenrezeptor stimuliert. Antikörper dienen dem tierischen Organismus im wesentlichen zur Abwehr und Eliminierung infektiöser bzw. krankheitsauslösender Agenzien wie beispielsweise Mikroorganismen und Viren. Um auf eine unendliche große Anzahl von verschiedenen Antigenen reagieren zu können ist eine enorme Vielfalt an spezifischen Antikörpern nötig, die durch eine Reihe von verschiedenen genetischen Mechanismen gewährleistet wird (*Liddell & Weeks, 1996*). Fünf Immunglobulinklassen lassen sich in Säugern unterscheiden, IgM, IgG, IgA, IgD und IgE. Immunglobulin G stellt dabei den größten Anteil an Immunglobulinen im Serum/Organismus dar. Die Grundstruktur wird von 4 Polypeptidketten gebildet, zwei schweren Ketten (heavy chains) und zwei leichten Ketten (light chains). Die H- und L-Ketten werden durch inter- und intramolekulare Disulphidbrücken verbunden und durch Protein-Protein-Wechselwirkungen stabilisiert (*Liddell & Weeks, 1996; Schimpl, 1997; Lottspeich & Zorbas, 1998*). Jede Immunglobulinklasse besitzt für sie kennzeichnende schwere Ketten. Der Struktur nach sind Antikörper bifunktionelle Moleküle, die im wesentlichen zwei verschiedene Aufgaben erfüllen müssen, um zu einer effizienten Eliminierung des Antigens zu führen: (i) Antigenerkennung und (ii) Interaktion mit Effektormolekülen und -zellen. Röntgenstrukturanalysen zeigten, dass sowohl die H- als auch die L-Ketten zu charakteristischen globulären Regionen-Domänen aufgefaltet werden. Immunglobuline bestehen somit aus einem variablen Antigen bindenden Teil, der als variable Domäne bezeichnet wird und einem Effektor bindenden und aktivierenden Teil, der die konstante Domäne darstellt. Der variable Bereich des Antikörpers gliedert sich in die Antikörpergerüstregion und die sogenannten hypervariablen Abschnitte, die auch als „Complementary Determining Regions“, CDR`s bezeichnet werden. Letztere sind für die Ausbildung der tatsächlichen Antigenbindungsstelle, dem Paratop verantwortlich. Die konstanten Bereiche des Antikörpers sind nötig für die zelluläre Immunantwort. Diese umfasst unter anderem die Komplementbindung und die daraus resultierende Aktivierung des Komplementsystems, sowie die Bindung an den Fc-Rezeptor von Effektorzellen und den dadurch stimulierten Prozessen wie beispielsweise Phagozytose, Zytotoxizität (*Liddell &*

Weeks, 1996). Die Gewinnung von Antikörpern ist auf vielfältige Weise möglich. Revolutioniert wurde sie durch die von Köhler und Milstein 1975 entwickelte Methode der Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper durch Fusion einer Antikörpersezernierenden Plasmazelle mit einer Myelomzelle (Köhler & Milstein, 1975). Mit Hilfe der stetig fortschreitenden Entwicklung gentechnischer Methoden zur Isolierung und Manipulation der Immunglobulingene ist man mittlerweile in der Lage, noch schneller und kontrollierter eine noch größere Variabilität an Antikörperspezifitäten zu gewinnen. Die am häufigsten verwendete Methode ist die Isolierung von Immunglobulingenen aus Lymphozyten immunisierter Tiere durch Amplifikation der entsprechenden Gene mit Hilfe der PCR (Winter & Milstein, 1991). Verschiedene Formen antigenbindender Antikörperfragmente wurden so konstruiert und in heterologen Systemen zur Expression gebracht, um dann auf ihre Funktionalität überprüft zu werden (Daly et al., 2001). Zu den so erzeugten rekombinanten Antikörperproteinen gehören neben vollständigen Antikörpern, F(ab)-Fragmente, F(ab')₂ Fragmente, Fv-Fragmente, Einkettenantikörperfragmente (scFv, „single chain Fv“), Disulfidbrückenstabilisierte Fv-Fragmente und einzelne VH-Ketten. Weitere funktionelle Formen sind multispezifische und multivalente Poly-Einkettenantikörper (Diabody, Triabody, Tetrabody, bispezifische AK, trispezifische Miniantibodies), die durch Zusammenlagerung mehrerer gleicher oder verschiedener scFv-Moleküle gebildet werden können (Cao & Suresh, 1998; Dall'Acqua & Carter, 1998; Little et al., 2000; Kortt et al., 2001).

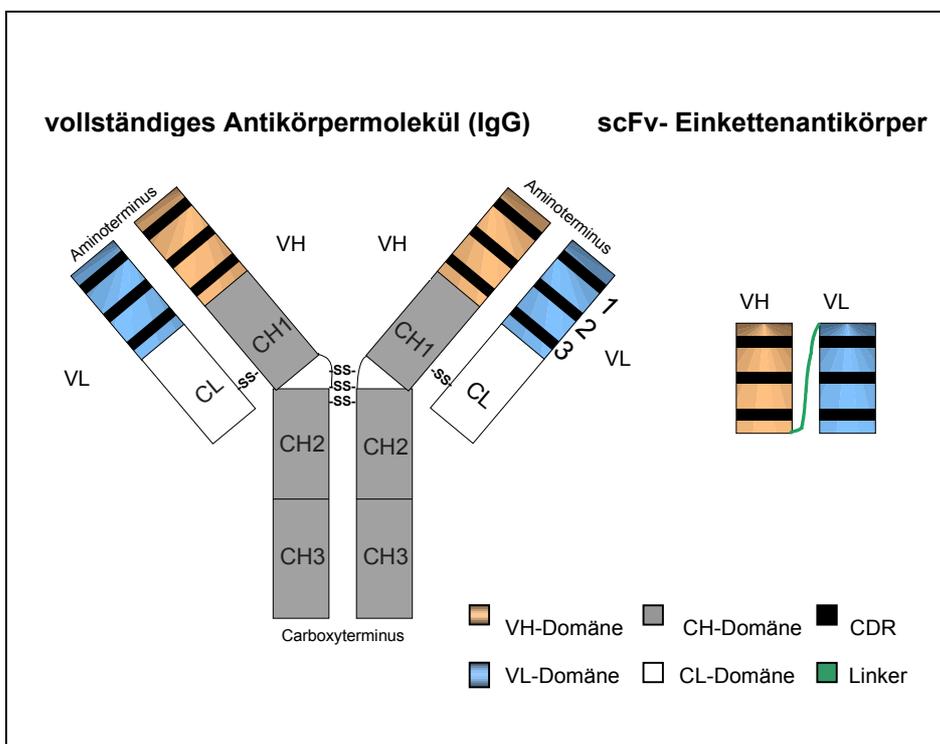


Abb. 1: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus von IgG und eines scFv-Einkettenantikörpers. VH: variable Domäne der schweren Kette; VL: variable Domäne der leichten Kette CDR1-3: hypervariable Regionen; CH1-3 konstante Domänen der schweren Kette; CL: konstante Domäne der leichten Kette.

Während für die Erreichung der Funktionalität bei vollständigen Antikörpern als auch bei F(ab) und Fv-Fragmenten eine korrekte Zusammenlagerung der jeweiligen Polypeptidketten eine notwendige Voraussetzung ist, erfüllt diese bei der Verwendung von scFv-Einkettenantikörpern. ScFv's sind chimäre Polypeptide, bestehend aus den variablen Domänen der schweren (VH) und der leichten Kette (VL) eines Immunglobulins (siehe *Abbildung 1*). Die Domänen sind durch ein kurzes flexibles Linkerpeptid (L) kovalent miteinander verbunden (*Bird et al., 1988; Huston et al., 1988; Bird & Walker, 1991*). Neben einzelnen VH-Ketten (Fd) stellen scFv-Einkettenantikörperfragmente die kleinsten antigenbindenden Moleküle dar. ScFv's können einerseits durch Fusions-PCR mit den aus Hybridomzellen oder direkt aus Lymphozyten immunisierter Tiere isolierten variablen Genen hergestellt werden (*Chaudhary et al., 1990*). Die so erhaltene DNA-Sequenz für das scFv wird anschließend in einem bakteriellen System zur Expression gebracht und die Eigenschaften der chimären Antikörperfragmente untersucht (*Dreher et al., 1991, Hoogenboom, et al., 1991*). Eine immer stärker genutzte Methode zur Isolierung rekombinanter Antikörper wurde durch die Entwicklung der kombinatorischen Display Bibliotheken ermöglicht. Diese Antikörperdisplay Technologie wird für die Erzeugung von Antikörperfragmenten aus einer Vielzahl von Arten wie beispielsweise Mensch, Kaninchen, Maus und Schaf genutzt.

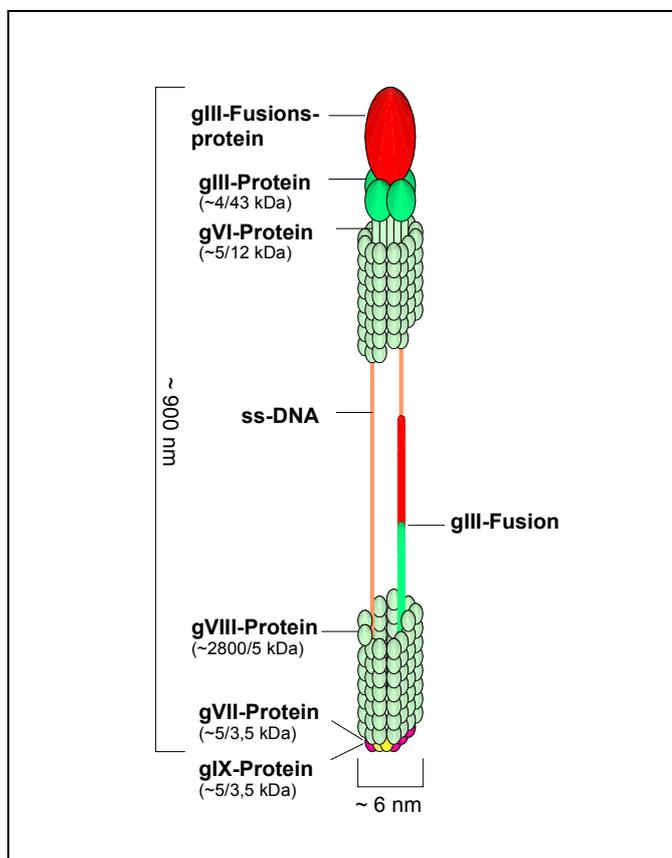


Abb.2: Schematische Darstellung eines im „Phage Display“ verwendeten Phagen. Gezeigt ist die Präsentation der Antikörperdomänen als Fusionsprotein mit Phagenhüllprotein gIII unter Verwendung eines Phagen- oder Phagemidvektors auf der Oberfläche des Bakteriophagen. **gIII-Fusionsprotein:** Antikörper-Hüllprotein gIII Fusionsprotein, **gIII:** Phagenhüllprotein gIII, **gVI:** Phagenhüllprotein gVI, **ssDNA:** einzelsträngige DNA des Bakteriophagen, **gVIII:** Phagenhüllprotein gVIII, **gVII:** Phagenhüllprotein gVII, **gIX:** Phagenhüllprotein gIX, **gIII-Fusion:** Fusion der Antikörpergene im N-terminalen Sequenzbereich des Hüllproteins gIII des Bakteriophagen.

Als Quelle für die Antikörpergene können beispielsweise Hybridomzellen oder Lymphozyten aus Milz, Knochenmark, Lymphknoten von immunisierten oder nicht immunisierten Menschen und Tieren verwendet werden. Die Gensegmente z.B. V-Gene, codierend für ein Antikörperfragment, werden mittels PCR gewonnen, miteinander kombiniert oder mit zusätzlichen synthetischen Nukleotidsequenzen rekombiniert. Nach der Klonierung in entsprechende Plasmide können sie dann in einer Vielzahl von Expressionssystemen appliziert werden. Eines der interessantesten Expressionssysteme nutzt Phagen-Partikel zur Produktion rekombinanter Antikörper. Das Prinzip der als „Phage Display“ bekannten Methode für die Isolierung von Antikörpern und Antikörperfragmenten wurde von *McCafferty und Mitarbeitern* erstmals 1990 vorgestellt und in den darauffolgenden Jahren stetig erweitert (*McCafferty et al., 1990; Barbas et al., 1991; Clackson et al., 1991; Winter & Milstein, 1991; Chiswell & McCafferty, 1991; Hoogenboom, 1997, 2002; Hoogenboom & Chames, 2000; Rondot et al., 2000; Übersicht in O'Brien & Aitken, 2002*). Vereinfacht wie in Abbildung 2 dargestellt, können verschiedene Fremdsequenzen (Antikörpersequenzen) mit der Sequenz eines Phagenhüllproteins (z.B. gIII) eines Bakteriophagen im N-terminalen Bereich fusioniert und somit auf der Oberfläche des Phagenpartikels als Fusionprotein präsentiert werden. Mittels selektiver Bedingungen wird dann der gewünschte rekombinante Antikörper angereichert. Effektiv präsentierte Antikörperdisplay Formate sind scFv, Fab, Fvs und Diabody's. Die Verwendung von „Phage-Display“ Vektoren ermöglicht die Herstellung sehr umfangreicher einfacher, semi-synthetischer oder synthetischer Antikörper-Phagenbibliotheken bis zu einer bisher erreichten Komplexität von 10^{10} . Dies erlaubt eine sehr schnelle und effiziente Isolierung antigenspezifischer, hochaffiner Antikörperfragmente ohne vorherige Immunisierung (*Vaughan et al., 1996; Liddell & Weeks, 1996; Sheets et al., 1998; Desiderio, 2001*). Die Vorteile dieser Technik sind: (i) Spezifische Antikörperfragmente können aus einem großen Antikörperrepertoire durch Affinitätsanreicherung isoliert werden, (ii) Die strukturellen und funktionellen Informationen des selektierten und auf der Oberfläche des Phagen präsentierten Antikörperproteins sind mit dem im Phagengenom enthaltenen entsprechenden genetischen Informationen verbunden. Weitere verbesserte Möglichkeiten zur Gewinnung von Antikörpern und Antikörperfragmenten stellen die als Ribosomendisplay, als ARM-Ribosomen-Display und als „Selective Infectious Phages“, SIP bezeichneten Techniken dar (*Hanes & Plückthun, 1997; He & Taussig, 1997; Dall'Aqua et al., 1998; Schaffitzel et al., 1999; Übersicht in O'Brien & Aitken, 2002*). Mit Hilfe verschiedenster Techniken wie beispielsweise durch Einführung von Mutationen in die DNA-Sequenz (Error-prone PCR), durch Ribosomendisplay, durch „Chain oder DNA-shuffling“ und „loop grafting“ sowie durch wiederholtes Panning unter stringenten Bedingungen können wichtige funktionelle Charakteristika eines Antikörpers bzw. Antikörperfragmentes wie Affinität, Stabilität, Löslichkeit und Spezifität nachträglich gezielt optimiert und den gewünschten

Aufgabenstellungen angepasst werden (*Marks et al., 1992; Knappik et al., 1995; Jung & Plückthun, 1997; Chowdhury et al., 1998; Dooley et al., 1998; Martineau et al., 1998; Proba et al., 1998; Jung et al., 1999; Jermutas et al., 2000; Gavilondo, 2000; Wörn & Plückthun, 2001/ I*).

1.4 Ex-situ und In-situ Nutzung von scFv-Einkettenantikörper

Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente wurden unter Nutzung verschiedenster gentechnischer Methoden, in den letzten Jahrzehnten in einer Vielzahl verschiedener heterologer Systeme produziert und funktionell charakterisiert (*Fischer et al., 1999, 2001; Schots et al., 1992; Übersicht Gavilondo, 2000; Chadd & Charnow, 2001; Daly et al., 2001; Venturi et al., 2002*). Sie haben sich aufgrund ihrer Eigenschaft der spezifischen Antigen-Antikörper Reaktion in vielen Bereichen der Forschung, Industrie und Medizin als ideales Reagenz sowohl für die Anwendung außerhalb als auch innerhalb der Zelle erwiesen. Sie dienen unter anderem als Mittel der medizinischen Diagnostik und therapeutischen Anwendung bei Mensch und Tier, als Impfstoffe sowie zum Nachweis, zur Kontrolle und zur Quantifizierung einer großen Zahl von Proteinen und anderer Substanzen wie beispielsweise Herbizide (*Baumann & t'Hart-De Kleijn, 1993; Carter & Merchant, 1997; Smith & Glick, 1997, 2000; Longstaff et al., 1998; Strachan et al., 1998; Zeitlin et al., 1998; Daly et al., 2001; Rau et al., 2002*). Bei der intrazellulären Expression von Antikörpern haben sich die scFv's als besonders geeignet erwiesen. Sie können aufgrund ihrer geringen Größe leicht jedes gewünschte Gewebe penetrieren und in unterschiedlichen Kompartimenten einer Zelle wie beispielsweise im Endoplasmatischen Retikulum, im Zytosol, im Kern und im Apoplast funktionell exprimiert und akkumuliert werden (*Biocca et al., 1995/ I, II; Fiedler et al., 1998; Conrad & Fiedler, 1998; Ramirez et al., 2001; Jurado et al., 2002*). Das Anwendungsspektrum der intrazellulär exprimierten scFv's ist sehr vielfältig. Sie können unter anderem als Mittel der Diagnostik und Therapie, nach Fusion mit Immunotoxinen, Enzymen, Farbstoffen oder anderen Proteinen im Bereich der Medizin verwendet werden (*DeNardo et al., 1999; Kreitman, 1999; Casey et al., 2000*). Weitere Möglichkeiten betreffen die Verwendung in der biologischen Grundlagenforschung (Grundlagen der Zellphysiologie) und die Nutzung der rekombinanten Antikörperfragmente im Bereich der landwirtschaftlichen Pflanzenbiotechnologie für die intrazelluläre Immunisierung, beispielsweise zur Erzeugung von Resistenz oder Toleranz gegenüber Viren und Krankheiten (*Casadevall, 1998; Jones & Marasco, 1998; Enjuanes et al., 1999; Kreitman, 1999; Chames & Baty, 2000; Gavilondo & Larrick, 2000*). Die Anwendung intrazellulär exprimierter Antikörper wurde ursprünglich für die Blockierung von Regulations- und Stoffwechselprozessen in menschlichen Zellen entwickelt (*Biocca et al., 1990*). Dabei können die auch als Intrabodies bezeichneten Antikörper spezifisch gegen die verschiedensten zellulären Targets (endogene Moleküle) wie beispielsweise Nukleinsäuren, Proteine, Hormone, Transkriptionsfaktoren, Signalmoleküle

oder Pathogene gerichtet sein (*Marasco et al., 1993/ I, II; Richardson & Marasco, 1995; Marasco, 1995, 1997; Chames & Baty, 2000*). Innerhalb der Zelle können diese diverse biologische Prozesse durch vielfältige Mechanismen modifizieren. Beispiele hierfür sind die Bindung und Inaktivierung des endogenen Zielmoleküls, die Blockierung bzw. Stabilisierung bestimmter makromolekularer Wechselwirkungen wie beispielsweise Protein-Protein oder Protein-DNA-Wechselwirkungen, die Modulierung von Enzymfunktionen bzw. -aktivität und das Fehlleiten des Zielmoleküls von seinem Wirkort (*Richardson & Marasco, 1995; Conrad & Manteuffel, 2001; Lecerf et al., 2001*). Neben der Modifizierung biologischer Prozesse kann die Expression von Intrabodies auch zur intrazellulären Immunisierung gegen mikrobielle Pathogene wie beispielsweise Viren verwendet werden. Intrazellulär exprimierte Antikörper werden unter anderem in menschlichen Zellen zur Bekämpfung von Autoimmunerkrankheiten, in der Transplantationsmedizin, in der Tumor- und Krebsbekämpfung sowie zur Therapie und Bekämpfung von Viruserkrankungen beispielsweise durch Inhibierung der Replikation des HIV-1 genutzt (*Duan et al., 1994; Biocca et al., 1995, 1995; Deshane et al., 1995; Jones et al., 1995; Richardson et al., 1995/ I, II, Rondon & Marasco, 1997; Hudson, 1998, 1999; Marasco et al., 1999*).

1.5 Anwendung der Immunmodulation in Pflanzen

Ein neues und innovatives Forschungs- und Anwendungsgebiet in der Biotechnologie ist die Produktion von Antikörpern und Antikörperfragmenten in Pflanzen. Seit Hiatt und Mitarbeiter 1989 zum ersten Mal die erfolgreiche Expression von Antikörpern in Pflanzen zeigen konnten, wurde eine Vielzahl von rekombinanten Antikörpern in den verschiedensten Pflanzen für ein weit gefächertes Anwendungsspektrum produziert (*Hiatt et al., 1989, 1990; Düring et al., 1990; De Neve et al., 1993; Conrad & Fiedler, 1994; van Engelen et al., 1994; Ma, 1995/I; Smith, 1996; Whitlam & Cockburn, 1996; Smith & Glick, 1997, 2000; Torres et al., 1999; Fischer et al., 1999, 2001; Stöger et al., 2000; Giddings, 2000; Übersicht in Larrick, 2001; Schillberg et al., 2001; Peeters et al., 2001*). Hierzu zählt unter anderem die Produktion von Antikörpern und Antikörperfragmenten zur *ex-planta* Nutzung im Sinne des „Molecular farming“. Diese Antikörper finden Anwendung in vielen Bereichen der Medizin beispielsweise in der menschlichen Immuntherapie sowie in der Diagnostik und passiven Immunisierung von Mensch und Tier sowie für verschiedenste Anwendungen in der Industrie und der Biologie (*Sharp et al., 1991; Ma & Hein, 1995/II, III; Smith, 1996; Khoudi et al., 1999; Smith & Glick, 1997; Porter et al., 1997, Strachan et al., 1998; Perrin et al., 2000; Commandeur & Fischer, 2001; Bouquin, 2002*). Mit der *in-planta* Nutzung der exprimierten Antikörper eröffnete sich ein sehr großes, interessantes und neues Anwendungsgebiet für Wissenschaft, Industrie und Landwirtschaft. Die ursprünglich für menschliche Zellen entwickelte molekulare Technik der Immunmodulation, bei der durch intrazelluläre Expression von Antikörpern eine Modifikation biologischer Prozesse, des zellulären

Metabolismus, von Signaltransduktionswegen oder der Pathogeninfektiosität in der Zelle verursacht wird, findet in der Pflanze ein großes Anwendungsspektrum (*Schots et al., 1992; Whitelam & Cockburn, 1996; De Jaeger et al., 2000; Fischer et al., 2001; Conrad & Manteuffel, 2001*). Voraussetzungen für eine erfolgreiche Immunmodulation sind zum einen die Isolation und Gewinnung spezifischer hochaffiner Antikörper und Antikörperfragmente, wobei sich die Verwendung von scFv-Antikörperfragmenten für die Immunmodulation in Pflanzen als besonders geeignet erwiesen hat (*De Jaeger et al., 1999; Schillberg et al., 2001*). Zum anderen ist eine intra- oder extrazelluläre Expression und Akkumulation der Antikörperfragmente in geeigneten Organen, Geweben und Kompartimenten der Pflanzenzelle erforderlich. Durch die Wahl geeigneter Promotoren sowie entsprechender Signal- und Translokationssequenzen kann die Expression in der Pflanze reguliert werden (*Smith, 1996; Fiedler et al., 1997; Smith & Glick, 1997*). Für die erfolgreiche Expression und Translokation der Antikörperproteine in den sekretorischen Weg der pflanzlichen Zelle wird eine spezifische Signalpeptidsequenz im N-terminalen Bereich des Antikörpergens fusioniert. Diese erlaubt die Translokation des gebildeten Antikörperproteins durch die ER-Membran und daraus resultierend die Einschleusung der Antikörper in den sekretorischen Weg. Eine zusätzliche C-terminal fusionierte ER-Retentionssignalsequenz führt zum Verbleib und zur Akkumulation der Antikörper im endoplasmatischen Retikulum (*Denecke et al., 1992; Wandelt et al., 1992; Artsaenko et al., 1995; Schouten et al., 1996; Gomord et al., 1999*). Durch Verwendung anderer Transitsequenzen werden die im sekretorischen Weg befindlichen Antikörper in andere Kompartimente der Zelle transportiert. So können die Antikörper beispielsweise bei Verwendung vakuolärer Translokationssequenzen in die Zellvakuole transportiert oder durch Fusion mit einer geeigneten Transmembrandomäne in der Plasmamembran der pflanzlichen Zelle akkumuliert werden (*Nakamura & Matsuoka, 1993; Kermode, 1996; Chesnut et al., 1996; Schillberg et al., 2000; Vine et al., 2001*). Beim Fehlen weiterer Targetingsignale werden die Antikörper über verschiedene intrazelluläre Transportsysteme in den Apoplasten transportiert (*Firek et al., 1993; Voss et al., 1995; De Wilde et al., 1996; Schouten et al., 1996; Zimmermann et al., 1998*). Eine Erweiterung des Anwendungsbereiches intrazellulär exprimierter Antikörperproteine wird durch die Verwendung anderer N-terminal fusionierter Signalsequenzen wie beispielsweise spezifischer plastidärer oder mitochondrialer Signalpeptide ermöglicht damit die Antikörper in diesen Kompartimenten der Pflanzenzelle exprimiert werden können (*Bednarek & Raikhel, 1992; Biocca et al., 1995*). Für eine Expression von Antikörpern im Zytosol der pflanzlichen Zelle sind keine zusätzlichen Signalsequenzen erforderlich. Die Verwendung des ER-Retentionssignals KDEL hat sich für die Stabilisierung des Antikörperproteins in dieser reduzierenden Umgebung als förderlich erwiesen (*Schouten et al., 1996, 1997; Tavladoraki et al., 1999; Schillberg et al., 1999; Spiegel et al., 1999*). Die in der Pflanze exprimierten Antikörper, die auch als Plantibodies bezeichnet werden, können dabei gegen eine Vielzahl

von verschiedensten Zielmolekülen in der Zelle wie z.B. Signalmoleküle, Rezeptoren, Enzyme, Hormone, DNA-bindende Proteine oder Virusproteine gerichtet sein. Sie interferieren dabei durch Bindung der entsprechenden Antigene mit der Funktion dieser Zielmoleküle. Die Methode der Immunmodulation in der Pflanzenzelle bietet daher eine alternative Möglichkeit zu herkömmlichen Geninhibierungstechniken für die Untersuchung und Manipulation von pflanzlichen Biosynthesewegen und von funktionellen Zusammenhängen verschiedenster Moleküle in der Zelle (Bourque, 1995; Hedden & Phillips, 2000; Conrad & Manteuffel, 2001). Die Ausbildung des Antigen-Antikörperkomplexes *in vivo* kann durch verschiedenste Mechanismen zur Modulation der Antigenaktivität führen (De Jaeger et al., 2000; Conrad & Manteuffel, 2001; Vergleich Abbildung 3): (I) Durch die Bindung des Antikörpers an die Substrat-oder Ligandenbindungsstelle eines Enzyms oder Rezeptors können die spezifischen Interaktionen zwischen Enzym-Substrat und Rezeptor-Ligand (kompetitive Hemmung) blockiert werden. (II) Die Bindung des Antikörpers an anderen Bindungsstellen eines Enzyms oder Rezeptors kann zu strukturellen Veränderungen in den Reaktionszentren des Enzyms oder Rezeptors führen (allosterische Inhibierung).

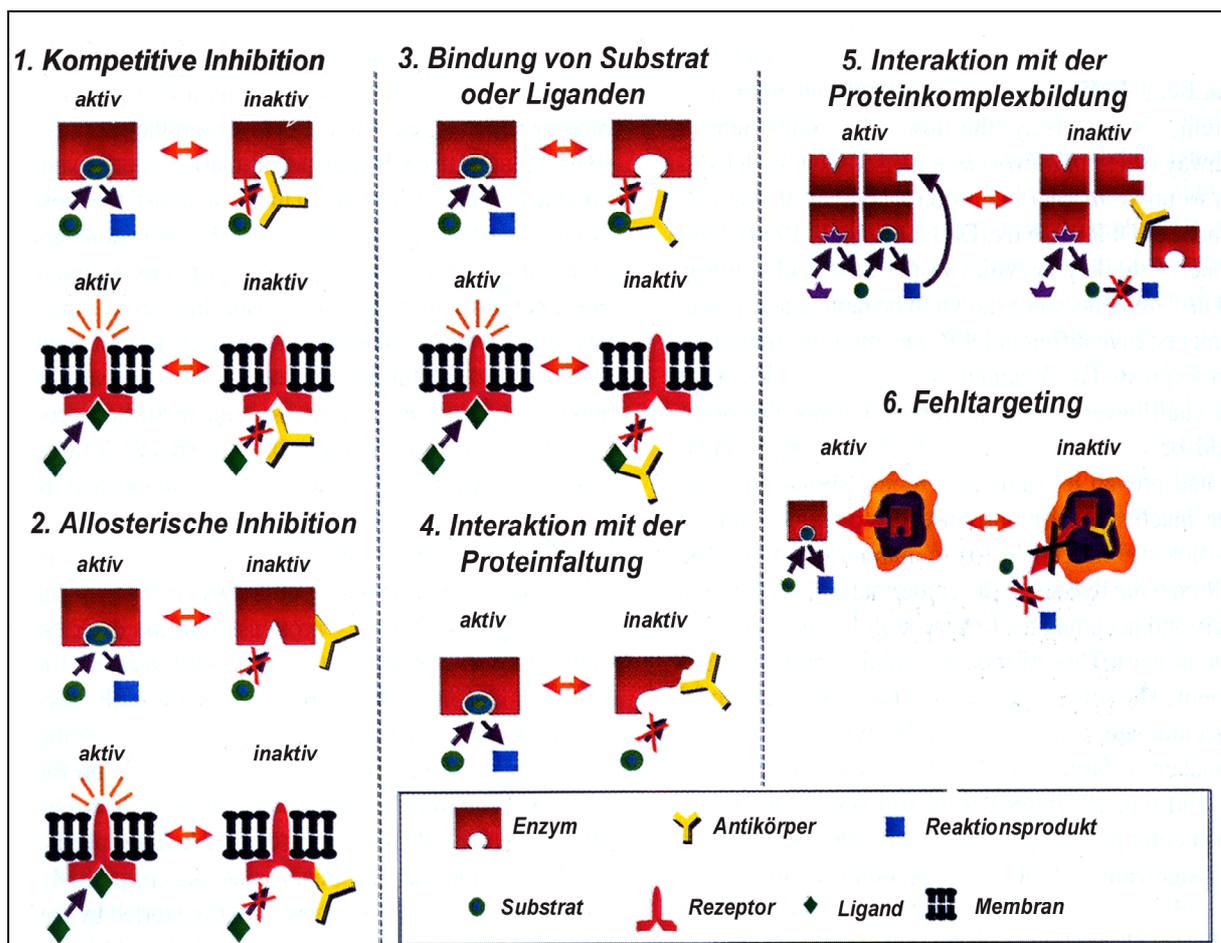


Abb.3: Potentielle Mechanismen der Antikörper vermittelten *in vivo* Modulation der Aktivität und Funktionalität endogener Zielmoleküle (verändert aus De Jaeger et al., 2000)

(III) Inaktivierung des endogenen Substrates durch Bindung des Substrates oder des Liganden selbst durch den Antikörper. (IV) Die Bindung des Antikörpers kann mit der Proteinfaltung interferieren. (V) Die Bindung des Antikörpers an eine Proteinuntereinheit kann die Zusammenlagerung von Untereinheiten zu quarternären Proteinstrukturen wie beispielsweise Multienzymkomplexen verhindern und (VI) das Zielmolekül kann durch Antikörperbindung fehlgeleitet werden, wobei es durch gezielte Expression des Antikörpers in einem Kompartiment der Zelle zur Ausbildung eines „artificialen sinks“ kommen kann, das in einer Defizienz dieses Zielmoleküls in einem anderen Kompartiment resultiert. Erfolgreiche Anwendungsbeispiele der durch Expression intrazellulärer Antikörper vermittelten Immunmodulation verschiedener spezifischer Zielmoleküle in Pflanzen sind die Erhöhung von Resistenz gegenüber Pathogenen wie z.B. Viren oder Bakterien im Zuge der intrazellulären Immunisierung (*Tavladoraki et al., 1993; Fecker et al., 1997; Zimmermann et al., 1998; Le Gall et al., 1998; Schillberg et al., 2000, 2001; De Jaeger et al., 2000*). Besonders interessant ist die Anwendung der verschiedensten Mechanismen der Immunmodulation zur Untersuchung diverser biologischer Prozesse, insbesondere spezifischer Funktionen und Interaktionen verschiedener endogener Zielmoleküle. Beispiele hierfür sind die Blockierung des Rezeptorproteins Phytochrom, das zu einer veränderten Phytochrom vermittelten Samenkeimung führte oder die Blockierung der Zusammenlagerung von Proteinkomplexen wie beispielsweise bei der sogenannten Hitzeschock-Granula (*Owen et al., 1992; Conrad & Manteuffel, 2001*). Die Blockierung der Aktivität eines spezifischen zellulären Zielmoleküls kann zu dessen Funktionsverlust führen und stellt somit eine wichtige Technik zur Untersuchung der regulatorischen Funktionen des ausgewählten Zielmoleküls dar. Enorme Fortschritte wurden durch die Anwendung der Immunmodulation, insbesondere des Mechanismus des Fehlleitens eines Antigens, zur Modifikation der Aktivität und Funktionalität verschiedener Phytohormone und zur Modulierung hormonell geregelter Biosynthesewege erzielt. Das erste Beispiel für eine erfolgreiche Immunmodulation der Phytohormonaktivität in Pflanzen zur Aufklärung der biologischen Funktion verschiedener Phytohormone wurde 1995 von *Artsaenko und Mitarbeitern* vorgestellt (*Artsaenko et al., 1995*). Hierbei wurden durch die ubiquitäre Expression eines spezifisch gegen das Hormon Abscisinsäure gerichteten scFv im ER transgener Tabakpflanzen spezifische morphologische Symptome von Abscisinsäure-defizienten Mutanten wie beispielsweise welkende Blätter und Störung der Schließzellfunktion erzeugt (*Artsaenko, 1996, 1999*). Desweiteren wurde die Immunmodulation des Hormons bei samenspezifischer Expression des scFv-Einkettenantikörpers untersucht. Dieses führte zur Erzeugung eines sonst nur bei starken defizienten und insensitiven Mutanten auftretenden phänotypischen Effektes, der in einem verfrühten Wechsel von der Samenreifung zur Samenkeimung (Viviparie) resultierte (*Phillips et al., 1997*). Im folgenden wurde die Technik der Immunmodulation für die Untersuchungen weiterer Pflanzenphytohormone genutzt, so beispielsweise für die

Untersuchung der Funktion von Gibberellinen mit einem gegen GA_{19/24} gerichteten scFv-Antikörper in Tabak. Die erhaltenen transgenen Tabakpflanzen zeigten eine Modifikation der Biosynthese der aktiven Gibberellinorstufen, die zu einem kleinwüchsigen Phänotyp mit geringerem GA₁-Gehalt führte (*Shimada et al., 1999*). Neuere Anwendungen betreffen die Immunmodulation von Jasmonsäure und Brassinosteroiden (*Conrad & Manteuffel, 2001*).

Resultierend aus der erfolgreichen Anwendung der Immunmodulation zur intrazellulären Immunisierung der Pflanzenzelle gegenüber Pathogenen und zur Inaktivierung endogener Zielmoleküle erwuchs die Idee, die auf der Expression von scFv-Antikörperproteinen basierenden immunmodulierenden Eigenschaften auch auf exogen applizierte Moleküle z.B. Pestizide anzuwenden. Alternativ könnte daraus eine Möglichkeit zur Neutralisierung phytotoxischer Effekte, die durch angewendete Pestizide in den behandelten Pflanzen erzeugt werden, und basierend darauf eine Methode zur Vermittlung von Toleranz bzw. Resistenz gegenüber dem verwendeten applizierten Stoff entwickelt werden.

1.6 Herbizidnutzung in der Landwirtschaft

Seit der Mensch dazu übergegangen ist, Pflanzen im landwirtschaftlichen Maßstab für seine Ernährung, als Futtermittel und für viele andere Bedürfnisse anzubauen, musste er sich mit dem Problem des Schutzes dieser Kulturpflanzen vor diversen biotischen äußeren Faktoren beschäftigen. Dazu zählen vor allem die Bekämpfung von Unkräutern und der Schutz vor Schaderregern wie beispielsweise Pilzen und vor Fressfeinden (Insekten) zur Reduzierung von Ertragsverlusten und zur Aufrechterhaltung der Kontinuität der Ernteerträge. Die Realisierung dieses Schutzes der Kulturpflanzen wird durch die Kombination von verschiedensten Verfahren im Zuge des integrierten Pflanzenschutzes in der Landwirtschaft ermöglicht.

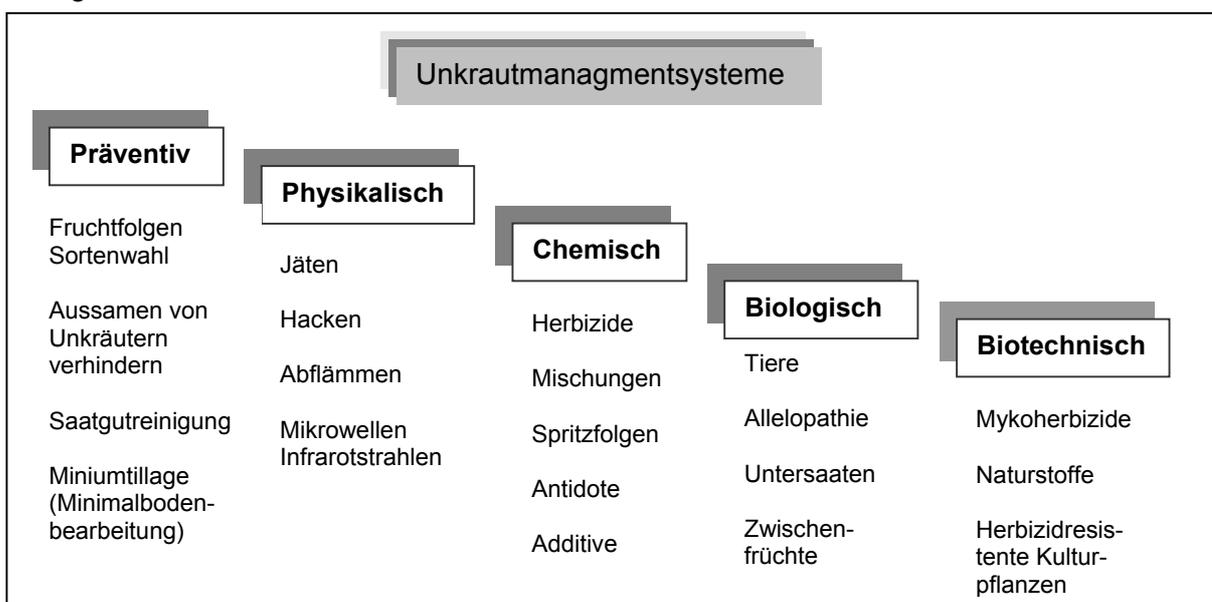


Abb.4: Verschiedene Methoden zur Unkrautbekämpfung (*Hock et al., 1995*)

Unter dem Begriff des Pflanzenschutzes im modernen System des „integrierten Pflanzenbaus“ versteht man die Anwendung von anbau- und kulturtechnischen, pflanzenzüchterischen, physikalischen, mechanischen, biologischen und chemischen Verfahren zur erfolgreichen Kontrolle von Unkräutern im Pflanzenanbau (*Burnside, 1992; Hock et al., 1995*; siehe Abbildung 4). Der Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln ist im System des landwirtschaftlichen Pflanzenschutzes zur erfolgreichen Pflanzenproduktion einer der wichtigsten Bestandteile. Zu diesen als Pestiziden bezeichneten Pflanzenschutzmitteln gehören neben Fungiziden und Insektiziden vor allem Herbizide, die einen Anteil von etwa 50% der weltweit eingesetzten Pflanzenschutzmittel darstellen. Im landwirtschaftlichen Anbau dienen Herbizide zur effektiven Bekämpfung von Unkräutern, die mit den Kulturpflanzen um wichtige Ressourcen wie Sonnenlicht, Nährstoffe, Wasser und den Standort konkurrieren. Die Anfänge der chemischen Unkrautbekämpfung gehen bis ins 18. und 19. Jahrhundert auf die Entdeckung der pflanzenschädigenden Wirkung der Schwefelsäure zurück. Ein enormer Anstieg der Herbizidanwendung und Entwicklung setzte aufgrund sozialer Umstände als auch durch veränderte Anbaumethoden in der Landwirtschaft nach dem Zweiten Weltkrieg ein. Allein der Herbizidmarkt in Deutschland konnte 1991 einen jährlichen Umsatz von 780 Millionen DM verzeichnen, während sogar über 5500 Millionen DM auf dem weltweit größten Markt in den USA umgesetzt wurden sind (*Übersicht Weltmarktanteile Pestizide in Neupert, 1994; Hock et al., 1995*). Der Einsatz von Herbiziden ist je nach angebautem Kulturpflanzenbestand unterschiedlich stark. So werden beispielsweise in Deutschland vor allem im Getreideanbau verstärkt Herbizide, deren Anteil bei über 50% der insgesamt angewendeten Pestizide liegt, für Pflanzenschutzmaßnahmen eingesetzt. Die durch Unkräuter induzierten Verluste belaufen sich heute im Durchschnitt auf 5-15%, je nach Literaturangabe sogar auf bis zu 35%, wobei in einigen Ländern Afrikas die Verluste generell höher liegen (*Heß, 1992; Hock et al., 1995; Schärer-Züblin, 1998*). Die dabei auftretenden Schadwirkungen umfassen neben den erwähnten Ernteverlusten zusätzlich noch eine gesteigerte Ernteerschwerernisse sowie eine enorme Qualitätsminderung des Erntegutes und ein mögliches Vergiftungsrisiko für Mensch und Tier (*Hock et al., 1995*). Der Einsatz von Herbiziden hat für die Landwirtschaft vielseitige Vorteile, wie zum Beispiel die Ermöglichung einer effizienten Nutzung der maschinellen Bearbeitung sowie die Anwendung spezieller Ackerbautechniken zur Ertragssteigerung, muss aber dennoch unter Einbeziehung des gesamten Agrarökosystems betrachtet werden. Vor allem aufgrund der wachsenden Problematik der Verunreinigung des Grund- und Oberflächenwassers (*Van Dijk & Guicherit, 1999*) bzw. der Ackerböden durch die enorm hohen Mengen eingesetzter Herbizide (z.B. in den USA, 1989: 182 Millionen kg/Jahr; *Burnside, 1992*; weltweit: ~2,5 Billionen kg/Jahr; *Pimentel et al., 1998*) als auch bedingt durch die steigende Zahl resistenter Unkrautbiotypen ist es nötig, neue Herbizide unter biologischen, ökologischen und toxikologischen sowie ökonomischen Gesichtspunkten zu entwickeln und gleichzeitig nach

neuen Möglichkeiten des Pflanzenschutzes zu suchen. Zu diesen Möglichkeiten gehört die Entwicklung und der Einsatz chiraler Herbizide zur Reduzierung der einzusetzenden Herbizidmenge, die Entwicklung von Kontrollstrategien unter Verwendung der Negativen-Cross-Resistenz (*Pittendrigh & Gaffney, 2001*), der Einsatz von Naturstoffen mit phytotoxischen Eigenschaften oder unter Anwendung bzw. Einbeziehung der Biotechnologie sowie die Erzeugung und der Einsatz von herbizidresistenten Kulturpflanzen (*Hock et al., 1995*)

1.7 Charakteristika der Auxinherbizide

Die Klassifizierung der Herbizide kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen: 1. nach den chemischen Gruppen, 2. nach ihren Wirkungsmechanismen und 3. nach ihrer Anwendung. Zu den, nach ihrer Wirkung als Auxinherbizide bezeichneten Gruppe gehören eine Reihe verschiedener synthetischer Verbindungen die primär phytohormonelle Auxinaktivität zeigen. Seit ihrer erstmaligen Beschreibung in der Mitte des letzten Jahrhunderts gehören sie zu den am erfolgreichsten eingesetzten Herbiziden und Bioregulatoren in der Landwirtschaft (*Cobb, 1992; Hall et al., 1996; Sterling & Hall, 1997; Grossmann, 2000*). Aufgrund ihrer Fähigkeit das Wachstum zweikeimblättriger Unkräuter im Kulturpflanzenanbau einkeimblättriger Pflanzen zu kontrollieren, gehörten die auch als synthetische Auxine bezeichneten Herbizide zu den ersten eingesetzten selektiv wirkenden organischen Bioregulatoren in der Landwirtschaft (*Ashton & Crafts, 1981; Devine et al., 1993; Coupland, 1994*). Die weitgefächerte Breitenwirkung von Herbiziden basiert auf den Eingriff in für alle Pflanzen notwendige zentrale Stoffwechselprozesse. Demgegenüber kann die Selektivität einiger Herbizide wie beispielsweise der Auxinherbizide auf: 1. morphologische Unterschiede im Aufbau der Pflanzen 2. Art und Stärke der Metabolisierung sowie 3. Stabilität der metabolisierten Produkte basieren (*Hatzios, 1991; Heß, 1992; Hall et al., 1996*). Die Gruppe der Auxin-Herbizide umfasst verschiedene chemische Stoffklassen wie beispielsweise Indolsäuren, Naphtylsäuren, Phenoxycarbonsäuren, heterozyklische Carbonsäuren, Benzoesäuren und die Gruppe der Chinolincarbonsäuren, deren Vertreter auch natürlich in Pflanzen und im Boden vorkommen (*Sahashi, 1925; Hall et al., 1996; Grossmann, 2000*). Grundsätzlich zeigen Auxinherbizide gleiche Charakteristika (biphasische Effekte) wie das natürlich in höheren Pflanzen vorkommende Phytohormon Auxin (*Abeles et al., 1992; Cobb, 1992; Devine et al., 1993; Sterling & Hall, 1997; Grossmann, 1998/ I, II; Cobb & Kirkwood, 2000*). Dieses reguliert in Kooperation mit anderen Pflanzenhormonen die grundlegenden Wachstums- und Entwicklungsprozesse in der Pflanze. Es ist bekannt, dass natürliche und synthetische Auxine regulierend in das Wachstum der Pflanze eingreifen, indem sie unter anderem biologische Prozesse wie Zellteilung und Zellstreckung fördern. Bei niedrigen Konzentrationen stimulieren sie das Wachstum durch Zellteilung und Elongation, während bei steigenden Konzentrationen

phytotoxische Hemmeffekte mit einer Reihe von physiologischen und morphologischen Veränderungen induziert werden (Devine et al., 1993; Coupland, 1994). Diese Eigenschaft bildet die Grundlage für die Anwendung der synthetischen Auxine als herbizide Wirkstoffe. (Cobb, 1992; Hall et al., 1996; Sterling & Hall, 1997; Grossmann, 1998, 2000; Grossmann et al., 2001). Exogen applizierte synthetische Auxine sind im Gegensatz zu dem natürlichen endogenen Phytohormon IAA sehr langlebig und effektiver aufgrund ihrer hohen Stabilität und der langsameren Inaktivierung durch die Pflanze.

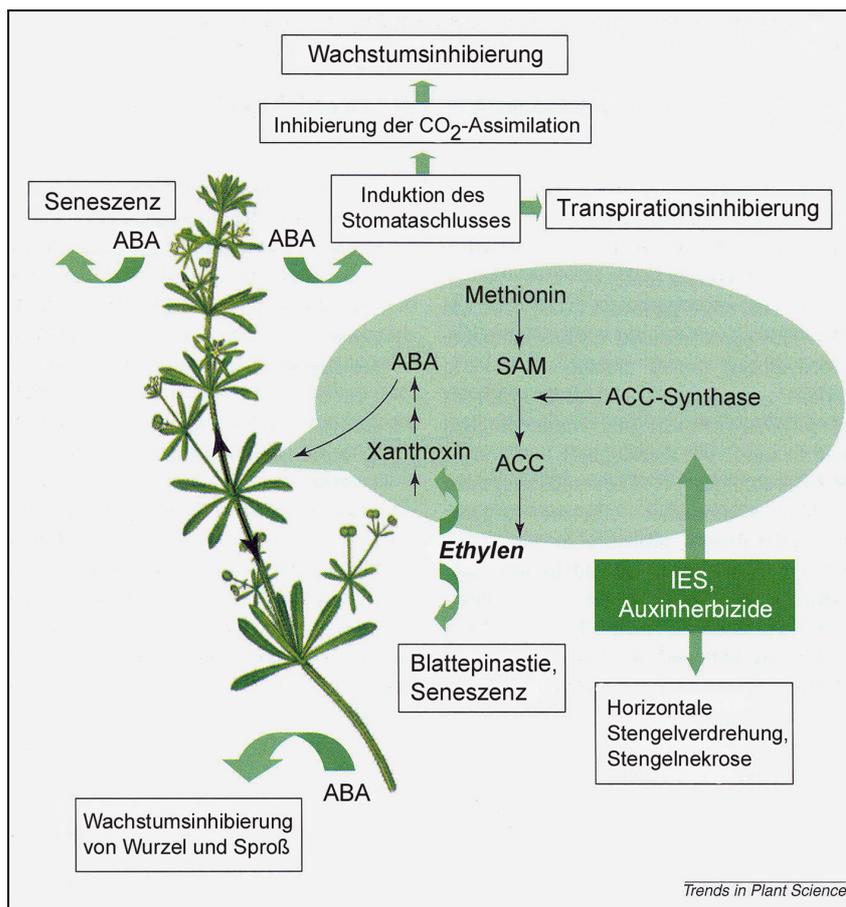


Abb.5: Theoretisches Wirkprofil von Auxinherbiziden und applizierter Indolyl-(3)essigsäure (IAA) bei physiologisch hohen Konzentrationen in der Pflanze am Beispiel des Unkrautes Galium aparine (Kleblabkraut, verändert aus Grossmann, 2000).

Zu den auftretenden visuellen Veränderungen zählen unter anderem Blattepinastie, Hypertrophy, Wachstumsinhibierung der Wurzel und des Stengels, insbesondere reduziertes Internodienwachstum, verstärkte dunkelgrüne Pigmentierung, Beeinflussung der nastischen Stomatabewegungen (Stomataschluß) gefolgt von Seneszenz, Chlorosis, Desiccation und Nekrosis, die letztendlich zum Tod von entsprechend sensitiven Pflanzen führt (Cobb, 1992; Devine, 1993; Sterling & Hall, 1997; Coupland, 1994; Grossmann, 2000; Grossmann & Hansen, 2001). Diese durch Applikation der Auxinherbizide hervorgerufenen Veränderungen beruhen auf einer Vielzahl von biochemischen Veränderungen wie beispielsweise der Induktion des Ca²⁺-Einstroms, der Aktivierung der Plasmamembran ATPasen oder der Steigerung der Nuklein- und Proteinbiosynthese (Devine et al., 1993; Hall et al., 1996; Sterling & Hall, 1997; Grossmann, 2000). Untersuchungen zur Spezifität verschiedener synthetischer Auxinherbizide an verschiedenen Pflanzenarten haben gezeigt, dass der

eigentliche Wirkmechanismus der durch synthetische Auxine hervorgerufenen frühen Effekte wie beispielsweise die schnelle Wachstumsinhibierung bei geringen Konzentrationen in sensitiven Pflanzen, auf die Stimulation der Ethylenbiosynthese zurückzuführen ist (Grossmann & Scheltrup, 1995; Grossmann et al., 1996; Grossmann & Scheltrup, 1997; Grossmann, 1998, 2000; Hansen & Grossmann, 2000; Wei et al., 2000). Diese Stimulierung wird durch Induktion der Neu-Synthese der ACC-Synthase, die den limitierenden Schritt der Ethylen-Biosynthese katalysiert und der darauf basierenden Veränderung der Enzymaktivität erreicht (Hall et al., 1985; Tittle et al., 1990; Abeles et al., 1992; Grossmann & Kwiatkowski, 1993; Abel & Theologis, 1996; Kende & Zeevaart, 1997; Wei et al., 2000). In Abbildung 5 ist das theoretische Wirkprofil der Auxinherbizide, das schon für die Applikation von hohen Konzentrationen des Phytohormones Auxin bei sensitiven Pflanzen beschrieben wurden ist dargestellt (Grossmann & Scheltrup, 1995; Grossmann, 2000, 2001). Aufgrund von Untersuchungsergebnissen zur Aufklärung des molekularen Wirkungsprinzipes verschiedener Auxinherbizide konnte festgestellt werden, dass in auxinherbizidsensitiven Gräsern das als Nebenprodukt der Ethylenbiosynthese entstandene Cyanid (HCN) im Gewebe für die phytotoxischen wachstumsinhibierenden Effekte verantwortlich ist (Grossmann & Kwiatkowski, 1995; Grossmann et al., 1996; Grossmann, 1998; Hansen & Grossmann, 2000). Hingegen sind in empfindlichen dikotylen Pflanzen die frühen wachstumsinhibierende Effekte auf das Ethylen selbst zurückzuführen (Sterling & Hall, 1997; Grossmann, 1998; Hansen & Grossmann, 2000; Wei et al., 2000). In einer Vielzahl von dikotylen Pflanzen und in verschiedenen Grassarten ist das Phytohormon Ethylen, entsprechend seiner physiologischen Funktionen, involviert in wichtige biologische Prozesse wie beispielsweise das Pflanzenwachstum und Stressreaktionen (Kende & Zeevaart, 1997). Einhergehend mit der Steigerung der Ethylenbiosynthese konnte in sensitiven Pflanzenarten (beispielsweise *Galium aparine*) eine durch Ethylen induzierte Erhöhung von Abscisinsäure, basierend auf der Förderung der Spaltung von Xanthophyll zur ABA-Vorstufe Xanthoxal, nachgewiesen werden (Grossmann et al., 1996; Grossmann & Scheltrup, 1998; Grossmann, 2000; Hansen & Grossman, 2000; Grossmann & Hansen, 2000). In sensitiven Dikotyledonen wurde im Zusammenhang mit der auxininduzierten Stimulierung der Ethylenbiosynthese und dem erhöhten Abscisinsäure-Spiegel außerdem eine damit einhergehende gesteigerte Akkumulation von H₂O₂ festgestellt (Grossmann et al., 2001). Die Abscisinsäure wird innerhalb der Pflanze verteilt und bildet im Zusammenspiel mit Ethylen und Cyanid die Grundlage für einige physiologische und biochemische Veränderungen in sensitiven Pflanzen wie beispielsweise dem Stomataschluß, der Hemmung der CO₂-Assimilation und Transpiration sowie der Anreicherung von Wasserstoffperoxid im Gewebe, die unter anderem in der Inhibierung des Wachstums bzw. in einer Reduzierung der Biomasseproduktion resultieren und letztlich zur Zellzerstörung und Gewebeseneszenz

führen (Scheltrup & Grossmann, 1995, 1996; Grossmann et al., 1996; Grossmann, 1998; Grossmann & Scheltrup, 1998; Grossmann, 2000; Hansen & Grossmann, 2000).

1.8 Modellherbizid Quinmerac

B518H oder auch Quinmerac genannt, dessen exakte chemische Bezeichnung 7-Chlor-3-methyl-8-chinolincarbonsäure lautet, ist ein von der BASF entwickelter herbizider Wirkstoff und gehört in die Gruppe der Chinolincarbonsäuren. Es handelt sich dabei um eine geruchslose, farblose und kristalline Substanz mit einem Molekulargewicht von 221,63 g/mol.

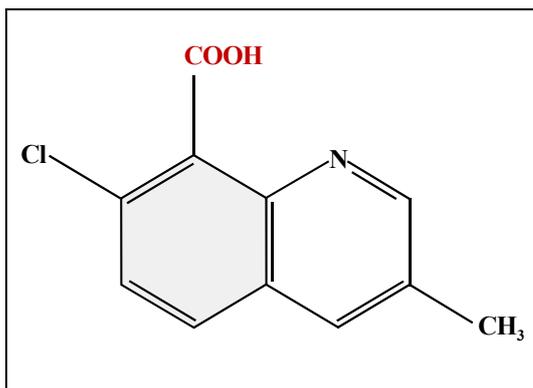


Abb.6: Strukturformel von Quinmerac

Quinmerac und das verwandte Herbizid Quinchlorac wurden erstmals 1985 von *Wuerzer und Mitarbeitern* vorgestellt und beschrieben (Haden et al., 1985; Wuerzer et al. 1985; Wuerzer & Berghaus, 1985). Es wirkt selektiv in Monokotyledonen und in einigen dikotyledonen Pflanzenarten (Nuyken et al., 1985; Walter et al., 1994). Ursprünglich wurde B518H zur Bekämpfung von dikotyledonen Unkräutern wie beispielsweise des Problemunkrautes *Galium aparine*, in Zuckerrüben, Raps und Getreidearten eingesetzt (Bain et al., 1989). Als sensitiv gegenüber dem Herbizid erwiesen sich eine Vielzahl weiterer Unkräuter wie beispielsweise *Aethusa cynapium*, *Ammi majus*, *Conium maculatum*, *Lamium ssp.* und *Veronica ssp.* sowie Kulturpflanzen wie *Pisum sativa* und *Daucus carota* (Wuerzer & Berghaus, 1985; Wuerzer et al., 1985; Nuyken et al., 1985; Haden & Menck, 1986; Boatman & Bain, 1992; Walter et al., 1994). Hingegen sind *Cyperaceen* und Gräser nahezu unempfindlich gegenüber diesem herbiziden Wirkstoff. In Kombination mit anderen Herbiziden wie beispielsweise Chloridazon und Metazachlor bietet es neue, flexible, erweiterte Anwendungsmöglichkeiten zur Bekämpfung von Problemunkräutern (Landes et al., 1993; Klaassen & Menck, 1994). Das Herbizid wird im allgemeinen schnell über die Wurzel und das Blatt aufgenommen und systemisch in der Pflanze verteilt, wobei eine Stabilisierung der herbiziden Aktivität insgesamt nach Aufnahme über das Wurzelsystem beschrieben wird (Berghaus & Wuerzer, 1987; Berghaus & Retzlaff, 1989). Durch Untersuchungen verschiedener Pflanzenarten im Freiland als auch im Gewächshaus konnten einige Einflussfaktoren festgestellt werden, die die Aufnahme und damit gleichzeitig

die Wirkung des Herbizides beeinflussen. Zu diesen Faktoren gehören beispielsweise Bodenbeschaffenheit, Licht, pH-Wert, Temperatur und Additiva (Wuerzer & Berghaus, 1985; Berghaus & Retzlaff, 1988, 1989; Deschauer & Kögel-Knaber, 1990; Walter et al., 1994). Die herbizide Wirkung des Quinmerac's ist wie zuvor schon im Abschnitt 1.7. für die Auxinherbizide beschrieben, in seiner Auxin-Aktivität begründet, die in sensitiven Pflanzenarten zu einer artspezifischen Steigerung der Ethylenbiosynthese führt (Abbildung 5; Berghaus & Wuerzer, 1987; Grossmann & Scheltrup, 1995; Scheltrup & Grossmann, 1996; Hansen & Grossmann, 2000). Die Stärke dieses Eingriffes in den pflanzlichen Hormonhaushalt und die daraus folgenden sekundären Effekte korrelieren gut mit der Empfindlichkeit und äußeren sich in der Art und Stärke der Schädigung der Pflanze (Sterling & Hall, 1997; Grossmann, 1998). Anhand von Untersuchungen zur Aufklärung des molekularen Wirkungsmechanismus an *Galium aparine* und an verschiedenen Kulturpflanzen konnte unter Verwendung von Quinmerac erstmals gezeigt werden, dass die herbizidvermittelte Stimulierung der Ethylenbiosynthese in sensitiven Pflanzenarten von einer Erhöhung des ABA-Gehaltes in entsprechenden pflanzlichen Geweben begleitet wird. Die Quinmerac induzierte Abscisinsäure wird systemisch in der Pflanze verteilt und ist entsprechend ihrer physiologischen Funktionen (Taiz & Zeiger, 1998; Davies, 1995) die Ursache für eine Vielzahl von sekundären Veränderungen in der Pflanze (Vergleich Abschnitt 1.7.; Scheltrup & Grossmann, 1995, 1996; Grossmann & Scheltrup, 1995; Hansen & Grossmann, 2000). Visuelle Symptome der Quinmeracbehandlung sind beispielsweise gestörtes Wurzel- und Internodienwachstum, Stauchung der Sproßachse, Epinastie der Blätter und Anthocyanbildung (Berghaus & Wuerzer, 1987; Berghaus & Retzlaff, 1989). Die selektive Wirkung des Auxinherbizides Quinmerac beruht nach Untersuchungen an Kleblabkraut (*Galium aparine*), Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L.) auf einer gegenüber dem Wirkstoff verringerten Gewebe- und Wirkortempfindlichkeit in diesen Kulturpflanzenarten (Berghaus & Retzlaff, 1989; Hall et al., 1996; Scheltrup & Grossmann, 1996; Grossmann & Scheltrup, 1997, 1998; Desphande & Hall, 2000). Des weiteren kann die selektive Wirkung zusätzlich durch die Art und Stärke der Metabolisierung des Herbizides in der Pflanze bedingt sein (Berghaus & Retzlaff, 1989; Walter et al., 1994; Grossmann & Scheltrup, 1995, 1998).

1.9 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Testung eines Modellsystems zur Erzeugung von Toleranz gegenüber einem applizierten exogenen Herbizid durch Expression und Akkumulation von scFv- Einkettenantikörpern in verschiedenen Kompartimenten der Pflanzenzelle. Dieses System zur Vermittlung von Toleranz in Kulturpflanzen gegenüber den phytotoxischen Effekten angewandeter Herbizide könnte eine alternative, neue Möglichkeit der Resistenz- bzw. Toleranzerzeugung zu herkömmlich angewendeten Methoden darstellen (Botterman & Leeman, 1988; Dodge, 1989; Cobb, 1992; Powles & Holtum, 1994; Tsiftaris, 1996). Die dargestellten und erläuterten Mechanismen der Immunmodulation führten zu der Idee, dass es möglich sei durch Expression von scFv-Antikörperproteinen nicht nur die Funktion und Aktivität endogener Zielmoleküle zu modifizieren sondern auch die Funktionalität exogen applizierter Moleküle zu modulieren. Insbesondere die Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten des Fehlleitens des Zielproteins, durch das Entfernen von exogen appliziertem Herbizid von seinem Wirkort in artifizielle „sinks“, stand dabei im Mittelpunkt des Interesses. Am Beginn der Arbeit stand die Aufgabe der Isolation und Gewinnung spezifischer Quinmerac bindender scFv-Antkörperproteine mit Hilfe der „Phage Display“ Methode aus menschlichen V-Gen Phagemidbibliotheken. Nach der funktionellen Charakterisierung im bakteriellen System und anschließender Sequenzierung der ausgewählten spezifisch Quinmerac bindenden Einkettenantikörper wurden diese für die Konstruktion geeigneter Pflanzenexpressionskassetten verwendet. Hierfür wurden die Anti-Quin-scFv unter die Kontrolle des ubiquitären CaMV 35S-Promotors gestellt und nach *Agrobacterium tumefaciens* vermitteltem Gentransfer in *Nicotiana tabacum* in der Pflanzenzelle zur Expression gebracht. Die ubiquitäre Expression der Anti-Quin-scFv und nachfolgende Akkumulation in verschiedenen Kompartimenten der Pflanzenzelle wie dem endoplasmatischen Retikulum, dem Zytosol und der Plasmamembran sollte zeigen, ob es möglich ist, durch Immunmodulation Toleranz gegenüber dem exogen applizierten Herbizid Quinmerac zu erzeugen. Desweiteren sollte ein geeignetes Testsystem unter Verwendung definierter Toleranz- bzw. Wachstumsparameter entwickelt und angewendet werden, das den Nachweis der Toleranz der regenerierten transgenen Tabakpflanzen gegenüber dem in das System applizierte Herbizid Quinmerac ermöglicht.

