

Gezielter Proteinabbau in Pflanzen
mittels chimärer E3-Ubiquitin-Ligasen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt bei der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

Der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Eberhard Sorge

geb. am 16.01.1987 in Halle (Saale)

Gutachter/in

1. Prof. Dr. Udo Conrad
2. Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen
3. Prof. Dr. Sabine Rosahl

Tag und Ort der öffentlichen Verteidigung: 12.07.2022, Halle (Saale)

Nachdem ihm der „Schwarze Fleck“ ausgehündigt wurde, ist sein Ableben nicht mehr weit.

Robert L. Stevenson – Die Schatzinsel

Zusammenfassung

Ein wesentlicher Aspekt molekularbiologischer Grundlagenforschung ist die Analyse funktioneller Proteine. Zusammenhänge zwischen einzelnen Komponenten von Signalkaskaden können durch den gezielten Proteinabbau analysiert werden. Daraus lassen sich wichtige Schlüsse auf Pathomechanismen ziehen oder Methoden zur Resistenzzeugung ableiten. Etablierte Methoden zur Reduktion von Proteinabundanz wirken auf DNA- (TALEN, CRISPR/Cas9) oder Transkriptionsebene (RNAi). Diese Herangehensweisen setzen am Informationsträger für ein bestimmtes Protein ein und verhindern durch die Deletion eines Genabschnittes oder den Abbau von mRNA die Translation. Eine Übertragung dieser Techniken auf die Pflanzenforschung kann problematisch sein, da eine artspezifisch variable Anzahl von Chromosomen bzw. Ploidiegraden die Herstellung homozygoter Pflanzen erschwert. Des Weiteren sind diese Techniken hinsichtlich ihrer Spezifität noch nicht ausgereift, sodass es zu unbeabsichtigten Effekten („*off-target effects*“) kommen kann. Eine Alternative bietet der Proteinabbau über den 26S Proteasomsignalweg. Dysfunktionale, falsch gefaltete, oder Proteine deren Halbwertszeit überschritten ist, werden enzymatisch mit Ubiquitinmolekülen markiert, durch das 26S Proteasom erkannt und abgebaut (1). Eine wesentliche Schaltstelle der Ubiquitinierung stellen substratspezifische Ubiquitinligasen dar. Erkenntnisse über die Modularität der Ubiquitinligasen gehen auf Winston *et al.* zurück (2) und zogen kreative Versuche nach sich, gezielt Proteine für den proteasomalen Abbau zu markieren. Eine Methode, die Substratspezifität zu beeinflussen, wurde 2011 von Caussinus *et al.* publiziert. Durch den Austausch der Substratbindedomäne mit einem anti-GFP Nanobody konnte der Abbau von GFP-Fusionsproteinen in Insekten- und Humanzelllinien erzielt werden (3). Speziell durch die hohe Selektivität des Nanobodies sind *off-target* Effekte sehr unwahrscheinlich. Eine erfolgreiche Übertragung auf das Pflanzenmodell wurde durch Baudisch *et al.* 2018 publiziert (4). Aufgrund des verwendeten ubiquitären Promotors und der konstitutiven Expression einer chimären E3-Ligase liegt ein Überschuss der chimären E3-Ligase vor. Das Zielprotein wird kontinuierlich gebunden, ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Entsprechende Effekte sind bereits in T₁ Generationen beobachtbar. Dadurch entfällt die Selektion homozygoter Pflanzenlinien über mehrere Generationen bei DNA-basierten Methoden, woraus ein erheblicher Zeitvorteil resultiert.

Optimierungspotential besteht beim gewebs- und kompartimentspezifischen Proteinabbau. Die erste Beschreibung eines zellkernspezifischen Proteinabbaus in Human- und Insektenzellen erfolgte 2015 durch Ju Shin *et al.* (5). Anknüpfend an diesen Versuchsansatz, wird in der vorliegenden Arbeit ein experimenteller Beweis für einen kernspezifischen Proteinabbau in Pflanzen erbracht. Dafür wurde die von Ju Shin verwendete Sequenz einer E3-Ligase (SPOP) in einen geeigneten Pflanzenexpressionsvektor kloniert und spezifische Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingefügt, um einen flexiblen Austausch der n-terminalen Antikörpersequenz zu ermöglichen. Ein erster Modellversuch erfolgte anhand des anti-GFP-Nanobodies: VHHGFP4 (6). Der erste Abbaubersuch wurde mit transgenen Pflanzen durchgeführt, die EYFP-CENH3 (7) stabil überexprimieren. Durch Cotransformation dieser Pflanzen mit dem VHHGFP4-SPOP-Konstrukt wurden doppelt transformierte Linien erzeugt, in denen EYFP-CENH3 kontinuierlich abgebaut wird. Die Pflanzen der Folgegenerationen enthielten weiterhin das Primärtranskript für EYFP-CENH3, zeigten allerdings keine EYFP-spezifischen Fluoreszenzsignale mehr. Der experimentelle Ablauf und die Ergebnisse werden in dieser Arbeit beschrieben und wurden am 12. Februar 2021 publiziert (8).

Im Rahmen eines zweiten Versuchs sollte eine Proteinfusion aus dem pathogenen Effektorprotein *secreted AYWB protein 11* (SAP11) und GFP abgebaut werden. SAP11, transloziert von *Phytoplasma mali*, beeinflusst indirekt die Konzentration zellulär verfügbarer Jasmonsäure (JA) einer Wirtspflanze und reduziert dadurch eine systemische Pathogenabwehr (9). Neben einer verstärkten Suszeptibilität zeigen die Pflanzen starke phänotypische Merkmale infolge einer Infektion. Innerhalb des zweiten Abschnittes dieser Arbeit wurde experimentell erörtert, inwieweit SAP11-induzierte Phänotypen durch den gezielten SAP11-Abbau reversibel sind. Wie im ersten Versuchsansatz wurden dazu transgene Pflanzen mit SAP11-GFP5-Überexpression hergestellt. Der bereits durch Meng Tan *et al.* beschriebene Phänotyp (10) konnte dadurch reproduziert werden. Aufbauend auf dem erfolgreichen Abbau von EYFP-CENH3 im ersten Versuch wurden die SAP11-GFP5-Pflanzen mit dem VHHGFP4-SPOP-Konstrukt übertransformiert und die Tochtergeneration analysiert. Dabei konnte eine deutliche Abschwächung des SAP11-induzierten Phänotyps sowie reduzierte Fluoreszenzsignale im Vergleich zu den Kontrollpflanzen beobachtet werden. Als pflanzenphysiologischer Parameter wurde die Jasmonsäureakkumulation in den

transgenen Pflanzen analysiert. Dazu wurden Pflanzen gezielt verwundet und das Jasmonatlevel über Massenspektrometrie quantifiziert. Es zeigte sich, dass alle Pflanzen mit SAP11-GFP5-Überexpression ca. 50% weniger JA-Ile akkumulieren als Wildtyppflanzen. Entgegen der Erwartungen trifft dies auch auf Pflanzen mit rekonstituiertem Phänotyp zu.

Ein dritter Versuchskomplex befasst sich mit einem auf Phagen-Display-basierten *screening* zur Generierung eines Effektorprotein-spezifischen Antikörpers. Im Gegensatz zu den ersten beiden Versuchen, sollte damit eine Möglichkeit geschaffen werden, Zielproteine ohne Affinitäts-*tag* abzubauen. Als Zielstruktur wurde die pflanzenpathogene Methyltransferase *Plasmodiophora brassicae salicylate / benzoate carboxy methyltransferase 1* (PbBSMT1) ausgewählt. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, einen spezifischen Antikörper zu selektieren, wurden drei verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt. Der Versuch ein rational ausgewähltes Peptid als Antigen für das *screening* zu verwenden, führte nicht zur Identifizierung spezifischer Binder. Aus einem *screening* mit gereinigtem Volllängenprotein, ging ein spezifisch bindender Antikörper (1B1) mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) von ca. 600 nM hervor. Unter Verwendung einer Peptidmatrix als Antigen, welche 25 oberflächenexponierte Peptide gleichzeitig darstellt, konnten zwei spezifisch bindende Antikörper mit Affinitäten zwischen 1,7 und 1,9 mM selektiert werden. Trotz der geringen Affinitäten stellt dieses Experiment einen Erfolg dar, da die Verwendung einer Peptidmatrix für eine Phagen-Display-basierte Antikörperselektion bisher noch nicht beschrieben wurde. In zukünftigen Experimenten könnte durch Affinitätsmaturierung die Bindungsstärke und Spezifität gesteigert werden und entsprechende Varianten mit E3-Ligasen fusioniert werden, um Resistenztests *in planta* durchzuführen.

Abkürzungen	vii
1. Einleitung	1
1.1 Bereitstellung von Erbinformationen als Bauplan für die Proteinsynthese	1
1.2 Kontrolle auf Transkriptionsebene	2
1.3 Kontrolle auf Translationsebene	3
1.4 Kontrolle auf Proteinebene	4
1.5 Analyse von Einzelproteinen und ihr Einfluss auf Signalkaskaden	5
1.6 Proteinabbau: das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	6
1.7 UPS gekoppelte Signaltransduktion in Pflanzen	10
1.8 Gezielter Proteinabbau als Instrument der Proteinanalytik	11
1.9 Spezifische Anwendungsfälle gezielten Proteinabbaus in Pflanzen	18
1.10 Zielstellung	18
2. Materialien	21
2.1 Chemikalien	21
2.2 Oligodesoxynukleotide	22
2.3 Plasmide	23
2.4 Mikroorganismen	24
2.5 Helferphagen	24
2.6 Nährmedien	24
2.7 Puffer und Lösungen	25
2.8 Antikörper	25
2.9 Enzyme	26
2.10 Antibiotika	26
2.11 Pflanzenmaterial	26
2.12 Kits und Standards	27
2.13 Geräte und Zubehör	27
2.14 Software	29
3. Methoden	30
3.1 Mikrobiologische Methoden	30
3.1.1 Anzucht und Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	30
3.1.2 Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
3.1.3 Transformation von <i>E. coli</i>	30
3.1.4 Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	31
3.1.5 Stabile Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	31
3.1.6 Phagen-Display	32
3.2 Molekularbiologische Methoden	34

3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.2.2	Mutagenese-PCR	35
3.2.3	qPCR	35
3.2.4	Enzymatische Spaltung und Dephosphorylierung von DNA	36
3.2.5	Ligation von DNA	37
3.2.6	Agarosegelelektrophorese	37
3.2.7	DNA-Isolierung	37
3.2.8	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	38
3.2.9	Sequenzierung von DNA	38
3.3.	Klonierungen	39
3.3.1	Klonierung von VHHGFP4-SPOP Konstrukten	39
3.3.2	Klonierung von Nanobody- oder scFv-Sequenzen selektierter Phagen	39
3.4.	Proteinchemische und Analytische Methoden	40
3.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.4.2	Western Blot	40
3.4.3	Quantifizierung von Proteinen	41
3.4.4	Konzentration und Umpuffern von Proteinlösungen	42
3.4.5	Reinigung von Proteinen	42
3.4.6	ELISA (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)	44
3.5.	Mikroskopie	48
3.6.	Verwundungs-Experimente mit transgenen Tabak Pflanzen	48
4.	Ergebnisse	50
4.1	Proteasomale Degradation von Proteinen im Zellkern	51
4.1.1	Analyse der Degradation von EYFP-CENH3	55
4.2	Abbau pathogener Effektorproteine am Beispiel von SAP11-GFP5	59
4.2.1	Koexpression von SAP11-GFP5 und VHHGFP4 bzw. VHHGFP-SPOP	59
4.2.2	Phänotypische und mikroskopische Analyse von transgenen Pflanzen	62
4.2.3	Physiologische Untersuchungen des SAP11-GFP5-Abbaus in transgenen Pflanzen	66
4.3	Gezielter Abbau eines pathogenen Effektorproteins	68
4.3.1	Selektion von PbBSMT1-Nanobodies durch Phagen-Display mit gereinigtem Antigen	69
4.3.2	Selektion von Nanobodies durch Bindung an ein Einzelpeptid	77
4.3.3	Selektion von Antikörpern gegen PbBSMT1 mittels Peptidarray	84
5.	Diskussion	93
5.1	Abbau von kernlokalisierten Proteinen am Beispiel von EYFP-CENH3	94

5.2	Degradation eines kernlokalisierten Proteins pathogenen Ursprungs und Untersuchung physiologischer Auswirkungen	99
5.3	Selektion eines anti- PbBSMT1 Bindeproteins.....	103
6.	Ausblick.....	110
7.	Literaturverzeichnis.....	112
Anhang	122

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
ABA	Abscisinsäure
AFB	<i>Auxin Signaling F-Box</i>
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ASK	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
AtBSMT1	<i>Arabidopsis thaliana</i> Benzoessäure/Salicylsäure Methyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AYWB	<i>Aster Yellows phytoplasma Witches' Broom</i>
BCR	BTB- Cul3- Rbx1
BSA	Bovines Serumalbumin
BTB	<i>BR-C, tk and bab domain</i>
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus
Carb	Carbenicillin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDR	<i>complementary determining region</i>
CENH3	centromerspezifisches Histon 3
cfu	<i>colony forming units</i>
CP	<i>core particle</i>
CRISPR	<i>clustered regulary interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR RNA
C _T	<i>cycle threshold</i>
CTFR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CUL3	Cullin3 Protein
Da	Dalton
DARPIN	designed ankyrin-repeat protein
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DUB	Deubiquitinierende Proteasen
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eIF	Eukaryotische Initiationsfaktoren
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
Fab	<i>fragment antigen- binding</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
H2A	Histon Protein Variante H2A
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatografie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
Kan	Kanamycin
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante [M]
LB	<i>lysogeny broth</i>

Lox	Genfamilie der Lipoxigenasen
M	Molar
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Murashige-Skoog
NSlmb	<i>supernumerary limbs</i> F-Box Protein aus <i>Drosophila melanogaster</i>
PbBSMT1	<i>Plasmodiophora brassicae</i> Benzoessäure/Salicylsäure Methyltransferase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POZ	<i>Pox virus and Zinc finger domain</i>
PPT	Phosphinothricin
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon Polyvinylalkohol
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RBX1	<i>RING-Box Protein 1</i>
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RP	<i>regulatory particles</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rpn	<i>Regulatory particle non-ATPase</i>
Rpt	<i>regulatory particle triple-A-protein</i>
SA	Streptavidin
SAP11	secreted AYWB protein 11
SCF	<i>Skp, Cullin, F-box containing complex</i>
scFv	<i>single chain fragment variable</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SKP1	<i>S-phase kinase-associated protein 1</i>
Spec	Spectinomycin
SPOP	<i>Speckle-type POZ protein</i>
Tag	Fusionspeptid
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
target	Zielmolekül
TB	<i>Terrefic broth</i>
TCP	EOSINTE BRANCHED 1-CYCLOIDEA-PROLIFERATING CELL FACTOR
TEA	Triethylamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TIR1	<i>Transport Inhibitor Response 1</i>
UBA	Ubiquitin assoziierte Proteine
UIM	<i>ubiquitin interaction motif</i>
UPS	Ubiquitin Proteasom System
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _H H	<i>Variable domain of camelid heavy chain only antibody</i>
V _L	variable Domäne der leichten Kette
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Komplexe Proteine bilden eine essentielle Grundlage aller bekannten Lebewesen. Sie bestehen aus verketteten Aminosäuren, deren Sequenz unmittelbaren Einfluss auf die Raumstruktur von Proteinen hat. Um eine korrekte Funktion zu gewährleisten, stehen Proteine in einem stetigen Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation. Diese elementare Balance unterliegt einem komplexen Regelmechanismus, um dem Aufbau dysfunktionaler bzw. der unspezifischen Degradation intakter Proteine entgegenzuwirken. Der Zeitpunkt, die Menge und die Art der synthetisierten Proteine wird sowohl auf Genomebene, als auch auf Transkript- und Proteinebene reguliert. Das Verständnis der beteiligten Mechanismen ist der erste Schritt zur biotechnologischen Anwendung.

1.1 Bereitstellung von Erbinformationen als Bauplan für die Proteinsynthese

Den Bauplan aller Proteine stellt der primäre Erbinformationsträger, die Desoxyribonucleinsäure (DNA) dar. Proteincodierende Sequenzbereiche nehmen allerdings nur ca. 1,5% des gesamten menschlichen Genoms ein. Die übrigen 98,5 % sind nicht-codierend und werden in weitere Klassen unterteilt (Abb. 1).

Die komplexe DNA-Struktur liegt unterschiedlich stark kondensiert in Proteinkomplexen (Histonen) vor. Diese DNA-Histon-Hybride (Nukleosomen) setzen sich aus den Histonvarianten H2A, H2B, Histon 3 und Histon 4 zusammen (11). Heterodimere aus H2A und H2B lagern sich sukzessiv zu Tetrameren zusammen, ebenso H3 und H4. Diese zwei Tetramervarianten komplexieren zu oktameren Strukturen. Dabei ist das Heterochromatin stärker kondensiert als das Euchromatin. Diese Einteilung spiegelt eine wichtige Regulationsebene wider, da weniger stark kondensierte DNA-Bereiche zugänglicher für den Transkriptionsapparat sind. Histonmodifikationen beeinflussen ebenfalls die Zugänglichkeit von Sequenzabschnitten. Kovalente Methylierungen und Acetylierungen von Lysin-, Histidin- und Argininresten, sowie Phosphorylierungen an Serinen führen zu Strukturänderung des Chromatins, was eine (De-)Kondensierung eines Chromatinabschnittes zur Folge hat (12). Dadurch wird die Zugänglichkeit nicht-codierender DNA-Bereiche, wie Promotor-, Enhancer- oder Silencerregionen, beeinflusst. Abhängig vom Kondensationsgrad können Transkriptionsfaktoren (TFIIA, -

IIB, -IIC, IID, IIE, -IIF, -IIH) *upstream* der codierenden Sequenz binden und die Interaktion mit Co-Aktivatoren oder Repressoren begünstigen. Durch die vollständige Assemblierung dieses Präinitiationskomplexes wird die Rekrutierung des RNA-Polymerase-II-Holoenzym (Pol II) ermöglicht, und damit die Transkription eines Genabschnitts in ein mRNA-Molekül (13).

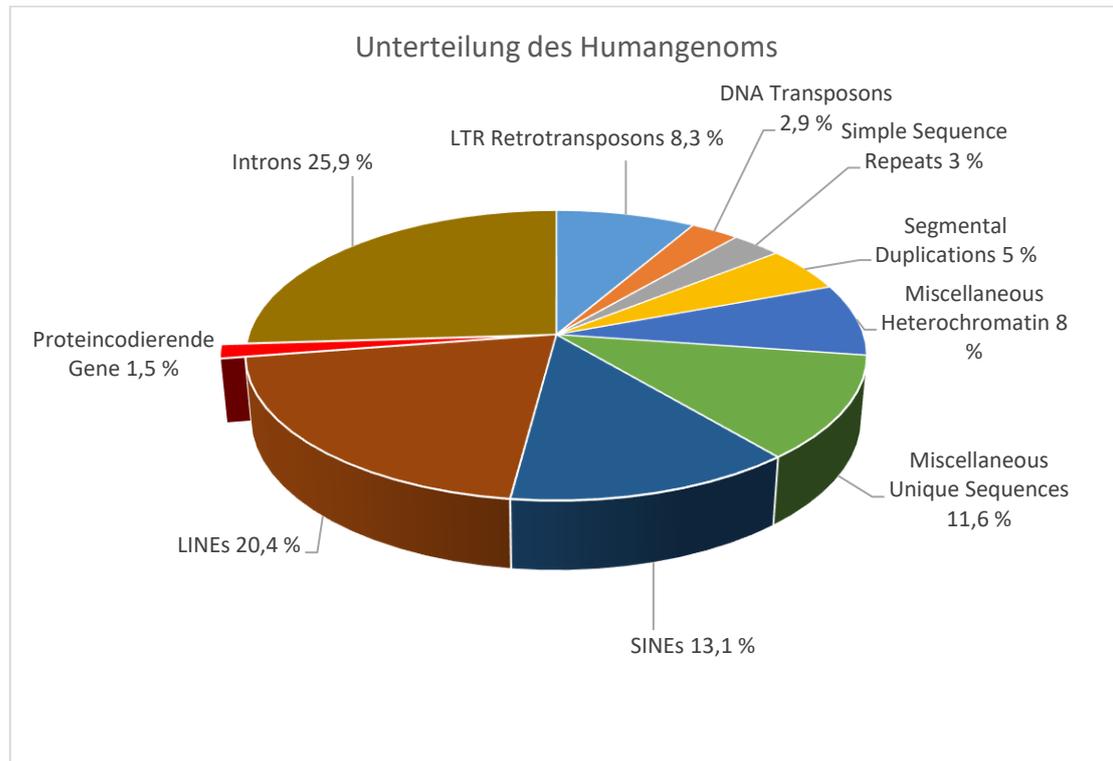


Abb. 1: Überblick über das humane Genom. 20000- 30000 proteincodierende Gene stellen ca. 1,5% des gesamten Genoms dar. Die codierenden Bereiche (Exons) werden durch Introns (25,9 % des Gesamtgenoms) unterbrochen. Retrotransposons bilden ca. 50 % und setzen sich aus LTR Retrotransposons, DNA Transposons, LINEs und SINEs zusammen. Weitere 27,6 % bestehen aus einfachen Sequenzwiederholungen (*repeats*), *segmental duplications*, Heterochromatin und verschiedener einzigartiger Sequenzen (*unique sequences*) zusammen. Modifizierte Abbildung nach (14).

1.2 Kontrolle auf Transkriptionsebene

Die Synthese des Primärtranskriptes, der prä-messenger-RNA (prä-mRNA), bildet eine weitere Kontrollebene. Unterteilt in Initiation, Elongation und Termination, dirigiert sie die Transkription eines Gens durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase-II (Pol II). Den ersten Schritt bildet die Assemblierung des Präinitiationskomplexes. Dazu dient eine Erkennungssequenz (TATA-Box) ca. 30 Basenpaare *upsteam* der codierenden Region, die mit einem TATA-Bindeprotein interagiert (15). Dieses bildet eine Untereinheit des Multiproteinkomplexes TFIID (*transcription factor of RNA polymerase II-D*). Die sukzessive Interaktion weiterer Transkriptionsfaktoren (TFs) mit

dem vorassemblierten Komplex ändert die strukturelle Konformation des DNA-Abschnittes, welche das Binden der Pol II begünstigt (16). Nach der Bildung des Präinitiationskomplexes, dissoziieren einige TFs, andere verbleiben in der Promotorregion und die Pol II katalysiert die Synthese eines mRNA-Strangs in 3'-Richtung. Der sich anschließende Elongationsprozess findet nicht in uniformer Geschwindigkeit statt. *Pausing* und *Backtracking* beschreiben Phänomene, die den Translationsprozess unterbrechen und werden durch akzessorische Proteine reguliert (17-19). Während der mRNA Synthese finden weitere strukturelle Modifikationen statt. Co- bzw. post-transkriptionellen Prozesse beinhalten die Ausbildung von Cap-Strukturen in Form eines 7-Methylguanosin-Rests am 5'-Ende und das Anhängen eines Poly(A)-Schwanzes durch die Poly(A)-Polymerase am 3'-Ende. Cap-Strukturen dienen der Stabilisierung der mRNA, sind am Export aus dem Zellkern beteiligt und bilden eine Voraussetzung für den späteren Translationsprozess sowie dem *Splicing* zum Entfernen von Introns. Über den post-transkriptionell angehängten Poly(A)-Schwanz wird die Halbwertszeit einer mRNA sowie die Termination der Transkription reguliert (20). Weiterhin ist bekannt, dass die Interaktion des Poly(A)-Schwanzes mit einem Poly(A)-Bindepotein eine Voraussetzung für den Translationsstart ist (21). Viele dieser Prozesse werden u.a. durch *carboxy tail domain* (CTD)-Kinasen und Phosphatasen über Phosphorylierungsstellen der β -Untereinheit der Pol II dirigiert (22). Entsprechend des reversiblen Phosphorylierungszustandes der CTD werden Proteine gebunden, die den Elongationsprozess beeinflussen. Schließlich wird das Primärtranskript über die Kernmembran aus dem inneren des Zellkerns ins Zytosol transportiert. Dabei ist zu beachten, dass auch der Transport über die Kernmembran durch Kernporen (*nuclear pore complex*: NPC) einer strengen Kontrolle unterliegt (23). Es folgt die Translation der mRNA in eine Aminosäuresequenz.

1.3 Kontrolle auf Translationsebene

Ähnlich der Transkription kann die Translation in die drei Teilschritte Initiation, Elongation und Termination unterteilt werden. Mit der mRNA als Matrize synthetisiert das 80S-Ribosomen dabei eine Polypeptidkette aus Aminosäuren. Vor der Bildung des Initiationskomplexes müssen die Sekundärstrukturen der RNA, die sich durch intramolekulare Basenpaarung bilden, aufgelöst werden. Die eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF4A, B und G lagern sich an der 5'-Cap Struktur des mRNA Moleküls an und rekrutieren die 40S-Untereinheit sowie die Initiator-tRNA, um den

Initiationskomplex zu bilden. Diese wandert in 5' → 3' Richtung entlang der mRNA und trennt Doppelstrangstrukturen. Sobald der Komplex auf ein Startcodon (AUG) trifft, wird die zweite Untereinheit des Ribosoms, das 60S Ribosom rekrutiert. Initiationsfaktoren dissoziieren und der Komplex (80S Ribosom und mRNA) tritt in die Elongationsphase ein, in der Peptidbindungen zwischen den tRNA-vermittelten Aminosäuren ausgebildet werden. Ein ratenlimitierender Faktor für die Elongation ist die tRNA-Verfügbarkeit (24). Die Termination erfolgt am 80S-Ribosom durch Interaktion eines universellen *eukaryotic release factor* (eRF1) mit einem von drei Stopcodonen (UAG; UAA; UAG). Zusammen mit der Ribosomen-abhängigen GTPase eRF3, wird das Polypeptid vom Ribosom getrennt und steht der weiteren Prozessierung zur Verfügung.

1.4 Kontrolle auf Proteinebene

Die Funktion eines Proteins steht im direkten Zusammenhang mit dessen Aminosäuresequenz und Struktur. Posttranslationale Modifikationen (PTM) am Carboxy- bzw. Amino-Terminus, oder an intrinsischen Aminosäureresten erfüllen funktionelle und strukturgebende Aufgaben. Dabei werden funktionelle Gruppen z.B. durch Phosphorylierung modifiziert. Andere Modifikationen sind Glykolysierungen, die das Anfügen von Kohlenhydraten (Glykane) an die Polypeptidkette beschreiben. Glykolysierungen von Proteinen sind eine Voraussetzung bestimmter Faltungsprozesse und der Proteinreifung und beeinflussen u.a. die Proteinstabilität. Sie sind an Zelladhäsion durch Glycan-Proteinbindung sowie an Rezeptorbindung und Aktivierung beteiligt oder vermitteln den Proteintransport. Zu weiteren PTM gehören die Bildung von Disulfidbrücken durch Disulfidisomerase oder die Konjugation mit Ubiquitin (25).

Die Strukturebenen eines Proteins sind entsprechend ihres Komplexitätsgrades zu klassifizieren (26). Die Primärstruktur wird durch die Abfolge der Aminosäuresequenz bestimmt. Physikalische und chemische Eigenschaften der proteinogenen Aminosäuren bestimmen die Charakteristik einer Polypeptidkette und wirken sich direkt auf die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen aus. Die Hauptsekundärstrukturelemente sind spiralförmige α -Helices und β -Faltblätter, die von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Eine Faltung in die Tertiärstruktur wird durch hydrophobe Interaktionen der Sekundärstrukturelemente ermöglicht, die natürlicherweise Amphiphile, Hydrophobe oder Hydrophile enthalten und findet bereits kotranslational statt. Spontane Proteinfaltung durch hydrophobe Effekte führt zu der

thermodynamisch und energetisch favorisierten Raumstruktur. Diese Konfiguration muss nicht der funktionellen Form des maturierten Proteins entsprechen. Um eine fehlerhafte oder abweichende Faltung zu verhindern, lagern sich Faltungshelfer (Chaperone) an instabile Bereiche des Polypeptids an und stabilisieren damit eine definierte Struktur (27). Eine andere Klasse von Chaperonen bilden Hitzeschockproteine, die eine bestimmte Faltung während hoher Temperaturen unterstützen bzw. stabilisieren. Eine funktionelle Einheit wird oft erst durch die Anlagerung mehrerer Proteine erreicht. Diese Multimerisierung zu einer Quartärstruktur umfasst die Assemblierung von zwei oder mehreren Proteinuntereinheiten in eine größere funktionelle Struktur, über nicht-kovalente Proteininteraktionen. Eine korrekte Assemblierung der Untereinheiten ist ebenfalls strikt reguliert.

1.5 Analyse von Einzelproteinen und ihr Einfluss auf Signalkaskaden

Der hohe Komplexitätsgrad stellt entsprechende Anforderungen an die korrekte Struktur und Funktion einzelner Proteine. Erbkrankheiten die im Zusammenhang mit dysfunktionalen Proteinen stehen, zeigen welchen Einfluss bereits kleine Sequenzabweichungen haben können. Dies kann an dem Pathomechanismus der Mukoviszidose veranschaulicht werden. Unterschiedliche autosomal-rezessiv vererbte Gendefekte führen zu Mutationen auf dem CTFR-Gen (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene*) (28). Eine der häufigsten Mutationen führt zu der Deletion von drei Nukleotiden an Position 508 der kodierenden DNA. Auf Transkriptebene bedeutet dies den Verlust des Basentriplets, das für Phenylalanin kodiert. Dem translatierten Protein fehlt an der entsprechenden Position die essenzielle, hydrophobe Aminosäure Phenylalanin, was eine gestörte Faltungskinetik des CFTR-Proteins zur Folge hat. Die daraus resultierende Verzögerung im Faltungsprozess des CFTR-Proteins führt zu der verfrühten Rekrutierung der Protein-Ubiquitinligase durch Hitzeschockprotein 70 (Hsp70), gefolgt von proteasomaler Degradation. Dadurch wird das Protein abgebaut noch bevor es vollständig glykosyliert werden kann (29). Das CFTR-Protein ist membranassoziierter Chloridkanal, zuständig für transepithelialen Transport. Ohne CTFR wird kein ASL (*airway surface liquid*) auf die der Atemluft zugewandten Seite des Lungenepithels transportiert (30). Die genaue Kenntnis der molekularen und zellbiologischen Pathomechanismen ermöglichte die Entwicklung von Wirkstoffen die beispielsweise die unzureichende Chaperonaktivität stimuliert (Lumacaftor®) oder den Transport durch den Chloridkanal erhöht (Ivacaftor®). Ein

tieferes Verständnis der molekularen Grundlagen des Proteinabbaus ist von allgemeingültiger Bedeutung für alle Biowissenschaften. Diese Erkenntnisse finden sowohl in der Arzneimittelforschung, als auch in der Biotechnologie, Landwirtschaft und der Kulturpflanzenforschung potentielle Anwendungsfelder.

1.6 Proteinabbau: das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Ungefähr 80%-90% des Proteinabbaus eukaryotischer Zellen werden durch das UPS vermittelt (31). Regulatorisch- und metabolisch-aktive Proteine sowie Strukturproteine haben variable Halbwertszeiten von Minuten bis zu mehreren Jahren (32-34). Nach überschrittener Lebensdauer bzw. zunehmender Instabilität erfolgt ein kontrollierter Proteinabbau durch das UPS. Aminosäuren werden dem Metabolismus zurückgeführt und die Akkumulation dysfunktionaler oder falsch gefalteter Proteine minimiert. Vereinfacht dargestellt werden Zielproteine in einem zweistufigen Prozess dem Abbau zugeführt. Zuerst werden sie durch eine selektive Enzymkaskade markiert und anschließend über das ebenfalls selektiv arbeitende 26S Proteasom degradiert. Diesen beiden übergeordneten Kontrollinstanzen schließen sich eine Reihe weiterer Mechanismen an, um einem unspezifischen und unkoordinierten Abbau durch das 26S Proteasom entgegenzuwirken. Das spezifische Degradationssignal liegt in Form einer sukzessiven Konjugation von Zielproteinen mit Ubiquitinmolekülen vor (35, 36). Die Enzymfamilien E1, E2 und E3 übernehmen diesen hoch selektiven Prozess, indem sie die Konjugation von Ubiquitinmolekülen mit einem Zielproteinen dirigieren (37). Dabei ist Ubiquitin (Ub) ein evolutionär konserviertes, relativ kleines Protein von 76 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 8,6 kDa (38), das in allen höheren Organismen vorkommt (Hefe-, Human- und Pflanzen Ubiquitin unterscheiden sich in drei Aminosäuren (39, 40)).

Der erste Schritt der Ubiquitinierung eines Substrates erfolgt ATP-abhängig durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1. Es katalysiert die Ausbildung einer Thiolesterbindung zwischen der Carboxygruppe des C-terminalen Glycins eines Ubiquitin-Moleküls und einem Cystein des E1. Die Umesterung des aktivierten Ubiquitin auf ein Cystein des Ubiquitin- konjugierenden Enzyms E2 resultiert in einem E2-Ub Intermediat, welches zusammen mit dem E3-Ligasekomplex das Ub auf ein Akzeptormolekül überträgt. Dazu wird eine Isopeptidbindung zwischen ϵ -Aminogruppen an Lysinen des Substrates und C-terminalen Glycin des Ub gebildet. Neben der *N-end rule* diktieren dabei zwei Domänen des E3-Ligasekomplexes die

Substratspezifität. Entscheidend ist einerseits die Kombination aus E2 und E3 und andererseits die Interaktion zwischen E3-Ligase mit dem Substrat. Die Substratspezifität der E3-Ligase ist abhängig von bestimmten Sequenzbereichen die durch reaktive Seitenketten der Aminosäuren ein bestimmtes Bindemotiv bilden. Zu den am besten charakterisierten Bindemotiven zwischen Zielprotein und E3-Ligase gehören repetitive Sequenzelemente wie *WD40 repeats* (41).

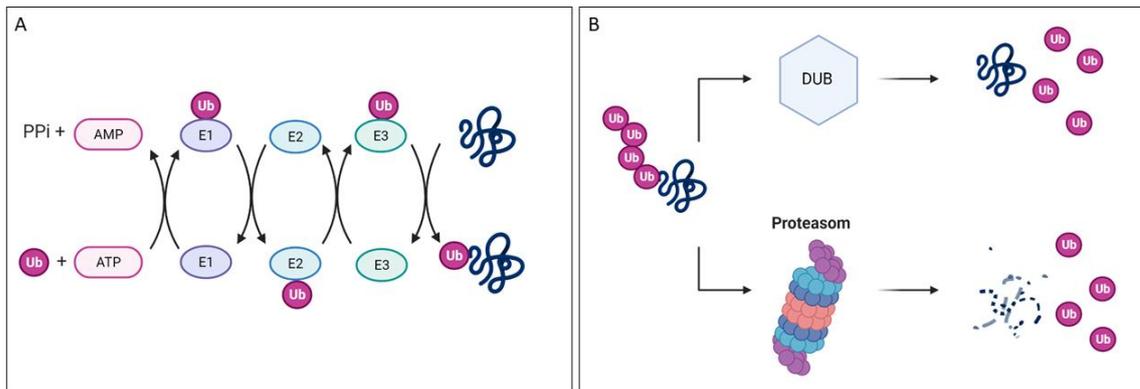


Abb. 2: Der Proteinabbau über das UPS. (A): Ubiquitin wird ATP-abhängig durch E1 aktiviert und durch Umesterung auf E2 übertragen. Das Ub-E2 Intermediat komplexiert mit der E3-Ligase, welche das Ubiquitin auf ein Akzeptormolekül überträgt. (B): Ubiquitinierte Moleküle werden über DUBs deubiquitiniert oder durch das 26S Proteasom degradiert. Grafik erstellt mit Biorender.com.

Ein weiterer Einflussfaktor für die Markierung von Zielproteinen ist die Identität der Aminosäure am N-Terminus (*N-end rule*) (42). Aminosäuren wie Methionin, Serin, Alanin, Valin, Thyrosin oder Glycin am N-Terminus stabilisieren und verlängern die Halbwertszeit. Negativ wirken sich Arginin, Lysin, Phenylalanin, Leucin oder Aspartat auf die Halbwertszeit aus. Eine Besonderheit dieser sogenannten N-Degrone ist der partielle oder der sukzessive Abbau mehrerer Proteindomänen. Dabei werden die Proteinuntereinheiten gezielt degradiert, während der Rest des Proteinkomplexes seine Integrität beibehält. Das betrifft beispielsweise die Untereinheit-spezifische Degradation von Transkriptionsfaktoren (43) oder Cyclinen (44) und verdeutlicht den Einfluss des UPS auf die Genregulation respektive der Zellzykluskontrolle.

Essenziell für die weitere Prozessierung von Zielproteinen ist die Art und Anzahl der Ubiquitinierungen. Konjugate mit einem einzelnen Ubiquitinmolekül (Monoubiquitinierung) dienen als Signal für den Umsatz im Lysosom oder in der Vakuole. Des Weiteren ist diese Form der Ubiquitin-Konjugation an nicht-proteolytischen Prozessen wie dem Membrantransport, Histonmodifikation, Transkriptionsregulation, DNA-Reparatur und DNA-Replikation beteiligt (45, 46).

Polyubiquitinketten basieren auf Verbindungen zwischen internen Aminogruppen des Ubiquitins. Zur Verfügung stehen acht Aminogruppen, die potentiell für die Konjugation an ein weiteres Ub-Molekül zugänglich sind: den N-Terminus des proximalen Ub, K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63. Polyubiquitinketten die intern über K48 verbunden sind, bilden das häufigste Signal für die proteasomale Degradation (47). Andere wie beispielsweise über K63 verbundene Ketten regulieren die Endozytose einiger Plasmamembran-Proteine oder sind an anderen basalen, zellulären Prozessen beteiligt (48-50). Dabei ist die Ubiquitinierung ein reversibler Prozess. Eine Gruppe von deubiquitinierenden Proteasen (DUB), spalten die Isopeptidbindung zwischen Substrat und Ubiquitin. Sie sind beispielsweise an der Regeneration von Ubiquitinmonomeren aus Polyubiquitinketten beteiligt, die nicht mit einem Protein verbunden sind. Damit bilden sie einen Gegenspieler in ubiquitinabhängigen Signalwegen, vergleichbar mit dem Prinzip der Phosphorylierung/Dephosphorylierung. Nicht zuletzt sind sie an der Bereitstellung von Ubiquitin aus dem Vorläuferprotein Pro-Ubiquitin beteiligt. Dieses liegt fusioniert mit dem Ribosom oder als lineares Polyubiquitin vor und wird durch DUBs in reife Monomere gespalten (51).

Das 26S Proteasom ist ein 2.5 MDa großer Multiproteinkomplex und besteht aus insgesamt 33 derzeit bekannten, unterschiedlichen Untereinheiten, die in zwei Subkomplexe unterteilt werden können (31). Ein Subkomplex ist das 20S Proteasom und wird vom proteolytisch aktiven *core particle* (CP) gebildet. Der andere Subkomplex besteht aus einem oder zwei terminalen 19S *regulatory particles* (RP). Das ca. 730 kDa 20S Proteasom weist eine tonnenförmige Struktur auf und besteht aus vier heptameren Ringen. Diese sind in einer zylinderartigen $\alpha\beta\alpha$ -Struktur angeordnet, die im Reich der Metazoa hoch konserviert ist. Jeweils 7 α -Untereinheiten bilden einen von zwei der äußeren α -Ringe, sieben β -Untereinheiten bilden zwei innen liegende β -Ringe. Die proteolytische Aktivität des Proteasoms basiert auf katalytisch aktiven, N-terminalen Threonin-Resten der β -Untereinheiten, die N-terminale nukleophile (Ntn) Hydrolaseaktivität aufweisen. Andere β -Untereinheiten sind mit *Caspase-like*, *trypsin-like* und *chymotrypsin-like* Aktivitäten assoziiert, welche Peptidbindungen C-terminaler saurer, basischer und hydrophober Aminosäuren spalten können. Die β -Ringe stellen das katalytische Zentrum des 26S Proteasoms. Die α -Ringe bilden eine vergleichsweise enge Öffnung über die ein Substrat im Normalfall aktiv transportiert wird. Der RP-Komplex weist eine Größe von ca. 930 kDa auf und wird von 19 verschiedenen

Untereinheiten gebildet. Die enzymatisch aktive Einheit beider Subkomplexe ist das 26S Proteasom, und es wird durch Bindung von 19S RP an einem oder beiden Enden des CP gebildet. Entscheidend für die Substraterkennung, Entfaltung und das Öffnen des CP ist das 19S RP. Es besteht aus 19 Untereinheiten die in zwei Gruppen unterteilt werden können: den regulatorischen Partikeln der ATPase Untereinheiten (Rpt1-6 (*regulatory particle triple-A-protein*)) und regulatorischen Partikeln der nicht-ATPase Untereinheiten (Rpn 1-15 (*Regulatory particle non-ATPase*)). Diese übergeordneten Strukturen des 19S RP werden in zwei Subkomplexe unterteilt: dem „Deckel“ und der „Basis“. Hierbei besteht der Deckel aus neun non-ATPase Untereinheiten und die Basis aus sechs verschiedenen AAA+ ATPase-Untereinheiten (Rpt1-6) sowie drei non-ATPase-Untereinheiten (Rpt1, Rpt2, Rpt13). Rpn10 ist an der Schnittstelle von Deckelstruktur und Basis positioniert und stabilisiert deren Verbindung (52). Die Erkennung von Zielproteinen erfolgt auf Basis einer zuvor angehängten Kette aus Ubiquitinmolekülen (53). Zu den bekannten intrinsischen Untereinheiten bzw. Rezeptoren, die mit Ubiquitin-Konjugaten interagieren, gehören das zuvor erwähnte Rpn10 und Rpn13 (54). Rpn10 enthält ein flexibles C-terminales *ubiquitin interaction motif* (UIM), während Rpn13 hochaffin gegenüber Diubiquitin durch eine N-terminale Pru-Domäne (*pleckstrin-like receptor for the ubiquitin domain*) ist (55, 56). Extrinsische Rezeptoren sind *ubiquitin-like* (UBL) und *ubiquitin associated* (UBA) Ubiquitinrezeptoren. Dazu zählen Rad23, Dsk2 und Ddi1. UBL Domänen interagieren direkt mit Untereinheiten des RP Komplexes. UBA bindet hingegen Polyubiquitin-Konjugate. Beide Proteinfamilien arbeiten kooperativ mit intrinsischen Rezeptoren und vermitteln somit die Erkennung polyubiquitinerter Proteine. Als katalytisch aktiver Teil der Deckelstruktur ist Rpn11 am Prozess der Deubiquitinierung beteiligt. Rpn11 gehört damit zur Familie *deubiquinylating enzymes* (DUB) und hydrolysiert durch Metalloisopeptidaseaktivität Peptidbindungen zwischen Substraten und einem C-terminalen Glycin eines gebundenen Ubiquitins (57, 58). Die Lokalisierung von Rpn11 in der Nähe der Öffnung des CP, begünstigt die Thiol-abhängige Hydrolyse von Estern, Thioestern, Amidien, Peptiden und Isopeptid-Bindungen Ubiquitin vom Substrat (59). Innerhalb des CP werden die Proteine in Peptide von zwei bis zehn Aminosäuren Länge prozessiert (60). Immunologisch betrachtet sind diese Peptide von großem Interesse, da sie von *major histocompatibility complex* (MHC) *class I* zur Präsentation intrazellulärer oder endogener Antigene verwendet werden können. Aktuelle Studien weisen allerdings drauf hin, dass auch intrinsisch unstrukturierte Proteine (61) oder durch Oxidation

TIR1/AFB (*Transport Inhibitor Response 1/ Auxin Signaling F-Box*) gegenüber AUX/IAA aus. TIR1/AFB bildet eine Untereinheit der E3-Ligase SCF^{TIR1/AFB1-3} (SKP1: S-phase kinase1, CUL1: Cullin1, F-box Protein) und vermittelt die Substratspezifität über Leucin-reiche, repetitive Sequenzelemente. Im Komplex mit dieser E3- Ligase wird AUX/IAA schrittweise ubiquitiniert. Die Ubiquitin-konjugierten AUX/IAA Proteine werden vom 19S RP gebunden und sukzessive im 26S Proteasoms degradiert. Auxin vermittelt also die Interaktion zwischen SCF^{TIR1/AFB1-3} und den AUX/IAA und wirkt somit als Signalgeber für den Abbau der Repressoren.

1.8 Gezielter Proteinabbau als Instrument der Proteinanalytik

Die Analyse derartig komplexer Signalwege wurde durch verschiedene Methoden realisiert, die es erlauben die Funktion bestimmter Proteine gezielt zu hemmen oder auszuschalten.

Auf DNA-Ebene bestimmen Mutationen des Genoms die Proteinfunktion und damit den Phänotyp des Modellorganismus. Die natürliche Mutageneserate ist zum Teil äußerst gering und bedeutet eine zeit- und materialaufwändige Suche nach phänotypischen Abweichungen (*forward genetics*). Die Anwendung von Chemikalien wie Ethylenmethylsulfonat (EMS) oder radioaktiver Strahlung erhöhte die Anzahl von Mutationen dramatisch, erfolgte aber ungerichtet und nicht kontrollierbar, wodurch gezielte Änderungen am Genom nicht realisierbar sind (68). Die sequenzspezifische *in vitro* Mutagenese ermöglichte erstmals die gezielte Veränderung von Genen (69). Sehr diverse Strategien wurden entwickelt, diese Genfragmente in den Zielorganismus zu transportieren: Co-Kultivierung mit *Agrobacterium tumefaciens*, ballistische Methoden (*gene bombardment*) oder direkter Gentransfer durch Elektroporation, Mikroinjektion oder Behandlung von Proplastiden mit Polyethylenglycol (PEG) (70-74). Entsprechende Fragmente können u.a. über homologe Rekombination in das Genom integriert werden. Nachteile dieser Methoden sind allerdings, dass die Rate spontaner Integrationen exogener DNA sehr gering ist und spontan an verschiedenen Loci erfolgt. Außerdem hängt die Aufnahme stark vom Organismus bzw. Zelltyp und Entwicklungsstadium ab. Fortschritte wurden durch Zinkfingernukleasen erzielt, die definierte DNA-Sequenzen erkennen und Doppelstrangbrüche einfügen (75). Die Entdeckung des Effektorproteins AvrBs3, einem Vertreter der *Transkription activator like effector* (TAL) Proteine, aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* konnte die Sequenzspezifität nochmals erhöhen. Repetitive Sequenzelemente dieses Effektors sind für die Bindung spezifischer

Zielsequenzen im Wirtsgenom verantwortlich. Jens Boch et al. sowie Matthew J. Moscou und Adam J. Bogdanove *et al.* ist es gelungen das Bindungsmuster zu entschlüsseln (76, 77). Eine Fusion der TALE-Domäne mit einer Nuklease (TALEN) ermöglicht das zielgerichtete Einfügen von Doppelstrangbrüchen. Durch endogene Reparaturmechanismen (*error-prone non-homologous end-joining*) können die entsprechenden Genabschnitte repariert werden, wodurch Insertionen oder Deletionen eingefügt werden können. Für jede Zielsequenz muss allerdings ein eigenes Set von Erkennungssequenzen designiert werden. Da die erforderlichen Schritte bei der Entwicklung von ZNFs und TALENs nicht trivial sind, fanden diese Techniken bisher keine breite Anwendung. Der aktuellste Durchbruch basiert auf der Entdeckung bestimmter Sequenzmotive innerhalb des *Escherischia coli* genoms, den *clustered regulary interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) (78, 79), die mit der Endonuclease Cas9 (CRISPR associated protein 9) assoziiert sind. In dieser funktionellen Einheit, vermittelt CRISPR die Bindung an definierte DNA-Sequenzen, während Cas9 Strangbrüche einfügt. Biotechnologische Adaptionen basieren auf der Veränderung einzelner Bestandteile des Typ II Cas-Systems. Zum einen wird die crRNA so verändert, dass sie mit einem bestimmten Genlocus im Wirtsgenom hybridisieren kann. Da sie mit komplementären DNA-Abschnitten hybridisiert, dient sie als *guide RNA*. Ein zusätzliches *repair template* enthält ein DNA-Fragment das der Wirtszelle als Matrize für die anschließende Reparatur des Strangbruchs über homologe Rekombination dient. TracrRNA (*trans activating crRNA*) und crRNA formen einen aktiven Komplex. Zusammen mit Cas9 bilden die beschriebenen Elemente eine funktionelle Einheit, die gezielt Strangbrüche einfügt und über zelleigene Reparaturmechanismen die Möglichkeit bietet, neue Sequenzen einzufügen. Trotz aller Fortschritte ist auch die Genomeditierung über CRISPR Cas9 durch *off-target* Effekte limitiert (80-84). Eine Inaktivierung von Proteinfunktion auf genetischer Ebene ist zudem sehr zeitaufwändig und bestimmte Mutanten lassen sich nicht erzeugen, sollte das entsprechende Gen essenziell für frühe Entwicklungsstadien sein.

Einflussmöglichkeiten auf RNA Ebene basieren auf dem RNAi (RNA-Interferenz) Signalweg, über den es möglich ist die Expression einzelner Gene gezielt zu inhibieren (85). Innerhalb des RNAi-Signalweges schneidet die Endoribonuclease *Dicer* doppelsträngige (ds)RNA- in kurze dsRNA-Moleküle, die ca. 20 Nucleotide lang sind. Die doppelsträngigen Fragmente (siRNA oder miRNA) komplexieren mit dem

Argonautenprotein (AGO) welches den RNAi *silencing complex* (RISC) bildet. Dort werden die doppelsträngigen Vorläufer in zwei einzelsträngige RNAs gespalten, wovon der Leitstrang (*guide strand*) am RISC verbleibt, während der andere (*passanger strand*) degradiert wird. Hybridisiert dieser Komplex mit einer komplementären mRNA, wird diese über eine AGO2 Untereinheit des RISC-Komplexes abgebaut. Dessen C-terminale PIWI Domäne entfaltet eine Mg^{2+} -abhängige Endonukleaseaktivität und führt zum Abbau des mRNA-Moleküls. Gezieltes Design von siRNA-Molekülen ermöglichte erstmals den Abbau bestimmter mRNAs in Humanzelllinien (86). Seit dieser Entdeckung wurde besonders die medizinische Anwendung forciert. Zahlreiche Patentanmeldungen und klinische Studien sind in Arbeit. Die Behandlung von HIV-Infektion (Phase I/II; NCT02797470, Phase I; NCT00569985, Phase I; NCT03517631), altersbedingte Makuladegeneration (Phase I, II; NCT02599064) oder Hämophilie (Phase III; NCT03417245, NCT03417102, NCT03549871, NCT03754790) sind nur wenige Beispiele (87). Zu den Nachteilen von RNAi basierten Techniken gehört die Effizienz. So werden beispielsweise nicht alle mRNA-Moleküle adressiert, wodurch es nur zu einer Reduktion des entsprechenden Proteinlevels (*knock-down*) kommt. Weiterhin ist die Methodik anfällig für *off-Target* Effekte, also Veränderungen im Transkriptom die nicht der Zielsequenz entsprechen. Dies ist insbesondere der Fall, wenn die dsRNA repetitive Sequenzen enthält (88).

Andere Ansätze auf Proteinebene wurden entwickelt, um direkt Einfluss auf bestimmte Proteinfunktionen zu nehmen. Neutralisierende monoklonale Antikörper finden bereits breite Anwendung in Medizin und Forschung. Auch in Pflanzen konnte gezeigt werden, dass bestimmte Einzeldomänen-Antikörper gegen Pflanzenviren erfolgreich exprimiert werden können. Einen funktionellen Beweis dafür zeigten Tavladoraki *et al.* indem sie Einzeldomänen Antikörper gegen Virionen des *Artichoke mottled crinkle virus* (AMCV) isolierten und transgene Tabakpflanzen herstellten, die diesen Antikörper akkumulierten (89). Anschließende Resistenzanalysen zeigten eine inhibitorische Wirkung auf den Befall durch AMCV und signifikant reduzierte Symptome. Für ein ähnliches Experiment haben Artsaenko *et al.* phänotypische ABA (*Abscisinsäure*)-Mutanten auf Basis von anti-ABA-scFv (*single chain variable fragment*) Antikörpern erzeugt (90). Dafür wurden die variablen Ketten VH und VK des monoklonalen anti-Abcisinsäure Antikörpers 15-I-C5 zu einem scFv zusammengefügt und in transgenen Tabakpflanzen im ER akkumuliert. Dadurch wurde ein artifizieller ABA-Sink im

Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet und somit ABA-Funktionen im Zytosol gehemmt. Dies hatte Entwicklungsdefizite, Missbildungen der Stomata und Trockenstressempfindlichkeit zur Folge. Eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit war, dass der beobachtete Phänotyp dem einer ABA-Mangelmutante entspricht (91). Durch samenspezifische Immunmodulation wurden ebenfalls ABA-Defizienzphänotypen (Viviparie) erzeugt (92). Eine spezifische ABA-Immunmodulation konnte weiterhin für Erbsen und Getreide gezeigt werden (93, 94).

2004 gelang es Miroshnichenko *et al.* die Funktion von sHSPs (*small heat shock proteins*) in Tabakpflanzen, mittels hochaffiner Einzeldomänen-Antikörper auf Proteinebene zu unterdrücken (95). Ein entscheidender Vorteil dieser Strategie gegenüber *knockout*-Mutanten bestand darin, dass die zelluläre sHSP-Konzentration unverändert blieb. Durch die interferierenden Antikörpervarianten wird lediglich die Assemblierung bzw. Dissoziation hochmolekularer sHSP-Multimere gestört. Daraus resultierten neue Möglichkeiten, Stressreaktionen auf Hitze in entsprechenden phänotypischen Mutanten beobachten zu können. Weitere Möglichkeiten für die Reduktion bestimmter Proteinfunktionen auf Proteinebene stellen das *sequestering*, *cleaving* oder *protein knock-outs* dar. *Sequestering* beschreibt eine Strategie, in der die Zielmoleküle in ein Zellkompartiment überführt werden indem sie ihre ursprüngliche Funktion nicht mehr ausüben können (96-98). *Cleavage* umfasst den Einsatz einer TEV (*tobacco etch virus*)-Protease die bestimmte Sequenzmuster erkennt und proteolytisch spaltet (99, 100). Um Proteine auf diese Weise gezielt zu manipulieren, wird zuvor eine Variante des Zielmoleküls erstellt, die diese Erkennungssequenz enthält. Das entsprechende Gen wird zusammen mit der codierenden Sequenz für die TEV-Protease und einem induzierbaren Promotor in das Genom des Zielorganismus integriert. Die Idee, bestimmte Proteine durch gezielten Abbau über das UPS gänzlich aus einem System zu entfernen, hat das Methodenrepertoire stark erweitert. Schon 1994 gab es erste Arbeiten, in denen mittels Hitzeshock-abhängigen Degrons gezielt Proteine degradiert wurden (101). Ähnlich dem TEV-Cleavage System, basiert diese Methode auf einer Veränderung des Zielproteins. Arbeiten, die diese Abhängigkeit überwinden konnten, rückten das UPS in den Mittelpunkt. Die Arbeitsgruppe um Pengbo Zhou konstruierte dazu eine chimäre Variante der Cdc4p Ubiquitin-Ligase (102). Innerhalb dieses Multiproteinkomplexes vermittelt ein F-box-Protein über repetitive, Leucinreiche Aminosäuresequenzelemente die Substratspezifität. Um ein anderes Zielmolekül

zu adressieren, wurde dieser Sequenzbereich mit 35 AS des N-terminalen Bereiches aus dem E7 Protein des Humanen Papillomavirus erweitert. Dadurch erzwang man eine Affinität der Cdc4-Ubiquitin-Ligase gegenüber dem Retinoblastoma Protein (pRB). In Folgeexperimenten konnte über dieses Hybridprotein erfolgreich pRB in Hefe- und transgenen Humanzellen (*Cervical Carcinoma C33A*) durch das UPS abgebaut werden. Eine erste Kombination der induzierbaren Degron-Technik und dem UPS vermittelten Proteinabbau wurde von Nishimura *et al.* 2009 publiziert. In dem sog. AID-System wurde die pflanzliche E3-Ligase SCF^{TIR1/AFB1-3} verwendet, um Zielproteine in Fusion mit dem IAA17-Degron abzubauen (103). Die Funktionalität dieses auxinabhängigen Degradationssystems konnte für Hefezellen, aber auch in diversen Säugetierzellen gezeigt werden. Viele der beschriebenen Ansätze hängen von der Aktivierung durch exogene Komponenten (Chemikalien, Hormone, physikalische Einflüsse wie Hitzeschock) ab, was den experimentellen Aufbau kompliziert gestaltet. Eine weitere Einschränkung ist die streng limitierte Variabilität der Zielproteine, da hier meist auf bekannte Strukturen und Interaktionspartner zurückgegriffen werden muss.

Caussinus *et al.* demonstrierten erstmals die Möglichkeit, mittels einer Kombination aus hochaffinen Einzeldomänen-Antikörpern und dem UPS gezielt Proteine abzubauen (3). Ihnen gelang die selektive Degradation des Fusionsproteins H2B-GFP (3). Entsprechend der Bezeichnung DeGradFP (*degradation of fluorescent proteins*), wurden in transgenen HeLa-Zellkulturen und *Drosophila melanogaster* Embryonen fluoreszierende Proteinfusionen abgebaut. Dafür wurde die reguläre Bindedomäne eines F-box Proteins, bestehend aus WD40 repeats, durch einen GFP-spezifischen Einzeldomänen-Antikörper (Nanobody) auf genetischer Ebene ersetzt. Zelllinien, die mit diesem Konstrukt transfiziert wurden, zeigten deutlich schwächere GFP-Signale als die Kontrolllinien. Im Vergleich zu früheren Ansätzen ist die Substratbindung durch den Einsatz von Nanobodies hochvariabel. Durch verschiedene Selektionsmethoden können Bindeproteine gegen ein breites Feld von Antigenen angereichert und auf DNA-Ebene mit einer E3-Ligase-Untereinheit (F-box) fusioniert werden.

Eine essentielle Grundlage dieser Strategie ist die Erzeugung hochaffiner und antigenspezifischer Bindeproteine. In der Analytik am weitesten verbreitet sind nach wie vor komplette Antikörper, die durch Immunisierung von Versuchstieren aus dem Serum gewonnen werden. Aus ethischen, aber auch aus Gründen des damit verbundenen Arbeitsaufwandes (Versuchstierhaltung, Spritzen der Versuchstiere, wiederholte

Serumentnahme über mehrere Wochen und anschließende Analytik), entwickelte sich eine Nachfrage an kostengünstig produzierbaren synthetischen Antikörpern. Das Prinzip der Reproduzierbarkeit durch monoklonale Antikörper und rekombinante Antikörper hat aber auch eine Rolle gespielt. Aktuelle Verfahren zu deren Gewinnung gründen beispielsweise auf rekombinanten Immunglobulinderivaten oder synthetisch designten Molekülen auf Basis verschiedener Proteingerüste. Zu den natürlichen Antikörpern gehören IgM, IgA, IgD, IgE und der häufigste Vertreter IgG. Die ca. 150 kDa großen IgGs sind heterotetramere Proteine, die aus zwei identischen schweren (50 kDa) und zwei leichten Ketten (25 kDa) bestehen. Die leichten Ketten enthalten eine N-terminale variable Domäne (V_L) und einer einzelnen konstanten Domäne am C-terminalen Ende. Die schweren Ketten bestehen aus einer N-terminalen variablen Domäne (V_H) und drei bis vier konstanten Domänen (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} und evtl. C_{H4}). Entsprechend seiner bispezifischen Natur bilden zwei dieser Domänen, C_{H2} und C_{H3} , den konstanten Fc-Teil (*constant fragment*) der IgG-Antikörper aus, der an der Rekrutierung der Immunzellen beteiligt ist. Den antigenspezifischen Bereich bilden V_H und V_L in Form des variablen Fragmentes (Fv). Auf Strukturebene zeigt sich, dass die ungefähr 110 AS langen Domänen der V_H und V_L aus mehreren anti-parallel orientierten β -Faltblättern bestehen, die über Loop-Strukturen miteinander verbunden sind (104, 105). Diese hypervariablen Loops enthalten Sequenzmotive, die sowohl in Länge als auch Aminosäure-Sequenzabfolge hoch variabel (complementarity determining region: CDR) (106) sind und bilden das Paratop, über das der Antikörper mit einem Epitop eines Antigens reagiert.

Mit dem Ziel die Bindungseigenschaften der IgGs mit vereinfachten Herstellungsprozessen zu kombinieren, wurden auf Grundlage der strukturellen Erkenntnisse verschiedene Derivate der Immunglobuline entwickelt. Klassische Vertreter sind Fab- (*Fragment antigen binding*), bzw. einzelne V_H - oder V_L -Fragmente, und scFv. Im Fall der Fab-Fragmente und scFv-Formate werden V_H - und V_L -Domänen über hydrophobe Framework Regionen verbunden. Trotz vieler Optimierungsversuche sind scFv oft strukturell instabil, was ihre Löslichkeit reduziert. Demgegenüber steht eine Klasse natürlich evolvierter Antikörper, denen die leichten Ketten fehlen. Sie wurden im Serum von Kamelen (*Camelus dromedarius*) (107) und im Atlantischen Ammenhai (*Ginglymostoma cirratum*) (108) entdeckt und zeigen im Vergleich zu den scFv eine geringere Tendenz Aggregate zu bilden und bzw. oder proteolytisch abgebaut

zu werden. Vor allem durch ihre geringe Größe können sie Gewebe penetrieren, was sie für klinische Anwendungen interessant macht. Schwerkettenantikörper (*heavy chain antibodies*: hcAbs) kommen ergänzend zu konventionellen Antikörpern vor und bestehen nur aus zwei schweren Ketten, die kovalent verbunden sind. Die individuellen Ketten bestehen aus jeweils zwei konstanten Domänen und einer variablen Domäne. Dies spiegelt ebenfalls die vergleichsweise geringe Größe von ca. 90 kDa wieder. Im Vergleich zu humanem IgG ist die funktionelle Bindeeinheit auf eine einzige variable Domäne (V_{HH}) reduziert. Das hat zur Folge, dass Antigene mit nur drei statt sechs hypervariablen Loops gebunden werden können. Um ein Bindeinterface vergleichbarer Größe (600-800 Å²) zu erreichen, müssen die Loops länger ausfallen.

Hinsichtlich ihrer Bindungsart unterscheiden sich diese hcAbs ebenfalls deutlich. Paratope konventioneller IgG bilden häufig Vertiefungen oder flache Oberflächen, um kleine chemische Gruppen, Peptide oder planare Epitope größerer Proteine zu binden (109). V_{HH} bilden eine gestreckte Form, die ein konvexes Paratop exponiert (110), welches sich gut in Vertiefungen oder kryptische Epitope einfügt (111). Letztere sind für die deutlich größeren konventionellen IgG-Paratope nur schwer zugänglich.

Das antigenbindende Fragment der hcAbs besteht ausschließlich aus einer Domäne, weshalb ebenfalls die Bezeichnung sdAbs (*single domain antibodies*) oder VHHs eingeführt wurde. Die Bindedomäne wird von einem ca. 360 bp großen Gen codiert. Aufgrund der geringen Größe des Fragmentes ist es möglich über eine einzige Polymerase-Kettenreaktion (PCR) das gesamte VHH Repertoire aus den B Zellen eines immunisierten Lamas zu amplifizieren. Aus 50 mL Lamablut lassen sich dadurch kleine DNA-Bibliotheken mit 10^6 verschiedenen antigenspezifischen VHHs generieren, welche die Grundlage für eine weitere Selektion mittels Phagen-Display bilden. Die selektierten Nanobodies haben eine Größe von ca. 13-14 kDa, lassen sich heterolog in Bakterienkulturen exprimieren und eignen sich für funktionelle Anwendungen in eukaryotischen Zellen. Weiterhin haben sich Techniken etabliert die Variabilität der naiven Bibliotheken synthetisch zu steigern (112). Durch Mutagenese der CDRs werden die semi-synthetischen Bibliotheken diversifiziert und erreichen eine Variabilität von 10^9 .

1.9 Spezifische Anwendungsfälle gezielten Proteinabbaus in Pflanzen

Methoden des gezielten Proteinabbaus könnten breite Anwendung bei der Erzeugung resistenter Pflanzenlinien finden. Ein gezielter Abbau von Effektorproteinen könnte den Pathogenbefall einer Pflanze verhindern. In bisherigen Arbeiten konnte ein gewisser Schutz gegenüber Pflanzenviren durch Immunmodulation bestimmter Viruspartikel erzeugt werden. Beispielhaft für diesen Ansatz sind Arbeiten von Boonrod *et al.* (113). Ihnen gelang es mittels Phagen-Display-Technologie einen scFv-Antikörper gegen eine Domäne einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase des *tomato-bushy-stunt-virus* zu selektieren. Folgeexperimente zeigten, dass diese heterolog exprimierten Antikörper die Funktion der RdRps in Modellpflanzen (*Nicotiana benthamiana*) unterdrücken können. Da es sich bei dem verwendeten Antigen zur Erzeugung der rekombinanten Antikörper um eine hoch konservierte Domäne des Virus handelte, umfasste die erzeugte Resistenz gegenüber dem TBSV auch nahe verwandte Viren. Aber die bloße Bindung von Effektorproteinen reicht oftmals nicht aus, um eine Resistenz auszubilden. Der Abbau über das UPS mittels DeGradFP-System könnte einen entscheidenden Vorteil bieten. Aufgrund der potentiellen Möglichkeiten haben Baudisch *et al.* diese Methode auf Pflanzen übertragen und konnten gezielt EGFP in transgenen Tabakpflanzen proteasomal abbauen (4). Damit konnte eine universelle Anwendbarkeit, insbesondere auch in der Pflanzenforschung, demonstriert werden. Ebenfalls wurde die Möglichkeit eröffnet, Resistenzen gegenüber Pflanzenpathogenen durch den vollständigen Abbau von pathogenen Effektorproteinen zu erzeugen. Eine andere Anwendungsmöglichkeit findet sich in der Pflanzenzüchtung, in der die Erzeugung immer leistungsfähigerer oder resistenter Sorten im Mittelpunkt steht. Klassische Züchtungsmethoden sind jedoch sehr zeitaufwändig und Inzuchtlinien erreichen erst nach ca. sechs Generationen vollständige Homozygotie. Durch den gezielten Abbau von Proteinen, die an der Segregation der Chromosomen beteiligt sind, könnte die erforderliche Anzahl an Generationszyklen drastisch reduziert werden.

1.10 Zielstellung

Zusätzlich zum *knockout* auf DNA-Ebene oder auf RNA-Ebene wurde die Immunmodulation mit Hilfe von *Nanobodies* (VHH) oder Einzelkettenantikörpern (scFv) als Werkzeug zur Beeinflussung physiologischer Prozesse genutzt (90, 95, 114). Damit wurde gezeigt, dass rekombinante Antikörper in verschiedenen Zellkompartimenten mit molekularen Zielstrukturen wie Proteinen oder Phytohormonen

interagieren können. Das zugrunde liegende Funktionsprinzip basiert auf dem Blockieren von Epitopen eines funktionellen Proteins durch entsprechende Antikörper. Nicht alle Proteinfunktionen sind durch diese Immunmodulation beeinflussbar, u.a. weil es nicht immer gelingt, rekombinante Antikörper zu erzeugen, die bei Interaktion mit einer bestimmten Domäne zum Funktionsverlust des Zielproteins führen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit experimentell ermittelt, ob mittels gezieltem Proteinabbau physiologische Veränderungen in Pflanzen zu erzielen sind. Das Versuchsprinzip basiert auf einer chimären E3-Ligase (3, 115), deren Antigen-spezifität durch Fusion mit einem anti-GFP-Nanobody moduliert wurde (3, 5). Durch die Assemblierung des E2-E3-Ligase-Komplexes mit dem chimären Adapterprotein werden GFP-Fusionsproteine gebunden, polyubiquitiniert und entsprechend im 26S Proteasom degradiert (Abb. 4).

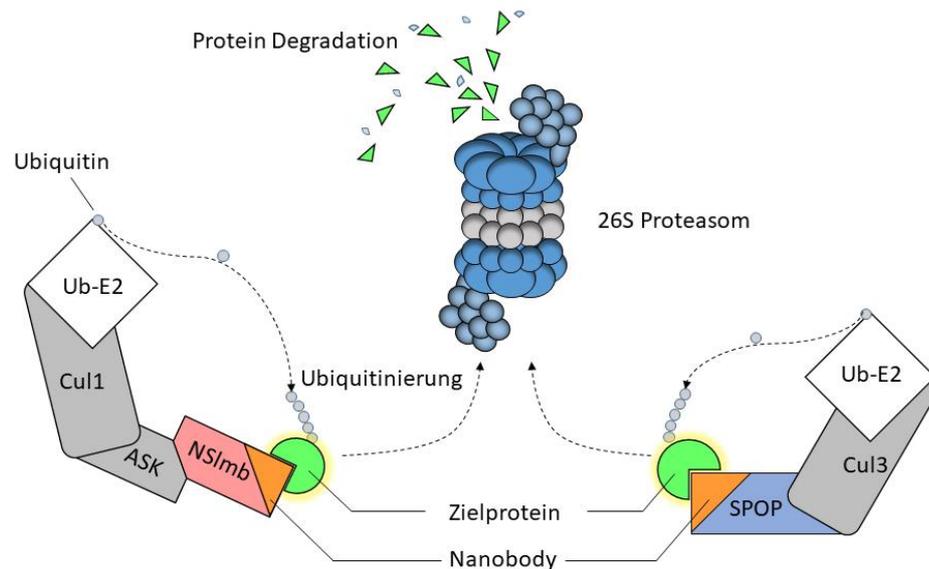


Abb. 4: Gezielter Abbau von Proteinen. Der E2-E3 Ligase Komplex vermittelt den Transfer von Ubiquitin auf ein Zielprotein. Die Spezifität gegenüber eines Zielproteins hängt von der Proteinuntereinheit NS1mb oder SPOP ab. Die natürlichen Bindedomänen von SPOP (MATH) bzw. NS1mb (WD40) wurden auf DNA-Ebene durch einen anti-GFP-Nanobody ersetzt, wodurch eine chimäre E3-Ligase mit hoher Bindungsaffinität gegenüber GFP entsteht. Die Assemblierung des E2-E3 Ligase Komplexes mit den chimären Adapterproteinen ermöglicht die Ubiquitinierung von GFP-Fusionsproteinen und damit deren proteasomalen Abbau.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Ansätze verfolgt, um Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften experimentell abzubauen. Da ein erfolgreicher Abbau von GFP im Zytosol bereits gezeigt werden konnte (4), widmet sich der erste Teil der Arbeit dem Abbau des zellkernlokalisierten Fusionsproteins EYFP-CENH3. Die Histonvariante CENH3 assoziiert mit Zentromeren während des Zellzyklus und hat eine

Kontrollfunktion bei der Ausbildung der Kinetochore während der Chromosomensegregation (116, 117). Aufgrund der gut nachweisbaren Lokalisation im Zellkern (7) wurde das Fusionsprotein EYFP-CENH3 als Zielprotein für kompartimentspezifische Abbaubersuche ausgewählt. Im zweiten Teil der Arbeit wird der Abbau des Fusionsproteins SAP11-GFP5 untersucht. Durch heterologe Überexpression von SAP11-GFP5 wurden Tabakmutanten generiert, die makroskopisch von Wildtyppflanzen unterscheidbar sind. SAP11 ist dabei ein Effektorprotein aus dem Pflanzenpathogen *Phytoplasma mali*, welches mit Transkriptionsfaktoren der Wirtspflanze interferiert und starke Phänotypen in Wirtspflanzen hervorruft. Innerhalb eines *Rescue*-Experimentes soll mit Hilfe chimärer E3-Ligasen das überexprimierte SAP11-GFP5 transgener Pflanzen abgebaut und der Wildtyp-Phänotyp wiederhergestellt werden. Thematisch schießt sich der dritte Teil der Arbeit hier an, in der das pathogene Effektor Protein *Plasmodiophora brassicae Salicylate / benzoate carboxy methyltransferase 1* (PbBSMT1) abgebaut werden soll. Im Unterschied zu den vorangehenden Ansätzen soll dabei das Zielmolekül direkt über Nanobody- bzw. Singlechain-Varianten adressiert werden. Besonders die Selektion solcher PbBSMT1 bindenden Moleküle wird detailliert dargelegt.

2. Materialien

2.1 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Sofern nicht explizit vermerkt, verfügen sie mindestens über einen Reinheitsgrad p.A..

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
Agarose Wide Range	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Anti-TNF-ELP (eigene Produktion)	IPK, Gatersleben, Germany
Bacto™ agar	Otto Nord Wald, Hamburg, Germany
Bacto™ Tryptone	Otto Nord Wald, Hamburg, Germany
Bacto™ yeast extract	Otto Nord Wald, Hamburg, Germany
Bovine Serum Ablumin, Protease free (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
Bromophenolblau Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Dimethylsulfoxid (DMSO) Rotipu-ran®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Glycerin Rotipuran®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Imidazol BioUltra	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Germany
Isopropanol Rotipuran®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (dioxane-free) (IPTG)	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Magermilchpulver	Saliter Milchwerk GmbH & Co. KG Obergünzburg, Germany
Methanol Rotipuran®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Phosphinothricin	Sigma-Aldrich, USA
Pierce™ Protein L Peroxidase conjugated	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania
Polyethylenglycol 6000 (PEG)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany

Chemikalie	Hersteller
Polysorbat 20 (Tween® 20)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
<i>Protein assay dye reagent concentrate</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
PVA-50 (Polyvinylalkohol Molekulargewicht 50 000 g/mol)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Germany
PVP-360 (Polyvinylpyrrolidon Polyvinylalkohol Molekulargewicht 360 000 g/mol)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Germany
ROTI®Block	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-, Bisacrylamid Stammlösung im Verhältnis 37.5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
TEA (Triethylamin)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Germany
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany

2.2 Oligodesoxynukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden über Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) bezogen.

Tabelle 2: Verwendete Oligodesoxynukleotide.

Primername	5' → 3' Sequenz
EYFP_for	TATATCATGGCCGACAAGCA
EYFP_rev	GTTGTGGCGGATCTTGAAGT
EF-1alpha_for	GGATCTGTTGAGATGCACCA
EF-1alpha_rev	CCAACATTGTCACCAGGAAGTG
Nslmb-VHHGFP_for	AACCATGGCCATGATGAAAATGGAGACTGACAAA
Nslmb-VHHGFP_rev	CAGATCTGCTGGAGACGGTGACCTGGG
BTB-VHHGFP_for	TGGCCATGGATCAAGTCCAAGT
BTB-VHHGFP_rev	GTGCTCGAGTGGGGGTCCAGAAAAGGGCACTG
VHHGFP_for	TGGCCATGGATCAAGTCCAAGT
VHHGFP_rev	CAGATCTGCTGGAGACGGTGACCTGGG
BTB-NdeI_for	TACATATGTCTGTCAACATTTCTGGCCAGAATACC
BTB-XhoI_rev	GTGCTCGAGTGGGGGTCCAGAAAAGGGCACTG
GFP5-NdeI_for	TACATATGAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTCTACTG
GFP5-XhoI-R	GTGCTCGAGTTTGTATAGTTCATCCATGCCATGT
Sap11-NcoI_for	GGCCATGGCCTCCCCTCCAAAGAAGGACT
Sap11-NotI_rev	GTGCGGCCGCTTTTTTGCCTTTATCTTTATTATTA
antiMT-scFv-3H5_for	CCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTG
antiMT-scFv-3H5_rev	CAACAGCTGCACCTCGGCCATGGCCGG
antiMT-scFv-4E10_for	CTGTGCGGTGGTCACTTACAATGTA
antiMT-scFv-4E10_rev	TACATTGTAGACTGACCACGCGACAG
antiMT-scFv-4H2_for1	CTCACGTATTTTCAGCCTGGTTGGGG
antiMT-scFv-4H2_rev1	GCCCAACCAGGCTGAAAATACGTGAG

Primername	5' → 3' Sequenz
antiMT-scFv-4H2_for2	AAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA
antiMT-scFv-4H2_rev2	TTCCCTGGTTTCTGCTGATACCAATTT
antiMT-scFv-11A6_for	TCGGAATAGGGGTCAGTGTACATCGTA
antiMT-scFv-11A6_rev	TACGATGTACACTGACCCCTATTCCGA
antiMT-scFv-11B11_for	GGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGG
antiMT-scFv-11B11_rev	CCAACAGCTGCACCTCGGCCATGGCC

2.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgeführt. Als Ausgangsvektor für Klonierungen anhand des pRTRA-Vektors, diente das Plasmid pRTRA15 (90) bzw. das daraus resultierende Plasmid pRTRA-NSlmb-VHHGFP4 (4), in dem die LeB4-Sequenz deletiert wurde. Der binäre Vektor pCB301-Kan (118) wurde für die Agrobacterium-vermittelten Transformation von Tabak verwendet. Dieses Plasmid basiert auf pCB301 (119) und entstand durch den Transfer eines *BglIII/BamHI*-T-DNA-Fragments des binären Vektors BIN19 (120).

Tabelle 3: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Verwendung	Resistenz und Marker
pUC	Standardvektor für kommerziell erworbene DNA-Sequenzen. Wurde für die Lieferung der SPOP Sequenz verwendet.	Ampicillin
pIT1	Phagemidvektor zur Präsentation von scFv auf der Oberfläche rekombinanter Phagen. pIII Fusion und pelB Signalsequenz für den Transport ins Periplasma.	Ampicillin, c-Myc
pIT2	Phagemidvektor zur Präsentation von Nanobodies auf der Oberfläche rekombinanter Phagen. pIII Fusion und pelB-Signalsequenz für den Transport ins Periplasma.	Ampicillin, c-Myc- und HIS-tag
pet22b(+) c-Myc	Expressionsplasmid mit C-terminalem 6xHis Fusionspeptid, T7 Promotor, T7- Terminator	Ampicillin, c-Myc- und HIS-tag
pRTRA	<i>high copy</i> Klonierungsvektor für die Anreicherung der gewünschten Expressionskassette. Enthält 35S CaMV Promotor, KDEL Motiv für die Retention im ER, 6xHis-Fusionspeptid und ein C-terminales c-Myc-tag	Ampicillin
pCB-301 Kan	Binärer Vektor für die <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelte Proteinexpression in Pflanzen. Virulente T-DNA-Sequenzbereiche zwischen <i>left-</i> und <i>right-</i> T-DNA <i>border</i> wurden entfernt und eine MCS eingefügt.	Kanamycin, c-Myc- und HIS-tag

2.4 Mikroorganismen

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Mikroorganismen.

Organismus	Genotyp
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm</i> λ (DE3)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac- F'</i> [<i>proAB lacIqZAM15 ::Tn10</i>]
<i>E. coli</i> HB2151	<i>K12 ara Δ(lac-pro) thi/F'</i> [<i>proA+B+ lacIq acZAM15</i>]
<i>E. coli</i> TG1	<i>K12 Δ(lac-proAB) supE thi hsdD5/F' traD36 proA+B lacIq lacZAM15</i>
<i>A. tumefaciens</i> GV2260	pGV2260 (pTiB6S3DT-DNA)

2.5 Helferphagen

Tabelle 5: Verwendete Helferphagen.

Phage	Beschreibung
M13KO7	M13-Phagen-Abkömmling, Mutation M40I in Gen II, P15A Ori, NPT II Gen für Kan Resistenz

2.6 Nährmedien

Tabelle 7 fasst alle Medien zusammen die für die Kultivierung von Mikroorganismen oder in vitro Pflanzenkulturen verwendet wurden. Alle Nährmedien wurden vor der Verwendung 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Additive wie Antibiotika oder Glucose wurde den Festmedien nach Abkühlung auf 50-60°C hinzugefügt und Nährplatten (d=9cm) direkt im Anschluss ausgegossen. Die Lagerung fertiger Kulturplatten erfolgte bei 4°C für maximal 6 Wochen.

Tabelle 6: Verwendete Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt
LB fest	LB-Medium mit zusätzlich 15 g/l Agar
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM, KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glucose
2TY-Medium	5 g/L NaCl, 16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt
2TY-Medium fest	2TY-Medium mit 15 g/L Agar
TB-Medium	12 g/L Trypton, 24 g/L Hefeextrakt, 17 mM KH ₂ PO ₄ *, 72 mM K ₂ HPO ₄ , 4 mL Glycerin
MS-Medium	0,44% (w/v) Murashige & Skoog-Fertigsubstanz (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande), 3% Saccharose, 0,05% (w/v) MES, 10g/L Agar
M9 Minimalmedium	33,7 mM Na ₂ HPO ₄ , 22 mM KH ₂ PO ₄ , 8,5 mM NaCl, 9,35 mM NH ₄ Cl, 1 mM MgSO ₄ , 0,3 mM CaCl ₂ , 1 µg Biotin, 1 µg Thiamin, 1x Spurenelemente, 0,4% Glucose

2.7 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer (Tabelle 7) wurden mit deionisiertem und gefiltertem Wasser hergestellt. Die Lagerung der Puffer erfolgte bei Raumtemperatur.

Tabelle 7: Verwendete Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
0,5 M EDTA	186 g/L EDTA pH 8,0 mit 1 M NaOH
1 M IPTG	238 mg/mL IPTG
1 M Tris-HCl	121 g/L Tris pH 8,0
2 x SDS Probenpuffer	20% (v/v) Glycerin, 4% SDS, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % β -Mercaptoethanol, 17,3 g/L Tris
3% BSA in PBS	3 g BSA in 100 mL PBS
PBS-T	PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20
Marvel Puffer	2,42 g/L Tris, 10,51 g/L NaCl, pH 7.8
NPI10	20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,6
NPI20	20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,6
NPI30	20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 30 mM Imidazol, pH 7,6
NPI500	20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,6
Phagen-PBS	5,75 g/L Na_2HPO_4 , H_2O , 2,36 g/L NaH_2PO_4 , 5,84 g/L NaCl, pH 7,2
Sammelgelpuffer	60,6 g/L Tris, 4 g/L SDS pH 6,8
Trenngelpuffer	181,6 g/L Tris, 4 g/L SDS pH 8,8
Laufpuffer	3,03 g/L Tris, 1 g/L SDS, 14,4 g/L Glycerin
Transferpuffer	3,03 g/L Tris, 1 g/L SDS, 14,4 g/L Glycerin, 20% (v/v) Methanol

2.8 Antikörper

Der im Western Blot und ELISA verwendete monoklonale anti-c-Myc-Antikörper, der einen Bereich des humanen Proto-Oncogens p62 (c-Myc-Antikörper) erkennt (AS 408 bis 439) (121), wurde aus dem Zellkulturüberstand der Hybridomzelllinie 9E10 gewonnen (122). Die Überstände wurden mittels Ammoniumsulfat (50%-gesättigtes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) gefällt und gegen PBS dialysiert. Alle weiteren im Rahmen der Arbeit genutzten Antikörper sind in der nachfolgenden Tabelle 8 gelistet.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Organismus	Konjugation	Hersteller
Anti-c-Myc	Maus	keine	Eigenproduktion aus Maushybridomazellen
Anti-EGFP	Kaninchen	keine	Chromotek
Anti-AtCENH3	Maus	keine	LifeTein (Hillsborough, New Jersey US)
ECL anti-mouse IgG	Schaf	HRP	GE
Anti-rabbit	Maus	HRP	ThermoFischer Scientific

2.9 Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Die verwendeten Polymerasen liegen in einem sofort verwendbaren Format mit optimierten Pufferbedingungen vor. Sofern nicht anders vermerkt wurden alle Enzyme entsprechend der Herstellervorgaben eingesetzt.

Tabelle 9: Verwendete Enzyme. Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt.

Enzym/Puffer	Bezugsquelle
10x FastDigest buffer	Thermo Fisher Scientific
10x FastDigest Green buffer	Thermo Fisher Scientific
FastDigest <i>Bam</i> HI	Thermo Fisher Scientific
FastDigest <i>Bsp</i> I20I	Thermo Fisher Scientific
FastDigest <i>Nco</i> I	Thermo Fisher Scientific
FastDigest <i>Not</i> I	Thermo Fisher Scientific
FastDigest <i>Xho</i> I	Thermo Fisher Scientific
DreamTaq Green PCR Master Mix, 2x	Thermo Fisher Scientific
Phusion High-Fidelity PCR master mix	Thermo Fisher Scientific
Alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific
POWER SYBR Green Master Mix	Fischer Scientific
T4 DNA-Ligase (5 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific
10x T4 Ligase Puffer	Thermo Fisher Scientific

2.10 Antibiotika

Die Antibiotika wurden als Stammlösung in den in Tabelle 10 angeführten Konzentrationen bereitgestellt. Wenn nicht anders angegeben wurden sie mit deionisiertem H₂O hergestellt und steril filtriert. (Spritzenfilter, CA-Membran, 0,20 μ m, Heinemann Labortechnik GmbH)

Tabelle 10: Verwendete Antibiotika.