2 Material

2.1 Geräte, Chemikalien, Enzyme

2.1.1 Geräte

BioRad: (Richmond CA., USA)	Gene Pulser™ (Elektroporationsgerät)
Biotech Fischer: (Sigma Labortechnik)	Horizontalelektrophoresen
Dynatech Laboratories: (Stuttgart)	Dynatech MR 5000/ 7000 Platten-Lesegerät
Eppendorf: (Schütt Labortechnik)	Concentrator 530 Kühlzentrifuge 5402 Tischzentrifugen 5415 C und 5414 D, Thermomixer compact
Gilson: (Abimed Langenfeld)	Pipetten
Heraeus Instruments: (Hanau)	Brutschränke, Inkubatoren (28°C/ 37°C), LaminAirbox HS12/2, Sepatech Suprafuge 22, Sorvall 5C 5C, Varifuge 20 RS und 30 R
Hermle: (Rettberg, Göttingen)	Tischzentrifuge Z 230A
Hettich: (Tuttlingen)	Zentrifuge AHT35 R
Hofer: (San Fransisco CA., USA)	Transfer-Elektrophorese- Einheit
IKA-Werke: (Staufen)	Magnetthermorührer IKAMAG® RCT basic
Infors-AG: (CH Bottmingen)	Schüttelinkubatoren
Kern & Sohn GmbH: (Balingen)	Elektronische Präzisionswaage 770/GS/GJ

Liebherr: _____ (Ochsenhausen)	Kühlschränke Tiefkühlschränke
Milton Roy: _____ (USA)	UV/ VIS Spectronic „Genesys 5“
Nikon GmbH: _____ (Düsseldorf)	Stereomikroskop SMZ 645
Perkin Elmer: _____ (Norwalk CT., USA)	GeneAmp® PCR System 9700
Peqlab: _____ (Erlangen)	„Easycast™ „ Horizontal Electrophoresis System
Schütt: _____ (Göttingen)	Bioclav; Magnetrührer Mikropistelle; Transferpipetten® 8; Pipetus® Standard; Vertikalelektrophoresen; Vortex Genie 2; verschiedene heizbare Wasserbäder; Trockenschränke
Stovall Life Science: _____ (Greensboro NC., USA)	„The Belly Dancer/ Hybridisation Water bath“
Stratagene: _____ (Heidelberg)	Geldokumentationsanlage Picofuge; Transilluminator 2020 (UV/ White), UV- Stratalinker™ 2400
Tecan: _____ (Crainsheim)	Columbus Washer (für Mikrotiterplatten); Spectrafluor Plus (Elisa Reader)
OWL-Angewandte Gentechnologische Systeme GmbH: _____	Horizontalelektrophoresen

2.1.2 Labormaterial:

Amersham Life Science: _____ (Braunschweig)	Nylonmembran (HybondN ⁺)
Becton Dickinson: _____ (USA)	Falcon® 3915 ProBind (Flachboden ELISA Platte)
B.Braun Surgical GmbH: _____ (Melsungen)	10 Cutoff® Surgical Disposable Scalpel (Einwegskalpelle)

Greiner: (Kremsmünster)	Flachbodenzellkulturplatten (6, 12, 24, 48 und 96 Well); 15ml und 50 ml Röhrchen
Kodak: (Göttingen)	Biomax MR 1-Film
K.R.Anderson, Inc.: (Kanada)	Klebeband „Permacell P422 1“ (für Mikrotiter-Platten)
Millipore: (Bedford MA., USA)	Dialysefilterpapier 0,025µm /13mm
Nalgene: (Rochester NY., USA)	Syringe filters (0,2µm, 0,45µm und 0,8µm);
NormJect:	Einmalspritzen 1ml
Nunc: (Dänemark)	GeNunc™ Modules; TC-Microwell 96F
Pall Gelman Sciences: (Roßdorf)	Acrodisc 0,2µm (DMSO safe); Biotyne® Transfer Membran
Retina: (Berlin)	Röntgenfilm
Schleicher und Schüll: (Dassel)	Nitrocellulosemembran BA 85; Blotting Papier GB 002

2.1.3 Chemikalien

Actigen:	rProteinL-Agarose
Amersham Life science: (Braunschweig)	„ECL western blotting analysis system „(detection reagents); Shrimp Alkaline Phosphatase
BioRad: (Richmond CA., USA)	„BIO-RAD-Protein Assay“ (Bradford Reagenz); „Kaleidoscope Prestained Standard“ (Protein Molekulargewichtsstandard), „Precision Protein Standards™ „
Boehringer: (Mannheim)	„DIG DNA labelling and kit“; Desoxynucleosid-Triphosphate Set (PCR Grade); 100bp DNA Leiter

Difco Laboratories: (Detroit, USA)	Bacto®-Agar; Bacto®-Trypton; Bacto®-Pepton; Bitek Agar; Hefeextrakt
Duchefa: (Amsterdam, Niederlande)	Ampicilin; Carbenicillin; Cefotaxim; Claforan; Kanamycin; Murashige-Skoog Vollmedium - Festschubstanz; Rifampicin
Eurogentec: (Seraing, Belgien)	DNA Smart Ladder
Fluka: (Schweiz)	Polyviylpyrrolidon (PvPP K90)
Gibco-BRL: (Gaithersburg MD., USA)	Agarose; EDTA; TEMED; Tris; 1kb DNA Längenstandard
Lever: (Hamburg)	Domestos Sanitär Reiniger
Merck: (Darmstadt)	NaOH; NaCl; MgSO ₄ x 6 H ₂ O; Polyethylenglykol; Tris
Perkin Elmer Cetus: (Norwalk CT., USA)	Gene Amp® dNTP's
Pierce: (Rockford, Illionois, USA)	„Super Signal® Chemiluminescent Substrat Western Blotting“
Qiagen: (Hilden)	„Qiagen Plasmid Mini/Midi/Maxi kit“; Qiaex II Gel Extraction kit“; Qiaquick Gel Extraction kit“
Riedel de Haën: (Seelze)	Ethanol (reinst /RNA) Quinmerac PESTANAL® 250mg
Roche: (Mannheim)	„Expand™ Long Template PCR System“; „Rapid DNA Ligation kit“; „Expand™ High Fidelity PCR System“
Roth: (Karlsruhe)	Borsäure; Essigsäure; Ethanol; Ethidiumbromid; Methanol; Natriumacetat; Îsopropanol; Phenol, Phenol/Chloroform; Chloroform; Roti-Hybrid-Quick (Hybridisierungs-Lösung);

	Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 30% ige Lösung); Fleischextrakt
Serva: (Heidelberg)	Albumine bovine (BSA); Dinatriumhydrogen- phosphat; Glycerin; IPTG; Kaliumdihydrogen- Phosphat; MES; Natriumdihydrogen- phosphat; Coomassie R250 Brilliantblau; SDS; Tween 20; β-Mercaptoethanol
Sigma: (Louis MO., USA)	Bromphenolblau; Carbenicillin; DMSO; Glucosetestkit „Trinder 100“; Kanamycin; Lithiumchlorid; Saccharose; Triton X-100 Proteinase K; pnpp-Tabs (15mg/Tab); NAA; BAP; 2,4 D; Kinetin; Maleinsäure
USB: (Cleveland OH., USA)	SDS; Shrimp Alkaline Phosphatase

2.1.4 Antigene, Antikörper und Enzyme

Amersham Life Science: (Braunschweig)	Rabbit Anti mouse Ig (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate (RAM-IgG~ALP)
BASF AG: (Ludwigshafen)	BAS 518F; Quinmerac Festschubstanz ; BAS 518 BSA; BAS 514BSA; BAS 09002S LF700 (50% Wettol)
Boehringer: (Mannheim)	DNA Polymerase I (Klenow Fragment), Rnase A; PWO Polymerase; Taq Polymerase
Gibco-BRL: (Gaithersburg MD., USA)	T4-DNA Ligase, Taq-DNA Polymerase; Restriktionsendonucleasen

IDEXX Laboratories: _____ (Westbrook ME., USA)	Phytotek® Indole-3- Acetic Acid Alkaline Phosphatase Conjugate (IAA Tracer)
MBI-Fermentas: _____	Restriktionsendonucleasen
Sigma: _____ (Braunschweig)	Rabbit Anti Maus IgG-POD (mit Peroxidase konjugierter Sekundär antikörper aus Kaninchen)
Takara Shuzo Co.,, LTD: _____ (Japan)	Restriktionsendonucleasen

Die Anti-c-myc-Antikörper werden aus dem Überstand der Hybridomazellen 9E10 (*Evan et al., 1985*) gewonnen, die im eigenen Zellzuchtlabor der Arbeitsgruppe Phytoantikörper kultiviert werden.

2.2 Phagenbibliotheken

Die im „Phage Display“ verwendeten menschlichen V-Gen Phagenbibliotheken A und B, die im scFv-Phagemidformat vorlagen, wurden von I.Thomlinson am MRC Cambridge hergestellt (*De Wildt et al., 2000*).

2.3 Oligonukleotide

Die nachfolgenden synthetisch erzeugten Oligonukleotide wurden von der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg) hergestellt.

2.3.1 PCR

FOR TOM1	5'GTC ACG GGA TCC ATT CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TT-3'
BACK LEG TOM	5'ACA GTG GAT CCG AGG TGC AGC TGT TGG AGT CTG GGG GAG GCT TGG TAC AGC CTG GGG -3'

2.3.2 Sequenzierung

LMB 3	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'
Phenseq	5'-CTA TGC GGC CCC ATT CA -3'
M13 universal	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
M13 reverse	5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

Tag73	5'-GCT TTC ACT TTC CTT GCT TC-3'
Leb73	5'-GAG AGA CTG GTG ATT TTT GCG-3'

2.3.3 IPCR

IPCR 1	5'-TTG TCA AGA CCG ACC TGT CC-3'
IPCR2	5'-CGT TGC GGT TCT GTC AGT TCC-3'

2.4 Plasmide, Vektoren

pIT	amp ^r (vom MRC Cambridge bereitgestellt)
pRTRA 7/3	amp ^r (Artsaenko et al., 1995)
pBin 19	Kan ^r (Bevan et al., 1984, Frisch et al., 1995)
pRT-A-Hook	amp ^r (von Dr. Udo Conrad, IPK Gatersleben bereitgestellt)

2.5 Bakterienstämme

2.5.1 *E.coli*:

TG1	K12, Δ (lac-pro), supE, thi, hsdD5/ FtraD36, proA ⁺ B ⁺ , lacZ M15 (Gibson et al., 1984)
HB2151	ara, Δ (lac-pro), thi/F ['] proA ⁺ B ⁺ , lacI ^q Z Δ M15 (Hoogenboom et al., 1991)

2.5.2 *Agrobacterium tumefaciens*:

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

2.6 Pflanzen

Als Pflanzenmaterial wurden *In vitro* Sterilkulturen und Samen von WT *Nicotiana tabacum* Varietät Samsun NN verwendet. Die transgenen Kontrollpflanzen (UF-Linien) wurden von Ulrike Fiedler (Diss., 1996) produziert.

2.7 Medien

Die Anzucht der *E.coli*-Stämme erfolgte auf LB-Medium nach *Sambrook et al. (1989)* mit dem selektiven Antibiotikum. *Agrobacterium tumefaciens* wurde auf CBY-Agarplatten unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika kultiviert.

LB-Medium: _____ 10g NaCl, 10g Trypton, 5g Hefeextrakt, (pH 7,0)

LB-Agar: _____ LB-medium mit Zusatz von 20g Agar

2xTY: _____ 16g Trypton, 10g Hefeextrakt, 5g NaCl

TYE: _____ 15g Agar, 8g NaCl, 10g Trypton, 5g Hefeextrakt

CBYF-Medium: _____ 5g Trypton, 5g Saccharose, 2mM MgSO₄,
1g Hefeextrakt, 5g Fleischextrakt (pH 7,2)

CBY-Agar: _____ 5g Trypton, 5g Saccharose, 2mM MgSO₄,
1g Hefeextrakt, 20g 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-Vollmedium: _____ 4,4g Murashige und Skoog-Medium , 2% Saccharose,
0,5g MES (pH 5,6-5,8)

½ MS-Medium: _____ 2,2g MS-Medium, 2% Saccharose, 0,5g MES (pH 5,8)

¼ MS-Medium: _____ 1,1g MS-Medium, 0,5g MES (pH 5,6-5,8)

Alle bisherigen Mengenangaben beziehen sich auf 1L hergestellten Mediums bzw. Agars.

2.8 Lösungen und Puffer

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

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

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

PBS-T: _____ 1x PBS, 0,05% Tween-20

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

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

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

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

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

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

SDS-Gelladepuffer: _____ 1% Glyzerin, 0,14xTrenngelpuffer, 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

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

TAE-Puffer: _____ 1mM EDTA, 40mM Tris-Azetat, pH8,0

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

Beschichtungspuffer: _____ 200mM Na_2CO_3 pH 9,6

Substratpuffer: _____ 9,1M Glycin, 1mM MgCl_2 , 1mM ZnCl_2 , pH 10,4

3 Methoden

3.1 Isolierung spezifischer scFv`s durch „Phage Display“

Die Grundlage der angewendeten „Phage Display“ Methode bildeten zwei von Thomlinson hergestellte menschliche scFv-Phagenbibliotheken A und B („Human single framework scFv libraries“, MRC Cambridge, *De Wildt et al., 2000*). Das „Phage Display“ erfolgte in Anlehnung an das vom Hersteller mitgelieferte Protokoll und wurde mit Unterstützung von Herrn Dr. U. Conrad und Frau I. Tillack am IPK-Gatersleben durchgeführt.

3.1.1 Herstellung eines Helferphagenstocks und Titern der Phagenbibliotheken

Die für die Immunselektion und das Panning notwendigen Vorbereitungen umfassten 1. die Herstellung eines Helferphagenstocks von 10^{12} - 10^{13} Phagen/ml (nach Angaben des Herstellers) und 2. das Titern der vorhandenen Phagenbibliotheken. Für den Helferphagenstock wurden M13K07-Helferphagen der Firma Pharmacia Biotech verwendet. Nach der Herstellung eines, der quantitativen Vorraussetzung von mindestens 10^{12} Phagen/ml entsprechenden Helferphagenstockes wurden die Phagenbibliotheken A und B separat kultiviert und getitert. Dazu wurden je 500ml 2xTY-Medium, 100µg/ml Ampicillin, 0,1% Glucose mit je 500µl des vorhandenen Phagenbibliotheksstocks A und B angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,4 kultiviert. Nach Erreichen der gewünschten OD wurden jeweils 50ml jedes Kulturansatzes mit je $2,5 \times 10^{11}$ Helferphagen versetzt und für 30min bei 37°C im Wasserbad ohne Schütteln inkubiert. Nach Abzentrifugation bei 3300g für 10 min und Resuspension der erhaltenen Pellets in je 500ml 2xTY-Medium, 100µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Kanamycin wurden die Kulturansätze schüttelnd Ü/N bei 30°C kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Ü/N-Kulturen für 15min bei 11000g abzentrifugiert. Dann setzte man zu je 400ml erhaltenem Überstand je 100ml PEG/NaCl hinzu und stellte diesen Ansatz für 1h auf Eis, um die in der Lösung vorhandenen Phagen zu präzipitieren. Nach dieser Inkubation wurden die Ansätze für 30min bei 11000g zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 8ml TE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Suspensionen erneut mit einer entsprechenden Menge von PEG/NaCl (im Verhältnis 1:4) versetzt, für 30min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden danach in 5ml sterilem PBS aufgenommen und nochmals für 10min bei 14000g zentrifugiert, um übrig gebliebene Zellwandreste zu entfernen. Die Überstände enthielten die zur Immunselektion einsetzbaren Phagenbibliotheken und konnten für kurze Zeit bei 4°C im Kühlraum oder nach Zusatz von 15% Glycerin über längere Zeit bei -70°C gelagert werden. Das Titern der Phagenbibliotheken erfolgte separat für A und B nach Angaben im Protokoll des Herstellers.

3.1.2 Immunselektion (Panning)

Für die Immunoselektion beginnend mit dem ersten Panning der Bibliotheken wurde eine TG1-Ü/N-Kultur (5 ml 2xTY) angesetzt und eine entsprechende Anzahl von Vertiefungen einer 96er Maxi-Sorb-Platte mit je 100µl des ELISA-Antigens (B518H-BSA in Beschichtungspuffer) beschichtet.

Am darauffolgenden Tag wurde die ELISA-Platte dreimal mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit je 200 µl 2%BSA /Kavität für 2h geblockt. In der Zwischenzeit wurden 20 ml frisches 2xTYMedium mit 100µl der TG1-Ü/N-Kultur angeimpft und bei 37°C kultiviert, damit zum richtigen Zeitpunkt eine OD von 0,4 bei 600 nm erreicht wurde. Nach Beendigung des Blockens der ELISA-Platte wurde diese nochmals dreimal mit 1xPBS gewaschen. In jede beschichtete Vertiefung der Platte pipettierte man separat 10^{10} - 10^{11} Phagen der beiden Phagenbibliotheken (siehe 3.1.1), die je nach bestimmten Phagentiter vorher in 2%BSA aufgenommen wurden waren. Die Platte wurde anschließend 30 min bei RT geschüttelt und dann 60 min bei RT stehen gelassen. Nach der Inkubation wurde die Platte zwanzigmal mit PBS-T per Hand gewaschen und die an der Platte gebundenen Phagen wurden mittels Zugabe von 90 µl/ Kavität frisch hergestelltem 100mM Triethylamin eluiert (10min/schüttelnd). Anschließend wurden die Triethylamineluat der Phagenbibliotheken A und B, mit den darin enthaltenen abgelösten Phagen vereinigt und durch Zugabe von 270 µl Tris pH 7,4 neutralisiert. Zu 7,2 ml einer frischen TG1-Kultur (0,4 bei OD_{600}) wurden 600 µl des Phageneluats gegeben und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Um die restlichen in der Platte verbliebenen Phagen herauszuwaschen, wurden in die verwendeten Vertiefungen 5µl Tris pH 7,4 und 50 µl TG1-Zellen pipettiert. Die Platte wurde dann 30min bei 37°C inkubiert und die, in den Vertiefungen enthaltene Suspension mit der 7,2 ml Kultur vereinigt. Zum Abschluß der ersten Selektionsrunde wurden zur Bestimmung des Phagentiters Verdünnungsreihen der erhaltenen Bakteriensuspension von 10^1 - 10^6 hergestellt und je 50µl/Verdünnung auf TYE-Agarplatten, 100µg/ml Ampicillin, 1% Glucose ausplattiert. Der ermittelte Phagentiter sollte dabei einen Grenzwert von 10^4 Phagen nicht unterschreiten. Die restliche Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert (3300g, 10min), das erhaltene Pellet in 2 ml 2xTY-Medium resuspendiert und auf einer großen Bio-Assay-Platte (TYE-Agar, 100µg/ml Amp, 1% Glucose) ausgespatelt. Nach Ü/N-Inkubation der Platten bei 37°C wurde die große TYE-Agarplatte mit 5ml 2xTY-Medium, 15%Glycerin abgespatelt. Für die zweite Selektionsrunde wurden 50µl der erhaltenen Bakteriensuspension abgenommen und die restliche Suspension bei -70°C eingefroren.

3.1.3 Anreicherung und weitere Selektion spezifisch bindender Phagen

Um weitere Selektionrunden durchführen zu können wurden 50ml 2xTY-Medium, 100µg/ml Ampicillin, 1% Glucose mit 50µl abgenommener Bakteriensuspension aus der vorhergehenden Selektionsrunde (siehe 3.1.2) angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert. Anschließend wurden 10ml dieser Kultur mit 5×10^{10} Helferphagen versetzt und bei 37°C im Wasserbad für 30min ohne schütteln inkubiert. Nach Abzentrifugation dieses Kulturansatzes (3300g, 10min) wurde das erhaltene Pellet in 50ml 2xTY-Medium, 100µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Kanamycin resuspendiert und Ü/N im Schüttler bei 30°C kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde die Ü/N-Kultur abzentrifugiert (3300g, 15min) und zu je 40ml Kulturüberstand 10ml PEG/NaCl hinzugegeben. Nach Beendigung der Inkubationszeit (1h auf Eis) wurde der Ansatz erneut bei 3300g für 30min zentrifugiert, das erhaltene Pellet danach in 2ml TE-Puffer, pH 7,4 aufgenommen und nach Zugabe von 0,5ml PEG/NaCl für 20min auf Eis inkubiert. Das nach wiederholter Zentrifugation (3300g, 30min) erhaltene Pellet wurde in 2ml PBS resuspendiert und nochmals bei 11000g für 10min zentrifugiert. Für die nächste Selektionsrunde (beginnend bei 3.1.2) wurde 1ml des erhaltenen Überstandes, der die rekombinanten Phagen enthielt, verwendet. Die restliche Phagensuspension wurde bei 4°C gelagert.

Durch Wiederholung der unter 3.1.2 und 3.1.3 beschriebenen Versuchsabfolge können so beliebig viele Selektionsrunden zur Isolierung und Anreicherung antigenspezifisch bindender rekombinanter Phagen durchgeführt werden.

3.1.4 Monoklonaler Phagen-ELISA

Zum Nachweis und zur Isolierung einzelner antigenspezifisch bindender rekombinanter Phagen wurden diese, aus Einzelkolonien stammend, im Phagen-ELISA getestet.

Von den, nach jeder Selektionsrunde eingefrorenen, TG1-Zellen, wurden verschiedene Verdünnungsstufen von 10^1 - 10^6 hergestellt und wie unter 3.1.2 beschrieben ausgestrichen, um viele individuelle Kolonien zu erhalten. In Vorbereitung des ELISA's wurden je nach Versuchsumfang mehrere 96er Mikrotiterplatten mit je 100 µl 2xTY-Medium, 100µg/ml Amp, 1%Glucose/Kavität befüllt, anschließend mit je einem Einzelklon von den Verdünnungsplatten beimpft und Ü/N bei 37°C, 300rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 2µl/Vertiefung von diesen Platten in neue Platten, mit 200 µl 2xTY-Medium, 100µg/ml Amp, 1%Glucose/Kavität, überimpft und bei 37°C 1h geschüttelt. Durch Zugabe von Glycerin (Endkonzentration 15%) wurden von den Originalplatten Glycerinkulturen hergestellt, und diese bei -70°C eingefroren. Nach der einstündigen Inkubation bei 37°C wurden je 25µl 2xTY-Medium, 100µg Amp, 1%Glucose, 10^9 Helferphagen je Vertiefung hinzugegeben. Die Platten wurden erst 30 min bei 37°C stehend inkubiert, dann 1h bei 37°C geschüttelt (300rpm) und anschließend für 10 min bei 1800g abzentrifugiert.

Das erhaltene Pellet wurde in jeweils 200 µl 2xTY-Medium, 100µg/ml Amp, 50µg/ml Kan resuspendiert und die Platten dann Ü/N bei 30°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Inkubationsplatten bei 1800g für 10 min abzentrifugiert und je 100µl des phagenhaltigen Überstandes für den Phagen-ELISA abgenommen. Die Masterplatten mit den restlichen Phagenüberständen wurden dann bei 4°C gelagert bis zu ihrer Verwendung zur Produktion/Herstellung löslicher scFv's (siehe 3.1.5). In Abhängigkeit der Anzahl der zutestenden Überstände wurden entsprechend viele Mikrotiterplatten mit 100µl des ELISA-Antigens (B518H)/Kavität Ü/N beschichtet und am folgenden Tag dreimal mit PBS-T gewaschen. Nach der Absättigung der Platten mit 3% BSA für 2h bei RT und erneutem dreimaligen Waschen mit PBS-T wurden je 40µl 6%-iges BSA und 40µl des phagenhaltigen Überstandes/ Vertiefung vorgelegt. Nach einer Inkubation von 90min bei RT wurden die Platten fünfmal mit PBS-T per Hand gewaschen. Man pipettierte dann in jede Vertiefung 1:5000 in 3% BSA verdünntes HRP-anti-M13-Konjugat (Pharmacia), inkubierte bei RT für 90min und wiederholte das Waschen der Platten mit PBS-T. Im letzte Schritt wurden dann je 100µl/Kavität einer frisch hergestellten Substratlösung (100µg/ml TMB in 100mM Natriumacetat), der zuvor 10µl 30%-iges H₂O₂ zugesetzt worden war, vorgelegt und 10min bei RT stehengelassen. In dieser Zeit sollte eine blaue Farbreaktion sichtbar werden, die anschließend durch Zugabe von je 50µl/Vertiefung 1M Schwefelsäure gestoppt wurde. Abschließend erfolgte die Messung der Absorption der Platten im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 650 und 450nm, wobei in der Auswertung die erhaltenen OD-Werte voneinander subtrahiert wurden.

3.1.5 Produktion und Nachweis löslicher anigenbindender scFv-Antikörperfragmente

Für die Expression löslicher scFv-Proteine wurde 2xTY-Medium mit einer HB2151 Ü/N-Kultur im Verhältnis 1:40 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert. Inzwischen zentrifugierte man die unter 3.1.4. hergestellten Phagenmasterplatten ab. In die Vertiefungen neuer Mikrotiterplatten wurden je 200 µl HB2151-Zellen und je 10 µl der phagenhaltigen Überstände von den Masterplatten pipettiert und diese 30 min bei 37°C, ohne Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 2 µl der infizierten HB2151-Zellen in neue Platten mit je 175 µl 2xTY-Medium, 100µg/ml Amp, 0,1%Glucose/Kavität pipettiert und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 schüttelnd kultiviert. In jede Vertiefung wurden nach Erreichen der gewünschten OD je 25 µl 2xTY-Medium, 100µg/ml Amp, 9mM IPTG gegeben und die Platten Ü/N bei 30°C geschüttelt. Nach Abzentrifugation der Platten (1800g, 10min) am nächsten Tag und wurden die erhaltenen Expressionsüberstände im indirekten ELISA analysiert. Die Beschichtung bzw. die Behandlung der Platten sowie der Nachweis erfolgten analog zu dem für den im Abschnitt 3.3. beschriebenen indirekten ELISA.

Mit den im Zuge des „Phage Display“ selektierten und im Phagen-ELISA positiv getesteten antigenspezifisch bindenden Phagen wurden im nächsten Schritt TG1-Zellen infiziert und kultiviert. Anschließend erfolgte die Isolation von Plasmid-DNA aus individuellen Bakterienklonen und die Prüfung auf Insertion des scFv-Genes mittels Restriktionsanalyse. Die DNA individueller Klone wurde mit Hilfe der Primer PHEN und LMB3 sequenziert und die Sequenzen anschließend ausgewertet (siehe 3.4).

3.2 Gewinnung des scFv-Quinmerac aus *E.coli*

Für die weitere Charakterisierung ausgewählter scFv-Antikörperfragmente wurde die entsprechende Plasmid-DNA in den *E.coli* Stamm HB2151 transformiert und auf 2xTY-Agarplatten mit 1% Glucose und 100µg/ml Ampicillin ausplattiert. Individuell selektierte Klone wurden anschließend in 2xTY-Medium, 1% Glucose und 100µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C vorkultiviert. Anschließend wurde frisches 2xTY-Medium, 0,1% Glucose und 100µg/ml Ampicillin mit der bakteriellen Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 bei 37°C kultiviert. Durch Zusetzen von IPTG (Endkonzentration 1mM) wurde dann die Expression des scFv Gens induziert. Nach der etwa 16-24-stündiger Inkubation bei 30°C wurde der bakterielle Überstand abzentrifugiert und nach Sterilfiltration für die funktionelle Charakterisierung des darin enthaltenen scFv- Antikörperfragmentes im ELISA und „Western-Blot“ genutzt. Für die Charakterisierung im ELISA wurde der Überstand mit PBS-T verdünnt eingesetzt. Zur Expressionsanalyse im „Western Blot“ (siehe 3.10) wurden die Proteine durch Zugabe eines entsprechenden Volumenteils an 2xSDS-Gelladepuffer und nachfolgender 10minütiger Inkubation bei 100°C denaturiert.

Desweiteren wurde der mit dieser Methode isolierte scFv-haltige bakterielle Überstand für die Reinigung des scFv-Antikörperfragmentes über eine Protein-L-Säule verwendet.

3.3 Funktionelle Charakterisierung des Anti-Quin scFv`s im ELISA

Der indirekte und indirekt kompetitive ELISA diente dem immunologischen Nachweis der spezifischen Antigenbindung der in Bakterien exprimierten Anti-Quin scFv`s. Hierfür wurde eine 96er Mikrotiterplatte mit einer Lösung des in Beschichtungspuffer verdünnten Konjugats (B518H-BSA; 1-10µg/ml; 100µl/Kavität) bei 4°C Ü/N inkubiert. Nach dem Ausgießen der Beschichtungslösung und dem anschließend erfolgten Waschschritten (3x PBS-T) unter Verwendung eines ELISA-Platten Washers, wurden die unspezifischen Bindestellen der beschichteten Platte mit einer 2%igen BSA-Lösung in PBS-T für 1h bei RT (200µl/Kavität) abgesättigt. Nach dem Entfernen der BSA-Lösung konnten die so vorbereiteten und versiegelten ELISA-Platten über längere Zeit bei 4°C gelagert werden.

Für den indirekten ELISA wurden im nächsten Schritt eine beschichtete ELISA-Platte mit Verdünnungen des bakteriellen Zellkulturüberstandes nach der IPTG-Induktion (siehe

Abschnitt 1.1.5) für 2h bei 25°C inkubiert (100µl/ Kavität). Anschließend wurde die Platte erneut dreimal mit PBS-T gewaschen und mit einer 1:100-Verdünnung des Anti-c-myc-Antikörpers 9E10-Konzentrates (*Evan et.al, 1985*) für weitere 2h inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (3x PBS-T) erfolgte eine Inkubation der Platte mit dem ALP-konjugierten RAM-IgG-Antikörper (1:1000 in PBS-T verdünnt, 100µl/Kavität, 2h bei 25°C). Danach wurde die ELISA-Platte nochmals dreimal mit PBS-T gewaschen und abschließend die frisch hergestellte pNPP-Lösung (1mg/ml in Substratpuffer, 100µl/Kavität) zugegeben. Anschließend versiegelte man die Platte mit Klebeband und inkubierte sie bei 37°C im Wärmeschrank. Die Messung der Absorption der Platten erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Beim indirekt kompetitiven ELISA erfolgt im Gegensatz zum indirekten ELISA die Inkubation der scFv-haltigen Lösung (Überstände/ Extrakte) in Gegenwart von freiem Antigen. Jeweils 50µl/Kavität verschieden konzentrierter Lösungen des freien Antigens (BAS518 in PBS-T) wurden in der mit Quin-BSA/KLH beschichteten und mit BSA abgesättigten ELISA-Platte für 30min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurden je 50µl/Kavität des entsprechend verdünnten bakteriellen Zellkulturüberstandes bzw. des nativen pflanzlichen Proteinextraktes hinzugegeben und gut gemischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 25° wurden die Platten dreimal mit PBS-T gewaschen. Die weitere Durchführung und der abschließende Nachweis erfolgen nach dem bereits beim indirekten ELISA beschriebenen Ablauf von Inkubationsschritten (9E10-Antikörper, RAM-IgG-ALP-Konjugat), Waschschritten und der Umsetzung des zugesetzten Enzymsubstrates pNPP (siehe oben).

3.4 Klonierung und Sequenzierung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Standardmethoden zur Klonierung wie z.B. Plasmidisolierung, Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Ligation sowie Anzucht und Vermehrung von Bakterien wurden wie bei *Sambrook et al. 1989* beschrieben durchgeführt. Die Transformation der verwendeten *E.coli* Stämme HB2151 und TG1 erfolgte durch Elektroporation (*Inoue et al., 1990*).

Die Reinigung von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem QIAquick Gel Extraktions Kit und dem Qiaex-Gel Extraktions Kit der Firma Qiagen. Plasmid- DNA für die Sequenzierung wurde mit dem Plasmid Mini- bzw. Maxi Kit, Firma Qiagen isoliert. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte nach *Sanger et al. 1977* und *Chen and Seeburg 1985*. Dieser Service wurde von Frau S. König am IPK-Gatersleben mit Hilfe eines automatischen Laser Fluoreszenz Sequenziergerätes und unter Verwendung von Fluorescein-markierten Oligonukleotiden durchgeführt. Die Sequenzanalyse wurde mit den PC-Programmen „Vector NTI 4.0 Deluxe“ (InforMax Inc.) und „Lasergene“ (DNASTAR Inc.) durchgeführt.

3.5 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation des für die Pflanzentransformation verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Stammes pGV 2260 in C58C1 (Deblaere et al., 1985) mit gewünschter Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation nach Mersereau et al. 1990. Die Bakterien wurden auf CPY-Agarplatten unter Zusatz selektiver Antibiotika, wie Carbenicillin und Kanamycin bei 28°C kultiviert. Individuelle Klone wurden anschließend durch Southern-Hybridisierung auf das Vorhandensein des scFv- Gens getestet.

3.6 DNA-Analyse-„Southern-Blot“

Die DNA aus *Agrobacterium tumefaciens* wurde nach der Methode von Birnboim & Doly 1979 isoliert und mit der Restriktionsendonuklease HindIII gespalten. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 1%igem Agarosegel wurde dieses dann für 30min in 0,5M NaOH, 1,5M NaCl denaturiert und anschließend neutralisiert (45min 1M Tris-HCl, pH 8,0, 1,5M NaCl). Mit Hilfe eines Saugblots (in 20xSSC) wurde die DNA anschließend auf eine Nylonmembran transferiert (Hybond N+, Sambrook et al., 1989). Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch UV-Quervernetzung in einem „UV-Stratalinker™ 2400“ (Stratagene). Der Nachweis des scFv-Genes erfolgte mit dem „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ der Firma Roche durch Hybridisierung der Membran mit Hilfe eines mit Digoxigenin markierten scFv-DNA-Fragmentes.

3.7 Transformation der Tabakpflanzen

Die Transformation der Tabakpflanzen erfolgte durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer durch die Blattscheiben („Leaf-Disk“-)Transformationsmethode (Horsch et al., 1985). Das dafür verwendete Blattmaterial stammt von im Gewächshaus oder von *in vitro* im Kulturraum gewachsenen *Nicotiana tabacum* Pflanzen (Varietät Samsun NN). Die für die Transformation vorgesehenen Blätter wurden durch 15minütige Inkubation in 30% Domestos oberflächensterilisiert und nach mehrfachem Spülen in sterilem Wasser direkt für die Infektion genutzt. Anschließend wurden die sterilen Blätter mit Hilfe eines Skalpell in kleine Stücke (ca.1cm²) geschnitten und für die Transformation in eine Petrischale, die eine Suspension von *Agrobacterium tumefaciens* (im Verhältnis 1:10; Ü/N:MS-Medium) enthielt überführt und in dieser 10-15 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Blattstücken durch leichtes Abtropfen auf sterilem Filterpapier von überschüssiger Bakteriensuspension befreit und für die Kokultivation auf MS-Agarplatten (ohne WS) ausgelegt. Die Kokultivation erfolgte Ü/N im Kulturraum bei 25°C und im Dunkeln. Am folgenden Tag wurden die Blattstücken auf MS-Agarplatten mit 0,1mg/l NAA, 1mg/l BAP, 50mg/l Kan und 250mg/l Cefatoxim transferiert und die Kultivierung mit einem 16hLicht/8hDunkelheit-Rhythmus fortgesetzt.

Nach etwa 4 Wochen bildeten sich dann erste Kalli, die wiederum auf frische MS-Agarplatten mit 0,1mg/l NAA, 1mg/l BAP, 50mg/l Kan und 250mg/l Cefotaxim umgesetzt wurden. Nach etwa 5-8 Wochen bildeten sich erste Sprosse, die anschließend zur Wurzelbildung auf MS-Medium mit 50mg/l Kan und 250mg/l Cefotaxim überführt wurden. Die nach dieser Methode in vitro regenerierten Pflanzen wurden anschließend in Erde gepflanzt und im Gewächshaus bis zur Samenbildung kultiviert.

3.8 Anzucht der Pflanzen

3.8.1 Keimung der Tabaksamen und In vitro Anzucht der Tabakpflänzchen

Reife Tabak-Wildtypsamen sowie transgene Tabaksamen wurden für 5min in 70%igem Ethanol oberflächensterilisiert und für 60min in sterilem Wasser vorgequollen. Anschließend wurden diese Samen auf MS-Agarplatten ausgelegt und im Kulturraum kultiviert. Die sich entwickelnden Keimlinge wurden dann in mit MS-Agar gefüllte Einweckgläser bzw. Petrieschalen umgesetzt. Die im Kulturraum eingestellten Bedingungen waren ein 16h/8h Licht-Dunkelrhythmus bei einer Belichtung von $500\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ und eine Temperatur von 22°C .

3.8.2 Gewächshausbedingungen

Die Pflanzen wurden nach der in vitro Anzucht in Erde gesetzt und im Gewächshaus bei einem Belichtungsrythmus von 16h Belichtung und 8h Dunkelheit kultiviert.

3.9 Herstellung pflanzlicher Proteinextrakte

3.9.1 Proteinextraktion aus Blättern

Für die Extraktion der single-chain Fv-Proteine aus Blättern transgener Tabakpflanzen für die Proteinanalyse wurden 50mg frisch geerntetes Blattgewebe verwendet. Die Homogenisierung des Blattmaterials erfolgte in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Hilfe einer handelsüblichen Bohrmaschine und eines Mikropistills unter Zugabe von 80 μl 1x SDS-Probenpuffer. Die zerkleinerten Proben wurden für 10min bei 100°C gekocht und bei 15000g für 20min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Proteingehaltes des gesamtlöslichen Proteins im Überstand (in %GLP) sowie die nachfolgende gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine im 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel.

Für die Herstellung nativer pflanzlicher Proteinextrakte aus Blattmaterial, die zum Nachweis der Bindeeigenschaften des pflanzlich exprimierten Einkettenantikörpers im ELISA verwendet wurden, waren 150mg Blattmaterial unter flüssigem Stickstoff nach Zusatz von Quarzsand in einem Mörser mit Hilfe eines Pistells homogenisiert wurden.

Nach anschließender Aufnahme des erhaltenen Pulvers in 0,5-1ml Proteinextraktionspuffer wurde das Gemisch nochmals homogenisiert und bis zum Auftauen auf Eis gestellt. Die in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführten aufgetauten Extrakte wurden bei 4°C und 15000g für 10min zentrifugiert. Danach wurde die Konzentration der löslichen Proteine im Überstand unter Verwendung des Bradford Test im Photospektrometer bei einer OD von 595nm bestimmt. Der Überstand wurde dann verdünnt in 1% BSA für die Charakterisierung der Bindeeigenschaften des scFv im ELISA eingesetzt. Für die Bestimmung der Konzentration des Einkettenantikörpers im nativen Proteinextrakt mittels „Western-Blot“ wurde der Überstand mit einer entsprechenden Menge 2x SDS-Gelladepuffer gemischt, 10min bei 100°C gekocht und die Proteine anschließend im 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die zur Affinitätsreinigung mittels Protein-L-Säule verwendeten nativen Pflanzenextrakte wurden 100-150g frisches Blattmaterial eingesetzt. Die Homogenisierung der Blätter erfolgte wiederum im Mörser unter Zusatz von Quarzsand mit flüssigem Stickstoff. Das fein zermahlene Pulver wurde in Proteinextraktionspuffer aufgenommen, in ein entsprechendes Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C, 5000g für 1-2h zentrifugiert. Anschließend wurde der erhaltene Überstand sterilfiltriert und in Eis im Kühlraum bis zu seiner Verwendung gelagert.

3.9.2 Proteinextraktion aus Samen/ Keimlingen

Für die Herstellung pflanzlicher Proteinextrakte zur Isolierung der scFv-Proteine aus Tabaksamen wurden 50-150mg reife Tabaksamen bzw. Keimlinge im Mörser unter flüssigem Stickstoff nach Zusatz von Quarzsand homogenisiert. Anschließend wurde das erhaltene Pulver in 0,5-1ml Proteinextraktionspuffer aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C, 15000g für 20min zentrifugiert. Die Konzentration der löslichen Proteine im erhaltenen Überstand wurde nach *Bradford (1976)* bestimmt. Der Überstand wurde für die „Western-Blot“-Analyse mit entsprechenden Mengen 2xSDS-Gelladepuffer versetzt und 10min bei 100°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe im 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.10 Proteinanalyse-“Western-Blot“

Hergestellte Proteinextrakte (siehe 3.9.) wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel nach *Laemmli 1970* elektrophoretisch aufgetrennt. Die nach erfolgter Elektrophorese im Gel aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer ($\sim 1,2\text{mA}/\text{cm}^2$, 16h) auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell) in einer mit Transferpuffer gefüllten Elektrotransferapparatur geblottet. Nach Absättigung der Nitrozellulosemembran mit 5%igem Marvel in Marvelpuffer für 2h bei RT, wurde diese mit dem monoklonalen Antikörper 9E10 (*Evan et.al, 1985*) für weitere 2h bei RT inkubiert. Der monoklonale Antikörper, der gegen

das c-myc-tag-Peptid gerichtet ist, wurde dabei in einer 1:50 mit 0,4%igem Marvel verdünnten Lösung eingesetzt. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 5-20min mit 0,4%igem Marvel bei RT gewaschen und für 2h in einer Verdünnung des Sekundärantikörpers (RAM-IgG-POD) von 1:2000 in 0,4%igem Marvel bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem erneuten Waschen (4x jeweils 5-20min) mit PBS-T erfolgte der Nachweis des scFv-c-myc-Tag-Proteins durch Chemilumineszenz mit dem ECL-System („Western blotting analysis system“) von Amersham oder dem ECL-System von Pierce. Zur Auswertung der auf dem Röntgenfilm erhaltenen Signale wurden diese mit Hilfe eines Flachbettscanners digitalisiert und anschließend mit dem Programm TINA-pcbas2.0 (Raytest, Schraubenhardt) ausgewertet.

3.11 Nachweis der DNA-Insertion durch Invers- PCR

Für die Isolation genomischer DNA aus Blättern transgener und WT-Tabakpflanzen wurde eine in Anlehnung an die von *Lassner et al. 1989* beschriebene Methode verwendet. Die weitere Aufarbeitung der gereinigten genomischen DNA erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von *Does et.al. 1991* unter Beibehaltung der Abfolge von Restriktions- und Religationsschritten, aber mit Abänderung der entsprechenden sequenzabhängigen Restriktionsendonukleasen für die jeweiligen Restriktionsschritte. Die Amplifikation der gespaltenen/religierten DNA wurde unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide durch die PCR in einem automatischen DNA- Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt: 1. Denaturierung bei 95°C für 5 min, 2. Anlagerung der Oligonukleotide (Annealing) bei 65°C für 1 min, 3. Polymerasereaktion bei 70°C für 2 min und 4. Denaturierung bei 95°C für 1 min. Die Schritte 2-4 wurden dreißigmal wiederholt. Den Abschluß der Amplifikation bildete eine 5 minütige Anlagerung der Primer bei 60°C und eine 15 minütige Polymerasereaktion bei 75°C. Nach Beendigung der PCR wurde die Hälfte des PCR-Reaktionsansatzes in einem 1,5%-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetragen.

3.12 Affinitätsreinigung des scFv-Proteins über die Protein-L-Säule

Die Herstellung einer für die Reinigung von scFv-Proteinen aus bakteriellen Überständen und pflanzlichen Extrakten geeigneten Protein-L-Säule (Affinitätschromatographiesäule) erfolgte nach Angaben im Protokoll des Herstellers (ACTigen Ltd.) Die hierbei verwendete rProtein LTM-Agarose dient der Bindung einer Vielzahl von Immunglobulinklassen aus verschiedenen Spezies durch Interaktion mit den variablen Teilen leichter κ - Ketten der jeweiligen Antikörper. Die für die Reinigung verwendeten Extrakte wurden wie unter 3.9.1. beschrieben hergestellt und gelagert. Die gepackte Säule wurde entsprechend den Angaben im Protokoll equilibriert und gewaschen. Das Auftragen der Überstände bzw. Extrakte erfolgte in adäquaten Mengen und der Durchlauf wurde bis zu viermal erneut über die Säule

gegeben. Die folgenden Wachschriffe, die Elution sowie die anschließende Neutralisation des Eluats erfolgten wie im Protokoll beschrieben. Die im Zuge der Elution erhaltenen Fraktionen wurden auf Eis im Kühlraum bis zu Ihrer weiteren Verwendung gelagert. Für die Bestimmung der Konzentration des gereinigten Einkettenantikörpers in den jeweiligen Fraktionen mittels „Western-Blot“ wurden 30µl der Probe mit 2x SDS-Gelladepuffer gemischt, 10min bei 100°C gekocht und anschließend im 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Fraktionen in denen scFv-Protein nachweisbar war wurden vereinigt und unter Verwendung von PEG 6000 durch Wasserentzug eingeeengt. Abschließend wurde die Konzentration des gereinigten scFv-Antikörperfragmentes nach Aufkonzentrierung bei 280nm bestimmt.

3.13 Nachweis der gereinigten scFv-Proteine durch Coomassie-Brilliantblaufärbung

Für den Nachweis der unter Verwendung einer Protein-L-Agarose Säule gereinigten scFv-Antikörperfragmente wurden definierte Mengen des Proteins in einem 12,5%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Brilliantblaufärbung angefärbt. Hierfür wurde das Gel nach der elektrophoretischen Trennung zunächst für eine Stunde in Entfärbelösung gelegt und leicht geschüttelt. Anschließend wurde diese Lösung gegen eine Färbelösung mit R250-Coomassieblau ausgetauscht und das Gel für ca. 4h gefärbt. Nach Entfernung der Färbelösung wurde das Gel nochmals in Entfärbelösung gelegt und über Nacht bei mehrmaligem Wechseln der Lösung entfärbt.

3.14 Applikation von Quinmerac im Zellkulturplatten-System

Das verwendete Zellkulturplattensystem diente der gut handhabbaren, reproduzierbaren und statistisch auswertbaren Testung der transgenen Tabakpflanzen/samen auf Toleranz gegen über dem applizierten Herbizid Quinmerac. Verschiedene 1000fach-konzentrierte Quinmeracstammlösungen (1mM - 150mM) wurden frisch durch lösen von BAS518H-Festsubstanz in DMSO hergestellt und steril filtriert. Für die im Experiment verwendeten Applikationslösungen wurden die Stammlösungen 1:1000 in ½ MS-Medium mit 2% Saccharose verdünnt und in die sterilen Zellkulturplatten pipettiert. Je nach verwendetem Plattentyp wurden 1ml –3ml der sterilen Applikationslösung mit einer Endkonzentration von 0 bis 150µM Quinmerac steril eingefüllt. Parallel wurden je 150mg Tabaksamen der zu untersuchenden Tabaklinien eingewogen, mit 70% Ethanol oberflächensterilisiert gewaschen und anschließend gleiche Mengen nach Wägung unter sterilen Bedingungen auf die Kavitäten der mit Quinmerac-Lösung bzw. Kontrolllösung gefüllten Platten verteilt. Die eingesetzte Menge entsprach ca. 300 Samen je Plattenvertiefung (Tausendkorngewicht für *Nicotiana tabacum* beträgt 80mg, Avery, 1933).

Nach einer 14-28 tägigen Inkubation der Platten bei 25°C im Kulturraum erfolgte die Bestimmung der Frischmassen der Gesamtheit der jungen Keimlinge nach Entfernung der entsprechenden Applikationslösungen und Abtropfen auf Filterpapier durch Wägung mit einer Feinwaage.

Zum Nachweis der in den transgenen Tabakkeimlingen exprimierten scFv-Proteine mittels „Western-Blot“ (siehe Abschnitt 3.10) wurden native Keimlingsextrakte hergestellt. Für die Extraktion der Proteine aus Tabakkeimlingen wurden ca. 600mg Keimlingsmaterial nach Zugabe von Quarzsand und flüssigem Stickstoff in einem Mörser homogenisiert. Nach der Zugabe von 1ml 2-fach konzentriertem Proteinextraktionspuffer zum fein gemörserten Pulver erfolgte eine wiederholte Homogenisierung. Der auf Eis aufgetaute Extrakt wurde in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt, für 20min bei 4°C und 14000 RPM zentrifugiert. Nach der Bestimmung der Gesamtheit der löslichen Proteine (Bradfordtest) wurde eine entsprechende Menge des Extraktes mit der gleichen Menge 2xSDS-Gelladepuffers versetzt, 15 min bei 100°C denaturiert und im 12,5%-igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.15 ABA-Konzentrationsbestimmung in nativen pflanzlichen Extrakten

3.15.1 Herstellung nativer pflanzlicher Extrakte

Die Herstellung nativer Extrakte, zur Bestimmung des ABA-Gehaltes in transgenen und in Kontrollpflanzenlinien (SNN/UF) vor und nach Applikation des Herbizides Quinmerac, erfolgte durch Mörsern von frisch geerntetem Keimlingsmaterial in einer adäquaten Menge 80%igem Aceton. Die hergestellten Extrakte wurde auf Eis gelagert und anschließend Ü/N in lichtundurchlässigen Reaktionsgefäßen auf einem Schüttler im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Durch nachfolgende Zentrifugation wurde der ABA-haltige Überstand gewonnen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.15.2 Nachweis von ABA in nativen pflanzlichen Extrakten

Zum immunologischen Nachweis des Pflanzenhormones Absciscinsaure in pflanzlichen Extrakten von transgenen und von Kontrollpflanzenlinien diente die Methode des indirekten kompetitiven ELISA. Hierfür wurde eine 96er Mikrotiterplatte mit einer Lösung des in Beschichtungspuffer (Carbonatpuffer pH) 1:5000 verdünnten RAMIg beschichtet und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Nach dem Ausgießen und Waschen (3x PBS-T) der ELISA-Platte unter Verwendung eines ELISA-Platten-Washers wurde die Platte mit einer Lösung des in PBS-T verdünnten monoklonalen Anti-ABA-Antikörpers (15-I-C5; 10µg/ml) beschichtet und bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Daran anschließend wurde die ELISA-Platte wiederholt 3x mit PBS-T im ELISA-Platten-Washer gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde die Platte mit vorbereiteten Standardlösungen definierter in PBS verdünnter Mengen an ABA (1pg-50pg) als auch mit adäquat verdünnten Lösungen der unter 3.15.1 hergestellten nativen pflanzlichen Extrakte beschichtet und bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Nachfolgend wurde die ELISA-Platte 3x mit PBS-T gewaschen und anschließend mit ABA-ALP-Konjugat inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die ELISA-Platte erneut 3x mit PBS-T gewaschen und eine frisch hergestellte pNPP-Lösung (1mg/ml in Carbonatpuffer pH) zugegeben. Die Platte wurde danach für 18min bei 37°C im Inkubator stengelassen. Die Messung der Absorption erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405nm.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung Anti-Quin scFv's aus menschlichen V-Gen-Phagemidbibliotheken

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und anschließende Expression Quinmerac spezifisch bindender scFv-Einkettenantikörper in *Nicotiana tabacum*, um eine Verbesserung der Toleranz der Pflanzen gegenüber dem applizierten Herbizid zu ermöglichen. Der erste Schritt war die Gewinnung und Selektion von Anti-Quinmerac-scFv, die im weiteren Verlauf der Arbeit charakterisiert und mittels geeigneter Expressionskassetten in die Pflanze transformiert werden sollten. Die Isolierung antigenspezifischer Antikörperfragmente sollte mittels „Phage Display“ erfolgen, wobei die von Tomlinson am MRC Cambridge hergestellten, auf menschlichen V-Gensequenzen beruhenden und im scFv-Phagemid-Format vorliegenden synthetischen Bibliotheken A und B die Grundlage bildeten (De Wildt et al., 2000). Der für die Herstellung der Bänke verwendete Phagemidvektor pIT ist ein Plasmid-Expressionsvektor, der sich vom Phagemidvektor pHEN1 (Clackson et al., 1991) ableitet und eine sehr hohe Transformationseffizienz aufweist, die für die Erzeugung großer Antikörpergenbibliotheken benötigt wird. Das Phagemid besitzt einen Replikationsursprung für den filamentösen Phagen, die genetische Information für das gIII-Protein, einen lacZ-Promotor, eine PelB-Leadersequenz sowie geeignete Restriktionsschnittstellen, die die Insertion von Fremd-DNA (z.B. Gene die für scFv's codieren) im N-terminalen Bereich des gIII-Proteins erlaubt. Das Phagemid hat dabei den Vorteil das es sowohl für die Expression der Antikörpergene als Fusionsprotein auf der Oberfläche von Phagenpartikeln als auch zur Gewinnung löslicher scFv's in geeigneten Bakterien verwendet werden kann. Um freie Phagenpartikel zu erzeugen, die das scFv-Protein auf ihrer Oberfläche exprimieren, müssen die Bakterien, die das Phagemid enthalten, zusätzlich mit Helferphagen infiziert werden. Diese supplementieren die für die Verpackung in Phagenpartikel benötigten Strukturproteine. Im ersten Schritt sollte daher ein M13K07-Helferphagenstock hergestellt werden mit dessen Hilfe die Phagemidbänke A und B in neue Phagenpartikel verpackt und nachfolgend getitert werden konnten. Das Prinzip der angewendeten „Phage Display“-Technik beruht auf der Expression von scFv-Antikörperfragmenten als Fusion mit Phagenhüllproteinen auf der Oberfläche des Virions. Die Verbindung von Antikörper-Genotyp und Phänotyp erlaubt eine Anreicherung spezifisch bindender Phagen durch Selektion am immobilisierten Antigen. Durch „Screenen“ der neuangezogenen und mit Hilfe von Helferphagen in Phagenpartikel verpackten Phagemid-Bibliotheken mit dem Antigen-Quinmerac sollten antigenspezifisch bindende Phagen aus dem gesamten Repertoire isoliert, selektiert und durch Infektion geeigneter Bakterien vermehrt werden. Durch Wiederholung des gesamten Prozesses, der

auch als Panning bezeichnet wird, sollten die spezifisch Quinmerac bindenden Phagen aus dem Gesamtrepertoire mindestens um den Faktor Tausend angereichert werden. Daran anschließend sollte der Nachweis der Bindungsaktivität und -spezifität Quinmerac bindender Phagen im indirekten Phagen-ELISA erfolgen. Eine Auswahl der Antikörper präsentierenden selektierten Phagen, die eine hohe Bindungsspezifität für Quinmerac aufwiesen sollten dann zur Herstellung löslicher Anti-Quin scFv's durch Infektion von geeigneten Bakterien verwendet werden (siehe 3.1.5).

4.1.1 Herstellung eines Helferphagenstocks und Titern der Phagemidbibliotheken

Für die Gewinnung Anti-Quin scFv's mittels „Phage Display“ wurde im ersten vorbereitenden Schritt ein Helferphagenstock hergestellt und getitert (siehe 3.1.1). Zur Bestimmung des Helferphagentiters wurde 1 µl, des in 1 ml sterilem PBS verdünnten M13K07 Phagenstockes für die Infektion von TG1-Zellen verwendet. Nach 2 stündiger Inkubation wurden unterschiedliche Verdünnungen der Bakterien ausplattiert und kultiviert. Durch Auszählen der auf den Platten erhaltenen Klone und Rückrechnung unter Einbeziehung aller Verdünnungsstufen konnte ein Helferphagentiter von $1,76 \times 10^{13}$ /ml bestimmt werden. Im zweiten vorbereitenden Schritt wurden die im scFv-Phagemid Format vorliegenden Bibliotheken A und B angezogen und in neue Phagenpartikel verpackt, die die Basis der Immunselektion bildeten. Die Anzucht und Verpackung, unter Zusatz von 10^{12} Helferphagen, der Phagemid-scFv-Bänke erfolgte wie unter 3.1.1 beschrieben separat für die Bibliothek A und B. Der ermittelte Titer betrug für die Bibliotheken A und B jeweils $3,6 \times 10^{14}$ Phagen/ ml. Damit war die für die Gewinnung eines hochaffinen scFv-Einkettenantikörpers nötige Komplexität der dem „Phage Display“ zu Grunde liegenden Bibliotheken A und B gegeben.

4.1.2 Immunselektion, Anreicherung und Vermehrung Quinmerac- bindender Phagen

Das der Immunselektion zu Grunde liegende Prinzip ist in Abbildung 6 vereinfacht dargestellt. Für die erste Runde der Immunselektion mittels immobilisiertem Quinmerc-Antigen wurden 6 Kavitäten einer 96er ELISA-Maxisorbplatte mit je 50 µg/ml Quin-BSA in 0,2M Carbonatpuffer beschichtet. Die ELISA-Platte wurde wie unter 3.1.2 für das Panning beschriebenen behandelt. Im nächsten Schritt wurden separat für jede Bank (à 3 Kavitäten) je Kavität $3,6 \times 10^{11}$ Phagen, der zuvor im Verhältnis 1:100 in 2% BSA verdünnten Phagenbibliothek A und B eingesetzt. Die nachfolgende Inkubation und Elution mittels Triethylamin erfolgte wie im Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Um die Komplexität der Bibliotheken und die damit verbundene Selektion hochaffiner Anti-Quinmerac scFv's zu erhöhen wurden die aus den sechs Vertiefungen abgenommenen Phageneluatate beider Bibliotheken gemischt und wie unter 3.1.2 beschrieben zur Infektion von TG1-Zellen zur Vermehrung Quin-spezifisch bindender Phagen verwendet. Der im Anschluß ermittelte

Phagentiter für die erste Selektionsrunde lag bei 6×10^5 Phagen. Laut Protokoll sollte der nach der ersten Selektionsrunde zu bestimmenden Phagentiter einen Grenzwert von 10^4 Phagen nicht unterschreiten, da sonst die notwendige Größe des Phagenstocks für weitere Selektionsrunden nicht gewährleistet werden wäre. Die Größe und Diversität der Phagenbibliothek beeinflusst entscheidend die Möglichkeit der Selektion von Antikörpern gegen eine große Anzahl verschiedenster Antigene und deren Affinität (*Desiderio, 2001; Griffiths et al., 1994*). Die durch Infektion mit den aus der ersten Runde selektierten theoretisch spezifisch bindenden Phagen erhaltenen TG1-Zellen wurden als Ausgangspunkt für die nachfolgende Selektionsrunde verwendet. Insgesamt wurden zur Selektion, Anreicherung und Amplifikation Quinmerac spezifisch bindender Phagen im Zuge dieses „Phage Display“ drei aufeinanderfolgende Selektionsrunden durch Wiederholung des unter 3.1.2 und 3.1.3 beschriebenen Versuchsablaufs durchlaufen. Dabei wurde nach der zweiten Runde ein Phagentiter von $1,7 \times 10^7$ Phagen bestimmt und nach der dritten Runde von $3,2 \times 10^9$ Phagen, womit eine Anreicherung spezifisch Quinmerac bindender Phagen um den Faktor Tausend erreicht werden konnte. Die nach der dritten Selektionsrunde eluierte theoretisch spezifisch bindende Phagenpopulation wurde durch Infektion von Bakterien vermehrt und individuelle monoklonale Phagen auf ihre Antigenbindungsaktivität überprüft.

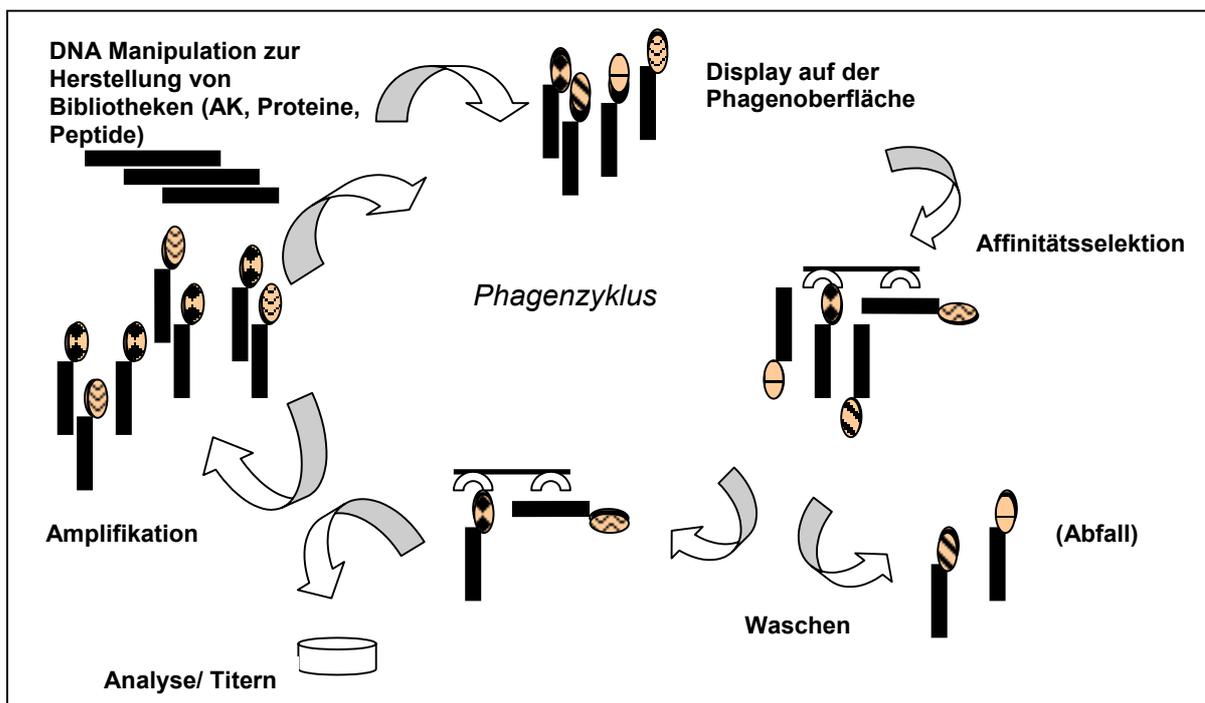


Abb.7: Schematische Darstellung der *in vitro* Immunselektion mit Hilfe von Phagenbibliotheken. Die Phagen-Antikörperbibliotheken werden mit dem entsprechenden Antigen inkubiert und nicht gebundene Phagen im darauffolgenden Schritt mittels Waschen entfernt. Spezifisch bindende Phagen werden anschließend eluiert und durch Infektion eines geeigneten *E.coli*-Stammes amplifiziert. In der sich nun anschließenden 2. Selektionsrunde werden die amplifizierten Phagenpartikel wiederholt mit dem Antigen inkubiert. Nach 2-4 Selektionsrunden können individuelle (monoklonale) spezifisch bindende Phagen sowie die in geeigneten Bakterienstämmen (z.B. HB2151; keine Suppressormutation) exprimierten entsprechenden löslichen rekombinanten Antikörperfragmente analysiert werden.

4.1.3 Nachweis Quinmerac bindender Phagen mittels monoklonalem Phagen-ELISA

Der Nachweis der Bindungsaktivität einzelner Quinmerac spezifisch bindender Phagen erfolgte wie unter 3.1.4 beschrieben. Hierfür wurden in zwei 96er Mikrotiterplatten 192 individuell gepickte infizierte TG1-Klone angezogen. Diese Klone wurden durch Ausplattierung der TG1-Zellen, die nach der dritten Selektionsrunde mit den selektierten Quin-bindenden Phagen infiziert wurden waren, gewonnen. Nach erfolgter Inkubation und Überimpfung in neue Platten wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben wurden je Kavität 10^9 Phagen (in 25 μ l Medium) zugesetzt um freie, von individuellen Klonen abstammende monoklonale Phagenpartikel herzustellen, die dann mittels Phagen-ELISA (Prinzip siehe Abbildung 8) auf ihre Bindungsaktivität getestet wurden. Für die Beschichtung der ELISA-Platten wurden je 100 μ l/Kavität einer Lösung von 2 μ g/ml Quinmerac-BSA-Konjugat und reinem BSA (Kontrolle) in Beschichtungspuffer eingesetzt. Die weiteren Schritte des ELISA erfolgten wie unter 3.1.4 für den monoklonalen Phagen-ELISA beschrieben.

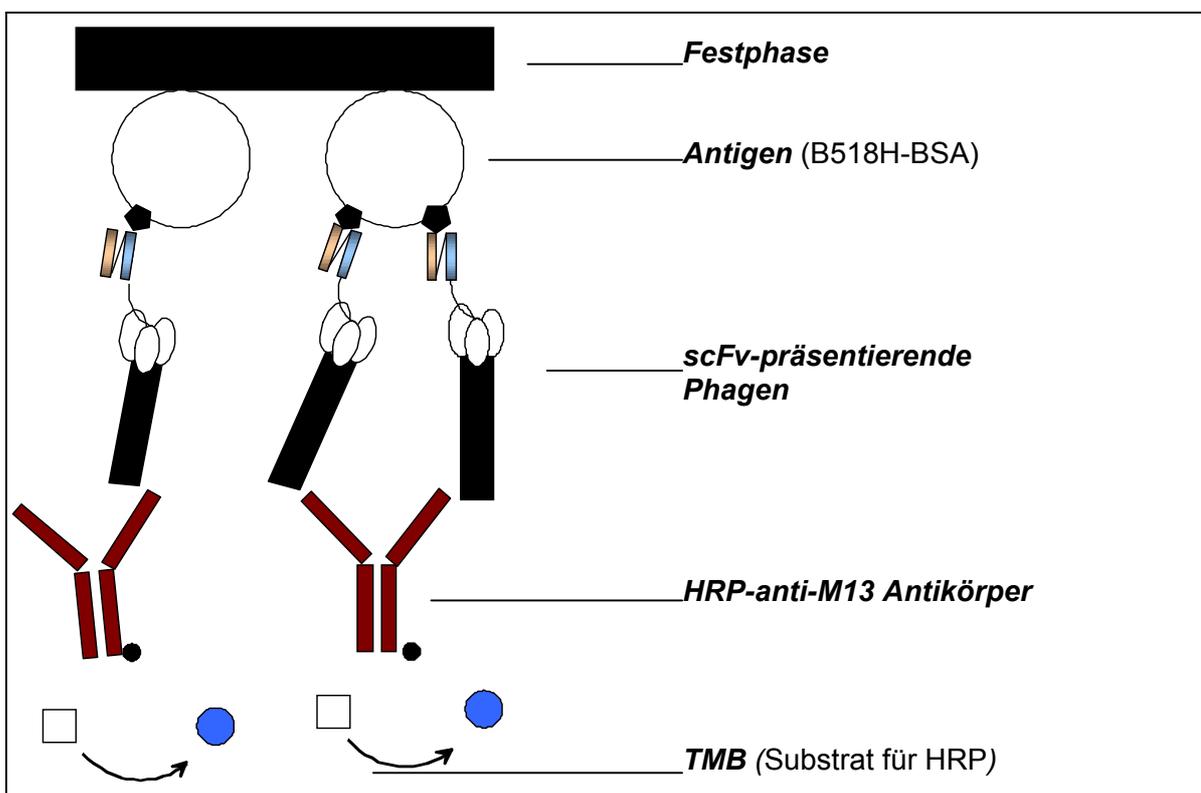


Abb.8: Monoklonaler Phagen-ELISA zum Nachweis der Bindung individueller rekombinanter Phagen an das Hapten Quinmerac. Die ELISA-Platten wurden mit BSA-Quinmerac-Konjugat beschichtet, mit der eluierten Phagensuspension (gIII-scFv-Fusionsprotein präsentierend) und einem HRP-anti-M13 Antikörper inkubiert. Der Nachweis von enzymgekoppelten Anti-M13 Antikörper erfolgte durch Messung des TMB- Substratumsatzes nach Abstoppen der Reaktion mit H_2SO_4 als ΔOD_{450nm} und ΔOD_{650nm} im ELISA-Reader.

Insgesamt konnten von den 192 getesteten monoklonalen Phagen 72 spezifisch Quinmerac bindende Phagen identifiziert werden. Die nachgewiesenen spezifisch bindenden Phagen zeigten unterschiedlich starke spezifische Bindung an das immobilisierte Antigen Quinmerac (siehe Tabelle 1 und Abbildung 9). Von den 72 individuellen Bakterienklonen, von denen die identifizierten Phagen abstammen, wurden für die weiteren Experimente zur Gewinnung und nachfolgender Charakterisierung spezifischer löslicher Quin-scFv-Antikörperfragmente 18 scFv-Quin exprimierende Klone ausgewählt.