Bezeichnung	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 g/L	100 mg/L
Carbenicillin	50 g/L	50 mg/L
Kanamycin	50 g/L	50 mg/L
Rifampicin	50 g/L*	50 mg/L
Spectinomycin	100 g/L	100 mg/L

* in DMSO gelöst und nicht sterilfiltriert

2.11 Pflanzenmaterial

Zur Regeneration transgener Pflanzen durch den Agrobacterium-vermittelten Gentransfer wurde *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN (SNN) verwendet. Die Aussaat,

Anzucht und Kultur von Tabakpflanzen *in vitro* erfolgte auf MS-Medium (Tabelle 6) unter Selektionsbedingungen mit Kanamycin und ggf. Phosphinothricin bei 21°C und 16 h Licht pro Tag (150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Licht). Tabaksamen wurden für die *in vitro* Aussaat in 80% (v/v) Ethanol für 2 min oberflächensterilisiert. Für die Aussaat und Anzucht der Tabakpflanzen (3- bis 4-Blattstadium) im Gewächshaus (22°C; 50 - 70% relative Luftfeuchte; 16 h Licht pro Tag, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Licht) wurden Substrat 1 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste-Groß Hesepe) und Pflanztöpfe mit 6 cm Durchmesser (Hermann Meyer KG, Rellingen) verwendet. Sechs bis sieben Wochen nach der Aussaat wurden die Jungpflanzen in Pflanztöpfe (\varnothing 16 cm, Hermann Meyer KG, Rellingen) mit Substrat 2 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste-Groß Hesepe) überführt (22°C; 45% relative Luftfeuchte; 16 h Licht pro Tag, 200 - 220 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Licht). Die Düngung der Tabakpflanzen und eine eventuelle Schädlingsbekämpfung erfolgten nach Bedarf.

2.12 Kits und Standards

Verwendete Kits und Standards wurden entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 11: Verwendete Kits und Standards.

Material	Hersteller/Bezugsquelle
Kits	
Topo cloning kit	Thermo Fisher Scientific
RNeasy	Quiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit (250)	Quiagen
Standards	
PageRuler Prestained	Thermo Fisher Scientific
PageRuler Prestained Plus	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 1kb Plus	Thermo Fisher Scientific

2.13 Geräte und Zubehör

Für diese Arbeit verwendete Geräte und Zubehör sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Verwendete Geräte und Zubehör.

	Gerät und Zubehör	Hersteller/Bezugsquelle
<i>Autoklav</i>	Laboklav ECO	SHP Steriltechnik AG, Germany
<i>Blottingapparatur</i>	Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories, USA
<i>DNA-</i>	NanoDrop™ ND-1000	ThermoFisher Scientific, USA
<i>Quantifizierung</i>	Spectrophotometer	
<i>Elektroporation</i>	BioRad GenePulser	BioRad (München)
<i>Geldokumentation</i>	AlphaImager® HP gel imaging system	Protein Simple, USA

	Gerät und Zubehör	Hersteller/Bezugsquelle
<i>Homogenisierung</i>	UV Transilluminator	Vilber Lourmat, France
	Bioruptor Sonicator	Diagenode, USA
	MM400 CryoMill	Retsch, Haan, Germany
<i>Inkubatoren</i>	Multitron Shaker incubator	Infors HAT, Switzerland
	Binder	Binder GmbH, Germany
<i>Kühlschränke</i>	Titramax 1000 Platform Shaker	Heidolph, Germany
	FKS5000 Index 10c	Liebherr, Germany
	GS5203 Index 22/001 Tiefkühlschrank	Liebherr, Germany
<i>Mikrotiterplatten</i>	96-well F-Boden MaxiSorp	Nunc (Roskilde, DK)
<i>Mikroskop</i>	LSM 780	Carl Zeiss GmbH
<i>PCR-Gerät</i>	PCR Thermocycler	SensoQuest GmbH, Germany
<i>qPCR-Gerät</i>	QuantStudio 6 Flex system	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific
<i>Reinstwasseranlage</i>	Millipore	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
<i>SDS-PAGE</i>	Mini-Protean® Tetra system	Bio-Rad laboratories, USA
<i>Sicherheitswerkbank</i>	Herasafe™ KS 15 biological safety cabinet class II	Thermo Fisher Scientific, USA
<i>pH-Messgerät</i>	SenTix® 80 Cond 720 Set	WTW Inolab, Germany
<i>Plattenlesegerät</i>	M200 infinite pro	Tecan
<i>Protein-Quantifizierung</i>	Spectronic Genesys™ 10 Bio Spectrophotometer	ThermoFisher Scientific, USA
	<i>Waagen</i>	BP 301 S
<i>Zentrifugen</i>	KB 2400-2N	KERN & Sohn GmbH, Germany
	Avanti J-26 XP	Beckman Coulter, Germany
	Biofuge Fresco Heraeus Centrifuge	Thermo Electron LED GmbH, Germany
	Varifuge 3.0R	Thermo Electron LED GmbH, Germany
	Sorvall® Evolution™ RC Centrifuge	Thermo Electron LED GmbH, Germany
	Fresco 21 Refrigerated Micro Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, USA
	<i>sonstige</i>	2 mL- Reaktionsgefäße
1,5 mL Reaktionsgefäße		Eppendorf AG, Germany
JS-5.3 Rotor		Beckman Coulter, USA
HydroFLEX™ Microplatten Washer		Tecan, Switzerland
Consort EV 2310 Power Supply		Consort BVBA, Belgium
Eppendorf 5301 Concentrator		Eppendorf AG, Germany
Eppendorf 5436 Thermoblock		Eppendorf AG, Germany
Vortex-Genie2		Scientific Ind. Inc., USA
Gyro-rocker SSL3		Stuart™ Equipment, Germany
Titramax 1000 Platform Shaker		Heidolph, Germany
Mini Trans-Blot Cell		Bio-Rad laboratories, USA

2.14 Software

Die für diese Arbeit verwendeten Computerprogramme sind in *Tabelle 13* zusammengefasst.

Tabelle 13: Verwendete Programme.

Programm	Anwendung	Hersteller
Fiji ImageJ	Bildanalyse	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Pymol	Visualisierung von Protein 3D Strukturen	DeLano Scientific LLC, Schrödinger
UCSF Chimera	Visualisierung von Protein 3D Strukturen	University of California
Tecan i-control	Einlesen und Auswerten von ELISA Daten	Tecan
Zen	Erstellen und Bearbeiten von Mikroskopiebildern	Carl Zeiss
Lasergene	Klonierungsplanung	DNASTAR

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Anzucht und Kultivierung von *Escherichia coli*

Ausgehend von Einzelklonen- oder Kryokulturen erfolgte die Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) in LB-Medium unter Zugabe entsprechender Antibiotika (Tabelle 10) bei 37 °C im Schüttelinkubator. Die Kultivierung von 3-5 mL Bakteriensuspension erfolgte in 15 mL Zellkulturröhrchen bei 37 °C und 220 rpm (Multitron Shaker Incubator, Infors HAT, Switzerland), die Kultivierung in 12-*well*-Mikrotiterplatten erfolgte mit 1 ml Medium pro *well* bei 450 rpm (Titramax 1000 Platform Shaker, Heidolph, Germany). Die kurzfristige Stammhaltung von *E. coli* bis zu vier Wochen erfolgte über Ausstriche auf Agarplatten (Lagerung bei 4 °C). Eine langfristige Lagerung erfolgte in Form von Kryokulturen. Für diese wurden Übernachtskulturen (37 °C, 220 rpm in LB-Medium) mit Glycerin mit einer finalen Konzentration von 30 % (v/v) versetzt. Die Kulturen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.2 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

Analog zur Kultivierung von *E. coli* erfolgte die Kultivierung von *A. tumefaciens* ausgehend von Einzelklonen- oder Kryokulturen unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika: Rifampicin (chromosomale DNA), Kanamycin (bakterielles plasmidspezifisches Selektionsantibiotikum), Carbenicillin (Ti-Plasmid). Für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer und transiente Transformation von Tabakpflanzen wurde der *A. tumefaciens* Stamm C58C1 (pVG2260, (123)) verwendet. Flüssigkulturen erfolgten im Schüttelkolben mit YEB Medium für 24-28h bei 28°C und 140 rpm (Kulturschüttler Mutlitron, INFORS AG, Bottmingen, BRD). Aliquote für eine längere Aufbewahrung (Kryokonservierung) wurden mit 7% (v/v) DMSO versetzt, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C eingelagert.

3.1.3 Transformation von *E. coli*

Die Transformation elektrokompenter *E. coli* XL1-blue Zellen erfolgte mittels Elektroporation (124). Für die Herstellung der elektrokompenten Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml Bakterienkultur beimpft und bei 37°C und 140 rpm bis zum Erreichen einer OD600 von 0,5 - 0,8 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1750 x g; 15 min; 4°C), mehrmals in sterilem, entionisierten H₂O (4°C) gewaschen, in 10% (v/v) Glycerin aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C bis zur

Verwendung gelagert. Für die Transformation wurde ein Aliquot der elektrokompetenten Zellen mit 300 ng Plasmid-DNA versetzt, in eine Küvette (Gene Pulser® Cuvette, 0,2 cm, BIO-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) überführt und ein elektrischer Puls ausgelöst (25 μ F; 2,5 kV und 200 Ohm; Gene Pulser®, BIO-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Der Transformationsansatz wurde in 1 ml SOC-Medium für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Mengen der Bakterienlösung auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum verteilt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Identifizierung von Klonen die das Ziel Plasmid enthalten erfolgte mittels Kolonie-PCR und der Restriktionsspaltung isolierter DNA von Kandidatenkolonien.

3.1.4 Transformation von *A. tumefaciens*

Für die Transformation von *A. tumefaciens* wurden nach dem bereits für *E. coli* beschriebenen Protokoll elektrokompetente Zellen hergestellt. Abweichungen traten im Hinblick auf die Inkubationstemperatur (28°C) und das Nährmedium (YEB-Medium, vgl. II.1.2) auf. Die Transformation der Zellen erfolgte ebenfalls durch Elektroporation von Plasmid-DNA (125) bei 2,5 kV und 200 Ohm (Gene Pulser®, BIO-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Der Transformationsansatz wurde mit 1 ml SOC-Medium versetzt, 1 h bei 28°C inkubiert, anschließend Aliquote auf Nährplatten mit Selektionsantibiotika verteilt und für zwei Tage bei 28°C kultiviert. Die Identifizierung von Klonen mit dem gewünschten binären Vektor erfolgte nach Restriktionsspaltung der isolierten Plasmid-DNA.

3.1.5 Stabile Transformation von *Nicotiana tabacum*

Die Herstellung von transgenen Tabakpflanzen erfolgte wie bereits durch Horsch *et al.* beschrieben (126). Blattscheiben steriler Tabakpflanzen wurden für 1 h in einem Gemisch aus MS-Medium und *A. tumefaciens* Flüssigkultur inkubiert (50 ml SOC-Medium mit den entsprechenden Selektionsantibiotika). Anschließend wurde das Blattmaterial mit den Bakterien auf MS-Platten im Dunkeln für 48 h bei 21°C kultiviert. Die Blattscheiben wurden danach auf MG-Platten mit dem Selektionsantibiotikum Kanamycin und den Wuchsstoffen BAP und NES überführt. Zur Abtötung der Agrobakterien erfolgte die Zugabe von Cefotaxim zum Nährmedium. Nach Bildung erster Sprosse wurden diese zur Bewurzelung auf MS-Medium mit Selektionsantibiotikum, Cefotaxim und den beiden bereits erwähnten Wuchsstoffen gegeben. Die Erneuerung der Nährböden für die Regeneration transgener Pflanzen

erfolgte alle sieben bis zehn Tage. Nach Bewurzelung wurden die erzeugten Primärtransformanten (T0-Pflanzen) durch Western Blot auf Transgenexpression analysiert und bis zur Samenbildung und -reife im Gewächshaus kultiviert. Kanamycinresistente T0-Pflanzen wurden nach Bildung der Wurzeln in Erde überführt.

3.1.6 Phagen-Display

Die Immunselektion von scFvs auf Basis der Tomlinson A+B Phagenbank, wurde wie von Gahrtz und Conrad 2009 beschrieben (127) durchgeführt. In Vorbereitung wurden Phagentiter der Phagenbänke (Tomlinson A+B bzw. anti-TNF alpha Nanobody Bibliothek) bestimmt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Phagentiter der eingesetzten Bibliotheken. Vor Selektionsbeginn wurden die Phagentiter der eingesetzten Phagenbänke bestimmt.

<i>Scaffold</i>	Bezeichnung	cfu / mL
scFv	Tomlinson A	1×10^{13}
	Tomlinson B	$1,3 \times 10^{13}$
<i>anti-TNFα Nanobody Library</i>	TLL	3×10^{12}
	GLL	1×10^{13}
	SLL	3×10^{12}
Helferphagen	M13KO7	4×10^{12}

Das *Biopanning* erfolgte für über 3 Runden in 96 Well Platten (Nunc Maxisorp). Vor jeder Runde wurden 6 Wells mit Antigen beschichtet und über Nacht bei RT inkubiert. Für die Selektion gegen das gereinigte Protein wurden 100 ng PbBSMT1/Well eingesetzt. Die Lösung wurde anschließend verworfen und die entsprechenden Wells mit jeweils 200 μ L einer 2 % BSA/Phagen-PBS Lösung beladen. Während der 2h Inkubation bei RT werden freie Bindestellen blockiert und anschließen 3 Mal mit Phagen-PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden ca. 10^{12} Phagen Partikel jeder Bibliothek in 2 % BSA überführt und auf die Antigen-beschichtete 96-Well Platte gegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei RT für 30 min unter kontinuierlichem Schütteln (750 rpm, Titramax 1000 Plattform Shaker) und einer 60 min Inkubation ohne Schütteln. Unspezifische Binder wurden durch 20-maliges Waschen mit Phagen-PBS entfernt. Alle gebundenen Phagen wurden anschließend mit 90 μ L 100 mM TEA eluiert. Die eluierten Phagen wurden durch Zugabe von 1 M Tris pH 7,4 neutralisiert und zur Infektion von TG1 Zellen verwendet. Für die Bestimmung des Phagentiters wurden verschieden Verdünnungen der Kulturen auf TYE-Festmedium (Carbenicillin und 1% Glukose) ausplattiert. Der Rest der Kultur wurde auf 500 cm^2 Kulturplatten ausgestrichen und gemeinsam mit den Verdünnungsausstrichen über Nacht bei 37°C

inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit 8 mL YT-Medium / 15 % Glycerin abgelöst und 5 μ L davon verwendet um eine 20 mL Schüttelkultur (2xYT / Carbenicillin und 1 % Glukose) zu inokulieren. Das restliche Volumen wurde bei -80°C eingelagert. Die Schüttelkultur wurde bei 180 rpm und 37°C solange inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,7 erreicht wurde. 10 mL dieser Kultur wurden mit 5×10^{10} M13KO7 Helferphagen beimpft und für 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die co-infizierten TG1-Zellen bei $3300 \times g$ für 10 min bei 4°C abzentrifugiert (Variofuge 3.0R) und das sedimentierte Material in 50 mL 2xTY / Carbenicillin / Kanamycin resuspendiert und über Nacht bei 30°C und 160 rpm schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde am nächsten Tag zentrifugiert und der Überstand (Phagen) in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Phagen wurden mit PEG-NaCl versetzt und für 1 h auf Eis inkubiert, wodurch die Phagen ausfallen. Nach Zentrifugation bei 30 min / $3300 \times g$ wurde das Phagenpellet in 1 mL Phagen-PBS resuspendiert und nochmals bei $11600 \times g$ / 10 min / 4°C abzentrifugiert. Der Überstand ist die Phagensuspension die für die nächste Selektionsrunde verwendet wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei aufeinanderfolgende Selektionsrunden durchgeführt um PbBSMT1-Binder anzureichern. Im Anschluss an die dritte Runde wurden Einzelklone von den Verdünnungsaustriichen aufgenommen und für 1-2 h bei 37°C in einer 96-Well-Zellkulturplatte (Greiner Bio-One) in jeweils 100 μ L 2xTY / Carbenicillin / 1 % Glukose pro Well inkubiert. Ausgehend von dieser Platte wurden 2,5 μ L eines jeden Wells in eine neue 96 Well Platte mit 200 μ L 2xYT / Carbenicillin / 1 % Glukose überführt und mit 10^9 Helferphagen infiziert. Diese Platte wurde für 30 min in Ruhe inkubiert und anschließend für 1 h schüttelnd bei 300 rpm inkubiert. Die infizierten TG1 Zellen wurden anschließend in einer Zentrifuge mit Plattenaufnahme und Freischwingrotor (Avanti J-26 XP) bei $1800 \times g$ und 10 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 200 μ L 2xTY / Carbenicillin / Kanamycin resuspendiert und über Nacht bei 30°C schüttelnd (300 rpm) inkubiert. Am Folgetag wurden die Platten wie bereits beschrieben zentrifugiert und 10 μ L der Überstände verwendet um jeweils 200 μ L des HB2151 *E.coli* Stammes zu infizieren. Dafür wurde eine separat vorbereitete Masterplatte verwendet, die im Vorfeld mit der HB2151 Kultur beladen wurde. Die Kulturplatte wurde für 30 min in Ruhe und bei 37°C inkubiert und anschließend 2 μ L eines jeden Wells auf eine vorbereitete 96-Well Platte mit jeweils 175 μ L 2xYT / Carbenicillin / 0,1 % Glukose überführt. Nachdem die Kulturen eine OD_{600} von 0,9 erreicht haben, wurden den einzelnen Vertiefungen IPTG zu einer finalen Konzentration

von 1 mM zugegeben. Die dadurch induzierte Proteinexpression der scFvs/Nanobodies erfolgte über Nacht bei 30°C und 300 rpm. Am nächsten Tag wurden die Expressionskulturen abzentrifugiert (1800 x g für 20 min und 4°C) und die Überstände im ELISA (siehe 3.4.6) eingesetzt. Für Folgeexperimente wurde sowohl von den HB2151-Expressionskulturen als auch von den TG1-Kulturen Glycerinstocks vorbereitet. Dazu wurde in die einzelnen Wells Glycerin zu einer finalen Konzentration von 15% zugegeben und die 96-Well bei -80°C eingelagert.

Phagen-Display mit Hilfe eines Peptidarrays

Das initiale Phagen-Display weicht materialbedingt von dem klassischen Versuchsablauf mit isolierten Antigenen ab: Eine Peptidarray-Papiermembran wurde in PBS-T und anschließend PBS eingeweicht und über Nacht in 5% Trockenmilch in PBS in einem 5ml-Gefäß inkubiert. 5×10^{13} Phagen der Tomlinson-Libraries A + B (humane scFv; 1350µl) wurden mit 3650ml 5% Trockenmilch in PBS gemischt und die Peptidarray-Membran 1h „end-over-end“ damit inkubiert. Anschließend wurde 3x mit 0,5% Trockenmilch in PBS und 1x mit PBS gewaschen. Danach wurden die gebundenen Phagen 10 min mit Triethylaminpuffer (1ml in 2 ml-Gefäß) eluiert, der Peptidarray entfernt und die Elutionslösung (1ml) mit 0,5ml 1M Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 neutralisiert. Der Phagentiter wurde bestimmt und die Phagen für die nächste Runde wurden produziert. Für weitere 3 Runden Phagen-Display wurden für die Selektion an den Peptidarraypapiermembranen jeweils 800µl Phagenlysat + 1200µl 5% Trockenmilch in PBS eingesetzt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation, Identifikation und Modifikation von Genabschnitten wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt (128). Dabei wurden *Taq*- und Phusion- DNA-Polymerasen entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die genauen Reaktionsbedingungen variierten in Abhängigkeit von der verwendeten Kombination aus *template*-DNA, Primern und Polymerase. Die Hybridisierungstemperatur wurde entsprechend der verwendeten Primer gewählt. Die Dauer der DNA-Amplifikation wurde in Abhängigkeit der verwendeten Polymerase und der Länge des DNA-Fragmentes bestimmt (Tag: 1 min/kbp, Phusion: 15-30 s/kbp).

Tabelle 15: Beispielreaktionsansatz und Standardreaktionsbedingungen für Polymerasekettenreaktion.

Reagenz	Pro 25 μ L Ansatz	Schritt	Zeit [s]	Temperatur [$^{\circ}$ C]
		Initiale		
Template DNA	1-50 ng	Denaturierung	120	95-95
Primer 1	10 pmol	Denaturierung	30	95-98
Primer 2	10 pmol	Hybridisierung	30	49-69
2x Polymerase MM	12,5 μ L	Amplifikation	30-45	72
		Finale		
ddH ₂ O	Differenzvolumen	Amplifikation	600	72

3.2.2 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese einzelner Basen erfolgte nach Bedarf. Spontane Amber-Stop Mutationen kamen während des Phagen-Displays vor, da ein *Amber-Suppressor* Stamm für diese Arbeiten verwendet wurde. Dieser Stamm überliest das UAG Stopcodon und setzt eine tRNA mit CAG Glutamin ein. Für die Expression der scFv- oder Nanobody-Varianten außerhalb des Amber Suppressorstammes, musste eine entsprechende Mutagenese-PCR durchgeführt werden, um ein vorzeitiges Aussetzen der Translation zu vermeiden. Auf Basis von Sequenzanalysen wurden die betroffenen Sequenzbereiche identifiziert und Primerpaare von ca. 20 bp Länge entworfen, welche die zu verändernde Base mit jeweils 10 bp flankieren (Tabelle 2). Anstelle des Uracils wurde ein Cytosin eingesetzt (UAG \rightarrow CAG) wodurch während der Amplifizierung der Fragmente die gewünschte Base eingesetzt wird. Die entstehenden Fragmente wurden mittels Assembly-PCR und unter Verwendung einer Proof-Reading Polymerase zu vollständigen scFv-Sequenzen amplifiziert, durch Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Reinigung des präparierten Fragmentes (Machery-NagelTM, NucleoSpinTM Gel and PCR Clean-up Kit) und über Restriktion/Ligation anhand von *NcoI/NotI*-Restriktions-Sequenzen in den pET22b(+)-c-Myc Vektor eingesetzt. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung (Methoden: 3.2.9) überprüft.

3.2.3 qPCR

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des Kits „*Quiagen RNeasy plant mini kit*“ entsprechend der Herstellerangaben (Quiagen) und Blattmaterial junger Pflanzen. Gesamt-RNA wurde photometrisch quantifiziert und Kontaminationen mit DNA durch den Einsatz von „*Turbo DNA free*“ (ThermoFisher Scientific) beseitigt. Die reverse Transkription der mRNA erfolgte mit Hilfe des „*first strand cDNA synthesis*“

kit“ (ThermoFischer Scientific), oligo (dT) 18 primer und 2 µg der pflanzlichen RNA als Ausgangsmaterial.

Um auf bestimmte Transkriptmengen schließen zu können wurde die synthetisierte cDNA für eine qPCR (*quantitative real time PCR*) verwendet. Pro Reaktionsvolumen (10 µL) wurde eine cDNA-äquivalente Masse von 40 ng gesamt RNA eingesetzt.

Das EYFP–CENH3 Transkript wurde anhand der EYFP-spezifischen Primer (Tabelle 2) und dem POWER SYBR Green Master Mix amplifiziert. EF-1alpha spezifische Primer wurden zur Amplifikation eines internen Kontrollgens verwendet. Die PCR Bedingungen beinhalteten 10 min Polymerase Aktivierung bei 95°C und 40 Zyklen bei 95°C für 3 s und 60°C für 30 s. Für jeden Genotyp wurden jeweils drei biologische Replikate getestet. Jedes biologische Replikat wurde in drei technischen Replikaten eingesetzt, die alle während desselben Durchlaufs analysiert wurden. Die relative Genexpression wurde anhand eines Vergleichsmodells und der Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ (129) berechnet, wobei die Genexpression des Zielgens in Relation zu der Expression des *Houskeeping*-Gens EF-1alpha gesetzt wurde. Die Signalerfassung erfolgte mittels QuantStudio 6 Flex System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2.4 Enzymatische Spaltung und Dephosphorylierung von DNA

Restriktionsenzyme und die zur Reaktion benötigten Puffer wurden von Thermo Fischer Scientific bezogen. Die Reaktionen wurden stets nach Herstellerangaben durchgeführt. Die eingesetzten Enzymmengen wurden entsprechend der eingesetzten DNA-Menge gewählt und die Reaktionszeiten entsprechend der verwendeten Enzyme eingestellt. Nach beendeter Reaktion erfolgte eine thermische Inaktivierung in Abhängigkeit der verwendeten Enzyme über 20 min bei 65°C oder über 10 min bei 80°C. Die Isolation der gewünschten Fragmente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. 3.2.6) und anschließender Gelextraktion (3.2.7). Durch die Spaltung entstandenen Phosphatreste an den 5'-Enden der DNA-Fragmente wurden nach der Linearisierung des Plasmids durch Dephosphorylierung abgetrennt. Dies hat zur Folge, dass die gespaltenen Plasmide nicht spontan religieren wodurch sich Leervektoren anreichern könnten. Diese Reaktion wurde durch die direkte Zugabe von alkaliner Phosphatase (1U/µL) (Thermo Fischer Scientific) in den Restriktionsansatz initiiert (1µL/ 20µL Reaktionsvolumen).

3.2.5 Ligation von DNA

DNA-Fragmente wurden mit T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers zusammengefügt. Das molare Verhältnis von Vektor-DNA zu *insert*-DNA betrug in der Regel 1:5 und wurde je nach Transformationserfolg auf Verhältnisse von 1:3 bis 1:7 variiert. Die Ligationsreaktion erfolgte über 60 min bei 21°C. Die Ligationsprodukte wurden anschließend 2 h gegen H₂O dialysiert (Membranfilter 0,025 µm, „V“ Serie, Ø 25 mm, Millipore, Billerica, MA, USA) und für die Transformation von *E. coli* oder *A. tumefaciens* (vgl. 3.1.3 und 3.1.4) verwendet.

3.2.6 Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten zu analytischen und präparativen Zwecken wurde die Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Alle DNA-Gemische wurden vor der elektrophoretischen Trennung mit ¼ ihres Volumens 6x *Loading Dye* (Thermo Scientific™) versetzt. Fragmente ≤ 400 bp wurden mit 2%igen (w/v) Agarosegelen aufgetrennt, größere Fragmente mit 0,8 – 1%igen Gelen. Die Herstellung der Gele erfolgte stets in dem verwendeten Laufpuffer (TAE Puffer). Die elektrophoretische Trennung erfolgte in horizontalen Gelen mit einer Spannung von 15 V/cm für 20-30 Minuten für analytische Zwecke in 0,5x konzentriertem Laufpuffer. Für präparative Anwendungen erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in 1x Puffer bei 5-6 V/cm über 1-2 Stunden. Ein Anfärben von DNA-Fragmenten erfolgte durch den interkalierenden Farbstoff *DNA stain Clear G* (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany), der dem abgekühlten Gel (ca. 50°C) entsprechend der Herstellerangaben, hinzugefügt wurde. Die Visualisierung zu Dokumentationszwecken wurde am UV-Transilluminator (Gel Jet Imager, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) durchgeführt.

3.2.7 DNA-Isolierung

Plasmid DNA aus Bakterienkulturen für analytische Zwecke fand im kleinen Maßstab („mini-prep“) statt. Dazu wurden ca. 3 mL LB-Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei 6000 x g und Raumtemperatur sedimentiert. Die weitere Plasmidisolierung erfolgte anhand des GenUP™ Plasmid Kit (biotechrabbit GmbH, Berlin) und entsprechend der Herstellerangaben. Eine präparative Isolation von Plasmid DNA erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid Kit (QIAGEN, Hilden) unter Verwendung von 70 mL Flüssigkultur, ebenfalls entsprechend den Herstellerangaben.

Genomische DNA aus Pflanzenmaterial wurde durch Phenol-Chloroform Extraktion isoliert und hauptsächlich für Sequenzanalysen verwendet. Dazu wurden pro Pflanze zwei Blattscheiben von 0,8 cm Durchmesser (entspricht ca. 200-400 mg Frischgewicht) aus jungen Blättern herausgestanzt und zusammen mit zwei Metallkügelchen in ein 2 mL Safelock® Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) platziert. Die Gefäße wurden in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und mit Hilfe der Schwingmühle MM400 (Retsch, Haan) homogenisiert. Das Material wurde mit 800 µL Extraktionspuffer (Tabelle 7) versetzt und mittel Vortexmischer (Genie™) in eine gleichmäßige Suspension gebracht. Nach Zugabe von 800 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 wurde erneut gründlich gemischt. Anschließend wurde das Gemisch bei RT mit 10 000 x g für 5 min zentrifugiert, 700 µL der oberen Phase in ein frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 70 µL einer 3M Natriumacetat (pH 5,2) sowie 700 µL Isopropanol zugegeben. Das Gemisch wurde bei RT und 10 000 x g für weitere 20 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das sedimentierte Material enthält die extrahierte DNA und wurde mit 800 µL 70% Ethanol (eiskalt) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in DNase-freiem Wasser aufgenommen. Zusätzlich wurden 3 µL RNase A zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert, um mögliche RNA Kontaminationen zu minimieren.

3.2.8 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Eine Quantifizierung von Nukleinsäuren bei bis zu fünf Proben erfolgte mittels Nanodrop ND-1000 (ThermoFischer Scientific). Eine größere Anzahl von Proben wurde mit Hilfe der NanoQuant Plate™ und dem Plattenlesegerät Infinite® M200 Pro (Tecan) gemessen. Beide Geräte und Zubehörteile wurden entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt. Als Referenz dienten der Puffer bzw. das Lösungsmittel, in dem die Nukleinsäuren gelöst wurden.

3.2.9 Sequenzierung von DNA

Der Klonierungserfolg wurde neben Kontroll-PCRs und Restriktion über die Sequenzierung des entsprechenden Genabschnittes überprüft. Zu diesem Zweck wurde DNA isoliert, entsprechend der Vorgaben Sequenzierungsfirma verdünnt (Methoden 3.2.7) und bei Eurofins Genomics eingeschendet. Die Auswertung der Sequenzinformation erfolgte online über <https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/> oder über MegAlign (DNA Star Lasergene®).

3.3. Klonierungen

Klonierungsreaktionen zur Herstellung bestimmter DNA-Konstrukte, Expressionskassetten oder Plasmide wurden anhand von Sequenzinformationen und der Software Lasergene® (DNASTAR) geplant. Die Plasmide für die EYFP-CENH3 und die SAP11-GFP5 Expression wurden von Inna Lermontova (IPK Gatersleben) bzw. Alisa Stohmayer (RLP AgroScience GmbH) bereitgestellt.

3.3.1 Klonierung von VHHGFP4-SPOP Konstrukten

Als Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit verwendete VHHGFP4-SPOP-Expressionskassette dienten Sequenzinformationen die freundlicher Weise von Ju Shin (Kangwon National University, Republic of Korea) zur Verfügung gestellt wurden. Geplant wurde ein Konstrukt, das einen beliebigen Austausch der Nanobodysequenz zulässt und sowohl die Expression in Bakterien als auch in Pflanzen ermöglicht. Dazu wurde die SPOP Sequenz so gewählt, dass sie am 5'-Ende eine *NcoI*- sowie eine *NotI*- und am 3'-Ende eine *BspI20I*- und eine *XhoI*-Erkennungssequenz enthält (Abbildung siehe Anhang). Die Sequenz wurde synthetisiert (GeneCust) und im pUC57 Standardvektor (GenBank: Y 14837.1) ausgeliefert.

Eine Klonierung in den pET22b(+) Vektor für bakterielle Expression erfolgte über die *NcoI* und *XhoI*-Schnittstellen. Die resultierende Expressionskassette erlaubt den beliebigen Austausch einer Sequenz am 5'-Ende mit kompatiblen Überhängen.

Für die Expression in Pflanzen wurde ein pRTRA Vektor als Zwischenvektor verwendet. Dabei wurde der Vektor durch die Restriktionsenzyme *NcoI* und *NotI* und das Fragment mit *NcoI* und *BspI20I* restringiert. Die Ligation beider Fragmente führt zur Maskierung der *NotI* Sequenz am 3'-Ende des Inserts. Da das Fragment nicht über *NotI*, sondern *BspI20I* restringiert wurde, enthält die fertige Expressionskassette eine *NcoI/NotI* Klonierungsstelle am 5'-Ende der SPOP Sequenz und erlaubt dadurch eine flexible Gestaltung der N-terminalen Proteinsequenz.

3.3.2 Klonierung von Nanobody- oder scFv-Sequenzen selektierter Phagen

Ausgewählte Nanobody- und scFv-Varianten wurden nach ihrer Selektion über kompatible Überhänge (*NcoI/NotI*) in das Expressionsplasmid pET22b(+)-c-Myc kloniert (Abbildung A 7). Der Ausgangsvektor der Tomlinson A+B Phagenbank (scFv-Selektion) ist pIT1. Ausgangsvektor der Nanobody Phagenbank ist pIT2. In beiden

Phagemidvektoren wird die scFv- bzw. Nanobody-Sequenz von *NcoI/NotI* Restriktionserkennungssequenzen flankiert (Abbildung siehe Anhang).

3.4. Proteinchemische und Analytische Methoden

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt (130). Das Verfahren beruht auf der unterschiedlichen, größenabhängigen Migrationsgeschwindigkeit von einheitlich geladenen Molekülen im elektrischen Feld (131). Ein einheitlicher Ladungszustand wird durch die Aufarbeitung mit 2x SDS-Probenpuffer gewährleistet. Die Proben wurden über 5 min bei 50 °C und anschließend 10 min bei 95 °C denaturiert, 10 min bei RT und 21 000 x g zentrifugiert und der Überstand direkt für die Elektrophorese eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein diskontinuierliches Gelsystem mit unterschiedlichen Puffern für Sammel- und Laufgel eingesetzt. Zur Identifikation und Charakterisierung von Proteinen aus bakterieller Überexpression wurden Trenngele mit 10 % Polyacrylamid verwendet. Die Analyse von Proteinen aus Pflanzenextrakten erfolgte anhand von Gradientengelen (7-15%). Um eine Vergleichbarkeit der Signalintensitäten zu gewährleisten, wurden einheitliche Proteinmengen (1-20 µg) auf einem Gel aufgetragen. Für Anwendungen in denen die Proteinkonzentration über den Standard-Bradford Assay nicht ermittelbar waren, wurden einheitlich 40 µL pro Geltasche eingesetzt. Eine Verdünnung der Proben erfolgte mit 2x SDS Probenpuffer. Die elektrophysikalische Auftrennung erfolgte bei 100 V konstanter Spannung im Bio-Rad Mini-Protean® Tetra System unter Verwendung des Laufpuffers (Tabelle 7). Die Laufzeit hängt vom verwendeten Gel ab und betrug zwischen 2 und 3 Stunden. Zur unspezifischen Visualisierung der Proteine wurden die Gele über Nacht mit Quick Coomassie® Stain (Serva) inkubiert. Die Dokumentation erfolgte durch Scannen (CanoScan LiDE210, Canon).

3.4.2 Western Blot

Ein spezifischer Nachweis von Proteinen erfolgte mittels Western Blot. Dazu wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine von den SDS-Gelen auf eine Nitrozellulose-Membran (Protean 0,45 µm NC), in Transferpuffer bei konstanter Spannung von 18V, transferiert (Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell). Anschließend wurden freie Bindestellen auf der Membran durch Inkubation (2h) mit 5% (w/v) Trockenmilch/Marvel-Puffer (MM) abgesättigt. Für den Nachweis von c-Myc-

Affinitäts-*tags* wurde der anti-c-Myc-Antikörper (*Tabelle 8*) 1:100 in 5 % MM verdünnt und zusammen mit der Membran für 2h inkubiert. Anschließend wurde die Membran drei Mal für jeweils 5 min mit 0,5 % MM gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (ECL anti-mouse IgG, *horseradish peroxidase-linked whole antibody*) in einer 1:2000 Verdünnung inkubiert. Die Detektion von GFP erfolgte über einen polyklonalen anti-EGFP-Antikörper aus immunisierten Kaninchen (eigene Produktion, IPK Gatersleben) in einer Verdünnung von 1: 10 000, ebenfalls in 5 % MM. Als Sekundärantikörper wurde anti-Rabbit-Antikörper (anti-Rabbit IgG (H+L) *secondary antibody*, HRP Thermofischer Scientific), in einer 1:2000 Verdünnung eingesetzt. Danach wurde die Membran drei weitere Male mit 0,5 % MM, einmal mit Marvelpuffer und anschließend mit PBS, jeweils 5 min, gewaschen. Alle Wasch- und Inkubationsschritte fanden bei leichter Bewegung auf dem Rotationsmischer (SSL3 gyro-rocker) statt. Vor der Detektion wurden die Membranen mit jeweils 2 mL ECL-Reagenz (GE Healthcare) benetzt, blasenfrei in einer Lage Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Filmkassette mit einem Röntgenfilm (Fujifilm) gelegt. Durch die enzymatische Substratreaktion der Antikörper-konjugierten HRP entsteht eine Chemilumineszenz die zu einer Schwarzfärbung des Röntgenfilms führt. Die Schritte der Filmentwicklung fanden in einer Dunkelkammer statt. Die getrockneten Filme wurden im Scanner (CanoScan LiDE210, Canon) dokumentiert.

3.4.3 Quantifizierung von Proteinen

Die Gesamtproteinkonzentration von Extrakten sowie Reinigungs- und Elutionsfraktionen wurde durch Bradford Assay (*132*) bestimmt. Die Messung findet in Einweg-Kunststoffküvetten statt, mit 1 mL einer 1x Bradfordlösung und 1-5 μ L Proteinlösung. Nach guter Durchmischung folgte 5 min Inkubation und anschließende Messung der Absorption bei 595 nm im Küvetten-Spektrophotometer (Spectronic Genesys 10 Bio Spektrophotometer). Die Konzentration wurde relativ zu einer Eichgeraden (Anhang) berechnet, die anhand einer BSA-Verdünnungsreihe erstellt wurde. Dabei wurden die Absorptionswerte auf der y-Achse und die Konzentrationswerte auf der X-Achse eingetragen und eine Lineare Gleichung aus der Geraden abgeleitet. Die resultierende Gleichung ($y = 0,0534x + 0,0026$) mit einem R-Wert von $R^2 = 0,9973$ erlaubt durch Umstellung der Gleichung nach x die Berechnung von Proteinkonzentrationen: $x = \frac{y-0,0026}{0,0534}$.

3.4.4 Konzentration und Umpuffern von Proteinlösungen

Proteinlösungen deren Konzentration nicht dem vorgesehenen Zweck entsprechen wurden verdünnt oder angereichert. Die Anreicherung erfolgte für kleinere Volumina (≤ 3 mL) anhand von Zentrifugal-Konzentratoren (Corning® Spin-X® UF 500 μ L Centrifugal Concentrator, 5000 MWCO). Das Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen bis zu 2,5 mL erfolgte in PD-10 Entsalzungssäulen (GE Healthcare) entsprechen der Herstellerangaben. Größere Volumina ($\geq 2,5$ mL) wurden durch Dialyse gegen das entsprechende Puffersystem umpuffert. Dabei wurden Dialyseschläuche mit einem *molecular weight cut off* (mwco) von 6-8 kDa verwendet. Die Zellulosemembranen wurden nach Herstellerangaben vorbehandelt, die zu dialysierende Proteinlösung blasenfrei eingefüllt und bei leichtem rühren in 2 L Puffer inkubiert. Ein Pufferwechsel wurde nach 2, 4 und 8h durchgeführt, wobei der letzte Puffer über Nacht inkubiert. Bei Volumenzunahme durch den Ionenaustausch wurde die Flüssigkeit mit PEG bei 4°C reduziert.

3.4.5 Reinigung von Proteinen

3.4.5.1. Herstellung von Expressionskulturen und Bakterienlyse

Standardprotokoll für Lysate aus Schüttelkulturen

Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Proteine wurden entweder durch eine Kombination aus enzymatischer (Lysozym) und physikalischer (Ultraschall) Lyse oder durch osmotische Lyse periplasmatischer Extrakte freigesetzt. In beiden Fällen wurde ein Vereinzelausstrich der Expressionsklone angefertigt, der über Nacht bei 37°C auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum gewachsen ist. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine Einzelkolonie aufgenommen und 10 mL LB-Medium inokuliert, das über Nacht schüttelnd bei 37°C kultiviert wurde. Am Folgetag wurden 500 μ L dieser Kultur verwendet um 500 mL frisches LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum zu versetzen. Die Kultivierung dieser Bakteriensuspension erfolgte im Erlenmeyer-Kolben (5-10-faches Kulturvolumen) bei 37°C im Schüttelinkubator (150 rpm) und bis zu einer $OD_{600}=0,6$. Die Expression der Zielproteine wurde durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) zu einer finalen Konzentration von 1 mM induziert und erfolgte bei 30°C über Nacht im Schüttelinkubator. Die Zellen wurden anschließend für 15 min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert und das Medium verworfen. Für eine Isolation von Proteinen aus sedimentiertem Zellmaterial wurden die Frischgewichte des Zellpellets bestimmt und in

5 mL/g Lysepuffer (NPI20: 20 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,6) resuspendiert. Zur Suspension wurden anschließend 50 U Benzonase (Merck) 20 mM MgSO₄ und 200 µg/µL Lysozym zugegeben und 40 min auf Eis inkubiert. Im Eisbad wurden Zellmembranen anschließend mit Hilfe einer Sonotrode (Biodisruptor Sonicator, Diagenode, USA) über Ultraschallpulse aufgeschlossen (5 Zyklen aus 25 s Puls und 25 s Pause). Das Lysat wurde dann über 20 min bei 40 000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und weitere 20 min bei 50 000 x g und 4°C zentrifugiert. Diese Überstände wurden über einen Spritzenfilter mit 45µm PES-Membranfilter in ein neues Reaktionsgefäß (50 mL, Greiner) mit vorher äquilibrierter (Säulenvolumen NPI20) Nickel-Agarose (Quiagen) gefüllt und über Nacht auf einem Rotationsmischer (CMV-E79006, Benedikt Heilmann) bei 4°C inkubiert.

Anreichern von Proteinen aus dem periplasmatischen Raum

Die Aufarbeitung von periplasmatischen Extrakten zur Isolation von Proteinen erfolgte in abgewandelter Form auf Basis des Buchartikels: „*Isolation of Bacteria Envelope Proteins*“ (133). Dabei wurden die sedimentierten Zellen in 4 mL eiskaltem TES-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM Sucrose, 1 mM EDTA) resuspendiert und im Eisbad für 30 min unter sporadischem Mischen inkubiert. Die Suspension wurde im Anschluss für 30 min bei 16 000 x g und 4°C zentrifugiert und die Überstände mit den periplasmatischen Extrakten in neue Reaktionsgefäße durch einen PES-Membranfilter transferiert. Die Inkubation der Extrakte mit Nickel-Agarose erfolgte wie im oberen Absatz beschrieben.

3.4.5.2. Anreicherung durch Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatografie

Die Reinigung durch Affinitätschromatografie erfolgte durch stationäre Gravitationssäulen in der Kühlkammer bei 4°C. Nickel-Agarose/Protein- Gemische wurden auf die Säulen gegeben und für 30 min und in Ruhe inkubiert damit sich die Agarose-Matrix absetzen kann. Anschließend wird der Durchfluss aufgefangen und ein weiteres Mal über das Säulenmaterial gegeben. Unspezifisch gebundene Proteine wurden über eine zweistufige Reinigung abgelöst. Lysate wurden dabei zunächst mit 6 Säulenvolumen NPI20 und 6 Säulenvolumen NPI50 (50 mM Imidazol) gewaschen. Periplasmatische Extrakte enthalten nur knapp ein Drittel der Proteine des klassischen Lysates. Aus diesem Grund wurde die Reinigung mit 20 Säulenvolumen NPI10 (10 mM) durchgeführt. Die Elution der gereinigten Proteine erfolgte durch Zugabe von 2

Säulenvolumen NPI500 (500 mM Imidazol). Vereinigte Elutionsfraktionen wurden anschließend mittels Dialyseschläuchen (MWCO (*Molecular Weight Cut-Off*) = 5 kDa (Corning Inc., USA)) und 4 sukzessiven Pufferwechseln bei 4°C dialysiert oder anhand von PD-10 Einwegsäulen zur Entsalzung (Cytavia Lifescience, USA) umgepuffert. Dieser Schritt wurde hauptsächlich zum Entfernen der hohen Imidazolkonzentrationen und zu Gunsten einer längeren Halbwertszeit der Proteinlösung durchgeführt.

3.4.5.2.1. Anreicherung durch Protein L Magnetic Beads®

Als effiziente Variante für die Anreicherung und Reinigung von scFvs hat sich ein Reinigungssystem auf Basis von Protein L Magnetic Beads (Pierce™, Protein L Magnetic Beads) herausgestellt. Weil versuchsbedingt nur relativ geringe Lysatvolumina über diese Verfahren gereinigt werden konnten, wurden Kulturvolumen von maximal 50 mL angesetzt. Die Kulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ = 1,2 kultiviert und anschließend durch Zugabe von Imidazol (1 mM finale Konzentration) die Genexpression induziert. Diese Kulturen wurden über Nacht bei 16°C kultiviert und in Anlehnung an Aubrey et. al 2003 (134) und dem Buchartikel „*Isolation of Bacteria Envelope Proteins*“ (133) weiterverarbeitet. Dazu wurden die Kulturen bei 3500 x g und 4°C über 30 min zentrifugiert und sedimentierte Zellen in TES-Puffer solubilisiert (20 mL/L Kulturvolumen). Die Suspension wurde über 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 21 000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Die periplasmatischen Extrakte wurden gegen TBS-Puffer (20 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, pH 8.0) dialysiert und in einem 2 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) zusammen mit 50 µL Protein L Magnetic Beads 1 h bei 4°C inkubiert. Mit Hilfe eines Magneten wurden die *Magnetic Beads* am äußeren Gefäßrand fixiert und drei Waschschrte mit 1,5 mL dem TBS-Puffer durchgeführt. Die Elution der scFvs erfolgte nach dem letzten Waschschrte mit 100 µL Glycin pH 2,0, direkt gefolgt von einer Neutralisation durch 115 µL 1 M Tris-HCl pH 8,5. Die Eluate wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.4.6 ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Die Messung der Proteininteraktionen im Rahmen dieser Arbeit fand durch ELISA statt.

Standard-ELISA

Die Analyse der Interaktion zwischen gereinigten Proteinen fand nach Vorgabe eines Standard-Protokolls statt. Dafür wurden die Kavitäten einer 96-Well MaxiSorp®-Platte

(Nunc) mit jeweils 100 μL einer Proteinlösung (enthält das Antigen) zu einer Konzentration von 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ beladen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am Folgetag wurde die Lösung verworfen und freie Bindestellen mit jeweils 200 μL 3% BSA in PBS-T für 2h abgesättigt. Die verwendeten Zielproteine dieser Arbeit trugen ein c-Myc-Affinitäts-tag (EQKLISEEDL), das durch einen Maus anti-c-Myc Primärantikörper (Klon 9E10) nachgewiesen werden kann. Pro Kavität wurden 100 μL des 1:200 in 1 % BSA PBS-T verdünnten anti-c-Myc-Antikörper eingesetzt und für 1 h bei 25°C inkubiert. Anschließend erfolgten drei automatisierte Waschschriffe mit PBS-T im HydroFLEX Microplate washer (Tecan) und die Zugabe des Sekundärantikörpers. Dabei wurde ein anti-Maus-Antikörper mit konjugierter Alkalischer Phosphatase (APL) in 1:2000 Verdünnung verwendet und ebenfalls 1 h bei 25°C inkubiert. Währenddessen wurden 5 mg para-Nitrophenylphosphat (PNPP) (ThermoFisher Scientific) in Diethanolamin Substratpuffer (pH 9,8) für ca. 30 min auf einem Rotationsmischer gelöst. Nach Inkubation der ELISA-Platte und einem weiteren Waschzyklus, wurden 100 μL / Kavität des Substratpuffers zugegeben und die Platte bei 37°C inkubiert. Da das Substrat im Überschuss zugegeben wird, hängt die Umsatzrate primär von der Konzentration der ALP und damit von der Menge gebundenen Antikörpers ab. Aus diesem Grund wird die Platte alle 5 – 10 min kontrolliert und das Signal im Plattenlesegerät (TECAN M200 infinite pro) bei 405 nm ausgelesen.

Phagen-ELISA

Der Phagen-ELISA diente zur Analyse von Einzelphagen im 96-Well-Maßstab. Da die angereicherten Phagen die Antikörper (scFv oder Nanobody) als PIII-Fusionsprotein auf ihrer Oberfläche präsentieren, war es möglich die Überstände der Phagen-Präparationen direkt im EILSA zu analysieren. Dieses Format erlaubt die schnelle Beurteilung vieler Klone, ohne sie vorher in ein Expressionsplasmid zu klonieren und eine Expressionskultur anzusetzen. Dazu werden auf einer MaxiSorp® ELISA-Platte 50 ng eines Antigens über Nacht adsorbiert und am Folgetag die Lösung verworfen. Freie Bindestellen werden über 2 h bei RT mit 2% BSA in PBS-T abgesättigt. Als erster Interaktionspartner wurden 90 μL Phagenüberstände (siehe 3.1.6) aus einer Übernachtskultur verwendet und bei 25°C für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Überstände entfernt und die Platte manuell 5-mal mit PBS-T gewaschen. Im Rahmen der Nanobody Selektion wurde als Sekundärantikörper anti-M13 HRP in einer Verdünnung von 1:5000 (1 % BSA / Phagen-PBS) verwendet und 1 h bei 25°C

inkubiert. Im Phagen-ELISA der scFv-Kandidaten wurde als Sekundärantikörper Protein L konjugierte Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) 1:2000 verdünnt verwendet. Nach der Sekundärantikörper-Inkubation erfolgte ein automatisierter Waschschrift und die Detektion über eine TMB-Färbereaktion. Dafür wurden jeweils 100 μL TMB Färbelösung (1 mg TMB in 350 μL DMSO aufgefüllt mit 100 mM Natriumacetat pH6 auf ein finales Volumen von 10 mL, Zugabe 2 μL 30 % H_2O_2 kurz vor Gebrauch) pro Kavität überführt und bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich eine Blaufärbung einstellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μL 1 M H_2SO_4 pro Kavität abgestoppt, wodurch ein blauer Farbumschlag stattfindet. Die Intensität dieses Farbsignale wurde im ELISA-Plattenlesegerät durch die Differenz der Absorptionswerte bei 630 nm und 450 nm gemessen.

ELISA mit löslichen Antikörpern aus HB2151 Überständen

Dieses Experiment schließt sich dem Monoklonalen Phagen-ELISA an und erlaubt die weitere Charakterisierung ausgewählter Klone. Durch die Eigenschaft des verwendeten HB2151-Stammes, Proteine ins Medium zu sezernieren ist eine Bewertung von vielen Klonen möglich, ohne sie vorher in ein Expressionsplasmid zu klonieren.

Eine HB2151 Kultur wurde in 10 mL 2xTY-Medium angesetzt und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Übernachtskultur 1:100 mit 2xTY-Medium verdünnt und bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,4 kultiviert. Die Kultur wurde zu je 200 μL /Kavität auf ELISA-Platten verteilt und mit je 10 μL eluierter Phagen aus dem Phagen-ELISA infiziert. Diese Platten wurden für 30 min nicht-schüttelnd bei 37°C inkubiert. Aus diesen vorinkubierten Platten wurden 2 μL aus jeder Kavität entnommen und auf eine neue ELISA-Platte mit jeweils 175 μL 2xTY, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin und 0,1 % Glukose transferiert und schüttelnd bei 37°C bis $\text{OD}_{600} = 0,9$ inkubiert. Die Genexpression wurde durch die Zugabe von 9 mM IPTG in 15 μL 2xTY-Medium und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin induziert, und erfolgte über Nacht bei 30°C. Am nächsten Tag wurden die ELISA-Platten abzentrifugiert (10 min bei 1800 x g und Raumtemperatur) und 100 μL der Phagen-Überstände auf eine mit Antigen beschichtete ELISA-Platte gegeben (siehe *Standard-ELISA*). Während der folgenden 60-minütigen Inkubation bei RT interagieren selektierte Phagen unterschiedlich stark mit dem adsorbierten Antigen auf den ELISA-Platten. Nicht gebundene Phagen wurden anschließend durch 5-faches waschen mit PBS-0,1% Teen20® entfernt und verworfen.

Das c-Myc-Tag der gebundenen Phagen wurden mittels anti-c-Myc-Antikörper entsprechend der Beschreibung *Standard-ELISA* nachgewiesen.

Kompetitions-ELISA

Dieses Format wurde zur Bestimmung der Affinität löslicher Antikörpervarianten verwendet. Die angewendete Methodik und die Berechnungsgrundlage orientieren sich dabei an dem Buchartikel von P. Martineau (135). In einem Vorexperiment wurde das optimale Antigen/Antikörper-Verhältnis ermittelt. Dazu wurde ein Standard ELISA durchgeführt, in dem verschiedene Antigenkonzentrationen (0, 1, 5, 10, 50, 100 ng) und Antikörperkonzentrationen (1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10000, 1:20000, 1:50000) eingesetzt wurden. Um Chargeneffekte auszuschließen, finden sowohl die Konkurrenz als auch der Kontrollversuch auf derselben ELISA Platte statt. Die Auswertung der Messwerte erfolgte nach 1 h Inkubation. Das Verhältnis, dass nach einer 1h einen Wert von ca. 1 ($\pm 0,1$) erzeugt, wurde für den Konkurrenz-ELISA verwendet.

Mit der ermittelten Antigenkonzentration wurden Kavitäten einer MaxiSorp® ELISA-Platte beschichtet. Für eine statistische Auswertung der späteren Messergebnisse wurden jeweils fünf Kavitäten als technische Replikate behandelt und unter gleichen Reaktionsbedingungen beladen. Parallel dazu wurde eine weitere 96-Well Platte mit jeweils 200 μL 3 % BSA in PBS beschickt um Bindestellen zu blockieren. In dieser Masterplatte findet am Folgetag die Konkurrenz-Reaktion statt. Beide Platten inkubierten über Nacht bei RT. Am Folgetag wurde die Blockierlösung entfernt und die Masterplatte mit 50 μL der vorberechneten Antigenkonzentrationen beladen. Anschließend wurde in jede Kavität 50 μL der empirisch ermittelten Antikörperverdünnung gegeben und durch auf- und abpipettieren gemischt. Während der 30 min Vorinkubation bei 25°C kann die Bindung zwischen Antigen und Antikörper in Lösung stattfinden. Anschließend wurden jeweils 90 μL auf die MaxiSorp® Platte mit beschichtetem Antigen übertragen und für 1 h bei 25°C inkubiert. Je nachdem welche Menge an Antikörpern bereits in Lösung einen Komplex mit dem Antigen eingegangen sind, können ungebundene Varianten in diesem Schritt Oberflächen-adsorbierte Antigene binden. Nach Ablauf des Inkubationsschrittes wurde ungebundenes Material über 5 automatisierte Waschschrte entfernt. Die Signaldetektion erfolgt wie bereits beschrieben durch automatisierte Waschschrte,

einer Kombination aus anti-c-Myc Antikörper und anti-Maus ALP, sowie der Nachweisreaktion von APL mit PNPP-Substratpuffer. Die Berechnung der Dissoziationskonstante K_D erfolgte anhand der Konzentrationen des eingesetzten Kompetitors und der ausgelesenen Messwerte. Die Berechnungsgrundlage bildet die Verhältnisgleichung $Y = A2 + \frac{A1-A2}{1+\exp(\frac{x-x0}{dx})}$.

A1 entspricht dem Absorptionswert der bei der geringsten KompetitorKonzentration, während A2 den Absorptionswert der höchsten KompetitorKonzentration beschreibt. Der berechnete Wert für Y entspricht der KompetitorKonzentration bei der die Hälfte aller Bindestellen des Analyts (Nanobody oder scFv) durch das Antigen besetzt ist. Je höher die Affinität und damit die Bindungsstärke des Antikörpers gegenüber dem Antigen ist, desto geringer ist die Dissoziationskonstante.

3.5. Mikroskopie

Für die mikroskopische Dokumentation und Analyse von Blattmaterial wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (Zeiss LSM 780) und die entsprechende Systemsoftware (Zen) verwendet. Proben wurden von jungen Blättern genommen und auf dem Objektträger platziert. Untersucht wurde ausschließlich frisches, unfixiertes Blattmaterial. GFP und EYFP Emissionen wurden mittels Bandpassfilter bei 490-540 nm und einem 488 nm Anregung aufgenommen. Zur Gewinnung eines Überblicks wurde ein 20x NA 0.8 Objektiv verwendet. Detailbilder wurden mit einem 40x NA 1.2 Wasserimmersionsobjektiv und zu Wahrung der Vergleichbarkeit mit einheitlichen Einstellungen aufgenommen.

3.6. Verwundungs-Experimente mit transgenen Tabak Pflanzen

Je Versuchspflanze wurde ein ausgewachsenes Blatt verwendet. Dabei wurde eine Blatthälfte direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren (unverwundete Kontrolle). Die andere Hälfte wurde mehrfach mit einer Pinzette gequetscht und an der Pflanze belassen. Nach 30 min wurde das gestresste Blatt entfernt und ebenfalls mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Homogenisierung mittels Mörser in flüssigem Stickstoff. Für die Extraktion wurden ca. 50 mg homogenisiertes Blattmaterial mit 500 µL 100 %-LC-MS-Methanol versetzt und je 50 ng [$^2\text{H}_5$] OPDA, [$^2\text{H}_6$] JA, und [$^2\text{H}_2$] JA-Ile als interne Standards verwendet. Die Methanolphase wurde auf ein Methanol zu Wasser-Verhältnis von 10:90 mit LC-MS-Wasser eingestellt. Die

Festphasenextraktion erfolgte auf einer 96 HR-XC Well-Platte (Macherey & Nagel) mit anschließender Elution durch 900 µL LC-MS-Acetonitril. Für eine Messung wurden jeweils 10 µL Eluat verwendet. Die Quantifizierung des Jasmonsäuregehaltes erfolgte anhand der aufgearbeiteten Pflanzenproben über massenspektrometrische Verfahren. Bei diesen Methoden werden ionisierte Moleküle entsprechend ihrem Masse-Ladungsverhältnis durch elektromagnetische Felder getrennt. Die Messung mittels UPLC-MS/MS wurden am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) Halle in der Arbeitsgruppe Jasmonatfunktion und Mykorrhiza (Frau Prof. Dr. Bettina Hause) durch Hagen Stellmach nach Balcke et. al 2012 (136) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Um den spezifischen Abbau kernlokalisierter Proteine, mit Hilfe chimärer E3-Ligasen experimentell zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Genkonstrukte verwendet (Abb. 5). Das Fusionsprotein EYFP-CENH3 diente dabei als gut lokalisierbares Zielkonstrukt, dessen Abbau fluoreszenzmikroskopisch nachvollziehbar ist. In Tabakpflanzen überexprimiertes SAP11-GFP5, erzeugte einen definierten Phänotyp, der auf der Interaktion von SAP11 mit Transkriptionsfaktoren der Versuchspflanzen beruht. Ein Abbau von SAP11-GFP5 durch VHHGFP4-SPOP sollte den WT-Phänotyp wiederherstellen. Dynamiken der SAP11-GFP5-Konzentration wurden morphologisch, mikroskopisch und physiologisch betrachtet. Für den Abbau von Proteinen ohne GFP-Fusion, sollte ein Antikörper hergestellt werden, der die pathogene Methyltransferase PbBSMT1 bindet. Eine zukünftige Fusion solcher Bindeproteine mit E3-Ligasen und die Überexpression in Kreuzblütengewächsen, ermöglicht ggf. eine Resistenzbildung gegenüber *Plasmodiophora brassicae*, dem Erreger der Kolhernie, dessen Infektionsstrategie mit PbBSMT1 in Verbindung zu bringen ist.

Grafische Darstellung	Funktion	Quelle
	Zielstruktur für den experimentellen, kernlokalisierten Proteinabbau	Lermontova et al. 2006
	Zielstruktur für den experimentellen, kernlokalisierten Proteinabbau	Alisa Stohmayer (RLP AgroScience GmbH)
	Chimäre E3-Ligase für den experimentellen Abbau kernlokalisierter Proteine in Pflanzen	Shin et al. 2015 Sorge et al. 2021
	Chimäre E3-Ligase für den experimentellen Abbau von Proteinen in Pflanzen	Caussinus et al. 2011 Baudisch et al. 2018
	Kontrollkonstrukt	Baudisch, Pfort et al. 2018

Abb. 5 **Verwendete Konstrukte für Proteinabbauversuche in Pflanzen.** Lineare Darstellung der verwendeten Konstrukte. Detektion überexprimierter Proteine erfolgte durch anti-EGFP- oder anti-cMyc-Antikörper im Western Blot. EYFP-CENH3 lokalisiert an Zentromeren und dient als kernspezifisches Substrat. Das NSlmb-Konstrukt basiert auf dem Protein Slmb aus *D. melanogaster*. Die SPOP-Sequenz entstammt dem Humangenom. Die Nanobody-Kontrolle (ohne E3-Ligase) soll die Abhängigkeit des gezielten Proteinabbaus von der chimären E3-Ligase belegen (NSlmb bzw. SPOP). Die verwendeten Konstrukte stehen unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors. Die Selektion transgener Pflanzen erfolgte durch Kanamycin (Kan) oder Phosphinothricin (PPT)-Resistenzgene.

4.1 Proteasomale Degradation von Proteinen im Zellkern

Das erste Abbauziel ist ein Fusionsprotein aus der Zentromer-spezifischen Histon 3 Variante CENH3 und EYFP. EYFP und GFP unterscheiden durch Mutationen der chromophoren Gruppe (Phe64>Leu und Ser65>Thr), wodurch sich die unterschiedlichen Emissionsspektren (GFP = 509 nm YFP = 527 nm) ergeben. Dass der anti-GFP-Nanobody VHHGFP4 ebenfalls EYFP bindet und welche Seitenketten an der Bindungsformation beteiligt sind, wurde zuvor nachgewiesen (137). Als Bindungsrelevant wurden dabei die Aminosäuren D173, E142, V176, N170, R168, N146, A206, K166, S147, Q202, F223 der GFP-Sequenz eingeschätzt. Unter dieser Aufzählung befindet sich keine Sequenzabweichung innerhalb des VHHGFP4-Bindemotifs für GFP oder EYFP (Abb. 6).

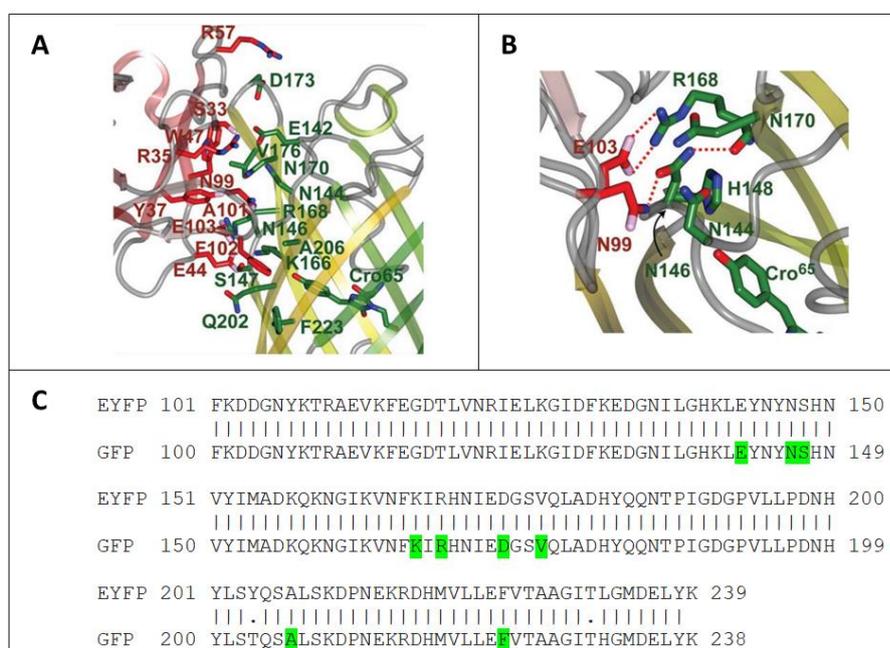


Abb. 6 VHHGFP4 bindet sowohl GFP als auch EYFP. (A): Beteiligte Aminosäuren an der Interaktion zwischen GFP und VHHGFP4. (B): Detailaufnahme in dem Bereich von Asn146. Durch einen leicht abweichenden Blickwinkel ist ebenfalls die Seitenkette H148 zu erkennen. (C): Sequenzvergleich der AS-Sequenzen von GFP und EYFP. Grün hervorgehoben sind an der Interaktion beteiligte Aminosäuren. An der Bindung beteiligte Aminosäuren sind für GFP und EYFP identisch. Abbildung 6A und 6B entnommen aus Kubala et al. 2010 (137).

Auf dieser Basis können die chimären E3-Ligasen NSlmb-VHHGFP4 bzw. VHHGFP4-SPOP für Degradationsexperimente mit dem Zielprotein EYFP-CENH3 unverändert verwendet werden. Zu diesem Zweck wurden die Abbaukonstrukte NSlmb-VHHGFP4 und VHHGFP4-SPOP in einen geeigneten Pflanzenexpressionsvektor kloniert (siehe 3.3.1) und transgene *N. tabacum*-Pflanzenlinien generiert, die entweder die

Kombination aus EYFP-CENH3/NSlmb-VHHGFP4 oder EYFP-CENH3/VHHGFP4-SPOP exprimieren (Abb. 5). Kontrolllinien wurden so transformiert, dass sie entweder die Kombination aus VHHGFP4 und EYFP-CENH3 oder nur das Zielprotein EYFP-CENH3 exprimieren.

Die Transformation von Wildtyp-*N. tabacum*-Pflanzen mit 35S:CENH3-EYFP erfolgte wie im Abschnitt Methoden 3.1.5 beschrieben. Die Selektion basiert auf dem im Expressionsvektor enthaltenen BAR-Gen, welches Phosphinothricin (PPT)-Resistenz vermittelt. Auf PPT wachsende Pflanzen wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert und aus den 20 *in vitro* kultivierten Pflanzen, vier mit dem stärksten Fluoreszenzsignal ausgewählt. Blattmaterial dieser Pflanzen wurde für die Transformation mit 35S:VHHGFP4, 35S:NSlmb-VHHGFP4 oder 35S:VHHGFP4-SPOP verwendet. Die resultierenden Doppeltransformanten wurden auf Basis des NPTII-Gens auf Kanamycin-haltigem Medium selektiert und mit sequenzspezifischen Primern (Tabelle 2) und PCR-Analyse hinsichtlich des Transgens identifiziert. Exemplarisch wurde das Ergebnis der PCR-Analyse für drei unterschiedliche Linien gleichen Genotyps gezeigt (Abb. 7). Die Linien L23, L24 und L25 enthalten Konstrukte für 35S::NSlmb-VHHGFP4 und EYFP-CENH3 und zeigten unter Verwendung spezifischer Primer ein Signal auf Höhe des 1000 bp Markers (Abb. 7A).

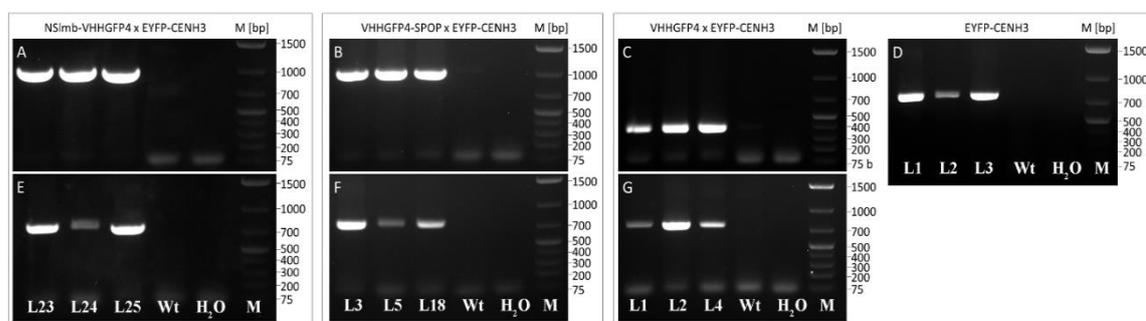


Abb. 7: Nachweis der DNA-Konstrukte stabil transformierter Tabakpflanzen. Der Transformationserfolg wurde durch PCR mittels genomischer DNA und sequenzspezifischer Primer (Tabelle 2) bestätigt. (A): Amplifizierte NSlmb-Sequenz in drei unabhängig getesteten transgenen *N. tabacum*-Pflanzenlinien mit NSlmb-VHHGFP/EYFP-CENH3-Überexpression. Die berechnete Fragmentgröße der NSlmb-Sequenz beträgt ca. 1000 bp und wurde für alle drei getesteten Linien bestätigt. (B): Amplifikation der SPOP-Sequenz aus transgenen VHHGFP-SPOP/EYFP-CENH3 Linien. Alle getesteten Linien zeigen Signale der berechneten Fragmentgröße (ca. 1000 bp). (C): Amplifikation der VHHGFP-Sequenz transgener VHHGFP/EYFP-CENH3-*N. tabacum*-Pflanzenlinien. Signale knapp unterhalb des 400 bp Markers entsprechen der berechneten Größe (360 bp). (D): Nachweis der EYFP-CENH3-Sequenz in Kontrolllinien (EYFP-CENH3-Überexpression). Die berechnete Fragmentgröße von ca. 700 bp konnte in allen drei getesteten Pflanzen nachgewiesen werden. (E, F, G): Nachweis der EYFP-CENH3-Konstrukte in transgenen Linien mit NSlmb-VHHGFP4/EYFP-CENH3, VHHGFP4-SPOP/EYFP-CENH3 und VHHGFP4 EYFP-CENH3-Überexpression (in Kooperation mit Inna Lermontova, IPK Gatersleben).

Dies entspricht der berechneten Größe des DNA-Fragmentes von NSlmb-VHHGFP4. Eine PCR-Analyse der Linien L3, L5 und L18, welche die Konstrukte 35S::VHHGFP4-SPOP und 35S::EYFP-CENH3 enthielten, zeigte ebenfalls ein Signal auf der Höhe des 1000 bp Markers, entsprechend des berechneten Molekulargewichtes (Abb. 7B). Transformanten mit VHHGFP4/EYFP-CENH3 wurden mit VHHGFP4-spezifischen Primern untersucht und zeigen Signale auf Höhe knapp unterhalb des 400 bp Markers (Abb. 7C). Dies entspricht ebenfalls der berechneten Fragmentgröße von ca. 360 bp. Alle Pflanzen, inklusive der Kontrolllinien, die nur das Gen für EYFP-CENH3 trugen (Abb. 7D), wurden auf das Insert EYFP-CENH3 geprüft. Dabei zeigten alle Linien ein Signal auf Höhe des 700 bp Markers, welches ebenfalls der berechneten Größe entspricht (Abb. 7D, Abb. 7E, Abb. 7F, Abb. 7G). Diese Testresultate zeigen, dass die gewünschten Genfragmente im Genom der Wirtspflanze nachweisbar waren. Weiterführende Experimente wurden mit diesen Pflanzenlinien durchgeführt.

Die genaue Quantifizierung der EYFP-CENH3 Transkriptmenge erfolgte durch qPCR. Auf diese Weise sollte gezeigt werden, dass sich die spezifische Transkriptmenge von EYFP-CENH3 zwischen den Pflanzenlinien nicht unterscheidet und unbeeinflusst von den Degradationskonstrukten NSlmb-VHHGFP und VHHGFP4-SPOP ist. Das Experiment wurde an Blattmaterial ca. 6 Wochen alter Pflanzen durchgeführt, deren transgener Status im vorherigen Experiment belegt wurde. 13 von 14 getesteten Pflanzen erreichten relative Expressionswerte zwischen 0,2 und 1,2 (Abb. 8).

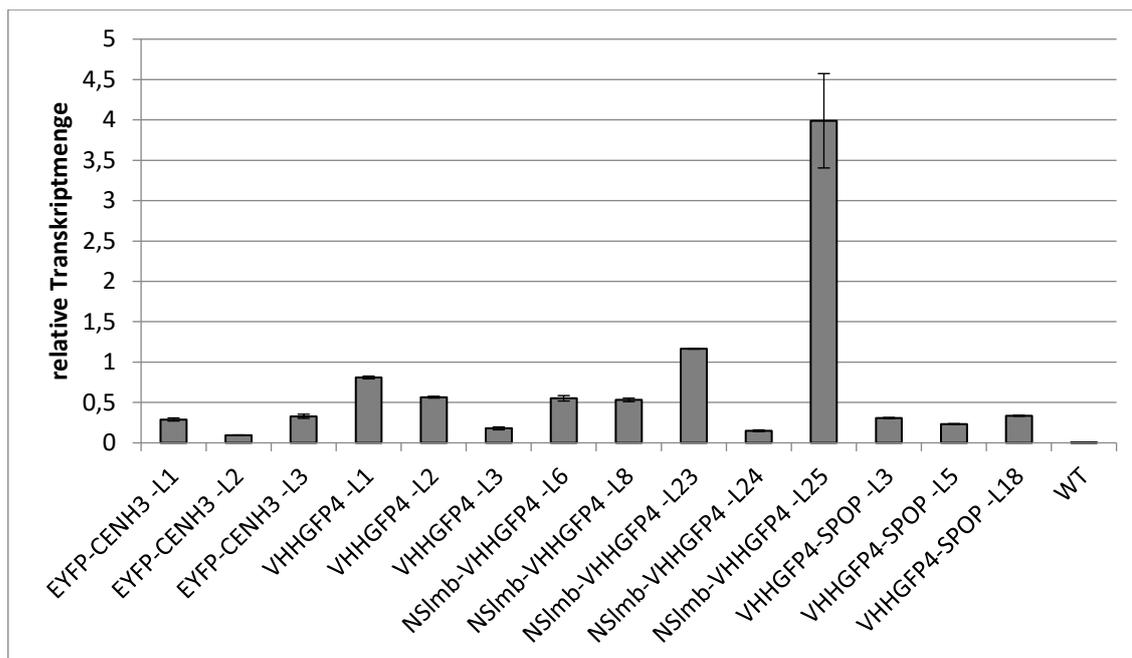


Abb. 8: Vergleich der Transkriptmenge transgener *N. tabacum*-Pflanzen durch qPCR. Analyse der relativen EYFP-CENH3-Genexpression transgener Pflanzen. Für jeden Genotyp wurden drei unabhängige Pflanzenlinien getestet. Die relative Expressionsstärke (Methoden 3.2.3) der EYFP-CENH3-mRNA variiert zwischen 0,2 und 1,2. Einen Ausreißer bildet Linie 25 (NSlmb-VHHGFP4), welches die 4-fache relative Expressionsstärke zeigt. Dieses starke Signal korreliert mit einer entsprechend hohen Abundanz des Zielproteins, was fluoreszenzmikroskopisch bestätigt werden konnte (Abb. 11) (in Kooperation mit Inna Lermontova, IPK Gatersleben).

Der Ausreißer (NSlmb-VHHGFP4/EYFP-CENH3, Linie 25) erreichte mit einem Wert von 3,98 fast die sechsfache Transkriptmenge des arithmetischen Mittels (0,68) aller Proben. Dieses spiegelte sich in späteren fluoreszenzmikroskopischen Analysen in Form stärkerer Fluoreszenzsignale wieder (Abb. 11, Abbildung A 8). Material nicht-transformierter Wildtyppflanzen diente als Negativkontrolle und wies einen vernachlässigbar niedrigen Wert auf (0,0003). Sowohl die Abbaukonstrukte NSlmb-VHHGFP4 und VHHGFP4-SPOP als auch der Nanobody ohne Ligase-Fusion haben folglich keinen Einfluss auf die Transkriptmenge des Zielkonstruktes EYFP-CENH3.

Neben der Verfügbarkeit einer mRNA spielen posttranskriptionelle Prozesse (siehe 1.3) eine wesentliche Rolle und können die tatsächliche Proteinproduktion beeinflussen. Um direkte Rückschlüsse auf das Expressionsverhalten zu ziehen, wurden Proteinabundanzen mittels Western Blot überprüft (Abb. 10). Der Nachweis der chimären E3-Ligasen NSlmb-VHHGFP4 und VHHGFP4-SPOP, sowie des Nanobodies VHHGFP4 erfolgte mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen den C-terminalen c-Myc-Tag. Signale der erwarteten Größe (38,4 kDa) wurden für NSlmb-VHHGFP4 erreicht. Schwächere Signale wurden in transgenen Linien mit VHHGFP4-SPOP-

Überexpression (37,9 kDa) erzeugt. Pflanzenlinien, die VHHGFP4 (15,7 kDa) akkumulierten, zeigten starke Signale auf Höhe des 15 kDa Markers im Western Blot.

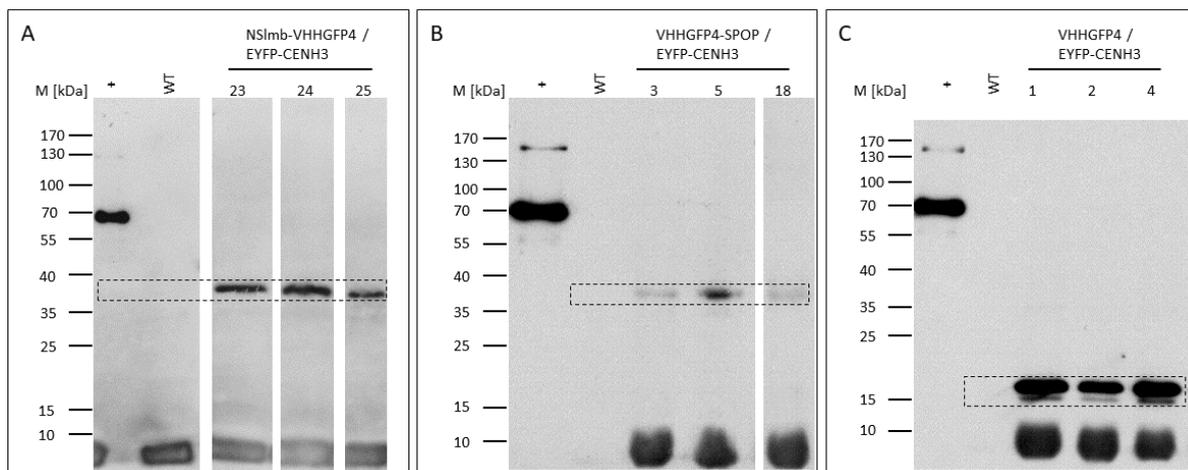


Abb. 9: Analyse der Expression von chimären E3- Ligasen in transgenen, doppelt transformierten Tabakpflanzen. (A): NSlmb-VHHGFP4/EYFP-CENH3-Pflanzenlinien zeigten spezifische Signale bei ca. 38 kDa entsprechende des berechneten Molekulargewichtes von NSlmb-VHHGFP4. (B): Analyse von transgenen Linien mit VHHGFP4-SPOP/EYFP-CENH3-Überexpression. Ein spezifisches Signal bei 38 kDa entspricht der Größe des VHHGFP4-SPOP-Konstruktes. (C): Proben aus transgenen Pflanzen mit VHHGFP4/EYFP-CENH3-Koexpression. Ein Signal auf Höhe des 15 kDa Markers bestätigte die Überexpression des anti-GFP-Nanobody (VHHGFP4, berechnete Größe ca. 16 kDa). Die Visualisierung von Zielproteinen im Western Blot erfolgte mittels des C-terminalen c-Myc-tag, einem spezifischen monoklonalen anti-c-Myc-Antikörper (9E10) und ECL-Entwicklung. Interne Western Blot Kontrolle (+) ist das 100 x ELP (I38). Schwach bis mäßig stark ausgeprägte Signale unterhalb des 10 kDa Markers sind auf Autofluoreszenz des Chlorophylls an der Lauffront des Gels zurückzuführen.

Diese Ergebnisse bestätigten die Akkumulation eines der jeweiligen Abbaukonstrukte (NSlmb-SPOP oder VHHGFP4-SPOP bzw. VHHGFP4 ohne Fusion in Kontrollpflanzen) in den doppelt transformierten *N. tabacum*-Pflanzen.

4.1.1 Analyse der Degradation von EYFP-CENH3

Ein erfolgreicher proteasomaler Abbau von EYFP-CENH3 mit Hilfe von chimären E3-Ligasen spiegelt sich in reduzierten EYFP-CENH3-Proteinmengen wieder. Eine weitere Analyse erfolgte auf Proteinebene via Western Blot mit Proben aus transgenen Pflanzen. Anti-*A. thaliana* CENH3-Antikörper wurden verwendet um nicht-abgebautes EYFP-CENH3 nachzuweisen (Abb. 10A).

Pflanzen, die EYFP-CENH3 zusammen mit VHHGFP4 oder NSlmb-VHHGFP4 koexpressieren, zeigten Signale knapp unterhalb des 55 kDa Markers. Dies korrespondiert mit der berechneten Größe des Fusionsprotein EYFP-CENH3 (49 kDa), welches in keiner anderen Linie durch anti-CENH3 oder anti-GFP-Western Blot

detektiert werden konnte (Abb. 10A, Abb. 10B und Abb. 10C). Alle Proben inklusive dem Wildtypen zeigten eine unspezifische Bande bei ca. 41 kDa. Die beschriebenen 49 kDa und 68 kDa Signale traten nicht in Proben aus VHHGFP4-SPOP/EYFP-CENH3 Pflanzenlinien auf (Abb. 10A und Abb. 10B).

Die Immundetektion von EYFP führte zu vergleichbaren Beobachtungen (Abb. 10B). Signale für EYFP-CENH3-Monomere, die mit einer Größe von ca. 49 kDa korrespondiert, wurden für Pflanzen mit VHHGFP4/EYFP-CENH3- oder NSlmb-VHHGFP4/EYFP-CENH3- Überexpression gefunden. Transgene Pflanzen die VHHGFP4-SPOP und EYFP-CENH3 exprimieren zeigten keine spezifischen Signale für EYFP oder EYFP-konjugierte Proteine (Abb. 10B). An Stelle einer konventionellen Beladungskontrolle mittels Coomassiefärbung wurden anti-Histon H3-Antikörper verwendet. Dadurch wurde gezeigt, dass jeweils vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden (Abb. 10C). Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass das Zielprotein EYFP-CENH3 in Pflanzen mit VHHGFP4-SPOP/EYFP-CENH3-Koexpression degradiert wurde. Dies konnte in Pflanzen mit NSlmb-VHHGFP4/EYFP-CENH3- oder VHHGFP4/EYFP-CENH3- bzw. nur EYFP-CENH3-Expression in Kontrollpflanzen nicht beobachtet werden.

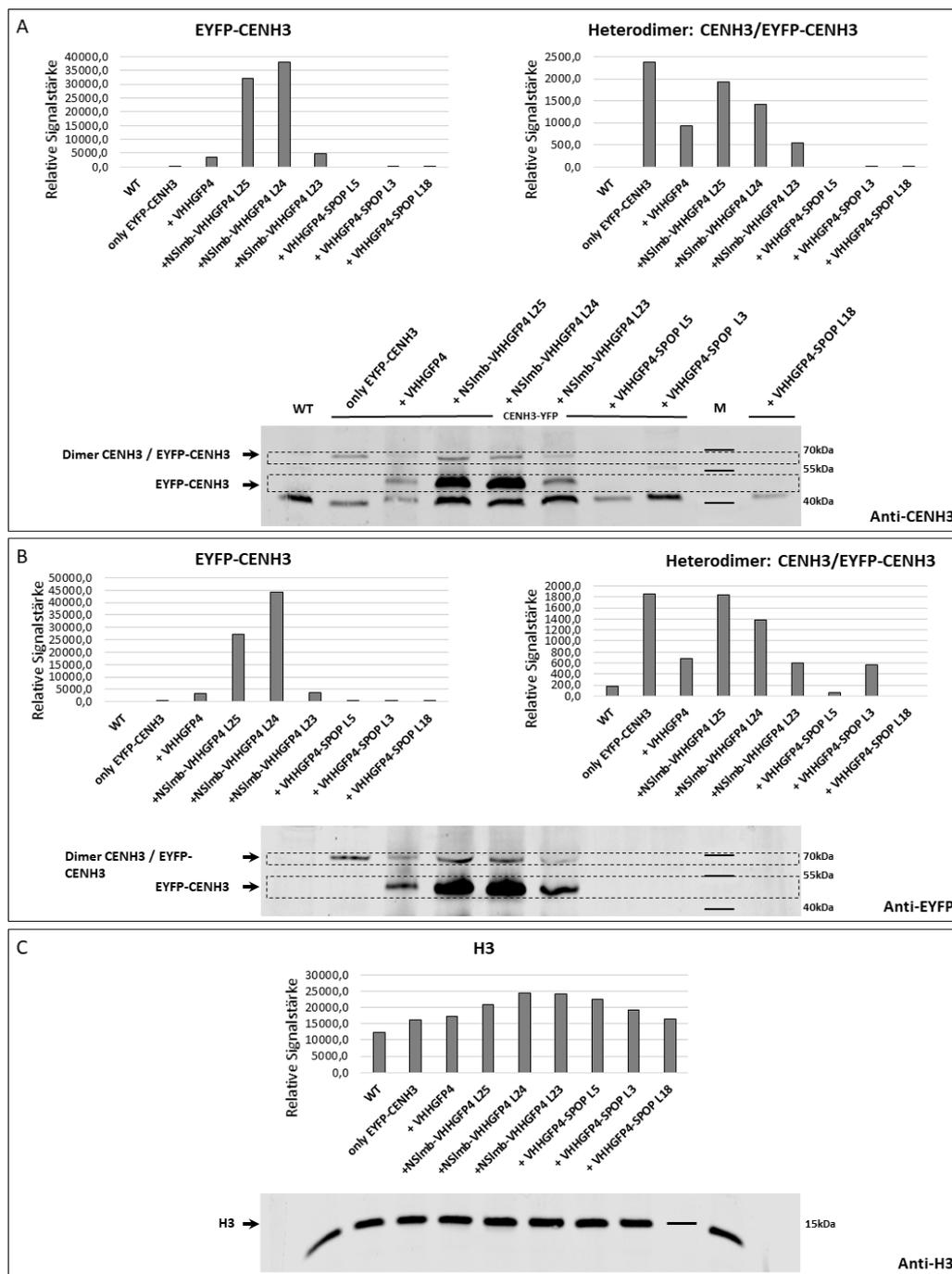


Abb. 10: Western Blot Analyse von CENH3, EYFP und Fusionsproteinen in transgenen *N. tabacum*-Pflanzen.