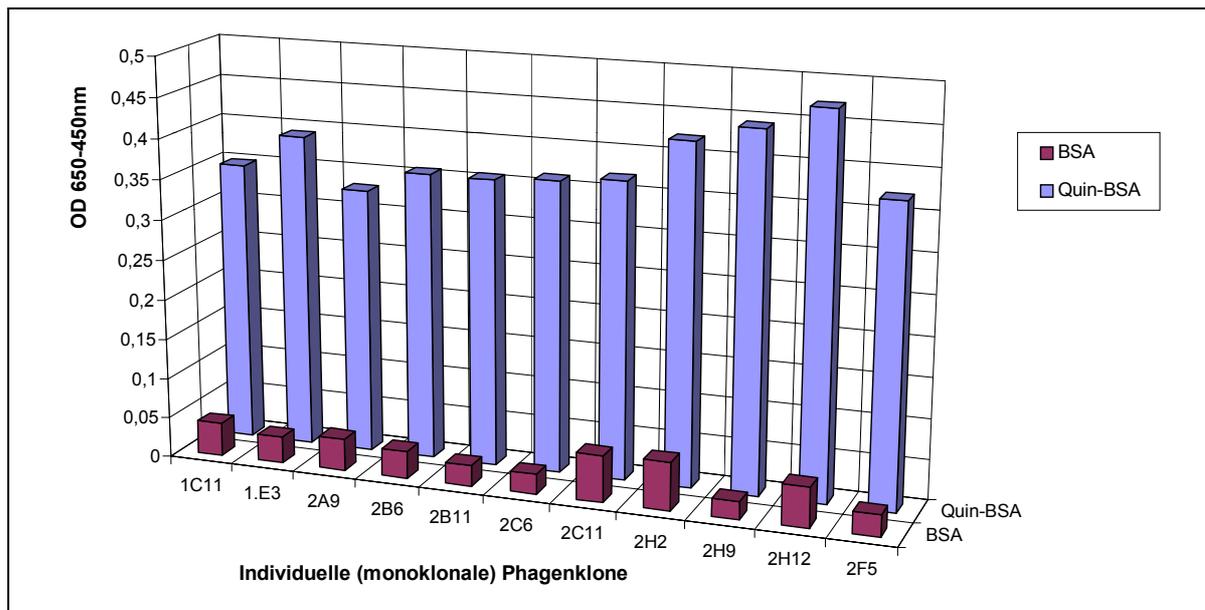


Abb.9: Nachweis der Antigenbindungsaktivität individueller Phagenklone an das Hapten Quinmerac im monoklonalen Phagenelisa. Dargestellt ist die Bindungsaktivität an das Hapten Quinmerac und an reines BSA einiger ausgewählter individueller Phagen. Die Beschichtung der ELISA-Platten erfolgte in Abschnitt 3.1.4. beschrieben.

Tab.1: Übersicht und Einteilung der 192 im Phagen-ELISA getesteten individuellen monoklonalen Phagen. Gezeigt ist die Anzahl der getesteten Phagen in Bezug zu ihrer ermittelten Bindungsaktivität. Die Einteilung der getesteten Phagen erfolgte durch die im Phagen-ELISA nachgewiesenen Bindungsaktivität an Quinmerac (ermittelte Substratumsatzraten) und nach Vergleich mit dem entsprechenden BSA-Kontrollwert.

Nachgewiesene Bindungsaktivität (OD _{650-450nm})	Quinmerac	Anzahl der identifizierten monoklonalen Phagen	BSA-Kontrollwert (OD _{650-450nm})
> 0,4 (gut-sehr gut)		8	< 0,05
> 0,3 (mittel)		64	< 0,05
0,2-0,1 (schlecht)		120	<0,1

4.1.4 Überprüfung des scFv-Inserts durch Restriktionsanalyse

Die Selektion der gewünschten, präsentierten spezifisch Quinmerac bindenden scFv-Antikörperfragmente erfolgte durch Inkubation der rekombinanten Phagen mit immobilisierten Antigen. Nachfolgend wurden die Bakterienklone selektioniert, von denen die im Abschnitt 4.1.3 identifizierten monoklonalen spezifisch Quinmerac bindenden rekombinanten Phagen abstammen (siehe 3.1.5). Von den 18 ausgewählten Quin-Klonen wurde anschließend die Plasmid-DNA nach *Sambrook et al., 1989* isoliert und zum Nachweis der scFv-Gen-Inserts, als 1500bp Fragment durch Restriktion mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen BamH I und Nco I verwendet (siehe Abbildung 10). Nach elektrophoretischer Auftrennung des Restriktionsansatzes in einem 1,5% igem Agarosegel konnte bei 12 der getesteten Klone das 1500bp scFv-Fragment nachgewiesen werden. In Abbildung 9 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der gespaltenen Plasmid-DNA einiger individueller Bakterienklone dargestellt. Im Anschluß daran wurden nach einer ersten Überprüfung der Bindungsaktivität der exprimierten löslichen scFv-Antikörperfragmente aller 12 Klone im indirekten ELISA (siehe Abschnitt 4.1.3, Ergebnisse nicht gezeigt) drei geeignete Anti-Quin scFv exprimierende Bakterienklone, B11; C11 und H12, für die genauere funktionelle Charakterisierung und die nachfolgende Erzeugung von Pflanzenexpressionskassetten ausgewählt.

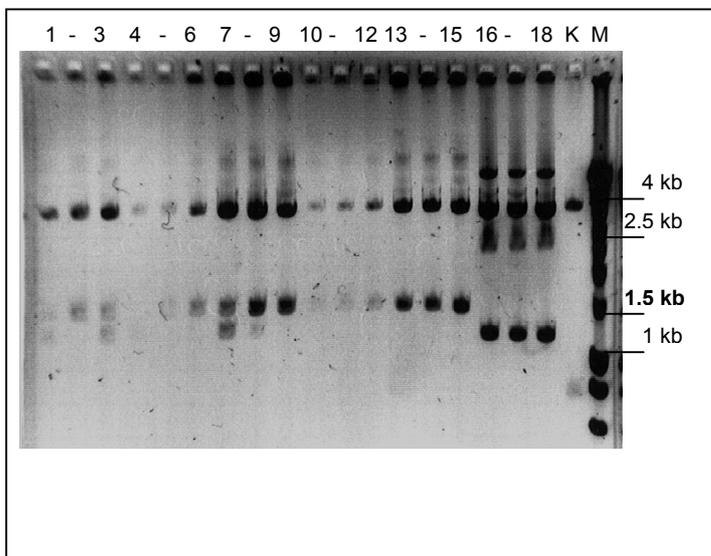


Abb.10: Restriktionsanalyse zum Nachweis der scFv-Inserts im Phagemidvektor pIT. Gezeigt ist die Restriktionsspaltung der aus individuell selektierten Bakterienklonen isolierten Plasmid-DNA mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen BamHI und NcoI. Der Nachweis der scFv-Antikörperfragmente im Phagemidvektor pIT erfolgte als ~1500bp Fragment. Individuelle Klone: Spur 1-3: Q1C11; Spur 4-6: Q1D8; Spur 7-9: Q2A9; Spur 10-12: Q2B6; Spur 13-15: Q2B11; Spur 16-18: Q1A1; K: Kontrolle-pIT; M: Marker

4.2 Gewinnung und funktionelle Charakterisierung der Anti-Quin scFv's im bakteriellen Expressionssystem

Nachdem die mittels „Phage Display“ spezifisch Quinmerac bindenden monoklonalen Phagen identifiziert und isoliert werden konnten, wurden die in den mit den selektierten Phagen infizierten TG1-Zellen enthaltenen Plasmidvektoren auf scFv-Insertion mittels Restriktionsanalyse überprüft.

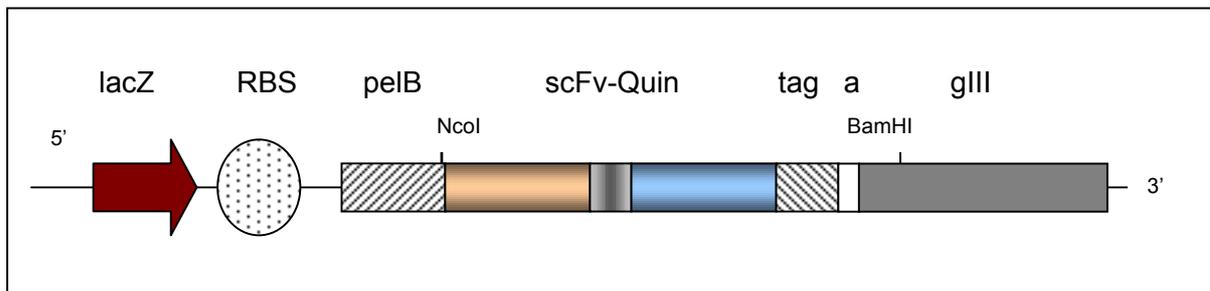


Abb.11: Schematische Darstellung des Phagemid-Plasmidvektors für die Expression der Anti-Quin Einkettenantikörper als Fusionsproteine auf der Oberfläche von Virionen und für die Synthese löslicher Antikörperfragmente in geeigneten Bakterien. **lacZ:** induzierbarer lacZ-Promotor; **RBS:** Ribosomenbindeort; **pelB:** bakterielles Signalpeptid; **scFv Quin:** Anti-Quinmerac-Einkettenantikörper; **a:** UAG-Stoppocodon; **tag:** c-myc-tag; **gIII:** kleines Phagenhüllprotein

Im folgenden Schritt sollten die ausgewählten drei scFv-Einkettenantikörper als lösliche Fragmente im bakteriellen System zur Expression gebracht und anschließend eingehend funktionell charakterisiert werden. Das prokaryotische Expressionssystem hat den Vorteil einer schnellen und effizienten Testung der spezifischen scFv-Antikörperfragmente auf Antigenbindungsaktivität und Funktionalität. Der im „Phage Display“ verwendete Plasmidvektor pIT (siehe Abbildung 11) hat den Vorteil, dass er sowohl für die Expression der Antikörpergene als Fusionsprotein auf der Oberfläche von Phagenpartikeln als auch zur Gewinnung löslicher scFv's in geeigneten Bakterien verwendet werden kann. Dieser Vektor enthält das Gen für das pelB-Signalpeptid der *Erwinia cavotovora* Pectatylase B, das die Sekretion des scFv-Gens als pelB-scFv-Fusionsprotein in den periplasmatischen Raum der Bakterienzelle und unter Anwendung spezifischer Kulturbedingungen (für partielle Lyse der Bakterienzellwand) in das Kulturmedium ermöglicht. Des weiteren enthält der Vektor ein zwischen scFv-Gen und gIII-Protein gelegenes Stoppcodon UAG. Das ermöglicht es, dass bei Expression des Plasmidvektors in *E.coli*-Stämmen mit einer Suppressormutation das Stoppcodon überlesen wird und das im Vektor integrierte scFv-Antikörpergen als gIII-scFv-Fusionsprotein in den periplasmatischen Raum der Bakterienzelle sekretiert werden kann.

Im Zuge des „Phage Display“ wird das Fusionsprotein nach Infektion der Zellen mit Helferphagen in neu entstehende Phagenpartikel verpackt und an der Oberfläche des Virions exprimiert. Im Gegensatz dazu wird bei Expression des Vektors in *E.coli*-Stämmen wie z.B. HB2151, die keine Suppressormutation haben, das Stoppcodon UAG erkannt und es erfolgt an dieser Stelle der Abbruch der Translation. Dies führt zur Synthese eines löslichen scFv-Antikörperfragmentes und zur Sekretion in den periplasmatischen Raum (Pope *et al.*, 1996). Die Expression des scFv-Antikörperfragmentes erfolgt unter der Kontrolle des im Phagemidvektor integrierten lacZ-Promotors. Aufgrund der nicht vollständigen Reprimierbarkeit des Promotors und der Möglichkeit der Toxizität der exprimierten scFv-Antikörperfragmente als auch der scFv-Fusionsproteine für die Bakterienzelle, wurden die Bakterien unter Zusatz von Glukose angezogen (De Bellis & Schwartz, 1990). Durch die Zugabe von Glukose zu Beginn der Kultivierung der Bakterien erfolgte die Hemmung der Aktivität des Promotors durch den als Katabolit-Repression bekannten Regulationsprozeß (Knippers, 1995; O'Brien & Aitken, 2002). Durch Zusatz von IPTG, das als starker Induktor wirkt, konnte die Expression der scFv-Antikörperfragmente dann in der log-Phase des Bakterienwachstums induziert werden. Durch die Wahl geeigneter Kulturbedingungen, die zur partiellen Lyse der Bakterienzellwand führten, konnten die im Periplasma der Bakterienzelle akkumulierten scFv-Einkettenantikörper ins umgebende Kulturmedium freigesetzt werden. Nachfolgend sollten die so gewonnenen scFv-haltigen *E.coli*-Zellkulturüberstände für die funktionelle Charakterisierung im indirekten und kompetitiven ELISA und zur Bestimmung des Expressionsniveaus in „Western-Blot“ verwendet werden. Der Nachweis der scFv-Antikörperfragmente erfolgte durch den am C-Terminus des Proteins fusionierten c-myc-tag (Munroe & Pelham, 1986) unter Verwendung des gegen diesen gerichteten murinen Anti-c-myc Antikörper 9E10 (Evan *et al.*, 1985). Nach Untersuchung der DNA primär ausgewählter Bakterienklone auf korrekte scFv-Insertion und nach erster Überprüfung der Bindungsaktivität der exprimierten löslichen spezifisch Quinmerac bindenden scFv-Antikörperfragmente wurden drei geeignete Anti-Quin scFv exprimierende Bakterienklone für die genauere funktionelle Charakterisierung ausgewählt (siehe 3.3). Der nach IPTG-Induktion der Kulturansätze erhaltenen scFv-haltige *E.coli*-HB2151-Kulturüberstand sollte durch ELISA-Experimente und „Western-Blot“ Analysen eingehender charakterisiert werden. Es konnte bei allen drei ausgewählten Quin-Klonen eine korrekte Expression und Spezifität für Quinmerac, der von ihnen produzierten scFv-Antikörperfragmente immunologisch nachgewiesen werden. Anschließend wurden unter Verwendung aller im Zuge der funktionellen Charakterisierung erhaltenen Ergebnisse, einschließlich der ausgewerteten Sequenzdaten, von den ursprünglich analysierten drei Klonen nur die beiden Einzelklone B11 und H12 ausgewählt, um in weiteren Experimenten zur Herstellung der Expressionskassetten genutzt zu werden.

4.2.1 Nachweis der Bindungsaktivität/affinität ausgewählter scFv-Quin im ELISA

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Expression von Anti-Quin scFv's in verschiedenen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle zur Erzeugung von Toleranz gegenüber dem Herbizid Quinmerac. Dafür mussten im Vorfeld die Eigenschaften der für die Herstellung der Pflanzenexpressionskassetten verwendeten scFv's detaillierter untersucht werden. Die nachfolgenden Experimente dienten daher der eingehenden funktionellen Charakterisierung der von den mittels „Phage Display“ isolierten spezifisch Quinmerac bindenden Phagen präsentierten scFv-Antikörperfragmente im bakteriellen System. Dieses eignet sich hervorragend für eine schnelle und effektive Überprüfung der spezifischen Eigenschaften (der Funktionalität) von rekombinanten Proteinen wie beispielsweise von Antikörpern und Antikörperfragmenten. Die Antigenbindungsaktivität und -affinität der ausgewählten Anti-Quin scFv's wurden in verschiedenen ELISA wie in Abbildung 12/13 dargestellt überprüft.

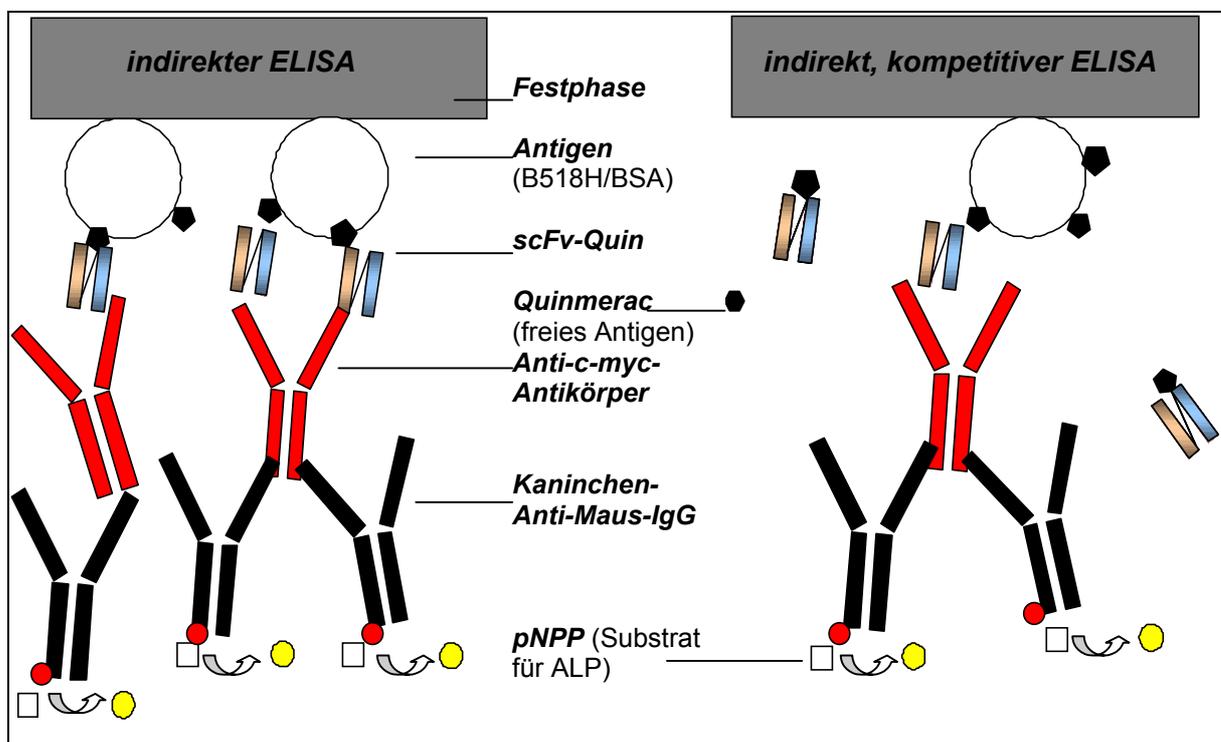


Abb.12: Schematische Darstellung des indirekten ELISA und des indirekt kompetitiven ELISA zum Nachweis der Antigenbindungsaktivität, und -spezifität der im bakteriellen System exprimierten löslichen Anti-Quin scFv's an immobilisiertem Antigen (Quinmerac; BSA; Quinchlorac). Die ELISA-Platten wurden mit dem jeweiligen Antigenkonjugat beschichtet (siehe Abschnitt 3.3.), mit dem bakteriellen Überstand, dem monoklonalen Antikörper 9E10 und einem Kaninchen-Anti-Maus-ALP-Konjugat inkubiert. Der Nachweis von enzymgebundenem Anti-Maus-Ig erfolgte durch den Umsatz des zugesetzten Substrates pNPP (ΔOD_{405nm}) und anschließender Vermessung bei einer OD von 405nm im ELISA-Reader. Für den indirekt kompetitiven ELISA wurde der bakterielle Überstand zusätzlich mit einer Lösung von freiem Quinmerac vorinkubiert.

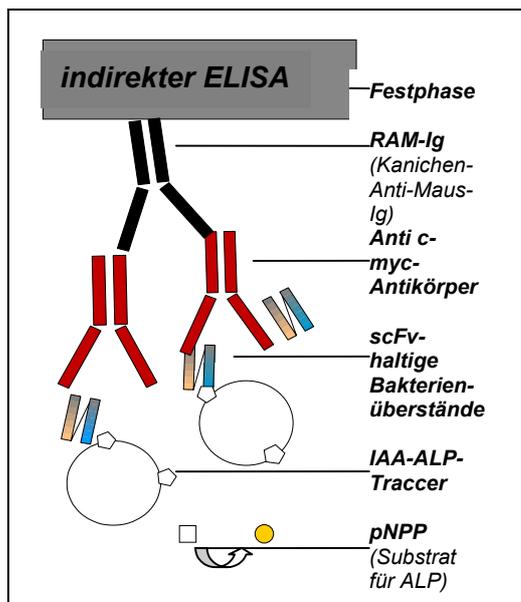


Abb.13: Schematische Darstellung des indirekten ELISA zum Nachweis der Antigenbindungsspezifität bzw. Kreuzreaktivität mit Indolylessigsäure der im bakteriellen System exprimierten löslichen Anti-Quin scFv's. Die ELISA-Platten wurden mit RAM-Ig beschichtet (siehe Abschnitt 3.3.), mit dem monoklonalen Antikörper 9E10, den scFv-haltigen bakteriellen Kulturüberständen und einem IAA-ALP-Tracer konjugiert. Der Nachweis von Antikörper gebundenem IAA-Tracer erfolgte durch den Umsatz des zugesetzten Substrates pNPP und anschließender Vermessung bei einer OD von 405nm im ELISA-Reader.

Für diese Untersuchung wurden die DNA der unter 4.1.3 ausgewählten drei Klone; B11; C11 und H12 sowie pIT als Kontrolle erneut in den *E.coli*-Stamm HB2151 transformiert. Anschließend wurden jeweils individuelle Bakterienklone wie in Abschnitt 3.2 beschrieben kultiviert und die nach IPTG-Induktion erhaltenen Anti-Quin-scFv-haltigen Überstände für die weitere funktionelle Charakterisierung der exprimierten löslichen scFv-Einkettenantikörper verwendet. Die Untersuchung der Bindeeigenschaften der in den bakteriellen Überständen enthaltenen scFv-Antikörperfragmente wurde mittels der indirekten ELISA-Technik (Abbildung 12) und Quin-BSA als immobilisiertem Antigen durchgeführt. Der Nachweis erfolgte wie in Abschnitt 3.3 für den indirekten ELISA beschrieben mittels einem Anti-c-myc-Antikörper (Evan et al., 1985) als Sekundärantikörper und einem Kaninchen-Anti-Maus-ALP-Konjugat als Tertiärantikörper. Die Ergebnisse des indirekten ELISA sind in Abbildung 14 dargestellt.

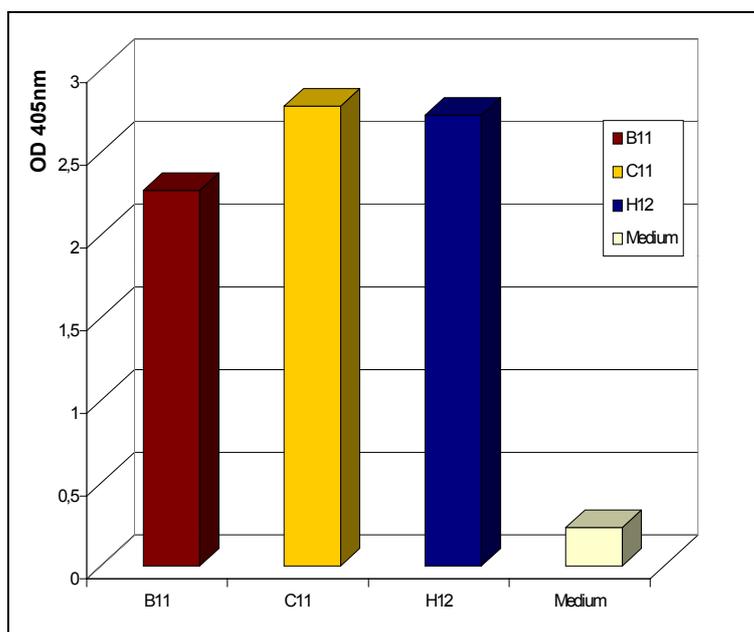


Abb.14: Nachweis der Antigenbindungsaktivität der Anti-Quin scFv B11, C11 und H12 an das Hapten Quinmerac im indirekten ELISA. Die ELISA-Platten wurden mit B518H-BSA-Konjugat beschichtet, mit den in PBS-T 1:5 verdünnten, nach IPTG-Induktion erhaltenen bakteriellen Kulturüberständen, dem c-myc-Antikörper 9E10 und einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~ALP-Konjugat inkubiert. Der Nachweis von enzymgekoppeltem Anti-Maus-Ig erfolgte wie in Abschnitt 3.3. beschrieben.

Die im bakteriellen System exprimierten Einkettenantikörper aller drei Klone (B11, C11 und H12) zeigten eine starke Antigenbindung an das Hapten Quinmerac obgleich das scFv B11 dabei trotz äquivalenter Mengen an produziertem scFv-Protein im bakteriellen Kulturüberstand eine, im direkten Vergleich, etwas geringere spezifische Aktivität aufwies. Bis zu einer 50fachen Verdünnung des bakteriellen Überstandes konnte eine Bindungsaktivität der löslichen scFv-Fragmente an das immobilisierte Antigen Quinmerac nachgewiesen werden. In weiteren Experimenten sollte die Spezifität und Kreuzreaktivität der erhaltenen löslichen scFv-Antikörperfragmente eingehender überprüft werden. Hierfür wurden mehrere indirekte ELISA (siehe Abbildung 12/13) unter Verwendung von verschiedenen immobilisierten Antigenen (BAS 518H (Quinmerac), BAS 514H (Quinchlorac), RAMIG und reinem BSA), für die Beschichtung der ELISA-Platten, durchgeführt. Die spezifischen Antigenbindungseigenschaften der einzelnen Klone sind in Abbildung 15 dargestellt. Es wurde bei keinem der drei Klone eine Kreuzreaktivität mit BSA, Quinchlorac beziehungsweise Indolylessigsäure festgestellt. Die isolierten Anti-Quin-scFv's der Klone B11; C11 und H12 binden folglich spezifisch an das Hapten Quinmerac.

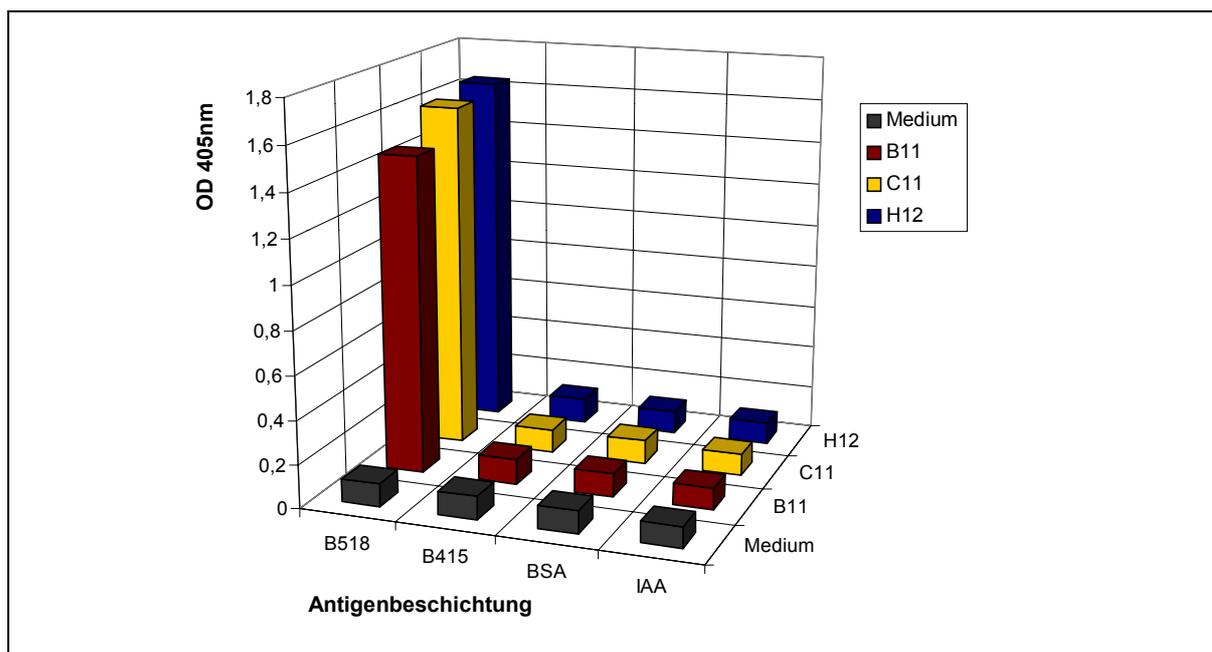


Abb.15: Nachweis der Bindungsspezifität der bakteriell exprimierten Einkettenantikörper B11; C11 und H12 an das Hapten Quinmerac im indirekten ELISA. Dargestellt ist der Substratumsatz in Abhängigkeit von der verwendeten Antigenbeschichtung (ΔOD_{405nm}). Die ELISA-Platten wurden mit unterschiedlichen Konjugaten (B518H, B418H) sowie reinem BSA bzw. RAMIG (für den Nachweis mittels IAA-Tracer) beschichtet und anschließend mit den 1:5 verdünnten Kulturüberständen bzw. unverdünntem Medium als Negativ-Kontrolle inkubiert. Der immunologische Nachweis erfolgte nach Inkubation mit dem Anti-c-myc-Antikörper 9E10 und dem Kaninchen-Anti-Maus-IgG-ALP-Konjugat durch Umsatz des hinzugefügten Substrates pNPP. Für den indirekten ELISA zur Testung auf Kreuzreaktivität mit IAA erfolgte der Nachweis nach Inkubation der ELISA-Platten mit dem Rabbit-Anti-Maus-Ig und den scFv-haltigen Kulturüberständen unter Verwendung enzymgekoppelter Indolylessigsäure ebenfalls durch pNPP-Substratumsatz.

Zur weiteren genaueren Untersuchung und zur Überprüfung der Antigenbindungsaffinität, und -spezifität der löslichen Anti-Quin-scFv's wurden indirekt kompetitive ELISA durchgeführt (siehe Abbildung 12). Der bisherig durchgeführte Nachweis der Antigenbindung der Einkettenantikörperfragmente erfolgte mit Hilfe eines, durch Kopplung an eine Festphase, immobilisierten Trägerprotein-Quinmerac-Konjugat. Für das gesetzte Ziel der Erzeugung von Herbizidtoleranz in Pflanzen durch Expression spezifischer Einkettenantikörper müssen diese exprimierten Anti-Quin-scFv auch freies Quinmerac binden können. Dafür wurden die scFv-haltigen und 1:5 verdünnten bakteriellen Überstände der Klone B11; C11 und H12 nach IPTG-Induktion direkt in einer mit Quin-BSA beschichteten ELISA-Platte mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen von freiem Quinmerac inkubiert. Durch Bindung des scFv-Antikörperfragmentes an das in der Lösung enthaltene freie Antigen kommt es zu einer Abnahme der für die Bindung an die Festphase verfügbaren scFv-Antikörperfragmente. Dadurch verringert sich auch die Menge des im Zuge des Nachweises gebundenen Sekundär- und Tertiärantikörpers wodurch sich letztendlich die Substratumsatzmenge verringert. Der Nachweis des kompetitiven Effektes durch das freie Antigen erfolgte durch Messung der Abnahme des enzymatischen Umsatzes (ΔOD_{405nm}).

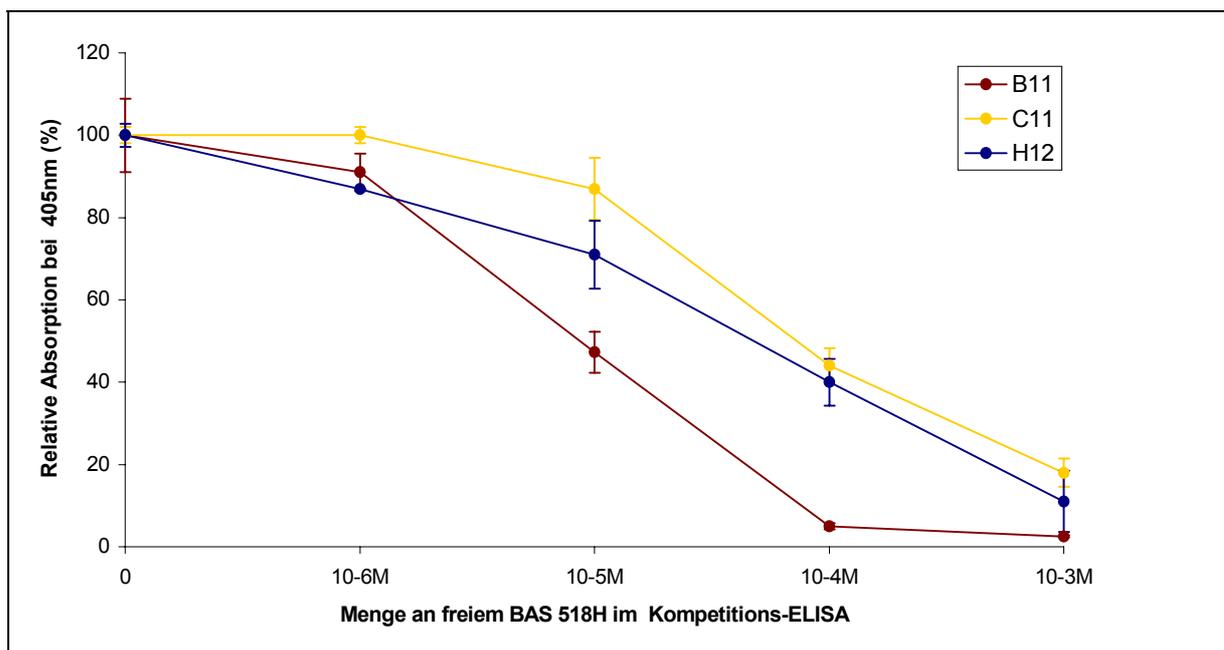


Abb.16: Nachweis der Bindung der bakteriell exprimierten Anti-Quin-scFv B11, C11 und H12 an freies Quinmerac im indirekten kompetitiven ELISA. Dargestellt ist der Substratumsatz in Abhängigkeit von der verwendeten Menge an freiem Quinmerac. Die ELISA Platten wurden mit Quinmerac-BSA-Konjugat beschichtet, mit den entsprechenden Mengen an freiem Antigen (Quinmerac), mit den in PBS-T im Verhältnis 1:2 verdünnten bakteriellen Kulturüberständen der Klone pITB11, C11 und H12 sowie mit dem c-myc-Antikörper 9E10 und einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~ALP-Konjugat inkubiert. Der Nachweis von ezymgekoppelten Anti-Maus-Immunglobulin erfolgte durch Umsatz des hinzugesetzten Substrates pNPP.

Die Verringerung des Substratumsatzes zeigte, dass die löslichen scFv's B11; C11 und H12 sowohl an das immobilisierte Antigen als auch an das freie Antigen-Quinmerac spezifisch binden (siehe Abbildung 16). Dabei wies der Quin-Klon B11 im direkten Vergleich eine höhere Bindungsaffinität zum freien Antigen Quinmerac auf als die Klone C11 und H12. Beim Klon B11 erfolgte eine 50%ige Reduktion des enzymatischen Substratumsatzes bereits beim Zusatz von 10µM freiem Quinmerac (IC_{50}) im Inkubationsschritt mit dem scFv-haltigen Kulturüberstand des indirekt kompetitiven ELISA. Für den Klon C11 und H12 hingegen führte erst die Zugabe von 100µM an freiem Antigen (IC_{50}) zur 50%igen Reduktion des enzymatischen Substratumsatzes. Die im „Western-Blot“ bestimmten Konzentrationen der scFv in den bakteriellen Kulturüberständen waren für alle drei Klone annähernd gleich. Im abschließendem Vergleich aller drei Klone konnte somit festgestellt werden, dass das scFv-B11 eine etwa um den Faktor 10 verbesserte Antigenbindungsaffinität aufweist als die scFv C11 und H12. Generell konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten scFv's B11; C11 und H12 sich aufgrund der Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung im indirekten und indirekt kompetitiven ELISA für die weiteren Experimente zur Konstruktion spezieller Pflanzenexpressionskassetten für Erzeugung von Toleranz gegenüber dem Herbizid Quinmerac eignen.

4.2.2 Nachweis der exprimierten Anti-Quin scFv's im bakteriellen Überstand mittels „Western-Blot“

Um die eingehende funktionelle Charakterisierung der mittels bakteriellem System exprimierten und bereits durch indirekten und indirekt kompetitiven ELISA untersuchten löslichen anti-Quin scFv's B11; C11 und H12 abzuschließen, sollten diese zusätzlich im „Western-Blot“ analysiert werden. Hierfür wurden die Bakterienklone B11; C11 und H12 sowie der Kontrollklon pIT wie im Abschnitt 3.2 beschrieben angezogen und die erhaltenen scFv-haltigen Kulturüberstände nach erfolgter IPTG-Induktion verwendet. Die scFv-Proteine der Kulturüberstände wurden in einem 12,5% SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. (siehe 3.10.). Der Nachweis der scFv-Expression erfolgte mit Hilfe des Anti-c-myc-Antikörpers 9E10, einem Kaninchen-Anti-Maus-POD-Konjugat und dem ECL-Detektionssystem. Durch direkten Vergleich der auf dem Röntgenfilm erhaltenen Signale (Stärke eines Signals) mit Hilfe des Computerprogramms „TINA“ konnte die relative Menge des exprimierten scFv's unter Berücksichtigung des auf das Gel aufgetragenen Volumens des bakteriellen Überstandes. Wie in der Abbildung 17 zusehen ist, konnten bei allen drei Klonen (B11, C11 und H12) scFv-Antikörperfragmente mit einer Größe von ca. 28kDa in etwa vergleichbaren Mengen im bakteriellem Kulturüberstand nachgewiesen werden. Die Menge des nachgewiesenen Anti-Quin-scFv belief sich bei Klon B11 auf $\sim 7ng_{scFv}/\mu l_{Überstand}$; bei C11 auf $\sim 10ng_{scFv}/\mu l_{Überstand}$ und bei H12 auf $\sim 8,5ng_{scFv}/\mu l_{Überstand}$ (nach ca. 20 stündiger IPTG-Induktion).

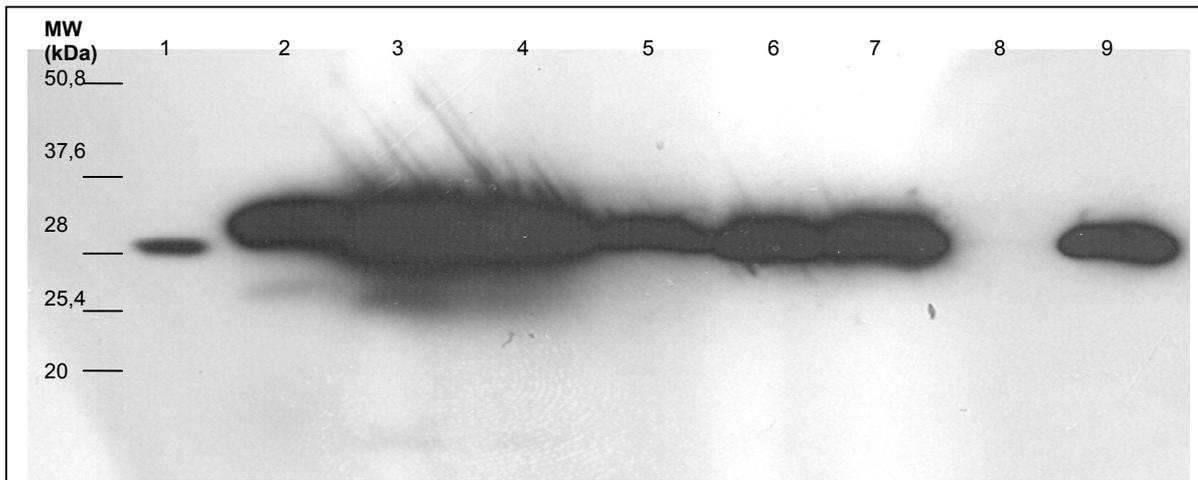


Abb.17: Nachweis der Anti-Quin scFv B11, C11 und H12 durch „Western-Blot“-Analyse. Definierte Volumina der bakteriellen Kulturüberstände der mittels IPTG induzierten Klone B11, C11 und H12 wurden in einem 12,5%igem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der immunologische Nachweis des scFv-c-myc-tag-Proteins erfolgte mit Hilfe des monoklonalem Antikörpers 9E10 und einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~POD-Konjugat sowie dem ECL-Detektionssystem. Spur 1: Positivkontrolle (definierte Menge eines gereinigten scFv; 10ng); Spur 2 und 5: Kulturüberstand Klon pIT B11, 2: 20µl, 5: 10µl; Spur 3 und 6: Kulturüberstand Klon pIT C11, 3: 20µl, 6: 10µl; Spur 4 und 7: Kulturüberstand Klon pIT H12, 4: 20µl, 7: 10µl, Spur 8: Negativkontrolle: Kulturüberstand Klon pIT, 30µl; Spur 9: Kulturüberstand Klon pIT C6, 20µl. Linksseitig sind die Größen des verwendeten Protein-Molekulargewichts-Standards dargestellt.

4.3 Sequenzanalyse der Anti-Quin scFv's B11; C11 und H12

Nach der erfolgreichen funktionellen Charakterisierung der löslichen Anti-Quin scFv's durch indirekten und indirekt kompetitiven ELISA sowie durch „Western-Blot“ Analyse erfolgte die Sequenzierung und nachfolgende Analyse der verschiedenen scFv-Gene im pIT-Vektor unter Verwendung der spezifischen Sequenzierungsprimer pHEN und LMB3 (siehe 2.2.2). Die Analyse der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe verschiedener Internetsequenzdatenbanken und den Spezialprogrammen Vector-NTI und Lasergene. Nach Auswertung und anschließendem Vergleich der Sequenzen aller drei Quinmerac bindenden scFv-Klone B11, C11 und H12 konnte eine 100%ige Übereinstimmung der Nukleotidsequenz der Anti-Quin-scFv B11 und C11 festgestellt werden. Im Folgenden wurden daher nur die Sequenzen des Klones B11 und die des Klones H12 in die weiteren Analysen einbezogen (Vergleich Abbildung 18/19/20).

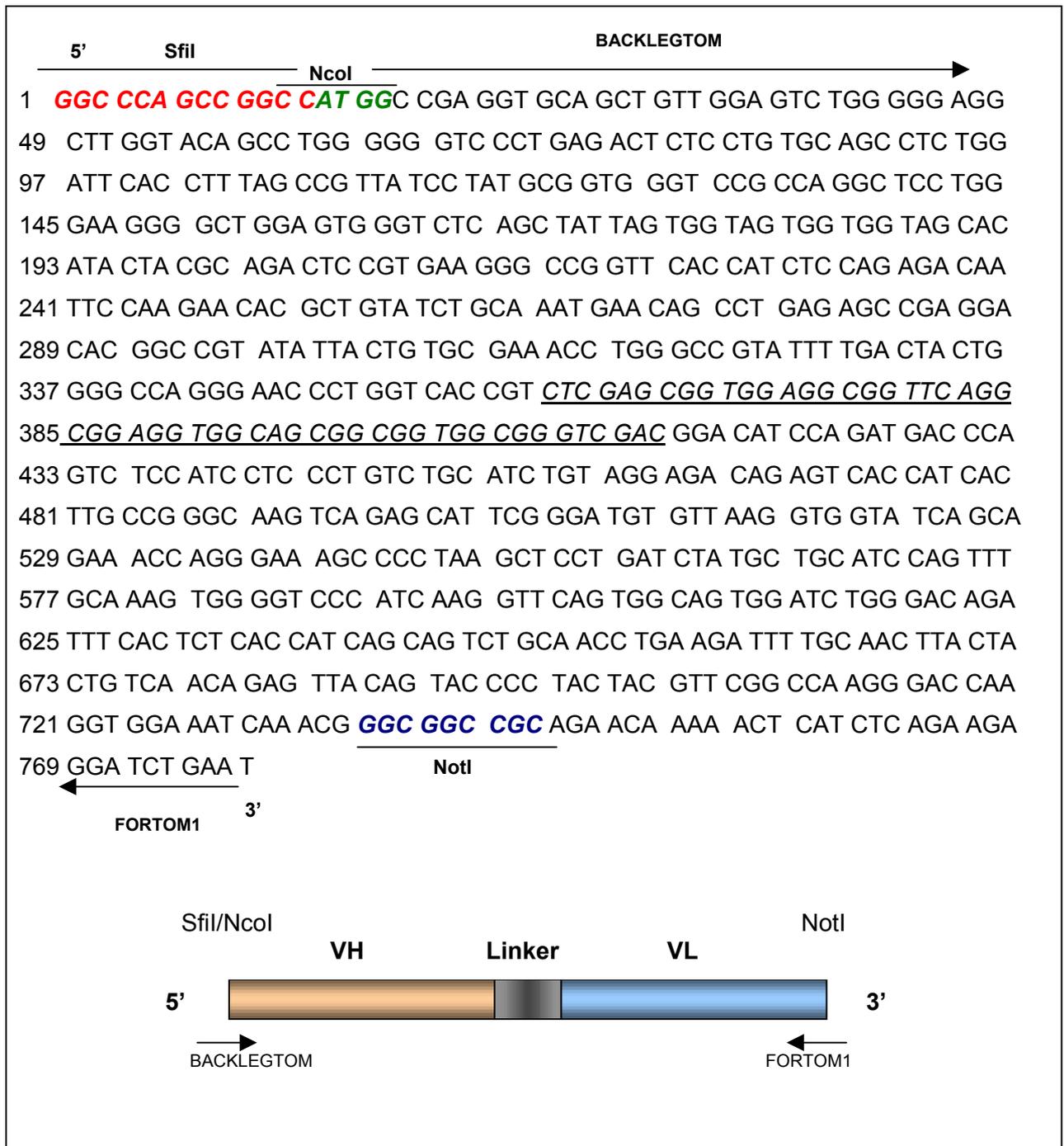


Abb.18: Nukleotidsequenz des Anti-Quinmerac-scFv B11 und C11 und dessen schematische Darstellung. Gezeigt ist die Sequenz des komplementären Stranges als Triplettabfolge nach Sequenzierung im Vektor pITB11 und C11. Hervorgehoben ist der Linkerbereich sowie die für die Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen. Des Weiteren sind die Oligonukleotide BACKLEGTOM und FORTOM1 eingezeichnet, die für die Einführung der für die Klonierung des scFv als BamHI-Fragment (in das Vektorfragment von pRTRA7/3) notwendigen BamHI-Restriktionsschnittstellen mit Hilfe der PCR-Methode verwendet werden. **VH:** Gen für die variable Domäne der schweren Kette; **Linker:** Linkersequenz; **VL:** Gen für die variable Domäne der leichten Kette.

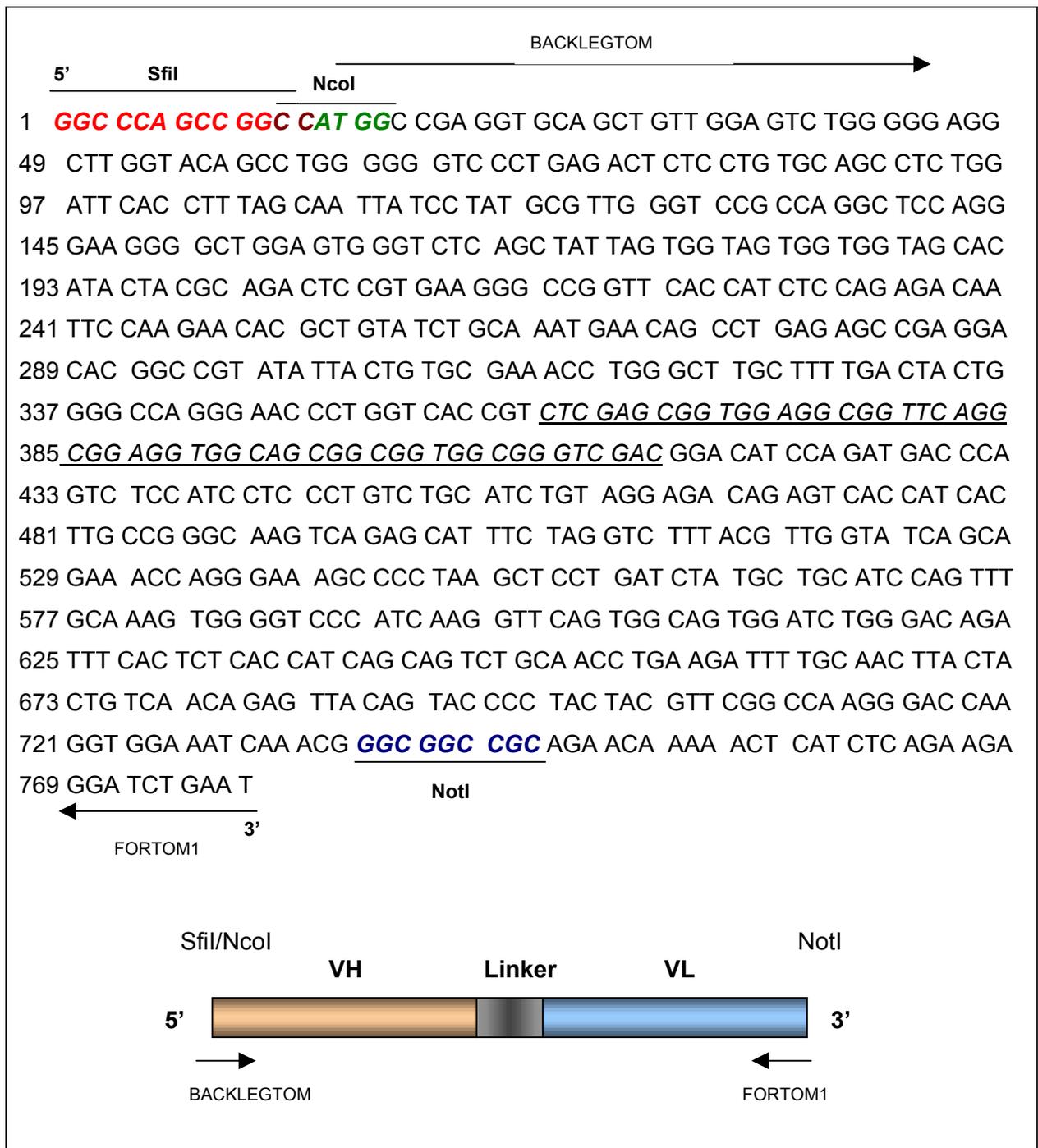


Abb.19: Nukleotidsequenz des Anti-Quinmerac-scFv H12 und dessen schematische Darstellung. Gezeigt ist die Sequenz des komplementären Stranges als Triplettabfolge nach Sequenzierung im Vektor pITH12. Hervorgehoben ist der Linkerbereich sowie die für die Klonierung notwendigen Restriktionschnittstellen. Des weiteren sind die Oligonukleotide BACKLEGTOM und FORTOM1 eingezeichnet, die für die Einführung der für die Klonierung der scFv als BamHI-Fragmente in das Vektorfragment von pRTRA7/3 nötigen BamHI-Restriktionsschnittstellen mit Hilfe der PCR-Methode verwendet werden. **VH:** Gen für die variable Domäne der schweren Kette; **Linker:** Linkersequenz; **VL:** Gen für die variable Domäne der leichten Kette.

Mit Hilfe bestimmter Internetsequenzdatenbanken konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den isolierten scFv-Gensequenzen um von menschlichen Antikörpern abgeleitete rekombinante Antikörperfragmente handelte. Zur Festlegung und Bestimmung der Positionen der hypervariablen Bereiche (CDR's) und der umgebenden Antikörpergerüstregionen in den variablen Domänen der schweren und leichten Ketten wurde das von *Kabat et al. (1991)* entwickelte System verwendet.

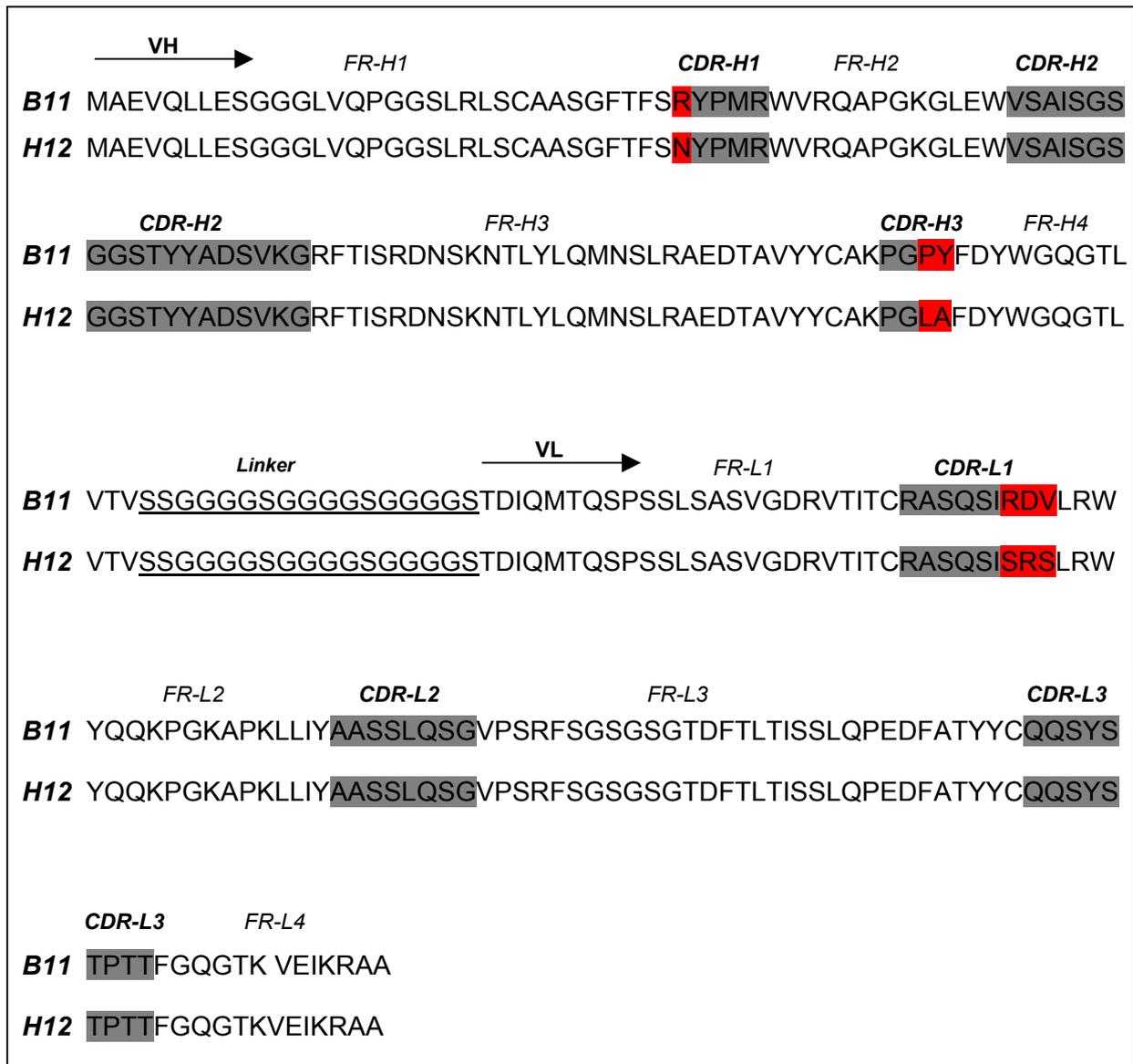


Abb.20: Aminosäuresequenz der scFv-Gene B11 und H12. Dargestellt ist die von der analysierten DNA-Sequenz der Plasmide pITB11 und H12 abgeleitete Aminosäuresequenz. Gekennzeichnet sind die hypervariablen Bereiche (CDR's) der schweren und leichten Ketten Einkettenantikörper sowie die dazugehörigen Antikörpergerüstregionen (Framework-Regionen). Auftretende Sequenzunterschiede im direkten Vergleich der beiden scFv sind zusätzlich rot hinterlegt worden. **VH:** Sequenz für die variable Domäne der schweren Ketten; **CDR-H1-3 bzw. CDR-L1-3:** hypervariable Bereiche der variablen schweren und leichten Ketten; **VL:** Sequenz für die variable Domäne der leichten Ketten; **Linker:** Linkersequenz; **FR-H1-3 bzw. FR-L1-3:** Gerüstregionen der variablen schweren und leichten Ketten.

Zur weiteren Auswertung der Sequenzen wurden diese zusätzlich mit der Sequenz eines anderen bereits zuvor aus den Bibliotheken A und B isolierten und gegen ein Hormon gerichteten scFv-Antikörper verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Nukleotidsequenzen aller scFv's (B11; H12 und Kontrolle) in den Antikörpergerüstregionen FR1-4 beider Ketten übereinstimmen, was auf die in den Bibliotheken verwendete menschliche Antikörpergerüstregion zurückzuführen ist. Signifikante Sequenzveränderungen traten vor allem im Bereich der hypervariablen Regionen (CDR's), die im wesentlichen für die Antigenbindung verantwortlich sind, auf. Die Unterschiede betreffen den Austausch von Basen im Bereich der CDR's H1, H3 und L1. Die festgestellten Unterschiede in den CDR's können auf die eingeführte Diversität („Side chain diversity“, „somatic mutation“) an definierten Positionen in diesen spezifisch antigenbindenden Bereichen der Klone der Bibliotheken zurückgeführt werden (siehe Protokoll des Herstellers). Nach Analyse der Sequenzen in einer speziellen Datenbank konnten die theoretischen Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte der scFv-Proteine bestimmt werden (B11/C11, H12; Tabelle 2). Nach Auswertung aller Daten wurden die Klone B11 und H12 für die Herstellung der Expressionskassetten, die für die Vermittlung von Toleranz gegenüber dem applizierten Herbizid Quinmerac in *Nicotiana tabacum* verwendet werden sollen, ausgewählt.

Tab.2: Zusammenfassende Übersicht der mit Hilfe verschiedener Internetsequenzdatenbanken ermittelten theoretischen Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte der funktionell charakterisierten scFv B11/C11 und H12.

Anti-Quin-scFv	theoretisch bestimmtes Molekulargewicht in kDa	Theoretisch berechneter Isoelektrischer Punkt
B11/C11	27,6	8,3
H12	27,5	8,4

4.4 Chimäre Genkonstrukte zur Expression der Anti-Quin-scFv in *Nicotiana tabacum*

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, eine immunmodulationsbedingte Vermittlung von Toleranz der Pflanzen gegenüber dem verwendeten Herbizid Quinmerac durch Expression geeigneter charakterisierter Anti-Quin-scFv in unterschiedlichen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle zu erreichen. Das im Zuge dieser Arbeit verwendete Herbizid Quinmerac sollte stellvertretend für andere Herbizide als Versuchsherbizid verwendet werden um ein Modellsystem zur Erzeugung von Toleranz in Kulturpflanzen durch Expression von Anti-Quinmerac-Einkettenantikörpern zu entwickeln. Die Überlegungen gingen dahin, dass es mittels der in verschiedenen subzellulären Kompartimenten exprimierten und akkumulierten funktionell aktiven Anti-Quin-scFv-Fragmente möglich sein

sollte, die phytotoxischen Effekte eines exogen applizierten Herbizids durch Immunmodulation zu unterbinden. Die herbizide Wirkung von Quinmerac liegt in seiner Auxin-Aktivität begründet (Grossmann & Scheltrup, 1995; Hansen & Grossmann, 2000). Der primäre Wirkort des Herbizids Quinmerac ist nach Untersuchungen an der Versuchspflanze *Galium aparine* das Sprossgewebe (Scheltrup & Grossmann, 1996). Aufgrund dessen, dass das Herbizid sowohl über die Blätter als auch über die Wurzel aufgenommen und systemisch in der Pflanze verteilt wird, sollten die Einkettenantikörper ubiquitär in der Pflanze in verschiedenen Kompartimenten der Pflanzenzelle exprimiert und akkumuliert werden. Durch Erzeugung artifizierender „sinks“ mittels Expression der Quinmerac-Einkettenantikörper in verschiedenen Kompartimenten sollte das theoretisch so gebundene Quinmerac in diesen angereichert und somit vom Wirkort ferngehalten werden beziehungsweise durch Bindung an das Antikörperfragment inaktiviert werden. Unter Verwendung entsprechender Signal- und Retentionssignalsequenzen konnte die Expression und Akkumulation der scFv in verschiedenen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle erfolgen (Conrad & Fiedler, 1998; Chesnut et al., 1996).

4.4.1 Konstruktion ubiquitärer Expressionskassetten

Für die ubiquitäre, in der gesamten Pflanze erfolgende Expression der Anti-Quin-scFv musste das scFv-Gen unter die Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors gebracht werden (Harpster et al., 1988; Odell et al., 1985; Benfey & Chua, 1990). Der für diese Zwecke verwendete Promotor ist der CaMV35 S-Promotor (Franck et al., 1980; Benfey et al., 1989), der stromaufwärts von der scFv-Gensequenz kloniert wurde. Für die Akkumulation der Anti-Quin-scFv auf subzellulärer Ebene in verschiedenen Kompartimenten mussten zusätzliche spezifische Signal- und Retentionssequenzen mit der Sequenz der scFv-Gene fusioniert werden (Chesnut et al., 1996; Conrad & Fiedler, 1998).

4.4.2 Konstrukte für die ubiquitäre Expression mit Einschleusung in den sekretorischen Weg und Retention im ER

Für die ubiquitäre Expression mit Einschleusung in den sekretorischen Weg und Retention im ER wurden die Anti-Quin-scFv unter die Kontrolle des CaMV 35S-Promotors gestellt. Um die Einschleusung der exprimierten scFv in das ER der pflanzlichen Zelle zu erreichen, wurde das scFv-Gen im N-terminalen Bereich mit der Gensequenz des Legumin-B4-Signalpeptides aus *Vicia faba* fusioniert (Bäumlein et al., 1986; Bednarek & Raikhel, 1992). Die verwendete N-terminale Proteinsequenz vermittelt dabei den Eintritt des scFv-Einkettenantikörpers (cotranslational) in das ER und wird nach erfolgtem Membrandurchtritt proteolytisch abgespalten. Die nachfolgende Retention der Antikörperproteine im ER erfolgte durch Fusion mit der Sequenz des Tetrapeptides KDEL im C-terminalen Bereich des scFv-

Gens. Dabei vermittelt die KDEL-Sequenz die Akkumulation bzw. das Zurückhalten der scFv-Proteine im ER und führt zu dessen Anreicherung (Bildung artifizierender „sinks“, *Munro & Pelham, 1987; Pelham, 1990; Bednarek & Raikhel, 1992; Wandelt et al., 1992, Pelham, 1996; Pagny et al., 1999*). Die schematische Darstellung der für die ubiquitäre Expression der Anti-Quin-scFv in der Pflanze mit Retention im ER verwendeten Expressionskassetten ist in Abbildung 21 dargestellt.

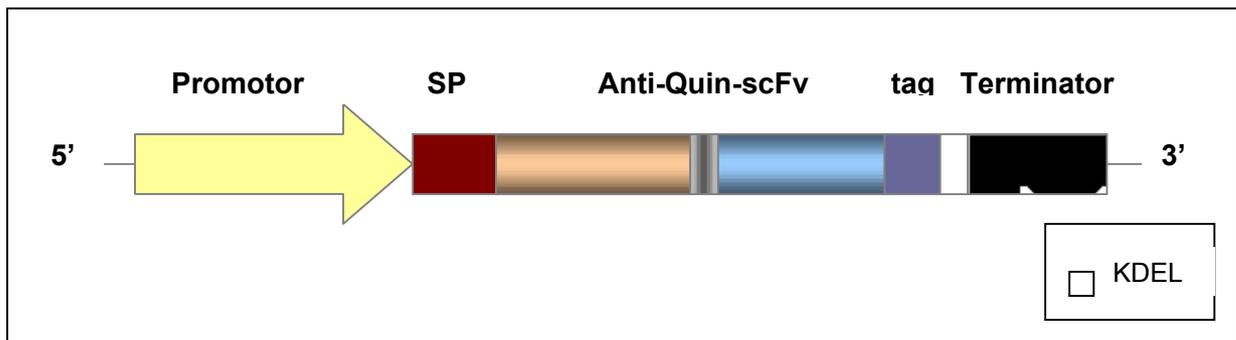


Abb.21: Schematische Darstellung der für die ubiquitäre Expression der Anti-Quin-Einkettenantikörper mit anschließender Retention im ER verwendeten chimären Genkonstrukte pERB11 und pERH12. **Promotor:** CaMV 35S-Promotor; **SP:** Legumin B4-Signalpeptidsequenz; **Anti-Quin-scFv:** scFv-Sequenz der Klone pIT B11 und H12; **tag:** c-myc-tag Sequenz aus pIT; **Terminator:** CaMV 35S-Terminatorsequenz; **KDEL:** Tetrapeptidsequenz KDEL (ER-Retentionssequenz)

Der Plasmidvektor pRTRA 7/3 (Abbildung 22), der von dem Plasmid pRT103 abstammt (*Töpfer et al., 1987*), bildete den Ausgangspunkt der Klonierung und Konstruktion der verwendeten Pflanzenexpressionskassetten. Dieser enthält den konstitutiven CaMV 35S-Promotor, die Leguminsignalpeptidsequenz (*Bäumlein et al., 1986; Bednarek & Raikhel, 1992*), den c-myc-tag, die KDEL-Retentionssequenz, das CaMV 35S-Polyadenylierungssignal (*Gardner et al., 1981*) sowie einen Ampicillin-Resistenzmarker. Der Vektor wurde mittels der Restriktionsendonuklease BamHI gespalten und das erhaltene 3400 bp Plamidfragment nachfolgend dephosphoryliert. In diesen vorbereiteten Vektor sollte das Einkettenantikörpergen-Insert als BamHI-Fragment kloniert werden. In den erhaltenen Vektoren pER B11 und H12 steht die Expression der scFv-Gene somit unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors. Terminiert wird die kodierende Antikörpersequenz durch die c-myc-tag Sequenz, die KDEL-Sequenz, ein Translationsstoppsignal und das Polyadenylierungssignal. Die Einkettenantikörpergene wurden mittels PCR-Technik aus den jeweiligen bakteriellen Plamidvektoren der Klone B11 und H12 als scFv-c-myc-tag Fusionsgene unter Verwendung der spezifischen PCR-Oligonukleotide FORTOM1 und BACKLEG TOM amplifiziert (siehe Abbildung 23). Die PCR-Primer FORTOM 1, welcher im Bereich des c-myc-tags bindet und BACKLEG TOM, der am 3' Ende der scFv-Gensequenz bindet, dienten dabei der Einführung der für die Klonierung notwendigen BamHI-Restriktionsschnittstellen (siehe Abbildung 18/19). Die resultierenden ~800bp Anti-Quin-

scFv-c-myc-tag Genfragmente wurden anschließend in das dephosphorylierte 3400 bp Vektorfragment kloniert.

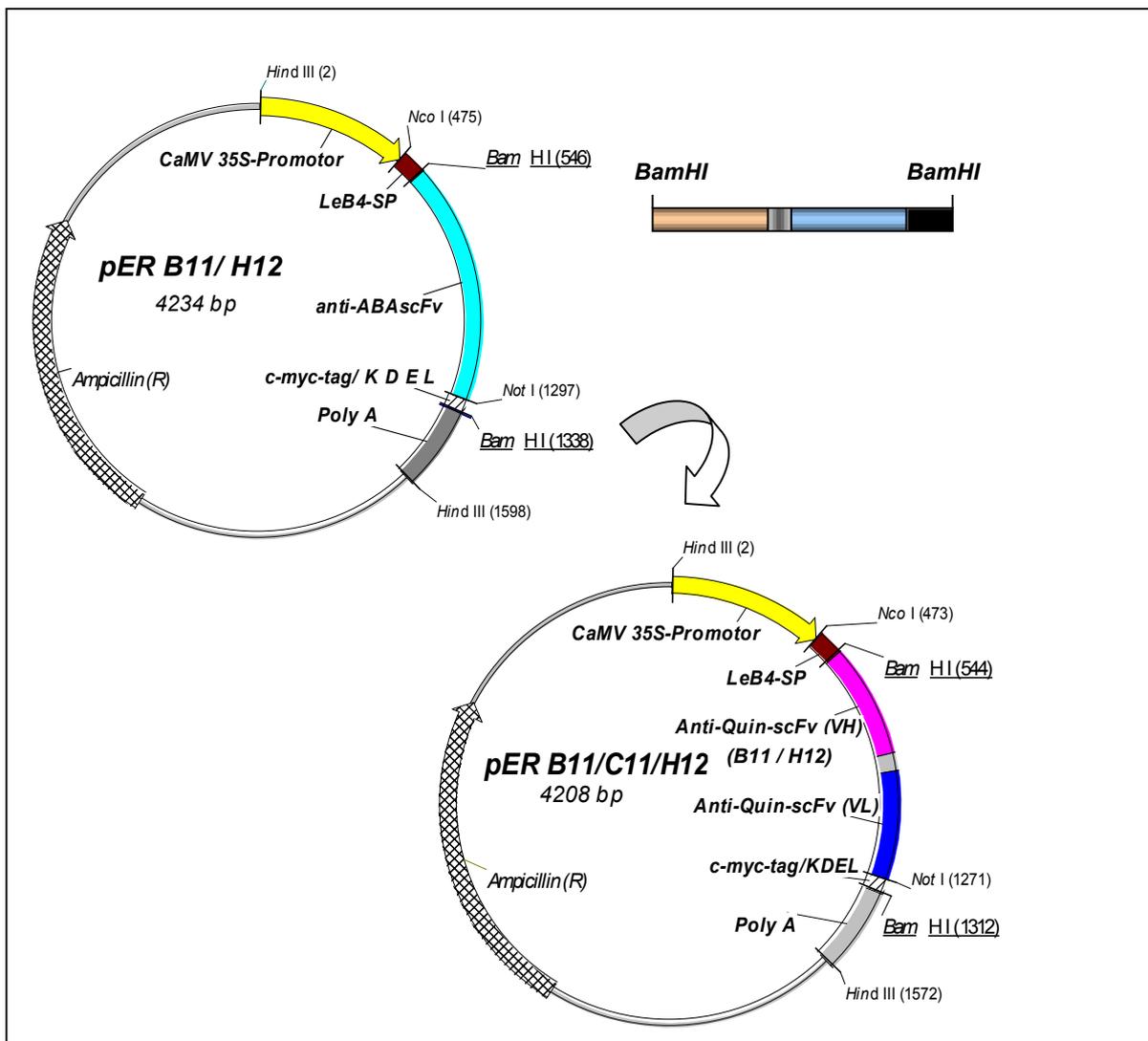


Abb.22: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Konstruktion der Expressionskassetten für die ubiquitäre Expression der Anti-Quinmerac scFv B11 und H12 mit Retention im endoplasmatischen Retikulum.

Die korrekte Insertion der Anti-Quin-scFv wurde durch anschließende Restriktionsanalyse und abschließende Sequenzierung der erhaltenen Vektoren pER B11 und pER H12 (Abbildung 22) unter Verwendung der spezifischen fluoreszenzmarkierten Sequenzprimer M13 uni, der im Bereich des Terminators bindet, 35-S, der im Bereich des CaMV 35S-Promotors bindet, LeB73, der im Bereich des LeB4-Signalpeptides bindet und Tag 73, der im Bereich des c-myc-tag bindet, überprüft. Zur Erzeugung der verwendeten Pflanzenexpressionskassetten wurden aus den konstruierten Plasmidvektoren pER B11 und pER H12 die jeweiligen Expressionskassetten als ~1500bp HindIII-Fragmente isoliert und nachfolgend in den für die Transformation des Agrobakterien-Stammes pGV 2260 in C58C1 (Deblaere et al., 1985) verwendeten Binärvektor pBIN19 kloniert (Bevan et al., 1984; Frisch et al., 1995). Die erhaltenen Konstrukte pBIN B11 und pBIN H12 bildeten die Grundlage für

den durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer in Tabakpflanzen zur Erzeugung der transgenen Pflanzenlinien B11 und H12.

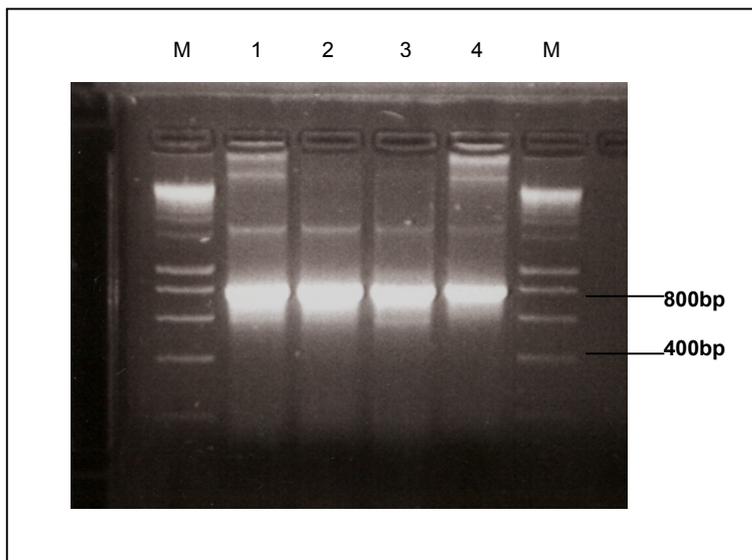


Abb.23: Amplifikation der ~800bp-scFv-Fragmente aus den pIT-Vektoren B11 und H12 mit Hilfe der PCR-Methode. Gezeigt sind die unter Verwendung von spezifischen Primern (siehe..) aus den pIT-Vektoren B11 und H12 amplifizierten scFv-Fragmente B11 und H12. Spur M: Marker; Spur 1: H12; Spur 2: B11; Spur 3: C11 und Spur 4: C6

4.4.3 Konstrukte für die ubiquitäre zytosolische Expression

Für die ubiquitäre zytosolische Expression wurden die erhaltenen Anti-Quin-scFv unter die Kontrolle des CaMV 35S-Promotors gestellt. Um eine Expression und Akkumulation der Anti-Quin-Einkettenantikörper im Zytosol der Pflanzenzelle zu erreichen, wurde im Gegensatz zur Translokation in den sekretorischen Weg auf die Verwendung von Signalpeptidsequenzen (LeB4) im N-terminalen Bereich der scFv verzichtet. Zur Erhöhung der Expression und zur Stabilisierung der zytosolisch exprimierten scFv wurde das ursprünglich für die Retention im ER verwendete KDEL-Tetrapeptid im C-terminalen Bereich der Quinmerac-Einkettenantikörper fusioniert (Schouten *et. al.*, 1996, 1997). Die schematische Darstellung der für die ubiquitäre zytosolische Expression der Anti-Quin-scFv in Tabakpflanzen verwendeten Expressionskassetten ist in Abbildung 24 zu sehen.

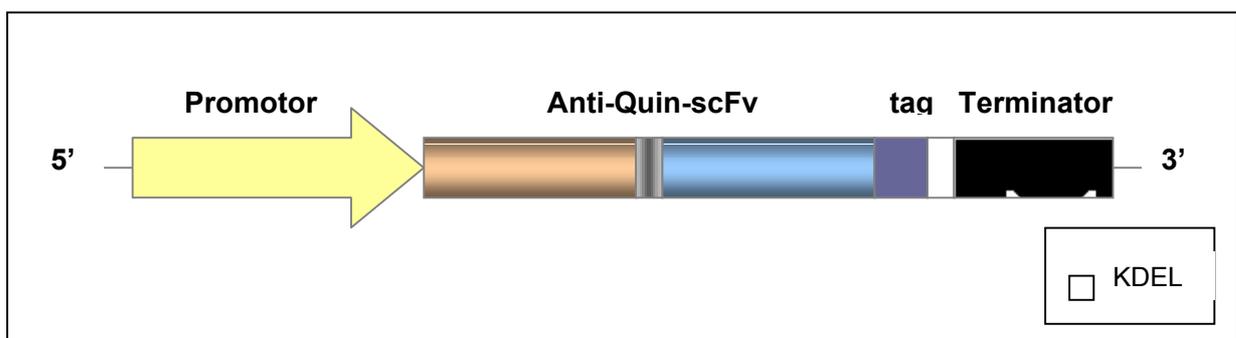


Abb.24: Schematische Darstellung der für die ubiquitäre zytosolische Expression der Anti-Quin-Einkettenantikörper verwendeten chimären Genkonstrukte pCyto B11 und pCyto H12. Promotor: CaMV 35S-Promotor; Anti-Quin-scFv: scFv-Sequenz der Klonen pIT B11 und H12; tag: c-myc-tag Sequenz aus pIT, Terminator: CaMV 35S-Terminatorsequenz; KDEL: Tetrapeptidsequenz KDEL (ER-Retentionsignalsequenz)

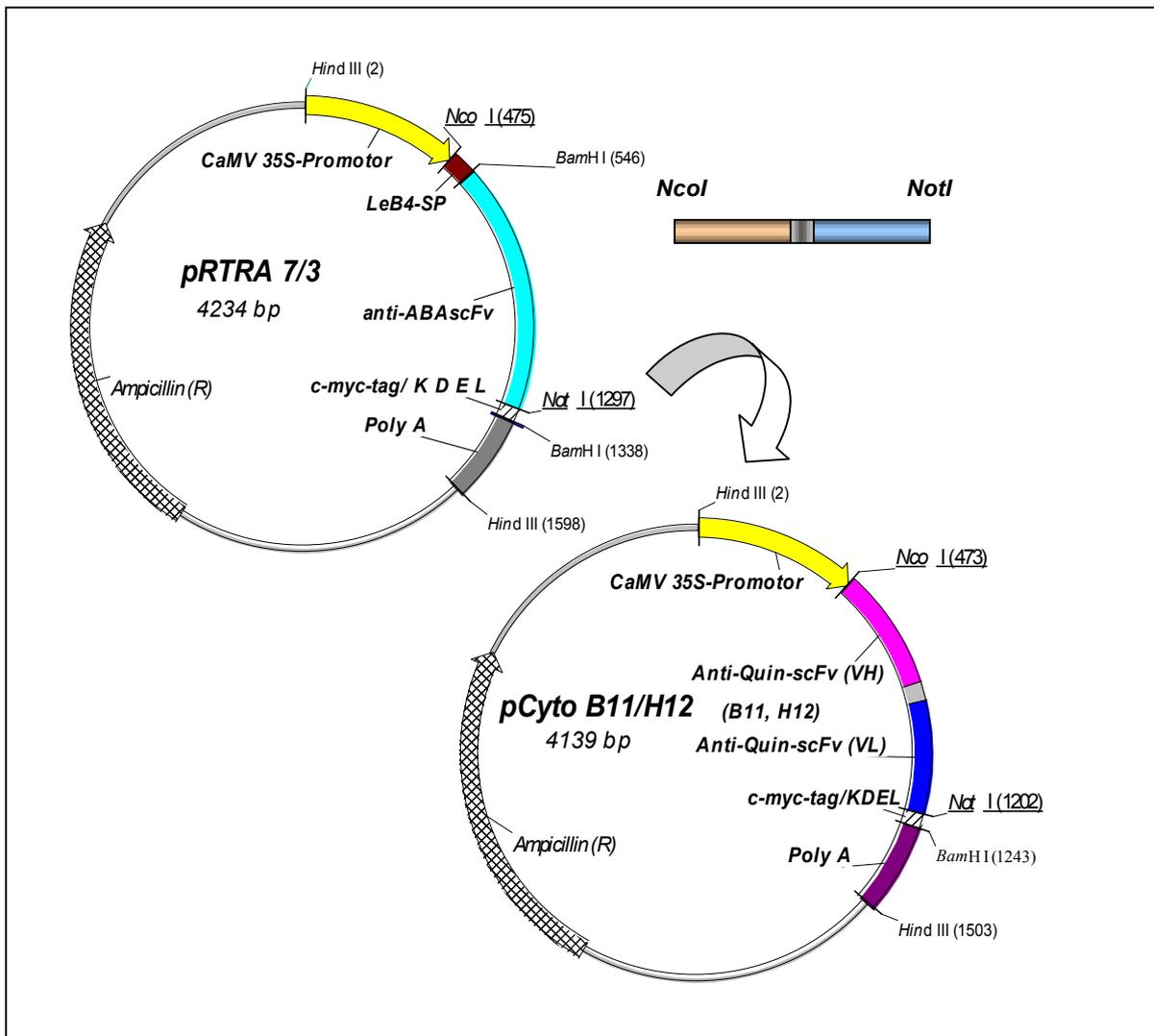


Abb.25: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Konstruktion der Expressionskassetten für die ubiquitäre zytosolische Expression der Anti-Quinmerac scFv B11 und H12.

Die Grundlage für die Konstruktion der verwendeten Expressionskassetten bildete der Vektor pRTRA 7/3 (Abbildung 25). Nach Spaltung des Vektors mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen NcoI und NotI in zwei Fragmente mit einer Größe von 800bp und 3400bp, wurde letzteres als Vektorfragment für die Klonierung der scFv-Inserts verwendet. Für die Klonierung wurden aus den Plasmidvektoren pIT B11 und pIT H12 die Anti-Quin-scFv-Gene als NcoI/NotI-Fragmente isoliert. Anschließend wurde das 3400bp pRTRA 7/3 Vektorfragment mit jeweils einem der 700bp großen Anti-Quin-scFv-Fragmente ligiert und die erhaltenen Vektoren pCyto B11 und pCyto H12 (Abbildung 25) mittels Restriktionsanalyse auf die korrekte Insertion der scFv-Fragmente überprüft. Aus den neu konstruierten Vektoren pCyto B11 und pCyto H12 wurden die Expressionskassetten als 1600bp große HindIII-Fragmente isoliert und in den Binärvektor pBIN 19 kloniert (Bevan et al., 1984; Frisch et al., 1995). Die daraus resultierenden chimären Genkonstrukte pBINcyto B11 und pBINcyto H12 waren nach Transformation in den *Agrobacterium tumefaciens*

Stamm (pGV 2260 in C58C1, *Deblaere et al., 1985*) die Grundlage für den durch den *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer in *Nicotiana tabacum* zur Erzeugung der Pflanzenlinien Cyto B11 und Cyto H12.

4.4.4 Konstrukte für die ubiquitäre Expression mit Retention in der Plasmamembran

Für die ubiquitäre Expression mit Akkumulation in der Plasmamembran wurden die erhaltenen Anti-Quin-scFv wiederum unter die Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S-Promotors gestellt. Die Einschleusung der exprimierten scFv in den sekretorischen Weg der pflanzlichen Zelle erfolgte wie schon bei der ubiquitären Expression mit Retention im ER, durch Fusion der Gensequenz des Legumin-B4-Signalpeptides aus *Vicia faba* (*Bäumlein et al., 1986; Bednarek et. al., 1992*) im N-terminalen Bereich des scFv-Gens. Die Verankerung in der Plasmamembran der in den sekretorischen Weg eingeschleusten scFv-Antikörperproteine wurde durch Fusion einer Transmembrandomäne im C-terminalen Bereich der scFv-Gens erreicht. Die Transmembrandomäne bewirkt dabei die Verankerung der im sekretorischen Weg befindlichen scFv in der Plasmamembran der Pflanzenzelle und ermöglicht so eine Akkumulation der Einkettenantikörper in diesem subzellulären Kompartiment. Der schematische Aufbau der Expressionskassetten für die ubiquitäre Expression der Anti-Quin-scFv mit Retention in der Plasmamembran ist in Abbildung 26 dargestellt.

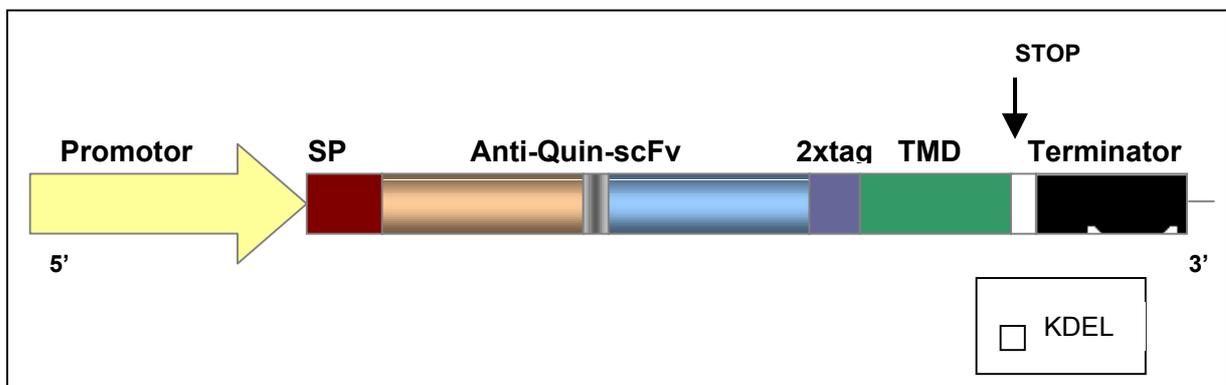


Abb.26: Schematische Darstellung der für die ubiquitäre Expression der Anti-Quin-Einkettenantikörper mit anschließender Retention in der Plasmamembran verwendeten chimären Genkonstrukte pTMD B11 und pTMD H12. **Promotor:** CaMV 35S-Promotor; **SP:** Legumin B4-Signalpeptidsequenz; **Anti-Quin-scFv:** scFv-Sequenz der Klone pIT B11 und H12; **2x tag:** c-myc-tag Sequenz; 2x hintereinander kloniert; **TMD:** Sequenz der Transmembrandomäne, **Terminator:** CaMV 35S-Terminatorsequenz; **KDEL:** Tetrapeptidsequenz KDEL (ER-Retentionsignalsequenz)

Die Grundlage für die Konstruktion der Expressionskassetten für eine ubiquitäre Expression der Anti-Quin-scFv mit anschließender Retention in der Plasmamembran stellten die Plasmidvektoren pRT-A-Hook und die neu konstruierten Vektoren pER B11 und pER H12

dar. Der Vektor pRT-A-Hook ist ein Abkömmling des Plasmidvektors pRTRA 7/3 und enthält das Anti-ABA-scFv-Gen, das im C-terminalen Bereich mit einer Transmembrandomäne fusioniert ist (Abbildung 27). Diese wurde aus dem Vektor pHook-1 (Chesnut et al., 1996) isoliert und ist ursprünglich die Transmembrandomäne eines Blutplättchenwachstumsfaktor-Rezeptors beim Menschen (PDGFR, Gronwald et al., 1988).

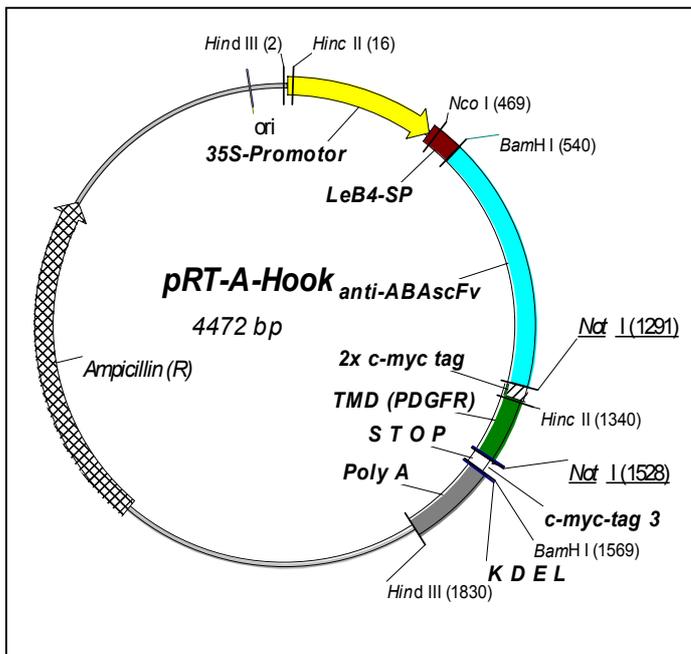


Abb.27: Schematische Darstellung des Vektors pRT-A-Hook. Der Plasmidvektor bildete die Grundlage für die Isolierung der im Zuge der Klonierung der Expressionskassetten für die ubiquitäre Expression der Antikörperproteine mit Retention in der Plasmemembran verwendeten Transmembrandomäne als NotI-Fragment.

Für die Klonierung wurde die Transmembrandomäne durch Spaltung des Vektors pRT-A-Hook mit Hilfe der Restriktionsendonuklease NotI als 237bp großes Fragment isoliert (Abbildung 28). Dieses wurde anschließend in die vorbereiteten mit NotI gespaltenen, linearisierten und anschließend dephosphorylierten Vektoren pER B11 und pER H12 ligiert. Die korrekte Insertion der Transmembrandomäne wurde durch Restriktionsanalyse überprüft. Aus den neu entstandenen Vektoren pTMD B11 und pTMD H12 (siehe Abbildung 28) wurden die Expressionskassetten als 1600bp große HindIII-Fragmente isoliert und in den Binärvektor pBIN 19 (Bevan et al., 1984; Frisch et al., 1995) kloniert. Die erhaltenen Vektoren pBIN TMD B11 und pBIN TMD H12 wurden anschließend in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm pGV 2260 in C58C1 (Deblaere et al., 1985) transformiert. Diese bildeten die Grundlage für den mittels *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer in Tabakpflanzen und zur Herstellung der transgenen Pflanzenlinien TMD B11 und TMD H12.

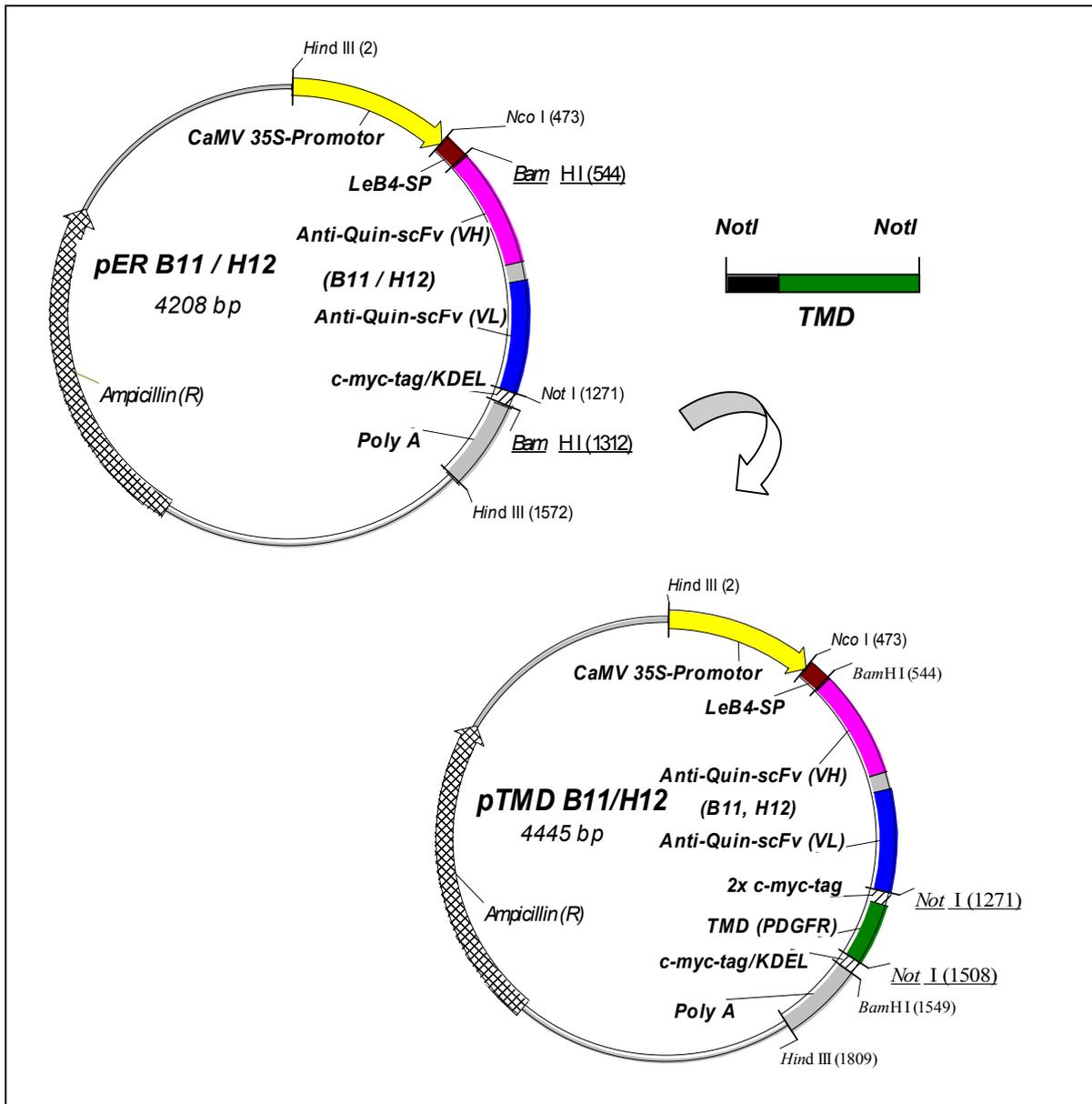


Abb.28: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Konstruktion der Expressionskassetten für die ubiquitäre Expression der der Anti-Quinmerac scFv B11 und H12 mit Retention der scFv-Antikörperproteine in der Plasmamembran.

4.5 Erzeugung stabil transformierter Tabakpflanzen durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, stabil transformierte Tabakpflanzenlinien zu regenerieren, die das Anti-Quin-scFv in verschiedenen Kompartimenten der Pflanzenzelle exprimieren um dadurch Toleranz gegenüber dem verwendeten Herbizid Quinmerac zu erzeugen/ vermitteln. Dafür wurden die in den Abbildungen 21, 23 und 25 dargestellten Expressionskassetten als HindIII-DNA-Fragmente in den Binävektor pBIN 19 kloniert (Bevan

et. al., 1984; Frisch et. al., 1995). Der Vektor pBIN 19 wurde speziell für den Gentransfer ins Pflanzengenom entwickelt und enthält Gensequenzen (nicht-onkogene T-DNA), die für eine Insertion der Fremd-DNA in das Genom der Pflanzenzelle notwendig sind sowie Gensequenzen für die Nopalinsynthase und für die Neomycin-Phosphotransferase II (NptII), die unter der Kontrolle des Nopalinsynthasepromotors und –Terminators stehen. Die NptII wird in diesem System als selektiver Marker durch Vermittlung von Resistenz gegenüber Kanamycin in stabil transformierten Tabakpflanzen verwendet. Die in den Binävektor integrierten Expressionskassetten pBIN B11/ H12/ cyto B11/ cyto H12/ TMD B11 und TMD H12 wurden durch Elektroporation (Mersereau et. al., 1990) in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm C58C1 (pGV 2260, Deblaere et al., 1985) transformiert.

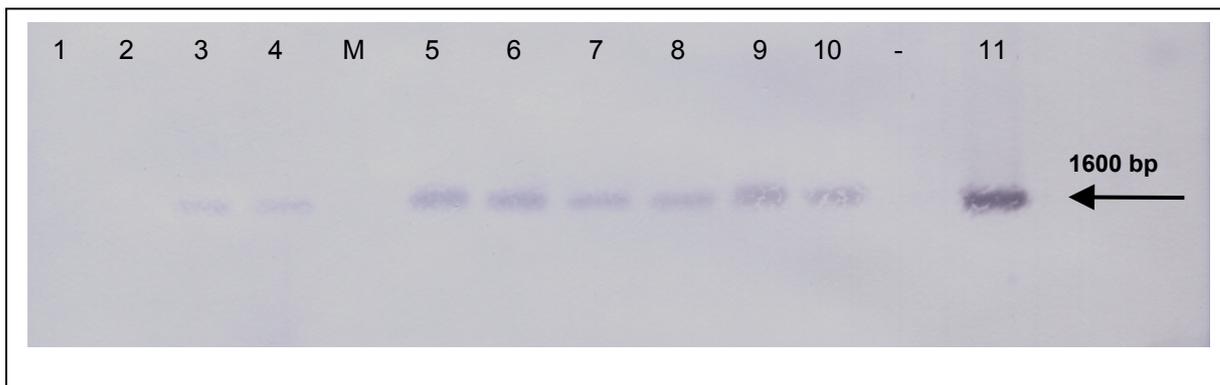


Abb.29: Nachweis des Anti-Quinmerac scFv-Gens ER B11 und ER H12 in transformierten individuellen *Agrobacterium tumefaciens* Klonen mit Hilfe von „Southern-Blot“-Analysen. Die isolierte *Agrobacterium* Plasmid-DNA wurde mit HindIII gespalten (Vergleich 3.6.) und in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die aufgetrennte DNA mittels „Southern-Blot“ auf Nitrozellulose fixiert und mit einem Digoxigenin markierten Anti-Quin scFv B11 DNA-Fragment hybridisiert. Der Nachweis der hybridisierten Sonde erfolgte immunologisch unter Verwendung des „DIG DNA Labeling and Detection Kit“. Spur 1 und 2: Negativkontrolle Plasmid-DNA pBin 19 (HindIII gespalten); Spur 3 und 4: Positivkontrolle Plasmid-DNA pBin ER B11 und pBin ER H12 (HindIII gespalten); Spur M: Marker (DNA Standard); Spur 5, 6 und 7: *Agrobacterium*-DNA Klone ER B11(60/1-2); Spur 8, 9 und 10: *Agrobacterium*-DNA Klone ER H12 (90/1-2); Spur 11: Positivkontrolle Plasmid-DNA pBin ER H12 (HindIII gespalten)

Rekombinante *Agrobacterium*klone, die die konstruierten binären Plasmide enthielten, wurden durch nichtradioaktive Southernhybridisierung selektiert (siehe Abbildung 29/30). Die mit Hilfe dieser Methode isolierten positiven *Agrobacterium*klone bildeten die Grundlage für den durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer in *Nicotiana tabacum* zur Erzeugung der transgenen Pflanzenlinien ER B11; ER H12; Cyto B11; Cyto H12; TMD B11 und TMD H12 (siehe 3.7). In Abhängigkeit vom jeweilig verwendeten Konstrukt wurden ~50-250 transformierte kanamycinresistente Tabakpflanzen *in vitro* regeneriert und im Gewächshaus kultiviert (siehe Tabelle 3-8). Die Expression der Anti-Quin-scFv Einkettenantikörper in verschiedenen Kompartimenten der Pflanzenzelle wurde durch „Western-Blot“-Analysen der regenerierten transgenen Tabakpflanzen überprüft.

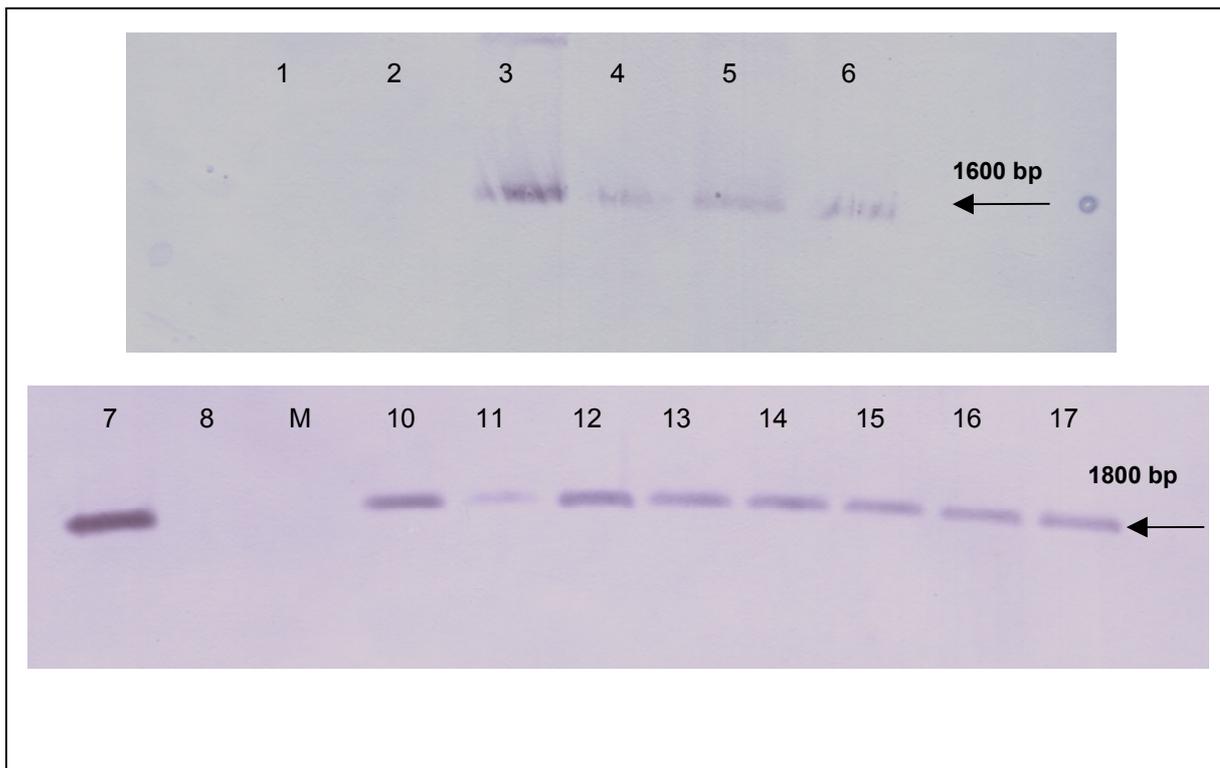


Abb.30: Nachweis des Anti-Quinmerac scFv-Gens Cyto B11; Cyto H12; TMD B11 und TMD H12 in transformierten individuellen *Agrobacterium tumefaciens* Klonen mit Hilfe von „Southern-Blot“-Analysen. Die isolierte Agrobakterien Plasmid-DNA wurde mit HindIII gespalten (Vergleich 3.6.) und in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die aufgetrennte DNA mittels „Southern-Blot“ auf Nitrozellulose fixiert und mit einem Digoxigenin markierten Anti-Quin scFv B11 DNA-Fragment hybridisiert. Der Nachweis der hybridisierten Sonde erfolgte immunologisch unter Verwendung des „DIG DNA Labeling and Detection Kit“. Spur 1 und 2: Negativkontrolle Plasmid-DNA pBin 19 (HindIII gespalten); Spur 3 und 4: Agrobakterien-DNA Klone Cyto B11 (1-2); Spur 5 und 6: Agrobakterien-DNA Klone Cyto H12 (1-2); Spur 7: Positivkontrolle Plasmid-DNA pBin TMD H12 (HindIII gespalten); Spur 8: Negativkontrolle Plasmid-DNA pBin 19 (HindIII gespalten); Spur 10-13: Agrobakterien-DNA Klone TMD B11 (41/1-4); Spur 14-17: Agrobakterien-DNA Klone TMD H12 (44/1-4).

4.6 Analyse der transgenen Tabakpflanzen mit den chimären Genkonstrukten für die ubiquitäre Expression der Anti-Quin-scFv

Die in Abschnitt 4.4 beschriebenen und durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer in das Pflanzengenom integrierten Expressionskassetten aus pBIN B11/ H12/ cyto B11/ cyto H12/ TMD B11 und TMD H12 ermöglichten die Regeneration der Pflanzenlinien ER B11; ER H12; Cyto B11; Cyto H12; TMD B11 und TMD H12, in denen die Anti-Quin scFv-Antikörperproteine unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors konstitutiv in der gesamten Pflanze in verschiedenen Zellkompartimenten, ER, Zytosol und Plasmamembran exprimiert wurden. Die regenerierten transgenen Pflanzen wurden hinsichtlich der Expression und Funktionalität der produzierten Anti-Quin-scFv-Proteine untersucht. Dazu wurden SDS-Proteinextrakte aus Blattmaterial der verschiedenen Pflanzen hergestellt und im „Western-Blot“ analysiert. Nach Bestimmung der Gesamtkonzentration an

löslichem Protein in den Blattextrakten mittels Bradford-Test wurde eine vergleichbare Menge an gesamtlöslichem Protein in SDS-PAA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet (Vergleich 3.10). Der in den Expressionskassetten im C-terminalen Bereich des scFv-Gens enthaltene c-myc-tag (Munroe & Pelham, 1986) erlaubt den immunologische Nachweis des in der transgenen Pflanze exprimierten scFv-Einkettenantikörper im „Western-Blot“ unter Verwendung des spezifischen monoklonalen Anti-c-myc-Antikörpers 9E10, einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG~POD-Konjugat und dem ECL-Kit-System. Die semiquantitative Bestimmung der exprimierten scFv-Antikörpermengen ($\mu\text{g}_{\text{scFv}}/\mu\text{l}_{\text{Extrakt}}$) erfolgte durch Vergleich der auf Röntgenfilm erhaltenen Signalstärken definierter Standard scFv-Mengen mit den erhaltenen Signalstärken der scFv in den Blattproteinextrakten. Der scFv-Gehalt wurde anschließend, unter Berücksichtigung des im SDS-PAA-Gel aufgetragenen Volumens, in Bezug auf die Menge an Gesamtprotein berechnet ($\%_{\text{scFv}}/\text{GLP}$).

4.6.1 Phänotypische Erscheinung der transgenen Pflanzen

Zur Analyse der regenerierten transgenen Anti-Quin-scFv exprimierenden Pflanzen gehörte auch eine Untersuchung des phänotypischen Erscheinungsbildes der transgenen Tabakpflanzen im direkten Vergleich mit Wildtyp-Tabakpflanzen.

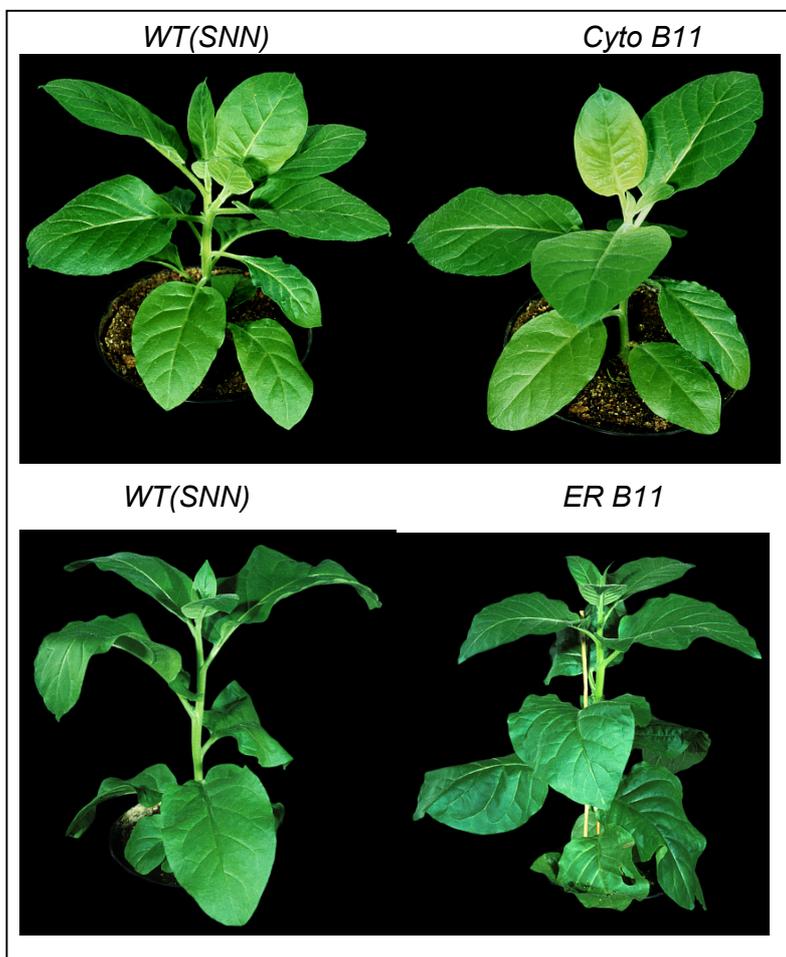


Abb.31: Vergleich des Phänotyps von *in vitro* regenerierten Kontrollpflanzen Tabak-Wildtyp (SNN) mit *in vitro* regenerierten, transgenen und auf Expression des Anti-Quinmerac scFv getesteten Tabakpflanzen am Beispiel der Linien Cyto B11 und ER B11.

Dabei sollte festgestellt werden ob durch Expression des Einkettenantikörpers in verschiedenen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle sichtbare phänotypische Unterschiede auftreten. Keine der regenerierten und untersuchten transgenen Tabakpflanzenlinien (ER B11, ER H12, Cyto B11, Cyto H12, TMD B11 und TMD H12) zeigte im Vergleich mit Wildtyp-Tabakpflanzen auffallende phänotypische Merkmalsunterschiede beziehungsweise negative Einflüsse auf das Wachstum, die Entwicklung der Pflanze oder die äußere Morphologie. In Abbildung 31 ist anhand von ausgewählten Tabakpflanzen der Linien ER B11 und Cyto B11 der direkte Vergleich des Phänotyps der transgenen Tabakpflanzen mit Kontrollpflanzen Tabak-Wildtyp (SNN) gezeigt.

4.6.2 Analyse der Anti-Quin-scFv Expression in den transgenen Tabakpflanzenlinien ER B11 und ER H12

Die mit den Konstrukten pBIN B11 und H12 für die ubiquitäre Expression der Anti-Quin-scFv mit Retention im endoplasmatischen Retikulum transformierten und erhaltenen regenerierten Pflanzen (siehe 4.4.2) wurden hinsichtlich ihrer scFv-Proteinexpression untersucht. Dazu wurden aus jungen Blättern Proteinextrakte hergestellt (Vergleich 3.9). Insgesamt wurden 225 Pflanzen für das Konstrukt ER B11 und 176 Pflanzen für das Konstrukt ER H12 regeneriert und auf die Expression des scFv-Antikörperprotein überprüft. Die Anzahl der je Konstrukt regenerierten Pflanzen sowie der Anti-Quin-scFv exprimierenden Pflanzen, das durchschnittliche Expressionsniveau im Blattgewebe der analysierten Pflanzen und die detailliertere Verteilung des Expressionsniveaus der regenerierten Pflanzen sind in Tabelle 3/4 dargestellt.

Tab.3: Ergebnisse der Expressionsanalyse der regenerierten und untersuchten transgenen Pflanzenlinien ER B11 und ER H12 mit ubiquitärer Expression und Retention im ER der Anti-Quin-Einkettenantikörper. Gezeigt ist die Anzahl der regenerierten Pflanzen sowie die Anzahl der im „Western-Blot“ nachweislich scFv-Antikörperprotein exprimierenden Pflanzen und das entsprechende Expressionsniveau im Blatt (Minimal/ Maximal-Werte) der analysierten Pflanzen.

Genkonstrukt	Anzahl der regenerierten kan ^f Pflanzen (TG ₀ -Generation)	Anzahl der regenerierten Pflanzen mit nachweisbarer scFv-Antikörperprotein-expression	Expressions-Niveau (% _{scFv} /GLP)		Mittel
			Min.	Max.	
ER B11	225	144	0,05	2	0,5
ER H12	176	103	0,05	2	0,65

Tab.4: Verteilung des Expressionsniveaus der transgenen Pflanzenlinien ER B11 und ER H12 mit ubiquitärer Expression und Retention der Anti-Quin-scFv im endoplasmatischen Retikulum. Gezeigt ist die Anzahl und Verteilung der Tabakpflanzen mit dem entsprechenden, mit Hilfe der „Western-Blot“-Analyse semiquantitativ bestimmten Expressionsniveau im Blattgewebe.

Genkonstrukt	Σ -scFv-exprimierender Tabakpflanzen	Expressionsniveau (% _{scFv} /GLP)			
		< 0,05	0,05-0,1	0,1-0,5	0,5-2
ER B11	144	23	36	64	21
ER H12	103	4	3	56	40

Der Nachweis des exprimierten scFv-Antikörperfragmentes mit Hilfe des Anti-c-myc-Antikörpers 9E10 erfolgte im Blattgewebe aller Pflanzen der Pflanzenserien ER B11 und ER H12. Die ermittelten scFv-Expressionshöhen bezogen sich dabei auf das gesamtlösliche Protein in den hergestellten Blattextrakten (%_{scFv}/GLP) der Pflanzenlinien ER B11 und ER H12. Diese lagen durchschnittlich bei 0,5%_{scFv}/GLP für die getesteten ER B11-Tabakpflanzenlinien und maximal bei 2%/GLP. Für die Pflanzen der Linie H12 lag das durchschnittliche Expressionsniveau im Bereich von 0,65%_{scFv}/GLP und maximal bei 2%_{scFv}/GLP.

4.6.3 Analyse der Anti-Quin-scFv Expression in den transgenen Tabakpflanzenlinien Cyto B11 und Cyto H12

Wie zuvor für die transgenen Tabakpflanzen mit ubiquitärer Expression und Retention der Anti-Quin-scFv-Antikörperfragmente im endoplasmatischen Retikulum ausführlich beschrieben, wurde auch von den regenerierten Tabakpflanzen, die mit den Konstrukten Cyto B11 und Cyto H12 für die zytosolische Expression der Einkettenantikörper transformiert wurden sind, Blattgewebe entnommen und für die Herstellung von Proteinextrakten zur Bestimmung der scFv-Expressionshöhen verwendet.

Tab.5: Ergebnisse der Expressionsanalyse der regenerierten und untersuchten transgenen Pflanzenlinien Cyto B11 und Cyto H12 mit ubiquitärer zytosolischer Expression der Anti-Quin-Einkettenantikörper. Gezeigt ist die Anzahl der regenerierten Pflanzen sowie die Anzahl der im „Western-Blot“ nachweislich scFv-Antikörperprotein exprimierenden Pflanzen und das entsprechende Expressionsniveau im Blatt (Minimal/Maximal-Werte) der analysierten Pflanzen.

Genkonstrukt	Anzahl der regenerierten kan ^r Pflanzen (TG ₀ -Generation)	Anzahl der regenerierten Pflanzen mit nachweisbarer scFv-Antikörperprotein-Expression	Min.	Expressions-Niveau (% _{scFv} /GLP)	
				Max.	Mittel
Cyto B11	100	45	0,02	0,15	0,09
Cyto H12	94	57	0,03	0,2	0,14

Tab.6: Verteilung des Expressionsniveaus der transgenen Pflanzenlinien Cyto B11 und Cyto H12 mit ubiquitärer zytosolischer Expression der Anti-Quin-scFv. Gezeigt ist die Anzahl und Verteilung der Tabakpflanzen mit dem entsprechenden, mit Hilfe der „Western-Blot“-Analyse semiquantitativ bestimmten Expressionsniveau im Blattgewebe.

Genkonstrukt	Σ -scFv-exprimierender Tabakpflanzen	Expressionsniveau (% _{scFv} /GLP)			
		<0,05	0,05-0,1	0,1-0,15	>0,15
Cyto B11	45	16	17	12	-
Cyto H12	57	3	7	47	-

Die tabellarische Zusammenfassung der Anzahl der je Konstrukt regenerierten Pflanzen sowie der Anti-Quin-scFv exprimierenden Pflanzen, die minimale, maximale, und durchschnittliche Expressionshöhe im Blattgewebe der analysierten Pflanzen sowie die Gesamtverteilung des Expressionsniveaus ist in Tabelle 5/6 dargestellt. Das durchschnittliche Expressionsniveau der Anti-Quin-scFv exprimierenden Pflanzen lag für die Linien der Pflanzenserie Cyto B11 bei 0,09%_{scFv}/GLP, mit einem maximalen Wert von 0,15%_{scFv}/GLP. Bei den Pflanzenlinien der Serie Cyto H12 betrug die durchschnittliche Expressionshöhe 0,14%_{scFv}/GLP und maximal 0,2%_{scFv}/GLP. Damit lag das durchschnittliche Expressionsniveau der Pflanzenlinien Cyto B11 und Cyto H12 etwa 5-8fach und das maximale Expressionsniveau 10fach unter dem für die Pflanzenlinien der Serien ER 11 und ER H12 ermittelten durchschnittlichen Expressionshöhen.

4.6.4 Analyse der Anti-Quin-scFv Expression in den transgenen Tabakpflanzenlinien TMD B11 und TMD H12

Wie in den vorherigen Abschnitten erfolgte die Bestimmung des scFv-Expressionsniveaus für die regenerierten Tabakpflanzen, die mit den Genkonstrukten pBIN TMD B11 und pBIN TMD H12 für die ubiquitäre Expression und Retention der Anti-Quin-scFv in der Plasmamembran transformiert wurden, sind mittels der aus Blattgewebe der Tabakpflanzenlinien TMD B11 und TMD H12 hergestellten Proteinextrakte (Vergleich 3.9). Die Bestimmung erfolgte durch „Western-Blot“-Analyse der Blattproteinextrakte. Die Anzahl der regenerierten Pflanzen sowie das entsprechende Expressionsniveau sind in Tabelle 7/8 dargestellt.

Das durchschnittliche Expressionsniveau der Anti-Quin-scFv exprimierenden Pflanzen betrug für die Pflanzenlinien TMD B11 und H12 ~0,02%/GLP. Damit lag das durchschnittliche Expressionsniveau in den Blättern dieser Pflanzenlinien etwa 50fach unter dem für die Pflanzenlinien der Serien ER 11 und ER H12 und 10fach unter dem für die Pflanzenlinien Cyto B11 und H12 ermittelten durchschnittlichen Expressionshöhen im Blattgewebe. Der maximale Gehalt an exprimiertem scFv-Antikörperprotein im Blatt lag bei den getesteten Pflanzenlinien beider Konstrukte bei 0,03%/GLP.

Tab.7: Ergebnisse der Expressionsanalyse der regenerierten und untersuchten transgenen Pflanzenlinien TMD B11 und TMD H12 mit ubiquitärer Expression und Retention der Anti-Quin-Einkettenantikörper in der Plasmamembran. Gezeigt ist die Anzahl der regenerierten Pflanzen sowie die Anzahl der im „Western-Blot“ nachweislich scFv-Antikörperprotein exprimierenden Pflanzen und das entsprechende Expressionsniveau im Blatt (Minimal/Maximal-Werte) der analysierten Pflanzen.

Genkonstrukt	Anzahl der regenerierten kan ^r Pflanzen (TG ₀ -Generation)	Anzahl der regenerierten Pflanzen mit nachweisbarer scFv-Antikörperprotein-expression	Expressions-Niveau (% _{scFv} /GLP)		
			Min.	Max.	Mittel
TMD B11	45	17	0,01	0,03	0,02
TMD H12	53	20	0,01	0,03	0,01

Tab.8: Verteilung des Expressionsniveaus der transgenen Pflanzenlinien TMD B11 und TMD H12 mit ubiquitärer Expression und Retention der Anti-Quin-scFv in der Plasmamembran. Gezeigt ist die Anzahl und Verteilung der Tabakpflanzen mit dem entsprechenden, mit Hilfe der „Western-Blot“-Analyse semiquantitativ bestimmten Expressionsniveau im Blattgewebe.

Genkonstrukt	Σ-scFv-exprimierender Tabakpflanzen	Expressionsniveau (% _{scFv} /GLP)			
		0,01-0,015	0,015-0,02	0,02-0,025	>0,025
TMD B11	17	13	4	-	1
TMD H12	20	18	-	1	1

4.6.5 Expressionsanalyse der Anti-Quinmerac scFv in den Nachkommen transgener Tabakpflanzenlinien

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erzeugung von Toleranz in transgenen Tabakpflanzen gegenüber einem endogen applizierten Herbizid basierend auf den immunmodulierenden Eigenschaften intrazellulär exprimierter spezifisch gegen das Herbizid gerichteter Einkettenantikörper. Hierfür wurden *Nicotiana tabacum* Pflanzen mit den entsprechenden konstruierten Pflanzenexpressionskassetten transformiert und transgene spezifisch scFv exprimierende Pflanzen regeneriert (siehe Abschnitt 4.4-4.5). Diese sollten anschließend in einem geeigneten Testsystem auf ihre Toleranz gegenüber dem Herbizid untersucht werden (siehe Abschnitt 4.8). Im Zuge dieser Arbeit sollte neben der TG₀-Generation auch die Nachkommenschaft verschiedener transgener Pflanzenlinien (F₁ und F₂-Generation) hinsichtlich ihrer Herbizidtoleranz getestet werden. Die im folgenden beschriebenen Experimente dienen daher der Untersuchung der stabilen Weitergabe des Transgens an die nachfolgende Generation, der Prüfung des Expressionsniveaus und der Stabilität der Genexpression in der Nachkommenschaft. Für die Überprüfung und zur Bestimmung der Anzahl der Insertionen des Transgens in das Pflanzengenom bei

ausgesuchten transgenen Pflanzenlinien wurde die Technik der Inversen-PCR anstelle der zumeist verwendeten radioaktiven „Southern-Blot“ Analyse genutzt. Die Expressionanalyse des rekombinanten Antikörperproteins in der Nachkommenschaft verschiedener ausgesuchter Tabakpflanzenlinien wurde mit Hilfe der „Western-Blot“ Technik durchgeführt. Für alle Analysen wurde Blattmaterial junger transgener Pflanzen mit Expression und Retention des Antikörperproteins im ER, der F₁ und F₂-Generation verwendet. Mittels der Methode der inversen PCR wurde die Anzahl der ins Pflanzengenom integrierten Transgenkopien bei ausgesuchten transgenen Pflanzenlinien und in deren Nachkommenschaft bestimmt. Hierbei konnten in Zusammenhang mit parallel durchgeführten Segregationstests (siehe Abbildung 33) einige transgene Pflanzenlinien mit wahrscheinlich nur einer Integration des Transgens (T-DNA) identifiziert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

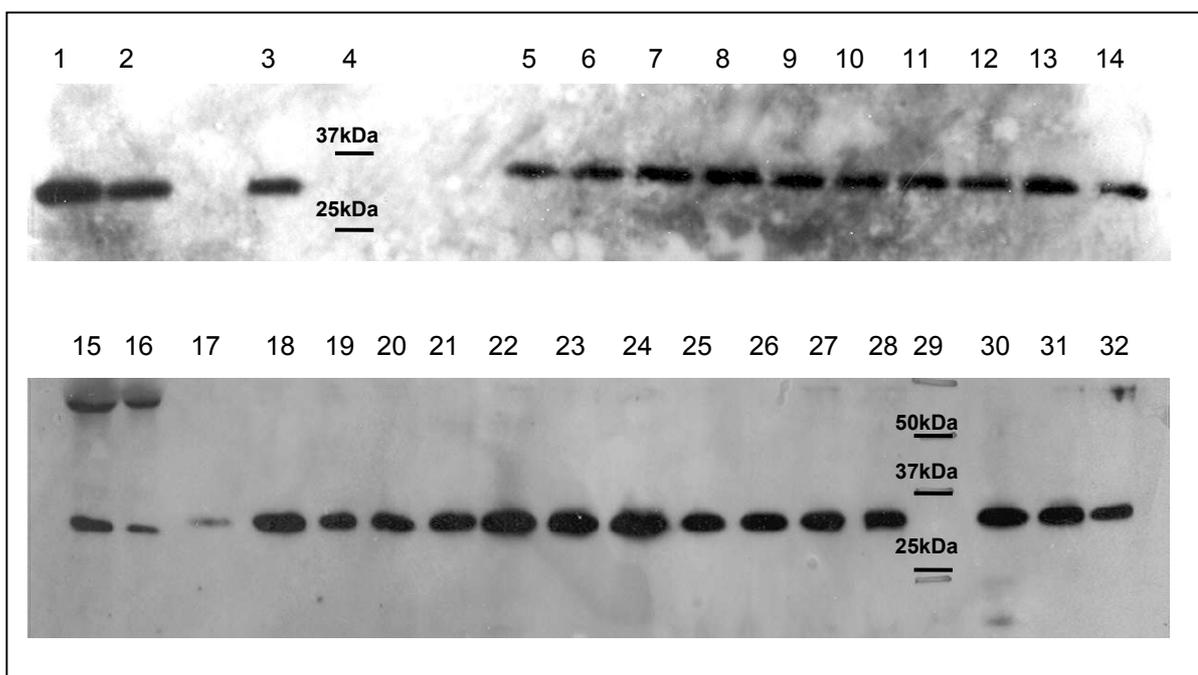


Abb.32: Beispiele für den Nachweis der Expression des scFv-Antikörperproteins (Anti-Quin-scFv) im Blatt nachfolgender Generationen (F₁ und F₂-Generation) anhand der ausgesuchten primären Transformanten (TG₀-Generation) ER B11/A5 und ER H12/D12 mit ubiquitärer Expression und Retention des scFv-Antikörperproteins im endoplasmatischen Retikulum. Es wurden jeweils 20µg GLP aus Blattmaterial in einem 12,5%igem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Der immunologische Nachweis der scFv-Antikörperproteine erfolgte unter Verwendung des Antikörpers 9E10, einem Kaninchen-Anti-Maus-IgG-POD-Konjugat und dem ECL-Kit. Spur 1-3: Proteinstandard (1: 20ng; 2-3: 10ng); Spur 4: Markerprotein; Spur 5-9: ER B11/A5/3,7,11, 13,22; Spur 10-14: ER B11/A5/22/1-5; Spur 15-16, 32: Proteinstandard (15: 10ng; 16: 5ng; 32: 15ng); Spur 17-20: ER H12/D7, D12, D15; D10, D; Spur 21-24: ER H12/D12/1, 4,10, 15; Spur 25-28,30-31: ER H12/D12/1/1-6; Spur 29: Proteinmolekulargewichtsstandard

Im Zusammenhang mit der Etablierung transgener exprimierender Pflanzenlinien wird häufig postuliert, dass die Gewinnung hochexprimierender homozygoter Pflanzen, mit nur einer Kopie des jeweiligen Transgens im Genom, aufgrund verschiedener auftretender störender sekundärer Effekte wie beispielsweise „gene silencing“ von Vorteil wäre (*De Wilde et al., 2002*). Die Etablierung und Verwendung hochexprimierender homozygoter Linien im Zuge der Toleranztestung hätte zudem den Vorteil, dass alle Nachkommen ein ähnliches Expressionsniveau aufwiesen und das auftretende heterogenitätsbedingte Effekte im Bioassay ohne einen hohen Probenumfang (siehe Abschnitt 4.8) minimiert werden könnten. Die Gewinnung bzw. Etablierung einer solchen homozygoten Pflanzenlinie ist sehr zeitintensiv und konnte demzufolge nur im Ansatz und mit einfachen Mitteln durchgeführt werden.

Der Vielzahl verschiedener transgener Pflanzenlinien entsprechend und ohne die Anwendung radioaktiver Nachweismethoden wurden von ausgesuchten transgenen Pflanzen die Segregationsverhältnisse bestimmt. Aufgrund der relativ engen Kopplung des Kanamycinresistenzgens (NPTII) und des scFv-Gens, kann das ermittelte Spaltungsverhältnis auch auf das scFv-Gen übertragen werden (*Fiedler Diss., 1996*). Ein ermitteltes Spaltungsverhältnis von 3:1 (resistenter : sensitiver Pflanzen) würde somit dem Einbau einer Kopie der T-DNA (mit Transgen) in das Tabakgenom entsprechen. Für diese Untersuchungen wurden jeweils 100-150 Tabaksamen der TG₀-Generation und der entsprechenden F₁ und F₂ Generation sowie von Kontrollpflanzen (SNN) auf kanamycinhaltigem MS-Medium ausgelegt (*Fisher et al., 1995*). Nach einer Inkubationszeit von maximal 4 Wochen erfolgte die Auswertung durch Bestimmung der Anzahl kanamycinresistenter (grün) und kanamycinsensitiver (weiß) Pflänzchen. In Abbildung 31 ist dieses Experiment am Beispiel der transgenen Pflanzenlinie ER B11/A5 (Expression des scFv im ER), einer ihrer Nachkommen und einer Kontrollpflanze (SNN) veranschaulicht.

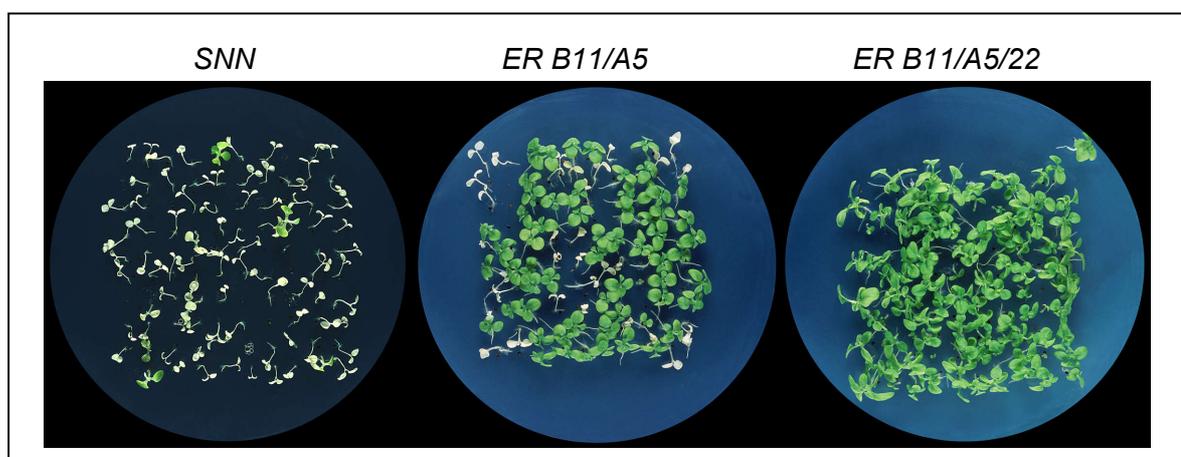


Abb.33: Ermittelte Segregationsverhältnisse am Beispiel der transgenen Tabakpflanzenlinie ER B11/A5 (TG₀-Generation) und ER B11/A5/22 (F₁-Generation) sowie einer Kontrollpflanze (SNN). Reife Tabaksamen vom Wildtyp, der primären Transformante ER B11/A5 und der F₁-Linie ER B11/A5/22 wurden auf MS-Medium ausgelegt.

Mit Hilfe dieser Methode und in Kombination mit der inversen PCR konnten einige Pflanzenlinien identifiziert werden (Ergebnisse nicht gezeigt), die theoretisch jeweils nur eine Kopie der T-DNA in ihrem Genom haben. Die Nachkommenschaft dieser identifizierten Linien müsste zur Etablierung einer homozygoten Tabakpflanzenlinie weiter untersucht werden (beispielsweise durch Rückkreuzungsexperimente), um dann im Testsystem hinsichtlich ihrer Toleranz unter Verwendung eines minimalen Probenumfangs analysiert zu werden.

4.7 Affinitätschromatographische Reinigung des scFv-Proteins aus Blättern

Das Ziel der Arbeit war die Etablierung eines Modellsystems zur Erzeugung von Toleranz transgener Tabakpflanzen gegenüber einem applizierten Herbizid durch Expression spezifischer gegen dieses Herbizid gerichteter scFv-Einkettenantikörper. Dazu wurden wie in Abschnitt 4.4 beschrieben Tabakpflanzen mit konstruierten pflanzlichen Expressionskassetten transformiert und transgene scFv-exprimierende Tabakpflanzen regeneriert.

Zum Nachweis, zur weiteren Charakterisierung und zur funktionellen Analyse der in den Pflanzen exprimierten scFv-Antikörperfragmente sollten diese aus dem Blattmaterial ausgesuchter individueller Tabakpflanzen (transformiert mit einem Konstrukt für die ubiquitäre Expression des scFv-Einkettenantikörpers mit Retention im Endoplasmatischen Retikulum und mit einem Konstrukt für die ubiquitäre zytosolische Expression) isoliert und mittels ELISA auf ihre Antigenbindungsaktivität bzw. -affinität überprüft werden. Die Reinigung des Einkettenantikörpers aus pflanzlichem Material erfolgte hierbei mit Hilfe der Affinitätschromatographie durch spezifische, reversible Absorption der Proteine an einen matrixgebundenen Liganden. Häufig wurde dafür ein an die Säulenmatrix gebundener Anti-c-myc-Antikörper verwendet, mit Hilfe dessen das scFv-Protein über den fusionierten c-myc-tag gebunden wird. Eine weitere Möglichkeit der Reinigung von Antikörpern und Antikörperfragmenten basiert auf der Verwendung matrixgebundener bakterieller Ig-Bindeproteine. Diese werden von vielen Gram-positiven Bakterienarten gebildet und weisen eine hohe Affinität für tierische und menschliche Immunglobulin Moleküle mit unterschiedlichen Bindungsspektra auf. Zu den bekanntesten für die Detektion und Reinigung von Antikörpern verwendeten Immunglobulin, vor allem die schweren Ketten des IgG (Fc-Teil), bindenden bakteriellen Zellwandproteinen gehören Protein A von *Staphylococcus aureus* und Protein G gebildet von Streptokokken aus den Gruppen C und G (Forsgren & Sjöquist, 1966; Reis et al., 1984; Björck & Kronvall, 1984). Zu der Gruppe der bakteriellen Immunglobulin Bindeproteinen gehört auch das von der anaeroben Bakterienart *Peptostreptococcus magnus* gebildete Protein L (Myhre & Erntell, 1985; Björck, 1988). Protein L ist ein fibröses Oberflächenmolekül mit einer molekularen Masse von 77kDa

(Nilson *et al.*, 1992). Der deutlichste Unterschied dieses Bindeproteins im Vergleich mit den Proteinen A und G ist, das tierische beziehungsweise menschliche Ig Moleküle, unabhängig von der Klasse der schweren Kette durch Interaktion mit den leichten Ketten (besonders mit κ -Ketten) der Moleküle gebunden werden (Åkerstöm & Björck, 1989; Nilson *et al.*, 1992; Kastern *et al.*, 1992). Der sich daraus ergebende Vorteil des Protein L liegt in der theoretischen Bindung von einer großen Anzahl verschiedener Immunglobulin-Klassen und -subklassen und der damit verbundenen erweiterten Möglichkeit einer Detektion beziehungsweise Reinigung verschiedenster Antikörper oder Antikörperfragmente auch ohne Vorhandensein der Fc-Region des Antikörpers. Die Immunglobulinbindungsaktivität des Protein L wird durch fünf homologe Domänen vermittelt (Kastern *et al.*, 1992). Diese interagieren mit der Gerüstregion in den variablen Domänen der leichten Ketten der Immunglobuline ohne Beeinflussung der Antigenbindungskapazität der Antikörper (Wikström *et al.*, 1995).