(A): CENH3-Nachweis durch anti-*At*CENH3-Antikörper. Kontrollpflanzen mit EYFP-CENH3 Überexpression zeigten spez. Signale bei 68 kDa. Dies entspricht einem Heterodimer aus EYFP-*At*CENH3 und *Nt*CENH3. Ähnliche Ergebnisse zeigten Pflanzen mit VHHGFP4/EYFP-CENH3 bzw. NSImb-VHHGFP4/EYFP-CENH3 Koexpression. Weitere Signale wurden bei 49 kDa detektiert, die der Größe von EYFP-*At*CENH3 entsprechen. Pflanzen mit VHHGFP4-SPOP/EYFP-CENH3-Koexpression zeigten diese Signale nicht. Alle Proben zeigten ein unspezifisches Signal bei ca. 41 kDa. (B): Anti-EYFP Detektion. Kontrolllinien mit EYFP-CENH3, bzw. EYFP-CENH3/VHHGFP4 oder EYFP-CENH3/NSImb-VHHGFP4 Koexpression zeigten EYFP-spez. Signale. Linien mit EYFP-CENH3/VHHGFP4-Koexpression zeigten keine EYFP-Signale. Unspezifische Signale bei 41 kDa. (C): Anti-Histon-H3-Detektion (Beladungskontrolle). Die Messung der Signalstärke einzelner Banden erfolgte mittels "LI-COR Image Studio" (LI-COR Biosciences – GmbH, www.licor.com) (in Kooperation mit Dmitri Demidov, IPK Gatersleben).

Zusätzlich wurde der Proteinabbau von EYFP-CENH3 im Zellkern mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Das zu erwartende EYFP-CENH3-Signal (7), zeigte sich in Form von fluoreszierenden Punkten im Bereich der Zentromere (Abb. 11A und Abb. 11B). Ähnliche Fluoreszenzsignale wurden in Proben aus Pflanzen mit VHHGFP4/EYFP-CENH3-Überexpression beobachtet (Abb. 11C und Abb. 11D).

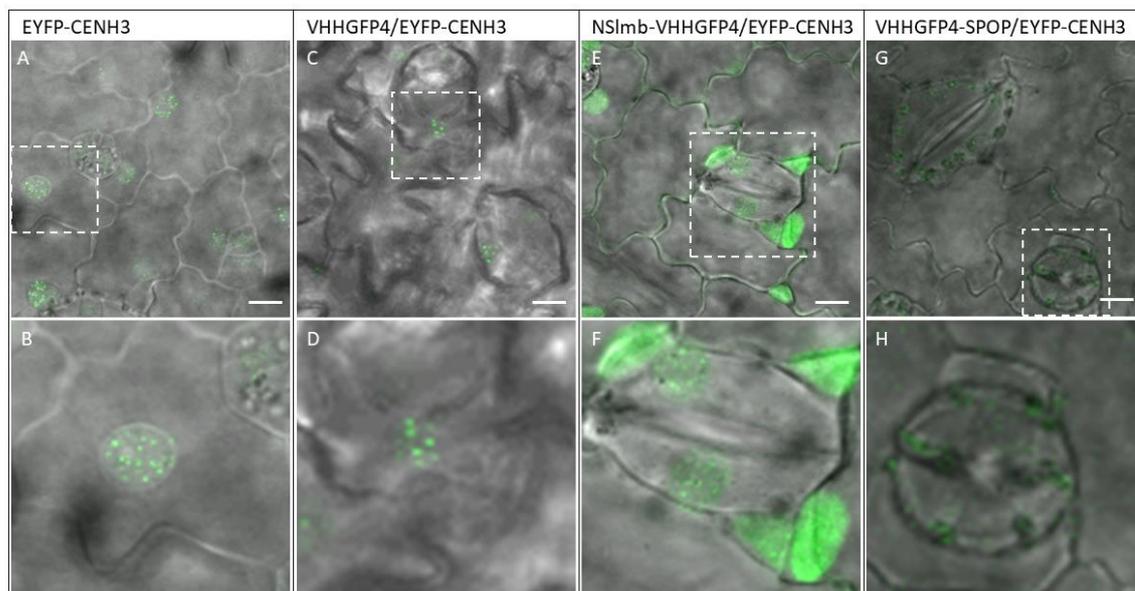


Abb. 11: Mikroskopische Analyse von EYFP-Fluoreszenzsignalen in unterschiedlichen *N. tabacum*-Pflanzen. (A und B): Anreicherung von EYFP-CENH3 an Zentromeren. (C und D): Koexpression von EYFP-CENH3/VHHGFP4. Nanobody ohne E3-Ligase-Fusion führt nicht zu einer Reduktion des EYFP-Signals (E und F): Koexpression von EYFP-CENH3/NSlmb-VHHGFP4 führt zu einer Translokation von Fluoreszenzsignalen in periphere Räume des Zellkerns (Nukleoplasma). (G und H): Koexpression von EYFP-CENH3/VHHGFP4-SPOP führt zur Reduktion der EYFP-Fluoreszenz. Referenzbalken: 10 μ m. Vergrößerung 40x.

Die Koexpression von NSlmb-VHHGFP4 und EYFP-CENH3 führte zu einer starken Akkumulation von Fluoreszenzsignalen im Bereich des Nukleoplasmas. Darüber hinaus fällt eine reduzierte Signalstärke an den Zentromeren auf (Abb. 11E und Abb. 11F). Das EYFP-spezifische Signal änderte sich von klar abgrenzbaren Punkten hin zu diffuser, breit verteilter Fluoreszenz. Dieses Signal lässt sich mit Chromatin assoziieren, welches nicht direkt an zentromeren Regionen lokalisiert. Schwache bis gar keine EYFP-Signale wurden in 10 unabhängig getesteten Pflanzen mit VHHGFP4-SPOP/EYFP-CENH3-Überexpression beobachtet (Abbildung A 8). Kreisrunde Strukturen entlang der Stomata entsprechen den Chloroplasten, welche durch Anregung der Autofluoreszenz des Chlorophylls sichtbar gemacht wurden (Abb. 11G und Abb. 11H). In Verbindung mit der Transkriptanalyse (Abb. 8) bestätigen diese Ergebnisse eine proteasomale Degradation von EYFP-CENH3 durch Koexpression von VHHGFP4-SPOP.

4.2 Abbau pathogener Effektorproteine am Beispiel von SAP11-GFP5

Das aus *Phytoplasma mali* bekannte Effektorprotein SAP11 erzeugt bei stabiler pflanzlicher Überexpression einen artübergreifenden Phänotyp. Typisch sind eine übermäßige Ausbildung von Seitentrieben (*witchbroom*), eingerollte Blätter und reduziertes Längenwachstum. Nach aktuellem Wissensstand basiert dieser Effekt auf der Interaktion zwischen SAP11 und TCP II-Transkriptionsfaktoren im Zellkern (139, 140). Die Schwere des veränderten Phänotyps hängt mit der Menge translatierten SAP11 zusammen (139). SAP11 stellt damit ein ideales Modellprotein für einen gezielten Proteinabbau dar, da bereits teilweise reduzierte Mengen dieses Proteins in weniger stark ausgeprägten Phänotypen resultieren (139). Der folgende Abschnitt stellt den experimentellen Versuch dar, eine Proteinfusion aus SAP11 und dem Reporterprotein GFP mittels DeGradFP abzubauen und phänotypische sowie physiologische Veränderungen zu analysieren.

4.2.1 Koexpression von SAP11-GFP5 und VHHGFP4 bzw. VHHGFP-SPOP

Transgene *N. tabacum* Pflanzen, die VHHGFP4 bzw. VHHGFP-SPOP überexprimieren, wurden mit 35S::SAP11-GFP5 Plasmiden cotransformiert. Jedes Plasmid enthält zusätzlich ein Resistenzgen: NPTII bzw. PPT, was die Selektion von Doppeltransformanten ermöglicht (Abbildung A 4). Der Transformationserfolg wurde durch PCR-Analyse genomischer DNA aus Pflanzenproben und mit Hilfe sequenzspezifischer Primer erbracht. Durch Agarose-Gelelektrophorese wurden amplifizierte Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und mittels Geldokumentation visualisiert (siehe 3.2.1). Beispielhaft wird das Ergebnis von fünf Pflanzenlinien gezeigt (Abb. 12). Der Nachweis von VHHGFP4 (360bp) in jeweils fünf unabhängigen Pflanzenlinien mit VHHGFP4 bzw. VHHGFP4-SPOP-Überexpression, bestätigt die erfolgreiche Integration der Zielsequenz in das Genom der Testpflanzen (Abb. 12 A und Abb. 12 B). Position und Anzahl der Insertionen durch die T-DNA vermittelte Fragmentinsertion mittels Agrobakterien wurden nicht weiter untersucht. Eine daraus resultierende variierende Kopiezahl des Transgens könnte die Ursache für die unterschiedlichen Signalintensitäten der einzelnen Proben sein (141). Auch die verwendeten Primer könnten ursächlich für geringe Signalintensitäten sein, da alle Reaktionen mit Klonierungsprimern durchgeführt wurden, die nicht weiter optimiert wurden.

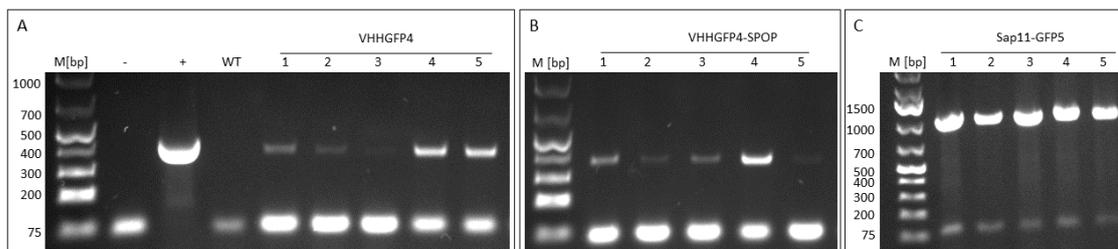


Abb. 12: Analyse genomischer DNA von Primärtransformanten (t_0) mittels PCR-Analyse. (A): Die erwartete Produktgröße von VHHGFP4 (360 bp) wurde für fünf Pflanzenlinien exemplarisch dargestellt. (B): Nachweis der VHHGFP4-Sequenz in Linien mit VHHGFP4-SPOP-Überexpression. Alle fünf getesteten Pflanzen enthielten das Zielkonstrukt. (C): SAP11-GFP5-Linien zeigten die erwartete PCR-Produkt-Größe von ca. 1018 bp.

In Kontrollpflanzen die mit SAP11-GFP5 transformiert wurden, konnte anhand sequenzspezifischer Primer ein Insert der erwarteten Größe (1018 bp) nachgewiesen werden (Abb. 12 C). Für die Cotransformation mit SAP11-GFP5 wurden jeweils drei Linien mit den stärksten Signalen in der Kontroll-PCR ausgewählt (L5, L6 und L11 für VHHGFP4 und L4, L7 und L9 für VHHGFP4-SPOP). Nach der Transformation wurden die Pflanzen auf Medium mit Kanamycin und Phosphinothricin vorselektiert. Pflanzen die trotz Selektionsdruck wuchsen, wurden erneut durch PCR auf die Transgene getestet. VHHGFP4-SPOP und SAP11-GFP5-cotransformierte Linien zeigten Signale, die sowohl mit der berechneten Fragmentgröße von SPOP-VHHGFP4 (974 bp, Abb. 13 A), als auch mit der berechneten Größe für SAP11-GFP5 (1018 bp, Abb. 13 B) korrespondieren. Pflanzen die mit VHHGFP4 und SAP11-GFP5 cotransformiert wurden, zeigten Fragmentgrößen von 360 bp (Abb. 12C) und 1018 bp (Abb. 12D), was den berechneten Größen von VHHGFP4 und SAP11-GFP5 entspricht. Pflanzen mit bestätigtem Genkonstrukt wurden weiter kultiviert und mittels Western Blot hinsichtlich ihrer Proteinexpression analysiert (Abb. 14). Durch anti-cMyc-Antikörper wurden die Konstrukte VHHGFP4 (ca. 15 kDa) und VHHGFP4-SPOP (ca. 38 kDa) nachgewiesen, während anti-EGFP-Antikörper dem Nachweis von SAP11-GFP5 dienten. Die Akkumulation von VHHGFP4-SPOP konnte in allen Pflanzenproben mit SAP11-GFP5/VHHGFP4-SPOP-Expression gezeigt werden (Abb. 14 A). Alle getesteten Pflanzenlinien mit SAP11-GFP5/VHHGFP4 Koexpression zeigten im anti-cMyc-Western Blot ein Signal auf Höhe des 15 kDa Markers (Abb. 14 B), entsprechend der berechneten Größe von VHHGFP4. Der EGFP-Nachweis bestätigte die SAP11-GFP5-Akkumulation der Linien L10 und L11 (SAP11-GFP5/VHHGFP4-SPOP), während in Linie L5 und L12 kein EGFP-spezifisches Signal nachweisbar war (Abb. 14 A).

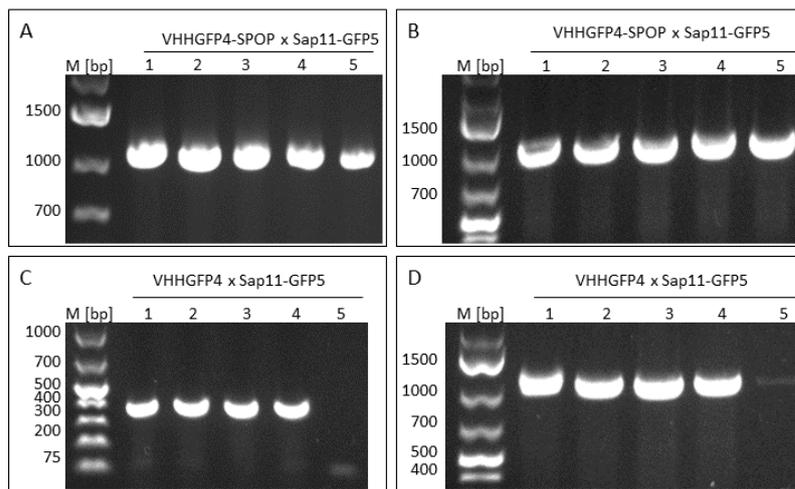


Abb. 13: PCR-Analyse von VHHGFP-SPOP/ bzw. VHHGFP4/SAP11-GFP5 Doppeltransformanten.

(A): Detektion von VHHGFP4-SPOP-DNA in VHHGFP4-SPOP/SAP11-GFP5-Doppeltransformanten. Alle getesteten Linien zeigten Signale erwarteter Größe (974 bp). (B): Nachweis von SAP11-GFP5-DNA (1018 bp) in VHHGFP4-SPOP/SAP11-GFP5-Doppeltransformanten. (C): Nachweis von VHHGFP4-DNA in VHHGFP4/SAP11-GFP5-Doppeltransformanten. Linien L1 bis L4 zeigten Signale der erwarteten Größe (360 bp). In Linie L5 war kein Zielkonstrukt nachweisbar. (D): Nachweis der SAP11-GFP5-DNA. Alle Linien zeigten Signale (Linie 5 schwach) oberhalb des 1000 bp Markers. Dies entspricht der berechneten Größe für SAP11-GFP5 von 1018 bp.

Für weiterführende Experimente wurden die SAP11-GFP5/VHHGFP4-SPOP-Linien L5 und L12 ausgewählt, da hier aufgrund des Western Blots davon ausgegangen wurde, dass ein spezifischer Proteinabbau von SAP11-GFP5 erfolgte. Pflanzenlinien mit SAP11-GFP5/VHHGFP4 Koexpression, zeigten nur für Linie L5 und L8 ein spezifisches EGFP-Signal (Abb. 14 B).

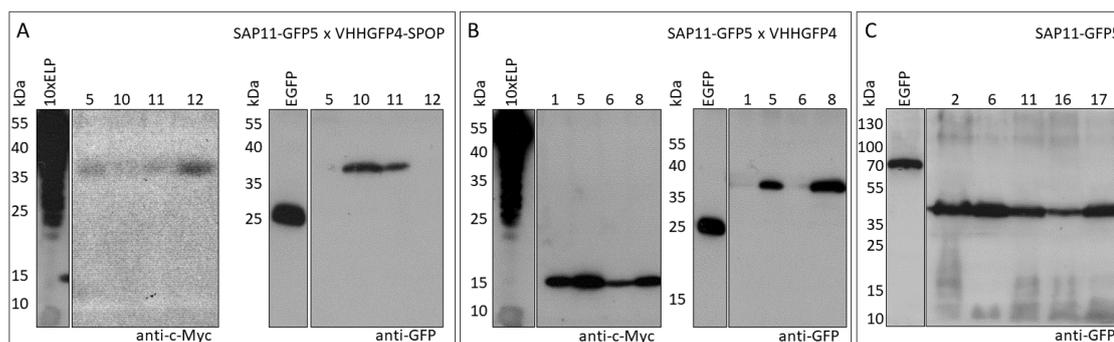


Abb. 14: Western Blot-Analyse der Proteinexpression cotransformierter Pflanzenlinien. (A): Die anti-c-Myc Detektion SAP11-GFP5/VHHGFP4-SPOP-exprimierender Linien zeigte Signale der berechneten Größe von VHHGFP4-SPOP (ca. 38 kDa). Ein anti-EGFP-Nachweis zeigte spezifische Signale für Linie L10 und L11 (Erwartungswert für SAP11-GFP5 ca. 39 kDa). In Proben aus Linie L5 und L12 lag die Signalstärke unterhalb der Nachweisgrenze. (B): Der anti-c-Myc-Nachweis in SAP11-GFP5/VHHGFP4-Doppeltransformanten zeigte Signale auf Höhe des 15 kDa Markers für alle getesteten Linien, entsprechend der berechneten Größe von VHHGFP4 (ca. 16 kDa). Die EGFP-Detektion zeigte spezifische Signale der erwarteten Größe für Linie L5 und L8. In den Linien L1 und L6 waren keine Signale detektiert. (C): Alle getesteten Kontrollpflanzen mit SAP11-GFP5 Überexpression zeigten Signale der erwarteten Größe (ca. 39 kDa) im anti-EGFP Western Blot.

Der anti-EGFP-Nachweis von Kontrollpflanzen (SAP11-GFP5) zeigte für alle getesteten Linien ein spezifisches Signal der erwarteten Größe (Abb. 14 C). Linie L2 wurde für weitere Experimente als Referenzlinie ausgewählt, da sie außerdem einen ausgeprägten Phänotypen zeigte (Abb. 15 C). Nach Bestätigung der Zielproteinexpression, wurden Pflanzen ab einer Wuchshöhe von ≥ 10 cm im Gewächshaus weiterkultiviert. Im folgenden Abschnitt werden Beobachtungen zum äußeren Erscheinungsbild, auf zellulärer Ebene und hinsichtlich der Einflüsse von SAP11 auf die Jasmonsäuresynthese untersucht.

4.2.2 Phänotypische und mikroskopische Analyse von transgenen Pflanzen

Das Vorhandensein von SAP11, ob durch Sezernierung (Insektenbefall) oder durch heterologe Überexpression, beeinflusst pflanzliche Entwicklungsprozesse und führt zu abnormalen Phänotypen. Im Versuch sollte die Frage geklärt werden, ob eine Reduzierung der SAP11-GFP5 Proteinabundanz mittels DeGradFP zu einer Abmilderung des Phänotyps oder Wiederherstellung des wildtypartigen Phänotyps führen kann. Zum Zeitpunkt der Fotodokumentation hatten alle Pflanzen das gleiche Alter (ca. 4 Wochen) und sind exemplarisch in Abb. 15 zusammengefasst. Wildtyppflanzen (Abb. 15 A) repräsentieren den normalen Wuchs. Die Überexpression von SAP11-GFP5 in transgenen Tabakpflanzen (Abb. 15 B) führte zu den bereits beschriebenen Phänotypen (siehe 4.2). Im Vergleich mit dem Wildtyp fielen besonders die abgerundete Blattform und leicht glänzende Oberfläche (Abb. 15 B1 und B2 und Abbildung A 9 A) sowie die reduzierte Wuchshöhe und die stark erhöhte Anzahl von Seitentrieben auf (Abb. 15 B3). Transgene Pflanzen, die SAP11-GFP5 und den anti-GFP-Nanobody VHHGFP4 koexprimierten (Abb. 15 C), entwickelten die gleichen abnormalen Merkmale wie Pflanzen, die nur SAP11-GFP5 exprimierten (vergleiche Abb. 15 B und Abb. 15 C). Eine Bindung des Nanobodys an den GFP-Teil des SAP11-Fusionsproteins reicht demnach nicht aus, um die SAP11-Funktion zu unterdrücken. Die Koexpression von SAP11-GFP5 und VHHGFP4-SPOP in transgenen Pflanzen (Abb. 15 D) zeigte eine Reduzierung der SAP11-spezifischen Wachstumsstörungen. Im Vergleich zeigten diese Pflanzen eine größere Blattfläche bei gleicher Wuchshöhe (Abb. 15 D1 und D2) und neigten weniger stark zur Bildung von Seitentrieben (Abb. 15 D3). Auch zu späteren Zeitpunkten hatte sich in dieser Linie die Anzahl an Seitentrieben ($n = 2$) nicht erhöht, während sich die Anzahl der Seitentriebe der anderen transgenen Pflanzen (SAP11-GFP5 und SAP11-GFP5 / VHHGFP4) auf $n \geq 9$ erhöhte.

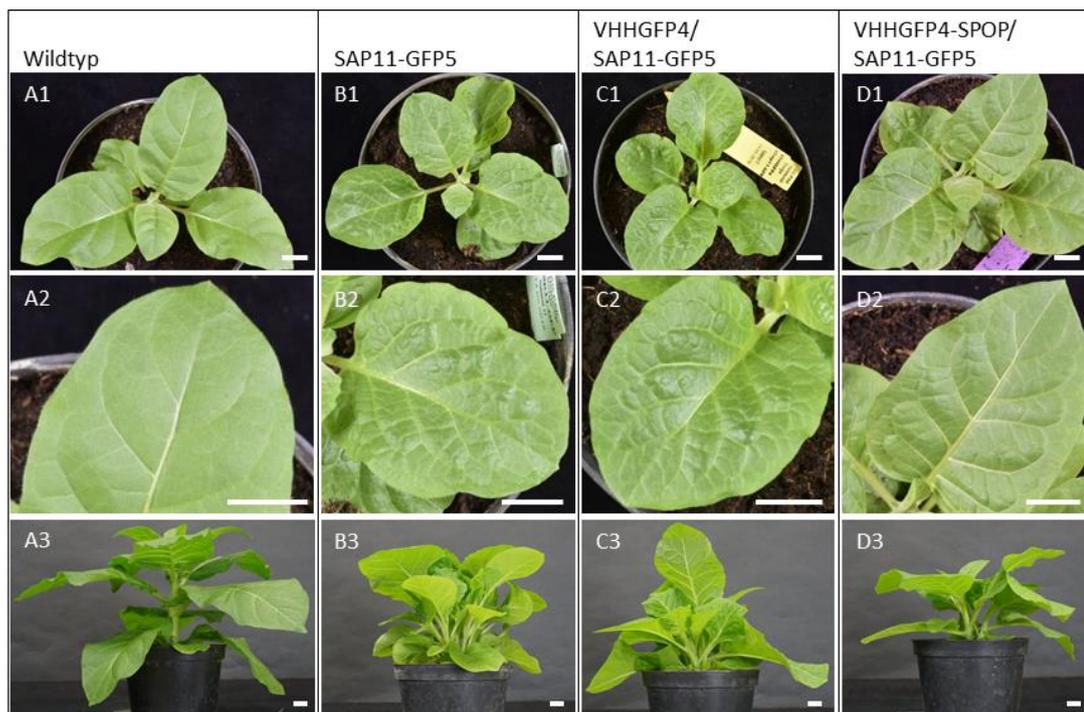


Abb. 15: Phänotypen transgener Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. (A1-A3): Wildtyppflanzen aus zwei unterschiedlichen Perspektiven in unterschiedlichen Vergrößerungen. Normale Merkmalsausprägung. (B1-B3): Transgene Pflanze mit SAP11-GFP Überexpression. B1 und B2 zeigten die veränderte Blattmorphologie. Einzelblätter entwickelten eine abgerundete Form anstelle der eher ovalen, spitz zulaufenden Wildtypform. Die Blattoberfläche reflektierte einfallendes Licht stärker. Blattadern waren deutlich hervorgehoben. Exzessive Ausbildung von Seitentrieben. (C1-C3): Transgene Pflanze mit VHHGFP4 und SAP11-GFP5 Überexpression. Gleiche Merkmalsausprägung wie in Reihe B. Eine Koexpression des anti-GFP Nanobodys hatte keinen Einfluss auf SAP11-GFP5 bedingte Phänotypen. (D1-D3): Pflanzenlinie mit VHHGFP4-SPOP- und SAP11-GFP5-Überexpression. D1 bzw. D2 (vergrößert) zeigten eine wildtyp-ähnliche Blattmorphologie. Die Anzahl von Seitentrieben war im Vergleich zu den in B und C beschriebenen Mutanten deutlich geringer (n=2 zum Aufnahmezeitpunkt). Die Koexpression von VHHGFP4-SPOP hat Merkmale reduziert, die durch SAP11-GFP hervorgerufen wurden. Größenmarker \cong 1 cm.

Diese Beobachtungen zeigen, dass die Koexpression von VHHGFP4-SPOP eine die SAP11-GFP5-induzierten Wachstumsartefakte abmildert und unterstützen die These, dass es zum Abbau des Zielproteins (SAP11-GFP5) kommt. Mikroskopische Untersuchungen wurden durchgeführt, um diese Hypothese weiter zu unterstützen. Eine Auswahl der dabei angefertigten Aufnahmen ist in Abb. 16 zusammengefasst, wobei die Reihe (A-E) einem bestimmten Genotyp und jede Zeile (1-4) einem bestimmten Kanal (1=GFP; 2=Autofluoreszenz; 3=lichtmikroskopisch; 4=Überlagerung aller Kanäle) zuzuordnen ist. Die erste Reihe (A1-A4) zeigt Blattproben aus transgenen Pflanzen mit SAP11-GFP5-Überexpression. Starke GFP-Signale sind in den Zellkernen der Spaltöffnungen entlang der Zellmembranen zu erkennen. Dass es sich dabei nicht um unspezifische Signale handelt, wird durch Aufnahmen der Chlorophyll-Autofluoreszenz

gezeigt. Dazu dient die Überlagerung der Kanäle, wodurch eine eindeutige Abgrenzung von Autofluoreszenz und GFP-Signal gezeigt wird. Mikroskopische Aufnahmen transgener Pflanzen mit SAP11-GFP5/VHHGFP4-Koexpression zeigen ein vergleichbares Muster mit ähnlicher Signalstärke (Abb. 16 B-1). Diese Abbildung veranschaulicht außerdem, dass der koexprimierte Nanobody keinen Einfluss auf die SAP11-GFP5-Lokalisierung hat und das GFP-Signal nicht moduliert. Im Gegensatz dazu ist das GFP-Signal in Pflanzen mit SAP11-GFP5/VHHGFP4-SPOP Koexpression deutlich reduziert (Abb. 16 D1 und E1) oder unterhalb des Detektionslimits (Abb. 16 C1). Diese Darstellung von drei unabhängigen Pflanzenlinien (Linie L5, L10 und L11) des gleichen Genotyps (SAP11-GFP5/VHHGFP4-SPOP) unterstützen die Hypothese des gezielten SAP11-GFP5 Abbaus. Die beobachteten GFP-Signalstärken stimmen ebenfalls mit den Western Blot Ergebnissen aus Abschnitt 4.2.1 überein.

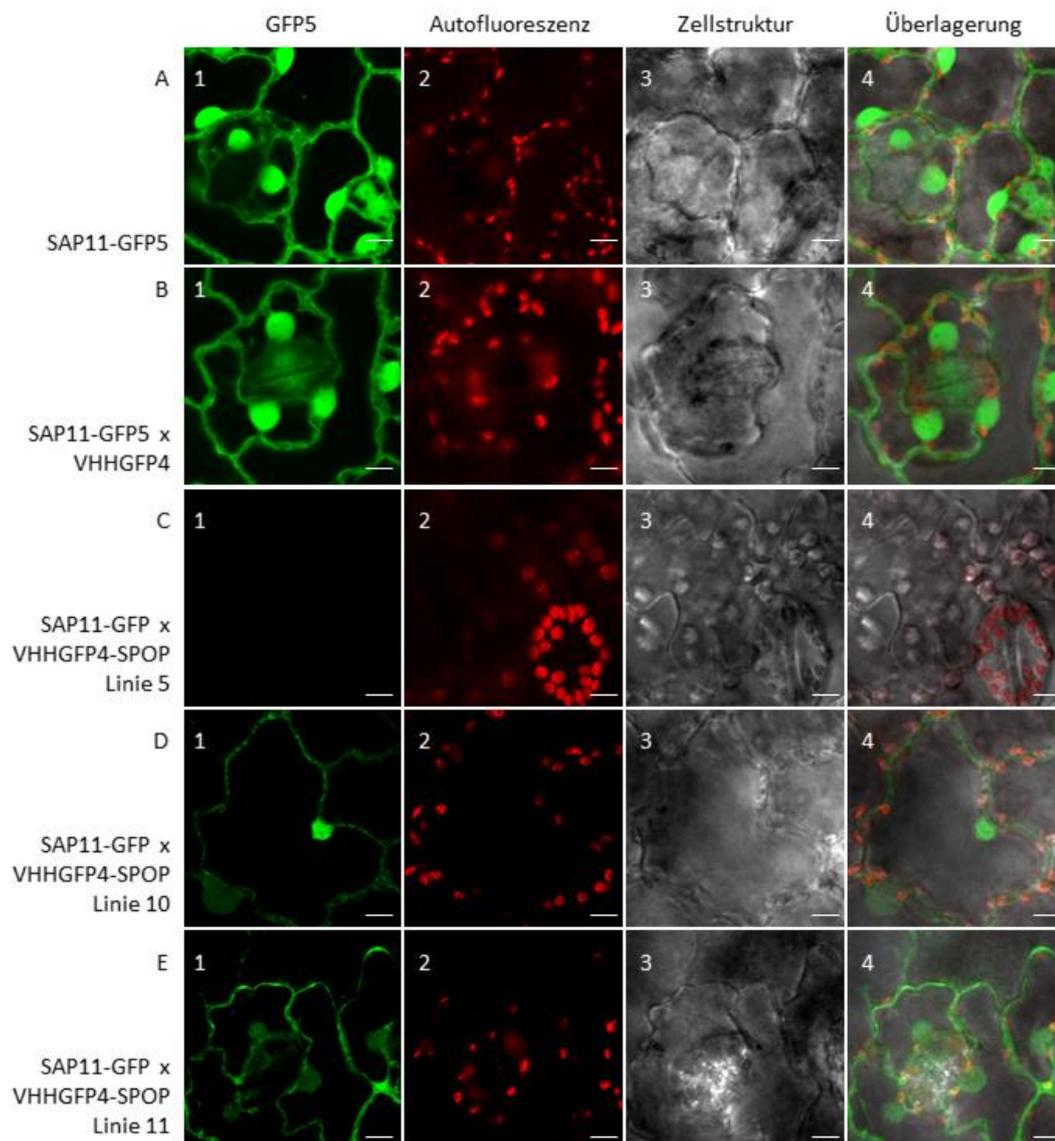


Abb. 16: Mikroskopische Analyse des SAP11-GFP5 Abbaus in transgenen Pflanzen. (A1- A4): Pflanzenlinie mit SAP11-GFP5 Überexpression. (A1): Spezifische GFP Signale in Zellkernen und Stomata. (A2): Darstellung des Frequenzbereiches zwischen 610nm und 700nm zeigt Autofluoreszenz von Chlorophyll A. (A3): Durchlichtaufnahme zur Darstellung von Zellstrukturen. (A4): Überlagerung der Einzelkanäle. GFP-Signal und Autofluoreszenz überlagern sich nicht. Das beobachtete GFP-Signal ist spezifisch. (B1-B4): Pflanzenlinie mit SAP11-GFP5/VHHGFP4 Koexpression. (C1-C4): Pflanzenline L5 mit SAP11-GFP5/VHHGFP4-SPOP Überexpression. Keine spezifischen GFP-Signale detektierbar. (D1-D4): Pflanzenline L10 mit SAP11-GFP5/VHHGFP4-SPOP Überexpression. Schwache GFP-spezifische Signale entlang der Zellwände und im Zellkern. (E1-E4): Pflanzenlinie L11 (SAP11-GFP5/VHHGFP4-SPOP). Ebenfalls schwache GFP-Signale entlang der Zellwände und innerhalb der Zellkerne. Größenmarker: 10 nm, Vergrößerung 40x.

4.2.3 Physiologische Untersuchungen des SAP11-GFP5-Abbaus in transgenen Pflanzen

Unter optimalen Bedingungen sollte ein erfolgreicher Abbau von SAP11-GFP5 phänotypisch und molekular nachvollziehbar sein. Da bekannt ist, dass SAP11 die Jasmonsäure-Biosynthese beeinflusst, ist eine physiologische Untersuchung ebenfalls denkbar. SAP11 bindet und destabilisiert TCP-Transkriptionsfaktoren (142) im Zellkern, wodurch es zu einer Inhibierung der *LOX2* Genexpression kommt. *LOX2* codiert für eine/die 13S-Lipoxygenase und wird unter anderem durch Verwundung aktiviert. Das Enzym ist an katalytischen Teilreaktionen der Jasmonsäure-Biosynthese beteiligt und trägt im Endeffekt zur Reaktion auf Pathogenbefall oder Pflanzenfraß bei. Eine Hemmung von *LOX2* durch SAP11-GFP *in planta* sollte folglich die Jasmonsäurekonzentration in verwundeten Blättern senken. Um Unterschiede zu Wildtyppflanzen zu erfassen wurde ein Verwundungsexperiment durchgeführt (siehe 3.6). Für diese Analysen wurden doppelt transformierte Pflanzen wie in 4.2.1 beschrieben und Wildtyppflanzen von einer Wuchshöhe bis ca. 20 cm betrachtet. Die Blätter wurden mit einer Pinzette mehrfach verwundet (Quetschung) und nach ca. 30 min eine Probe entnommen. Die Probenaufarbeitung und die Messung über LC-MS erfolgte wie im Methodenteil beschrieben (3.6) und wurde am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) Halle in der Arbeitsgruppe Jasmonatfunktion und Mykorrhiza (Frau Prof. Dr. Bettina Hause) durchgeführt. Dabei wurden Messwerte für freie Jasmonsäure und für die Isoleucin-konjugierte Form (JA-Ile) erhoben und grafisch dargestellt (Abb. 17). Die Gegenüberstellung der Messwerte von verwundeten und unverwundeten Pflanzen zeigt einen deutlichen Anstieg der JA und der JA-Ile Konzentration für alle getesteten Pflanzen. Dies bestätigt die bereits publizierte Beobachtung einer verwundungsspezifischen JA-Akkumulation. Die Anreicherung freier JA erreicht dabei Werte im Wildtyp von 2292 pmol/g bei verwundeten Pflanzen. Der dargestellte negative Wert ist ein Messartefakt und spiegelt eine Jasmonatkonzentration unterhalb des Detektionslimits wieder. Ähnliche Messwerte wurden für verwundete, transgene Pflanzen mit SAP11-GFP5 (2085 g/mol) bzw. Koexpression von SAP11-GFP5 / VHHGFP4 (2258 g/mol) erzielt. Geringere JA-Konzentrationen wurden in Pflanzen mit SAP11-GFP5/VHHGFP4-SPOP-Koexpression ermittelt (1395 g/mol). JA-Ile wurde mit in die Analyse aufgenommen, da dieses Konjugat als Hauptregulator der spezifischen Pflanzenabwehrreaktion gilt (143). Wildtyppflanzen akkumulierten entsprechend der ermittelten Daten die höchsten

Konzentrationen mit 1152 g/mol. Die untersuchten transgenen Pflanzen erreichten geringere Werte mit 628 g/mol bei SAP11-GFP5-, 515 bei SAP11-GFP5/VHHGFP4- und 566 g/mol bei SAP11-GFP5/VHHGFP4-SPOP-Koexpression. Auf Basis dieser Daten ist kein direkter Einfluss des Abbaukonstruktes VHHGFP4-SPOP auf die Jasmonsäure-Akkumulation zu erkennen. Die ursprüngliche These, dass ein Proteasom-vermittelter Abbau von SAP11-GFP5 potentiell erniedrigte JA-Konzentrationen wiederherstellen kann, konnte im Rahmen dieses Experimentes nicht bestätigt werden. Möglicherweise wirken sich andere Molekülgruppen bzw. Sekundärmetabolite stärker auf die JA-Akkumulation aus.

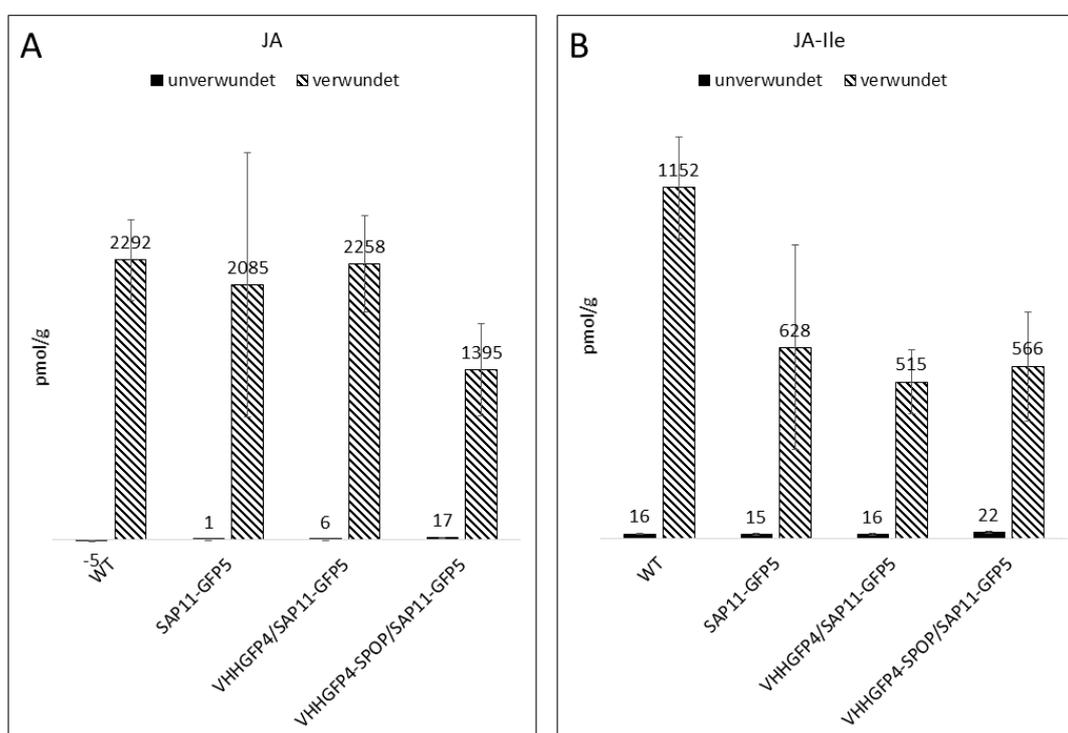


Abb. 17: Einfluss der Transgene auf den Jasmonsäure Haushalt nach Verwundung und im zeitlichen Verlauf. (A): Darstellung Messwerte der JA-Messung in unterschiedlichen transgenen Pflanzen. Gegenüber unverwundeten Pflanzen ist ein deutlicher Anstieg der JA-Konzentration in verwundeten Pflanzen beobachtbar. Unterschiede zwischen den transgenen Pflanzen sind nicht signifikant. (B): Darstellung der Messwerte für die biologisch aktive form Ja-Ile (Jasmonsäure-Isoleucin). Es ist ebenfalls ein deutlicher Anstieg der Ja-Ile Konzentration gegenüber den unverwundeten Pflanzen erkennbar. Wildtyp-Pflanzen akkumulieren ca. doppelt so viel Ja-Ile wie die transgenen Pflanzen.

4.3 Gezielter Abbau eines pathogenen Effektorproteins

Die bisher vorgestellten Strategien, bestimmte Proteine gezielt abzubauen, basierten auf einer Proteinfusion mit einem Markerprotein. Ein realer Anwendungsfall erfordert jedoch in den meisten Fällen eine direkte Interaktion zwischen einer E3-Ligase mit einem Zielprotein. Diese Notwendigkeit wird anhand des dritten Experimentalablaufs verdeutlicht. Das Hauptziel besteht darin, das Abbaupotential chimärer E3-Ligasen unabhängig von dem etablierten GFP-Nanobody anhand eines praxisnahen Beispiels zu analysieren. Die Wahl fällt auf die pathogene Methyltransferase PbBSMT1, welche mit dem Erreger der Kohlhernie *Plasmodiophora brassicae* in Verbindung gebracht wird. Das Protein wurde erstmals 2015 auf Basis von Sequenzanalysen näher betrachtet und hinsichtlich seiner physiologischen Eigenschaften im Infektionsprozess charakterisiert (144). Es wird argumentiert, dass PbBSMT1 die pflanzliche Salicylsäure (SA) methyliert und damit in eine volatile, inaktive Form bringt (MeSA). Dadurch wird die Signalübertragung mittels SA während der pflanzlichen Pathogenabwehr gehemmt. Eine hypersensitive Reaktion, die zum programmierten Zelltod und damit ein Absterben befallener Wurzelbereiche führt, bleibt aus und einem weiteren Befall kann nichts entgegengesetzt werden. Charakteristische Merkmale einer vorangeschrittenen Erkrankung sind Gallenbildung an den Wurzeln und das Welken oberirdischer Pflanzenteile (Abb. 18).



Abb. 18: Schäden an Nutzpflanzen durch die Kohlhernie. Links im Bild eine normal ausgebildete Wurzel ohne Befall. Rechts die typische Ausprägung der Gallen und anschwellen der Wurzelhaar nach Befall mit *Plasmodiophora* (<https://www.agric.wa.gov.au/broccoli/managing-clubroot-vegetable-brassica-crops>).

Die Depletion von PbBSMT1 ist ein vielversprechender proteintechnologischer Ansatz, um eine Resistenz gegenüber *P. brassicae* aufzubauen. Eine Grundvoraussetzung für diesen zielgerichteten Abbau mittels chimärer E3-Ligasen ist ein spezifischer, rekombinanter Antikörper gegen PbSMT1.