Für die Reinigung des scFv-Proteins wurde unter Verwendung einer adäquaten Menge von rProtein L -Agarose eine Affinitätschromatographie-Säule gepackt. Die verwendete rProtein L-Agarose enthält eine an die Säulenmatrix Agarose (chemisch aktive Phase) gekoppelte rekombinante Form des natürlichen Proteins, das vier Immunglobulin bindende Domänen (B-Domänen) enthält (siehe Angaben des Herstellers: „Applications Booklet“). Nach der Equilibrierung der Säule wurde der Blattextrakt, der wie im Abschnitt 3.9 beschrieben hergestellt worden war, auf die Säule gegeben (siehe 3.12 bzw. Angaben des Herstellers). Das verwendete Blattmaterial stammte von den transgenen Pflanzenlinien ER H12/90/Z5, ER B11/60/3, Cyto H12/11-3 und Cyto B11/11-9. Mit Hilfe von PBS wurden im darauffolgenden Schritt alle nicht gebundenen Proteine ausgewaschen. Die Elution des scFv-Antikörperfragmentes erfolgte durch Senkung des pH-Wertes auf 2,5. Jeweils 30 Fraktionen à 2ml Eluat wurden in Reaktionsgefäßen aufgefangen. Durch Zugabe von 0,1 M Tris-Base wurde das eluierte scFv-Protein anschließend neutralisiert (Vergleich..).

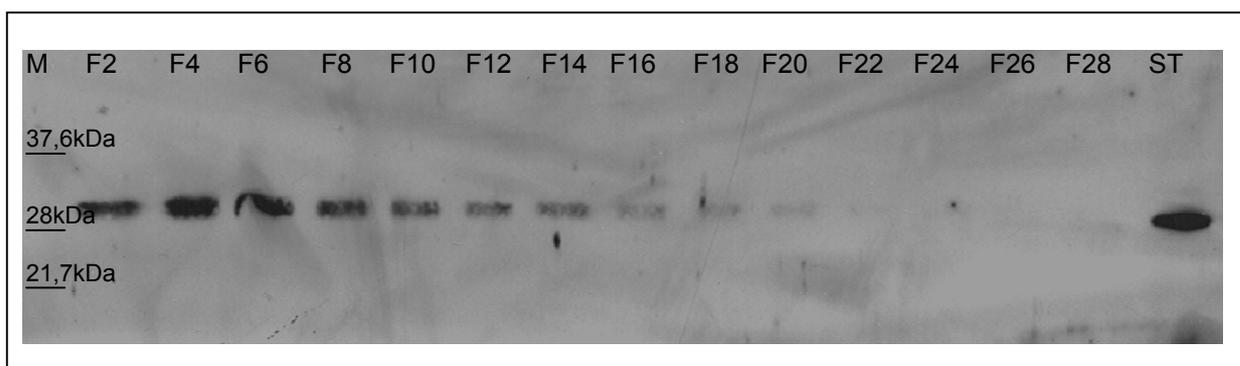


Abb.34: „Western-Blot“-Analysen des mit Hilfe der Affinitätschromatographie über eine rProteinL-Agarose-Säule aus transgenem Blattmaterial der Pflanzenlinie ER H12/90/Z5 gereinigten und ubiquitär mit Retention im ER exprimierten Anti-Quin-scFv. Spur M: Molekulargewichtsstandard, Spur F2-F28: Elutionsfraktionen (15 μ l), Spur St: scFv-Standard (10ng)

Adäquate Mengen der einzelnen Fraktionen wurden in einem 12,5%igen PAA-Gel aufgetrennt. Der Nachweis des gereinigten scFv-Proteins erfolgte immunologisch mittels „Western-Blot“ (siehe Abbildung 34). Nach der Auswertung der Ergebnisse wurden die scFv-haltigen Fraktionen vereinigt, aufkonzentriert und dialysiert (siehe Abschnitt 3.12).

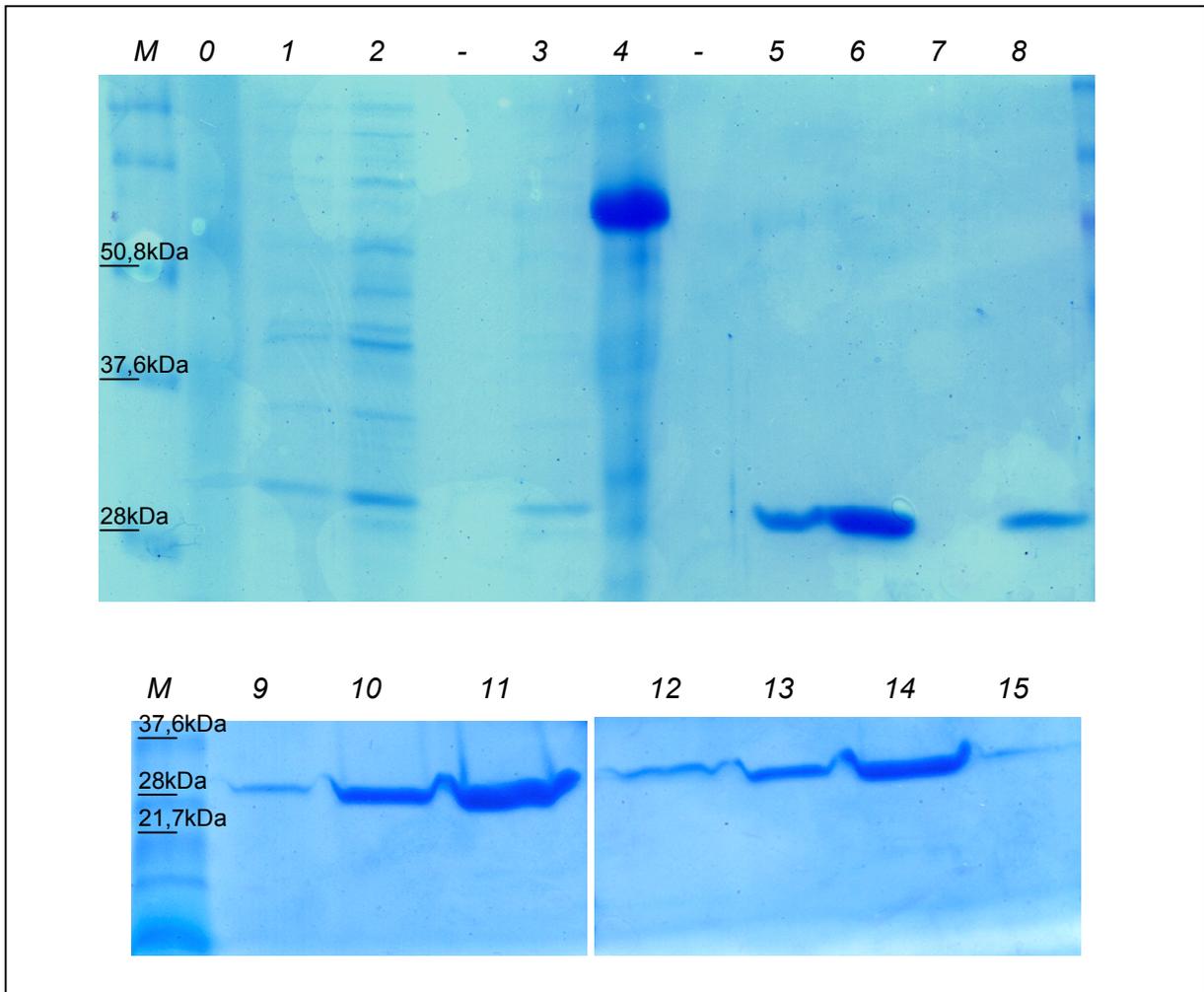


Abb.35: Nachweis der pflanzlich im ER und im Zytosol exprimierten und mittels Affinitätschromatographie gereinigten Anti-Quin-scFv aus den ausgewählten transgenen Tabakpflanzenlinien ER H12 (90/Z5) und Cyto H12 (11/3) durch Färbung mit Coomassie-Brilliantblau. Adäquate Mengen, der aus transgenem Blattmaterial Affinitätschromatographisch mittels einer Protein-L Säule gereinigten Anti-Quin-scFv wurden nach Denaturierung in einem 12,5%igem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und anschließend durch Coomassie-Brilliantblau nachgewiesen. Zur Kontrolle der Reinigungsmethode wurde außerdem eine definierte Menge nicht gereinigten Blattextraktes und zum direkten Vergleich ungereinigter bakterieller Kulturüberstand bzw. daraus mittels einer zweiten Protein-L-Säule gereinigte Anti-Quin-scFv aufgetragen. Spur M: Molekulargewichtsstandard, Spur 0-3: ungereinigter bakterieller Kulturüberstand (15-30µg GLP), Spur 4: ungereinigter Blattextrakt (30µg GLP), Spur 5/6: gereinigtes Anti-Quin-scFv H12 (2µl, 5µl), Spur 7/8: gereinigtes Anti-Quin-scFv B11(2µl, 5µl), Spur 9-11: gereinigter Anti-Quin-scFv H12 aus bakteriellem Kulturüberstand (0,5µl, 1µl, 2µl), Spur 12-14: gereinigter Anti-Quin-scFv ER H12 aus pflanzlichem Extrakt (0,5µl, 1µl, 2µl), Spur 15: gereinigter Anti-Quin-scFv Cyto H12 aus pflanzlichem Extrakt (2µl).

Die Konzentration des gereinigten scFv-Proteins wurde spektrophotometrisch (OD) mit Hilfe der Bradfordtechnik bestimmt, adäquate Mengen in einem 12,5%igen PAA-Gel aufgetrennt und die Proteine anschließend mit Brilliantblue R 250 angefärbt (Abbildung). Die mittels der angewendeten Methode erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass pflanzlich exprimiertes Antikörperprotein mit Hilfe dieser Technik aus transgenem Blattmaterial isoliert und gereinigt werden kann. Ähnliche Resultate wurden auch unter Verwendung anderer Pflanzenlinien (beispielsweise bei der Tabakpflanzenlinie Cyto H12/11-3 bzw. Cyto B11/11-9 mit zytosolischer Expression der Einkettenantikörper) erhalten (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Anschluß an die erfolgreiche Isolation pflanzlich exprimierter scFv aus dem Blattmaterial transgener Tabakpflanzen sollte deren funktionelle Aktivität und Spezifität überprüft werden. Hierfür wurden die affinitätschromatographisch mit Hilfe einer Protein-L Säule aus dem Blattmaterial der transgenen Tabakpflanzenlinien ER H12 , ER B11, Cyto H12 und Cyto B11 gereinigten Einkettenantikörper auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber dem Hapten Quinmerac im indirekten und im indirekt kompetitiven ELISA getestet (siehe Abschnitt).

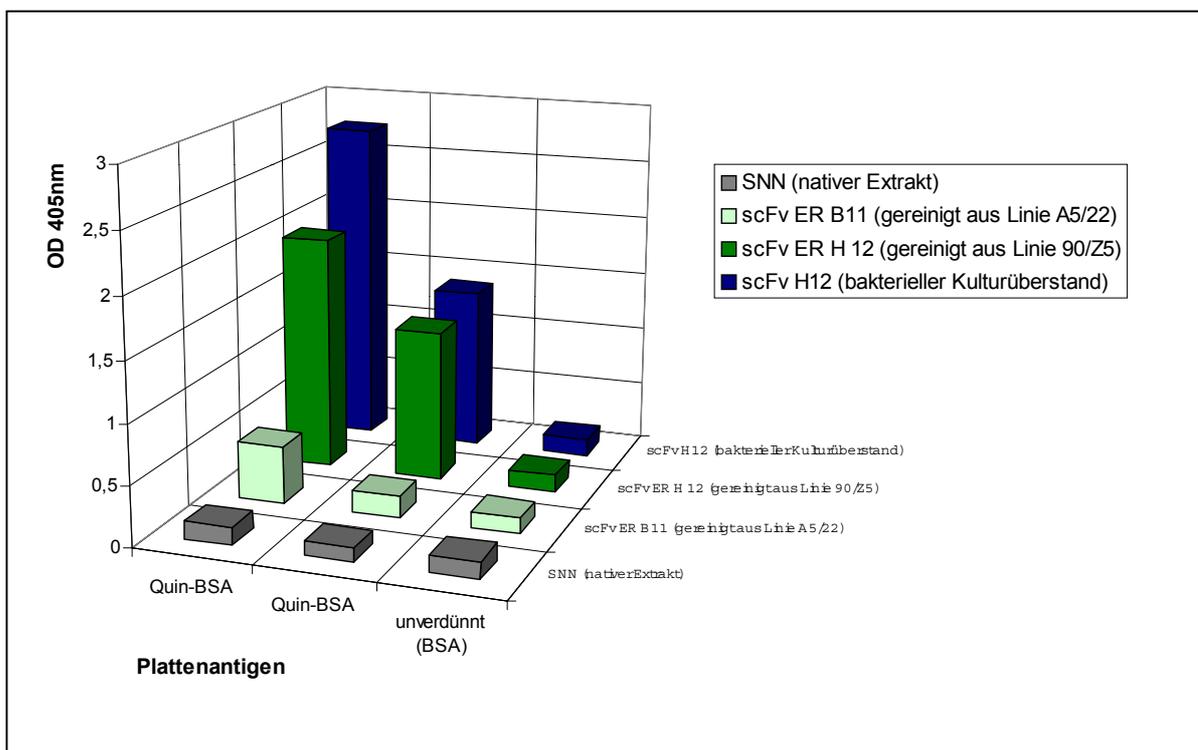


Abb.36: Nachweis der Funktionalität individueller pflanzlich exprimierter und mittels Affinitätschromatographie gereinigter Anti-Quin-scFv aus den ausgewählten transgenen Tabakpflanzenlinien ER H12 (90/Z5) und ER B11 (A5/22) durch indirekten ELISA. Die ELISA-Platten wurden mit Quin-BSA-Konjugat bzw. reinem BSA-Trägerprotein beschichtet, mit den verdünnten aus transgenem Blattmaterial gereinigten Anti-Quin-scFv-Eluaten bzw. mit nativem SNN-WT-Proteinextrakt als Negativkontrolle (ohne scFv) und verdünntem bakteriellen scFv-enthaltenden Kulturüberstand H12 als Positivkontrolle (mit scFv), dem c-myc-Antikörper 9E10 und einem Kaninchen-Anti-maus IgG-ALP-Konjugat inkubiert. Der Nachweis von enzymgekoppeltem Anti-Maus-Ig erfolgte durch Umsatz des hinzugefügten Substrates pNPP (ΔOD_{405nm}).

Im direkten Vergleich mit der mitgeführten Positiv- (gereinigtes scFv aus bakteriellem Kulturüberstand) und der Negativkontrolle (nativer Wildtyp-SNN-extrakt) konnte die Bindungsaktivität der aus dem Blattmaterial der Pflanzenlinien ER H12 und ER B11 gereinigten Anti-Quin-scFv an das Hapten Quinmerac ohne auftretende Kreuzreaktivität mit dem reinen Trägerprotein BSA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 36). Außerdem konnte die spezifische Antigenbindungsaktivität der pflanzlich exprimierten und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigten Anti-Quin-scFv für das freie Hapten Quinmerac im indirekt kompetitiven ELISA gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis der funktionellen Aktivität der pflanzlich im Zytosol exprimierten und mittels Affinitätschromatographie erfolgte in ähnlicher Weise wie zuvor beschrieben. Für die beiden, aus den Pflanzenlinien Cyto/H12/11-3 und Cyto B11/11-9 isolierten Anti-Quin-scFv lagen die ermittelten Antigenbindungsaktivitäten minimal über der eigentlichen Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der erst am Ende der Arbeit erhaltenen transgenen Linien mit Expression und Retention des Antikörperproteins in der Plasmamembran war eine umfangreiche Isolierung und Analyse dieser pflanzlich exprimierten Anti-Quin-scFv nicht mehr möglich. Bei einem durchgeführten Initial-ELISA-Experiment, unter Verwendung hergestellter nativer Blattproteinextrakte aus dem Blattmaterial junger transgener Tabakpflanzenlinien, konnte trotz nachweislicher Einkettenantikörperexpression (siehe Abschnitt 4.6.4) kein funktionell aktives Antikörperprotein detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

4.8 Prüfung der Toleranzeigenschaften der transgenen Anti-Quin-scFv exprimierenden Pflanzen gegenüber dem Herbizid Quinmerac

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Modellsystems zur Vermittlung von Toleranz gegenüber einem exogen applizierten Herbizid durch die immunmodulierenden Eigenschaften von spezifisch gegen dieses Herbizid gerichteten Einkettenantikörpern die im Gewebe von transgenen Pflanzen exprimiert werden. Es sollte somit die Grundlage zur Entwicklung einer alternativen Methode der Toleranz- beziehungsweise der Resistenzerzeugung bei Pflanzen gegenüber bisher verwendeten Methoden geschaffen werden. Als Modellpflanze sollte hierfür *Nicotiana tabacum* dienen, da diese schnell und relativ einfach zu transformieren ist und ein gut etabliertes Testsystem für die vielfältigsten Zielsetzungen in der Wissenschaft darstellt.

Als Modellherbizid wurde Quinmerac verwendet, ein von der BASF entwickeltes Auxinherbizid, dessen herbizide Wirkung auf seiner Auxinaktivität beruht. Es handelt sich bei Quinmerac um ein selektiv, in dikotyledonen Kulturpflanzenbeständen gegenüber monokotyledonen Unkraut-Spezies wirkendes Herbizid. Es verursacht in sensitiven Pflanzenspezies eine konzentrationsabhängige Stimulation der Ethylenbiosynthese, die

neben vielen weiteren Effekten (siehe 1.7-1.8) zur Inhibierung des Wachstums und zur Reduktion der Biomassenproduktion führt. Die Idee war es, die immunmodulierenden Eigenschaften intrazellulär exprimierter Einkettenantikörper auf exogen applizierte Stoffe zu erweitern. Durch Bildung eines „artificialen sinks“ des Herbizids in verschiedenen Kompartimenten der Pflanzenzelle sollte eine nachweisbare, durch das Antikörperprotein vermittelte Toleranz gegenüber dem Herbizid erzielt werden. Der exogen applizierte herbizide Wirkstoff sollte nach Eindringen in die Pflanzenzelle durch das scFv-Antikörperfragment gebunden und dadurch in seiner Funktionalität, infolge der Blockierung der Bindung des Herbizides an seinen Wirkort, modifiziert werden (Neutralisierung der auftretenden toxischen Effekte). Die wesentlichen Voraussetzungen für die Regeneration transgener Anti-Quin-scFv exprimierender Pflanzenlinien, die auf ihre Toleranzeigenschaften untersucht werden sollten, war die Isolierung und Charakterisierung spezifisch Quinmerac bindender scFv-Einkettenantikörper sowie die erfolgreiche Transformation von Tabakpflanzen unter Verwendung der konstruierten Expressionskassetten. Die so erzeugten Pflanzenlinien akkumulierten die Anti-Quin-scFv ubiquitär im endoplasmatischen Retikulum, im Zytosol und in der Plasmamembran. Anschließend sollten individuelle transgene scFv-exprimierende Pflanzenlinien auf ihre Toleranz gegenüber dem verwendeten exogen applizierten Herbizid getestet werden. Für die Entwicklung eines Testsystems zur Prüfung der Toleranzeigenschaften der regenerierten transgenen Pflanzenlinien im direkten Vergleich mit Kontrollpflanzen war es wichtig, dass das angewendete System reproduzierbare, aussagesichere und statistisch auswertbare Ergebnisse liefert. Es sollte daher möglich sein mit Hilfe dieser Technik eine große Anzahl verschiedener individueller Linien einer oder mehrerer Pflanzenserien unter kontrollierten und definierten Bedingungen gleichzeitig, relativ einfach und reproduzierbar zu analysieren und zu untersuchen.

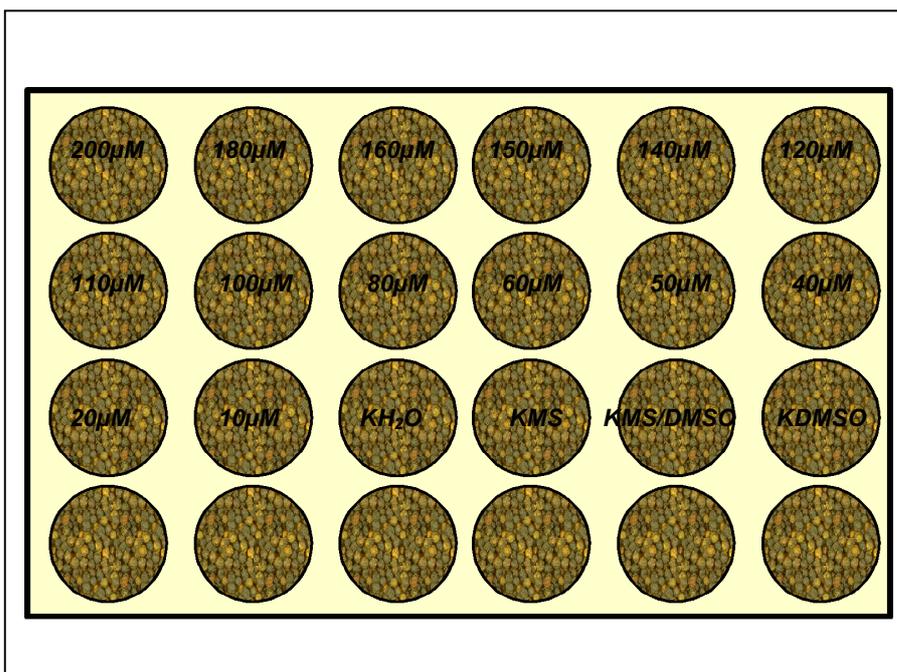


Abb.37:
Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Initialexperimente zur Untersuchung der Toleranzeigenschaften von transgenen Anti-Quinmerac Tabakpflanzenlinien und von Kontrollpflanzen (SNN; UF) während der Keimung. Je 30 Samen/Kavität wurden in die Applikationslösung (siehe 3.14) gegeben.

In Vorversuchen wurden verschiedene Techniken zur Prüfung der Toleranzeigenschaften angewendet und auf ihre Effizienz und Reproduzierbarkeit hin getestet (Daten nicht gezeigt). Beispielsweise wurde das Herbizid, unter Verwendung adäquater Mengen, durch Besprühen transgener Pflanzen und von Kontrollpflanzen appliziert. Dieses System erwies sich jedoch bei der Anwendung an den getesteten Tabakpflanzen als zu geringfügig effektiv und nicht stabil reproduzierbar. Das letztlich entwickelte und angewendete Versuchssystem basierte auf der Inkubation und der Keimung von Samen transgener Pflanzen und von Kontrollpflanzen in Zellkulturplatten mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen von Quinmerac (siehe Abbildungen 37, 39). Dieses System erlaubte es eine große Anzahl individueller Samen beziehungsweise Keimlinge (~300/Kavität) einer Pflanzenlinie sowie mehrere Pflanzenlinien einer Serie und mehrere Pflanzenserien gleichzeitig auf ihre Toleranzeigenschaften zutesten. Am Beginn der Experimente wurde zur Festlegung des optimalen Bereiches der herbiziden Wirkstoffkonzentration und zur genaueren Prüfung und Beurteilung der nach Quinmeracbehandlung auftretenden sichtbaren morphologischen Veränderungen bei Kontrollpflanzen (SNN) und bei transgenen Anti-Quinmerac Tabakpflanzen mit ubiquitärer Expression des scFv und Retention im endoplasmatischen Retikulum ein kleiner Probenumfang von etwa 30 Samen/ Kavität/ Tabaklinie gewählt (Abbildung 37 und 38).

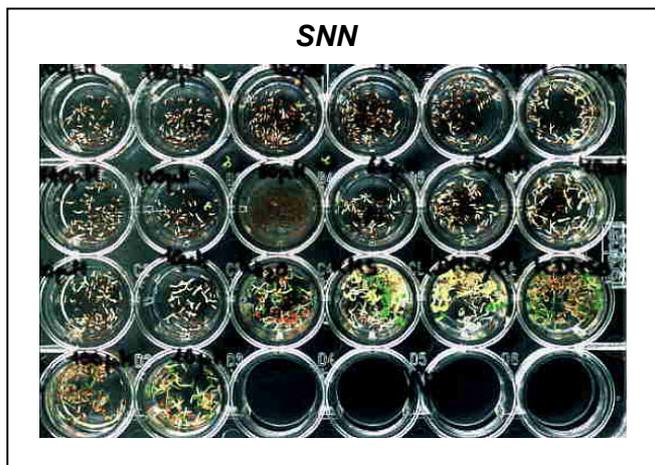


Abb.38: Darstellung der Ergebnisse aus den Initialexperimenten zur Prüfung der Toleranzeigenschaften der Kontrolltabakpflanzenlinien SNN (WT). Je Kavität wurden 30 oberflächensterilisierte reife Samen der Kontrollpflanze (SNN) in 500µl vorgelegte sterile Quinmeraclösungen mit einer Konzentration von 0-200µmol/l in ½ MS+2% Saccharose eingezählt. Die Inkubation der verschlossenen Platten erfolgte im Pflanzenkulturraum bei einem Hell/Dunkelrhythmus von 16/8h für etwa 10-14 Tage.

Es zeigte sich hierbei, dass die aufgrund der immunmodulierenden Eigenschaften der exprimierten scFv-Einkettenantikörper vermittelte Toleranz gegenüber dem Herbizid Quinmerac nur zu einer teilweisen Reduzierung der induzierten herbiziden Schädwirkungen führt. Die Applikation des Herbizides Quinmerac führte bei den getesteten transgenen Anti-Quin-Tabakpflanzenlinien als auch bei den mitgeführten Kontrollpflanzen Wildtyp (SNN) und UF-5 (Anti-Ox-scFv) zur Beeinflussung des Keimlingswachstums. Im direkten Vergleich der Keimlinge von getesteten Kontrollpflanzen und transgenen Anti-Quinmerac-Tabakpflanzen zeigten einige der getesteten transgenen Anti-Quin-Tabakpflanzen in einem eingeschränkten Konzentrationsbereich von 10µM-25µM eine Toleranz gegenüber den durch das applizierte Herbizid induzierten toxischen Effekten. Diese erzeugte Toleranz zeigte sich in einer

geringeren Reduktion der Keimlingslängen von verschiedenen transgenen Anti-Quin-scFv exprimierenden Tabakpflanzenlinien im Gegensatz zu den mitgeführten Kontrollpflanzen nach Applikation und Inkubation in der entsprechenden Herbizidlösung. Im Folgenden wurde sowohl zur Überprüfung der Ergebnisse aus den Vorversuchen als auch zum Ausschluß möglicher auftretender heterogener Effekte, durch die biologisch bedingte Variabilität, ein größerer Probenumfang an zu testenden individuellen hochexprimierenden transgenen Tabakpflanzenlinien, -serien und von Kontrollpflanzenlinien gewählt. Durch Bestimmung der Biomasse (Frischmasse) sollte dabei eine genauere Aussage über die durch scFv-Expression in transgenen Pflanzenlinien erzeugte Toleranz getroffen werden, die durch Untersuchung einer großen Anzahl verschiedener individueller Pflanzenlinien zusätzlich statistisch signifikant abgesichert werden konnte.

4.8.1 Ergebnisse der Frischmassenbestimmung nach Applikation von Quinmerac

Eine oft angewendete Methode zur Untersuchung phytotoxischer Eigenschaften verschiedenster Substanzen ist die Verwendung der Biomasse als Parameter für das Maß der Phytotoxizität eines Wirkstoffes bzw. zur Bestimmung des erzeugten Toleranzgrades (Mamdouh, 1995; Gong et al., 1999; Guiterrez-Lugo et al., 1999; Gong et al., 2001; Chen et al., 2002). Weitere Wachstums- oder Toleranzparameter sind beispielsweise die Pflanzengröße, die Blattgröße und der Längenzuwachs bei Pflanzenkeimlingen (Internodienlängen). Das Wachstum, wie beispielsweise bei der Keimung, ist durch einen Anstieg der Biomasse gekennzeichnet. Bei früheren Untersuchungen zur herbiziden Wirkung von Quinmerac an *Galium aparine* konnte nicht nur eine mit steigender Quinmerackonzentration auftretenden Schädigung der Pflanzen festgestellt werden, sondern auch eine negative Korrelation zwischen der Konzentration und der produzierten Biomasse (GRR). In Versuchen im Zuge dieser Arbeit wurde ebenfalls nach Applikation von Quinmerac an Wildtyp-Tabakpflanzen (SNN, siehe Abbildung 38), Wildtyp-Karottenpflanzen und transgenen Kontrollpflanzen (UF9) ein kausaler Zusammenhang zwischen der angewendeten Quinmerackonzentration und der resultierenden Biomasse der Keimlinge festgestellt. Je höher die zugesetzte Menge des Herbizides während der Keimung war, desto geringer war das resultierende gemessene Frischgewicht. Basierend auf diesen Ergebnissen, sollten die bestimmten Frischmassen der Keimlinge nach 14tägiger Inkubation in den Testlösungen als Maß für die Hemmung der Keimung bzw. der Biomassenproduktion dienen. Bei einer durch scFv-Expression in den transgenen Tabakpflanzen erzeugten Toleranz sollte dementsprechend eine höhere resultierende Keimlingsfrischmasse im Gegensatz zu mit den mitgeführten Kontrollpflanzen meßbar sein. Die ermittelten Werte der getesteten Kontrollpflanzenlinien und der transgenen Linien sollten nach dem direkten

Vergleich eine Aussage über den Grad der mittels der immunmodulationsbedingten Eigenschaften der exprimierten Antikörperfragmente erzeugten Toleranz ermöglichen.

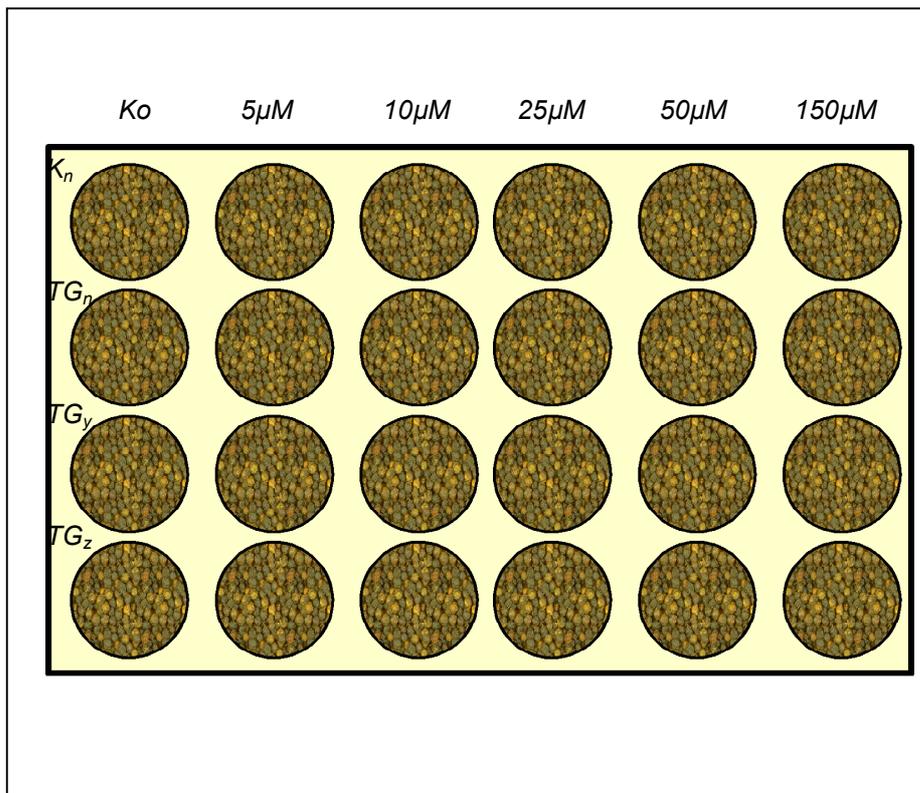


Abb.39:
Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Toleranzeigenschaften von transgenen Anti-Quinmerac Tabakpflanzenlinien und von Kontrollpflanzen (SNN; UF) während der Keimung. Je 300 Samen /Kavität transgener Anti-Quin Tabakpflanzen und von Kontrollpflanzen wurden in die Applikationslösung (siehe 3.14) gegeben. K_n : Kontrollpflanze, TG_{x-z} : transgene Pflanzenlinien

In dem verwendeten hydroponischen Testsystem zur Untersuchung der Toleranzeigenschaften Anti-Quin-scFv exprimierender Tabakpflanzen wurde das Frischgewicht einer definierten Menge transgener Keimlinge und von Kontrollkeimlingen nach Inkubation in Kontroll- und Quinmerac-haltigen Lösungen bestimmt und miteinander verglichen. Zu den im Vergleich verwendeten, parallel neben den transgenen Tabakpflanzenlinien mitgeführten, Kontrollpflanzenlinien gehörten Tabak-Wildtypenlinien (SNN) und transgene Kontrollpflanzenlinien (UF9), die einen gegen das Hapten Oxazolon gerichteten Einkettenantikörper ubiquitär exprimierten und im ER akkumulierten. Der Versuchsaufbau zur Toleranzprüfung der transgenen Tabakpflanzenlinien und der Kontrolllinien gegenüber den phytotoxischen Effekten des exogen applizierten herbiziden Wirkstoffes ist in Abbildung 39 schematisch dargestellt. Die Ergebnisse der Bestimmung des Keimlingsfrischgewichtes in den durchgeführten Applikationsexperimenten zur Prüfung der, mittels spezifischer gegen das Herbizid Quinmerac gerichteter Einkettenantikörper, erzeugten Toleranz transgener scFv-exprimierender Tabakpflanzenlinien sind in Abbildung 40-44 dargestellt. Anhand des im Bioassay bestimmten Toleranzparameters Frischmasse konnte bei den im Applikationssystem getesteten Kontrollpflanzenlinien eine konzentrationsabhängige Verzögerung des Wachstums nachgewiesen werden (siehe Abbildung 41).

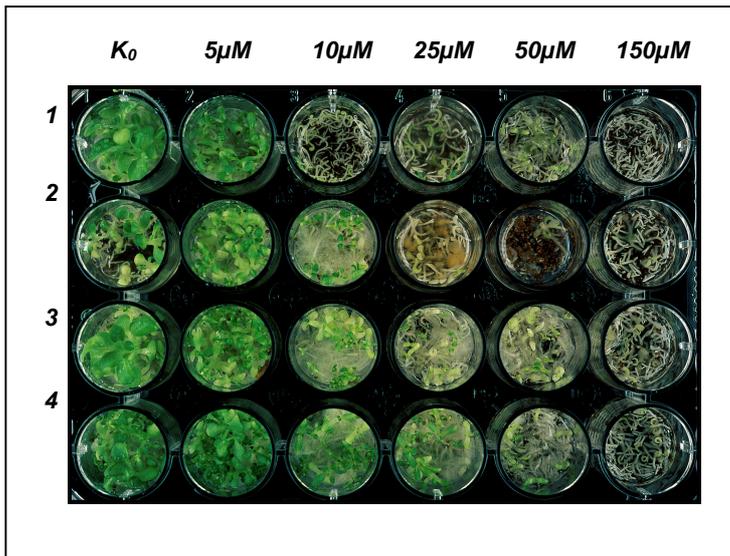


Abb.40: Darstellung der Ergebnisse aus dem resultierenden Testsystem zur Prüfung der Toleranzeigenschaften der transgenen Tabakpflanzenlinien ER B11/A1 (2), ER H12/90/Z5 (3) und ER H12/D10 (4) mit ubiquitärer Expression und Retention des Antikörperproteins im ER im Vergleich mit einer Kontrollpflanze (SNN, 1) nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen. Je Kavität wurden ~300 oberflächensterilisierte reife Samen in 500µl vorgelegte sterile Applikationslösung (Quinmerac) mit einer Konzentration von 0-150µmol/l in ½ MS+2% Saccharose ausgelegt und im Kulturraum bei 25°C und einem Hell/Dunkelrhythmus von 16/8h inkubiert. Die Auswertung und Bestimmung der Frischgewichte erfolgte nach ca. 14 Tagen.

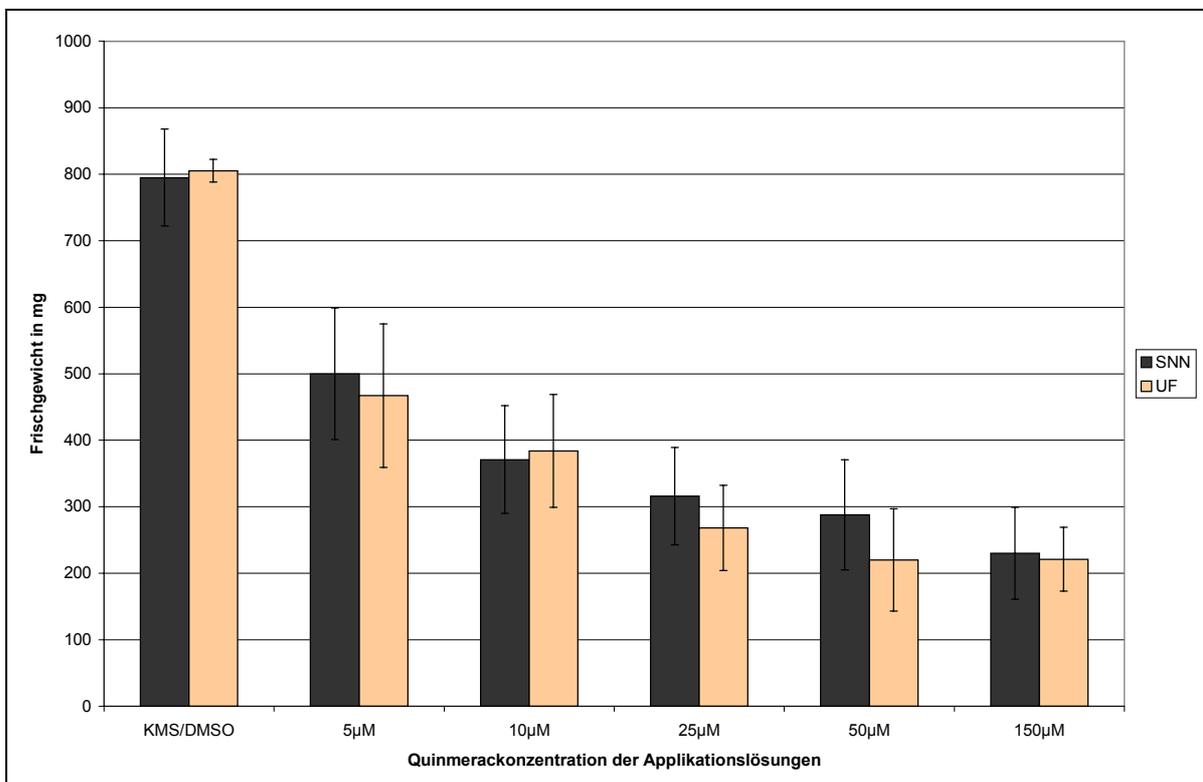


Abb.41: Vergleich der bestimmten Frischgewichte (mit Standardabweichung) aus den Applikationsexperimenten mit den Kontrollpflanzenlinien (SNN, n=20; UF9, n=10) zur Prüfung der Toleranzeigenschaften gegenüber dem Herbizid Quinmerac. Jeweils 150mg oberflächensterilisierte Samen wurden pro Kavität in die entsprechenden Applikationslösungen eingewogen. Anschließend wurden die Kulturplatten für 14 Tage im Kulturraum inkubiert. Die Keimung der Samen erfolgte in den Lösungen. Die Messung der Frischgewichte (die Gesamtheit der Keimlinge je Kavität) wurde 14 Tage nach Applikationsbeginn durchgeführt.

Die Auswertung der erhaltenen Frischgewichte erfolgte statistisch unter Anwendung des Duncan-Tests ($p < 0,05$) zum Nachweis einer erzielten signifikanten Verbesserung der Toleranz bei transgenen Pflanzenlinien im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollpflanzen. Die Ergebnisse der Frischgewichtsbestimmungen zeigen, dass bei den transgenen Pflanzenlinien mit ubiquitärer Expression und Akkumulation des Antikörperproteins im endoplasmatischen Retikulum und mit ubiquitärer zytosolischer Expression der scFv eine partielle Verbesserung der Toleranz in einem eingeschränkten Konzentrationsbereich (5-25 μM) gegenüber den phytotoxischen Effekten des Herbizides Quinmerac erzielt werden konnte (siehe Abbildung 42, 43). Zwar treten auch bei diesen Pflanzenlinien wachstumshemmende Effekte auf, die aber fallen im direkten Vergleich mit den Kontrollpflanzen schwächer aus. Die erzielte Verbesserung der Toleranz äußert sich demzufolge in einer Verringerung der wachstumshemmenden Effekte des Herbizides nachweisbar durch größere Frischgewichte (siehe Abbildung 42, 43).

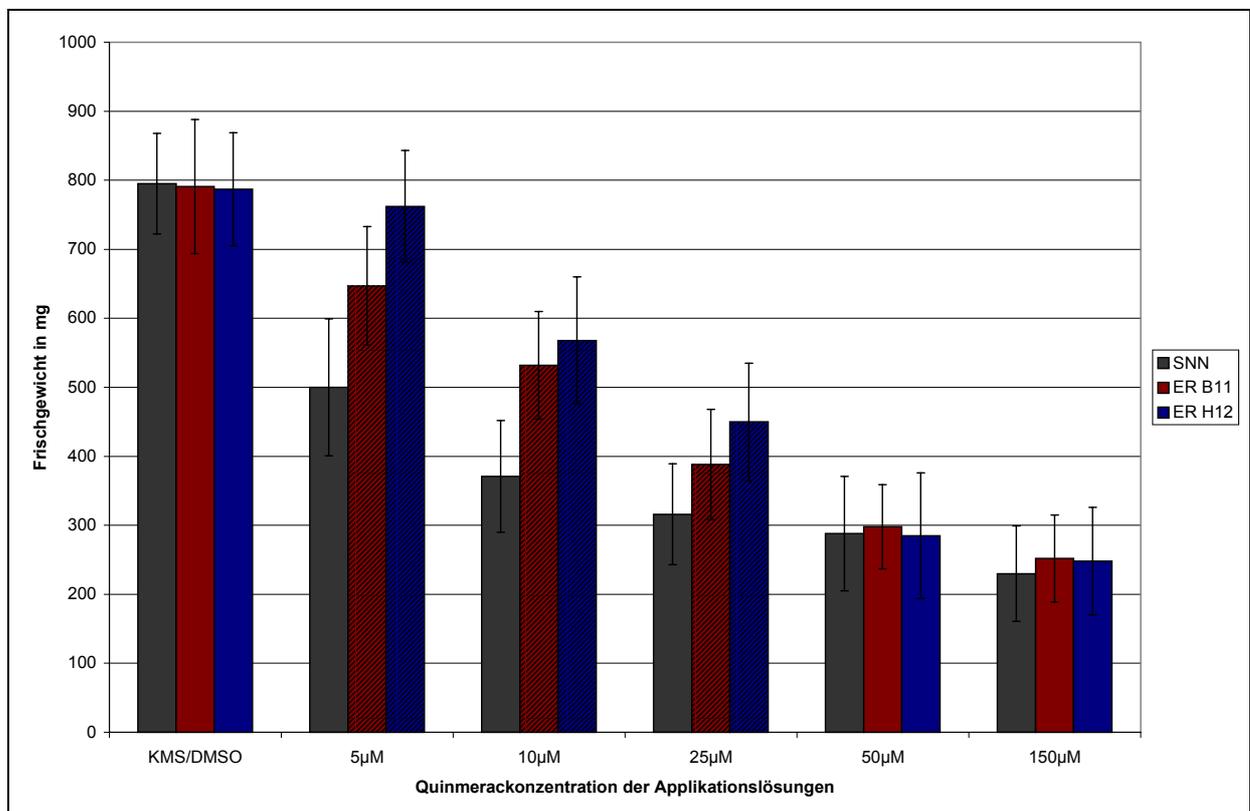


Abb.42: Vergleich der bestimmten Frischgewichte (mit Standardabweichung) aus den Applikationsexperimenten zur Prüfung der antikörpervermittelten Toleranz verschiedener transgener Pflanzenlinien mit ubiquitärer Expression und Retention des scFv im ER (ER B11/ H12, $n=25$; 20) und von Kontrollpflanzenlinien (SNN) gegenüber dem Herbizid Quinmerac. Jeweils 150mg oberflächensterilisierte Samen wurden pro Kavität in die entsprechenden Applikationslösungen eingewogen. Anschließend wurden die Kulturplatten für 14 Tage im Kulturraum inkubiert. Die Keimung der Samen erfolgte in den Lösungen. Die Messung der Frischgewichte (die Gesamtheit der Keimlinge je Kavität) wurde 14 Tage nach Applikationsbeginn durchgeführt. Die signifikanten Unterschiede im ermittelten Frischgewicht im direkten statistischen Vergleich mit den Kontrollpflanzenlinien sind schraffiert.

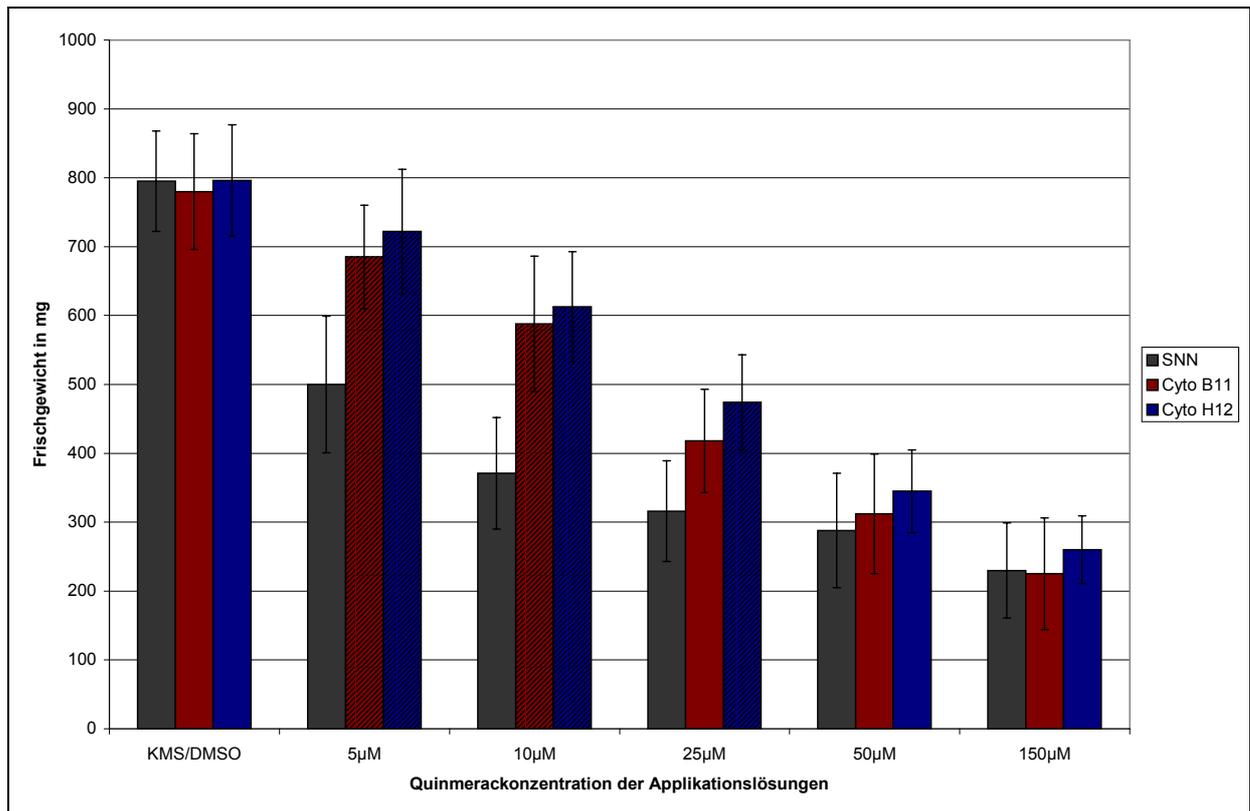


Abb.43: Vergleich der bestimmten Frischgewichte (mit Standardabweichung) aus den Applikationsexperimenten zur Prüfung der antikörpervermittelten Toleranz verschiedener transgener Pflanzenlinien mit ubiquitärer zytosolischer Expression (Cyto B11/ H12, n=19; 15) und von Kontrollpflanzenlinien (SNN) gegenüber dem Herbizid Quinmerac. Jeweils 150mg oberflächensterilisierte Samen wurden pro Kavität in die entsprechenden Applikationslösungen eingewogen. Anschließend wurden die Kulturplatten für 14 Tage im Kulturraum inkubiert. Die Keimung der Samen erfolgte in den Lösungen. Die Messung der Frischgewichte (die Gesamtheit der Keimlinge je Kavität) wurde 14 Tage nach Applikationsbeginn durchgeführt. Die signifikanten Unterschiede im ermittelten Frischgewicht im direkten statistischen Vergleich mit den Kontrollpflanzenlinien sind schraffiert.

Im Vergleich der Pflanzen der Linien ER B11/ H12, Cyto B11/ H12 mit Kontrollpflanzenlinien war eine ~50%ige Reduktion des Frischgewichtes der transgenen Linien bei einer Herbizidkonzentration $>25\mu\text{M}$ erreicht, während bei den Kontrollpflanzen diese Verminderung der Biomasse (IC_{50}) schon bei einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ erzielt worden war. Die herbizide Wirkung des Quinmerac kann partiell mittels Expression und Akkumulation spezifischer scFv in einem begrenzten Konzentrationsbereich gehemmt werden. Bei Pflanzen der Linien TMD B11/ H12 konnte keine signifikante Verbesserung der Toleranzeigenschaften mittel der exprimierten Anti-Quin-scFv nachgewiesen werden (siehe Abbildung 44). Die bestimmten Frischgewichte wiesen keine signifikanten Unterschiede zu den Frischgewichten der Kontrollpflanzen auf.

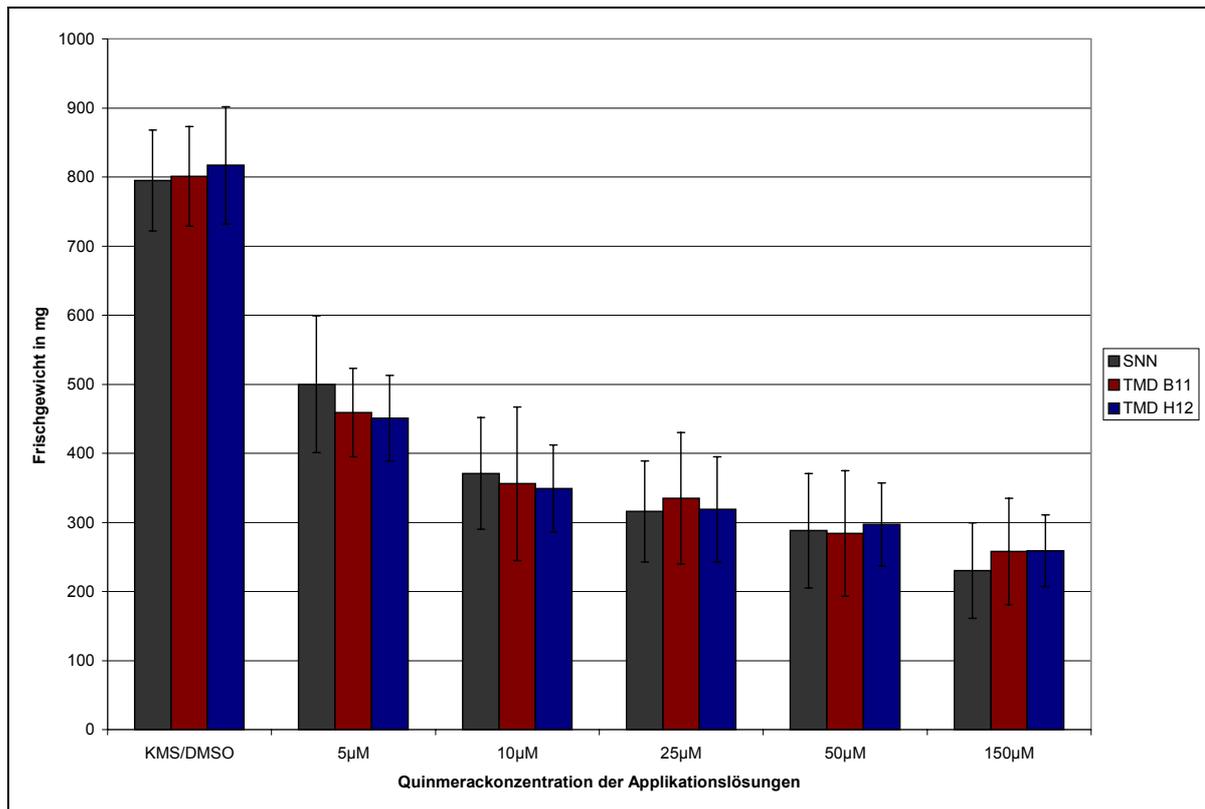


Abb.44: Vergleich der bestimmten Frischgewichte (mit Standardabweichung) aus den Applikationsexperimenten zur Prüfung der antikörpervermittelten Toleranz verschiedener transgener Pflanzenlinien mit ubiquitärer Expression und Retention des scFv in der Plasmamembran (TMD B11/ H12, n=10; 11) und von Kontrollpflanzenlinien (SNN) gegenüber dem Herbizid Quinmerac. Jeweils 150mg oberflächensterilisierte Samen wurden pro Kavität in die entsprechenden Applikationslösungen eingewogen. Anschließend wurden die Kulturplatten für 14 Tage im Kulturraum inkubiert. Die Keimung der Samen erfolgte in den Lösungen. Die Messung der Frischgewichte (die Gesamtheit der Keimlinge je Kavität) wurde 14 Tage nach Applikationsbeginn durchgeführt. Die signifikanten Unterschiede im ermittelten Frischgewicht im direkten statistischen Vergleich mit den Kontrollpflanzenlinien sind schraffiert.

Ab einer Konzentration von $>50\mu\text{M}$ Quinmerac in der Applikationslösung, konnte kein signifikanter Unterschied bei der Keimung bzw. bei der Inhibierung des Wachstums der Keimlinge von Kontrollpflanzenlinien und transgenen Tabakpflanzenlinien nachgewiesen werden. Der Grad der Inhibierung war nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen oberhalb dieser Konzentration bei allen getesteten Pflanzenlinien (transgene Pflanzenlinien und Kontrolllinien) annähernd gleich. Eine vollständige Inhibierung der Keimung bzw. des Keimlingswachstums bei höheren Herbizidkonzentrationen ($250\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$ Quinmerac in der Applikationslösung) konnte bei keiner der getesteten transgenen und der Kontrolltabakpflanzenlinien erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Überprüfung der vorhandenen Expression der Einkettenantikörperfragmente während der Applikationstest wurden von einigen Keimlingen, nach Bestimmung des Frischgewichtes, aus den unterschiedlich konzentrierten Inkubationslösungen der Experimente native Keimlingsproteinextrakte hergestellt (Vergleich 3.9).

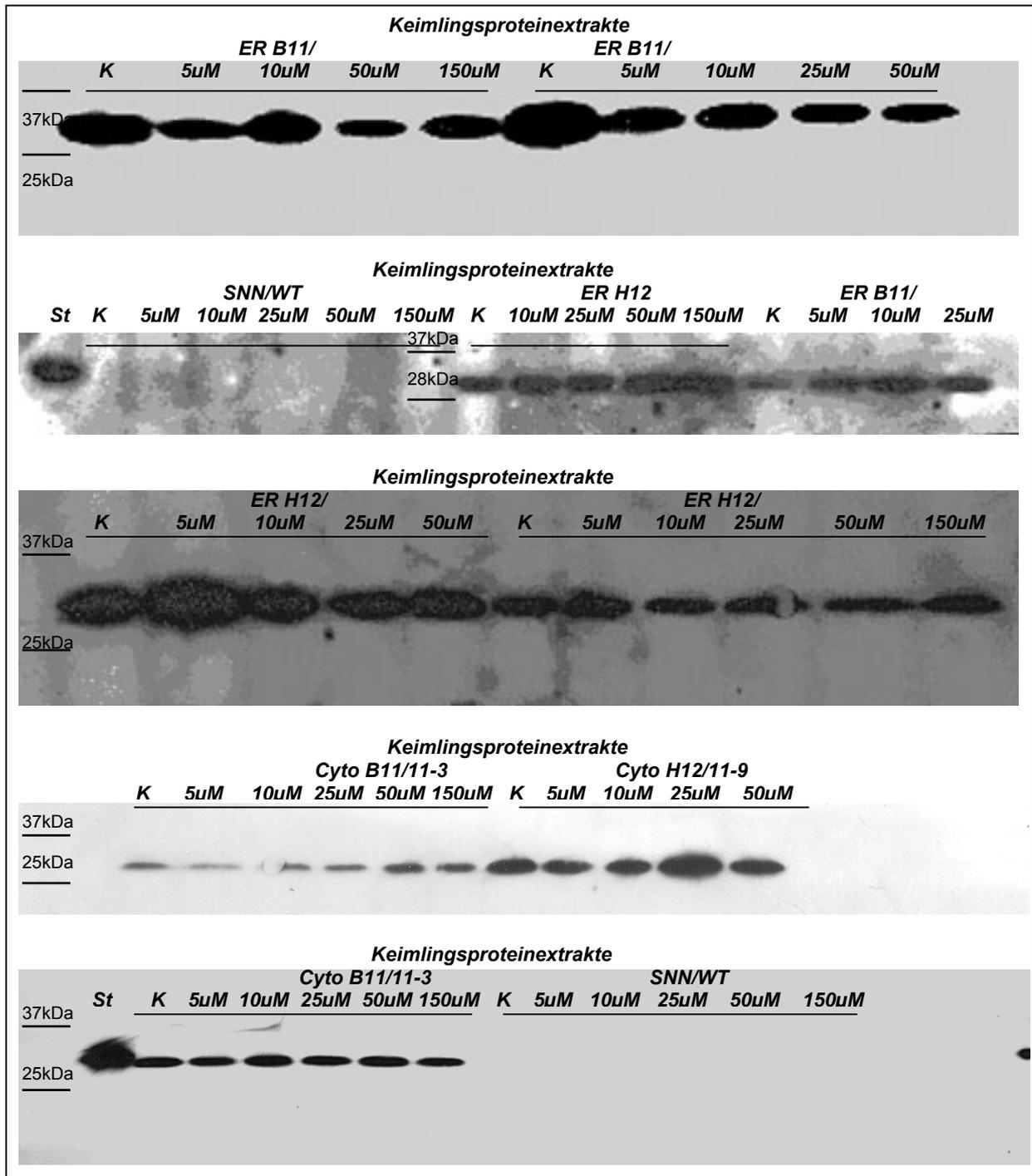


Abb.45: Nachweis der pflanzlich ubiquitär exprimierten und im endoplasmatischen Retikulum retentierten Einkettenantikörper (Anti-Quin-scFv) in Keimlingen verschiedener transgener Pflanzenlinien. Hergestellte native Keimlingsproteinextrakte wurden nach der Konzentrationsbestimmung hitzedenaturiert und auf einem 12,5%igem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das zur Herstellung der wäßrigen Extrakte verwendete Keimlingsmaterial entstammte den vorangegangenen Applikationstests und wurde nach Bestimmung der Frischmasse in flüssigem Stickstoff unter Zusatz des Puffers homogenisiert. Nach Transferrierung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte der immunologische Nachweis des scFv-Antikörperproteins unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 9E10, einem kaninchen-Anti-Maus-IgG-POD~Konjugat und dem ECL-Kit. Es wurden jeweils 20µg GLP (für ER B11 und H12) bzw. 50µg (für Cyto B11 und H12) der hergestellten denaturierten Keimlingsextrakte aufgetragen.

Für die Extrakte wurden die gesamtlöslichen Keimlingsproteine in einem wäßrigen Puffer extrahiert. Nach der Konzentrationsbestimmung der gesamtlöslichen Proteine und der Denaturierung der Proteine wurden diese in einem 12,5%-igem PAA-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der exprimierten scFv-Antikörperproteine erfolgte immunologisch mit Hilfe der „Western-Blot“ Technik. Beispiele für die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 45 gezeigt. Bei den Pflanzenlinien mit ubiquitär zytosolischer Expression des Einkettenantikörpers und bei Tabaklinien mit ubiquitärer Expression und Retention des Antikörperfragmentes im ER konnten die Antikörperproteine in den jungen Keimlingen nachgewiesen werden. Dabei war festzustellen, dass die Anti-Quin-scFv unabhängig von der angewendeten Herbizidkonzentration der Applikationslösung in der Pflanze exprimiert wurden. In Keimlingen der Pflanzenlinien mit ubiquitärer Expression und Retention des Einkettenantikörpers in der Plasmamembran lag die des Antikörperproteins aufgrund der geringen Konzentration an gesamtlöslichem Protein unter der Nachweisgrenze der „Western-Blot“ Technik.

4.9 Analyse des ABA-Gehaltes nach Applikation von Quinmerac

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, eine immunmodulationsbedingte Vermittlung von Toleranz der Pflanzen gegenüber dem verwendeten Herbizid Quinmerac durch Expression geeigneter charakterisierter Anti-Quin-scFv in unterschiedlichen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle zu erreichen. Die Untersuchung der erworbenen Toleranz der transgenen Tabakpflanzenlinien erfolgte, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, in einem dafür optimierten Bioassay- Testsystem durch Bestimmung der Frischmasse der getesteten Keimlinge in Abhängigkeit unterschiedlich konzentrierter applizierter Herbizidlösungen. Die Verwendung von Bioassays zur Bestimmung und Detektion von Toleranz bzw. Resistenz anhand definierter Parameter bei den verschiedensten Pflanzenarten (Unkräuter als auch Nutzpflanzen) ist dabei oft die Methode der Wahl (*Beckie et al., 2000*). Generell erfolgt hierbei wie im vorherigen Abschnitt 4.8 beschrieben und gezeigt, die Testung der Resistenz durch Bestimmung und Vergleich unterschiedlicher hauptsächlich in der Entwicklung von Keimlingen, aber auch beim Wachstum adulter Pflanzen auftretender phänotypischer Merkmale (anhand definierter Wachstumsparameter: Pflanzen-, Internodien- oder Blattgröße, Wurzellängen, Frisch- oder Trockengewichte) in Abhängigkeit der Konzentration der applizierten Xenobiotikalösung. Ergänzend zu diesen Pflanzenbioassays werden häufig sogenannte *in vitro* Tests durchgeführt. Mit deren Hilfe können beispielsweise Pigment-, Hormon- oder Proteinmengen bzw. Enzymaktivitäten als meßbare Parameter zum Nachweis von Toleranz oder Resistenz bestimmt werden. Die Möglichkeit des biochemischen Nachweises verschiedener endogener Proteinkonzentrationen bzw. der Aktivität von Enzymen steht dabei in unmittelbarer Abhängigkeit vom jeweiligen Wirkungsmechanismus

des angewendeten Pestizides. Beispielsweise konnte anhand von Konzentrationsbestimmungen unterschiedlicher Enzyme bzw. Stoffwechselprodukte, die als meßbare Parameter in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Wirkungsmechanismus der herbiziden Substanz standen, Aussagen über die Grundlagen der selektiven Wirkung der herbiziden Substanz Quinmerac in unterschiedlichen Pflanzenarten getroffen und Rückschlüsse über die Empfindlichkeit bzw. Toleranz verschiedener Unkraut- oder Kulturpflanzenarten (sensitive und/oder tolerante Biotypen) gegenüber diesem Herbizid gezogen werden (Abeles et al., 1992; Devine et al., 1993; Grossmann & Scheltrup, 1995, 1997; Sterling & Hall, 1997; Grossmann, 1998; Hansen & Grossmann, 2000). Auch bei Untersuchungen zum Toleranzverhalten von Pflanzen gegenüber anderen Herbizidklassen dienten *in vitro* bestimmte Konzentrationen an endogenen Stoffwechselprodukten bzw. Proteinen oder von Enzymaktivitäten als Parameter für die gentechnisch erzeugte bzw. natürlich vorhandene Toleranz ().

Das im Zuge dieser Arbeit verwendete Herbizid Quinmerac sollte stellvertretend für andere Herbizide als Versuchsherbizid verwendet werden, um ein Modellsystem zur Erzeugung von Toleranz in Kulturpflanzen durch Expression von Anti-Quinmerac-Einkettenantikörpern zu entwickeln. Quinmerac ist ein Vertreter der Gruppe der selektiv wirkenden Gruppe der Auxinherbizide, die revolutionierend für die gesamte Herbizidanwendung in der Landwirtschaft waren (Cobb, 1992; Devine et al., 1993; Roe et al., 1997). Die phytotoxische, herbizide Wirkung der Auxinherbizide ist in ihrer supraoptimalen Auxinwirkung (Auxin-Überdosis) begründet (Cobb, 1992; Devine et al., 1993; Coupland, 1994; Grossmann & Scheltrup, 1995; Sterling & Hall, 1997; Grossmann, 1998; Hansen & Grossmann, 2000). Von natürlichen und synthetischen Auxinen ist bekannt, dass sie regulierend in das Wachstumserhalten der Pflanzen eingreifen. Das mittels synthetischer Auxine hervorgerufene Ungleichgewicht im Auxinhaushalt der Pflanze und die Interaktionen mit anderen Pflanzenhormonen im Gewebe führen zu einer kontinuierlichen Überreaktion bzw. Überstimulierung des pflanzlichen Metabolismus. Zu den auftretenden charakteristischen morphologischen, physiologischen und biochemischen Veränderungen nach Applikation bei empfindlichen Pflanzen gehören beispielsweise Zellelongation, Epinastie, Hypertrophie, Stimulierung der Ethylenbiosynthese, Veränderung der Nukleinsäure und Proteinbiosynthese, Aktivierung der Plasmamembran ATPasen, Erhöhung H⁺ Extrusion und Erhöhung Ca²⁺ Influx, die in ihrer Gesamtheit zu ungeordnetem Wachstum und letztendlich zum Tod empfindlicher, sensibler Pflanze führen (Cobb, 1992; Coupland, 1994; Devine et al., 1993, Grossmann, 1998; Hall et al., 1996). Der grundlegende biochemische Wirkungsmechanismus der Auxinherbizide insbesondere des Quinmerac wurde erstmals 1995 beschrieben und ist begründet in einer Beeinflussung der Pflanzenhormonhaushaltes in sensitiven Pflanzen (Scheltrup & Grossmann, 1995). Wie in den Abschnitten 1.7-1.8 schon näher erläutert, konnte gezeigt werden, dass es zu einer Steigerung der Ethylenbiosynthese

kommt. Weiterhin konnte bei verschiedenen Untersuchungen zur Wirkungsweise von Quinmerac in empfindlichen Pflanzen gezeigt werden, dass einhergehend mit der Steigerung der Ethylenbiosynthese auch eine deutliche Erhöhung des ABA-Gehaltes bevorzugt im Sproßgewebe aber auch in anderen sensitiven Geweben der getesteten empfindlichen dikotylen Pflanzen auftrat (Scheltrup & Grossmann, 1995; Grossmann et al., 1996; Grossmann, 1998; Grossmann & Scheltrup, 1998; Hansen & Grossmann, 2000; Grossmann & Hansen, 2001). Eine enge Korrelation besteht dabei zwischen der Veränderung des Hormonhaushaltes und auftretenden morphologisch physiologischen Veränderungen (Grossmann, 1998; Hansen & Grossmann, 2000; Grossmann, 2000). Entsprechend den postulierten Wirkungseigenschaften von Quinmerac kommt es in empfindlichen Pflanzen, wie am Beispiel von *Galium aparine* eindeutig gezeigt werden konnte, bei zunehmender herbizider Wirkstoffkonzentration zu einer Steigerung des endogenen Gehaltes an reaktiver ABA. Schon 5h nach Applikation des herbiziden Wirkstoffes ist ein Anstieg des Abscisinsäuregehaltes nachweisbar, der 48h nach Herbizidapplikation das etwa 70fache der Ausgangskonzentration erreichte (Grossmann & Scheltrup, 1995; Scheltrup & Grossmann, 1995; Grossmann, 1998; Hansen & Grossmann, 2000). Dieser Anstieg konnte nur in herbizidsensitiven Pflanzenarten gezeigt werden, während bei natürlich insensitiven Pflanzen (entsprechend der postulierten Möglichkeiten eines verstärkten Metabolismus bzw. einer verringerten Targetsensitivität, siehe Einleitung) kein signifikanter Anstieg der ABA zu verzeichnen war (Grossmann & Scheltrup, 1995; Grossmann et al., 1996). In Anlehnung an bisherige Experimente wäre es demnach theoretisch möglich, eine Aussage über die in Pflanzen erzeugte Toleranz mit Hilfe des ermittelten ABA-Gehaltes zu treffen. Bei natürlich sensitiven Pflanzen, ohne Expression eines scFv-Antikörperfragmentes, würde es zu einer Steigerung und Akkumulation von Abscisinsäure kommen während bei toleranten Pflanzen bzw. Keimlingen durch die antikörpervermittelte Bindung und Inaktivierung des herbiziden Wirkstoffes eine theoretisch geringere Steigerung oder gar keine Steigerung des Gehaltes an Abscisinsäure möglich wäre. In Anwendung für diese Arbeit sollten die aus den hydroponischen Biotests erhaltenen Ergebnisse (Abschnitt 4.8) durch die Konzentrationsbestimmung eines, entsprechend den Laborvoraussetzungen möglichst einfach nachweisbaren und meßbaren Parameters ergänzt werden. Die Messung des Gehaltes von immunreaktiver Abscisinsäure in Pflanzen bzw. Pflanzenteilen mit Hilfe der indirekten ELISA-Technik stellt eine in der Arbeitsgruppe Phytoantikörper gut etablierte Nachweismethode dar (Abbildung 46). Für die Bestimmung des jeweiligen ABA-Gehaltes der Keimlinge bzw. Pflänzchen wurden Samen von transgenen Anti-Quin-scFv exprimierenden Linien und von Kontrollpflanzenlinien (SNN-WT, UF) sterilisiert und für die Keimung auf Nährmediumplatten ausgelegt (Vergleich 3.8).

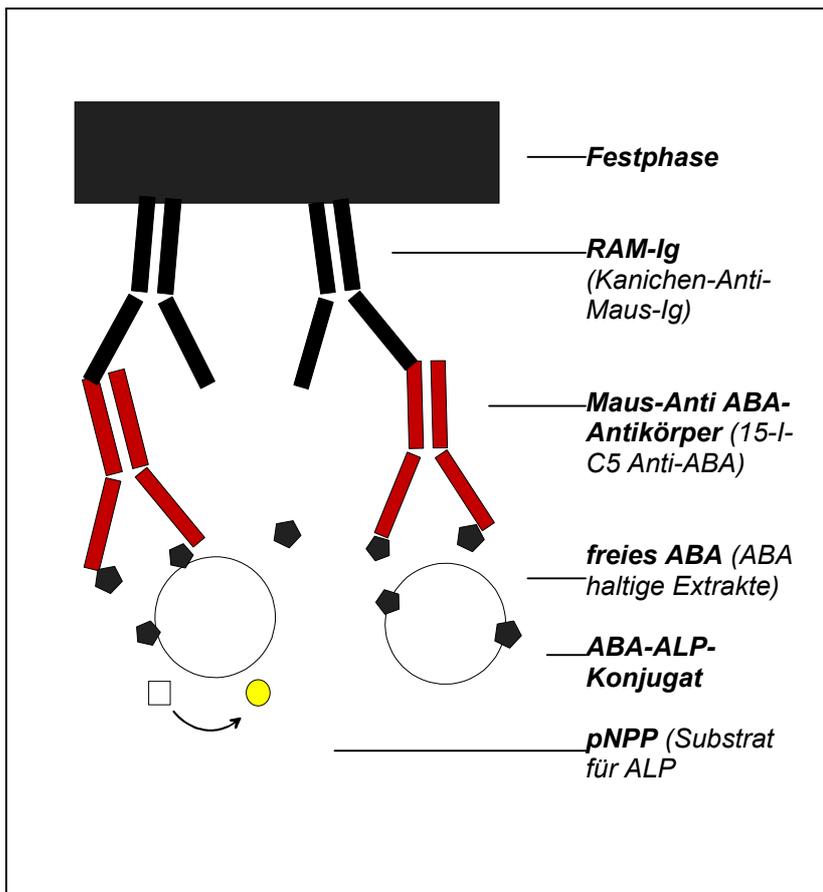


Abb.46: Schematische Darstellung des indirekten ELISA zum Nachweis der Abscisinsäurekonzentration (ABA-Gehaltes) in pflanzlichen Extrakten. Die ELISA-Platten wurden mit RAM-Ig beschichtet (siehe Abschnitt), mit dem monoklonalen Antikörper 15-I-C5, den ABA-haltigen pflanzlichen Extrakten und einem ABA-ALP Konjugat inkubiert. Der Nachweis von Antikörper gebundenem ABA-ALP erfolgte durch den Umsatz des zugesetzten Substrates pNPP und anschließender Vermessung bei einer OD von 405nm im ELISA-Reader.

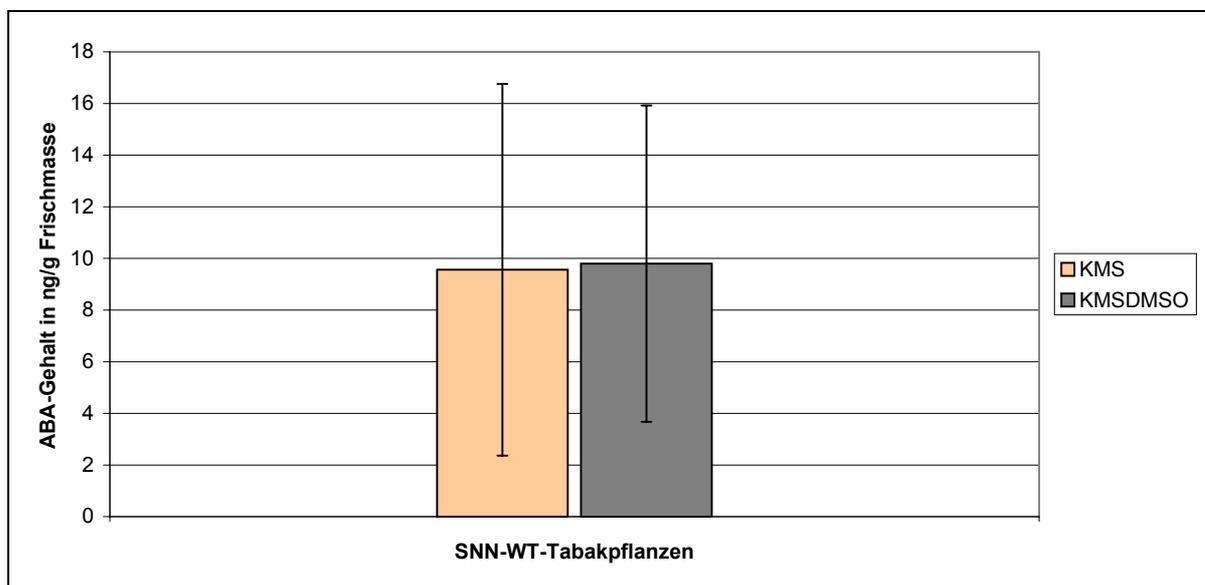


Abb.47: Durchschnittlicher ABA-Grundgehalt bei Tabakwildtyp-Kontrollpflanzen nach Inkubation in Applikationskontrollösungen des verwendeten Toleranztestsystems. Verschiedene Wildtyppflanzenlinien ($n=50$) wurden auf MS-Medium angezogen und für maximal 3h in den Applikationskontrollösungen KMS (nur MS-Medium) und KMS/DMSO (MS-Medium mit DMSO; 0,1%) inkubiert. Anschließend wurden die Pflänzchen in MS-Medium überführt und für 48h im Kulturraum stengelassen. Die Bestimmung des endogenen pflanzlichen ABA-Gehaltes im Blattmaterial erfolgte im ELISA unter Verwendung des monoklonalen Antikörper 15-I-C5 und einem ABA-ALP Konjugat. Der Nachweis von Antikörper gebundenem ABA-ALP erfolgte durch den Umsatz des zugesetzten Substrates pNPP und anschließender Vermessung bei einer OD von 405nm im ELISA-Reader.

In Vorversuchen wurde sowohl der Einfluß bzw. die auftretenden Unterschiede des Entwicklungsstadiums der Keimlinge (3-, 4- oder 5-Blattstadium) als auch der Einfluß des Vorhandenseins der Wurzel bei der Bestimmung des ABA-Gehaltes untersucht. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Einfluß bzw. Unterschied der getesteten Entwicklungsstadien der Keimlinge auf den bestimmten ABA-Gehalt (Daten nicht gezeigt). Auch das Vorhandensein oder die Fehlen des Wurzelgewebes bei der Herstellung der Pflanzenextrakte hatte keinen Einfluß auf die gemessenen endogenen Abscisinsäuremengen. Entsprechend diesen Ergebnissen wurden die Keimlinge im 4-Blattstadium für die Konzentrationsbestimmungen verwendet. In den ersten Tests wurden die jeweiligen ABA-Grundgehalte von Kontrollkeimlingen und von transgenen Keimlingen in Abwesenheit des Herbizides Quinmerac untersucht. Hierfür wurde eine größere Anzahl von verschiedenen individuellen Keimlingen der einzelnen Pflanzenlinien getestet. Die Messung des Abscisinsäuregehaltes erfolgte 48h nach Applikation der Kontrolllösungen im ELISA. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 47 und 48 dargestellt.

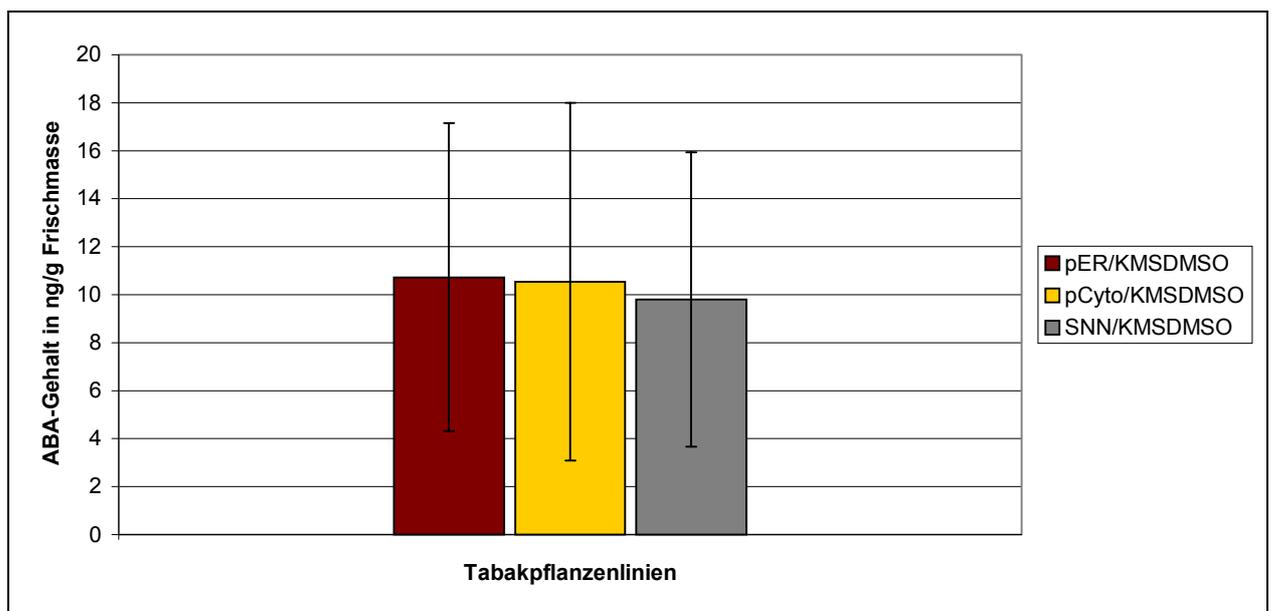


Abb.48: Durchschnittlicher ABA-Grundgehalt bei transgenen Tabakpflanzenlinien mit ubiquitärer Expression und Retention des Einkettenantikörpers im ER ($x=33$) und mit ubiquitär zytosolischer Expression ($y=35$) sowie bei Tabakwildtyp-Kontrollpflanzen ($z=50$) nach Inkubation in einer Applikationskontrollösung des verwendeten Toleranztestsystems. Verschiedene Tabakpflanzenlinien (transgen und Wildtyp) wurden auf MS-Medium angezogen und für maximal 3h in der Applikationskontrollösung KMS/DMSO (MS-Medium mit DMSO; 0,1%) inkubiert. Anschließend wurden die Pflänzchen in MS-Medium überführt und für 48h im Kulturraum stengelassen. Die Bestimmung des endogenen pflanzlichen ABA-Gehaltes im Blattmaterial erfolgte nach 48h im ELISA unter Verwendung des monoklonalen Antikörper 15-I-C5 und einem ABA-ALP Konjugat. Der Nachweis von Antikörper gebundenem ABA-ALP erfolgte durch den Umsatz des zugesetzten Substrates pNPP und anschließender Vermessung bei einer OD von 405nm im ELISA-Reader.

Die ermittelten individuellen Konzentrationswerte (in ng/g Frischmasse) zeigten sowohl bei den Kontrollpflanzen als auch bei den transgenen Linien innerhalb einer Pflanzenserie eine sehr starke Streuung, die durch die jeweilige sehr große Standardabweichung dargestellt wird. Im direkten Vergleich der gemittelten Konzentrationswerte von transgenen Keimlingen und von Kontrollkeimlingen (ohne Berücksichtigung der Standardabweichung) konnte jedoch keine größeren Unterschiede im ABA-Grundgehalt festgestellt werden (Abbildung 48). Die weiteren Experimente sollten dem Nachweis der Toleranz anhand der Bestimmung des ABA-gehaltes in Anwesenheit unterschiedlich konzentrierter Herbizidlösungen dienen. Dazu wurden individuelle transgene Tabakpflänzchen und Kontrollpflänzchen in Quinmerac haltigen Applikationslösungen für 3h inkubiert und anschließend für 48h in einer Nährlösung stehengelassen. Die Messung der endogenen Abscisinsäurekonzentrationen erfolgte 48h nach Applikation im ELISA. Auf der Grundlage der Ergebnisse aus der Bestimmung der ABA-Grundgehalte war zu erwarten, dass auch bei diesen Messungen starke Schwankungen zwischen den einzelnen ABA-Werten auftreten würden:

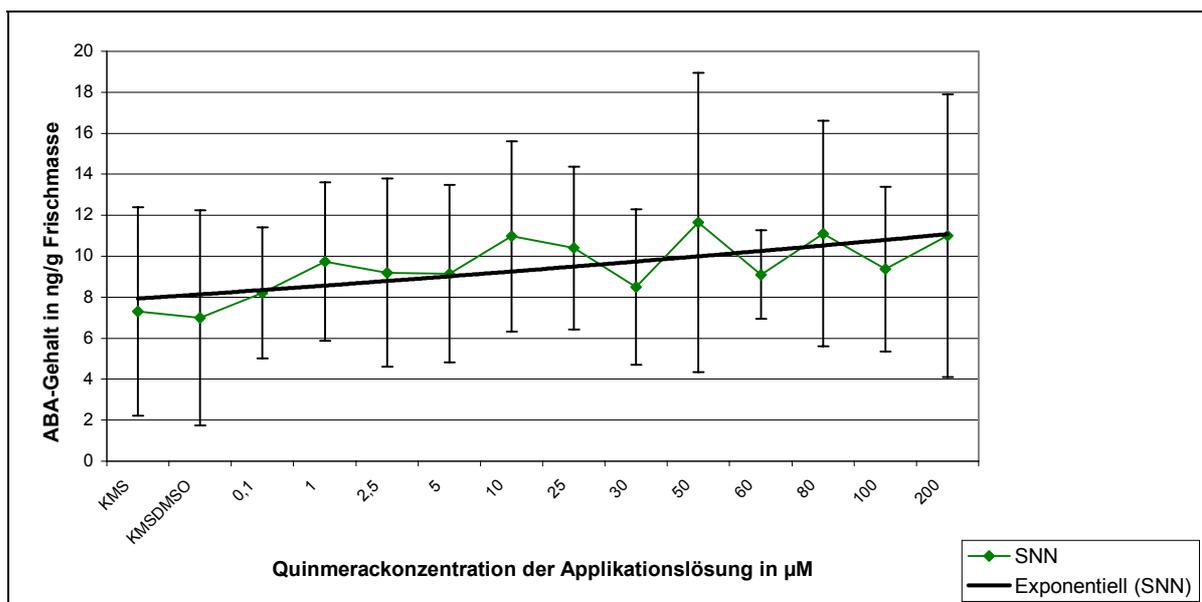


Abb.49: Durchschnittlicher ABA-Gehalt (mit Standardabweichung) bei Tabakwildtyp-Kontrollpflanzen nach Inkubation in den Applikationskontrollösungen KMS/ KMSDMSO und unterschiedlich konzentrierten Quinmerac-haltigen Applikationslösungen des verwendeten Toleranztestsystems. Verschiedene Wildtyppflanzenlinien (je Konzentration $z=18$) wurden auf MS-Medium angezogen und für maximal 3h in den Applikationskontrollösungen KMS (nur MS-Medium), KMS/DMSO (MS-Medium mit DMSO; 0,1%) und den Quinmerac-haltigen Applikationslösungen (MS-Medium mit 0,1-200µM Quinmerac in DMSO) inkubiert. Anschließend wurden die Pflänzchen in MS-Medium überführt und für 48h im Kulturraum stehengelassen. Die Bestimmung des endogenen pflanzlichen ABA-Gehaltes im Blattmaterial erfolgte nach 48h im ELISA unter Verwendung des monoklonalen Antikörper 15-I-C5 und einem ABA-ALP Konjugat. Der Nachweis von Antikörper gebundenem ABA-ALP erfolgte durch den Umsatz des zugesetzten Substrates pNPP und anschließender Vermessung bei einer OD von 405nm im ELISA-Reader (ΔOD_{405nm}). Die eingefügte schwarze Linie ist eine mittels Excel erstellte exponentielle Trendlinie.

Die Ergebnisse der ABA-Messungen bei Kontrollpflanzen und bei transgenen Tabakpflanzen in Abhängigkeit von der Applikation des Herbizides sind in Abbildung 49 und 50 dargestellt. Es zeigte sich dabei, dass der durch herbizidinduziertes Ethylen vermittelte ABA-Anstieg bei Tabakwildtyppflanzen im Vergleich mit dem in der Literatur beschriebenen etwa 70 fachen Anstieg der Abscisinsäurekonzentration in *Galium aparine* eher sehr gering ist. Eine Aussage über den tatsächlichen Anstieg des Abscisinsäuregehaltes in den Kontrollpflanzen läßt sich aufgrund der großen Standardabweichung nicht treffen. Nur bei einer genügend großen induzierten Änderung der ABA-Konzentration (ΔC_{ABA}) würden die auftretenden Standardabweichungen vernachlässigbar sein. Ein signifikanter Nachweis der antikörpervermittelten Toleranz in transgenen Pflanzen mittels des Parameters Abscisinsäure ist auf der Basis dieser Ergebnisse im Tabakwildtyppflanzen (zu geringer Anstieg der ABA, zu große Standardabweichungen) sehr unwahrscheinlich.

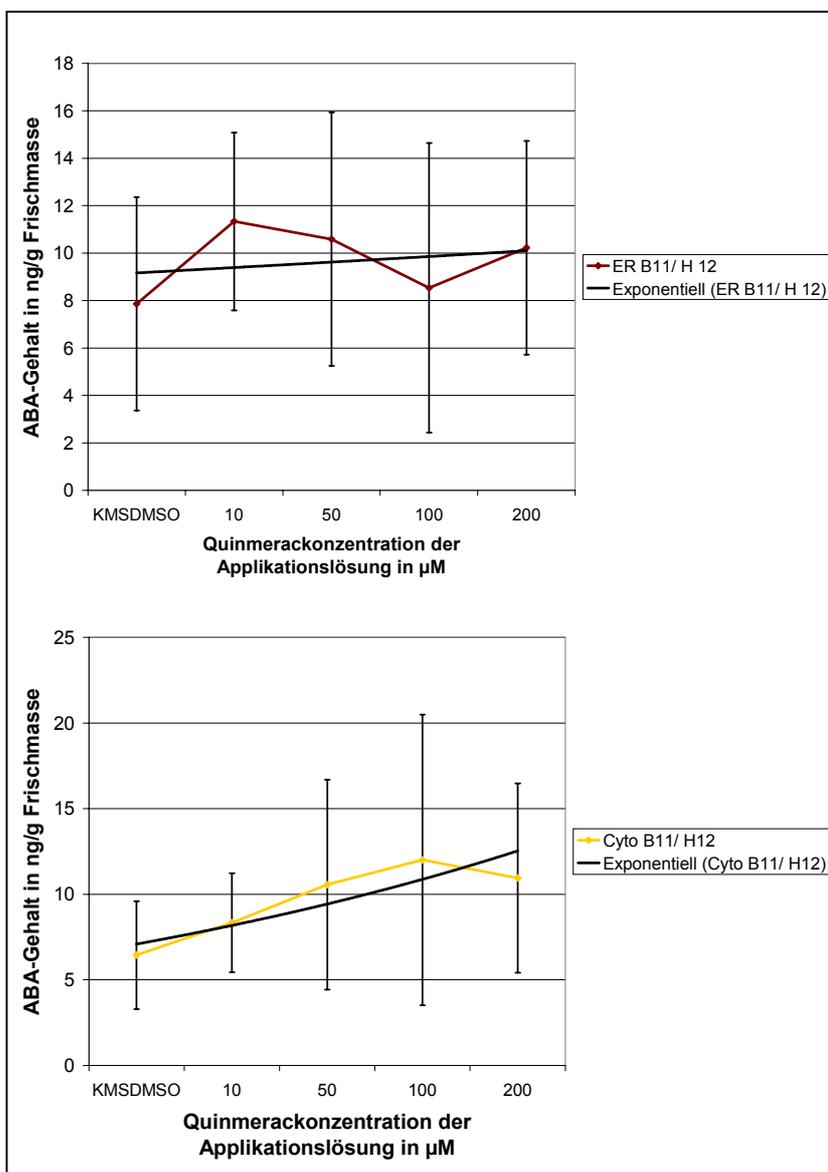


Abb.50: Durchschnittlicher ABA-Gehalt (mit Standardabweichung) bei den transgenen Pflanzenlinien ER B11/ H12 und Cyto B11/ H12 nach Inkubation in der Applikationskontrollösung KMS/DMSO und unterschiedlich konzentrierten Quinmerac-haltigen Applikationslösungen des verwendeten Toleranz-testsystems. Verschiedene transgene Pflanzenlinien (je Konzentration $z=18$) wurden auf MS-Medium angezogen und für maximal 3h in der Applikationskontrollösung, KMS/DMSO (MS-Medium mit DMSO; 0,1%) und den Quinmerac-haltigen Applikationslösungen (MS-Medium mit 10-200µM Quinmerac in DMSO) inkubiert. Die Bestimmung des endogenen pflanzlichen ABA-Gehaltes im Blattmaterial erfolgte nach 48h im ELISA.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die ABA-Konzentrationen verschiedener transgener Tabakpflanzenlinien 48h nach Applikation der Quinmerac- haltigen Lösungen im ELISA bestimmt. Auch bei diesen Messungen traten erhebliche Standardabweichungen auf. Eine Aussage über eine theoretisch postulierte antikörpervermittelte Reduzierung der Änderung des Abscisinsäuregehaltes in Anwesenheit der herbiziden Substanz Quinmerac läßt sich nicht treffen. Die in die Diagramme eingefügten Trendlinien wurden mittels exponentieller Regression in Excel erstellt und dienten nur der vereinfachten Anschauung. Ein signifikanter Nachweis der antikörpervermittelten Toleranz kann damit nicht gezeigt werden. In Abbildung 51 sind die Ergebnisse der ABA-Messungen bei transgenen Pflanzenlinien und bei Kontrollpflanzenlinien nach Applikation der Herbizid haltigen Lösungen noch einmal vergleichend (ohne Standardabweichung) dargestellt.

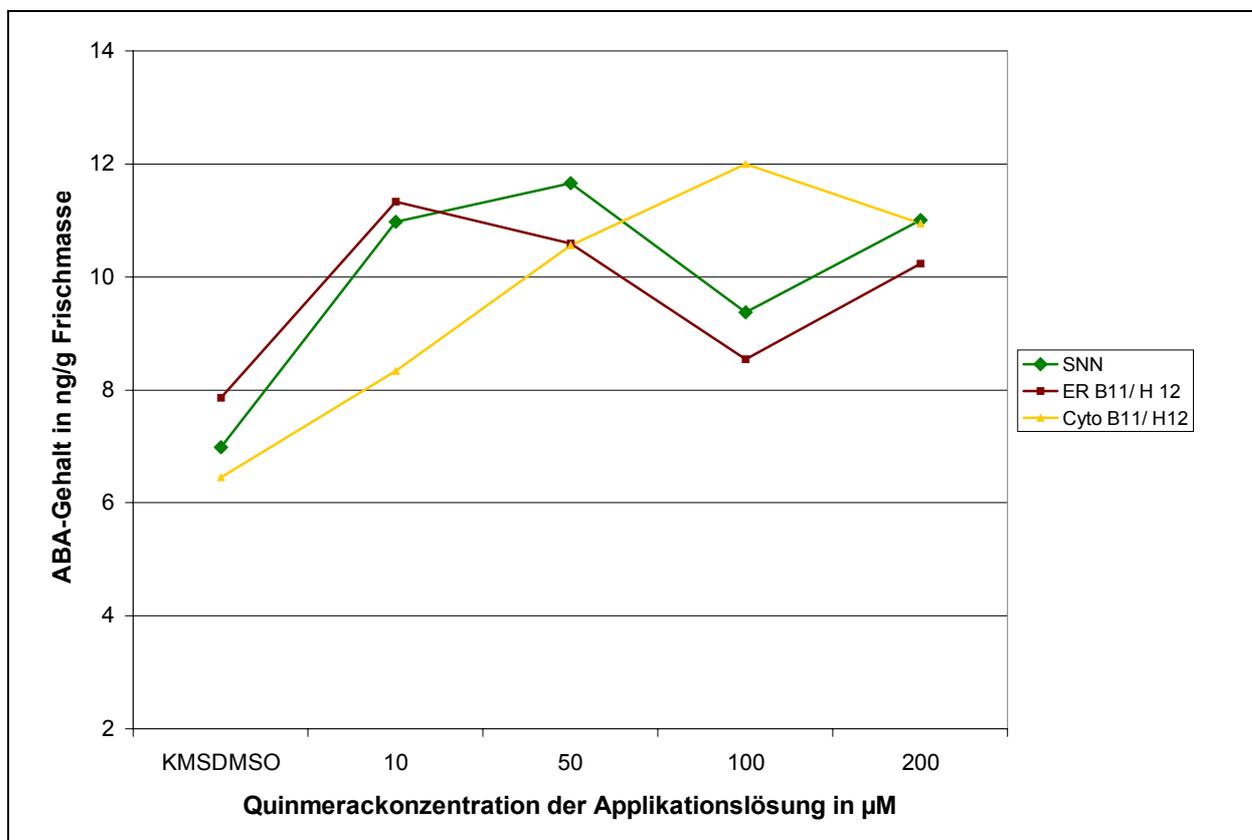


Abb.51: Durchschnittliche ABA-Konzentrationen (ohne Standardabweichung) bei Tabakwildtyp-Kontrollpflanzen (SNN) und bei den transgenen Pflanzenlinien ER B11/ H12 und Cyto B11/ H12 nach Inkubation in der Applikationskontrollösung KMS/DMSO und unterschiedlich konzentrierten Quinmerac-haltigen Applikationslösungen des verwendeten Toleranztestsystems. Verschiedene Wildtyppflanzenlinien (je Konzentration $z=18$) und transgene Pflanzenlinien wurden auf MS-Medium angezogen und für maximal 3h in der Applikationskontrollösung KMS/DMSO (MS-Medium mit DMSO; 0,1%) und den Quinmerac-haltigen Applikationslösungen (MS-Medium mit 10-200µM Quinmerac in DMSO) inkubiert. Anschließend wurden die Pflänzchen in MS-Medium überführt und für 48h im Kulturraum stengelgelassen. Die Bestimmung des endogenen pflanzlichen ABA-Gehaltes im Blattmaterial erfolgte nach 48h im ELISA unter Verwendung des monoklonalen Antikörper 15-I-C5 und einem ABA-ALP Konjugat. Der Nachweis von Antikörper gebundenem ABA-ALP erfolgte durch den Umsatz des zugesetzten Substrates pNPP und anschließender Vermessung bei einer OD von 405nm im ELISA-Reader (ΔOD_{405nm}).

Es bleibt festzustellen, dass sich die Bestimmung der endogenen ABA-Konzentration als Toleranzparameter in dem verwendeten Pflanzensystem Tabak als nicht geeignet erwies. Es konnte auf Grund der sehr großen Standardabweichungen der einzelnen Werte keine eindeutige Aussage über eine postulierte mögliche Reduzierung des ABA-Gehaltes auf der Grundlage der Neutralisierung der herbiziden Substanz durch die Einkettenantikörper gemacht werden. Folglich konnten auch keine Rückschlüsse auf eine damit eng korrelierende antikörpervermittelte Toleranz gezogen werden. Auf die theoretisch möglichen Ursachen wird in der Diskussion genauer eingegangen.

5 Diskussion

Der Anbau und die Verwendung von Pflanzen stand schon seit jeher im Mittelpunkt des Interesses der Menschen. In der heutigen Zeit ist man vor allem bestrebt, bedingt durch die steigenden Ansprüche in der Nahrungsversorgung von Mensch und Tier, durch die Entwicklung neuer Methoden in der Landwirtschaft (im Anbau, im Pflanzenschutz, bei der Ernte und bei der Verarbeitung) sowie durch die Entwicklung und Anwendung von Kulturpflanzensorten mit verbesserten Eigenschaften Ertragsteigerungen zu erzielen und Ertragsverluste zu minimieren.

Die Verwendung gentechnischer Methoden in der Pflanzenbiotechnologie konnte dabei wesentlich zur Verbesserung der Eigenschaften von Pflanzen, beispielsweise durch Übertragung und Expression von Genen pflanzlichen bzw. nicht pflanzlichen Ursprungs, beitragen und ermöglichte zudem die Erweiterung des Anwendungsspektrums von Pflanzen als Biofabriken im Sinne des „Molekular Farming“ (*Fischer et al., 1999; Kumar, 2001; Janick, 2001*). Eines der Hauptanwendungsgebiete pflanzenmolekulargenetischer Techniken und Arbeiten der letzten Jahre ist die Erzeugung von Resistenz bzw. Toleranz bei Kulturpflanzensorten gegenüber einer Vielzahl biotischer Faktoren wie beispielsweise Bakterien, Viren, Pathogenen (*Bajrovic et al., 2001*) und abiotischer Faktoren wie beispielsweise Salze, Trockenheit und Xenobiotika, die bei sensitiven, nicht resistenten bzw. toleranten Kulturpflanzenarten zu enormen Ertragsverlusten führen können. Die Kombination von Pflanzenbiotechnologie und Antikörpertechnologie gehört zu den innovativsten Anwendungen und bietet interessante Methoden und Alternativen für eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten wie beispielsweise zur Erzeugung von Resistenz bzw. Toleranz in Pflanzen (*Tavladoraki et al., 1993; Fecker et al., 1997; Schillberg et al., 2000, 2001; De Jaeger, 2000*).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Modellsystems zur Erzeugung von Toleranz in Pflanzen gegenüber einem exogen applizierten Herbizid durch Expression intrazellulär lokalisierter spezifisch gegen dieses Herbizid gerichteter Einkettenantikörper. Es konnte gezeigt werden, dass es in einem definierten Konzentrationsbereich (5µM-25µM) aufgrund der immunmodulierenden Eigenschaften verschiedener pflanzlich exprimierter spezifischer scFv-Einkettenantikörper (Anti-Quin-scFv) zu einer verbesserten Toleranz der entsprechenden transgenen scFv-exprimierenden Pflanzen gegenüber dem exogen applizierten Herbizid im direkten Vergleich mit mitgeführten Kontrollpflanzen kommt.

5.1 Moderne Landwirtschaft und Herbizideinsatz – Welche Vor- und Nachteile hat die Erzeugung und Anwendung herbizidtoleranter bzw. –resistenter Kulturpflanzen im System des „Integrierten Pflanzenbaus“ ?

Pflanzen bilden in Form von Nahrungs- und Futtermitteln sowie als Rohstoff in Industrie und Handwerk die Grundlage des täglichen Lebens. Aufgrund des weltweit drastischen Wachstums der Bevölkerung in der letzten Hälfte des vorigen Jahrhunderts und der daraus resultierenden Problematik des steigenden Nahrungsbedarfes sowie der begrenzten Anzahl landwirtschaftlich nutzbarer Anbauflächen ist in vielen Teilen der Welt eine effektivere Landwirtschaft notwendig. Hierzu gehören neben der Entwicklung und Verwendung hochleistungsfähiger, in Bezug auf ihre inneren und äußeren Eigenschaften optimierter Kulturpflanzensorten (*Sonnewald & Herbers, 2001*) vor allem verbesserte landwirtschaftlich technische Methoden zum Anbau, zum Schutz der Kulturpflanzenbestände, zur Ernte sowie zur Verarbeitung bzw. Lagerung des Erntegutes und damit letztlich zur Sicherung der Ernteerträge. Ein ganz wesentlicher Bestandteil ist dabei die Verbesserung und Optimierung des Schutzes der angebauten Kulturpflanzen gegen Krankheiten, Parasiten, Insekten, Viren, Pilze und Unkräuter durch Verwendung von Pestiziden bzw. Xenobitika, die eine Verbesserung der Quantität und Qualität des Erntegutes bewirken (*Cobb, 1992; Dodge, 1989; Neupert & Knirsch, 1994; Powles & Holtum, 1994; Powles & Shaner, 2001*). Neben der Verwendung von Insektiziden und Pestiziden im Zuge des modernen Pflanzenschutzes bildet die Verwendung von Herbiziden zur Kontrolle von Unkrautpopulationen eine maßgebliche Ursache für eine ausreichende und dauerhafte Nahrungsproduktion. Mittels dieser Pestizide konnte zumeist, entsprechend den lokalen Gegebenheiten und unter bestimmten Bedingungen, Ertragssteigerungen auf gleichbleibenden Anbauflächen erzielt werden (*Olofsdotter et al., 2000*). Die Problematik der Unkrautbekämpfung ist seit jeher ein wichtiger Bestandteil des landwirtschaftlichen Kulturpflanzenanbaus. Sie dient in erster Linie der Reduzierung der durch Unkräuter hervorgerufenen Schäden und der Verlustminimierung bei landwirtschaftlichen Erträgen. Die jährlich weltweit durch Unkraut induzierten Verluste, in Abhängigkeit von der jeweiligen Datenquelle, belaufen sich auf etwa 5-15%, wobei die in einigen Ländern Afrikas induzierten Ertragsverluste wesentlich höher liegen können (*Hock et al., 1995; Hatzios, 1989*). Ohne Herbizidanwendung würden die prozentualen Ertragsverluste weltweit gesehen noch deutlich höher liegen (*Neupert & Knirsch, 1994*). Der kontrollierte Einsatz von Herbiziden in der Landwirtschaft hat vor allem ökonomisch, wirtschaftliche und soziale Ursachen und Vorteile, die deren weitverbreitete Anwendung begünstigte (*Burnside, 1992; Hock et al., 1995*). Die Effektivität des Pestizidgebrauches ist dabei immer an bestimmte Randbedingungen wie beispielsweise Wirkungsmuster, Wirkungssicherheit und Rentabilität gekoppelt. Aufgrund der steigenden Problematik der Verunreinigung von Grund-, Oberflächenwasser und Böden müssen moderne Herbizide jedoch eine ganze Reihe von ökologisch und landwirtschaftlich wichtigen Ansprüchen genügen (*Van Dijk & Guicherit,*

1999; Pimentel et al., 1998). Man ist daher bestrebt, trotz der Vielzahl verschiedener Herbizidklassen, neue Herbizide unter modernen Gesichtspunkten wie beispielsweise hoher Effektivität, Toxizität, Selektivität, Umweltverträglichkeit, geringere wirksame Aufwandmengen, Persistenz sowie Mobilität zu entwickeln (Neupert & Knirsch, 1994; Tsafaris, 1996). Auch die Entwicklung neuer Möglichkeiten der Kontrolle von Problemunkräutern oder Unkrautpopulationen besonders in Hinblick auf die wachsende Problematik des verstärkten Auftretens resistenter Unkrautbiotypen, bedingt durch den Einsatz von Herbiziden im landwirtschaftlichen Anbau (Selektionsdruck), ist eine der gestellten Anforderungen in einer modernen Landwirtschaft (Cobb, 1992; Dodge, 1989; Hock et al., 1995). Bei der Verwendung von Herbiziden im landwirtschaftlichen Kulturpflanzenanbau wird daher mehr und mehr auf die Verwendung selektiver Herbizide zurückgegriffen, wobei hierbei oft das mit der Entwicklung selektiver Wirkstoffe einhergehende Problem einer geringfügigeren Kulturpflanzenverträglichkeit auftritt. Eine Möglichkeit dem entgegenzuwirken ist die Einführung von herbizidresistenten bzw. -toleranten Kulturpflanzensorten im Kontext des gesamten Unkrautmanagementsystems (Hock et al., 1995; Powles & Shaner, 2001). Die Entwicklung von Herbizidtoleranz in Kulturpflanzen kann mit Hilfe herkömmlicher Züchtungsmethoden, basierend auf dem Vorhandensein natürlich vorkommender Toleranzmechanismen als auch durch gentechnische Methoden erfolgen (Dodge, 1989; Hock et al., 1995;). Die dabei in den Pflanzen erzeugte Toleranz ist durch eine gesteigerte Verträglichkeit bzw. Unempfindlichkeit der gesamten Pflanze oder von Pflanzenteilen gegenüber dem applizierten Herbizid gekennzeichnet. Die postulierten Vorteile kommerziell nutzbarer herbizidresistenter bzw. -toleranter Kulturpflanzenarten sind vielfältig. Obwohl sehr häufig in der Literatur kontrovers diskutiert könnte die HR-Technik: (a) einfachere Lösungen bei auftretenden schwierigen Problemen im Unkrautmanagement, aufgrund der Möglichkeit der Verwendung nicht selektiver Breitbandherbizide, deren Nutzung sonst nicht realisierbar wäre (künstlich erzeugte Selektivität), ermöglichen (Sandermann & Ohnesorge, 1994; Olofsdotter et al., 2000); (b) unter dem Aspekt der Verträglichkeit bzw. der steigenden ökologischen Ansprüchen die Anwendung toxikologisch akzeptabler und umweltverträglicherer (Persistenz, Mobilität, Toxizität) herbizider Wirkstoffe zulassen (Böger, 1994; Sandermann & Ohnesorge, 1994; Park et al., 2001); (c) eine theoretisch relevante Reduzierung der Häufigkeit der Pestizidapplikation und der tatsächlichen Aufwandmengen im Zusammenhang mit einem effektiv und sinnvoll gestaltetem Unkrautmanagementsystem, das letztlich zu einer Reduktion der Umweltbeeinflussung bzw. der Umweltzerstörung führen würde, gestatten (geringere Boden-, Grundwasser- und Atmosphärenbelastung, Van Dijk & Guicherit, 1989); (d) die Verwendung von herbizidtoleranten Pflanzen im Zusammenhang mit neueren Methoden der Unkrautkontrolle (nicht chemische Unkrautkontrollmechanismen, Aufwandmengen, Applikationszeitraum, Applikationsart, flexibler Herbizideinsatz) zur Verhinderung von Bodenerosionen beitragen und (e) die Verhinderung von zusätzlichem

Verlust artenreicher Landgebiete ermöglichen, da mittels herbizidresistenter bzw. –toleranter Kulturpflanzenarten höhere Ernteerträge auf bisher landwirtschaftlich genutztem Gebiet realisiert werden können, so dass bei steigendem Bedarf an Nahrungsmitteln keine zusätzliche Rekultivierung beispielsweise von Waldgebieten notwendig werden würde (Burnside, 1992; Keller et al., 2001; Olofsdotter et al., 2000; Powles & Shaner, 2001; Sonnewald & Herbers, 2001). Demgegenüber stehen eine Reihe von Nachteilen, die sich vor allem auf die generelle Verwendung von Herbiziden und den daraus im Zusammenhang mit der Anwendung toleranter bzw. resistenter Pflanzenarten resultierenden Problemen beziehen wie beispielsweise der unkontrollierte Pestizidgebrauch, die postulierte Möglichkeit der reduzierten Biodiversität sowie die theoretisch mögliche Übertragung der Resistenzgene auf Unkrautarten (Burnside, 1992; Keller et al., 2001).

5.2 Welche Methoden der Herbizidtoleranz bzw. Resistenzerzeugung bei Kulturpflanzen sowie deren Anwendung sind bisher etabliert bzw. postuliert wurden oder theoretisch möglich?

Die Entwicklung herbizidtoleranter bzw. -resistenter Kulturpflanzenarten mit Hilfe herkömmlicher Züchtungsmethoden sind begrenzt. Die Anwendung gentechnischer Methoden zur Erzeugung herbizidresistenter bzw. –toleranter Pflanzenarten unter Verwendung vielfältigster genetischer Ressourcen wie beispielsweise Mikroorganismen eröffnete weitere Entwicklungsmöglichkeiten. In den letzten Jahren wurden aufgrund der Erforschung von Resistenzmechanismen auftretender resistenter Unkrautbiotypen (Owen, 1989; Putwain & Collin, 1989; Übersicht in Cobb, 1992; Heap, 1994; Powles & Holtum, 1994; Hall et al., 1996; Preston et al., 1996; Powles & Shaner, 2001; Übersicht in Beckie et al., 2000) sowie bei toleranten Kulturpflanzenarten (Zajc et al., 1999; Deng & Hatzios, 2002), bei Mikroorganismen (Comai et al., 1983; De Block et al., 1987; Kishore et al., 1986; Piruzian, 1988; Stalker et al., 1988; Streber & Willmitzer, 1989; Sripaoraya et al., 2001) und von Toleranzmechanismen in tierischen Zellen (Ohkawa et al., 1999), als auch durch Untersuchung des Wirkungsmechanismus verschiedenster Herbizide (Übersicht in Oettmeier, 1999) Mechanismen zur Verbesserung der Toleranz gegenüber phytotoxisch wirksamer Substanzen durch die Anwendung gentechnischer Methoden entwickelt (Botterman & Leemans, 1988; Dodge, 1989; Übersicht Llewellyn et al., 1990; Cobb, 1992; Powles & Holtum, 1994; Tsiftaris, 1996). Hierzu gehören (i) die Möglichkeit einer reduzierten Inhibierungsaktivität; (ii) die Modifizierung der Struktur des Targetenzym – resultierend in einer veränderten, modifizierten Sensitivität des Zielenzym gegenüber dem Herbizid. Beispiele für die erfolgreiche Anwendung dieser Strategie der Toleranzerzeugung sind die Expression einer veränderter Form des Zielenzym der Herbizide Imidazolin, Atrazin und von Sulfonylharnstoffen (Chaleff & Ray, 1984; Shaner & Anderson, 1985; Cheung et al., 1988, Haughn et al., 1988) sowie die Expression einer mutierten Form des bakteriellen *aroA*

Resistenzgens und einer veränderten Form der EPSP-Synthase, die zur Erzeugung von Toleranz gegenüber Glyphosat verwendet wurden sind (Comai et al., 1985; Fillatti et al., 1987; Frayley et al., 1987; Hinchee et al., 1988; Ye et al., 2001; Meilan et al., 2002). Weitere Mechanismen sind (iii) die Erhöhung der Detoxifikation, der Metabolisierung bzw. des Abbaus der aktiv wirksamen phytotoxischen Substanz beispielsweise durch die Expression des *bar* Gens, kodierend für eine Phosphinothricin Acetyltransferase, aus *Streptomyces hygroscopicus* (De Block et al., 1987; Gallo-Meagher & Irvine, 1996; Chen & Punja, 2002, Harcourt et al., 2000, Blair-Kerth et al., 2001; Lutz et al., 2001; Park et al., 2001; Sripaoraya et al., 2001, Zeldin et al., 2002) und die Expression des *bxn* Gens, kodierend für eine Nitrilase (Stalker et al., 1988). Die enzymvermittelte Toleranz basiert auf der Konvertierung des eingesetzten aktiven herbiziden Wirkstoffes wie beispielweise Bialaphos, Basta oder Bromoxynil in eine nicht toxische, inaktivierte acetylierte Form (Tsiftaris, 1996). Eine weitere häufig angewendete Möglichkeit beruht auf der Expression von Genen wie beispielsweise *tfdA*, die für verschiedene Monooxygenasen kodieren (Lyon et al., 1989; Streber & Willmitzer, 1989; Ohkawa et al., 1999; Yordanova et al., 2001) oder der Identifizierung, Charakterisierung und Expression pflanzlicher detoxifizierender Enzyme oder Enzymsysteme wie beispielsweise Oxidasen, Amidasen bzw. Dekarboxylasen (Tsiftaris, 1996). Zu den am meisten angewendeten Mechanismen zur Erzeugung herbizidtoleranter Pflanzen gehört (iiii) die Überproduktion des Targetenzym, die sich in einer Änderung der Quantität des Zielenzym äußert. Beispiele hierfür sind die Erzeugung von Toleranz gegenüber Glyphosat durch Überexpression des pflanzlichen Enzyms 5-Enol-Pyruvylshikimate-3 Phosphat Synthase (Shah et al., 1986) und gegenüber Phosphinothricin mittels Überexpression der Glutaminsynthetase (Eckes & Wengemayer, 1987). Eine weitere theoretisch denkbare Möglichkeit der Toleranzerzeugung besteht (iiiiii) in einer reduzierten bzw. herabgesetzten Aufnahme und Translokation der phytotoxischen Substanz (Quinn, 1990). Als nachteilig erweist sich bei den beschriebenen Methoden trotz der zumeist erzielten Toleranzverbesserung (siehe angeführte Beispiele oben), der direkte, möglicherweise wichtige Stoffwechselwege beeinflussende Eingriff in den Pflanzenmetabolismus. Diese Beeinflussung kann beispielsweise durch Erzeugung eines Ungleichgewichts im pflanzlichen Stoffwechsels bei Überproduktion eines spezifischen Zielproteins erfolgen oder mit der Modifizierung der Affinität des Zielenzym einhergehenden theoretisch möglichen drastischen Reduzierung der Enzymaktivität (Tsiftaris, 1996).

Ein neuer Ansatz für die Entwicklung und Erzeugung herbizidtoleranter Kulturpflanzenarten sollte durch die Kombination von Pflanzenbiotechnologie und Antikörpertechnologie geschaffen werden. Bisherige Anwendungen von Antikörpern in der Landwirtschaft, im Kontext der Pestizidnutzung, erfolgten vor allem als analytisches Mittel zum quantitativen und qualitativen Nachweis, zum schnellen Monitoring und zur schnellen, effektiven Detektionen von Antigenen beispielsweise von Herbiziden und Fungiziden in

verschiedensten Biomaterialien, in Bodenproben, in Wasserproben, in ganzen Pflanzen oder in Pflanzenteilen sowie in Nahrungsmitteln (*Jung et al., 1989; Sharp et al., 1991; Baumann & t' Hart-De Kleijn, 1993; Hock et al., 1995, 2000; Yau et al., 1998; Giraudi et al., 1999; Chiu et al., 2000; Spinks, 2000; Welzig et al., 2000; Charlton et al., 2001; Clegg et al., 2001; Tout et al., 2001; Chin et al., 2002; Lee et al., 2002*). Über die Expression von spezifisch gegen phytotoxisch wirkende Substanzen gerichtete Antikörper oder Antikörperfragmente in Pflanzen wurde bislang nur im Zusammenhang mit der Ausnutzung der spezifischen Antikörper-Antigen Reaktion als Grundlage der Reinigung von spezifischen phytotoxischen Molekülen wie beispielsweise von Xenobiotika sowie der theoretisch möglichen Entgiftung von belasteten Böden und Wasservorkommen berichtet (*Porter et al., 1997; Longstaff et al., 1998*).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modellsystem zur Erzeugung von Toleranz gegenüber einem exogen appliziertem herbiziden Wirkstoff (Quinmerac) durch die immunmodulierenden Eigenschaften pflanzlich exprimierter spezifisch gegen das Herbizid gerichteter Einkettenantikörper untersucht. Die grundlegende Idee dabei war, dass der exogen applizierte herbizide Wirkstoff nach Einschleusung in die Pflanzenzelle durch Bindung an die in den jeweiligen Kompartimenten exprimierten spezifischen scFv-Antikörperproteinen angereichert und inaktiviert wird. Diese Anreicherung, so wird postuliert, resultiert in einer Defizienz des Antigens in anderen Zellkompartimenten (*Conrad & Fiedler, 1998; Conrad & Manteuffel, 2001; De Jaeger et al., 2000*). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modellherbizid Quinmerac ist ein Vertreter der Gruppe der selektiv wirkenden Auxinherbizide, die die Herbizidanwendung in der Landwirtschaft revolutionierten (*Cobb, 1992; Devine et al., 1993; Roe et al., 1997*). Die phytotoxische, herbizide Wirkung der Auxinherbizide ist in ihrer supraoptimalen Auxinwirkung begründet. Zu den auftretenden charakteristischen morphologischen, physiologischen und biochemischen Veränderungen nach Applikation gehören beispielsweise Zellelongation, Epinastie, Hypertrophie, Stimulierung der Ethylenbiosynthese, Veränderung der Nukleinsäure und Proteinbiosynthese, Aktivierung der Plasmamembran ATPasen, Erhöhung H⁺ Extrusion, Erhöhung Ca²⁺ Influx, die in ihrer Gesamtheit zu ungeordnetem Wachstum und letztendlich zum Tod empfindlicher, sensitiver Pflanze führen (*Cobb, 1992; Coupland, 1994; Devine et al., 1993, Hall et al., 1996*). Die sich aus dem direkten Vergleich der Methoden zur Erzeugung herbizidtoleranter Pflanzen ergebenden Vor- und Nachteile werden im Abschnitt 5.8 eingehender diskutiert

5.3 Welche Möglichkeiten ergeben sich aus der Anwendung der Methode der Immunmodulation mittels spezifischer Einkettenantikörperfragmente in tierischen und pflanzlichen Systemen?

Rekombinante Antikörper können in bakteriellen, pflanzlichen und tierischen Zellen funktionell exprimiert werden. Aufgründessen wird die Nutzung der spezifisch

antigenbindenden Eigenschaften dieser Proteine auch außerhalb des natürlichen physiologischen Funktionsbereichesbereiches möglich. Besonderes Potential in Bezug auf die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten haben dabei die als Einkettenantikörper (scFv) bezeichneten rekombinanten Antikörperfragmente erlangt (*Carter & Merchant, 1997; Jones & Marasco, 1998; Marasco, 1999; Dankwardt, 2000; Gavilondo & Larrick, 2000; Holt et al., 2000; Terrada et al., 2000; Daly et al., 2001; Rau et al., 2002*). Diese rekombinanten Antikörperproteine bestehend aus einem Polypeptid, das keine zusätzliche *in vivo* Assemblierung bzw. komplexe Faltung benötigt, eröffnen aufgrund ihrer beschriebenen Eigenschaften, wie ihrer geringen Größe, die eine vereinfachte Penetration von Geweben ermöglicht, ihrer meist mit einem parentalen Antikörper vergleichbaren Antigenbindungsaktivität und der Möglichkeit der Fusion mit Effektorproteinen ein weites Feld der *in vitro* bzw. *in vivo* Anwendung (*Artsaenko et al., 1994; Biocca et al., 1994; Duan et al., 1994; Mhashilkar et al., 1995; Bird et al., 1988; Bird & Walker, 1991; Devlin et al., 1995; Smith et al., 1996*). Auf der Basis der hochaffinen Bindungseigenschaften der Antikörper bieten sich daher Anwendungsmöglichkeiten im medizinischen Bereich wie beispielsweise für Diagnose-, Therapie- oder Forschungszwecke, in der Industrie und in der Wissenschaft beispielsweise für eine Vielzahl von Nachweis- oder Reinigungsverfahren (*Hill et al., 1999; Xu et al., 1999; Dankwardt, 2000; Gavilondo & Larrick, 2000; Terrada et al., 2000; Daly et al., 2001; Rau et al., 2002*).

Eines der innovativsten Gebiete der letzten Jahre ist die Kombination von Pflanzenbiotechnologie und Antikörpertechnologie. Die Expression von Antikörpern und Antikörperfragmenten in Pflanzen, erstmals 1989 von *Hiatt und Mitarbeitern* gezeigt, wurde seitdem für die vielfältigsten Zwecke verwendet (*Hiatt et al., 1989; De Neve et al., 1993; Übersicht in Larrick, 1998, 2001; Schillberg et al., 2001*). Neben den vielfältigen *ex planta* Verwendungsmöglichkeiten ist die *in planta* Nutzung pflanzlich exprimierter Einkettenantikörper eines der interessantesten und erfolgsversprechendsten Anwendungsgebiete von scFv- Antikörperproteine (*Smith, 1996*). Hierzu gehören die Verwendung in der Diagnostik, in der biologischen Grundlagenforschung mit Hilfe der Technik der Immunmodulation und insbesondere in der landwirtschaftlichen Pflanzenbiotechnologie beispielsweise zur Erzeugung toleranter bzw. resistenter Pflanzen gegenüber Viren und anderen Pathogenen (Immunisierung, *Tavladoraki et al., 1993; Voss et al., 1995*). Die ursprünglich im tierischen System entwickelte und angewendete Methode der Immunmodulation mit Hilfe von Antikörpern bzw. rekombinanten Antikörperfragmenten ist eine der innovativsten Techniken zur Modifikation bzw. Regulation der Aktivität oder der Verfügbarkeit spezifischer zellulärer Targets und endogener Substanzen der letzten Jahre (*Marasco, 1995; Rondon & Marasco, 1997; Teillaud, 1999; De Jaeger et al., 2000; Lener et al., 2000; Conrad & Manteuffel, 2001*). Die Antikörper können durch Bindung ihres Zielantigens nach Eintritt bzw. Expression in der Zelle oder in einem bestimmten

Kompartiment der Zelle zelluläre Prozesse (Stoffwechselwege) beeinflussen. Eine erfolgreiche Immunmodulation ist gekennzeichnet durch die Anwendung hochaffiner gegen endogene Zielmoleküle gerichteter Antikörper bzw. Antikörperfragmente. Desweiteren muss die Möglichkeit bzw. Notwendigkeit einer zeitlich und örtlich regulierbaren intra- oder extrazellulären Expression und Akkumulation funktioneller Antikörperproteine in entsprechenden Organen, Geweben oder Kompartimenten der pflanzlichen Zelle durch Nutzung spezifischer Promotoren und spezifischer intrazellulärer Targetingsignale gewährleistet sein. Die Anwendung der Immunmodulation in Pflanzen ermöglicht eine effektive Strategie zur *in vivo* Untersuchung und Modulation der Funktion und Wirkung verschiedenster Zielmoleküle (beispielsweise spezifischer Regulationsfaktoren oder Stoffwechselmetabolite) in wichtigen Stoffwechselprozessen bzw. im pflanzlichen Metabolismus alternativ zu herkömmlich verwendeten Methoden. Außerdem bietet die intrazelluläre Expression von Antikörpern eine neue Möglichkeit der Erzeugung von Resistenz bzw. Toleranz gegenüber Pflanzenpathogenen. Zum Beispiel konnte durch die immunmodulierenden Eigenschaften spezifischer, gegen endogene niedermolekulare Pflanzenhormone gerichteter Antikörperfragmente eine verringerte Phytohormonverfügbarkeit in der Pflanze aufgrund der Bindung des Hormons durch den Antikörper erzielt werden (*Artsaenko, et al., 1995; Artsaenko, 1996; Artsaenko et al., 1998; Phillips et al., 1997; Shimada et al., 1999*). Im Zuge einer Immunisierung der Pflanzen mittels spezifischer, gegen exogen applizierte und im Gewebe angereicherter phytopathogener Krankheitserreger oder andere Pathogene (Viren, Nematoden), gerichteter Antikörperproteine konnten diese in ihrer Aktivität bzw. Mobilität modifiziert und eine partielle bzw. vollständige Toleranz erzeugt werden (*Tavladoraki et al., 1993; Übersicht in Fischer et al., 2001; Schillberg et al., 2001; Xiao et al., 2000*). Antivirale scFv-Einkettenantikörper wurden unter anderem in verschiedenen pflanzlichen Zellkompartimenten wie beispielsweise in der Plasmamembran und dem Zytosol exprimiert (*Bajrovic et al., 2001; Schillberg et al., 2000; Tavladoraki et al., 1993; Zimmermann et al., 1998*). Durch die immunmodulierenden Eigenschaften der scFv-Proteine konnte in den einzelnen Kompartimenten eine verbesserte Resistenz bzw. Toleranz gegenüber dem jeweiligen Virus erzeugt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen entstand die Idee der vorliegenden Arbeit, die immunmodulierenden Eigenschaften pflanzlich exprimierter spezifischer scFv-Antikörperfragmente zur Erzeugung von Resistenz bzw. Toleranz in Pflanzen gegenüber exogen applizierter Xenobiotika, insbesondere herbizider Wirkstoffe zu nutzen.

5.4 Die „Phage Display“ Technik als Methode der Wahl zur Isolierung herbizidspezifisch bindender scFv-Antikörperfragmente?

In der vorliegenden Arbeit wurden die spezifisch gegen das Modellherbizid Quinmerac gerichteten Einkettenantikörper B11, C11 und H12 mit Hilfe der 1990 erstmals von

McCafferty und Mitarbeitern vorgestellten „Phage-Display“ Technik gewonnen. Im Gegensatz zu der von *Köhler und Milstein* entwickelten Methode der Gewinnung von Antikörpern mittels Hybridomatechnologie hat diese seit einigen Jahren erfolgreich verwendete Methode den Vorteil der möglichen Umgehung des tierischen Immunsystems und damit des Verzichtes auf zeitaufwendige Tierimmunisierungen, was sich sowohl zeiteffizienter als auch kosteneffektiver und einfacher durchführbar erweist (*Köhler & Milstein, 1975; Mc Cafferty et al., 1990*). Von Vorteil ist desweiteren das eine Isolierung antigenspezifischer Antikörperfragmente aus einem großem Antikörperrepertoire mittels einfacher Affinitätsanreicherung möglich ist und die Affinität und Spezifität der rekombinanten Antikörperfragmente *in vitro* maßgeschneidert werden kann. Die Technik des „Phage Display“ zur Isolierung rekombinanter Antikörperfragmente beruht auf der Entwicklung und Verbesserung molekulargenetischer Methoden wie beispielsweise der Polymerasekettenreaktion und der Methodik zur Herstellung kombinatorischer Display Bibliotheken. Aus einer Vielzahl von verschiedenen Arten und Quellen können Antikörpersegmente kodierend für ein Antikörperfragment mittels PCR isoliert, amplifiziert und mit anderen Fragmenten oder synthetischen Nukleotidsequenzen rekombiniert werden. Nach Klonierung der Antikörpergene in entsprechende Plasmide können diese in geeigneten Expressionssystemen zur Produktion von rekombinanten Antikörperfragmenten verwendet werden (). Die „Phage Display“ Technik basiert auf der Verwendung von Phagenpartikel zur Expression von rekombinanten Antikörperfragmenten. Grundlegend werden die Antikörpersequenzen mit einer Phagenhüllproteinsequenz (N-terminal) fusioniert und anschließend auf der Oberfläche des Phagen als Antikörper-Hüllprotein-Fusionsprotein exprimiert und damit präsentiert (*McCafferty et al., 1990, 1996; Clackson et al., 1991; Hogenboom et al., 1991; Marks et al.1991; Winter & Milstein, 1991; Hogenboom & Winter, 1992 I,II; Griffiths, 1993; Griffiths et al., 1993; Winter et al., 1994; De Jaeger et al., 1997; Griffiths & Duncan, 1998; Desiderio et al., 2001*). Mit Hilfe geeigneter Phagen bzw. Phagemidvektoren können umfangreiche Antikörper-Phagenbanken (einfach, semi-synthetisch, synthetisch) mit sehr hoher Komplexität hergestellt werden, wodurch eine schnelle und effiziente Isolierung antigenspezifischer rekombinanter Antikörperfragmente möglich ist (*O'Brien & Aitken, 2002*). Auf der Basis solcher Phagenbibliotheken, deren Größe und Diversität entscheidend für die Affinität der isolierten Antikörper ist, konnten in den letzten Jahren eine Vielzahl verschiedenster rekombinanter Antikörperfragmente isoliert werden. Die sind gegen ein großes Spektrum der unterschiedlichsten Antigene gerichtet wie beispielsweise gegen niedermolekulare xenobiotische Substanzen, Antibiotika, Haptene und virale Proteine (*Griffiths et al., 1993; Nissim et al., 1994; Übersicht in Griffiths & Duncan, 1998; Li et al., 1999; Chae et al., 2000; Burmeister, 2001; Charlton et al., 2001; Tout et al., 2001; Goletz et al., 2002*).