In Abschnitt 4.1 und 4.2 wurde gezeigt, dass Einzeldomänenantikörper sowohl mit als auch ohne Fusionsprotein heterolog in Pflanzen exprimierbar sind. Ebenfalls konnte die Funktionalität der chimären E3-Ligase bzw. des modifizierten Adapterproteins VHHGFP4-SPOP *in planta* bestätigt werden, indem ein erfolgreicher Abbau von EYFP-CENH3 gezeigt wurde. Da sich die Expression von Nanobodies und scFvs in Pflanzen bewährt hat, wurden diese Antikörpervarianten als Basis für die Herstellung von anti-PbBSMT1-Antikörpern verwendet. Im Folgenden wird die experimentelle Selektion eines anti-PbBSMT1-Nanobodies bzw. scFv mittels *in vitro*-Selektion beschrieben.

4.3.1 Selektion von PbBSMT1-Nanobodies durch Phagen-Display mit gereinigtem Antigen

In einem ersten Selektionsexperiment sollte ein hochaffiner Antikörper gegen gereinigtes Vollängenprotein angereichert werden. Zu diesem Zweck wurde das entsprechende Antigen überexprimiert und affinitätschromatografisch gereinigt. Dieses Antigen wurde anschließend für den Selektionsprozess mittels Phagen-Display sowie für die Charakterisierung über verschieden ELISA-Formate verwendet.

4.3.1.1 Rekombinante Expression der pathogenen Methyltransferase PbBSMT1

Die PbBSMT1-Sequenz wurde wie beschrieben von Frau Prof. Ludwig-Müller (TU Dresden) bereitgestellt (144). Aufgrund etablierter Expressionsstämme und Protokolle wurde die PbBSMT1-Sequenz in den Expressionsvektor pET23a kloniert (ehemalige Mitarbeiterin der AG Phytoantikörper Dr. Bianca Baudisch). Die Überexpression erfolgte in dem *E.coli*-Stamm BL21 (DE3) und die einstufige Reinigung durch Affinitätschromatografie mittels Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (siehe 3.4.5.2). Die Qualität der Elutionsfraktionen wurde durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung bzw. Western Blot bewertet (Abb. 19). Anhand der Visualisierung der Gesamtproteinanteils wird die Reinheit der Fraktionen analysiert. Der Vergleich zwischen Rohextrakt (R) und der Elution (E) zeigt eine deutliche Reduktion unspezifischer Proteine in der Elution sowie die Anreicherung eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 35-40 kDa (Abb. 19 A). Die Proteinidentität wurde mit einem anti-c-Myc Western Blot überprüft. Dabei konnte entsprechend des berechneten Molekulargewichtes von ca. 38 kDa ein passendes Signal im Rohextrakt und der Elutionsfraktion detektiert werden (Abb. 19 B).

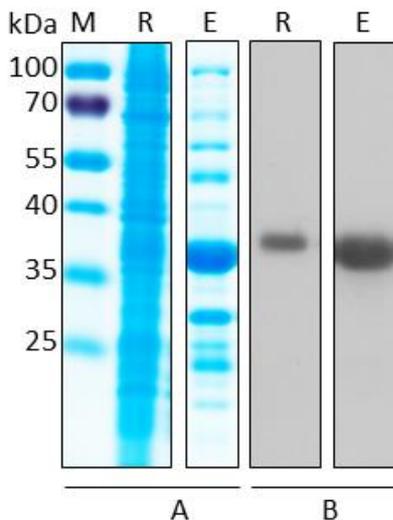


Abb. 19 Affinitätschromatografische Reinigung der Methyltransferase PbBSMT1. (A): Coomassiefärbung zur Beladungskontrolle und Visualisierung des Gesamtproteins. Gegenüber dem Rohextrakt zeigte sich eine deutliche Anreicherung einer Proteinentität auf Höhe zwischen dem 35 und 40 kDa Marker. (B): Nachweis des Zielproteins PbBSMT1 (38 kDa) durch anti-c-Myc-Western Blot. Die Position des Signals entspricht dem berechneten Molekulargewicht. Die Fraktion mit angereichertem PbBSMT1 war rein genug für ein *screening*-Experiment. M – PageRuler Protein Stain (+), R – Rohextrakt, E – Elution.

Die Proteinkonzentration der vereinigten Elutionsfraktionen entspricht ca. 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Proteinreinigungen stellen einen Kompromiss zwischen Reinheit und Ausbeute dar, da stringenter Waschbedingungen mit höheren Imidazolkonzentrationen sowohl unspezifisch als auch spezifisch gebundene Proteine von der Matrix verdrängen. Da das angestrebte *screening*-Experiment geringe Verunreinigungen toleriert, wurde auf weitere Reinigungsschritte verzichtet.

4.3.1.2 Phagen-Display zur Selektion von PbBSMT1 spezifischen Nanobodies

Für die Selektion hochaffiner, spezifisch bindender Phagen wurde das gereinigte Antigen (PbBSMT1) verwendet. Um Nanobody-Varianten anzureichern, die PbBSMT1 binden können, wurde das Antigen in zwei Konzentrationen (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ und 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) an die ELISA Platten (Nunc MaxiSorp®) adsorbiert. Um eine möglichst hohe Diversität zu gewährleisten, wurden die drei Phagenbanken, SLL („Super Lama Library“), GLL („Giga Lama Library“), und TLL („Tera Lama Library“) vereinigt und drei aufeinander folgende Durchgänge eines Phagen-Displays durchgeführt (siehe 3.1.6). Dabei wurde eine ungefähre Verdopplung des Phagen-Titers pro Runde beobachtet (Abb. 20). Hinsichtlich der unterschiedlichen Antigenkonzentrationen konnte keine Korrelation zu dem ermitteltem Phagentiter ermittelt werden.

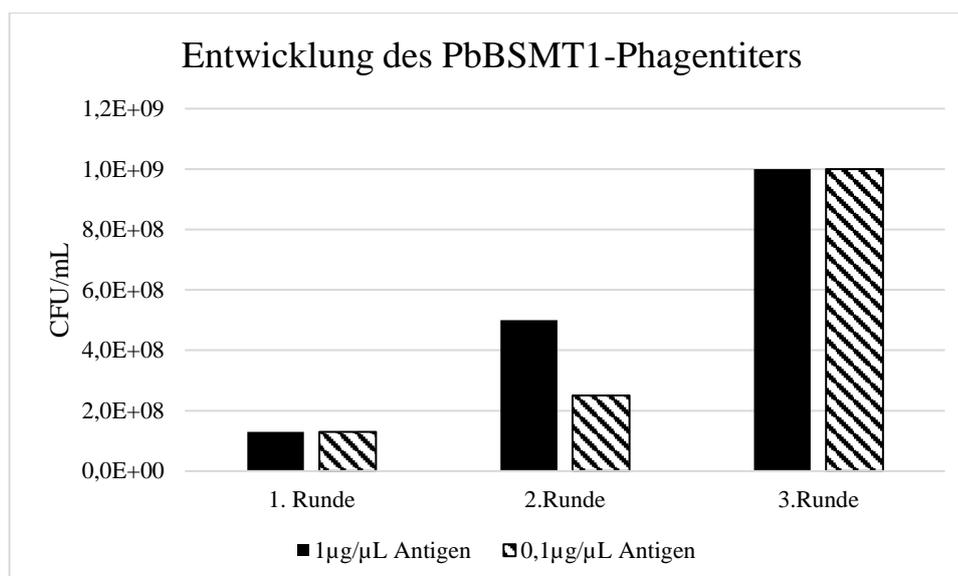


Abb. 20: Entwicklung des Phagentiters während 3 Runden *Biopanning* gegen ein proteinogenes Antigen (PbBSMT1). Titer nach erster Selektionsrunde: ca. $1,3 \cdot 10^8$ CFU/mL. Die zweite Runde führte zu einer Verdopplung auf $2,5 \cdot 10^8$ (0,1 µg/µL Antigen) bzw. einer Vervierfachung auf $5 \cdot 10^8$ CFU/mL (1 µg/µL Antigen) des Phagentiters. Dritte Selektionsrunde: Verzehnfachung des Phagentiters (10^9 CFU/mL) gegenüber der ersten Runde, unabhängig von Antigenkonzentrationen.

Aus den beiden Phagen-Displays mit unterschiedlichen Antigenkonzentrationen wurden jeweils 96 Klone ausgewählt, im 96-Well Maßstab angereichert und mittels monoklonalen Phagen-ELISA (Methoden 3.4.6) analysiert. Eine grafische Darstellung aller Absorptionswerte findet sich in Abb. 21. Einzelne Klone des *screenings* gegen 0,1 µg/µL Antigen erzielten im Phagen-ELISA relative Absorptionswerte zwischen 0,0036 und 1,7029. Klone aus dem *screening* mit 1 µg/µL Antigen erzielten Werte zwischen 0,0008 und 1,6126 [relative Absorption bei 405 nm]. Auf dieser Grundlage wurden jeweils 24 Klone mit dem höchsten Absorptionswert ($\geq 0,46$ des 0,1 µg/µL bzw. $\geq 0,378$ des 1 µg/µL *screenings*) ausgewählt und in einem weiteren ELISA funktionell analysiert.

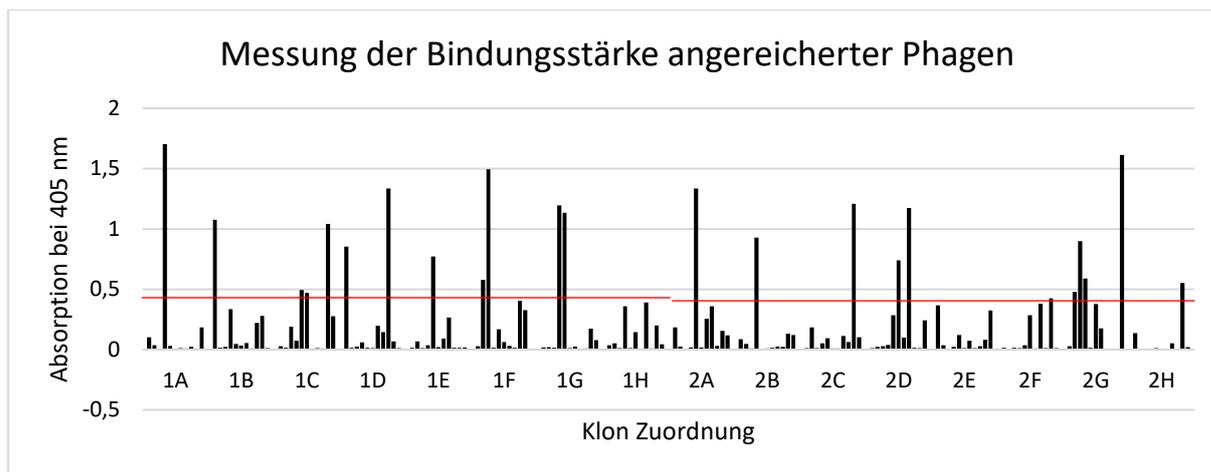


Abb. 21: Messung der Interaktionsstärke angereicherter Phagen durch Phagen-ELISA, nach drei Runden *Biopanning*. Nach Anreicherung von PbBSMT1-bindenden Phagen wurde ein anti-PbBSMT1-ELISA durchgeführt. An dieses Antigen bindende Phagen wurden mittels anti-M13-HRP-Antikörper detektiert. Das Diagramm zeigt, dass PbBSMT1-Bindemoleküle angereichert werden konnten. 1A-1H entsprechen 96 Klonen der Selektion gegen 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Antigenkonzentration), 2A-2H repräsentieren Klone der Selektion bei 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Antigenkonzentration). Rote Linien entsprechen 0,46 und 0,38 und stellen den unteren Grenzwert dar. Klone die höhere Absorptionswerte zeigen, wurden weitergeführt.

Eine erste Beurteilung der Bindungseigenschaften löslicher Nanobodies erfolgte im 24-Well-Platten Maßstab und pIII-Fusionsproteinen. Dazu wurde der *E. coli*-Stamm HB2151 mit den ausgewählten Phagen infiziert und die Proteinexpression der Nanobody-pIII-Fusionen wie beschrieben (siehe 3.4.6) induziert. HB2151 ist ein *amber codon non-supressor* Stamm der aufgrund einer tRNA-Mutation anstatt eines Translationsstops ein Glutamin bei UAG-Stopcodonen einfügt. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um zufällig auftretende UAG-Codone innerhalb der Nanobody- oder scFv-Sequenz während des *screening*-Prozesses zu unterdrücken. Dadurch erhöht sich die Anzahl potentieller Binder, da gerade in *comlementary determining regions* (CDRs) der hier verwendeten Bibliotheken, diese Codone sporadisch auftreten. Das UAA-Stopcodon wurde während der Erzeugung der Bank (Martin Giersberg und Udo Conrad, IPK Gatersleben) vermieden. Die translatierten Proteine enthielten weiterhin die C-terminale pIII-Fusion, wodurch rekombinante Proteine (z.B. Antikörper) auf der Phagenoberfläche präsentiert wurden. Für eine erste Bewertung der Bindungscharakteristik ist diese Eigenschaft allerdings vernachlässigbar.

Nach der Infektion von HB2151 und induzierter Expression, akkumulierten die Antikörper als pIII-Fusionsprotein im Medium. Eine Bewertung der Bindungsstärke

löslicher Antikörper erfolgte anschließend mit abzentrifugierten Überständen der Expressionskultur. Unlösliche Varianten wurden durch dieses Verfahren ausgeschlossen. Des Weiteren wurde das Bindungsverhalten hinsichtlich der BSA (Bovines Serum Albumin)-Interaktion analysiert und ggf. unspezifisch bindende Varianten selektiert. Der Kandidatenklon 1B1 zeigte zu diesem Zeitpunkt das beste Signal-zu-Rausch-Verhalten des ganzen *screenings* (Abb. 22). Im Anschluss an diese Vorauswahl, wurden die Kandidatenklone überprüft, ob sich darunter unerwünschte Mischklone befinden.

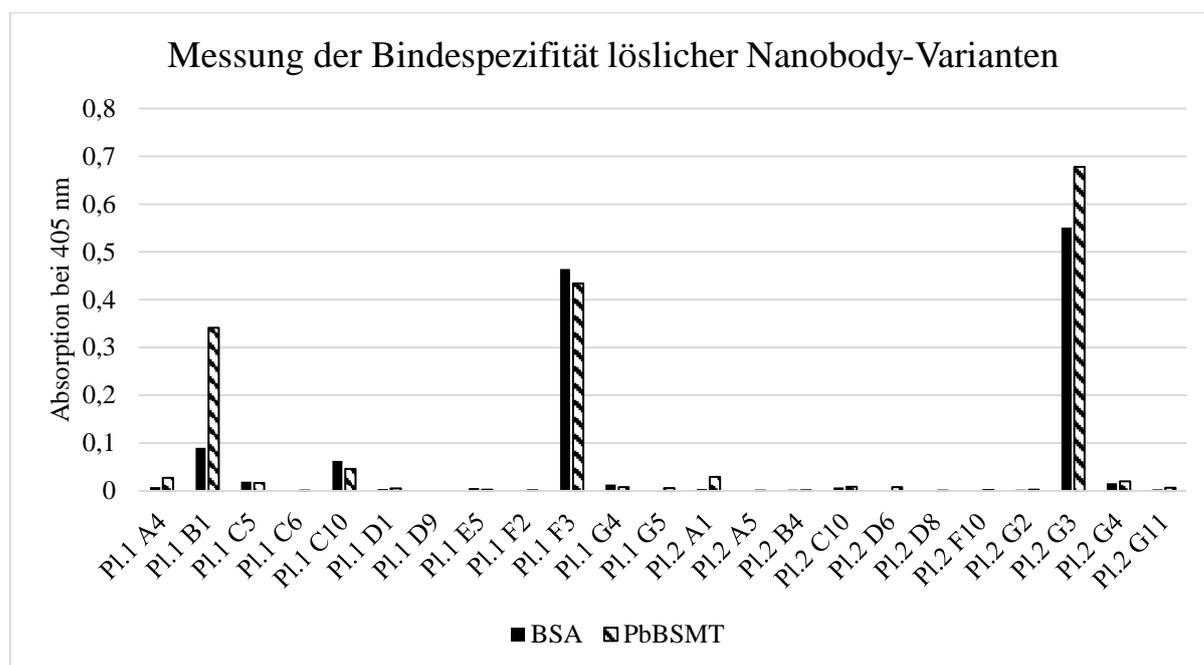


Abb. 22 Ausschnitt aus der Analyse des spezifischen Bindungsverhaltens ausgewählter anti-PbBSMT1-Nanobody-Varianten. Zur Einschätzung der Bindungsspezifität wurden potentiell bindende, vorselektierte Varianten hinsichtlich der BSA- bzw. PbBSMT1-Bindung untersucht. Der Klon B1 aus Platte 1 (1B1) zeigte als einziger Klon eine eindeutige Selektivität der Bindung. Während der PbBSMT1-Bindung erreichte dieser einen dreifach höheren Absorptionswert verglichen mit der Bindung gegenüber BSA.

Dazu wurden entsprechende Varianten mit spezifischem Signal mehrfach auf Kulturplatten vereinzelt, HB2151 Übernachtkulturen hergestellt und das Bindungsverhalten im ELISA überprüft (Daten nicht gezeigt). Nachdem sich eine reproduzierbare Signalstärke eingestellt hat, wurden diese Varianten sequenziert. Dadurch konnten potentiell doppelt auftretende Varianten ausgeschlossen und die Sequenz der randomisierten CDRs analysiert werden. Aus dem Pool erfolgversprechender Varianten wurden schließlich die Klone 1B1, 1A5, 8C4, 8A3, 7H4 und 8C3 näher charakterisiert. Alle ausgewählten Kandidaten des hier beschriebenen Nanobody-*screenings* enthielten die vollständige Nanobody-Sequenz.

Unterschiede zeigten sich erwartungsgemäß in den Sequenzen der CDRs (*complementarity determining regions*) (Abb. 23).

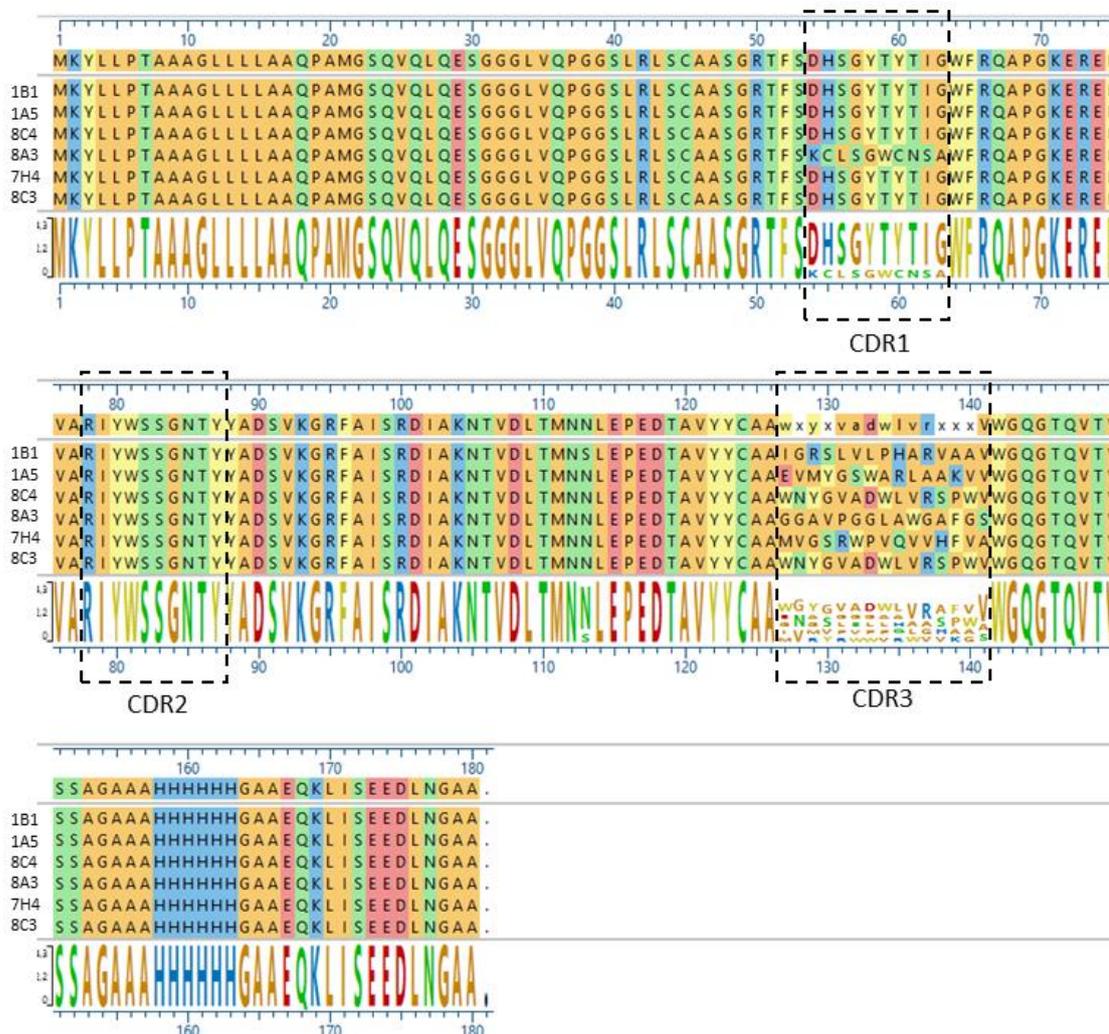


Abb. 23 Sequenzanalyse selektierter Nanobody Varianten. Die CDRs sind mit einer gestrichelten Linie eingerahmt. Innerhalb der CDR1 unterschied sich ausschließlich Variante 8A3 bezüglich der Sequenzabfolge. CDR2 war in allen analysierten Varianten unverändert. Die größten Unterschiede waren in CDR3 nachzuvollziehen. *Framework*-Regionen waren erwartungsgemäß nicht verändert. Der Sequenzvergleich belegte, dass alle sechs Klone unikal sind und keine identischen Klone selektiert wurden.

Alle analysierten Varianten zeigten unterschiedliche Aminosäuresequenzen in CDR3. Zusätzlich wurde ein Klon identifiziert, der eine abweichende Sequenz in CDR1 zeigte (Variante 8A3). Die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der CDRs resultierten in unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der Antikörpervarianten, die ihre Bindungsaffinität gegenüber einem bestimmten Epitop beeinflussen. Da zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden konnte, dass auch die pIII-Fusion eine Rolle bei der Antigenbindung spielt, wurden die Nanobody-Sequenzen der Kandidatenklone mit

5'- und 3'-Ende flankierenden Primern amplifiziert und in den bakteriellen Expressionsvektor pET22b(+)-c-Myc kloniert. Die kompatiblen Überhänge (*NcoI* / *NotI*) wurden mittels der verwendeten Primer erzeugt und das Zielplasmid durch Restriktion/Ligation konstruiert (Methoden 3.3.2). Die daraus resultierenden Expressionsvektoren wurden für die Transformation des *E. coli*-Stamms BL21(DE3) verwendet (Methoden 3.1.3).

Eine erfolgreiche Überexpression und anschließende Reinigung nach Standardprotokoll (siehe 3.4.5.2) konnte für die Varianten 8C4, 1B1 und 8A3 durchgeführt werden (siehe 3.4.5.2). Entsprechende Coomassiefärbungen bzw. Western Blots im Anschluss an die SDS-Page sind in Abb. 24 dargestellt. Die unspezifische Anfärbung aller Proteine des Rohextraktes bzw. der Elutionsfraktionen (Abb. 24 A) zeigte eine Anreicherung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 15 kDa. Durch Affinitätschromatografie wurden die Zielproteine erfolgreich isoliert. Anhand des Western Blot dieser Fraktionen wurde der c-Myc-Affinitäts-*tag* nachgewiesen. Dadurch zeichnete sich ein spezifisches Signal, ebenfalls auf Höhe des 15 kDa Markers, ab. Die hier nicht dargestellten Klone 1A5, 7H4, und 8C3 konnten nicht erfolgreich gereinigt werden, da diese entweder von Beginn an unlöslich waren oder nach 24h- Lagerung bei 4°C bereits ausgefallen waren. Aufgrund der daraus zu schließenden Instabilität dieser Varianten wurden sie von weiteren Experimenten ausgeschlossen.

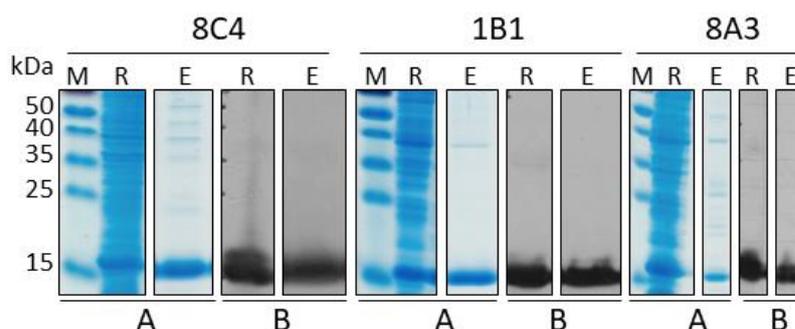


Abb. 24 Charakterisierung ausgewählter Nanobody Varianten auf Proteinebene. (A): Coomassie-Färbung der Proteine. Die Gegenüberstellung von Rohextrakt und Elution verdeutlicht die erfolgreiche Reinigung der Nanobody-Varianten, da in der Elutionsfraktion deutlich weniger unspezifische Proteine angereichert sind. (B): Detektion und Identifikation der überexprimierten und gereinigten Proteine durch anti-c-Myc Western Blot. Über den Western Blot und die Immundetektion des c-Myc-Tags wurde die Identität des Nanobodys (ca. 15kDa) nachgewiesen. M: Marker, R: Rohextrakt, E: Elution.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Bindungsparameter der gereinigten Nanobodies in Lösung untersucht. Dies erfolgte im Rahmen eines kompetitiven ELISA

(siehe 3.4.6), wodurch zusätzliche Schlüsse über die Bindungsstärke ausgewählter Nanobodies gezogen werden können.

In Vorbereitung auf dieses Konkurrenzexperiment wurden die Nanobody-Varianten mit unterschiedlichen Antigenkonzentrationen (0, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 5000, 10000 und 20000 nM) für 30 min bei 25°C vorinkubiert, bevor sie auf die beschichtete ELISA Platte übergeführt wurden. Eine ausreichend hohe Antigenkonzentration für die erfolgreiche Bindungshemmung wurde im Vorfeld experimentell ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte anhand eines Boltzmann-Fit und vorheriger Logarithmierung der Inhibitorkonzentrationen. Aus diesem Grund sind die Abszissen der K_D -Diagramme einheitenlos (Abb. 25). Für alle gezeigten Varianten (8C4, 1B1 und 8A3) ist ein Abfall des Kurvenverlaufs erkennbar. Für Variante 8C4 und 8A3 ist allerdings kein Nullpunkt abschätzbar.

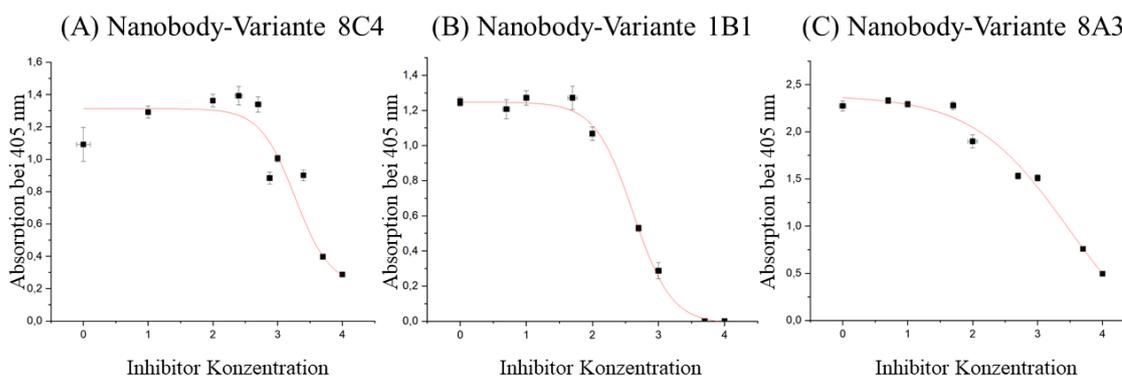


Abb. 25 Kompetitiver ELISA zur Charakterisierung der Interaktion zwischen Antigen (PbBSMT1) und Nanobody-Varianten in Lösung. Varianten 8C4 (A) und 8A3 (C) zeigen keine Annäherung an den Nullpunkt bei höheren Inhibitor Konzentrationen. Einzig die Variante 1B1 zeigt den typischen Abfall der Kurve und ließ damit als einzige Variante eine Bestimmung der Affinitätskonstante zu.

Variante 1B1 nähert sich im Bereich zwischen 5000 und 20000 nM einem Nullpunkt an. Für die anderen Varianten wären deutlich höhere Antigenkonzentrationen nötig gewesen, um eine erfolgreiche Inhibierung detektieren zu können. Aufgrund der geringen Bindungsaffinitäten der Varianten 8C4 und 8A3 wurden sie jedoch nicht weiterbearbeitet. Eine Bestimmung der Affinitätskonstante wurde nur für Variante 1B1 vorgenommen. Dabei wurde eine Antigenkonzentration von 50 ng/Kavität zum Beschichten der ELISA-Platte verwendet und Kompetitor (PbBSMT1) in Konzentrationen zwischen 100 nM und 20 μ M eingesetzt. Die Messwerte (siehe Tabelle A 2) erreichen ein Absorptionsmaximum von 1,072 ohne Inhibitor. Bei der höchsten Konzentration (10000 nM) wurde ein Messwert von 0,002 erreicht.

Ein Plot der Messwerte wie oben beschrieben, führt zu dem Bild einer sigmoidal verlaufenden Kurve (Abb. 26). Die resultierende Gleichung $Y = A2 + \frac{A1-A2}{1+\exp(\frac{x-x_0}{dx})}$ erlaubt eine Annäherung an den Wert, an dem eine halbmaximale Substrathemmung stattfindet. Da die Konzentrationen vor dem Plot zur Basis 10 logarithmiert wurden ergibt sich ein Wert $x_0 = 2,78013$. Entsprechend der Umkehrfunktion konnte eine InhibitorKonzentration von ca. 600 nM (± 42) berechnet werden.

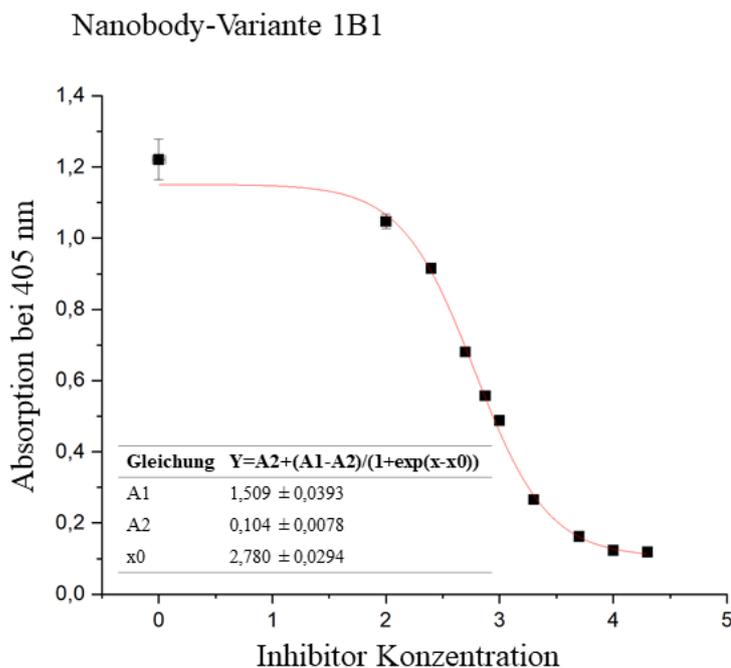


Abb. 26 Grafische Darstellung der Ergebnisse eines Kompetitions-ELISA, zur Ermittlung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante von Nanobody-Variante 1B1. Eine halbmaximale Inhibierung der Antigenbindung (x_0) wurde an dem Achsenwert 2,78 (Inhibitor Konzentration) erreicht. Werte der x-Achse wurden vor dem Fit zur Basis 10 logarithmiert. Nach der Rückrechnung ($x=10^{2,78}$) ergibt sich ein Wert von 602 nM. Dieser Wert entspricht der Gleichgewichtsdissoziationskonstante. Auf der y-Achse sind Absorptionswerte bei 405 nm dargestellt.

4.3.2 Selektion von Nanobodies durch Bindung an ein Einzelpeptid.

Struktur- und Sequenzanalysen weisen darauf hin, dass die Pathogen-Methyltransferase PbBSMT1 Homologien zum pflanzlichen Pendant aufweisen. Dadurch besteht ein gewisses Risiko, dass zukünftige Abbaukonstrukte auch zur Degradation pflanzeigener Methyltransferasen führen könnte. Damit sich die Chancen auf einen hoch selektiven Binder erhöhen, wurde ein unikalere Sequenzbereich von PbBMST1 für die Synthese eines Peptids ausgewählt, synthetisiert und anhand dieses Einzelpeptides ein weiteres Phagen-Display durchgeführt.

4.3.2.1 Auswahl eines Peptides

Um Kreuzreaktionen zwischen neu selektierten VHHs/scFvs mit pflanzenspezifischen Methyltransferasen und *in planta* zu minimieren, wurde eine unikale Peptidsequenz für die Antikörperselektion ausgewählt. Als Hilfestellung wurden bereits publizierte und validierte Sequenzvergleiche (Abb. 27 A) verwendet (145). Zu den untersuchten Methyltransferase-Vertretern gehören Varianten aus Mais (*Zea mays*), Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), Feenfächer-Clarkie (*Clarkia breweri*) und *Plasmodiophora brassicae*. Diese Auswahl deckte einerseits Mono- und Dikotyledonen ab und bildet andererseits mit *Arabidopsis* einen Vertreter der Kreuzblütengewächse ab – dem Hauptwirt von *Plasmodiophora brassicae*. Dadurch ist ein modellhaftes Spektrum von Organismen abgedeckt in denen Kreuzreaktionen mit einem anti-MT Antikörper denkbar sind. Neben der Aminosäuresequenz linearer Peptide spielen Strukturelemente eine wesentliche Rolle bei der Paratopbindung. Aus diesem Grund wurde als zweite Bedingung für die Peptidwahl die Ausbildung einer Sekundärstruktur gestellt.

Die grafische Darstellung des Sequenzvergleichs (Abb. 27A) zeigt Übereinstimmungen in den Sekundärstrukturelementen zwischen den analysierten Methyltransferasen unterschiedlicher Species. Strukturelemente sind durch Zylinder mit der Bezeichnung α (Alpha-Helix) und hellblauen Pfeilen mit der Bezeichnung β (Beta-Faltblatt) gekennzeichnet. Die Identität dieser Strukturelemente wurde abgesehen von PbBSMT1 bereits experimentell bestätigt. Eine *in silico* Strukturvorhersage auf Grundlage der PbBSMT1 Sequenz wurde mittels I-TASSER (146-148) durchgeführt. Diese Berechnungen haben eine monomere Struktur, wie in Abb. 27 B dargestellt ergeben. Ein Vergleich dieses 3D-Modells mit den Sequenzvergleichen aus Abb. 27 A zeigte eine α -Helix an Position 319–340 der PbBSMT1-Sequenz. Die Sequenzunterschiede gegenüber den pflanzlichen Varianten qualifizierten diesen Abschnitt als guten Kandidaten für das Antikörper-*screening*. Zur weiteren Validierung wurde dieser Bereich isoliert betrachtet und hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer α -Helix, und der Lösungsmittelzugänglichkeit über den Jpred 4-Server (149) untersucht. Entsprechend der Berechnungen wurde eine relativ gute Lösungsmittelzugänglichkeit vorhergesagt. Diese Schlussfolgerung basiert auf Berechnungen von Jnet0, Jnet_5 und Jnet_25 (Abb. 27 C). B steht dabei für *burial* und gibt an, welche Aminosäuren entweder nicht (0%), 5% oder 25%

lösungsmittelzugänglich sind. Sieben der 21 ausgewählten Aminosäuren sind also bedingt zugänglich, während ein Großteil (66%) der ausgewählten Aminosäureseitenketten lösungsmittelzugänglich ist. Eine potentielle Epitopbindung an diesen Sequenzbereich ist somit theoretisch möglich und sollte aufgrund der Lage des Peptides in der Gesamtstruktur (Abb. 27 B) nicht sterisch behindert werden. Begünstigend auf das *screening* wirkt sich außerdem der Anteil potentiell immunogener Aminosäuren (Arginin, Asparagin, Asparaginsäure und Lysin) aus (150).

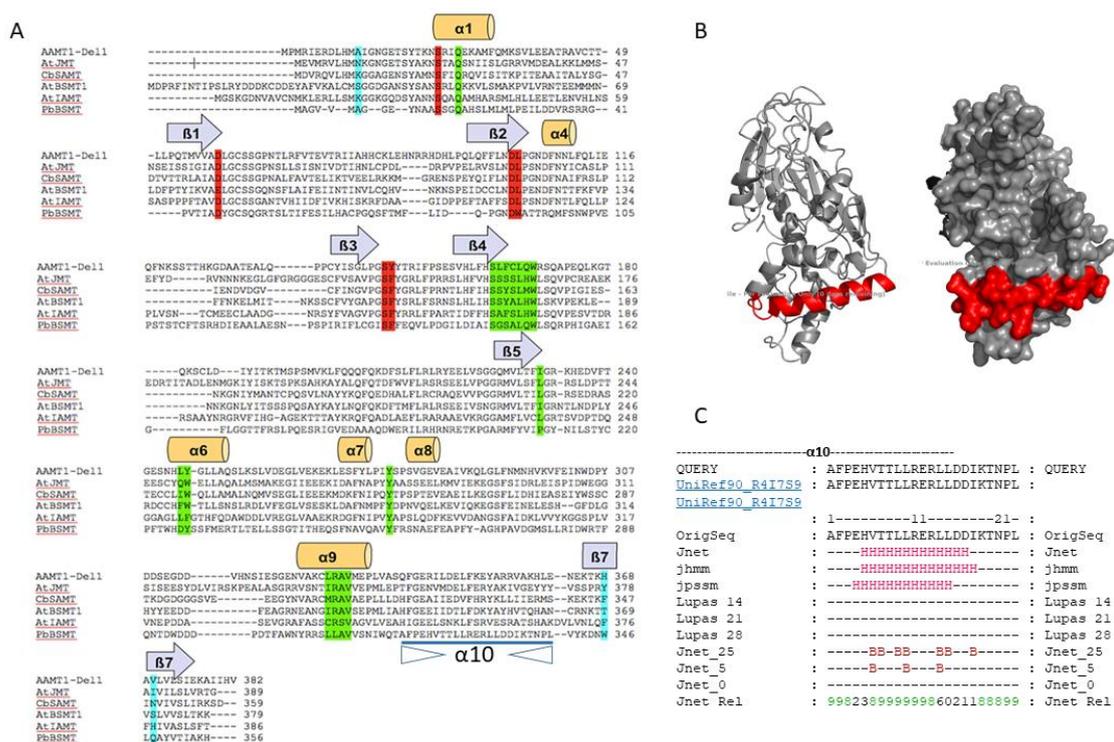


Abb. 27: Auswahl eines Peptides auf Basis von Sequenz- und Strukturdaten. (A): Sequenzvergleich von Methyltransferasen der SABATH- Gruppe aus sechs verschiedenen Spezies. AAMT, Mais Anthranilsäure Methyltransferase; AtJMT, *Arabidopsis thaliana* Jasmonsäure Methyltransferase; CbSAMT, *Clarkia breweri* Salicylsäure Methyltransferase; AtBSMT1, *Arabidopsis thaliana* Salicylsäure / Benzoesäure Methyltransferase; AtIAMT, *Arabidopsis thaliana* Indole-3-Essigsäure (IAA) Methyltransferase; PbBSMT1, *Plasmodiophora brassicae* Salicylsäure/Benzoesäure/Anthranilsäure-Methyltransferase. Gemeinsame Sekundärstrukturelemente sind mit α (Alpha Helix) und β (β -Faltblatt) gekennzeichnet und durchnummeriert. $\alpha 10$ entspricht mit ca. 21 AS der längsten Alpha Helix. Abbildung modifiziert nach Ludwig- Müller und et al. 2015 (144). (B): Berechnete Raumstruktur des PbBSMT1 Monomers. In Rot dargestellt ist $\alpha 10$. Das abgebildete Strukturmodell wurde mittels I-TASSER berechnet (146-148). Als Berechnungsgrundlage diente die PbBSMT1 Raumstruktur Daten von CbSAMT (PDB Code: 3B5I). (C): Sekundärstrukturanalyse und Evaluierung der Lösungsmittelzugänglichkeit anhand der Aminosäuresequenz von PbBSMT1, zur Bestätigung der ausgewählten Zielstruktur ($\alpha 10$). Die Berechnungen wurden mit Jpred 4 durchgeführt (149).

4.3.2.2 Anreicherung von PbBSMT1-Peptid spezifischen Nanobodies

Auf Basis des synthetisierten Peptides werden drei aufeinander folgende Runden Phagen-Display durchgeführt. Die verwendete Methode wurde im Methodenteil (siehe 3.1.6) beschrieben, allerdings erfolgte die Beschichtung anhand von Streptavidin-beschichteten ELISA-Platten und dem synthetisierten, Biotin-konjugierten $\alpha 10$ -Peptid. Die Beschichtung erfolgte mit 1mM $\alpha 10$ -Biotin für 2h bei Raumtemperatur. Alle weiteren Schritte erfolgten, wie bereits beschrieben, unter Verwendung der Nanobody-Phagenbänke SLL, GLL und TLL (siehe 3.1.6 bzw. 4.3.1.). Der Phagentiter der ersten Runde betrug $1,2 * 10^5$ CFU/mL. Die zweite Selektionsrunde wurde genutzt, um andere Blockierreagenzien nach der Antigenbeschichtung zu verwenden. Eingesetzt wurde BSA und in einem separaten Ansatz die Blockierreagenz RotiBlock®. Nach der zweiten Runde Phage Display wurden $5,7 * 10^8$ CFU/mL (PVA/PVP) bzw. $3,2 * 10^7$ CFU/mL (RotiBlock®) berechnet. Es zeichnete sich also eine sukzessive Anreicherung potentiell bindender Phagen ab. Die dritte Runde erfolgte ebenfalls entweder mit BSA-Blockierung oder mit dem Analogon, welches in diesem Fall eine Mischung zu gleichen Anteilen der synthetischen Polymere PVP/PVA (Polyvinylpyrrolidon/Polyvenylalkohol) war.

4.3.2.3 Screening angereicherter Nanobody-Varianten

Die hohe Anzahl potentieller Binder aus dem Phagen-Display wurde hinsichtlich ihrer unspezifischen Bindung an das entsprechenden Blockierungsmittel weiter eingeschränkt. Dieser Schritt sollte verhindern, dass Klone, die mit BSA oder PVP/PVA interagieren, zukünftig mitgeführt werden. Dazu wurden zwei unabhängige ELISA durchgeführt, die der Identifikation von BSA-Bindern bzw. der Identifikation von PVP/PVA-Bindern dienen. Die Analyse von insgesamt 188 Kandidaten ergab Absorptionswerte zwischen 0,1 und 2,4. Insgesamt 73 Kandidaten (40 aus dem BSA- und 33 aus dem PVP/PVA- abhängigem Phagen-Display) mit einem Absorptionswert (A_{405}) unterhalb von 0,3 wurden für weitere Experimente ausgewählt (Abb. 28).

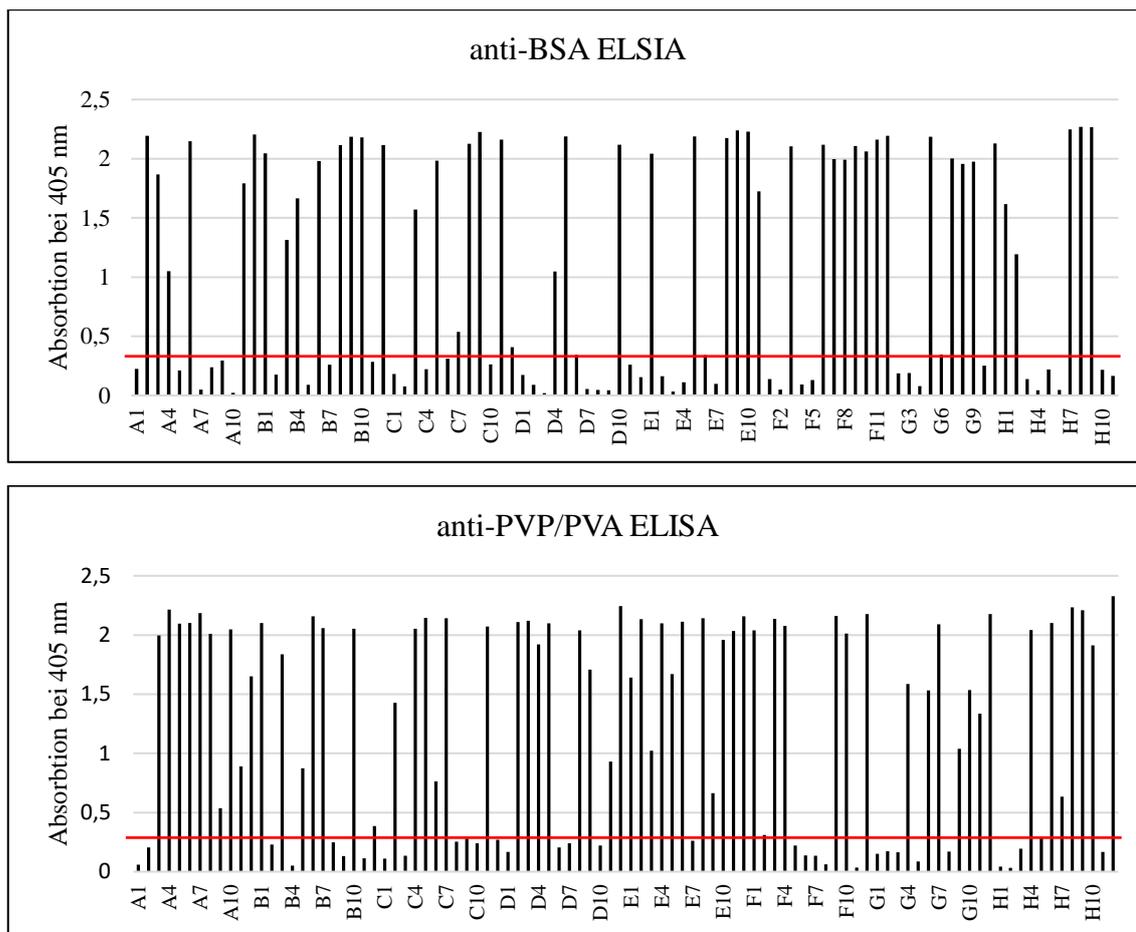


Abb. 28: Spezifitätsanalyse selektierter Nanobodies. Eine Auswahl von 92 (BSA)- und 96 (PVP/PVA)-Kandidaten wurde hinsichtlich unspezifischer Bindungseigenschaften gegenüber der verwendeten Blockierlösung getestet. Im entsprechenden ELISA wurde anstelle des α -10 Peptides, 100 ng/Kavität BSA bzw. eine Lösung des gleichanteiligen PVP/PVA-Gemischs zum Beschichten der Maxi-Sorp Platten verwendet.

Der Negativ-Selektion folgte eine positive Selektion hinsichtlich der Bindungsstärke gegenüber dem Antigen (PbBSMT1). Aufgrund der geringen Größe des Peptides fielen die elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Oberfläche einer ELISA-Platte (Polystyrol) zu gering aus. Um eine Bindung zu ermöglichen, wurden biotinylierte Peptide und Streptavidin-beschichtete ELISA Platten verwendet. Die biotinylierten Antigene binden entsprechend gerichtet und hochaffin an die Oberfläche der Versuchsmatrix. Eine grafische Darstellung der ELISA-Messwerte zeigt ein stark variierendes Bindeverhalten einzelner Varianten (Abb. 29). Insgesamt wurden für 73 Kandidaten relative Absorptionswerte zwischen 0,2 und 2,3 gemessen. Zur weiteren Eingrenzung potentieller Binder wurden alle Varianten mit einem relativen Absorptionswert von $\geq 1,1$ ausgewählt. Die daraus resultierenden 40 Kandidaten wurden mittels kompetitivem ELISA (3.4.6) analysiert.

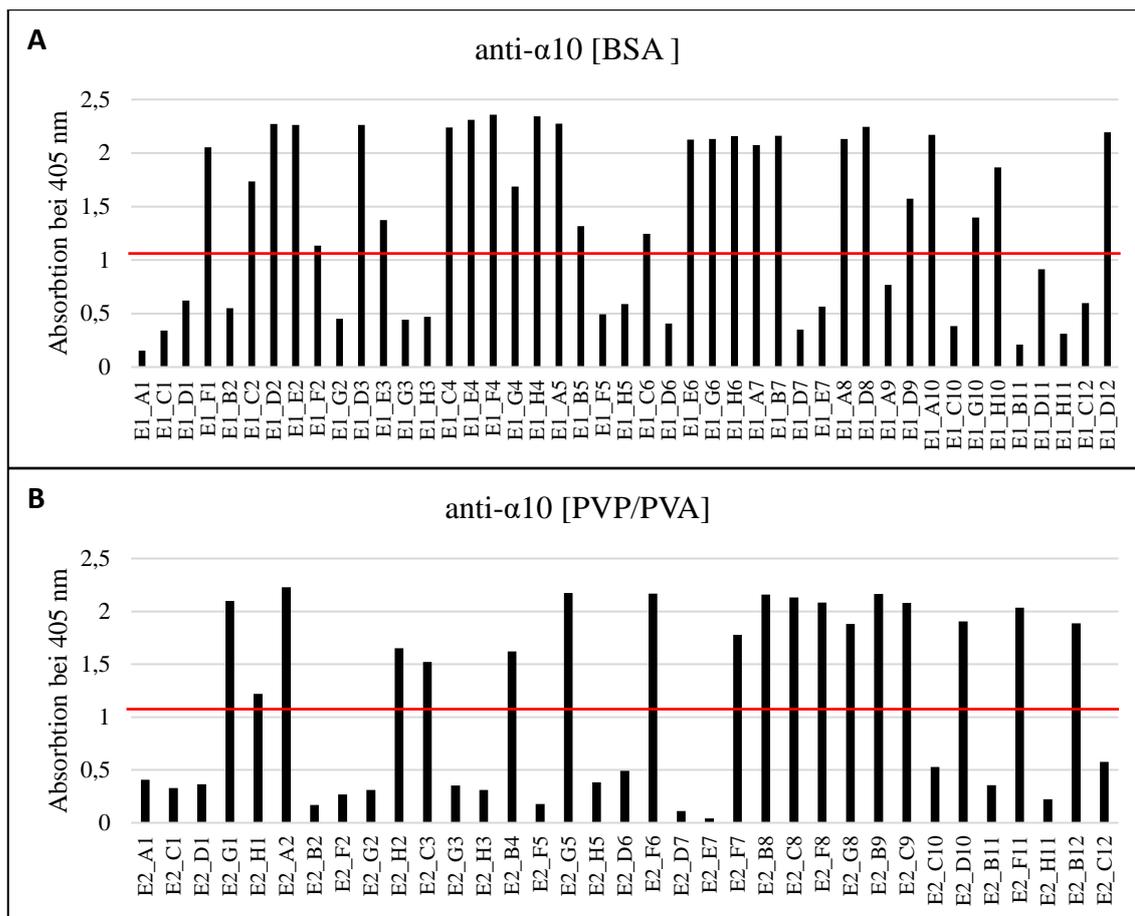


Abb. 29: ELISA zur Charakterisierung der Interaktion zwischen Nanobody-Varianten und dem Einzelpeptid α 10. (A): Ergebnis aller Kandidaten die während des Phagen-Displays mit BSA basierten Blockier Lösungen angereichert wurden. (B): Ergebnis aller Varianten, die aus PVP/PVA- blockierten Phagen-Display stammen. Alle Varianten mit einem relativen Absorptionwert $\geq 1,1$ wurden für weitere Analysen verwendet, die übrigen Varianten wurden nicht weiterbearbeitet.

Durch den Wettbewerbsassay wurde neben der Bindespezifität auch das Bindeverhalten in Lösung charakterisiert. Streptavidin-ELISA-Platten wurden mit 50 ng des α 10 Peptides/Kavität beschichtet. Freie Bindestellen wurden über 2h bei Raumtemperatur mit einer 3%igen BSA Lösung blockiert. Im Unterschied zu den bisher dargestellten ELISA-Varianten, wurden für dieses Experiment 45 μ L einer Phagen Suspension, einheitlich mit 45 μ L einer 1% BSA Lösung mit 20 μ M des α 10-Peptids gemischt (10 μ M Endkonzentration) und 30 Minuten vorinkubiert. Speziell im Vergleich zum bereits durchgeführten Wettbewerbs-ELISA (siehe 3.4.6) für die Nanobodies 1B1, 8A3 und 8C4 (siehe 4.3.1.2) entfällt hier ein Konzentrationsgradient zugunsten einer größeren Versuchsgruppe. Parallel dazu findet dieselbe Vorinkubation ohne Peptid in einem Kontrollansatz statt. Die Nachweisreaktion und das Auslesen der Platte erfolgen wie bereits beschrieben. Die Visualisierung der Daten legt keine wesentlichen Unterschiede

zwischen Konkurrenz und Kontrollversuch offen (Abb. 30). Entgegen der Erwartung ließ keine der 40 potentiellen Varianten eine Inhibierung der Bindung unter den verwendeten Versuchsparametern zu. Von einer starken Protein-Interaktion der Bindepartner in Lösung kann nicht ausgegangen werden.

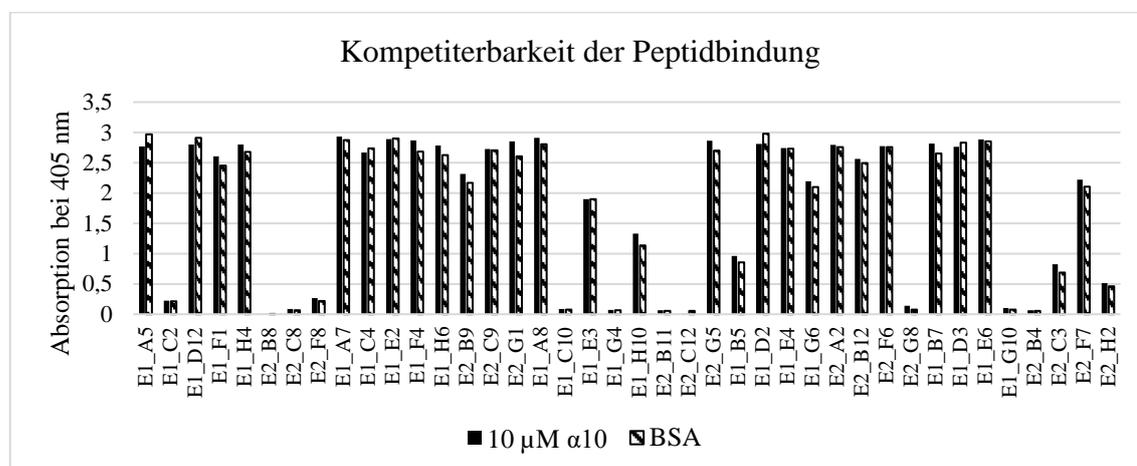


Abb. 30: Konkurrenzexperiment zur Charakterisierung des Bindevhaltens von Nanobody-Varianten gegenüber dem α 10-Peptid in Lösung. Schwarze Balken repräsentieren Messwerte die durch Vorinkubation mit 10 μ M des α 10-Peptids erzielt wurden. Gestrichelte Balken bilden die Vergleichsgruppe. Anstelle des Kompetitors wurde dabei eine 1% BSA in PBST Lösung ohne Kompetitor vorinkubiert. Keine der analysierten Varianten zeigt ein verändertes Bindevverhalten. Damit ist nicht von einer spezifischen Bindung auszugehen.

Um dennoch herauszufinden, ob einer der angereicherten Kandidaten unabhängig von der Bindungsstärke mit dem Volllängenprotein reagiert, wurde ein indirekter ELISA durchgeführt. Wie in Methodenteil beschrieben (siehe 3.4.6) wurde dafür mit 100 ng gereinigtem PbBSTM1 pro Kavität beschichtet, 90 μ L der Phagensuspension zugegeben und eine potentielle Bindung durch die Detektion des *c-Myc-tags* nachgewiesen. Als Referenz wurde der stärkste Binder aus dem *screening* gegen das Volllängenprotein (Variante 1B1, siehe 4.3.1) mitgeführt. Die im Diagramm (Abb. 31) aufgetragenen Messwerte wurden eine Stunde nach der Zugabe des Nachweis-Substrates erhoben. Zu diesem Zeitpunkt war das Signal der Variante 1B1 übersättigt und hatte das obere Detektionslimit überschritten. In dieser Zeit entwickelten die Peptidbinder relativ homogene Messwerte zwischen 0,120 und 0,197, was keiner eindeutigen Interaktion mit dem Volllängenprotein entsprach.

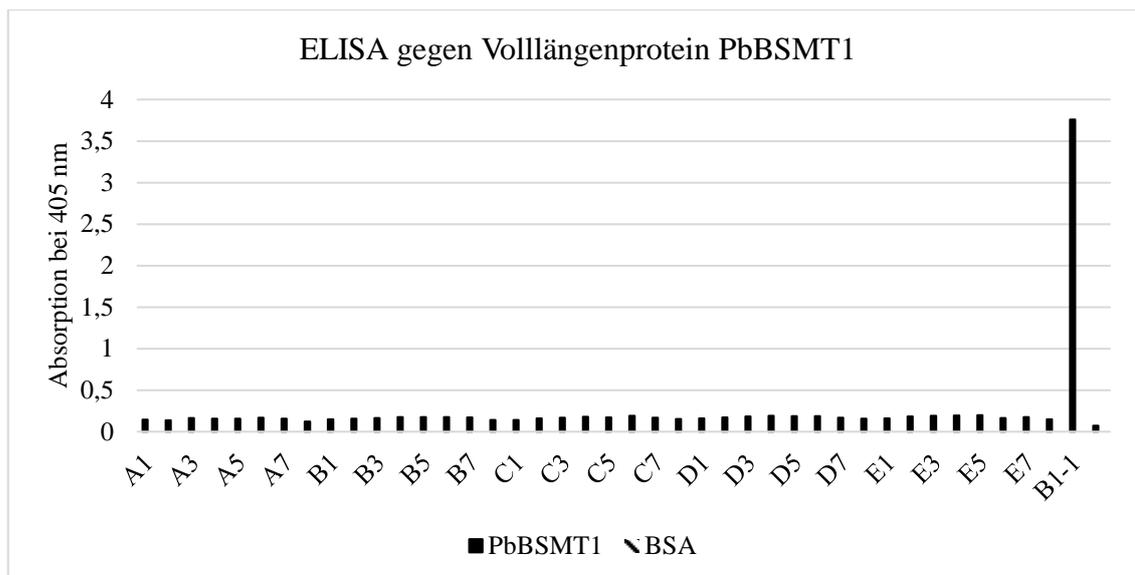


Abb. 31: Charakterisierung der Bindung des Volllängenproteins PbBSMT1 von Varianten die mit dem peptidbasierten *screening*-Verfahren gewonnen wurden. Das Bindungsverhalten von Kandidatenklonen aus dem peptidbasierten *screening* wurde anhand eines indirekten ELISA analysiert. Ein Vergleich mit dem Referenz-Kandidaten (1B1), zeigte keine der Varianten ein Signal vergleichbarer Intensität.

Besonders im Vergleich mit dem Referenzantikörper (1B1) fielen Messwerte für die Bindungsstärke äußerst gering aus. Aufgrund dieses negativen Versuchsergebnisses wurden weitere Versuche, Nanobodies auf Basis eines einzelnen Peptides zu charakterisieren oder zu selektieren, eingestellt.

4.3.3 Selektion von Antikörpern gegen PbBSMT1 mittels Peptidarray

Im Vergleich zu dem vorherigen Selektionsverfahren wurde in diesem Ansatz eine Peptid-Bibliothek verwendet. Bei dieser Herangehensweise wurden mehrere ausgewählte Peptide auf eine Trägermatrix synthetisiert und diese für das *screening* verwendet. In der folgenden Strategie zur Gewinnung von spezifischen Bindeproteinen wurde auf eine Vielzahl verschiedener PbBSMT1-Peptide anstelle des Volllängenproteins zurückgegriffen. Zu diesem Zweck wurden einzelne Peptidsequenzen, welche oberflächenexponierte Areale des nativen Proteins repräsentieren, auf einer Trägermatrix synthetisiert (Prof Armin Djamei, Universität Bonn). Aufgrund von Einschränkungen des technischen Verfahrens der Peptidsynthese war die Anzahl der möglichen Peptide pro Träger auf maximal $n=30$ limitiert. Zusätzlich war nur die Synthese von maximal 19 aufeinander folgenden AS möglich, wobei nur bei einer Anzahl von maximal 15 AS eine fehlerfreie Synthese gewährleistet war. Die Peptidsequenzen wurden so gewählt, dass sie sich immer 4-7 AS des C-Terminus mit dem N-Terminus des Nachfolgers überlappen (siehe

Tabelle A 3). Dadurch werden interne AS auch N-terminal präsentiert. Bestimmte Sequenzbereiche, die eventuell aufgrund unterschiedlicher AS-Seitenketten maskiert sind, werden somit ebenfalls abgebildet. Das Antigen (PbBSMT1) hat eine Gesamtlänge von insgesamt 356 Aminosäuren. Unter den gegebenen Voraussetzungen und mit einer Überlappung von 5 Aminosäuren am N-terminalen Ende, wurden mit jedem Peptid immer 10 individuelle Aminosäuren dargestellt. Um die Kapazität der verfügbaren Trägermatrix optimal auszunutzen, mussten Einschränkungen der verwendeten Sequenzabschnitte gemacht werden. Eine Auswahl der Peptide wurde auf Basis der folgenden rationalen Gründe durchgeführt.

4.3.3.1 Auswahl einer Gruppe von Peptiden für das Peptidarray

Neben der Lösungsmittelzugänglichkeit ist die Exposition von Sekundärstrukturen an der Moleküloberfläche ein wichtiges Kriterium für Proteininteraktionen. Für die Selektion entsprechender Sequenzabschnitte wurden *in silico* Strukturanalysen des Zielproteins mit Hilfe des I-TASSER-Servers durchgeführt (146-148). Zusammen mit den Sekundärstrukturdaten auf Grundlage der Aminosäure-Sequenz (Abb. 27) wurden relevante Module entsprechend ihrer Lage definiert.

Unzugängliche Sequenzbereiche wurden von der PeptidAuswahl ausgeschlossen. Auf dieser Grundlage ausgewählte Peptide sind der zu entnehmen. Eine Visualisierung der Bereiche im Kontext der Gesamtproteinsequenz ist in Abbildung A 10 dargestellt. Die Länge der Sequenzabschnitte wurde manuell an Sekundärstrukturelemente angepasst, damit α -Helices möglichst unterbrechungsfrei und vollständig abgebildet werden. Es resultieren Längen von 13-19 Aminosäuren. Der überwiegende Anteil überschreitet die empfohlene Länge von 15 AS nicht. Damit die erste α -Helix vollständig abgebildet werden konnte, wurde in diesem Fall ein längerer Abschnitt (19 Aminosäuren) gewählt.

4.3.3.2 Anreicherung von scFv-Varianten anhand einer Peptidmatrix

Zum Versuchszeitpunkt stand neben der Nanobody-Bibliothek zusätzlich die scFv-Phagen-Bibliothek „Tomlinson-Libraries A + B“ zur Verfügung. Da in der Vergangenheit ebenfalls spezifische Antikörpervarianten anhand dieser Phagen-Bank selektiert werden konnten, um die Diversität potentieller Binder zu erhöhen, wurde das folgende *screening* mit diesen Banken durchgeführt. Das *screening* erfolgte unter Verwendung der bereitgestellten Peptidmatrix (Prof. Dr. Armin Djamei von der Universität in Bonn), deren Beladung in Abschnitt 4.3.3.1 erläutert wurde. Methodische

Abweichungen zum klassischen Phagen-Display wurden in Abschnitt 3.1.6 erläutert. Die Phagentiter nach jeder Runde betrug 5×10^8 , $3,5 \times 10^8$, 6×10^8 und 3×10^8 . 184 Klone wurden nach der 4. Runde gepickt und lösliche scFv sowie Phagen von jedem Klon erzeugt. Durch Phagen-ELISA wurden mögliche spezifische Binder identifiziert.

4.3.3.3 Charakterisierung einzelner scFv-Kandidaten

Aus dem *screening* der scFv-Phagenbanken (Tomlinson A+B) mit Hilfe des Peptid-Arrays gingen fünf potentielle Kandidatenklone hervor, die spezifisch mit dem Gesamtprotein reagieren (Daten nicht gezeigt). Mittels Sequenzanalyse wurden für alle Kandidaten UAG-Stopcodons an verschiedenen Positionen innerhalb der Proteinsequenz identifiziert. Um einen durchgängigen Leserahmen für die Proteinexpression außerhalb von non-Suppressor *E. coli*-Stämmen zu ermöglichen, wurden entsprechende Sequenzbereiche mutiert (von UAG zu CAG). Dies erfolgte über geschachtelte PCR mit sequenzspezifischem Primern (siehe 3.2.2). Eine erneute Sequenzierung bestätigte den Mutageneseerfolg und zeigt unterschiedliche Aminosäureabfolgen innerhalb der CDRs verschiedener scFv-Varianten (Abb. 32). Eine detaillierte Darstellung einzelner CDRs im Kontext der Framework-Regionen befindet sich in Tabelle A 1.

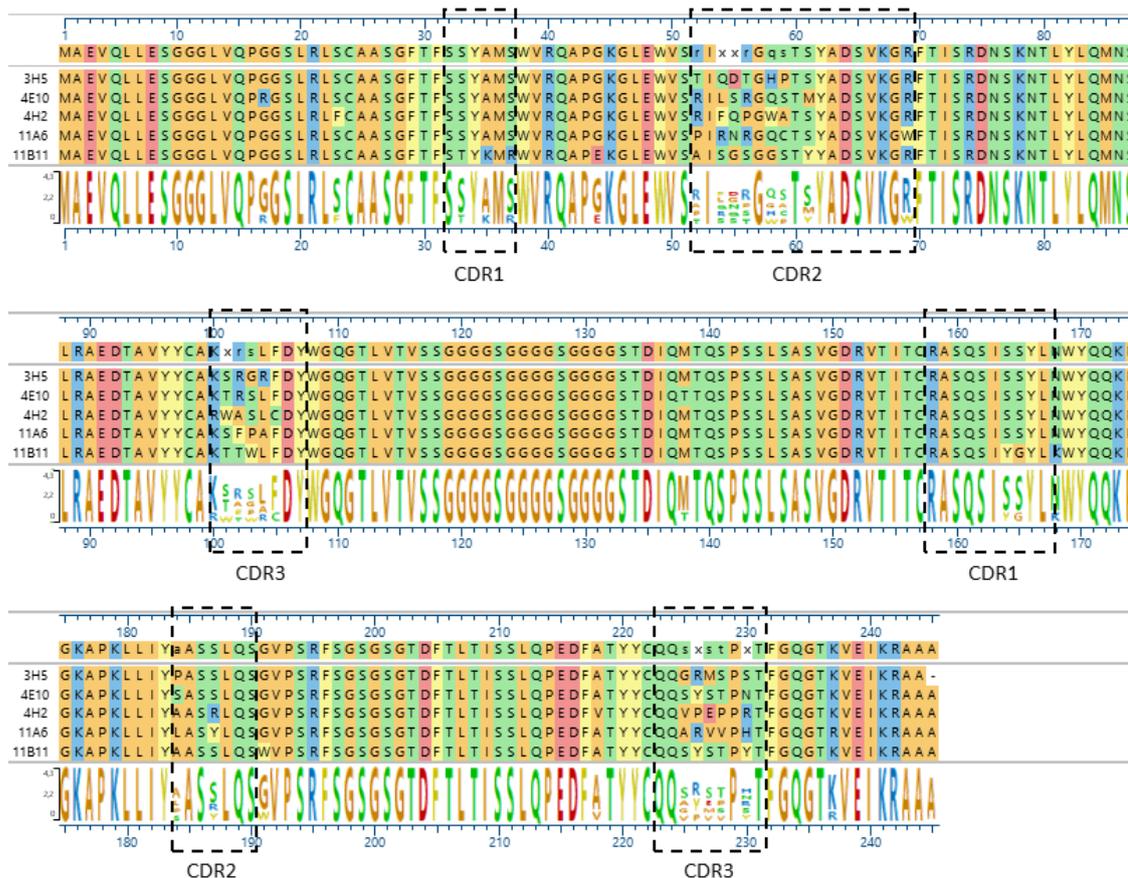


Abb. 32 Sequenzanalyse ausgewählter scFv-Varianten des anti-Peptid-Bibliothek Phagen-Displays. Die anhand der Sequenzdaten erstellte Grafik bestätigt, dass alle Amber-Stop Mutationen erfolgreich bereinigt wurden. Erwartungsgemäß unterschieden sich die Sequenzen vorrangig in den CDR-Regionen. Bis auf wenige Ausnahmen waren die *Framework*-Regionen nicht mutiert.

Die verschiedenen scFv-Sequenzen wurden in den Expressionsvektor pET22b(+)-cMyc kloniert, heterolog in *E. coli* exprimiert und funktionell durch einen indirekten ELISA geprüft (Methoden 3.4.6). Als Antigen wurde gereinigtes PbBSMT1 (Volllängenprotein) verwendet. Dabei erfolgte die Adsorption des gereinigten Antigens an die Oberfläche der ELISA-Platten, während die scFvs in Form ungereinigter periplasmatischer Extrakte (Methoden 3.4.5) analysiert wurden. Dieser experimentelle Aufbau erlaubt eine erste Einschätzung des Bindungsverhaltens einzelner scFv-Varianten mit dem entsprechenden Antigen ohne vorherige Proteinreinigung. Die grafische Zusammenfassung der Absorptionswerte zeigte, dass alle Varianten mit dem Antigen spezifisch reagieren (Abb. 33). Die Varianten 3H5, 4H2 und 11B11 zeigten die höchsten Signale.

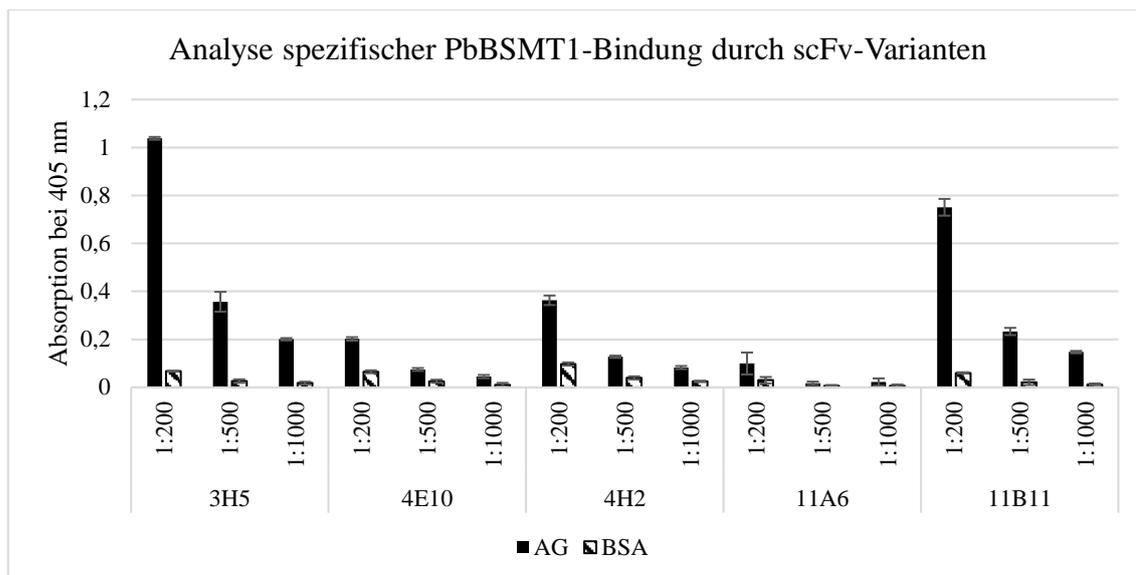


Abb. 33: Analyse der Bindungseigenschaften einzelner Klone. Untersuchung von fünf Varianten hinsichtlich ihrer Antigenbindung. Die Messwerte des indirekten ELISA zeigen die Interaktion zwischen immobilisiertem PbBSMT1 (Volllängenprotein, 50 ng/Kavität) und periplasmatischen Extrakten der Expressionskulturen. Eine Einschätzung der Bindungsspezifität, wurde durch BSA-Bindung untersucht. Extrakte wurden in drei Verdünnungsstufen aufgetragen (1:200; 1:500 und 1:1000) um einen linearen Messbereich abzudecken. Die Varianten 3H5; 4E10; 4H2 und 11B11 zeigten spezifische, konzentrationsabhängige Signale. 3H5 und 11B11 vermittelten die stärksten Signale und wurden im Folgenden näher untersucht.

Weiterhin wurde die Identität der Proteine mittels Western Blot bestätigt (Abb. 34). Für beide Varianten 3H5 und 11B11 wurden Banden unterhalb des 35 kDa bzw. oberhalb des 25 kDa Markers nachgewiesen. Dies entspricht dem berechneten Molekulargewicht von ca. 28 kDa für scFvs. Dieses Versuchsergebnis erlaubt den Rückschluss auf einen korrekten Leserahmen des exprimierten Proteins. Die scFv-Varianten 3H5 und 11B11 wurden in voller Länge durch das gewählte Expressionsformat synthetisiert. Im Anschluss an diese Vorexperimente wurden die entsprechenden Varianten gereinigt und für eine genauere Charakterisierung des Bindungsverhaltens verwendet.

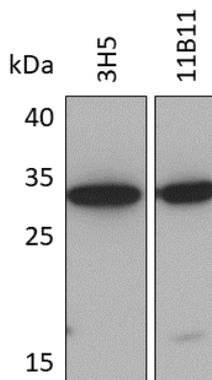


Abb. 34: Bestätigung der Proteinidentität selektierter scFv-Varianten. Die molekulare Identität der getesteten scFv-Varianten wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot bestätigt. Die Varianten 3H5 und 11B11 zeigen Signale in Höhe des berechneten Molekulargewichtes von ca. 28 kDa. Verwendet wurden periplasmatische Extrakte aus Abb. 33. Aufgetragen wurden 10 μ g denaturierter Proteinextrakt in einem diskontinuierlichen 10% PAA- Gel. Der Nachweis erfolgte über anti-c-Myc-Antikörper (primär) und anti-Maus ECL-Antikörper (sekundär).

Die Reinigung erfolgte mittels Protein-L-Dynabeads (siehe 3.4.5.2.1). Aus den verwendeten periplasmatischen Extrakten der Expressionskulturen konnten Elutionsfraktionen mit Konzentrationen von ca. zu $1\mu\text{g} / \mu\text{L}$ erzielt werden. Die Einschätzung der Reinigungsqualität erfolgte durch SDS-PAGE und Western Blot. Die Reinigungsqualität wird exemplarisch für Variante 3H5 gezeigt (Abb. 35). Ein Vergleich der Reinheit einzelner Fraktionen ist durch die Coomassie-Färbung des Gesamtproteinanteils der Fraktionen gezeigt (Abb. 35 A). Sedimentiertes Zellmaterial der Expressionskultur bildet die unlösliche Fraktion. Dieses Material wurde nicht für die Reinigung verwendet. Die lösliche Fraktion zeigte durch die deutlich geringere Konzentration eine schärfere Abgrenzung einzelner Proteine. Neben den aufgeschlossenen Proteinen des Wirtsstammes zeichnete sich bereits deutlich das Zielprotein auf Höhe unterhalb des 35 kDa Markers ab. Die Fraktion mit gereinigtem Protein zeigte eine solitäre Bande unterhalb des 35 kDa Markers. Da keine weiteren Banden innerhalb dieser Fraktion erkennbar waren, kann von einer hochreinen Proteinfraktion ausgegangen werden. Diese entspricht ungefähr den berechneten 28 kDa der scFv-Variante. Zur Bestätigung der Identität des Zielproteins wurden die gleichen Fraktionen im Western Blot analysiert (Abb. 35 B). Auf Höhe des 35 kDa Markers ist bei allen drei Fraktionen ein starkes Signal vorhanden. Zusätzlich sind weitere Signale zwischen dem 55 kDa und dem 70 kDa Marker sowie oberhalb des 170 kDa Markers in der unlöslichen Fraktion erkennbar. Diese Größen entsprechen in etwa dimeren (~ 56 kDa) Aggregaten der scFvs. Multimere Strukturen gereinigter scFvs wurden häufiger

beobachtet (151). Das Signal oberhalb des 170 kDa Markers repräsentiert hochmolekulare Proteinaggregate, die das Auflösungsvermögen des Trenngels überschreiten und sich am Phasenübergang akkumulieren. Die lösliche Fraktion zeigte im Vergleich dazu schwächere Signale zwischen 55 kDa und dem 70 kDa. Zusätzlich ist ein Signal zwischen dem 15 kDa und dem 25 kDa Marker erkennbar. Diese Proteinfragmente können aufgrund von Strukturinstabilität auftreten oder das Ergebnis von Proteaseaktivität des Expressionsstammes sein. In der zur Reinigung genutzten Fraktion werden ebenfalls höhermolekulare Aggregate akkumuliert. Die zusätzlichen Banden in der Elutionsfraktion entsprechen vom Molekulargewicht den Homodimeren der scFvs.

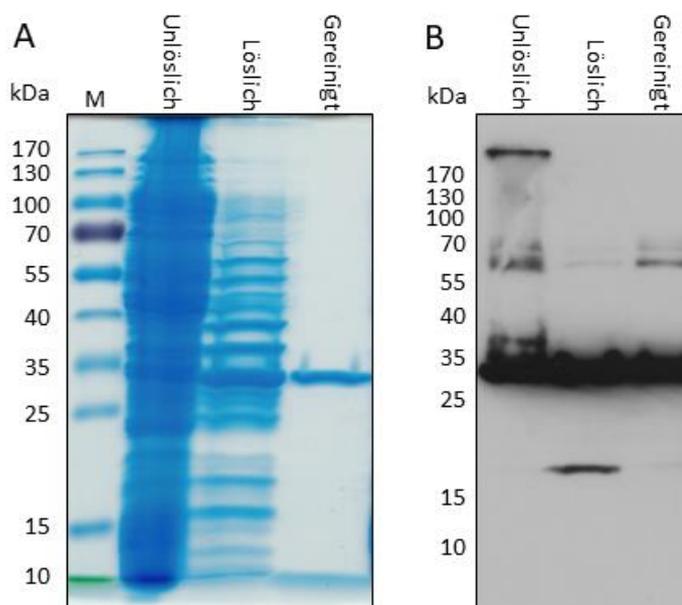


Abb. 35: Reinigung der scFv-Variante 3H5 mittels Protein L. (A): Coomassiefärbung. Unlösliche Bestandteile waren über das verwendete PAA-Gel-System nicht klar aufzutrennen. In der löslichen Fraktion zeichnete sich das Zielprotein auf Höhe unterhalb des 35 kDa Markers ab. Die gereinigte Fraktion zeigte fast keine Verunreinigungen. Das Signal entspricht dem berechneten Molekulargewicht eines scFv (28 kDa). Das verwendete Reinigungsformat ermöglicht hochreine Proteinfractionen. (B): Detektion des c-Myc-tags von Zielproteinen. Das beobachtete Laufverhalten entspricht der berechneten Größe des scFv. Alle Fraktionen erzeugten Signale zwischen dem 55 kDa und 70 kDa Marker, sowie oberhalb der 170 kDa. Diese Größen entsprechen ungefähr Di- bzw. Tetrameren des scFv. 10% PAA- Gele. Geltaschen wurden mit 10 µg Gesamtproteinextrakt beladen.

Zur Bestimmung weiterer Bindeparameter wurden die gereinigten scFvs in einem kompetitiven ELISA eingesetzt. Im Gegensatz zum indirekten ELISA wurde dabei das Bindungsverhalten in Lösung analysiert. Mögliche Bindestellen wurden also weder sterisch durch benachbarte Moleküle noch durch die Immobilisierung an einer Oberfläche blockiert. Dazu wurden die scFv-Klone mit unterschiedlichen

Konzentrationen des Antigens vorinkubiert und im Anschluss auf eine beschichtete ELISA-Platte (50 ng PbBSMT1/ Kavität) überführt. Nicht-bindende scFvs wurden durch Phagen-PBS (Tabelle 7) abgewaschen, während bindende Varianten an der Plattenoberfläche verblieben und detektiert werden konnten (siehe 3.4.6). Höhere Antigenkonzentrationen in Lösung führten zu weniger gebundenen scFvs am immobilisierten Antigen. Die Konkurrenz um Bindestellen bildet die Grundlage dieses Messprinzips. Mit höherer Antigenkonzentration kommt es zu einer Hemmung der Proteininteraktion, wodurch das resultierende Signal schwächer ausfällt.

Die Ergebnisse der kompetitiven ELISAs für 3H5 und 11B11 sind in Abb. 36 grafisch dargestellt. Die geringste eingesetzte Antigenkonzentration ist 5 nM, welche in Teilschritten zu einer maximalen Konzentration von 10000 nM steigt. Diese Konzentration ist im Diagramm gegen die gemessene Signalstärke aufgetragen.

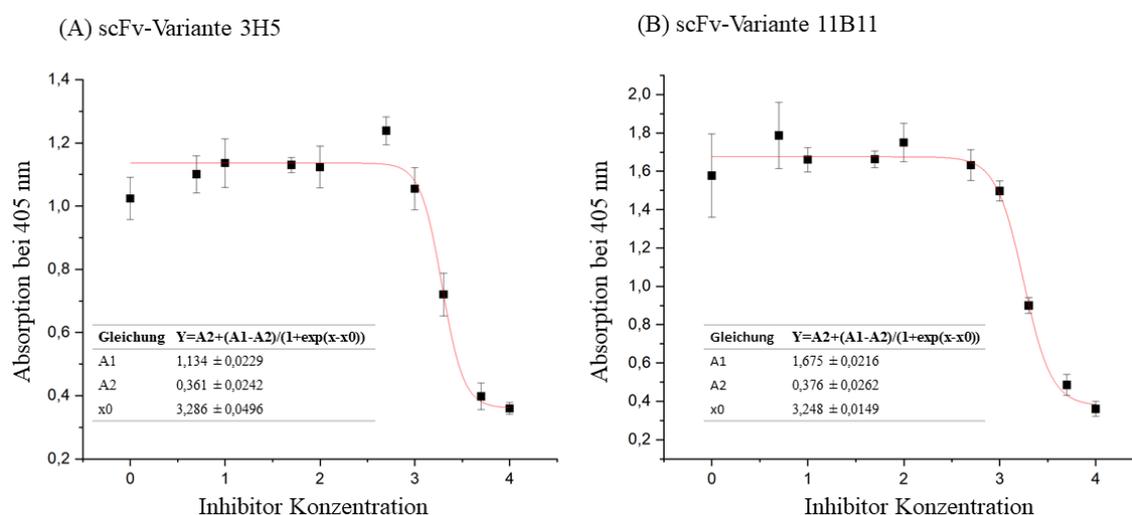


Abb. 36: Kompetitiver ELISA zur Einschätzung der Bindungsstärke in Lösung. Auf der Abszisse ist die aufsteigende Konzentration des Inhibitors aufgetragen. Die Ordinate zeigt die Absorptionswerte bei A_{405} . Die Messpunkte ergeben sich aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Replikaten. (A): Analyse der scFv-Variante 3H5. Unter Verwendung eines Boltzmann-Fits lässt sich eine Dissoziationskonstante von K_D 1932 nM berechnen. (B): Analyse der scFv-Variante 11B11. Anhand der Messpunkte des kompetitiven ELISA und einem Boltzmannfit ergibt sich eine Dissoziationskonstante von K_D 1772 nM. Die beobachteten Bindungsstärken bilden den unteren Grenzbereich einer Competition, der über dieses Messprinzip erfassbar ist. Die Messwerte deuten auf eine schwache Interaktion mit dem Antigen in Lösung.

Die Funktionsgraphen zeigen die Approximation einer sigmoidal verlaufenden Funktion an die Messwerte. Anhand dessen kann die Konzentration abgeleitet werden, an der die Hälfte aller Bindestellen besetzt ist. Dieser Wert der halbmaximalen Hemmung entspricht der Dissoziationskonstante K_D , wobei die halbmaximale Signalstärke als Berechnungsgrundlage dient. Die Dissoziationskonstante K_D beschreibt das

Gleichgewicht, das sich bei einer Dissoziation einstellt. Bei einem hohen K_D -Wert liegt das Gleichgewicht also weiter auf der Seite der dissoziierten Form und ist damit ein Maß für eine geringe Affinität. Eine erfolgreiche Konkurrenz der Bindung konnte für die Varianten 3H5 und 11B11 gezeigt werden. Aus den Werten ergibt sich eine Dissoziationskonstante von ca. $1,77 \mu\text{M}$ für Variante 3H5 und $1,93 \mu\text{M}$ für Variante 11B11. Diese Werte bilden die untere Grenze einer K_D , die im kompetitiven ELISA nachgewiesen werden kann und weisen auf eine vergleichsweise schwache Interaktion hin.