Die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit verwendete „Phage Display“ Technik bildete die von Tomlinson am MRC Cambridge entwickelten, auf menschlichen V-Gensegmenten basierenden synthetischen scFv-Phagemidbibliotheken A und B (*De Wildt et al., 2000*). Durch „Screenen“ der unter Verwendung von Helferphagen in neue Phagenpartikel verpackten scFv-Bibliotheken mit immobilisierten Antigen-Quinmerac konnten antigenspezifisch bindende Phagen mehrfach selektiert, durch Infektion geeigneter Bakterienstämme (mit Suppressormutation) vermehrt und nachfolgend je durchlaufender Panningrunde angereichert werden. Die direkte Detektion spezifisch Quinmerac bindender monoklonaler Phagen erfolgte mittels Phagen-ELISA. In diesen ELISA-Experimenten zeigten die für die Gewinnung der in der Arbeit verwendeten scFv-Einkettenantikörper B11, C11 und H12 verwendeten scFv präsentierenden Phagen B11, und H12 eine hohe Antigenbindungsaktivität für das an das Trägerprotein BSA gekoppelte Quinmerac ohne festzustellende Kreuzreaktivität mit dem reinen Trägerprotein BSA. Dabei wies der Klon H12 eine stärkere spezifische Bindung an das immobilisierte Quinmerac-Konjugat auf als der Klon B11. Nach der Isolierung der spezifischen Bakterienklone, von denen die getesteten Phagen abstammen wurde die jeweilige Plasmid-DNA (Expressionsvektor pIT-scFV) kodierend für die spezifisch Quinmerac bindenden scFv-Antikörperfragmente in HB2151 transformiert. Einer der Vorteile der verwendeten Phagenbanken in dieser „Phage Display“ Methode war, dass der für die Herstellung der Bibliotheken genutzte Phagemidvektor pIT bei Verwendung entsprechender Bakterienstämme (Suppressor oder Nicht-Supressor Stämme) entweder die Expression der scFv-Einkettenantikörper als Fusionsproteine mit dem Phagenhüllprotein auf der Oberfläche des Virions oder die Expression der rekombinanten Antikörperfragmente als lösliche periplasmatische Proteine ermöglicht. Eine zusätzliche Subklonierung der isolierten Plasmid-DNA in entsprechende Expressionsvektoren war daher nicht notwendig. Nach der Transformation in HB2151 (entsprechend den Bedingungen) wurden die rekombinanten Antikörperfragmente somit als funktionelle, lösliche, periplasmatische Proteine exprimiert. Der funktionelle Nachweis der scFv-Einkettenantikörper erfolgte nach entsprechender Kulturdauer der Bakterienkulturen und unter entsprechenden Kulturbedingungen (Vergleich) direkt aus dem Kulturmedium mittels löslichem ELISA und „Western-Blot“ Technik. Der Vorteil der Verwendung des bakteriellen Systems zur Expression von Antikörperfragmenten und anderen Proteinen liegt in der schnellen Überprüfung der Funktionalität und damit der korrekten Expression rekombinanter Proteine basierend auf effektiven Transformationsmethoden, dem schnellen Wachstum von *E.coli* unter einfachen Kulturbedingungen und gut etablierten Nachweistechiken. Der einfache Nachweis des gebildeten scFv-Proteins erfolgte durch den C-terminal klonierten c-myc-tag unter Verwendung eines spezifisch gegen diesen gerichteten monoklonalen Antikörpers 9E10 (*Hilpert et al., 2001*). In verschiedenen ELISA-Experimenten erfolgte mittels dieses Antikörpers der funktionelle und immunologische Nachweis der bakteriell

exprimierten scFv B11, C11 und H12. Alle drei getesteten Einkettenantikörper zeigten eine hohe Antigenbindungsaktivität und -affinität sowohl für das immobilisierte an das Trägerprotein BSA gekoppelte Quinmerac als auch an freies Quinmerac ohne festzustellende Kreuzreaktivität mit anderen verwendeten Trägerprotein-Konjugaten bzw. dem reinen Trägerprotein BSA. Der Nachweis der Antigenbindungsaktivität der scFv-Antikörperfragmente erfolgte im indirekten kompetitiven ELISA. Der ermittelte IC₅₀-Wert nach Zugabe von freiem Quinmerac im kompetitiven ELISA des Einkettenantikörpers B11 betrug 1x10⁻⁵M, die entsprechenden Werte der scFv Antikörperfragmente C11 und H12 betragen 1x10⁻⁴M. Somit zeigte das scFv B11 im direkten Vergleich mit den scFv C11 und scFvH12 eine etwas bessere Affinität zum freien Antigen Quinmerac auf. Nach abschließender Überprüfung der korrekten Expression aller drei Einkettenantikörper im „Western-Blot“ konnte somit die Funktionalität der drei im bakteriellen System exprimierten scFv-Antikörperfragmente nachgewiesen werden. Die Methode des „Phage Display“ zur Gewinnung von rekombinanten Antikörperfragmenten hat eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber der Methode der Hybridomatechnik. Einer der wesentlichsten Vorteile dieser Technik basiert auf der Verbindung zwischen Ligandengenotyp und Ligandenphänotyp, die eine Anreicherung am immobilisierten Targetantigen ermöglicht (O'Brien & Aitken, 2002). Parallel zum Ansatz der Gewinnung der scFv mittels „Phage Display“ wurde auch die Methode der Hybridomatechnik angewendet. Dabei konnten jedoch keine monoklonalen spezifischbindenden Antikörper sezernierenden Hybridomazelllinien gewonnen werden. Neben dem zellabhängigen System der Gewinnung von rekombinanten Antikörperfragmenten des „Phage Display“ gibt es weitere verbesserte zellunabhängige (*in vitro*) Systeme der Antikörpergewinnung (Hanes & Plückthun, 1997; Amstutz et al., 2001; Daly et al., 2001). Hierzu zählen das Ribosomendisplay bei dem die Antikörperproteine an Ribosomenkomplexen präsentiert werden sowie das ARM-Display und das robotergestützte Antikörperarray (Hanes & Plückthun, 1997; Hanes et al., 1998; De Wildt et al., 2001). Tendenziell ist durch die Anwendung verbesserter bzw. erweiterter Methoden der rekombinanten Antikörpergewinnung eine immer schnellere und labortechnisch routinemäßige Isolierung von maßgeschneiderten Antikörpern für die vielfältigsten Anwendungen möglich. Zudem können durch entsprechend gewählte Bedingungen bei der Verwendung, Nutzung der Displaytechniken wichtige Eigenschaften der rekombinanten Antikörperfragmente wie beispielsweise Stabilität, Spezifität, Affinität während der Isolation oder nachträglich verändert werden, um den jeweiligen Aufgabenstellung gerecht zu werden (Schier & Marks, 1996; Low et al., 1996; Hanes et al., 1998; Martineau & Betton, 1999; Wörn & Plückthun, 1999; Daugherty et al., 2000; Jermutus et al., 2000).

5.5 Erzeugung leichter Toleranzverbesserung durch die Expression spezifischer Anti-Quin-scFv in transgenen Tabakpflanzenlinien

Für die Erzeugung transgener Anti-Quin-scFv exprimierender Pflanzenlinien wurden die im bakteriellen System eingehend funktionell charakterisierten rekombinanten Antikörperfragmente, die gegen das Herbizid Quinmerac gerichtet sind, in geeignete pflanzliche Expressionskassetten kloniert und durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer in *Nicotiana tabacum* (Varietät Samsun) zur Expression gebracht. Im Zuge der Etablierung eines Modellsystems zur Erzeugung von Toleranz gegenüber einem exogen applizierten Herbizid auf Basis der Immunmodulationstechnik wurden Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*, Varietät Samsun) als Modellpflanzen verwendet, anhand derer die mittels scFv-Expression in transgenen Pflanzen erzeugte Toleranzeffizienz gezeigt werden sollte. Die Nutzung von Tabakpflanzen im Labor ist eine gut etablierte Methode, zum einen durch die einfache Transformierbarkeit und hohe Transformationseffizienz, zum anderen durch bisherige Ergebnisse und Erfahrungen innerhalb der Gruppe bei der Expression verschiedenster Antikörperfragmente in unterschiedlichen Zellkompartimenten, Geweben und Organen von Tabakpflanzen. Entsprechend der grundlegenden Idee der Arbeit und in Anlehnung an vorangegangene Arbeiten zur Immunmodulation wurden die verschiedenen scFv-Einkettenantikörper in unterschiedlichen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle unter Verwendung spezifischer Promotoren und spezifischer Targetingsequenzen exprimiert und akkumuliert. Die ubiquitäre Expression der Einkettenantikörper in der Pflanze erfolgte durch den starken konstitutiven Promotor CaMV 35S. Durch N-terminale Fusion der scFv-Gene mit einer LeB4-Signalpeptidsequenz wurde der Eintritt der rekombinanten Antikörperfragmente in den sekretorischen Weg ermöglicht (Bäumlein et al., 1986), was in vorangegangenen Arbeiten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Überprüfung der tatsächlichen Lokalisation bzw. Akkumulation pflanzlich exprimierter scFv-Proteine unter Verwendung verschiedener scFv-Antikörperfragmente in Tabakpflanzenzellen nachgewiesen worden war (Artsaenko, 1996; Fiedler, 1996). Beim Fehlen einer solchen geeigneten Signalpeptidsequenz werden die scFv-Proteine nicht in den sekretorischen Weg geschleust, sondern stattdessen im Zytosol der Zelle exprimiert und akkumuliert (Biocca et al., 1995). Die Expressionsniveaus der Anti-Quin-scFv B11 und H12 wurden mit Hilfe der „Western-Blot“ Technik semiquantitativ bestimmt. Das höchste Expressionsniveau wurde bei den Pflanzenlinien ER B11 und ER H12 mit ubiquitärer Expression und Retention der scFv-Proteine im endoplasmatischen Retikulum erzielt (siehe 4.6), was unter anderem auf die günstigen oxidativen Bedingungen in diesem Kompartiment zurückzuführen ist, die die Bildung der scFv-stabilisierenden Disulphidbrücken begünstigen (Gething & Sambrook, 1992; Galili et al., 1998). Desweiteren können andere stabilisierende bzw. faltungsunterstützende Faktoren, die in diesem Kompartiment (ER) lokalisiert sind, Ursachen

für die gegenüber der ubiquitär zytosolischen Expression wesentlich höheren Expressionslevel sein (Conrad & Fiedler, 1998; Schouten et al., 2002). Für die transgenen Pflanzenlinien ER B11 und ER H12 wurde ein maximaler Expressionslevel von 2%/GLP, wobei das durchschnittliche Expressionsniveau aller getesteter Pflanzen mit dem Konstrukt pER B11 (Vergleich 4.6) bei 0,5%/GLP und mit dem Konstrukt pER H12 (Vergleich 4.6) bei 0,65%/GLP lag. Im Gegensatz dazu lag das ermittelte durchschnittliche Expressionsniveau der Pflanzenlinien Cyto B11 und Cyto H12 mit ubiquitär zytosolischer Expression im Bereich zwischen 0,09-0,14%/GLP und damit deutlich unterhalb des Expressionsniveaus der Pflanzen mit ubiquitärer Expression und Retention des scFv im ER. Das maximale Expressionsniveau dieser Pflanzenlinien lag bei 0,2%/GLP. In Bezug auf die Problematik der geringen zytosolischen Expression rekombinanter Antikörperproteine gab es in den letzten Jahren eine Vielzahl von Untersuchungen über die Ursachen der niedrigen Expression und Akkumulation, da eine optimale Expression von funktionell aktivem rekombinanten Antikörperfragmenten im Zytosol viele Anwendungsmöglichkeiten eröffnen könnte (Bruyns, et al., 1996; Martineau et al., 1998; De Jaeger, 1999, 2000). Dabei konnte im Zusammenhang mit der zytosolischen Expression und Akkumulation rekombinanter Antikörper und Antikörperfragmente gezeigt werden, dass diese oft nur in geringen Konzentration in diesem Kompartiment nachweisbar waren (Owen et al., 1992; Tavladoraki et al., 1993; Fecker et al., 1996, 1997; Schouten, 1996; Zimmermann et al., 1998). Hypothetisch geht man davon aus, dass eine erfolgreiche Expression und Akkumulation im Zytosol abhängig ist von den inneren Eigenschaften des exprimierten Antikörperproteins (De Jaeger et al., 1999). In diesem Zusammenhang wird oft die Problematik der seltenen (nicht begünstigten) Ausbildung von Disulphidbrücken im Zytosol von Zellen diskutiert (Plückthun, 1992; Gilbert, 1990). Eine der Hauptgründe ist der reduzierte Redoxzustand dieses Zellkompartimentes, der zu einer partiell inkorrekten Faltung des rekombinanten Antikörperproteins führen kann. Resultierend daraus kann das gebildete Protein instabil werden (Biocca et al., 1995; Hiatt et al., 1989). Disulphidbrücken stellen eine der wichtigsten Grundlagen der Antikörperdomänen-Struktur dar. Es wird postuliert, dass sowohl die Faltung (Assemblierung), die Stabilität und letztlich auch die Funktionalität vieler Proteine abhängig von der Formation dieser Bindungen ist (Glockshuber et al., 1992; Frisch et al., 1994, 1996). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in einigen Fällen in denen die intermolekularen Disulphidbrücken nicht maßgeblich die Funktionalität und die Stabilität des jeweilig exprimierten Proteins bestimmen, durchaus eine effiziente heterologe Expression der kodierenden Gene im Zytosol möglich ist (Wörn & Plückthun, 2001); Schouten et al., 2002). Nachweislich gibt es Antikörperproteine, die eine fehlende oder unvollständige Assemblierung der Disulphidbrücken unter Beibehaltung ihrer Stabilität und Funktionalität tolerieren können (Proba et al., 1997; De Jaeger et al., 1999). Eine erfolgreiche Expression von rekombinanten Antikörperfragmenten im Zytosol von Pflanzenzellen ist zudem von der

Sequenz des jeweiligen rekombinanten Antikörperproteins abhängig, was sich in unterschiedlich großer Stabilität einzelner Antikörperfragmente im Zytosol äußert (*Steipe et al., 1994; Knappik & Plückthun, 1995*). Als weitere Ursache für die geringe Akkumulation von rekombinanten Proteinen im Zytoplasma wird das Vorhandensein von Proteasen beschrieben, die die Menge des akkumulierten Antikörperproteins durch Abbau entscheidend beeinflussen können. In einer Reihe von Arbeiten wurden verschiedene Möglichkeiten zur Verbesserung der zytosolischen Expression untersucht. Die Verwendung der Retentionssignalsequenz KDEL im Konstrukt für die zytosolische Expression ist eine der meist angewendeten Methode zur Verbesserung des Expressionslevels im Zytosol durch eine postulierte Stabilisierung des exprimierten Proteins (*Schouten et al., 1996, 1997*). Es bleibt dennoch anzumerken, dass in vorangegangenen Arbeiten trotz häufig sehr geringer zytosolischer Expressionslevel eine Toleranz gegenüber verschiedenen Pflanzenpathogenen erzeugt werden konnte.

Neben den oben erläuterten Kompartimenten sollten die Anti-Quin-scFv außerdem ubiquitär in der Pflanze exprimiert und nachfolgend in der Plasmamembran akkumuliert werden. Die Einschleusung der synthetisierten Antikörperproteine in den sekretorischen Weg erfolgt wie zuvor schon für die Konstrukte mit Retention im ER beschrieben durch Vermittlung der N-terminal fusionierten Signalsequenz. Über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat der Zelle erfolgt der Transport der scFv Einkettenantikörper in den extrazellulären Raum (Zelloberfläche). Eine im C-terminalen Bereich der Antikörpergensequenz fusionierte Transmembrandomäne des menschlichen Blutplättchen- Wachstumsfaktorrezeptors (PDGFR, *Gronwald et al., 1988*) ermöglicht dabei die Verankerung der exprimierten scFv-Proteine in der Membran, wobei diese dann extrazellulär präsentiert werden. In Bezug auf die tatsächliche Lokalisation der Antikörperfragmente wurde aufgrund vorangegangener Arbeiten zur Untersuchung der Lokalisation von Antikörperfragmenten in Abhängigkeit von fusionierten Transmembrandomänen die Theorie aufgestellt, dass ein Teil des mittels TMD in der Membran verankerten rekombinanten Proteins wieder abgespalten wird und sich anschließend im Apoplasten anreichert (*Schillberg et al., 2000*). Im Zuge des immunologischen Nachweises der pflanzlich exprimierten scFv-Einkettenantikörper der Pflanzenlinien TMD B11 und TMD H12 im „Western-Blot“ erfolgte deren Nachweis als scFv-TMD Fusionsprotein, prozessiertes bzw. abgespaltenes Antikörperprotein konnte nicht nachgewiesen werden, was seine Ursache in der von *Schillberg und Mitarbeitern* postulierten Theorie einer Schnittstelle im Bereich des c-myc-tags haben könnte. Das nach der Abspaltung im Apoplasten vorliegende scFv-Antikörperprotein wäre demnach aufgrund des Fehlens, des für den immunologischen Nachweis mittels des monoklonalen Antikörper 9E10 essentiellen c-myc-tag nicht mehr detektierbar also folglich nicht nachweisbar. Trotzdem kann auf der Grundlage weiterer experimenteller Ergebnisse von *Schillberg und Mitarbeitern* (*Schillberg et al., 2000*) bei Verwendung einer TMD neben der Anreicherung

von scFv-Antikörperprotein in der Membran auch eine Anreicherung von prozessiertem Antikörperprotein im extrazellulären Raum (Apoplasten) angenommen werden. Der für die Pflanzen TMD B11 und TMD H12 semiquantitativ bestimmte durchschnittliche Expressionslevel war zwischen 25 und 65fach niedriger als das für die Pflanzenlinien ER B11 und ER H12 ermittelte Expressionsniveau und 5-15fach niedriger als das durchschnittliche Expressionsniveau der Pflanzenlinien Cyto B11 und Cyto H12. Beim Vergleich der semiquantitativ bestimmten Expressionsniveau der Pflanzenlinien mit ubiquitär zytosolischer, mit ubiquitärer Expression mit Retention im ER und mit ubiquitärer Expression mit Retention in der Plasmamembran muß berücksichtigt werden, dass die Plasmamembran nur einen kleinen prozentualen Anteil an der gesamten Pflanzenzelle ausmacht, so dass trotz des im Vergleich sehr niedrig erscheinenden maximalen Expressionsniveaus von 0,03%/GLP stellenweise höhere Konzentrationen in der Plasmamembran angenommen werden können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erzeugung von Herbizidtoleranz in Tabakpflanzen durch die Expression und Akkumulation von spezifisch gegen ein exogen appliziertes Herbizid gerichteter Einkettenantikörper. Damit sollte eine alternative Methode zur Gewinnung herbizidtoleranter Pflanzen untersucht und etabliert werden. Durch die Expression der spezifischen Antikörperproteine in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle wie beispielsweise im ER, im Zytosol und in der Plasmamembran wurde die Möglichkeit der Nutzung der immunmodulierenden Eigenschaften der scFv-Antikörperfragmente im Hinblick auf die Erzeugung von Toleranz geprüft. Das im Zuge der Etablierung dieses Modellsystems verwendete Herbizid Quinmerac sollte dabei stellvertretend als Modellherbizid genutzt werden. Mit Hilfe eines optimierten Bioassay-Testsystems wurde der Grad der erzeugten Toleranz transgener Anti-Quin-scFv exprimierender Tabakpflanzen im Vergleich mit nicht transgenen Kontrolltabakpflanzen (WT-SNN) und transgenen Kontrollpflanzen (Anti-Ox-scFv) untersucht. Die Anwendung von Biotests in der Herbizidforschung stellt eine gut etablierte, zumeist einfach durchführbare Möglichkeit zur Testung der Wirkung phytotoxischer Substanzen dar (*Blair-Kerth et al., 2001; Beckie et al., 2000*). Im Labor oder im Gewächshaus können auf diese Weise im kleinern Maßstab neu entwickelte Wirkstoffe bzw. industriell interessante Substanzen in ihrer Wirkung auf Pflanzen getestet werden. In solchen Bioassays können sowohl ganze Pflanzen, als auch Pflanzenteile, Keimlinge und Samen untersucht werden. Mit Hilfe von Biotests können Aussagen über das Verhalten von Herbiziden im Boden, im Wasser oder in anderen Substraten getroffen werden (*Hock et al., 1995*). Desweiteren können Rückschlüsse auf die Empfindlichkeit bzw. Toleranz untersuchter Pflanzenbiotypen gezogen werden. Generell wird mittels dieser Biotests eine Pflanzenantwort behandelter Pflanzen gegenüber einer pestiziden Substanz basierend auf visueller Evaluierung, der Mortalität und der erzielten Wachstumsinhibierung anhand verschiedener Wachstumsparameter in Relation zu

unbehandelten Pflanzen untersucht. In sogenannten „Dose-response“-Experimenten bzw. einem einfachen diagnostischen Screening können statistisch abgesicherte Aussagen über eine vorhandene natürliche bzw. künstlich erzeugte Resistenz in Pflanzen getroffen werden (Mamdouh, 1995; Webb & Hall, 1995; Jeffers et al., 1996; Gaffney et al., 1998; Guitierrez-Lugo et al., 1999; Hulting et al., 2001). Die Applikation der phytotoxischen Substanz kann dabei sowohl mittels Besprühung ganzer Pflanzen, durch Wurzel Aufnahme nach Bodenapplikation als auch im hydroponischen System erfolgen (Wuerzer et al., 1985; Scheltrup et al., 1996; Gaffney et al., 1998; Feng et al., 1998; Park et al., 2001; Zeldin et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Biotests festgestellt werden, dass das Wachstum der Wildtyptabakkeimlinge in Abhängigkeit von der jeweiligen Herbizidkonzentration beeinflusst wird. Mit zunehmender Konzentration (5µM-150µM) erfolgte eine zunehmende Reduzierung des Wachstums der Keimlinge, wobei nach etwa 14tägiger Inkubation der transgenen Samen in einer 150µM Quinmerac-Lösung eine maximale Hemmung des Wachstums der Keimlinge festzustellen war. Eine vollständige Hemmung der Keimung bzw. des Keimlingswachstums war auch bei höheren Herbizidkonzentrationen (250-400µM) nicht nachweisbar. Ursache dafür kann die Semisensitivität des Tabak gegenüber dem verwendeten Herbizid sein. Im Vergleich von Kontrollpflanzen mit transgenen scFv exprimierenden Pflanzen konnte festgestellt werden, dass erstere eine stärkere Inhibierung des Keimlingswachstums in einem definierten Konzentrationsbereich aufwies als die entsprechenden transgenen Pflanzenlinien der Linien ER B11/ H12 und Cyto B11/ H12 bei gleicher Herbizidkonzentration. Trotz der nachweislichen Verbesserung der Toleranz war auch bei diesen Linien eine, wenn auch schwächer ausfallende Reduktion des Wachstums der Keimlinge festzustellen. Dieses Ergebnis resultiert aus dem direkten Vergleich der ermittelten Frischmassen nach Applikationsende, bei der im Konzentrationsbereich von 5-25µM signifikant höhere Frischmassen bei den transgenen Tabakpflanzen bestimmt worden sind. Durch Expression spezifischer gegen das Herbizid Quinmerac gerichteter Einkettenantikörper wurde somit in den getesteten Pflanzenlinien mit ubiquitärer Expression und Retention des scFv im ER und mit ubiquitär zytosolischer Expression in einem eingeschränkten Konzentrationsbereich eine partielle Verbesserung der Toleranz gegenüber dem exogen applizierten Herbizid erzielt. Im Gegensatz dazu konnte bei Pflanzen der Linien TMD B11/ H12 mit ubiquitärer Expression und Retention des Antikörperproteins in der Plasmamembran keine signifikante Toleranzverbesserung nachgewiesen werden. Die erzielten Expressionslevel in diesen Pflanzenlinien lagen maximal bei 0,03%/GLP. Auf Grund des fehlenden Nachweises der funktionellen Eigenschaften der aufgereinigten pflanzlich exprimierten Einkettenantikörper im ELISA kann keine definitive Aussage über die funktionelle Aktivität der Anti-Quin-scFV mit Retention in der Plasmamembran getroffen werden. Es wäre daher auf der Basis der Ergebnisse des Toleranzbioassays denkbar, dass das erzielte Expressionsniveau der

Antikörper nicht ausreicht um die herbizide Substanz nachweislich zu binden und dadurch zu inaktivieren. Rein hypothetisch wäre es ebenfalls möglich, dass die Wahl dieses Zellkompartimentes für die Erzeugung von Toleranz auf der Grundlage der Immunmodulation nicht geeignet war und so trotz ausreichender Antikörpermengen keine effektive Inhibierung möglich war.

Beim Vergleich mit anderen Arbeiten hinsichtlich der Anwendung der immunmodulierenden Eigenschaften von spezifischen scFv-Antikörperfragmenten, die zumeist in einer partiellen oder aber auch vollständigen Modifikation bzw. Neutralisation verschiedener endogener Faktoren resultierten, konnte in dieser Arbeit nur eine schwach partiell Toleranz vermittelnde Wirkung gezeigt werden (Tavladoraki et al., 1993; Artsaenko et al., 1995, 1998; Shimada et al., 1999; Schillberg et al., 2000, 2001). Die möglichen Gründe für die nur partiell in einem bestimmten Konzentrationsbereich erzielte Toleranzverbesserung können sehr vielfältig sein. Eine denkbare Ursache könnte die schon zu Beginn geringere Bindungsaffinität (10^{-4} bzw. 10^{-5} M) der mit Hilfe der „Phage Display“ Methode isolierten Antikörper für das Hapten Quinmerac sein. Theoretisch wäre es dann möglich, dass trotz ausreichender Menge an Antikörpermolekülen aufgrund der geringen Affinität noch ausreichend phytotoxisch wirkende Herbizidmoleküle vorhanden sind. Eine höhere Bindungsaffinität der scFv-Antikörper könnte von Vorteil bei der *in vivo* Nutzung der spezifischen Antikörperproteine für die Bindung und daraus resultierende Inaktivierung der phytotoxischen Substanz sein. Es wäre ebenfalls theoretisch möglich, dass die intrazellulär akkumulierte Menge des Antikörperproteins in den transgenen Pflanzenlinien nicht ausreichend oder nicht voll aktiv für eine vollständige Neutralisierung der exogen applizierten herbiziden Substanz ist. Das erzielte Expressionsniveau der Anti-Quin-scFv in den verschiedenen Pflanzenlinien war im Vergleich mit anderen erreichten Antikörperexpressionslevel eher niedrig (Artsaenko et al., 1995; Übersicht scFv-Expression in Fischer et al., 2001). Desweiteren konnte anhand der funktionellen Charakterisierung der pflanzlich exprimierten Einkettenantikörper nach Affinitätsreinigung aus transgenem Blattmaterial gezeigt werden, dass die Bindungsaktivität der Antikörperproteine, bei gleicher Konzentration des getesteten Anti-Quin-scFv, im Vergleich mit bakteriell exprimiertem Antikörperfragment deutlich geringer ist. Für die weitere Verwendung bzw. Etablierung dieser Methode als alternative Lösungsmöglichkeit für die Erzeugung herbizidtoleranter Pflanzen auf der Basis der Immunmodulation sollten eine Reihe von Verbesserungsmöglichkeiten wie sie in den folgenden Abschnitten eingehender diskutiert werden, berücksichtigt werden. Die Vorteile der Verwendung solcher Bioassays zum Nachweis von Toleranz bzw. Resistenz liegen in der relativ einfachen Methodik und in der Tatsache, dass sie oft die einzige Möglichkeit der Toleranz bzw. Resistenzprüfung bei Pflanzen gegenüber einigen Xenobiotika oder Pestiziden sind. Nachteilig dabei ist die notwendige statistische Auswertung, die eine sehr große Probenanzahl bedingt und durchaus sehr zeitaufwendig sein kann (Délye et al., 2002). Desweiteren können keine

genauen Aussagen über den eigentlichen Wirkungsmechanismus der Pestizide oder über auftretende Resistenzmechanismen getroffen werden. Weitere ergänzende Nachweismöglichkeiten bzw. Methoden, die Schlußfolgerungen auf natürlich vorhandene bzw. erzeugte Toleranz in Pflanzen zulässt, sind beispielsweise die PCR-vermittelte Detektion von Resistenzgenen sowie spezifische *in vivo*- oder *in vitro* Assays mittels definierter Parameter (Scheltrup & Grossmann, 1995; Beckie et al., 2000; Scarponi et al., 2001; Délye et al., 2002). Die bei diesen Assays als Toleranzfaktoren oder Marker verwendeten endogenen Stoffwechselprodukte oder spezifischen Enzyme (Proteine, Pigmente, Enzymaktivität) stehen dabei im unmittelbaren Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus der herbiziden Substanz. Nach Applikation der phytotoxischen Substanz können, im Vergleich von sensitiven und toleranten Pflanzenbiotypen, Aussagen über die Korrelation zwischen diesen Parametern und der Empfindlichkeit bzw. Toleranz der Pflanzen getroffen werden. In Anlehnung an vorangegangene Arbeiten zum Wirkungsmechanismus von Quinmerac sollten die mittels Bioassay erhaltenen Ergebnisse durch die Messung eines endogenen Parameters, der im unmittelbaren Zusammenhang mit dem Herbizidwirkungsmechanismus steht, ergänzt werden. Bei der Untersuchung von sensitiven dikotylen Pflanzenarten wie beispielsweise *Galium aparine*, konnte gezeigt werden, dass einhergehend mit der Quinmerac-induzierten Ethylenbiosynthese auch eine Steigerung des endogenen Gehaltes an reaktiver Abscisinsäure erfolgt. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass der Anstieg der ABA 48 h nach Applikation das etwa 70fache des Kontrollwertes erreichte (Scheltrup & Grossmann, 1995; Grossmann et al., 1996; Grossmann, 1998; Grossmann & Scheltrup, 1998). Unter Verwendung weiterer sensitiver und toleranter Pflanzenarten konnten nach Bestimmung verschiedener endogener Parameter, die eng mit dem Wirkmechanismus des Herbizides verbunden sind wie beispielsweise der endogenen ABA-Konzentration Rückschlüsse auf eine Korrelation zwischen dem Anstieg des Abscisinsäuregehaltes und der natürlichen Empfindlichkeit bzw. der auf verschiedene Mechanismen (veränderte Targetsensitivität oder schnellerer Metabolismus) beruhenden natürlichen Toleranz einzelner Pflanzenarten gezogen werden (Grossmann & Scheltrup, 1998). Theoretisch wäre es daher möglich, eine mit Hilfe der immunmodulierenden Eigenschaften pflanzlich exprimierter Einkettenantikörper erzeugte Toleranz durch einen geringeren oder fehlenden Anstieg der ABA in individuellen Pflanzen nachzuweisen. Die Ergebnisse jedoch zeigen, dass eine Aussage über die antikörpervermittelte Toleranz anhand der Abscisinsäurekonzentration nicht möglich ist. Als problematisch erwiesen sich in dem verwendeten Pflanzensystem Tabak schon die ermittelten ABA-Grundgehalte in Abwesenheit der herbiziden Substanz, die starke Schwankungen innerhalb der getesteten Pflanzenlinien aufwiesen. Eine Ursache dafür könnte eine natürlich vorkommende Variabilität des endogenen Abscisinsäuregehaltes individueller Pflanzen sein. Es wäre jedoch auch anzunehmen, dass ein stressbedingter

Anstieg von ABA im Gewebe die Ursache für die auftretenden Schwankungen ist. Zu den postulierten physiologischen Funktionen der Abscisinsäure zählen u.a. das Herbeiführen von Seneszenz und Dormanz, die Hemmung des Wachstums sowie in Folge von Wassermangel das Wirken als Stresshormon (Mohr & Schopfer, 1992; Giraudat et al., 1994; Jacob et al., 1994; Hartung et al., 1999, 2002). Denkbar wäre daher, dass die einzelnen Pflänzchen in dem verwendeten Kultursystem bzw. in dem angewandten hydroponischen Applikationssystem nicht gleichmäßig mit Nährlösung versorgt worden sind und dadurch eine Stresssituation hervorgerufen worden ist. Dies könnte die doch erhebliche Streuung der Werte zum Teil erklären. Die Ergebnisse der ABA-Konzentrationsbestimmung in Abhängigkeit von unterschiedlich konzentrierten Herbizidlösungen zeigten ebenfalls eine sehr starke Streuung der Werte. Trotz Untersuchung einer großen Anzahl verschiedener Kontroll- und transgener Pflanzen (n=18) lässt sich keine Aussage über eine antikörpervermittelte Toleranz auf Basis reduzierter Abscisinsäurewerte, im Vergleich von transgenen Tabakpflanzen mit Kontrollpflanzen, treffen. Eine Ursache hierfür kann die schon erwähnte Semisensitivität der Tabakpflanzen gegenüber dem Herbizid Quinmerac sein. Es wäre theoretisch denkbar, dass der herbizidinduzierte Anstieg des endogenen Phytohormones bzw. die antikörpervermittelte Toleranz, nachweisbar durch niedrigere endogene ABA-Konzentrationen, nicht groß genug ist (Vergleich siehe Scheltrup & Grossmann, 1995; 70facher Anstieg ABA). In Kombination mit den starken Schwankungen der Werte (Standardabweichung) würden somit geringere Veränderungen des ABA-Gehaltes kompensiert werden und könnten nicht erfasst werden. Im Zuge dieser Arbeit konnte anhand der Bestimmung der ABA-Gehalte herbizidbehandelter transgener- bzw. von Kontrollpflanzen und deren Verwendung als Toleranzparameter keine eindeutige Aussage über die scFv vermittelte Toleranz getroffen werden. Eine alternative Möglichkeit des Toleranznachweises auf der Basis von *in vitro* Assays wäre die Verwendung anderer im unmittelbaren Zusammenhang mit dem herbiziden Wirkmechanismus stehenden endogenen Parametern wie beispielsweise dem ACC-Synthase-gehalt, der Aktivität der ACC-Synthase oder der Ethylenkonzentration. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass mittels des gewählten und verwendeten Pflanzensystem *Nicotiana tabacum* gezeigt werden konnte, dass die Erzeugung von partieller Herbizidtoleranz auf der Basis der immunmodulierenden Eigenschaften exprimierter Einkettenantikörper möglich ist. Dennoch ist der Tabak in Kombination mit dem applizierten Modellherbizid Quinmerac, aufgrund seiner Semisensitivität, als Testsystem nicht optimal geeignet. Theoretisch denkbar wäre, dass herbizidsensitivere Pflanzenarten wie beispielsweise *Daucus carotta* in Verbindung mit dem Modellherbizid Quinmerac noch effizientere Ergebnisse liefern könnten.

5.6 Kann die Methode der Immunmodulation eine alternative Möglichkeit der Toleranzerzeugung bei Kulturpflanzen sein?

Der Gewinnung herbizidresistenter bzw. toleranter Pflanzenarten unter Verwendung rein züchterischer Methoden sind natürliche Grenzen gesetzt. Die Verwendung verschiedener gentechnischer Methoden zur Erzeugung herbizidtoleranter Pflanzen ermöglicht es, gezielt Resistenzgene aus unterschiedlichen genetischen Quellen zu übertragen. Eine große Rolle kommt dabei der Untersuchung auftretender resistenter bzw. toleranter Biotypen bei Bakterien, Unkräutern und Kulturpflanzen zu. Voraussetzung hierfür ist zumeist die Kenntnis bzw. Erforschung des molekularen Wirkmechanismus der Herbizide und die Identifikation, Isolation und Charakterisierung resistenzvermittelnder Gene. Vorteil der immunmodulationsvermittelten Toleranz ist die in der Tatsache begründet, dass das eigentliche Wirkprinzip nicht bekannt sein muß. Ein weiterer Nachteil der Verwendung herkömmlicher Mechanismen zur Erzeugung herbizidtoleranter Pflanzen kann zu dem der Eingriff in das Gleichgewicht des Pflanzenstoffwechsel sein. Dieser könnte sich beispielsweise in einer, durch die Expression eines veränderten Zielenzym reduzierten Aktivität zeigen bzw. eine zusätzliche Beeinflussung des pflanzlichen Stoffwechsels durch eingebrachte Metabolisierungsenzyme bewirken. Das Auftreten physiologischer Nebenwirkungen hat dabei eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit, wohingegen diese bei der Expression und Akkumulation von Antikörpern aufgrund ihrer Spezifität sehr gering sein dürfte. Prinzipiell könnten mittels der vorgestellten Methode herbizidtolerante Kulturpflanzen gewonnen werden, indem die jeweilige Substanz, gegenüber der eine Toleranz erwünscht ist, als Grundlage zur Gewinnung bzw. Isolation von spezifischen Antikörperfragmenten verwendet wird. Die selektierten spezifisch bindenden Antikörperproteine können dann mit Hilfe geeigneter Pflanzenkonstrukte in die Pflanze transformiert und dort exprimiert werden. Generell wäre so eine Anwendung weniger selektiver Breitbandherbizide in der Unkrautbekämpfung möglich, die aufgrund ihrer höheren Umweltverträglichkeit, und geringeren Persistenz zu einer ökologischen Entlastung, bzw. Reduzierung der Schädigung der Umwelt und des Eingriffes in das Agrarökosystem bei einer effektiven, sinnvollen Verwendung beitragen.

Im direkten Vergleich des erreichten Toleranzgrades in den Modellpflanzen mit anderen erzielten Toleranzniveaus (z.B. bei der antikörpervermittelten Toleranz gegenüber Pathogenen oder durch die Anwendung anderer gentechnischer Mechanismen) ist dieser sehr niedrig und nur auf einen engen Konzentrationsbereich beschränkt. Die möglichen Ursachen dafür wurden in den vorherigen Abschnitten eingehender diskutiert. Die praxisbezogene Anwendung der vorgestellten Methode der Immunmodulation als alternative Möglichkeit zur Erzeugung herbizidtoleranter Pflanzen ist auf der Basis des hier gezeigten Toleranzgrades eher gering. Mit Hilfe der Anwendung verschiedenster Verbesserungs- bzw. Optimierungsmöglichkeiten wäre es denkbar, dass die Strategie der Immunmodulation auch

für bestimmte Problemstellungen des Pflanzenschutzes in der Landwirtschaft genutzt werden könnte. Zum einen ist eine grundsätzliche Verbesserung der Antikörpereigenschaften wie beispielsweise der Antigenbindungsaffinität, der Stabilität durch die vielfältigsten molekulargenetischen Methoden möglich. Außerdem sollte das Expressionsniveau des Antikörperproteins in der Pflanze verbessert werden. Eine Verbesserung der immunmodulationsvermittelten Toleranzeigenschaften von Pflanzen könnte beispielsweise durch die grundlegende Optimierung der Antikörpereigenschaften des scFv-Antikörperproteins erfolgen. Obwohl die Technik des „Phage Display“ eine der innovativsten Techniken zur Gewinnung hochaffiner Antikörper darstellt, garantiert dieses allein nicht automatisch für die Isolierung von Antikörperfragmenten mit hervorragenden Faltungs- und Stabilitätseigenschaften sowie exorbitante Expressionshöhen (*Jung et al., 1999*). Mittels verbesserter „Phage Display“ Systeme oder anderer Displaymethoden könnte der Grad der Isolationseffizienz hochaffiner Antikörperfragmente entschieden verbessert werden (*Hanes et al., 1998; De Wildt et al., 2000; Amstutz et al., 2001; Jestin et al., 2001; Rondot et al., 2001; Baek et al., 2002*). Zudem gibt es eine Vielzahl von Methoden der nachträglichen Verbesserung und Optimierung spezifischer Antikörpereigenschaften wie beispielsweise „loop grafting“, „chain shuffling“ oder Mutagenesetechniken (*Jung & Plückthun, 1997; Tsumoto et al., 1997; Chowdhury et al., 1998; Martineau et al., 1998; Proba et al., 1998; Jermutus et al., 2001*). Im Hinblick auf die Problematik der zytosolischen Expression wäre so die Isolation von Antikörperfragmenten mit genügend hoher Stabilität unter Beibehaltung der Antigenbindungseigenschaften möglich. In den letzten Jahren wurden immer neue Strategien zur Verbesserung des Expressionsniveaus rekombinanter Proteine in Pflanzen untersucht und erfolgreich angewendet. Neben der schon angesprochenen Methode der Optimierung der funktionellen Eigenschaften der Antikörper auf Genebene mittels Sequenzveränderungen besteht die Möglichkeit der Verwendung RNA-stabilisierender Gensequenzen. Angriffspunkte sind hierbei die Förderung der m-RNA Stabilität und der Translationseffizienz wodurch eine Verbesserung des Expressionniveaus erreicht werden konnte (*Gallie, 1996; Chaubet-Gigot et al., 2001; Hulznik et al., 2002*). Eine weitere Methode der Expressionserhöhung besteht in der Möglichkeit der Fusion mit geeigneten stabilisierenden Proteinsequenzen. Erfolgreiche Verbesserungen des Expressionsniveaus rekombinanter Proteine konnten beispielsweise nach der N-terminalen Fusion der Antikörpergensequenz mit einem TMV-Hüllprotein erzielt werden (*Spiegel et al., 1999*). Weitere Beispiele sind die Fusion rekombinanter Proteine mit Ubiquitin und die Verbesserung der zytosolischen Expression von Antikörperprotein nach Fusion mit der Retentionssignalsequenz KDEL (*Schouten et al., 1996, 1997; Hondred et al., 1999*). Eine neuere Methode der Steigerung der Expression und Akkumulation von pflanzlich exprimiertem rekombinanten Protein konnte nach Fusion der jeweiligen Proteinsequenz mit einem Elastinartigen Polypeptid erzielt werden (*Scheller et al., 2001; Leps, Diss., 2002*).

Nach Berücksichtigung der vorgestellten Verbesserungsstrategien sind eine Reihe von tendenziellen Nutzungsmöglichkeiten denkbar. In dem mittels dieser Arbeit vorgestellten System zur Erzeugung von Herbizidtoleranz in Pflanzen durch Immunmodulation wurde Quinmerac als Modellherbizid stellvertretend für die Herbizide allgemein verwendet. Wenngleich hierbei festgestellt werden muß, dass die Erzeugung herbizidtoleranter bzw. -resistenter Pflanzen vor allem in erster Linie gegenüber umweltverträglicheren Breitbandherbiziden, aufgrund der in Abschnitt genannten Vorteile der HR-Technik, als sinnvoll erscheint. Der Sinn der Gewinnung herbizidresistenter bzw. -toleranter Kulturpflanzen ist die Erzeugung einer künstlich erworbenen Toleranz um eine selektive Wirkung des Herbizides zu ermöglichen. Viele der heutzutage genutzten Herbizide wirken indem sie in allgemein wichtige essentielle Stoffwechselwege bzw. Biosynthesewege eingreifen beispielsweise durch Blockierung von zentralen Stoffwechsellzymen oder durch Beeinflussung der Photosynthese. Eine selektive Wirkung ist daher zumeist nicht gegeben. Die landwirtschaftliche Anwendung der HR-Technik im Zusammenhang mit schon selektiv wirkenden Herbiziden wie beispielsweise den Auxinherbiziden ist daher eher unwahrscheinlich.

Tendenziell wäre eine Anwendung der Immunmodulations vermittelten Toleranz unter Nutzung verschiedener Promotoren mit unterschiedlichen Expressionsspektren in transgenen Pflanzen denkbar. Je nach verwendetem Herbizid könnten so weitere Kompartimente der Zelle für die Expression von scFv-Einkettenantikörper genutzt werden. Für eine praxisorientierte Anwendung könnte so eine postulierte „sink“-Bildung der rekombinanten Proteine in der Vakuole, nach plastidärer bzw. mitochondrialer Expression aber auch durch die Kombinationen der Expression in verschiedenen Kompartimenten erfolgen (*Biocca et al., 1995; Daniell et al., 1998, 1999, 2002; Staub et al., 1999, 2000; Frigerio et al., 2000; 2001; Heifetz, 2001; Van Bel et al., 2001; Maliga, 2002; Murray et al., 2002*). Beispielsweise wäre eine Expression von spezifisch herbizidbindenden Einkettenantikörpern zur Erzeugung von Toleranz in Plastiden eine sehr vielversprechende Möglichkeit zumal es eine Vielzahl der landwirtschaftlich verwendeten Herbizide Photosyntheseherbizide sind. Einhergehend damit hätte die plastidäre Expression auch den Vorteil das eine Übertragung der Resistenzgene nicht möglich ist, dass es scheinbar kein „Gen-silencing“ gibt und das aufgrund des hohen Ploidiegrades auch ein hoher Expressionslevel möglich wäre (*Staub et al., 1999, 2000; Van Bel et al., 2001*). Weitere praxisorientierte Anwendungsmöglichkeiten wären durch die Verwendung spezifischer Promotoren beispielsweise im Zuge einer samenspezifischen Expression gegeben. Hierbei wäre es theoretisch denkbar, dass diese vorgestellten Möglichkeiten eine sinnvolle Problemlösung für die Verwendung von Herbiziden im Vorlauf bzw. während der gleichzeitigen Keimung von Unkraut- und Kulturpflanzensamen darstellen. Im Zuge dieser Arbeit wurden entsprechende Konstrukte für die Expression der Einkettenantikörper unter

Verwendung des USP-Promotors entwickelt und mittels *Agrobacterium tumefaciens* vermitteltem Gentransfer in Tabakpflanzen transformiert (Bäumlein et al., 1991). Eine Auswertung bzw. Testung dieser Pflanzen konnte jedoch aus Zeitgründen nicht mehr erfolgen. Eine andere Strategie könnte auf der Basis der Transporteigenschaften von xenobiotischen Substanzen erfolgen. Da diese zumeist im Phloem transportiert werden, könnte mittels eines phloemspezifischen Promotors eine weitere Möglichkeit der effektiven und effizienten Toleranzerzeugung geschaffen werden (Chamberlain et al., 1995). Denkbar ist ebenfalls eine gleichzeitige Expression von spezifischen Antikörperfragmenten in verschiedenen Kompartimenten der Zelle durchzuführen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der mittels dieser Arbeit gezeigte und auf der Grundlage der immunmodulierenden Eigenschaften beruhende Toleranzgrad im Vergleich mit anderen herkömmlich verwendeten Methoden der Resistenzerzeugung gering ausfällt, aber durchaus unter Berücksichtigung der oben diskutierten Punkte Anwendungspotential hat.

6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Prüfung und Etablierung eines Modellsystems zur Erzeugung herbizidtoleranter transgener Pflanzen auf der Grundlage der immunmodulierenden Eigenschaften pflanzlich exprimierter spezifisch gegen ein Herbizid gerichteter Einkettenantikörper. Die regenerierten transgenen Pflanzenlinien wurden dazu hinsichtlich der Verbesserung ihrer Toleranz gegenüber den phytotoxischen Eigenschaften des verwendeten exogen applizierten Modellherbizid Quinmerac untersucht. Die Ergebnisse der Arbeit sind nochmals in einigen Punkten zusammengefasst:

1. Mit Hilfe der „Phage Display“ Technik konnten unter Verwendung zweier menschlicher scFv-Phagemidbibliotheken (MRC, Cambridge) verschiedene spezifisch Quinmerac bindende scFv-Antikörper präsentierende Phagen isoliert und funktionell charakterisiert werden. Die selektierten Phagenantikörper zeigten eine mittlere Bindungsaktivität für das Hapten Quinmerac.
2. Anschließend wurden die für die Anti-Quin-scFv (abgeleitet von ausgesuchten Phagenantikörpern) kodierenden Gene isoliert und charakterisiert/ sequenziert. Dabei wurden zwei verschiedene Einkettenantikörperfragmente identifiziert, im bakteriellen Expressionssystem exprimiert und eingehender hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften charakterisiert. Die isolierten Anti-Quin-scFv binden spezifisch mit mittlerer Bindungsaffinität das Hapten Quinmerac ohne nachweisbare Kreuzreaktivität mit anderen Trägerproteinen.
3. Die im Bakterienexpressionssystem funktionell charakterisierten Antikörperproteine bildeten die Grundlage für die Konstruktion der pflanzlichen Expressionskassetten. Mittels *Agrobacterium tumefaciens* vermitteltem Gentransfer und unter Verwendung der hergestellten Pflanzenkonstrukte wurden Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) transformiert und transgene Pflanzenlinien regeneriert.
Die intrazelluläre ubiquitäre Expression in verschiedenen Kompartimenten der Pflanzenzelle (Zytosol, endoplasmatisches Retikulum, Plasmamembran/Apoplast) erfolgte durch Verwendung spezifischer Signalsequenzen und Targetingsignale unter der Kontrolle des starken konstitutiven Promotors CaMV35S. Die Expression und Akkumulation der spezifischen Einkettenantikörper konnte in allen regenerierten transgenen Tabakpflanzenlinien nachgewiesen werden. Es konnten unter normalen Kulturbedingungen (im Gewächshaus, *in vitro*-Anzucht) in Abwesenheit des Herbizides keine phänotypische Unterschiede zwischen Wildtypkontrollpflanzen (SNN) und transgenen Tabakpflanzenlinien festgestellt werden.

4. Die transgenen Tabakpflanzenlinien wurden nach Applikation des Herbizides in einem dafür entwickelten Versuchssystem hinsichtlich der erzielten Verbesserung der Toleranz untersucht. Die herbizide Substanz Quinmerac wirkt aufgrund seiner Auxinaktivität phytotoxisch und inhibiert in höheren Konzentrationen das Wachstum der Tabakkeimlinge bzw. -pflanzen resultierend beispielsweise in einer Reduktion der Biomasse.

Anhand des ermittelten Keimlingfrischgewichtes, das als Toleranzparameter diente, konnte bei den hochexprimierenden transgenen Tabakpflanzenlinien mit ubiquitärer Expression und Retention des Einkettenantikörpers im ER und mit ubiquitär zytosolischer Expression in einem begrenzten Konzentrationsbereich (5-25 μ M) eine signifikante immunmodulationsbedingte Verbesserung der Toleranz im Vergleich zu Kontrollpflanzen festgestellt werden. Die erzeugte partielle Verbesserung der Toleranz bei den transgenen Pflanzenlinien zeigte sich in einer im direkten Vergleich mit Kontrollpflanzenlinien reduzierten Hemmung der Keimung bzw. des Keimlingswachstums in einem begrenzten Konzentrationsbereich. Mit steigender Konzentration entsprach der Grad der Hemmung der Keimung und des Keimlingswachstums der transgenen Tabakpflanzenlinien dem der Wildtyp-tabakpflanzen.

Mittels der immunmodulierenden Eigenschaften exprimierter spezifisch gegen das Herbizid Quinmerac gerichteter Einkettenantikörper konnte in einem begrenzten Konzentrationsbereich eine partielle Toleranzverbesserung bei einigen transgenen Tabakpflanzenlinien gegenüber den phytotoxischen Eigenschaften des Modellherbizides Quinmerac erzielt werden. Dieses Modellsystem könnte unter den schon diskutierten Verbesserungen und bei anwendungsbezogenen Problemstellungen eine alternative Möglichkeit der Toleranzerzeugung gegenüber phytotoxisch wirksamen Xenobiotika bzw. Pestiziden darstellen.

7 Literaturverzeichnis

- Abel, S., Theologis, A.**, (1996), "Early genes and auxin action", *Plant Physiology*, 111: 9-17
- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit, M.E.**, (1992), „Ethylene in Plant Biology“, Academic Press Inc., New York
- Åkerström, B., Björck, L.**, (1989), "Protein L: An immunoglobulin light chain-binding bacterial protein", *The Journal of Biological Chemistry*, 264(33): 19740-19746
- Amstutz, P., Forrer, P., Zahnd, C., Plückthun, A.**, (2001), "*In vitro* display technologies: novel developments and applications", *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 400-406
- Andersen, D.C., Krummen, L.**, (2002), "Recombinant protein expression for therapeutic application", *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 117-123
- Anonym (Porter et.al.)**, (1997), „Plantibodies to root out herbicides“, *Chemistry and Industry*, 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 phenotype in transgenic tobacco", *The Plant Journal*, 8(5): 745-750
- Artsaenko, O.**, (1996), "Immunomodulation of ABA-activity in transgenic tobacco plants", Dissertation, Universität Halle/Salle
- Artsaenko, O., Kettig, B., Fiedler, U., Conrad, U., Düring, K.**, (1998), "Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies", *Molecular Breeding*, 4: 313-319
- Artsaenko, O., Phillips, J., Fiedler, U., Peisker, M., Conrad, U.**, (1999), "Intracellular immunization of plants-new tool for investigating phytohormones", *Recombinant antibodies: applications in plant science and plant pathology*, Harper, K., Ziegler, A., (Eds.), 145-156
- Ashton, F.M., Crafts, A.S.**, (1981), "Mode of action of herbicides", John Wiley and Sons In., Toronto, ON, 525
- 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
- Baek, H., Suk, K.-H., Kim, Y.-H., Cha, S.**, (2002), "An improved helper phage system for efficient isolation of specific antibody molecules in phage display", *Nucleic Acids Research*, 30(5): e18
- Baez, J., Russell, D., Craig, J.**, (2000), "Corn seed production of therapeutic proteins moves forward", *BioPharm*, 50-54
- Bain, A.B., Boatman, N.D.**, (1989), "The potential of Quinmerac (BAS 518H) for the selective control of cleavers (*Galium aparine*) in field boundaries", *Brighthorn Crop Protection Conference-Weeds*, 8D-1:1057-1062

- 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", *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, 15(1): 21-27
- Barbas III, C.F., Kang, A.S., Lerner, R.A., Benkovic, S.J.,** (1991), "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 7978-7982
- Barcelo, P., Lazzeri, P.A.,** (1998), "Direct gene transfer: Chemical, electrical and physical methods", *Transgenic Plant Research*, 35-55
- Barry, G., Kishore, G., Padgett, S., Taylor, M.,** (1992), "Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants", In: *Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants*, Singh, B.K., Flores, H.E., Shannon, J.C., (Eds.), *Am. Soc. Of Plant Phys.*; 139-145
- Baulcombe, D.,** (1994), "Novel strategies for engineering virus resistance in plants", *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 117-124
- Baumann, R.A., 't Hart-De Kleijn, V.M.,** (1993), "Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of Quinmerac in cereals", *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 58(2a): 173-177
- 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 Acid Research*, 14(6): 2707-2720
- Bäumlein, H., Boerjan, B., Nagy, I., Bassüner, R., van Montagu, M., Inze, D., Wobus, U.,** (1991), "A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmental regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants", *Molecular and General Genetics*, 225: 459-467
- Beckie, H.J., Heap, I.M., Smeda, R.J., Hall, L.M.,** (2000), "Screening for herbicide resistance in weeds", *Weed Technology*, 14: 428-445
- Bednarek, S.Y., Raikhel, N.V.,** (1992), "Intracellular trafficking of secretory proteins", *Plant Molecular Biology*, 20: 133-150
- Benfey, P.N., Ren, L., Chua, N.,** (1989), "The CaMV 35S Enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue specific expression patterns", *The EMBO Journal*, 8: 195-202
- Benfey, P.N., Chua, N.,** (1990), "The cauliflower mosaic virus 35S Promoter: Combinatorial regulation of transcription in plants", *Science*, 250: 959-966
- Bennett, A.B., Chetelat, R., Klann, E.,** (1995), "Exotic germ plasm or engineered genes", *Genetically Modified Foods*, 8: 87-99
- Berghaus, R., Wuerzer, B.,** (1987), "The mode of action: the herbicidal quinolinecarboxylic acid, Quinmerac (BAS 518H)", *British Crop Protection Conference-Weeds*, 10B-3: 1091-1097
- Berghaus, R., Retzlaff, G.,** (1988), "Uptake and translocation of herbicidal quinolinecarboxylic acids in plants", *Proc. EWRS Symp.*, 81-86
- Berghaus, R., Retzlaff, G.,** (1989), "Quinmerac—studies to investigate selectivity in wheat", *Brighton Crop Protection Conference-Weeds*, 4D-6: 449-454

- Bevan, M.**, (1984), "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucleic Acid Research*, 12(22): 8711-8721
- Biocca, S., Neuberger, M.S., Cattaneo, A.**, (1990), "Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells", *EMBO Journal*, 9: 101-108
- Biocca, S., Pierandrei-Amaldi, P., Campioni, N., Cattaneo, A.**, (1994), "Intracellular immunization with cytosolic recombinant antibodies", *Bio/Technology*, 12: 396-399
- Biocca, S., Cattaneo, A.**, (1995), "Intracellular immunization: antibody targeting to subcellular compartments", *Trends in Cell Biology*, 5: 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: 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: 423-426
- Bird, R.E., Walker, B.W.**, (1991), "Single chain antibody variable regions", *Trends in Biotechnology*, 9: 132-137
- Birnboim, H.C., Doly, J.**, (1979), "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA", *Nucleic Acid Research*, 7(6): 1513-1523
- Björck, L., Kronvall, G.**, (1984), "Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent", *Journal of Immunology*, 133(2): 969-974
- Björck, L.**, (1988), "Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains", *Journal of Immunology*, 140: 1194-1197
- Blair-Kerth, L.K., Dotray, P.A., Keeling, J.W., Gannaway, J.R., Oliver, M.J., Quisenberry, J.E.**, (2001), "Tolerance of transformed cotton to glufosinate", *Weed Science*, 49: 375-380
- Boatman, N.D., Bain, A.B.**, (1992), "Evaluation of quinmerac and fluroxypyr against flora and uncommon arable weeds", *Tests of Agrochemicals and Cultivars*, 13, *Ann.appl. Biol.*, 120(Suppl): 42-43
- Böger, P.**, (1994), "Mögliche pflanzenphysiologische Veränderungen in herbizidresistenten und transgenen Pflanzen und durch den Kontakt mit Komplementärherbiziden", *Verfahren zur Technikfolgenabschätzung des Anbaus von Kulturpflanzen mit gentechnisch erzeugter Herbizidresistenz*, 2
- Botterman, J., Leemans, J.**, (1988), "Engineering herbicide resistance in plants", *TIG*, 4(8): 219-222
- Böttinger, P., Steinmetz, A., Steinmetz, O., Pickardt, T.**, (2001), "Agrobacterium-mediated transformation of *Vicia faba*", *Molecular Breeding*, 8: 243-254
- Bouquin, T., Thomsen, M., Nielsen, L.K., Green, T.H., Mundy, J., Dziegiel, M.H.**, (2002), "Human anti-Rhesus D IgG1 antibody produced in transgenic plants", *Transgenic Research*, 11: 115-122
- Bourque, J.E.**, (1995), "Antisense strategies for genetic manipulations in plants", *Plant Science*, 105: 125-149

- Bradford, M.M.**, (1976), „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Analytical Biochemistry*, 73: 248-254
- Bruyns, A-M., De Jaeger, G., De Neve, M., De Wilde, C., Van Monatgu, M., Depicker, A.**, (1996), “Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties”, *FEBS Letters*, 386: 5-10
- Burmeister, J., Spinelli, S., Pugliese, L., Krebber, A., Honegger, A., Jung, S., Schimmele, B., Cambillau, C., Plückthun, A.**, (2001), “Selection, characterisation and x-ray structure of anti-ampicillin single-chain Fv fragments from phage-displayed murine antibody libraries”, *Journal of Molecular Biology*, 309: 671-685
- Burnside, O.C.**, (1992), “Rationale for developing herbicide-resistant crops”, *Weed Technology*, 6: 621-625
- Byrne, F.R., Grant, S.D., Porter, A.J.R., Harris, W.J.**, (1996), “”, *Food Agric. Immunol.*, 8: 19-29
- Cao, Y., Suresh, M.R.**, (1998), “Bispecific antibodies as novel bioconjugates”, *Bioconjugate Chemistry*, 9(6): 635-644
- Carter, P., Merchant, A.M.**, (1997), “Engineering antibodies for imaging and therapy”, *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 449-454
- Casadevall, A.**, (1998), “Antibody-mediated protection against intracellular pathogens”, *Trends in Microbiology*, 6(3): 102-106
- Casey, J.L., Coley, A.M., Tilley, L.M., Foley, M.**, (2000), “Green fluorescent antibodies: novel *in vitro* tools”, *Protein Engineering*, 13(6): 445-452
- Chadd, H.E., Chamow, S.M.**, (2001), “Therapeutic antibody expression technology”, *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 188-194
- Chae, J.-S., Choi, J.-K., Lim, H.-T., Cha, S.-H.**, (2000), “Generation of a murine single chain Fv (scFv) antibody specific for cucumber mosaic virus (CMV) using phage display library”, *Mol. Cells*, 11(1): 7-12
- 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 Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7): 3724-3729
- Chamberlain, K., Tench, A.J., Williams, R.H., Bromilow, R.H.**, (1995), “Phloem translocation of pyridinecarboxylic acids and related imidazolinone herbicides in *Ricinus communis*”, *Pestic. Sci.*, 45: 69-75
- Chames, P., Baty, D.**, (2000), “Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization”, *FEMS Microbiology Letters*, 189: 1-8
- Charlton, K., Harris, W.J., Porter, A.J.**, (2000), “The isolation of super-sensitive anti-hapten antibodies from combinatorial antibody libraries derived from sheep”, *Biosensors & Bioelectronics*, 16: 639-646
- Chaubet-Gigot, N., Kapros, T., Flenet, M., Kahn, K., Gigot, C., Waterborg, J.H.**, (2001), “Tissue-dependent enhancement of transgene expression by introns or replacement of histone H3 genes of *Arabidopsis*”, *Plant Molecular Biology*, 45: 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 Academy of Sciences of the United States of America, 87:1066-1070
- Chen, E.Y., Seeburg, P.H.,** (1985), „Supercoil sequencing: A fast and simple method for sequencing plasmid DNA", DNA, 4(2): 165-170
- Chen, Y.X., Zhu, G.W., Tian, G.M., Zhou, H.P., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, T.W.,** (2002), Phytotoxicity of dredged sediment from urban canal as land application", Environmental Pollution, 117(2): 233-241
- Chen, W.P., Punja, Z.K.,** (2002), "Transgenic herbicide- and disease-tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants obtained through *Agrobacterium*-mediated transformation", Plant Cell Report, 20: 929-935
- 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 mammalian cell population with vectors expressing a membrane anchored single-chain antibody", Journal of Immunological Methods, 193(1): 17-27
- Cheung, A.Y., Bogorad, L., Van Montague, M., Schell, J.,** (1988), "Relocating a gene for herbicide tolerance: a chloroplast gene is converted into a nuclear gene", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85: 391-395
- Chin, T.E., Wong, R.B., Pont, J.L., Karu, A.E.,** (2002), "Haptens and monoclonal antibodies for immunassay of imidazoline herbicides", J. Agric.Food Chem., 50: 3380-3389
- Chiswell, D.J., McCafferty, J.,** (1992), "Phage antibodies: Will new "coliclonal"-antibodies replace monoclonal antibodies?", Trends in Biotechnology, 10: 80-84
- 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: 917-928
- Christou, P.,** (1993), "Particle gun-mediated transformation", Current Opinion in Biotechnology, 4: 135-141
- Christou, P.,** (1995), "Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardement", Euphytica, 85(1-3): 13-27
- Christou, P.,** (1996), "Transformation technology", Trends in Plant Science, 1: 423-431
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Winter, G.,** (1991), "Making antibody fragments using phage display libraries", Nature, 352: 624-628
- Clegg, B.S., Stephenson, G.R., Hall, J.C.,** (2001), "Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of dicamba", J.Agric. Food Chem., 49. 2168-2174
- Cobb, A.,** (1992), "Auxin-type herbicides", in Herbicides and Plant Physiology, Chapman & Hall, 82-106

- Cobb, A., Kirkwood, R.C.**, (2000), "Herbicides and their mechanisms of action", Sheffield Academic Press
- Comai, L., Sen, L.C., Stalker, D.M.**, (1983), "An altered *aro A* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate", *Science*, 221: 370-371
- Comai, L., Facciotti, D., Hiatt, W.R., Thompson, G., Rose, R.E., Stalker, D.M.**, (1985), "Expression in plants of a mutant *aro A* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate", *Nature*, 317: 741-744
- Commandeur, U., Fischer, R.**, (2001), "Transgene Pflanzen als orale Impfstoffe", *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 149: 356-365
- 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., 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., Fiedler, U.**, (1998), "Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity", *Protein Trafficking in Plant Cells*, Soll, J., (Ed.), PMB special volume
- Conrad, U., Manteuffel, R.**, (2001), "Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells", *Trends in Plant Science*, 6(9): 399-402
- Coupland, D.**, (1994), "Resistance to the auxin analog herbicides", *Herbicide Resistance in Plants*, Powles, S.B., Holtum, J.A.M., (Eds.), Lewis Publishers, Boca Raton, Fla., 171-214
- Cramer, C.L., Weissenborn, D.L., Oishi, K.K., Grabau, E.A., Bennett, S., Ponce, E., Grabowski, G.A., Radin, D.N.**, (1996), "Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 792: 62-71
- Dalsgaard, K., Uttenthal, A., Jones, T.D., Xu, F., Merrywether, 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
- Dall'Acqua, W., Carter, P.**, (1998), "Current Opinion in Structural Biology", 8: 443-450
- 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
- Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Fray, S., Lee, S.B.**, (1998), "Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome", *Nature Biotechnology*, 16: 345-348
- Daniell, H.**, (1999), "New tools for chloroplast genetic engineering", *Nature Biotechnology*, 17: 855-856

- Daniell, H., Streatfield, J., Wycoff, K.**, (2001), "Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants", *Trends in Plant Science*, 6(5): 219-226
- Daniell, H., Lee, S.B., Panchal, T., Wiebe, P.O.**, (2001), "Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts", *Journal of Molecular Biology*, 311: 1001-1009
- Daniell, H., Khan, M.S., Allison, L.**, (2002), "Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology", *Trends in Plant Sciences*, 7(2): 84-91
- Dankwardt, A.**, (2000), "Immunochemical assays in pesticide analysis", in "Encyclopedia of Analytical Chemistry", Meyers, A., John Wiley & Sons Ltd., Chichester
- Daugherty, P.S., Chen, G., Iverson, B.L., Georgiou, G.**, (2000), "Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 2029-2034
- Davies, P.J.**, (1995), "Plant Hormones", Kluwer Academic Publishers
- De Bellis, D., Schwartz, I.**, (1990), "Regulated expression of foreign genes fused to lac: Control by glucose levels in the growth medium", *Nucleic Acid Research*, 18: 1311
- 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 Block, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gosselé, V., Movva, N.R., Thompson, C., Van Montagu, M., Leemans, J.**, (1987), "Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme", *The EMBO Journal*, 6(9): 2513-2518
- De Jaeger, G., Buys, E., Eeckhout, D., Bruyns, A.-M., De Neve, 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: 116-122
- 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 of *Petunia hybrida*", *European Journal of Biochemistry*, 259: 426-434
- De Jaeger, G., De Wilde, C., Eeckhout, D., Fiers, E., Depicker, A.**, (2000), "The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance", *Plant Molecular Biology*, 43: 419-428
- De Nardo, S.J., Kroger, L.A., DeNardo, G.L.**, (1999), "A new era for radiolabeled antibodies in cancer?", *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 563-569
- De Neve, M., De Loose, M., Jacobs, A., van Houdt, H., Kaluza, B., Weidle, U., van Montagu, M., Depicker, A.**, (1993), "Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*", *Transgenic research*, 2: 227-237
- De Wilde, C., De Neve, M., De Rycke, R., Bruyns, A.-M., De Jaeger, G., Van Montagu, M., Depicker, A., Engler, G.**, (1996), "Intact antigen-binding MAK33 antibody and F_{ab} fragment accumulate in intercellular spaces of *Arabidopsis thaliana*", *Plant Science*, 114: 233-241

- De Wilde, C., Van Houdt, H., De Buck, S., Angenon, G., De Jaeger, G., Depicker, A.,** (2000), "Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of transgene silencing", *Plant Molecular Biology*, 43: 347-359
- De Wilde, C., Peeters, K., Jacobs, A., Peck, I., Depicker, A.,** (2002), "Expression of antibodies and Fab fragments in transgenic potato plants: case study for bulk production in crop plants", *Molecular Breeding*, 9: 271-282
- De Wildt, R.M.T., Mundy, C.R., Gorick, B.D., Tomlinson, I.M.,** (2000), "Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions", *Nature Biotechnology*, 18: 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 Acid Research*, 13(13): 4777-4788
- Dekkers, J.C.M., Hospital, F.,** (2002), "The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations", *Nature Reviews Genetics*, 3: 22-32
- Délye, C., Matějček, A., Gasquez, J.,** (2002), "PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud)", *Pest Management Science*, 58: 474-478
- Deng, F., Hatzios, K.K.,** (2002), "Purification and characterization of two glutathione S-transferase isoenzymes from *Indica*-type rice involved in herbicide detoxification", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72: 10-23
- Dennecke, J., De Rycke, R., Botterman, J.,** (1992), "Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope", *The EMBO Journal*, 11(6): 2345-2355
- Deschauer, H., Kögel-Knabner, I.,** (1990), "Sorption behavior of a new acidic herbicide in soils", *Chemosphere*, 21(12): 1397-1410
- Deshane, J., Cabrera, G., 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: 8-14
- Deshpande, S., Hall, J.C.,** (2000), "Auxinic herbicide resistance may be modulated at the auxin-binding site in wild mustard (*Sinapsis arvensis* L.): a light scattering study", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66: 41-48
- 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: 603-615
- Devine, M.D., Duke, S.O., Fedtke, C.,** (1993), "Herbicides with auxin activity", *Physiology of herbicides action*, Prentice Hall New Jersey, 295-309
- 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
- Dodge, A.D.,** (1989), "Herbicides and plant metabolism", Cambridge University Press

- Does, M.P., Dekker, B.M.M., de Groot, M.J.A., Offringa, R.,** (1991), "A quick method to estimate the T-DNA copy number in transgenic plants at an early stage after transformation, using inverse PCR", *Plant Molecular Biology*, 17: 151-153
- Dooley, H., Grant, S.D., Harris, W.J., Porter, A.J.,**(1998), "Stabilization of antibody fragments in adverse environments", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 28: 77-83
- Doran, P.M.,** (2000), "Foreign protein production in plant tissue cultures", *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 199-204
- Dreher, M.I., Gheradi, E., Skerra, A., Milstein, C.,** (1990), „Colony assay for antibody fragments expressed in Bacteria“, *Journal of Immunology Methods*, 139: 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: 5075-5079
- Düring, K., Hippe, S., Kreuzzaler, F., Schell, J.,** (1990), „Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*“, *Plant Molecular Biology*, 15: 281-293
- Eckes, F., Wengemayer, F.,** (1987), "Overproduction of glutamine synthetase in transgenic plants", *Regulation of Plant Expression*, *Biochemical Society*, 62
- Engel, K.-H., Frenzel, T., Miller, A.,** (2002), "Current and future benefits from the use of GM technology in food production", *Toxicology Letters*, 127: 329-336
- Enjuanes, L., Sola, I., Izeta, A., Sanchez-Morgado, J.M., Gonzalez, J.M., Alonso, S., Escors, D., Sanchez, C.M.,** (1999), "Interference with virus and bacteria replication by the tissue specific expression of antibodies and interfering molecules", in *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases 2*, Eds.: Paul, Francis, Kluwer Academic Publisher
- Estruch, J.J., Carozzi, N.B., Desai, N., Duck, N.B., Warren, G.W., Koziel, M.G.,** (1997), "Transgenic plants: an emerging approach to pest control", *Nature Biotechnology*, 15: 137-141
- Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsey, G., Bishop, J.M.,** (1985), "Isolation of monoclonal antibodies specific for human *c-myc* proto-oncogene product", *Molecular and Cellular Biology*, 5(12): 3610-3616
- Fecker, L.F., Kaufmann, A., Commandeur, U., Commandeur, J., Koenig, R., Burgermeister, W.,** (1996), „Expression of single-chain antibody fragments (scFv) specific for beet necrotic yellow vein virus coat protein or 25 kDa protein in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*“, *Plant Molecular Biology*, 32: 979-986
- Fecker, L.F., Koenig, R., Obermeier, C.,** (1997), „*Nicotiana benthamiana* plants expressing beet necrotic yellow vein 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“, *Arch. Virol.*, 142: 1857-1863
- Feng, P.C.C., Ruff, T.G., Rangwala, S.H., Rao, S.R.,** (1998), "Engineering plant resistance to thiazopyr herbicide via expression of a novel esterase deactivation enzyme", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 59: 89-103
- Fiedler, U., Conrad, U.,** (1995), "High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds", *Bio/Technology*, 13: 1090-1093

- Fiedler, U.**, (1996), "Hochoexpression rekombinanter Antikörperfragmente in transgenen Pflanzen", Dissertation, Universität Halle/Saale
- Fiedler, U., Phillips, J., Artsaenko, O., Conrad, U.**, (1997), "Optimisation of scFv antibody production in transgenic plants", *Immunotechnology*, 3: 205-216
- Fiedler, U., Artsaenko, O., Phillips, J., Conrad, U.**, (1998), „Transgenic plants –a low cost production sytem for recombinant antibodies“, *Recombinant antibodies-applications in plant sience and plant pathology*, Harper, K., Ziegler, A., (Eds.), Taylor and Francis London
- Fillatti, J.J., Kiser, J., Rose, R., Comai, L.**, (1987), "Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using binary *Agrobacterium tumefaciens* vector", *Bio/Technology*, 5: 726-730
- Firek, S., Draper, J., Owen, M.R.L., Gandecha, A., Cockburn, B., Whitelam, G.C.**, (1993), "Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures", *Plant Molecular Biology*, 23: 861-870
- Firoozabady, E., De Boer, D.L., Merlo, D.J., Halk, E.L., Amerson, L.N., Rashka, K.E., Murray, E.E.**, (1987), „Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants“, *Plant Molecular Biology*, 10: 105-116
- Fischer, R., Hain, R.**, (1994), „Plant disease resistance resulting from the expression of foreign phytoalexins“, *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 125-130
- 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: 401-410
- Fischer, R., Drossard, J., Commandeur, U., Schillberg, S.**, (1999), „Towards molecular farming in the future: moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants“, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30: 101-108
- Fischer, R., Liao, Y.C., Hoffmann, K., Schillberg, S., Emans, N.**, (1999), „Molecular farming of recombinant antibodies in plants“, *Biol. Chem.*, 380: 825-839
- Fischer, R., Emans, N.**, (2000), "Molecular farming of pharmaceutical proteins", *Transgenic Research*, 9: 279-299
- Fischer, R., Schillberg, S., Emans, N.**, (2001), "Molecular farming of medicines: field of growing promise", *Outlook on Agriculture*, 30(1): 31-36
- Fischer, R., Emans, N., Schillberg, S.**, (2001), „Achieving plant disease resistance by antibody expression“, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23: 236-245
- Fischhoff, D.A., Bodish, K.S., Perlak, F.J.**, (1987), "Insect tolerant transgenic tomato plants", *Biotechnology*, 5: 807-813
- Fisher, D.K., Gultinan, M.J.**, (1995), "Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: A seed-to seed protocol", *Plant Molecular Biology Reporter*, 13(3): 278-289
- Forsgren, A., Sjöquist, J.**, (1966), " Protein A from *Staphylococcus aureus*. I. Pseudo immune reaction with human gamma-globulin ", *Journal of Immunology*, 97: 822-827
- Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K., Hirth, L.**, (1980), "Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA", *Cell*, 21(1): 285-294

- Franconi, R., Roggero, P., Pirazzi, P., Arias, F.J., Desiderio, A., Bitti, O., Pashkoulov, D., Mattei, B., Bracci, L., Masenga, V., Milne, R.G., Benvenuto, E.,** (1999), "Functional expression in bacteria and plants of an scFv antibody against tospoviruses", *Immunotechnology*, 4: 189-201
- Franken, E., Teuschel, U., Hain, R.,** (1997), „Recombinant proteins from transgenic plants“, *Current Opinion in Biotechnology*, 8(4): 285-294
- Frayley, R.T., Kishore, G., Gasser, C.S., Padgett, S., Horsch, R., Rogers, S., Della-Cioppa, G., Shah, D.,** (1987), "Genetically-engineered herbicide tolerance – technical and commercial considerations, *Proc. Brit. Crop Protect. Conf.*, Surrey, UK, 463-471
- Frigerio, L., Vine, N.D., Pedrazzini, E., Hein, M.B., Wang, F., Ma, J.K.C., Vitale, A.,** (2000), "Assembly, secretion, and vacuolar delivery of a hybrid immunoglobulin in plants", *Plant Physiology*, 123: 1483-14933
- Frigerio, L., Foresti, O., Felipe, D.H., Neuhaus, J-M., Vitale, A.,** (2001), "The c-terminal tetrapeptide of phaesolin is sufficient to target green fluorescent protein to the vacuole", *Journal of Plant Physiology*, 158: 499-503
- Frisch, C., Kolmar, H., Fritz, H.J.,** (1994), "A soluble immunoglobulin variable domain without a disulfide bridge: construction, accumulation in the cytoplasm of *E.coli*, purification and physicochemical characterization", *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 375: 353-356
- Frisch, D.A., Harris-Haller, L.W., Yokubaitis, N.T., Thomas, T.L., Hardin, S.H., Hall, C.,** (1995), "Complete sequence of binary vector Bin19", *Plant Molecular Biology*, 27: 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 Academy of Sciences of the United States of America*, 82(17): 5824-5828
- Gaffney, J.F., Tolson, J.K., Querns, R., Shilling, D.G., Moye, H.A.,** (1998), "The influence of benomyl formulation on the response of cucumber seedlings (*Cucumis sativus*) to dibutylurea", *Pestic. Science*, 52: 287-291
- Galili, G., Sengupta-Gopalan, C., Ceriotti, A.,** (1998), "The endoplasmatic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies", *Plant Molecular Biology*, 38(1-2): 1-29
- Gallie, D.R.,** (1996), „Translational Control of Cellular and Viral mRNA's“, *Plant Molecular Biology*, 32: S.145-158
- Gallo-Meagher, M., Irvine, J.E.,** (1996), "Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the *bar* gene", *Crop Science*, 36: 1367-1374
- 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: 2871-2888
- Gasser, C.S., Fraley, R.T.,** (1989), "Genetically engineering plants for crop improvement", *Science*, 244: 1293-1299
- Gatz, C., Lenk, I.,** (1998), „Promoters that respond to chemical inducers“, *Trends in Plant Science*, 3(9): 352-358
- Gavilondo, J.V., Larrick, J.W.,** (2000), "Antibody engineering at the millennium", *BioTechniques*, 29: 128-145

- Gething, M.-J., Sambrook, J.,** (1992), "Protein folding in the cell", *Nature*, 355: 33-44
- Gheysen, G., Angemon, G., Van Montagu, M.,** (1998), „*Agrobacterium*-mediated plant transformation: a scientifically intriguing story with significant applications“, *Transgenic Plant Research*, 1-33
- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., Carter, A.,** (2000), "Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals", *Nature Biotechnology*, 18: 1151
- Giddings, G.,** (2001), "Transgenic plants as protein factories", *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 450-454
- Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P.-C., Bouvier-Durand, M., Vartanian, N.,** (1994), "Current advances in abscisic acid action and signalling", *Plant Molecular Biology*, 26: 1557-1577
- Giraudi, G., Rosso, I., Baggiani, C., Giovandoli, C., Vanni, A., Grassi, G.,** (1999), "Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for bealaxyl and its application to the analysis of water and vine", *Analytica Chimica Acta*, 392: 85-94
- Glick, B.R., Pasternak, J.J.,** (1994), „Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA“, ASM Press Washington, D.C., 113,155
- Glockshuber, R., Schmidt, T., Plückthun, A.,** (1992), "The Disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding *in vitro*, and functional expression in *Escherichia coli*", *Biochemistry*, 31: 1270-1279
- Godijn, O.J.M., Pen, J.,** (1995), "Plants as bioreactors", *Tibtech*, 13: 379-387
- Goletz, S., Christensen, P.A., Kristensen, P., Blohm, D., Tomlinson, I., Winter, G., Karsten, U.,** (2002), "Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display", *Journal of Molecular Biology*, 315: 1087-1097
- Gomord, V., Wee, E., Faye, L.,** (1999), "Protein retention and localization in the endoplasmatic reticulum and the Golgi apparatus", *Biochemie*, 81: 607-618
- Gong, P., Wilke, B.M., Fleischmann, S.,** (1999), "Soil-based phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to terrestrial higher plants", *Arch. 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
- Graham, B.M., Porter, A.J.R., Harris, W.J.,** (1995), "", *Chem. Tech. Biotechnol.*, 63: 279-289
- Griesbach, A.D.,** (1983), „Protoplast Microinjection“, *Hortscience*, 18(4): 616
- Griffiths, A.D., Duncan, A.R.,** (1993), "Production of human antibodies using bacteriophage", *Current Opinion in Immunology*, 5: 263-267
- Griffiths, A.D., Malmquist, 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-selfantibodies with high specificity from phage display libraries", *The EMBO Journal*, 12(2): 725-734

Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J., Prospero, T.D., Hoogenboom, H.R., Nissim, A., Cox, J.P.L., Harrison, J.L., Zaccolo, M., Gherardi, E., Winter, G., (1994), "Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires", 13(14): 3245-3260

Griffiths, A.D., Duncan, A.R., (1998), "Strategies for selection of antibodies by phage display", *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 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 Academy of Sciences of the United States of America*, 85(10): 3435-3439

Grossmann, K., Kwiatkowski, J., (1993), "Selective induction of ethylene and cyanide biosynthesis appears to be involved in the selectivity of the herbicide Quinchlorac between rice and barnyardgrass", *Journal of Plant Physiology*, 142: 457-466

Grossmann, K., Kwiatkowski, J., (1995), "Evidence for a causative role of cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the herbicidal mode of action of quinchlorac in barnyard grass", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 51: 150-160

Grossmann, K., Schmülling, T., (1995), "The effects of the herbicide quinchlorac on shoot growth in tomato is alleviated by inhibitors of ethylene biosynthesis and by the presence of an antisense construct to the 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid (ACC) synthase gene in transgenic plants", *Plant Growth Regulation*, 16: 183-188

Grossmann, K., Scheltrup, F., (1995), "On the mode of action of the new, selective herbicide Quinmerac", *Brighton Crop Protection Conference-Weeds*, 4D-5: 393-398

Grossmann, K., Scheltrup, F., Kwiatkowski, J., Caspar, G., (1996), "Induction of abscisic acid is a common effect of auxin herbicides in susceptible plants", *Journal of Plant Physiology*, 149: 475-478

Grossmann, K., Scheltrup, F., (1997), "Selective induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase activity is involved in the selectivity of the auxin herbicide quinchlorac between barnyard grass and rice", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 58: 145-153

Grossmann, K., Scheltrup, F., (1998), "Studies on the mechanism of selectivity of the auxin herbicide Quimerac", *Pestic. Sci.*, 52: 111-118

Grossmann, K., (1998), "Quinchlorac belongs to a new class of highly selective auxin herbicides", *Weed Sci.*, 46: 707-716

Grossmann, K., (1998), "The mode of action of quinchlorac: a case study of a new auxin-type herbicide", 181-214

Grossmann, K., (2000), "Mode of action of auxin herbicides: a new to a long, drawn out story", *Trends in Plant Science*, 5(12): 506-508

Grossmann, K., Hansen, H., (2001), "Ethylene-triggered abscisic acid: a principle in plant growth regulation?", *Physiologia Plantarum*, 113: 9-14

- Grossmann, K., Kwiatkowski, J., Tresch, S.,** (2001), „Auxin herbicides induce H₂O₂ overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.)”, *Journal of Experimental Botany*, 52(362): 1811-1816
- Grotz, N., Guerinot, M.L.,** (2002), “Limiting nutrients: an old problem with new solutions?”, *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 158-163
- Grover, A., Pareek, A., Singla, S.L., Minhas, D., Katiyar, S., Ghawana, S., Dubey, H., Agarwal, M., Rao, G.U., Rathee, J., Grover, A.,** (1998), „Engineering crops for tolerance against abiotic stresses through gene manipulation, *Current Science*, 75(5): 689-696
- Gruber, V., Berna, P.P., Arnaud, T., Bournat, P., Clement, C., Mison, D., Olganier, B., Philippe, L., Theisen, M., Baudino, S., Benicourt, C., Cudrey, C., Blöes, C., Duchateau, N., Dufour, S., Gueguen, C., Jacquet, S., Ollivo, C., Poncetta, C., Zorn, N., Ludevid, D., Van Dorsselaer, A., Verger, R., Doherty, A., Merot, A., Danzin, C.,** (2001), “Large-scale production of a therapeutic protein in transgenic tobacco plants: effect of a subcellular targeting on quality of a recombinant dog gastric lipase”, *Molecular Breeding*, 7: 329-340
- 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
- Haden, E., Menck, B-H., Honecker, H.,** (1985), „Quinchlorac (BAS 514H)-a new herbicide to control *Echinochloa spp.* In rice”, *British Crop Protection Conference-Weeds*, 77-83
- Haden, E., Menck, B-H.,** (1986), „BAS 518H- ein Spezialherbizid zur Bekämpfung von *Galium aparine* in Raps, Getreide und Zuckerrüben“, *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, 51/2a, 399-408
- Hall, J.C., Bassi, P.K., Spencer, M.S., Vanden Born, W.H.,** (1985), “An evaluation of the role of ethylene in herbicidal injury induced by picloram or clopyralid in rapeseed and sunflower plants”, *Plant Physiology*, 90: 139-143
- Hall, J.C., Webb, S.R., Desphande, S.,** (1996), „An overview of auxinic herbicide resistance: wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) as a case study”, *Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance*, American Chemical Society, 4: 28-43
- Hanes, J., Plückthun, A.,** (1997), „*In vitro* selection and evolution of functional proteins using ribosome display“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 4937-4942
- Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H.R., Plückthun, A.,** (1998), “Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies *in vitro* from immune libraries“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 14130-14135
- Hansen, H., Grossmann, K.,** (2000), „Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition”, *Plant Physiology*, 124: 1437-1448
- Hansen, G., Wright, M.S.,** (1999), “Recent advances in the transformation of plants”, *Trends in Plant Science*, 4(6): 226-231
- Haq, T.A., Mason, H.S., Clements, J.D., Arntzen, C.J.,** (1995), “Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants”, *Science*, 268: 714-716

- Harcourt, R.L., Kyojuka, J., Floyd, R.B., Bateman, K.S., Tanaka, H., Decroocq, V., Llewellyn, D.J., Zhu, X., Peacock, W.J., Dennis, E.S.,** (2000), "Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalypts", *Molecular Breeding*, 6: 307-315
- Hartung, W., Peuke, A.D., Davies, W.J.,** (1999), "Abscisic acid – a hormonal long distance stress signal in plants under drought and salt stress", In: *Handbook of crop stress*", eds.: Pessarakali, M., NY, 731-747
- Hartung, W., Sauter, A., Hose, E.,** (2002), "Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to", *Journal of Experimental Botany*, 53(366): 27-32
- 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 sugar beet and oilseed rape callus tissue", *Mol. Gen.Genet.*, 212(1): 182-190
- Hatzios, K.K.,** (1989), „Biotechnology applications in weed management: now and in the future „, *Adv. Agron.*, 41: 325-375
- Hatzios, K.K.,** (1991), „ „, *Environmental Chemistry of Herbicides*, Grover, R., Cessna, A.J., (Eds.), CRC Press Boca Raton, FL., Vol.II: 141-185
- Haughn, G.W., Smith, J., Mazur, B., Somerville, C.,** (1988), "Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides", *Mol. Gen. Genet.*, 211: 266-271
- He, M., Taussig, M.J.,** (1997), „Antibody-ribosome-mRNA complexes as efficient selection particles for *in vitro* display and evolution of antibody combining sites", *Nucleic Acid Research*, 25: 5132-5134
- Heap, I.M.,** (1994), "Identification and documentation of herbicide resistance", *Phytoprotection*, 75(Suppl.): 85-90
- Hedden, P., Phillips, A.L.,** (2000), "Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants", *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 130-137
- Heifetz, P.B.,** (2000), "Genetic engineering of the chloroplast", *Biochimie*, 82: 655-666
- Heifetz, P.B., Tuttle, A.M.,** (2001), "Protein expression in plastids", *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 157-161
- Heß, D.,** (1992), "Biotechnologie der Pflanzen", Verlag Eugen Ulmer Stuttgart,
- Herbers, K., Wilke, I., Sonnewald, U.,** (1995), „ A thermostable xylanase from *Clostridium thermocellum* expressed at high levels in the apoplast of transgenic tobacco has no detrimental effects and is easily purified „, *Bio/Technology* 13: 63-66
- Herbers, K., Sonnewald, U.,** (1999), „Production of new/modified proteins in transgenic plants", *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2): 163-168
- Hiatt, A., Cafferkey, R., Bowdish, K.,** (1989), „Production of antibodies in transgenic plants“, *Nature*, 342: 76-78
- Hiatt, A.,** (1990), „Antibodies produced in plants“, *Nature*, 344: 469-470
- Hilder, V.A., Boulter, D.,** (1999), "Genetic engineering of crop plants for insect resistance-a critical review", *Crop Protection*, 18: 177-191

- 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): 4482-4490
- Hilpert, K., Hansen, G., Wessner, H., Küttner, G., Welfle, K., Seifert, M., Höhne, 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, Wirkungen, Nebenwirkungen", Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Hock, B., Kramer, K., Seifert, M.**, (2000), "Environmental analysis using antibody and receptor based techniques", *Intern. J. Envir. Anal. Chem.*, 78(3-4): 289-303
- 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
- Holt, L.J., Enever, C., De Wildt, R.M., Tomlinson, I.M.**, (2000), "The use of recombinant antibodies in proteomics", *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 445-449
- 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: 713-723
- Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P., Winter, G.**, (1991), "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains", *Nucleic Acid Research*, 19(15): 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: 381-388
- Hoogenboom, H.R., Marks, J.D., Griffiths, A.D., Winter, G.**, (1992), "Building antibodies from their genes", *Immunological Reviews*, 130: 41-68
- Hoogenboom, H.R.**, (1997), "Designing and optimising library selection strategies for generating high-affinity antibodies", *Trends in Biotechnology*, 15: 62-70
- Hoogenboom, H.R., Chames, P.**, (2000), "Natural and designer binding sites made by phage display technology", *Immunology Today*, 21(8): 371-378
- Hoogenboom, H.R.**, (2002), "Overview of antibody phage-display technology and its applications", *Antibody Phage Display: Methods and protocols*, O'Brien, P.M., Aitken, R., (Eds.), Humana Press New Jersey
- 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): 119-127
- Honjoh, K., Shimizu, H., Nagaishi, N., Matsumoto, H., Suga, K., Miyamoto, T., Lio, M., Datano, S.**, (2001), "Improvement of freezing tolerance in transgenic tobacco leaves by expressing the *h1C6* gene", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65(8): 1796-1804
- Horsch, R.B., Fraley, R.T., Rogers, S.G., Sanders, P.R., Lloyd, A., Hoffmann, N.L.**, (1984), "Inheritance of functional foreign genes in plants", *Science*, 223(4635): 496-498

- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T.,** (1985/I), „A simple and general method for transferring genes into plants“, *Science*, 227(4691): 1229-1231
- Horsch, R.B., D., Rogers, S.G., Fraley, R.T.,** (1985/II), „Transgenic plants“, *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology*, 50: 433-437
- Hudson, P.J.,** (1998), “Recombinant antibody fragments”, *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 395-402
- Hudson, P.J.,** (1999), “Recombinant antibody constructs in cancer therapy”, *Current Opinion in Immunology*, 11: 548-557
- Hulting, A.G., Wax, L.M., Nelson, R.L., Simmons, F.W.,** (2001), “Soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivar tolerance to sulfentrazone”, *Crop Protection*, 20: 679-683
- Hulznik, R.J.M., De Groot, P.F.M., Croes, A.F., Quedvlieg, W., Twell, D., Wullems, G.J., van Herpen, M.M.A.,** (2002), “The 5'-untranslated region of the *npt303* gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation”, *Plant Physiology*, 129: 342-353
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M-S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Bruccoleri, R.E., Haber, E., Crea, R., Oppermann, H.,** (1988), “Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 5879-5883
- 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.), *Nature Biotechnology*, 14(6): 745-750
- Jacob, F., Jäger, E.J., Ohmann, E.,** (1994), “Botanik”, Gustav Fischer Verlag
- Janick, J.,** (2001), “New Crops for the 21st century”, in *Crop Science: progress and prospects*, Eds.: Nösberger, J., Geiger, H.H., Struik, P.C., Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 307-327
- Jeffers, G.M., O'Donovan, J.T., Hall, L.M.,** (1996), “Wild mustard (*Brassica kaber*) resistance to ethametsulfuron but not to other herbicides”, *Weed Technology*, 10: 847-850
- Jermutus, L., Honegger, A., Schwesinger, F., Hanes, J., Plückthun, A.,** (2000), „Tailoring *in vitro* evolution for protein affinity or stability“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1): 75-80
- Jestin, J.-L., Volioti, G., Winter, G.,** (2001), “Improving the display of proteins on filamentous phage”, *Res. Microbiol.*, 152: 187-191
- Jones, S.D., Porter-Brooks, J., Eberhardt, B., Chen, S.Y., Mhashilkar, A., Marasco, W., Rarnstedt, U.,** (1995), “Gene therapy for HIV using intracellular antibodies”, *Journal of Cellular Biochemistry*, S 21A: 395
- Jones, S.D., Marasco, W.A.,** (1998), “Antibody for targeted gene therapy: extracellular gene targeting and intracellular expression”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31: 153-170

- Jung, S., Plückthun, A.**, (1997), "Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting", *Protein Engineering*, 10(8): 959-966
- Jung, S., Honegger, A., Plückthun, A.**, (1999), "Selection for improved protein stability by phage display", *Journal of Molecular Biology*, 294: 163-180
- Jurado, P., Ritz, D., Beckwith, J., de Lorenzo, V., Fernandez, L.A.**, (2002), "Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*", *Journal of Molecular Biology*, 320: 1-10
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., Foeller, C.**, (1991), "Sequences of proteins of immunological interests", 5th Edition US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health
- Kastern, W., Sjöbring, U., Björck, L.**, (1992), "Structure of Peptostreptococcal protein L and identification of a repeated immunoglobulin light chain-binding domain", *The Journal of Biological Chemistry*, 267(18): 12820-12825
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.**, (1999), "Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor", *Nature Biotechnology*, 17: 287-291
- Kawchuk, L.M., Prüfer, D.**, (1999), "Molecular strategies for engineering resistance to potato viruses", *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21: 231-247
- Keller, B., Hütter Carabias, E.**, (2001), "Transgenic plants for sustainable crop production", in *Crop Science: progress and prospects*, Eds.: Nösberger, J., Geiger, H.H., Struik, P.C., Library of Congress Cataloging-in Publication Data, 351-367
- Kende, H., Zeevaart, J.A.D.**, (1997), "The five classical plant hormones", *Plant Cell*, 9: 1197-1210
- Kermode, A.R.**, (1996), "Mechanisms of intracellular protein transport and targeting in plant cells", *Critical Reviews in Plant Science*, 15(4): 285-423
- Khoudi, H., Laberge, S., Ferullo, J.-M., Bazin, R., Darveau, A., Castonguay, Y., Allard, G., Lerneux, R., Vezina, L.-P.**, (1999), "Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants", *Biotechnology and Bioengineering*, 64(2): 135-142
- Kinney, A.J.**, (1994), "Genetic modification of storage lipids of plants", *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 144-151
- Kishore, G.M., Brundage, L., Kolk, K., Padgett, S.R., Rochester, D., Huyhn, Q.K., Della-Cioppa, G.**, (1986), "Isolation, purification and characterization of a glyphosate-tolerant mutant *E.coli* EPSP synthase", *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.*, 45: 1506
- Klaassen, H., Menck, B.-H.**, (1994), "Rebell-das neue Rübenerbizid", *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderheft, XIV*: 595-602
- 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: 54-63
- Knappik, A., Plückthun, A.**, (1995), "Engineered turns of a recombinant antibody improve in vivo folding", *Protein Engineering*, 8(1): 81-89
- Knauf, V.C.**, (1995), "Transgenic approaches for obtaining new products from plants", *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 165-170

- Knippers, R.**, (1995), "Molekulare Genetik", Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Köhler, G., Milstein, C.**, (1975), „ Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity „, *Nature*, 256: 495
- Kortt, A.A., Dolezal, O., Power, B.E., Hudson, P.J.**, (2001), „Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting“, *Biomolecular Engineering*, 18: 95-108
- Kota, M., Daniell, H., Varma, S., Garczynski, S.F., Gould, F., Moar, W.J.**, (1999), „Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 1840-1845
- Kreitman, R.J.**, (1999), „Immunotoxins in cancer therapy“, *Current Opinion in Immunology*, 11: 570-578
- Kuchuk** (2001), "Transformation Methods in Grain Legumes" in "Carbohydrates in Grain Legume Seeds", (Eds.) Hedley, C.L., CABI Publishing
- Kumar, A.**, (2001), „Plant Biotechnology: Future Perspectives“, *Defence Science Journal*, 51(4): 353-366
- Kush, G.S.**, (2001), "Green revolution: the way forward", *Nature Reviews Genetics*, 2: 815-822
- Kushnadi, A.R., Nikolov, Z.L., Howard, J.A.**, (1997), "Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical Considerations", *Biotechnology and Bioengineering*, 56: 473-484
- Laemmli, U.K.**, (1970), "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227(259): 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: 111-117
- Landes, M., Nuyken, W., Jennrich, H., Jung, B.**, (1993), „New possibilities for the control of problem weeds in sugar beet with Quinmerac plus Chloridazon combinations“, *Brighton Crop Protection Conference-Weeds*, 7C-4: 1041-1046
- Landridge, W.H.R.**, (2000), "Edible vaccines", *Sci. Am.*, 283: 48-53
- Larrick, J.W., Yu, L., Chen, J., Jaiswal, S., Wycoff, K.**, (1998), „Production of antibodies in transgenic plants“, *Res. Immunol.*, 149: 603-609
- Larrick, J.W., Yu, L., Naftzger, C., Jaiswal, S., Wycoff, K.**, (2001), „Production of secretory IgA antibodies in plants“, *Biomolecular Engineering*, 18: 87-94
- Larrick, J.W., Thomas, D.W.**, (2001), „Producing proteins in transgenic plants and animals“, *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 411-418
- 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): 116-128
- Lassner, M., Bedbrook, J.**, (2001), "Directed molecular evolution in plant improvement", *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 152-156

- 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: 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* Huntington aggregation in cellular models of Huntington's disease", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(8): 4764-4769
- Lee, J.K., Ahn, K.C., Park, O.S., Ko, Y.K., Kim, D-W.,** (2002), "Development of an immunassay for the residues of herbicide bensulfuron-methyl", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 1791-1803
- Lener, M., Horn, I.R., Cardinale, A., Messina, S., Nielsen, U.B., Rybak, S.M., Hoogenboom, H.R., Cattaneo, A., Biocca, S.,** (2000), "Diverting a protein from its cellular location by intracellular antibodies", Eur. J. Biochem., 267: 1196-1205
- Leps, M.,** (2002), "Expression von Einkettenantikörpern gegen das Fungizid Kresoxim.methyl in transgenen Tabakpflanzen", Dissertation, Universität Halle/Wittenberg
- Li, Y., Ockburn, W., Kilpatrick, J., Whitelam, G.C.,** (1999), "Selection of rabbit single-chain Fv fragments against the herbicide atrazin using a new phage display system", Food and Agricultural Immunology, 11: 5-17
- Liddell, E., Weeks, I.,** (1996), "Antikörper-Techniken", Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- Little, M., Kipriyanov, S.M., Le Gall, F., Moldenhauer, G.,** (2000), "Of mice and man: hybridoma and recombinant antibodies", Immunology Today, 21(8): 364-370
- Llewellyn, D., Lyon, B.R., Cousins, Y., Hupatz, J., Dennis, E.S., Peacock, W.J.,** (1990), "Genetic engineering of plants for resistance to the herbicide 2,4-D", in "Genetic engineering in crop plants", eds.: Lycett, G.W., British Library Cataloguing in Publication Data
- Longstaff, M., Newell, C.A., Boonstra, B., Strachan, G., Learmonth, D., Harris, W.J., Porter, A.J., Hamilton, W.D.,** (1998), "Expression and characterisation of single-chain antibody fragments produced in transgenic plants against the organic herbicides atrazine and paraquat", Biochimica Et Biophysica Acta, 1381: 147-160
- Lottspeich, F., Zorbas, H.,** (1998), "Bioanalytik", Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- Low, N.M., Holliger, P.H., Winter, G.,** (1996), "Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain", Journal of Molecular Biology, 260: 359-368
- Lutz, K.A., Knapp, J.E., Maliga, P.,** (2001), "Expression of *bar* in the plastid genome confers herbicide resistance", Plant Physiology, 125: 1585-1590
- Lyon, B.R., Llewellyn, D.J., Hupatz, J.L., Dennis, E.S., Peacock, W.J.,** (1989), "Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco plants confers resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid", Plant Molecular Biology, 13: 533-540
- Ma, J.C-K., Hiatt, A., Hein, R., Vine, N.D., Wang, F., Stabila, C., van Dolleweerd, K., Mostov, K., Lehner, T.,** (1995/I), "Generation and assembly of secretory antibodies in plants", Science, 268: 716-719

- Ma, J.C-K., Hein, M.,** (1995/II), „Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants”, Trends in Biotechnology, 13: 522-527
- Ma, J.C-K., Hein, M.,** (1995/III), „Plant antibodies for Immunotherapy”, Plant Physiology, 109: 341-346
- Ma, J.K-C.,** (1995), “Antibody expression in plants”, Antibody Expression and Engineering, 56-69
- Ma, J.C-K., Hikmat, B.Y., Wycoff, K.,** (1998), „Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans”, Nat. Med., 4: 601-606
- Maliga, P.,** (2002), “Engineering the plastid genome of higher plants”, Current opinion in Plant Biology, 5: 164-172
- Mamdouh, M.N.A.,** (1995), “ Gluthathione regulation of gluthathione S-transferase and peroxidase activity in herbicide-treated *Zea mays*”, Plant Physiological Biochemistry, 33(2): 185-192
- Mannion, A.M.,** (1994), “Agriculture, environment and biotechnology”, Agriculture, Ecosystems and Environment, 53. 31-45
- 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”, Immuno. Technology, 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., La Vecchio, 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: 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”, Bio/Technology, 10: 779-783
- Martineau, P., Jones, P., Winter, G.,** (1998), “Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm”, Journal of Molecular Biology, 280: 117-127
- Martineau, P., Betton, J.M.,** (1998), “*In vitro* folding and thermodynamic stability of an antibody fragment selected *in vivo* for high expression levels in *Escherichia coli* cytoplasm”, Journal of Molecular Biology, 292: 921-929
- 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: 5335-5340
- Mason, H.S., Arntzen, C.J.,** (1995), “Transgenic plants as vaccine production systems”, Tibtech, 13: 388

- Mc Cafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J.**, (1990), "Phage antibodies: Filamentous phage displaying antibody variable domains", *Nature*, 348: 552-554
- Mc Cafferty, J.**, (1996), "Phage display: Factors affecting, panning efficiency", in *Phage Display of Peptides and Proteins*, 261-276
- McCormick, A.A., Kumagai, M.H., Hanley, K., Turpen, T.H., Hakim, I., Grill, L.K., Tusé, L.K., Levy, S., Levy, R.**, (1999), "Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 703-708
- Mehta, R.A., Cassol, T., Li, N., Ali, N., Handa, A.K., Mattoo, A.K.**, (2002), "Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life", *Nature Biotechnology*, 20: 613-618
- Meilan, R., Han, K.-H., Ma, C., DiFazio, S.P., Eaton, J.A., Hoiem, E.A., Stanton, B.J., Crockett, R.p., Taylor, M.L., James, R.R., Skinner, J.S., Jouanin, L., Pilate, G.**, (2002), "The CP4 transgene provides high levels of tolerance to Roundup® herbicide in field-grown hybrid poplars", *Can. J. For. Res.*, 32: 967-976
- Menassa, R., Nguyen, V., Jevnikar, A., Brandle, J.**, (2001), "A self-contained system for the field production of plant recombinant interleukin-10", *Molecular Breeding*, 8: 177-185
- Mercenier, A., Wiedermann, U., Breiteneder, H.**, (2001), "Edible genetically modified microorganisms and plants for improved health", *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 510-515
- Mersereau, M., Pazour, G.J., Das, A.**, (1990), "Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation", *Gene*, 90: 149-151
- Meulenbergh, E.P., Mulder, W.H., Stoks, P.G.**, (1995), "", *Environ. Sci. Technol.*, 29: 553-561
- Mhashilkar, A.M., Bagley, J., Chen, S.Y., Szilvay, A.M., Helland, D.G., Marasco, W.A.**, (1995), "Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies", *EMBO Journal*, 14: 1542-1551
- Miele, L.**, (1997), "Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations", *Trends in Biotechnology*, 15: 45-50
- Moffat, A.S.**, (1995), "Exploring transgenic plants as new vaccine source", *Science*, 268:658-660
- Mohr, H., Schopfer, P.**, (1992), "Pflanzenphysiologie", Springer Verlag
- Mourgues, F., Brisset, M-N., Chevreau, E.**, (1998), "Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering", *Tibtech*, 16: 203-210
- Munroe, S., Pelham, H.R.B.**, (1987), "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins", *Cell*, 48 899-907
- Murashige, T., Skoog, F.**, (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiolica Plantarum*, 15: 473-497

- Murray, C., Sutherland, P.W., Phung, M.M., Lester, M.T., Marshall, R.K., Christeller, J.T.**, (2002), "Expression of biotin-binding proteins, avidin and streptavidin, in plant tissues using plant vacuolar targeting sequences", *Transgenic Research*, 11: 199-214
- Myhre, E.B., Erntell, M.**, (1985), "A non-immune interaction between the light chain of human immunoglobulin and a surface component of a *Peptococcus Magnus* strain", *Molecular Immunology*, 22(8): 879-885
- Nakamura, K., Matsuoka, K.**, (1993), "Protein targeting to the vacuole in plant cells", *Plant Physiology*, 101: 1-5
- Nakashita, H., 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
- 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", *Bio/Technology*, 6: 403-409
- Neupert, S., Knirsch, J.**, (1994), "Der Beitrag des Anbaus herbizidresistenter Kulturpflanzen für die Ernährungssicherung in der Dritten Welt", *Verfahren zur Technikfolgeabschätzung des Anbaus von Kulturpflanzen mit gentechnisch erzeugter Herbizidresistenz*, Heft 16
- Nilson, B.H.K., Solomon, A., Björck, L., Åkerström, B.**, (1992), "Protein L from *Peptostreptococcus magnus* binds to the κ light chain variable domain", *The Journal of Biological Chemistry*, 267(4): 2234-2239
- Nissim, A., Hoogenboom, H.R., Tomlinson, I.M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D., Winter, G.**, (1994), "Antibody fragments from a "single pot" phage display library as immunochemical reagents", *The EMBO Journal*, 13(3): 692-698
- Nyken, W., Haden, E., Menck, B-H., Klingenschmitt, D.**, (1985), "BAS 518H- a new herbicide for weed control in cereals, rapeseed and sugar beet", *British Crop Protection Conference-Weeds*, 2-8, 71-76
- O'Brien, P.M., Aitken, R.**, (2002), "Antibody phage display", *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc.
- Odell, J.T., Nagy, F., Chua, N.H.**, (1985), "Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter", *Nature*, 313(6005): 810-812
- Oeller**, (1991), "Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA", *Science*, 254: 437-439
- Oettmeier, W.**, (1999), "Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II", *CMLS*, 55: 1255-1277
- Ohkawa, H., Tsujii, H., Shimoji, M., Imajuku, Y., Imaishi, H.**, (1999), "Cytochrome P450 biodiversity and plant protection", *Journal of Pesticide Science*, 24: 197-203
- Olofsdotter, M., Valverde, B.E., Madsen, K.H.**, (2000), "Herbicide resistant rice (*Oryza sativa* L.): Global implications for weedy rice and weed management", *Ann. Appl. Biol.*, 137: 279-295
- Owen, M., Gandecha, A., Cockburn, B., Whitlam, G.**, (1992), "Synthesis of functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco", *Bio/Technology*, 10: 790-794

- Owen, W.J.**, (1989), "Metabolism of herbicides-detoxification as a basis of selectivity", in Dodge, A.D., *Herbicides and Metabolism*, Cambridge University Press, 171-198
- Pagny, S., Lerouge, P., Faye, L., Gomord, V.**, (1999), "Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmatic reticulum", *Journal of Experimental Botany*, 50(331): 157-164
- Park, S.H., Park, J., Smith, R.H.**, (2001), "Herbicide and insect resistant elite transgenic rice", *Journal of Plant Physiology*, 158: 1221-1226
- 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., De Wilde, C., De Jaeger, G., Angenon, G., Depicker, A.**, (2001), "Production of antibodies and antibody fragments in plants", *Vaccine*, 19: 2756-2761
- Pelham, H.R.B.**, (1990), "The retention signal for soluble-proteins of the endoplasmatic reticulum", *Trends in Biochemicals Science*, 15(12): 483-486
- Pelham, H.R.B.**, (1996), "The dynamic organisation of the secretory pathway", *Cell. Struct. Funct.*, 21(5): 413-419
- Pen, J., Molendijk, L., Quax, W.J., Sijmons, P.C., van Ooyen, A.J.J., van den Elzen, P.J.M., Rietveld, K., Hoekema, A.**, (1992), "Production of active *Bacillus Licheniformis* alpha-amylase in tobacco and its application in starch liquefaction", *Bio/Technology*, 10: 292-296
- Pen, J., Verwoerd, T.C., van Paridon, P.A., Beudeker, R.F., van den Elzen, P.J.M., Geerse, K., van der Klis, J.D., Versteegh, H.A.J., van Ooyen, A.J.J., Hoekema, A.**, (1993), "Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization", *Bio/Technology*, 11: 811-814
- Perlak, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, T.A.**, (1990), "Insect resistant cotton plants", *Biotechnology*, 8:939-943
- Perrin, Y., Vaquero, C., Gerrard, I., Sack, M., Drossard, J., Stoger, 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: 345-352
- 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*, 16(15): 4489-4496
- Phillipson, B.A.**, (1993), "Expression of a hybrid (1-3; 1-4) - β - glucanase in barley protoplasts", *Plant Science*, 91: 195-206
- Pimentel, D., Tort, M., D'Anna, L., Krawic, A., Berger, J., Rossman, J., Mugo, F., Doon, N., Shriberg, M., Howard, E., Lee, S., Talbot, J.**, (1998), *BioSci.*, 48: 817-826
- Piruzian, E.S., Mett, V.L., Kobets, N.S., Urmeeva, F.I.**, (1988), "The use of bacterial genes encoding herbicide tolerance in constructing transgenic plants", *Microbiological Sciences*, 5(8): 242-248
- Pittendrigh, B.R., Gaffney, P.J.**, (2001), "Pesticide Resistance: Can we make it a renewable resource?", *J. theor. Biol.*, 211: 365-375

- Plückthun, A.**, (1991), "Antibody engineering: advances from the use of *Escherichia coli* expression systems", *Bio/Technology*, 9: 545-551
- Poirier, Y., Dennis, D.E., Klomparens, K., Somerville, C.**, (1992), "Polyhydroxybutyrate, a biodegradable, thermoplastic produced in transgenic plants", *Science*, 256: 520-523
- Poirier, Y., Nawrath, C., Somerville, C.**, (1995), "Production of polyhydroxyalanoates a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants", *Bio/Technology*, 13: 142-150
- Poirier, Y., Nawrath, C.**, (1998), "Transgenic plants for the production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable thermoplastics and elastomers", *Transgenic Plant Research*, 201-220
- Ponstein, A.S., Verwoerd, T.C., Pen, J.**, (1996), "Production of enzymes for industrial use", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 792: 91-98
- Ponstein, A.S., Bade, J.B., Verwoerd, T.C., Molendijk, L., Storms, J., Beudeker, R.F., Pen, J.**, (2002), "Stable expression of phytase (*phy A*) in canola (*Brassica napus*) seeds: towards a commercial product", *Molecular Breeding*, 10: 31-44
- Powles, S.B., Holtum, J.**, (1994), "Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry", Library of Congress Cataloging-in- Publication Data, CRC Press LLC
- Powles, S.B., Shaner, D.L.**, (2001), "Herbicide resistance and world grains", Library of Congress Cataloging-in- Publication Data, CRC Press LLC
- Preston, C., Tardif, F.J., Powles, S.B.**, (1996), "Multiple mechanisms and multiple herbicide resistance in *Lolium rigidum*", 117-129
- Proba, K., Honegger, A., Plückthun, A.**, (1997); "A natural antibody missing a cysteine in v_H : consequences for the thermodynamic stability and folding", *Journal of Molecular Biology*, 265: 161-173
- Proba, K., Wörn, A., Honegger, A., Plückthun, A.**, (1998); "Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution", *Journal of Molecular Biology*, 275: 245-253
- 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
- Putwain, P.D., Collin, H.A.**, (1989), "Mechanisms involved in the evolution of herbicide resistance in weeds", *Herbicides and Metabolism*, Cambridge University Press, 211-235
- Quinn, J.P.**, (1990), "Evolving strategies for the genetic engineering of herbicide resistance in plants", *Biotech. Adv.*, 8: 321-333
- Ramirez, N., Oramas, P., Ayala, M., Rodriguez, M., Perez, M., Gabilondo, J.V.**, (2001), "Expression and long-term stability of a recombinant single-chain Fv antibody fragment in transgenic *Nicotiana tabacum* seeds", *Biotechnology Letters*, 23: 47-49
- Ramirez, N., Ayala, M., Lorenzo, D., Palenzuela, D., Herrera, L., Doreste, V., Perez, M., Gabilondo, J.V., Oramas, P.**, (2002), "Expression of a single-chain Fv fragment specific for the Hepatitis B surface antigen in transgenic tobacco plants", *Transgenic Research*, 11: 61-64

- Rau, D., Kramer, K., Hock, B.,** (2002), „Single-chain Fv antibody-alkaline phosphatase fusion proteins produced by one-step cloning as rapid detection tools for ELISA“, *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 23(2): 129-143
- Reddy, A.R., Ramanathan, V., Seetharama, N., Bajaj, S., Wu, R.,** (1999), „Genetic improvement of rice for drought and salt tolerance: molecular breeding and transgenic strategies“, in „Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments“, (Eds.), Ito, O., O'Toole, J., Hardy, B., IRRI
- 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
- Reis, K.J., Ayoub, E.M., Boyle, M.D.P.,** (1984), „Streptococcal Fc-receptors. I. Isolation and partial characterisation of the receptor from group C streptococcus“, *The Journal of Immunology*, 132(6): 3091-3097
- Repellin, A., Baga, M., Jauhar, P.P., Chibbar, R.N.,** (2001), „Genetic enrichment of cereal crop via alien gene transfer: New challenges“, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 64(2-3): 159-183
- Richardson, J.H., Marasco, W.A.,** (1995), „Intracellular antibodies: Development and therapeutic potential“, *Trends in Biotechnology*, 13: 306-310
- Richardson, J.H., Sodorski, J.G., Waldmann, T.A., Marasco, W.A.,** (1995), „Phenotypic knockout of 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: 3137-3140
- Robinson, S., Scott, N., Gackle, A.,** (2000), „Gene technology and future foods“, *Asia Pacific J.Clin. Nutr.*, 9(Suppl): S113-S118
- Roe, R.M., Burton, J.D., Kuhr, R.J.,** (1997), „Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology“, IOS Press
- Rondon, I.J., Marasco, W.A.,** (1997), „Intracellular antibodies (intrabodies) for gene therapy of infectious diseases“, *Annu. Rev. Microbiol.*, 51: 257-283
- Rondot, S., Koch, J., Breitling, F., Dübel, S.,** (2001), „A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display“, *Nature Biotechnology*, 19: 75-78
- Saalbach, I., Giersberg, M., Conrad, U.,** (2001), „High-level expression of a single-chain Fv fragment (scFv) antibody in transgenic pea seeds“, *J. Plant Physiol.*, 158: 529-533
- Sahashi, Y.,** (1925), „Über das Vorkommen von Di-hydroxy-chinolin-carbonsäure (β -Säure von U.Suzuke) in der Reiskleie“, *Biochemische Zeitschrift*, 159: 221-234
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F.,** (1989), „Molecular cloning : A laboratory manual“, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, New York
- Sandermann, H.,** (1994), „Nutzpflanzen mit künstlicher Herbizidresistenz: Verbessert sich die Rückstandssituation?“, *Verfahren zur Technikfolgeabschätzung des Anbaus von Kulturpflanzen mit gentechnisch erzeugter Herbizidresistenz*, Heft 6
- Sanders, P.R., Sammons, B., Kaniewski, H.,** (1992), „Field resistance of transgenic tomatoes expressing the tobacco mosaic virus coat protein genes“, *Phytopathology*, 82: 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 United States of America, 74(12): 5463-5467
- Scarponi, L., Esposito, A., Tomassini, C.**, (2001), „Factors of tolerance to rimsulfuron in four pepper (*Capsicum annum* L.) lines“, Agronomie, 21: 419-425
- Schaffitzel, C., Hanes, J., Jermutus, L., Plückthun, A.**, (1999), „Ribosome display: an in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries“, Journal of Immunology Methods, 231: 119-135
- Schärer-Züblin, E.V.**, (1998), „Gen-Welten Ernährung“, Alimentaryum, Vevey
- 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
- Scheltrup, F., Grossmann, K.**, (1995), „Abscisic acid is a causative factor in the mode of action of the auxinic herbicide Quinmerac in Cleaver (*Galium aparine* L.)“, Journal of Plant Physiology, 147: 118-126
- Scheltrup, F., Grossmann, K.**, (1996), „Wie wirkt Quinmerac?- Auf den Spuren eines neuen Herbizids“, Gesunde Pflanzen, 48(2): 49-54
- Schier, R., Marks, J.D.**, (1996), „Efficient *in vitro* affinity maturation of phage antibodies using BIAcore guided selection“, Hum. Antibodies Hybridomas, 7: 97-105
- Schillberg, S., Zimmermann, S., Voss, A., Fischer, R.**, (1999), „Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*“, Transgenic Research, 8: 255-263
- 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: 317-326
- Schillberg, S., Zimmermann, S., Zhang, M-Y., Fischer, R.**, (2001), „Antibody-based resistance to plant pathogens“, Transgenic Research, 10: 1-12
- Schimada, 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“, Biosci. Biotechnol. Biochem., 63(4): 779-783
- Schimpl, A.**, (1997), „Antikörper und Antikörpersynthese“, Immunologie-Grundlagen-Klinik-Praxis, Gemsa, D., Kalden, J.R., Resch, K., (Eds.), Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Schots, A., De Boer, J., Schouten, A., Roosien, J., Zilverentant, J.F., Pomp, H., Bouwman-Smits, L., Overmars, H., Gommers, F.J., Visser, B., Stekema, W.J., Bakker, J.**, (1992), „Plantibodies“: a flexible approach to design resistance against pathogens“, Neth. J. Pl. Path., 98(S2): 183-191
- 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 C-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“, Plant Molecular Biology, 30: 781-793

- Schouten, A., Roosien, J., De Boer, J.M., Wilmin, A., Rosso, M.N., Bosch, D., Stiekema, W.J., Gommers, F.J., Bakker, J., Schots, A.,** (1997), "Improving scFv antibody expression levels in the plant cytosol", *FEBS Letters*, 415: 235-241
- Schouten, A., Roosien, J., Bakker, J., Schots, A.,** (2002), "Formation of disulfide bridges by a single-chain Fv antibody in the reducing ectopic environment of the plant cytosol", *The Journal of Biological Chemistry*, 277(22): 19339-19345
- Shah, D.M., Horsch, R.B., Klee, H.J.,** (1986), "Engineering herbicide tolerance in transgenic plants", *Science*, 233: 478-481
- Sharp, C.R., Feng, P.C.C., Horton, S.R., Logusch, E.W.,** (1991), "Development of highly specific antibodies to alachlor by use of a carboxy-alachlor protein conjugate", *ACS Symp. Ser.*, 446 Pestic. Residues Food Saf., 87-95
- Sheets, M.D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindqvist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J.C., Marks, J.D.,** (1998), "Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: The production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 6157-6162
- 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", *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(4): 779-783
- Shimamoto, K.,** (1994), "Gene expression in transgenic monocots", *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 158-162
- Sijmons, P.C., Dekker, B.M.M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T.C., van den Elzen, P.J.M., Hoekema, A.,** (1990), "Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants", *Bio/Technology*, 8: 217-221
- Sivamani, E., Brey, C.W., Talbert, L.E., Young, M.A., Dyer, W.E., Kaniewski, W.K., Qu, R.,** (2002), "Resistance to wheat streak mosaic virus in transgenic wheat engineered with the viral coat protein gene", *Transgenic Research*, 11: 31-41
- Smith, M.D.,** (1996), "Antibody production in plants", *Biotechnology advances*, 14(3): 267-281
- Smith, M.D., Glick, B.R.,** (1997), "Production and applications of plant-produced antibodies", *Food Technol. Biotechnol.*, 35(3): 183-191
- Smith, M.D., Glick, B.R.,** (2000), "The production of antibodies in plants: An idea whose time has come?", *Biotechnology Advances*, 18: 85-89
- Smith, R.H., Hood, E.E.,** (1995), "*Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons", *Crop Science*, 35(2): 85-89
- Somerville, C.R.,** (1994), "Production of industrial materials in transgenic plants", In: *The production and uses of genetically transformed plants*, Bevan, M.W., Harrison, B.D., Leaver, C.J. (Eds.), The University Press Cambridge
- Sonnenwald, U., Herbers, K.,** (2001), "Plant Biotechnology: Methods, goals and achievements", in *Crop Science: progress and prospects*, Eds.: Nösberger, J., Geiger, H.H., Struik, P.C., Library of Congress Cataloging-in Publication Data, 329-350

- Spiegel, H., Schillberg, S., Sack, M., Holzem, 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: 63-71
- Spinks, C.A.,** (2000), “Broad-specificity immunoassay of low molecular weight food contaminants: new path to utopia!”, *Trends in Food Science & Technology*, 11: 210-217
- Stalker, D.M., McBride, K.E., Malvj, L.D.,** (1988), “Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene”, *Science*, 242: 419-422
- Staub, J.M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P.T.J., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlitter, M., Carroll, J.A., Spatola, L., Ward, D., Ye, G., Russell, D.A.,** (2000), “High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts”, *Nature biotechnology*, 18: 333-338
- Steipe, B., Sciller, B., Plückthun, A., Steinbacher, S.,** (1994), “Sequence statistics reliably predict stabilizing mutations in a protein domain”, *Journal of Molecular Biology*, 240: 188-192
- Sterling, T.M., Hall, J.C.,** (1997), “Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides”, *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, Roe, R.M., Burton, J.D., Kuhr, R.J., (Eds.), IOS Press Amsterdam, 111-141
- Stöger, E., Vaquero, C., Torres, E., Sack, M., Nicholson, L., Drossard, J., Williams, S., Keens, D., Perrin, Y., Christou, P., Fischer, R.,** (2000), “Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies”, *Plant Molecular Biology*, 42: 583-590
- Stöger, E., Sack, M., Fischer, R., Christou, P.,** (2001), “Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks”, *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 161-166
- Strachan, G., Grant, S.D., Learmonth, D., Longstaff, M., Porter, A.J., Harris, W.J.,** (1998), “Binding characteristics of anti-atrazine monoclonal antibodies and their fragments synthesised in bacteria and plants”, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 665-673
- Streber, W.R., Willmitzer, L.,** (1989), “Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme are resistant to 2,4-D”, *Biotechnology*, 7: 811-816
- Sripaoraya, S., Marchant, R., Power, J.B., Davey, M.R.,** (2001), “Herbicide-tolerant transgenic pineapple (*Ananas comosus*) produced by microprojectile bombardment”, *Annals of Botany*, 88: 597-603
- Sunilkumar, G., Rathore, K.S.,** (2001), “Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration”, *Molecular Breeding*, 8: 37-52
- Taiz, L., Zeiger, E.,** (1998), „Plant Physiology,, Sunderland: Sinauer Associates Publishers
- Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinka, S., De Martines, D., Cattaneo, A., Galeffi, P.,** (1993), “Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack”, *Nature*, 366. 469-472
- Tavladoraki, P., Girotti, A., Donini, M., Arias, F.J., Mancini, C., Morea, V., Chiaraluce, R., Consalvi, V., Benvenuto, E.,** (1999), “A single-chain antibody fragment expressed in the cytoplasm of both *Escherichia coli* and transgenic plants”, *European Journal of Biochemistry*, 262. 617-624
- Teillaud, J.L.,** (1999), “A therapeutic trojan horse: intracellular antibodies”, *Pathologie Biologie*, 47(8): 771-775

- 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): 1337-1344
- Tingay, S., McElroy, D., Kall, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S., Brettell, R.,** (1997), "Agrobacterium-mediated barley transformation", Plant Journal, 11(6): 1369-1376
- Tingjuangjun, 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): 391-399
- Tittle, F.L., Goudey, J.S., Spencer, M.S.,** (1990), "Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on endogenous cyanide, β -cyanoalanine synthase activity, and ethylene evolution in seedlings of soybean and barley", Plant Physiology, 94: 1143-1148
- Torres, E., Vaquero, C., Nicholson, L., Sack, M., Stöger, E., Drossard, J.,** (1999), "Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies", Transgenic Research, 8: 441-449
- Tout, N.L., Yau, K.Y.F., Trevors, J.T., Lee, H., Hall, J.C.,** (2001), "Synthesis of ligand-specific phage-display scFv against the herbicide picloram by direct cloning from hyperimmunized mouse", J. Agric. Food Chem., 49: 3628-3637
- Tsaftaris, A.,** (1996), "The development of herbicide-tolerant transgenic crops", Field Crop Research, 45: 115-123
- Uchimiya, H., Fujii, S., Huang, J., Fushimi, T., Nishioka, M., Kim, K-M., Yamada, M.K., Kurusu, T., Kuchitsu, K., Tagawa, M.,** (2002), "Transgenic rice plants conferring increased tolerance to rice blast and multiple environmental stresses", Molecular Breeding, 9: 25-31
- Van Bel, A.J.E., Hibberd, J., Prüfer, D., Knoblauch, M.,** (2001), "Novel approach in plastid transformation", Current Opinion in Biotechnology, 12: 144-149
- Van Engelen, F.A., Schouten, A., Molthoff, J.W., Roosien, J., Salinas, J., Dirkse, W.G., Schots, A., Bakker, J., Gommers, F.J., Jongma, M.A., Bosch, D., Stiekema, W.J.,** (1994), "Coordinate expression of antibody subunit genes yields high levels of functional antibodies in roots of transgenic tobacco", Plant Molecular Biology, 26: 1701-1710
- Van Dijk, H.F.G., Guicherit, R.,** (1999), "Atmospheric dispersion of current-use pesticides: a review of the evidence from monitoring studies", Water, Air and Soil Pollution, 115: 21-70
- Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J., Johnson, K.S.,** (1996), "Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from large non-immunized phage display library", Nature Biotechnology, 14: 309-314
- Venturi, M., Seifert, C., Hunte, C.,** (2002), "High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm", Journal of Molecular Biology, 315: 1-8
- Verpoorte, R., Memelink, J.,** (2002), "Engineering secondary metabolite production in plants", Current Opinion in Biotechnology, 13: 181-187
- Verwoerd, T.C., van Paridon, P.A., van Ooyen, A.J.J., van Lent, J.W.M., Hoekema, A., Pen, J.,** (1995), "Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves", Plant Physiology, 109: 1199-1205

- Vine, N.D., Drake, P., Hiatt, A., Ma, J.K.-C.,** (2001), "Assembly and plasma membrane targeting of recombinant immunoglobulin chains in plants with a murine immunoglobulin transmembrane sequence", *Plant Molecular Biology*, 45: 159-167
- Visser,** (1991), "Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense construct", *Mol. Gen. Genet.*, 225: 289-296
- Voelker,** (1992), "Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants", *Science*, 257: 72-74
- Voss, A., Niersbach, M., Hain, R., Hirsch, H., Liao, Y., Kreuzaler, F., Fischer, R.,** (1995), "Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full size antibody", *Molecular Breeding*, 1: 39-50
- Walmsley, A.M., Arntzen, C.J.,** (2000), "Plants for delivery of edible vaccines", *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 126-129
- Walter, H.G., Retzlaff, r., Berghaus, R., Landes, M.,** (1994), "Einflussfaktoren auf die Wirkung von Quinmerac und Quinmerac-haltigen Kombinationsprodukten", *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz, Sonderheft*, 14: 583-594
- 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 endoplasmatic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants", *The Plant Journal*, 2(2): 181-192
- Webb, S.R., Hall, J.C.,** (1995), "Auxinic herbicide-resistant and -susceptible wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotypes: Effect of auxinic herbicides on seedling growth and auxin-binding activity", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 52: 137-148
- Wei, Y.D., Zheng, H-G., Hall, J.C.,** (2000), "Role of auxinic herbicide-induced ethylene on hypocotylelongation and root/hypocotyl radial expansion", *Pest Management Science*, 56: 377-387
- Welzig, E., Pichler, H., Krska, R., Knopp, D., Niessner, R.,** (2000), "Development of an enzyme immunoassay for the determination of the herbicide metsulfuron-methyl based on chicken egg yolk antibodies", *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 78(3-4): 279-288
- Whitelam, G.C., Cockburn, B., Gandecha, A.R., Owen, M.R.L.,** (1993), "Heterologous protein production in transgenic plants", *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 11: 1-29
- Whitelam, G.C., Cockburn, W., Owen, M.R.L.,** (1994), "Antibody production in transgenic plants", *Biochem. Soc. Trans.*, 22: 940-944
- Whitelam, G.C., Cockburn, W.,** (1996), "Antibody expression in transgenic plants", *Trends in Plant Science*, 1: 268-271
- Wikström, M., Sjöbring, U., Drakenberg, T., Forsen, S., Björck, L.,** (1995), "Mapping of the immunoglobulin light chain-binding site of protein L", *Journal of Molecular Biology*, 250: 128-133
- Wilkins, T.A., Rajasekaran, K., Anderson, D.M.,** (2000), "Cotton Biotechnology", *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(6): 511-550
- Willmitzer, L., Töpfer, R.** (1992), "Manipulation of oil, starch and protein composition", *Current Opinion in Biotechnology*, 3: 176-180

- Winter, G., Milstein, C.**, (1991), „Man-made antibodies“, *Nature*, 349(6307): 293-299
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., Hoogenboom, H.R.**, (1994), „Making antibodies by phage display technology“, *Annu. Rev. Immunol.*, 12: 433-455
- Wörn, A., Plückthun, A.**, (2001), „Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments“, *Journal of Molecular Biology*, 305, 989-1010
- Wörn, A., Plückthun, A.**, (2001), „Different equilibrium stability behavior of scFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering“, *Biochemistry*, 38: 8739-8750
- Wuerzer, B., Berghaus, R.**, (1985), „Substituted quinolinecarboxylic acids- new elements in herbicide systems“, *Proceedings 10th Conference of the Asian-Pacific Weed science Society*, Chiangmai, 24-30
- Wuerzer, B., Berghaus, R., Hagen, H., Kohler, R-D., Markert, J.**, (1985), „Characteristics of the new herbicide BAS 518H“, *British Crop Protection Conference-Weeds*, 2-7, 63-70
- 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: 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): 167-173
- Yan, L., Kerr, P.S.**, (2002), „Genetically engineered crops: their potential use for improvement of human nutrition“, *Nutrition Reviews*, 60(5): 135-141
- Ye, G.N., Hajdukiewicz, P.T.J., Broyles, D., Rodriguez, D., Xu, C.W., Nehra, N., Staub, J.M.**, (2001), „Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco“, *Plant Journal*, 25: 261-270
- Yordanova, E., Gorinova, N., Atanassov, A.**, (2001), „The use of cytochrome P450 monooxygenase genes to introduce herbicide tolerance in tobacco“, *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 15(1/2): 49-55
- Zajc, A., Neufeind, T., Prade, I., Reinemeier, P., Huber, R., Bieseler, B.**, (1999), „Herbicide detoxification by glutathione S-transferases as implicated from X-ray structures“, *Pesticide Science*, 55: 248-252
- Zamir, D.**, (2001), „Improving plant breeding with exotic genetic libraries“, *Nature Reviews Genetics*, 2: 983-989
- Zeitlin, L., Olmsted, S.S., Moench, T.R.**, (1998), „A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes“, *Nature Biotechnology*, 16: 1361-1364
- Zeldin, E.L., Jury, T.P., Serres, R.A., McCown, B.H.**, (2002), „Tolerance to the herbicide glufosinate in transgenic cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and enhancement of tolerance in progeny“, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 127(4): 502-507
- 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

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

Lebenslauf

Name	Britt Leps
Geburtsdatum	21.04.1974
Geburtsort	Halberstadt
Familienstand	Verheiratet
Staatsangehörigkeit	Deutschland

Ausbildung und Beruf

Seit Mitte 1998-2003 „IPK-Gatersleben“ Gatersleben

Durchführung der experimentellen Arbeiten und Anfertigung der Dissertation zum Thema „Anti-Quinmerac Einkettenantikörperexpression 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: „Steigerung der Antikörperexpression durch m-RNA Amplifikation“ am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben.

- Studium der Biologie

1988-1992 Gymnasium „Martineum“ Halberstadt

1980-1988 POS „Wilhelm Pieck“ Halberstadt

- 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 bedanken. Herrn Dr. habil. Udo Conrad, danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas. Frau Susanne König danke ich für die durchgeführten Sequenzierungsarbeiten, Frau Ursula Schumann für die hilfreiche Unterstützung bei der Regeneration der transgenen Tabakpflanzen und Frau Elisabeth Nagel für die durchgeführten ABA-Konzentrationsbestimmungen. An Frau Heike Ernst und Frau Schäfer geht ein Dankeschön für die Anfertigung der Fotoarbeiten. Ein besonders großer Dank auch den Gärtnern des IPK, Abteilung „Molekulare Genetik“ für die Anzucht und Versorgung der Pflanzen. Herrn Prof. Dr. Ulrich Wobus möchte ich für die Ermöglichung, die Arbeit am IPK in Gatersleben anfertigen zu dürfen, danken. Ein Dankeschön an Herrn Dr. habil. Armin Meister für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung. Den Mitarbeitern der Bibliothek des IPK sei ebenfalls gedankt für die freundliche und hilfreiche Unterstützung.

Besonders dankbar bin ich meiner Familie für Ihre ausdauernde und hilfreiche Unterstützung.

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 März 2003

Britt Leps