5. Diskussion

Der Signalweg des proteasomalen Proteinabbaus ist hoch konserviert. Sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich erfolgt die Ubiquitinierung auf Basis homologer Interaktionspartner und der gleichen molekularen Grundlagen (siehe 1.6 und 1.7). Einzelne homologe Untereinheiten der beteiligten Proteinkomplexe zeigen hohe Sequenzübereinstimmungen über Speziesgrenzen hinweg. Allerdings hat sich gezeigt, dass für einige Untereinheiten des E2-E3-Ligasekomplexes weitaus mehr homologe Sequenzen in Pflanzen existieren als im Humangenom. So gibt für das F-box interagierende Protein ASK insgesamt 21 experimentell bestätigte Varianten (152). Im Humangenom ist jedoch nur die Variante SKP1 bekannt, welches auf Protein- und funktioneller Ebene charakterisiert ist. Auf DNA-Ebene sind für Arabidopsis 694 verschiedene F-box-Gene bekannt (153). Auch für pflanzliche SPOP-Proteine sind mehrere Vertreter bekannt. Für Arabidopsis sind derzeit 6 verschiedene Varianten (*AtBTB1*, *AtBTB2*, *AtBTB3*, *AtBTB4*, *AtBTB5*, *AtBTB6*) publiziert und sie interagieren mit den Arabidopsis-Cullin3-Varianten Cullin3a oder Cullin3b (154). Aufgrund experimentell bestätigter Interaktionen der *AtBTB*-Proteine mit dem *ethylen response factor/Apetala2* (ERF/AP2) wird den Molekülkomplexen eine Beteiligung an der Transkriptionskontrolle über den Abbau der Transkriptionsfaktoren zugeschrieben (155). Insbesondere aufgrund der komplexen Kombinationsmöglichkeiten oben angeführter E2-E3-Ligase-Untereinheiten gibt es Annahmen über potentielle Funktionen des pflanzlichen UPS in der Pathogenabwehr (156, 157), da sie als sessile Organismen über kein mit Säugern vergleichbares Immunsystem verfügen. Es wäre daher sehr wahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten SPOP-Konstrukte aus dem Humangenom auch einen Interaktionspartner in Pflanzen haben. Erste Beweise und Anwendungsbeispiele für die ubiquitären Bindungseigenschaften der E3-Ligase-Interaktionspartner lieferte die AID (*auxin inducible degron*)-Methode (103). Dabei wurde gezeigt, dass ein pflanzliches F-Box Protein (TIR1) mit SKP1-Proteinen in Insekten- und Humanzellen interagieren und dies zu einem gezielten Proteinabbau führen kann. Der umgekehrte Anwendungsfall, also ein tierisches F-Box Protein (NSImb) für den gezielten Proteinabbau im Pflanzenmodell zu verwenden, wurde ebenfalls experimentell dargestellt (4). Da sich das 26S Proteasom als robustes System für den gezielten Proteinabbau etabliert hat, wurden in dieser Arbeit Versuche zur kompartimentspezifischen Degradation von Zielproteinen durchgeführt. Zu diesem

Zweck wurden zunächst GFP-Fusionsproteine genutzt, um die starke Bindung von anti-GFP-Nanobodies an GFP zu nutzen, die bereits in verschiedenen Experimenten verwendet wurde (2, 3).

5.1 Abbau von kernlokalisierten Proteinen am Beispiel von EYFP-CENH3

Ein kompartimentspezifischer Proteinabbau ermöglicht funktionelle Studien von Proteinen an ihren zellulären Wirkungsorten. Selbst vielversprechende Methoden wie CRISPR/Cas9 ermöglichen kein zell- oder kompartimentspezifischen *knock-down*. Dies zeigt den Bedarf einer Methode, die es ermöglicht, Proteine spezifisch an ihren Wirkungsbereichen auszuschalten und oder abzubauen.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschreibt einen entsprechenden Modellversuch. Unter Verwendung der bereits publizierten Konstrukte NSlmb-VHHGFP4 (3) und VHHGFP4-SPOP (5) wird experimentell erörtert, ob ein Abbau kernspezifischer Proteine in Pflanzen umsetzbar ist. Als Zielmolekül für den zellkernspezifischen Proteinabbau wurde EYFP-CENH3 ausgewählt (7). CENH3 ist eine Histonvariante, die während des Zellzyklus mit Zentromeren der Chromosomen assoziiert. Sie spielt eine wesentliche Rolle bei der Trennung von hochkondensierten Metaphasechromosomen, indem sie einen Angriffspunkt für den Spindelapparat bildet. Die Sequenz des hier verwendeten CENH3 entstammt dem *Arabidopsis thaliana* (*At*)-Genom. Die Grundvoraussetzung für eine korrekte Lokalisierung dieser CENH3-Variante in Zellkerne der Versuchspflanzen ist die Interaktion von *At*-CENH3 mit chromosomaler DNA in Tabak. Dies wurde bereits experimentell bestätigt und tritt vorwiegend bei evolutionär verwandten Spezies auf (158). Die N-terminale EYFP-Fusion ermöglicht eine Analyse des Fusionsproteins durch Fluoreszenzmikroskopie oder Western Blot.

Für die Abbauanalyse wurden transgene *N. tabacum*-Linien mit stabiler EYFP-CENH3 Expression erzeugt. Aufnahmen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie dieser Linien bestätigen, dass EYFP-(*At*-)CENH3 in Tabakpflanzen innerhalb des Zellkerns lokalisiert ist (Abb. 11). Den eindeutigen Beweis liefern die punktuell angesiedelten Fluoreszenzsignale innerhalb des Zellkerns. Dieses Signalmuster entspricht bereits publizierten Daten (7).

Diese transgenen Tabakpflanzen wurden mit jeweils einem chimären E3-Ligase-Gen, VHHGFP4-SPOP oder NSlmb-VHHGFP4 übertransformiert. Wie bereits publiziert wurde, zeigt der verwendete anti-GFP Nanobody ebenfalls Affinitätskonstanten im

nanomolaren Bereich gegenüber EYFP (98). Damit ist die proteinbiochemische Grundlage für eine Interaktion von EYFP-CENH3 mit NSlmb-VHHGFP4 oder VHHGFP4-SPOP gegeben. Eine vorherige *in vitro* Analyse der Interaktion beider Partner war zum Versuchszeitpunkt nicht möglich, da die heterologe Überexpression von EYFP-CENH3 in *E. coli* ohne Erfolg war (Daten nicht gezeigt) und die Konzentration im Rohextrakt transgener Pflanzen für eine affinitätschromatografische Reinigung nicht ausreichte. Aus diesem Grund werden Rückschlüsse auf eine Interaktion aus den Abbauanalysen *in planta* getroffen.

Innerhalb molekularer Analysen wurde geprüft, ob die Pflanzen über die entsprechenden Genkonstrukte verfügen, Primärtranskripte akkumuliert wurden und Proteine entsprechender Größe nachweisbar sind. Um die vollständige Genexpression transgener Versuchspflanzen zu überprüfen, erfolgte ein Nachweis der Zielproteine mittels Western Blot. Proben der transgenen Pflanzen wurden hinsichtlich ihrer VHHGFP4-SPOP bzw. NSlmb-VHHGFP4 oder VHHGFP4 Akkumulation analysiert (Abb. 9). Dabei konnte die Expression der chimären E3-Ligasen anhand des erwarteten Molekulargewichtes nachgewiesen werden. Niedermolekulare Signale im Western Blot traten aufgrund der Probenaufarbeitung auf. Die Pflanzenproben wurden nach der Homogenisierung direkt mit Laemmli-Puffer versetzt, erhitzt (5 min bei 65°C und 15 bei 95°C) und nach der Quantifizierung in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Hintergrundsignale durch Chlorophyll-Fluoreszenz oder durch andere Proteine, die mit dem Antikörper reagieren, könnten durch Proteinfällung reduziert werden. Zu Gunsten der Effizienz und aufgrund der ausreichenden Signalqualität wurde auf diesen Zwischenschritt verzichtet.

Um den vollständigen Abbau des Zielproteins in transgenen Pflanzen nachzuweisen, wurde N-terminales EYFP über anti-EGFP-Antikörper und C-terminales CENH3 über anti-CENH3-Antikörper im Western Blot analysiert (Abb. 10). Die Koexpression von VHHGFP4-SPOP und EYFP-CENH3 führte zu einer deutlichen Reduktion des EYFP-CENH3-spezifischen Proteinsignals im Vergleich zu den Kontrolllinien. Demgegenüber steht die Koexpression von NSlmb-VHHGFP4 und EYFP-CENH3. Proben dieser Linien zeigten ein ähnliches EYFP-Expressionsmuster wie Linien die nur EYFP-CENH3 überexprimieren. Die Koexpression des anti-GFP Nanobodys und EYFP-CENH3 in Kontrollpflanzen resultierte ebenfalls in stabiler und unbeeinflusster EYFP-Expression. Proben aus Pflanzen mit EYFP-CENH3-Überexpression zeigten weitere

Signale zwischen dem 55 kDa und dem 70 kDa Marker. Dies entspricht in etwa der berechneten Größe eines Heterodimers (68 kDa), das sich an Nukleosomen in der Nähe von Zentromeren aus endogenem *N. tabacum*-CENH3 und transgenem EYFP-CENH3 bilden könnte (159). Die Eigenschaft von CENH3 dimere Strukturen auszubilden, wurde nicht nur für Pflanzen beobachtet [25], sondern auch in *D. melanogaster* [26,27]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Heterochromatin der *N. tabacum*-Zellen eine Trennung der CENH3-Dimere im SDS Gel verhindert, auch in Gegenwart denaturierender Reagenzien. Die geringere Akkumulation möglicher *Nt*-CENH3/*At*-CENH3-EYFP-Heterodimere in Pflanzenlinien mit VHHGFP4 anstelle des NSlmb-VHHGFP4 könnte durch eine geringe Stabilität von EYFP-CENH3 im Komplex mit VHHGFP4 *in planta* erklärt werden. Dabei sollte in Betracht gezogen werden, dass der VHHGFP4-Nanobody eine Dimerisierung verhindert und damit die Komplexbildung inhibieren könnte. Das wird teilweise durch große Mengen an CENH3-EYFP Monomeren bestätigt, die in NSlmb-VHHGFP4-Transformanten akkumulieren (Abb. 10A).

Um zu klären, ob die Voraussetzung für eine EYFP-CENH3-Expression gegeben ist, wurde mittels qPCR die spezifische mRNA in transgenen Pflanzen mit überprüft. Abgesehen von Schwankungen in der Transkriptmenge, konnte für Linien des Genotyps VHHGFP4-SPOP/EYFP-CENH3 und NSlmb-VHHGFP4/EYFP-CENH3 durchgehend EYFP-CENH3 mRNA nachgewiesen werden (Abb. 8). Die Ergebnisse der Western Blots spiegeln die Erkenntnisse der Epifluoreszenz-Daten wieder. Weder die Koexpression von anti-GFP-Nanobodies noch die Koexpression von NSlmb-VHHGFP4 führten zu einer Reduzierung des EYFP Signals in den Zellkernen. Ebenfalls konnte eine stärkere Akkumulation von EYFP-CENH3, bei Koexpression mit VHHGFP4 oder NSlmb-VHHGFP4 gezeigt werden. Es gibt Hinweise auf eine Struktur-stabilisierende Wirkung des hier verwendeten anti-GFP Nanobodies. Strukturgebende Einflüsse von Nanobodies auf Zielproteine konnten ebenfalls anhand von Versuchen an Humanzelllinien (Hek293T) beobachtet werden (160). Zusammenfassend deuten die hier experimentell ermittelten Daten auf einen erfolgreichen, proteasomalen Abbau kernlokalisierter Proteine hin. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass eine humane E3-Ligase (SPOP) einen Proteinabbau in Pflanzen fördert.

Zu Gunsten einer besseren Erklärung der hier vorgelegten Ergebnisse muss beachtet werden, dass EYFP-CENH3 im Zytosol translatiert wird und höchstwahrscheinlich

auch im Zytosol abgebaut wird, sobald NSlmb-VHHGFP4 oder VHHGFP4-SPOP koexprimiert werden. Andererseits könnte der Komplex aus EYFP-CENH3 und chimärer-E3 Ligase für die Degradation in den Zellkern transportiert worden sein. In diesem Fall kann wohl kein passiver Transport stattfinden, da der Komplex die Ausschlussgröße für den passiven Kerntransport von 40 kDa weit übersteigt (161). Humane SPOP E3 Ligasen und ihrer Analoga aus Arabidopsis zeigen eine Tendenz funktionelle Homodimere zu bilden (155, 162). Die für diese Arbeit verwendete SPOP Sequenz wurde durch Ju Shin *et al.* bereitgestellt (5). Dabei ist wichtig festzuhalten, dass es sich um eine gekürzte Variante handelt, in der die Kernlokalisierungssequenz fehlt. Der erfolgreiche Abbau von EYFP-CENH3 *in planta* zeigt also ebenfalls, dass humanes SPOP funktionale Dimere mit Pendants aus dem *N. tabacum* Genom bilden kann. Für Arabidopsis wurden sechs unterschiedliche Proteinvarianten mit einer BTB-Domäne identifiziert und sowohl auf Genom- als auch auf Proteinebene experimentell bestätigt (155). Für den Interaktionspartner Cullin3 wurden die zwei Varianten Cullin3a und Cullin3b identifiziert (163). Da die Assemblierungen des BCR-Ligase-Komplexes auf der Interaktion zwischen BTB-Domäne und Cullin3 basiert, ist davon auszugehen, dass kompatible Cullin-Varianten in *N. tabacum* vorhanden sind und entsprechende BTB-Domänen ausreichend hoch konserviert sind, um spezifische Interaktionen zu ermöglichen. Speziell für Tabak wurden bisher keine SPOP-Proteinvarianten experimentell bestätigt. Die präsentierten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass zumindest kompatible Cullin-Proteinvarianten intrazellulär vorliegen, die Bestandteile funktionaler E3-Ligase Komplexe sind.

Besonders der ubiquitäre Charakter des 26S Proteasomsignalweges wird hier durch den erfolgreichen Proteinabbau *in planta* verdeutlicht. Trotz der Sequenzunterschiede können artübergreifend einzelne Untereinheiten des E3-Ligase Komplexes mit einander kreuzreagieren. Die Anzahl unterschiedlicher Ligaseklassen und die damit verbundene Komplexität verschiedener Untereinheiten bietet einen großen Spielraum für die Entwicklung neuer Technologien für den gezielten Proteinabbau.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erbringen einen experimentellen Beweis für den erfolgreichen, zielgerichteten Abbau kernlokalisierter Proteine. Eine sinnvolle Fortsetzung des Versuchs, die in direktem Bezug zu CENH3 steht, wäre die Erzeugung von Haploidie-Induzierer Linien (*haploid inducer lines*). In der Pflanzenzüchtung wird dieses Phänomen genutzt, um reinerbige Linien zu erzeugen, die für ein relevantes

Merkmal homozygot bzw. doppelt haploid (DH) sind. Aufgrund ihres seltenen Auftretens ist das Erzeugen solcher Linien anhand von konventionellen Züchtungsmethoden mit hohem Arbeits- und Zeitaufwand verbunden (164). Eine auf Colchicin basierende Technik wird industriell eingesetzt, um DH-Induzierer Linien herzustellen (165). Colchicin hemmt die Ausbildung des Spindelapparates indem es β -Tubulin bindet und eine Dimerisierung von Tubulinen verhindert. Während der Mitose kann somit keine korrekte Segregation der Schwesterchromatiden erfolgen. Die toxische Wirkung von Colchicin betrifft eukaryotische Lebewesen im Allgemeinen und bringt direkte Gesundheitsrisiken für das Personal mit sich und muss als Gefahrenstoff gesondert entsorgt werden. Eine Alternative könnte der gezielte Abbau von CENH3 in gentechnisch modifizierten DH-Induzierer Linien bieten. Da sich das Genom der DH-Induzierer Linie in den Nachkommen nicht weitervererbt, handelt es sich bei den Ertragspflanzen *per se* nicht um GVOs (Gentechnisch Veränderte Organismen).

CENH3 ist ebenfalls an der Segregation von Chromosomen beteiligt, da es die Assemblierung der Kinetochore durch den Einbau von CENH3 an Nukleosomen des Zentromers initiiert (166). Während der Kernteilung verbindet sich der Spindelapparat mit den Kinetochoren und zieht die Schwesterchromatiden in Richtung entgegengesetzter Pole (167). Störungen der Histonvariante H3 führen zu fehlerhafter Segregation. Anhand von *Arabidopsis* CENH3-Knockdown-Mutanten konnten eine reduzierte mitotische zugunsten einer erhöhten meiotischen Segregation gezeigt werden (168). Die gezielte Deletion von CENH3 könnte also ebenfalls die Segregation der Schwesterchromosomen verhindern (Abb. 37). Eine weitere Voraussetzung für dieses Experiment sind komplementierte *cenh3*^{-/-} *Arabidopsis*-Nullmutanten, in denen das Gen für CENH3 durch ein Genkonstrukt aus GFP und der N-terminalen Domäne der H3-Variante komplementiert wurde (169). Genetisch komplementierte Pflanzen, in denen endogenes CENH3 durch EYFP-CENH3 ersetzt wurde, könnten in Verbindung mit der hier gezeigten Methode als Modellpflanzen verwendet werden. Allerdings müsste dafür ein induzierbarer oder ein eizellspezifischer Promotor für die Expression der chimären E3-Ligase verwendet werden, da der konstitutive Abbau von EYFP-CENH3 in den komplementierten Linien letal wäre. Letztlich würde das Genom der Haploidie-induzierenden Linie nicht mit vererbt werden und eine doppelt haploide Pflanze mit dem Chromosomensatz des anderen Elters entstehen. Diese Technik würde das

Erzeugen genetisch stabiler Pflanzen innerhalb einer Generation ermöglichen, was eine erhebliche Beschleunigung des Züchtungsfortschritts zur Folge hätte.

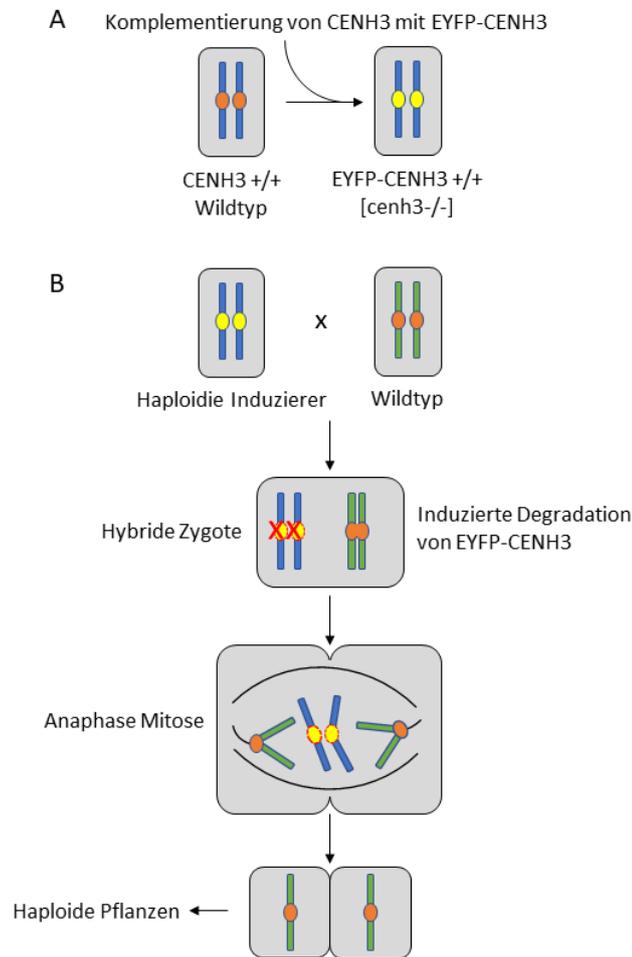


Abb. 37: Schema zur Erzeugung einer Haploidie-Induzierenden (HI) Pflanzenlinie. (A): Komplementierung des nativen CENH3 mit EYFP-CENH3. Die erzeugten Mutanten sind CENH3-defizient. Dessen Funktion wird von EYFP-CENH3 übernommen. (B): Kreuzung von HI Linien mit Wildtyp Pflanzen. Durch einen induzierbaren Promotor wird die Expression von VHHGFP4-SPOP eingeleitet. Der Abbau von EYFP-CENH3 in hybriden Zygoten unterdrückt die korrekte Assemblierung des Spindelapparates an die betroffenen Chromosomen. Während der Anaphase werden nur Wildtyp-Chromosomen zu den Polen transportiert. Das Resultat ist eine haploide Tochtergeneration. Modifizierte Abbildung nach (170).

5.2 Degradation eines kernlokalisierten Proteins pathogenen Ursprungs und Untersuchung physiologischer Auswirkungen

Die Sekretion von Effektorproteinen durch Pflanzenpathogene hemmt Abwehrmechanismen und ermöglicht eine effizientere Verbreitung parasitärer Organismen. Am Beispiel von transgenen Pflanzen mit SAP11-GFP5 Expression wurde zunächst bestätigt, dass die beschriebenen Wachstumsdefizite und phänotypische Merkmale ebenfalls in *N. tabacum*, und unter Verwendung des beschriebenen

Plasmides pKB-His-SAP11-GFP5-His (Abbildung A 4) auftreten (siehe 4.2.2 und Abb. 15 A und B). Die transgenen Pflanzen zeigten dabei die typischen SAP-11-induzierten morphologischen Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen. Das bestätigt die Beobachtungen von Meng Tan et. al (10), dessen Arbeiten auf einer Codon-optimierten Variante von SAP11 basieren und die gleichen phänotypischen Merkmale hervorrufen. Aus der Analyse von doppelt transformierten Pflanzen ging eindeutig hervor, dass geringere SAP11- Mengen zu mildereren Phänotypen führen (siehe 4.2.2 und Abb. 15 D). Ein Kontrollversuch zeigt, dass VHHGFP4 ohne SPOP-Fusion keine Abmilderung der Fehlbildungen bewirkt (siehe 4.2.2 und Abb. 15 C). Diese Indizien deuten auf einen SPOP- vermittelten Abbau des Fusionsproteins SAP11-GFP5 hin.

Zur weiteren visuellen Bestätigung wurden transgene Pflanzen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Pflanzen mit SAP11-GFP5 Koexpression zeigen schwache Fluoreszenzsignale entlang der Zellwand und eine starke Signalanreicherung im Zellkern (Abb. 16). Versuchspflanzen mit kombinierter Expression von SAP11-GFP5 und VHHGFP4-SPOP zeigen deutlich schwächere bis gar keine GFP-spezifische Fluoreszenz. Dies bestärkt die Hypothese, dass abgemilderte Phänotypen auf geringere SAP11-GFP5-Konzentrationen zurückzuführen sind. Starke Fluoreszenzsignale in SAP11-GFP5/VHHGFP4-Pflanzen und schwache bis keine Signale in Pflanzen mit SAP11-GFP5/VHHGFP4-SPOP-Koexpression sprechen ebenfalls für den SPOP-abhängigen Abbau von SAP11-GFP5 hin.

Ein dritter Beweis sollte die massenspektrometrische Analyse des Jasmonsäure-Gehaltes transgener Pflanzen liefern. Als Reaktion auf Verwundungen, beispielsweise infolge eines Pathogenbefalls bzw. durch Fraß, synthetisieren und akkumulieren Pflanzen Jasmonsäure hauptsächlich im Leitgewebe, der Bündelscheide und der Epidermis (171). Auf zellulärer Ebene findet die Synthese in den Chloroplasten und den Peroxisomen statt und dient als Signaltransmitter pflanzlicher Entwicklungsprozesse und Abwehrmechanismen. SAP11 wurde erstmals in *Phytoplasma spec.* entdeckt und als Effektorprotein, das eine systemische Pflanzenabwehr beeinflusst identifiziert (172). Dieses obligat parasitär lebende Bakterium wird von Insekten in das Phloem der Wirtspflanze sezerniert. Im Zellinneren findet ein Importin α -abhängiger Transport von SAP11 in den Zellkern statt, wo es verschiedene TFs wie CINCINATA (CIN-) *related* TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA, and PROLIFERATING CELL FACTORS (TCP) bindet, die unter anderem an der Regulation der LOX2-Genexpression beteiligt

sind (173-175). 13-LOX-Gene (LOX2, LOX3, LOX4, LOX6) kodieren für Lipoxygenasen, die an der initialen Oxygenierung von α -Linolensäure an Position C-13 beteiligt sind (176). Damit katalysieren Lipoxygenasen einen wesentlichen Syntheseschritt des JA-Anabolismus. Diese Aktivierung von LOX2 wurde bei der Verwundung von Blattgewebe beobachtet (177). Molekulare Analysen zeigten, dass die Inhibierung dieses Gens zu einer Hemmung der JA-Synthese und damit zu einer gehemmten Abwehrreaktion führt. Dadurch entsteht dem übertragenden Schadinsekt ein Reproduktionsvorteil. Im experimentellen Nachweis äußerte sich dies in Form einer vermehrten Eiablage durch *Macrostesles quadrilineatus* auf die Wirtspflanzen. Im Vergleich mit gesunden Pflanzen, wurden doppelt so viele Eier von *Macrostesles quadrilineatus* auf Blättern abgelegt, die vorher durch Phytoplasmen infiziert wurden (139, 178).

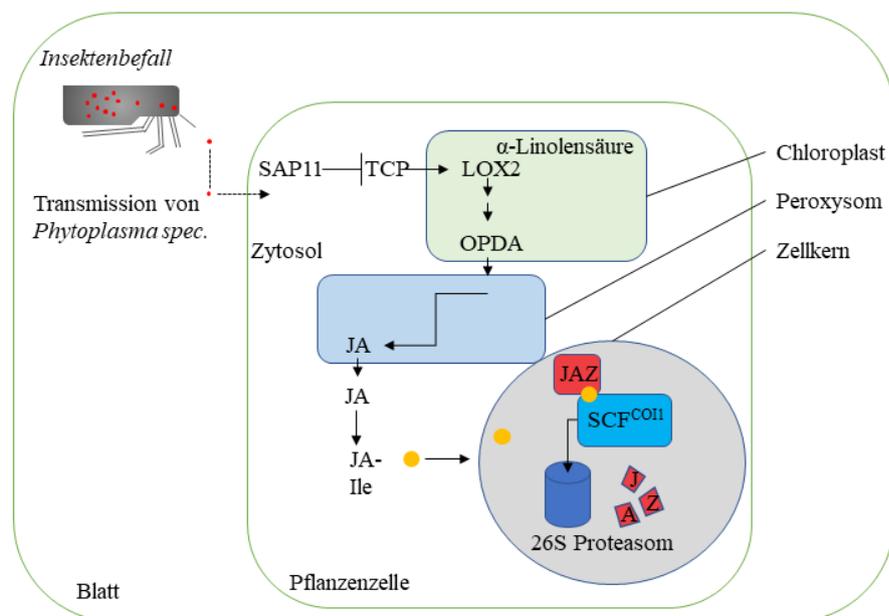


Abb. 38: Schematische Darstellung SAP11-afektierter Signalwege. Phloem-trinkende Insekten stechen das Leitgewebe an und Übertragung während der Mahlzeit *Phytoplasma spec.* über den Speichel. Phytoplasmen sezernieren SAP11, welches in den Zellkern importiert wird. SAP11 bindet und destabilisiert TCP-Transkriptionsfaktoren. Als Folge wird die LOX2-Genexpression reprimiert und die Oxylin-Synthese von JA gehemmt. JA fördert die Interaktion zwischen JAZ-Repressoren und COII, einer Untereinheit einer SCF-Ligase. Eine ausbleibende JA-Akkumulation als Stressantwort wirkt sich auf die Regulation diverser Gene der intrinsischen Pathogenabwehr aus. Modifizierte Abbildung nach Zhang *et al.* 2017 (179).

Mit dem Ziel die JA-Akkumulationen in transgenen Pflanzen messen zu können, wurde ein Verwundungs-Assay durchgeführt (siehe 3.6 und 4.2.3). Mit Hilfe einer Pinzette wurden mehrere Blätter einer Pflanze so einheitlich wie möglich verwundet und nach einer 30-minütigen Inkubationszeit abgeschnitten und mit flüssigem Stickstoff

tiefgefroren. Entsprechend der beschriebenen molekularen Grundlage wurde angenommen, dass ein Verwundungsstress eine temporäre Veränderung im JA-Haushalt bewirkt. Eine grafische Darstellung der Messwerte (Abb. 17) zeigt einen massiven Anstieg der JA-Konzentration in gestressten Blättern, im Vergleich zu nicht gestressten Blättern. Dabei stiegen die JA-Konzentrationen der verwundeten Pflanzen in den nanomolaren Bereich, während die ungestresste Kontrollgruppe im pikomolaren Bereich und weniger (nicht messbar) blieb. Messwerte anderer Publikationen mit ähnlichen experimentellen Ansätzen, zeigten ebenfalls JA-Konzentrationen im nanomolaren Bereich (180, 181). Anhand der transgenen Pflanzenlinien konnte die ursprüngliche These, dass SAP11 eine verringerte JA-Konzentration hervorruft jedoch nicht bestätigt werden. SAP11-GFP5 Pflanzen akkumulieren ähnlich hohe JA-Level wie Pflanzen mit dem Abbaukonstrukt VHHGFP4-SPOP. Ein ähnliches Bild zeichnet sich bei der biologisch aktiven Form Jasmonsäure-Isoleucin (Ile) ab, mit dem Unterschied, dass die transgenen Pflanzen ca. die halbe Menge JA-Ile in den untersuchten Geweben ansammeln. Dieser Effekt könnte darauf hinweisen, dass der Einfluss von SAP11 oder eines der anderen Transgene den Schritt der JA-Konjugation negativ beeinflusst. Interessant wäre eine experimentelle Untersuchung der Interaktion zwischen SAP11-GFP5 bzw. VHHGFP4-SPOP und gereinigter Jasmonyl-Isoleucin Synthase (JAR1), da dieses Enzym die Konjugation von Jasmonsäure mit der Aminosäure Isoleucin katalysiert (182). Im Falle einer Bindung könnte angenommen werden, dass SAP11-GFP5 diesen Signalweg negativ beeinflusst. Funktionell könnten diese Versuchsansätze auch mittels Substratabhängigem APT-32P-PPi-Isotopaustausch analysiert werden (183). Dabei würden die gereinigten Interaktionspartner zusammen mit dem ATP-Isotop, JA und Magnesium inkubiert und ein Teil des Ansatzes auf eine Cellulose-Polyethylenimin-Membran gegeben werden. Eine Hemmung der Enzymaktivität zeigt sich durch eine Änderung des Laufverhaltens, aufgrund des Größenunterschiedes von Pyrophosphat (PPi) und ATP. Sollte die Enzymaktivität von JAR1 durch Interaktion mit einem der Fusionsproteine (SAP11-GFP5, VHHGFP4 oder VHHGFP4-SPOP) gehemmt werden, zeigte sich dies durch prominente ATP-Banden, da wenig bis kein Substrat ATP-abhängig umgesetzt wird. Vergleichbare Experimente wurden bisher nicht durchgeführt und beschränken sich auf Dynamiken der JAR1-Transkriptmengen bei Stresseinwirkung (184) oder Überexpressions-Analysen (185).

Die in dieser Arbeit erhobenen Messwerte deuten jedoch darauf hin, dass die verwendeten Konstrukte keinen Einfluss auf den Jasmonsäure-Haushalt haben. Transformanten mit SAP11-GFP5/VHHGFP4-SPOP-Expression zeigten unter mikroskopischer und makroskopischer Betrachtung einen teilweise rekonstituierten WT-Phänotyp. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die hervorgerufenen morphologischen Änderungen der transgenen Pflanzen nicht in direktem Zusammenhang mit einer möglichen TCP-SAP11-Interaktion stehen.

5.3 Selektion eines anti- PbBSMT1 Bindeproteins

Alle bisher diskutierten Methoden des zielgerichteten Proteinabbaus basieren auf dem Austausch der Substratbindestelle einer Untereinheit von E3-Ligasen durch einen anti-GFP-Nanobody. Anhand dieses molekularen Werkzeuges konnte erfolgreich der spezifische Abbau von GFP bzw. GFP-Fusionsproteinen, sowohl im Zytosol als auch im Zellkern, induziert werden. Ein nächster logischer Schritt ist der Proteinabbau unabhängig von Fusionen mit einem Markerprotein.

Der modulare Aufbau der Adapterproteine ermöglicht die Deletion der natürlichen Bindedomäne (MATH (*meprin and tumor necrosis factor (TNF)-homology*))-Domain bei SPOP und WD40-repeats bei NSlmb) und die Fusion eines anti-GFP-Nanobodies. Entsprechend der Literatur (3-5) und der hier durchgeführten Experimente wurde gezeigt, dass ein Austausch von C-terminalen (NSlmb) oder N-terminalen (SPOP) Substratbindedomänen die Funktion der E3-Ligasen *in vivo* nicht beeinträchtigt. Durch eine Nanobody-Fusion von E3-Ligasen lässt sich der proteasomale Abbau also beliebig steuern.

Für einen experimentellen Nachweis dieser These wurde als Zielstruktur PbBSMT1 ausgewählt. Dabei handelt es sich um eine pathogene Methyltransferase der SABATH-Familie (186) aus dem protistischen Organismus *Plasmodiophora brassicae* (Pb). Die Sequenz wurde 2015 von Ludwig-Müller *et al.*, basierend auf Genomanalysen, beschrieben (144). Analog zu pflanzlichen Methyltransferasen katalysiert PbBSMT1 die Methylierung von Salicylsäure (SA). Als wichtiger Signaltransmitter liegt SA im Grundzustand methyliert vor (Me-SA). In diesem Zustand ist sie biologisch inaktiv und volatil. Die demethylierte Form ist an Signalwegen des Pflanzenwachstums insbesondere während der Stressantwort bzw. Pathogenabwehr beteiligt. Die Methylierung freier SA durch PbBSMT1 reprimiert Signalwege der SAR (*systemic*

acquired resistance) und ermöglicht einen effizienten Befall der Wirtspflanze durch Pathogene. Eine aktive Einflussnahme auf den SA-Haushalt und damit auf die SAR der Pflanze wurde bereits mehrfach beschrieben. Eine ähnliche Invasionsstrategie konnte bei *Pseudomonas syringae* beobachtet werden, welches ein Toxin (Coronatine) in den pflanzlichen Zellinnenraum sezerniert. Dieser Virulenzfaktor verhindert die Expression des *isochorismate synthase gene 1* (ICS1) und aktiviert die Expression von AtBSMT1. Die erhöhten Enzymkonzentrationen (AtBSMT1) in den Pflanzenorganen bewirken eine vermehrte Methylierung von SA und damit eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten der volatilen MeSA-Form. Verminderte SA-Konzentrationen infizierter Pflanzenorgane hemmen die Signaltransduktion und die SAR-Antwort befallener Pflanzen (187-189). Das Wirtsspektrum von *Plasmodiophora* umfasst nahezu alle Kreuzblütengewächse (Brassicaceae/Crucifera). Wirtschaftlich relevante Vertreter dieser Familie sind diverse Kohlsorten (Nahrungsmittelindustrie), aber auch Raps als Öl- und Biokraftstoffquelle. *Plasmodiophora* bildet äußerst resistente Dauersporen aus, die über 17 Jahre im Boden überdauern (190) und starken Temperaturschwankungen standhalten. Gegenmaßnahmen sind beispielsweise das Kalken des Ackerbodens zur Eindämmung der Gallenbildung, die großflächige Solarisation zum Inaktivieren der Sporen oder die Rotation des Anbaugutes (191). Jedoch sind diese Methoden nicht unter allen klimatischen Bedingungen durchführbar, oder nicht wirtschaftlich. Weiterhin existieren zum Beispiel 159 verschiedene resistente *Brassica napus*-Hybridsorten. Diese stellen aber nur eine intermediäre Lösung dar, da ihre Herstellung kompliziert ist und sie nur schwer zugänglich sind (192). Einen anderen Ansatz zur Resistenzerzeugung bildet der Abbau von PbBSMT1 über den 26S Proteasomsignalweg der Pflanze. Der Grundstein sollte durch die Selektion eines geeigneten Antikörpers im Rahmen dieser Arbeit gelegt werden. Zukünftige Fusionsproteine aus E3-Ligase und anti-PbBSMT1-Antikörper müssten resistenzbildende Eigenschaften unter Beweis stellen, um als Grundlage für eine agronomische Anwendung genutzt zu werden

Für die Antikörperselektion wurde in dieser Arbeit die Phagen-Display-Technik verwendet. Dabei ist die Diversität der verwendeten Phagenbanken proportional zu der Wahrscheinlichkeit passende Bindemoleküle anzureichern (193). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Phagenbank-Typen mit verschiedenen *Scaffolds* verwendet, um die Wahrscheinlichkeit, eine genügende Anzahl geeigneter PbBSMT1-Binder zu selektieren, zu erhöhen. Verwendet wurde eine scFv und eine Nanobody Bibliothek.

Zusätzlich wurden drei unterschiedliche Varianten für die Antigenpräsentation getestet: anhand von gereinigtem PbBSMT1-Antigen als Vollängenprotein, als Einzelpeptid ($\alpha 10$) oder einer Sammlung unterschiedlicher Peptide, die auf eine Membran synthetisiert wurden (Peptidarray). Aus dem *screening* gegen das Vollängenprotein ging eine Nanobody-Variante mit einer Dissoziationskonstante von ca. $K_D = 600$ nM hervor. Weder weitere Selektionsrunden noch die Verwendung unterschiedlicher Blockierlösungen führten zu spezifischen Bindern mit höherer Affinität. Hier könnten die eingesetzten *screening*-Bedingungen zu einem Verlust potentiell bindender Varianten geführt haben. Beispielsweise wurden nach Adsorption des Antigens über Nacht, nicht-bindende Varianten durch 20-maliges Waschen (siehe 3.1.6) mit Phagen-PBS entfernt. Ein milderes Verfahren mit weniger Reinigungsschritten hätte möglicherweise zu einem höheren Phagentiter führen können. Eine weitere Optimierungsmöglichkeit besteht in dem Auswahlverfahren angereicherter Phagen. Die Testung mittels Phagen-ELISA ist schnell und effizient, um einen Großteil nicht-bindender Varianten auszuschließen. Allerdings wurde für die Detektion im Phagen-ELISA ein anti-M13-Antikörper verwendet, der nicht zwangsweise monomere Proteinvarianten selektierter Nanobodies oder scFvs nachweist. Vielmehr handelt es sich um einen indirekten Nachweis, da der verwendete Nachweisantikörper M13-Phagenpartikel bindet. Dies ermöglicht eine effiziente Kontrolle der angereicherten Phagen, unabhängig von ihrer pIII-Fusion, lässt aber keine genauen Rückschlüsse auf die Identität des gekoppelten Binders zu. Dadurch kann zu diesem Zeitpunkt nicht gesagt werden, ob es sich beispielsweise um trunkierte Nanobody-Varianten handelt. Diese Varianten könnten ohne Fusionspeptid unlöslich sein oder ungeeignete Bindungseigenschaften zeigen. Mit den entsprechenden Ressourcen wäre die Analyse von deutlich mehr Varianten über ELSA möglich. Automatisierte *screening*-Verfahren wie sie in spezialisierten Firmen Verwendung finden, haben einen Durchsatz, der mit dem eines Labormaßstabes nicht vergleichbar ist. Dazu gehört beispielsweise die Reinigung von Antikörpervarianten im 96-Well Maßstab, die es erlaubt ein Vielfaches an Kandidaten gleichzeitig zu analysieren.

In einem anderen Ansatz wurde anhand der modellierten Raumstruktur von PbBSMT1 eine spezifische Sekundärstruktur als Antigen ausgewählt. Aufgrund der geringen Größe sind die auftretenden elektrostatischen Wechselwirkungen zu schwach für eine ausreichende Adsorption an Polystyroloberflächen. Umgangen wurde dieses Problem

durch eine C-terminale Modifikation, die das Peptid durch einen Linker mit Biotin verbindet. Dadurch kann das Peptid an Oberflächen mit Streptavidinbeschichtung binden. Das *screening* lieferte jedoch keinen spezifischen Binder im unteren nanomolaren Bereich ($K_D \leq 10^{-9} \text{M}$). Absorptionsmessungen des Phagen-ELISA zeigten kein selektives Bindeverhalten gegenüber dem Volllängenprotein. Ein möglicher Grund für den Misserfolg kann in der Sequenz des verwendeten Peptides liegen. Die 21 Aminosäuren lange Sequenz enthält acht als immunogen bewertete Aminosäuren (~38%) (150) und bildet eine oberflächenexponierte sowie lösungsmittelzugängliche Region des Zielproteins ab. Allerdings beinhaltet die Sequenz auch 41%, bzw. 9 von 21 hydrophobe Aminosäuren. Damit besteht ein gewisses Risiko, dass Binder gegen Sequenzbereiche selektiert wurden, welche im Volllängenprotein nicht zugänglich sind. Durch hydrophobe Wechselwirkungen würde die entsprechende Bindestelle maskiert werden, was eine Bindung verhindern und somit im ELISA kein spezifisches Signal ergeben würde. Des Weiteren basieren die Strukturinformationen auf *homology modeling*, da bisher für PbBSMT1 keine anderen strukturaufklärenden Experimente durchgeführt wurden. Die *in silico* berechnete Struktur von PbBSMT1 basiert auf dem Röntgenkristall Strukturmodell von CbSAMT (PDB Code: 3B5I), einer SABATH-Methyltransferase aus *Clarkia breweri* (194, 195). Im Vergleich zeigt die Aminosäuresequenz von (α 10) deutliche Unterschiede zu anderen Methyltransferasen (Abb. 27 A). Dies wurde als weiteres Kriterium bei der Peptidwahl verwendet, um eine mögliche Kreuzreaktion mit anderen, eventuell pflanzeigenen Methyltransferasen zu vermeiden.

Der aufwändigen Suche nach einzelnen geeigneten Sequenzbereichen steht der zweite peptidbasierte Versuchsansatz gegenüber. Anstelle eines singulären Peptides wurden 30 verschiedene Peptide auf eine Papiermembran synthetisiert. Aufgrund technischer Limitierungen im Herstellungsverfahren der Membranen, ist die mögliche Anzahl an Aminosäuren pro Einzelpeptid auf 19 beschränkt. Unter Verwendung der berechneten 3D-Struktur wurden dieses Mal mehrere oberflächenexponierte Sequenzbereiche ausgewählt. Um die Sequenzbereiche gänzlich abzubilden, überlappen sich die letzten fünf Aminosäuren mit den ersten Fünf der Folgesequenz. Dadurch soll die Zugänglichkeit zu bestimmten Sequenzbereichen verbessert werden und sterischen Behinderungen entgegengewirkt werden. Anhand des Phagen-Displays mit dieser Peptid-Matrix ist es gelungen, mehrere spezifisch bindende scFv-Varianten zu isolieren.

Im kompetitiven ELISA wurden für Variante 3H5 eine K_D von ca. 1932 nM und für 11B11 eine K_D von 1772 nM gemessen. Grundsätzlich ist das Experiment als Erfolg zu werten. Es konnten zwei bindende scFvs auf Basis eines Peptidarrays selektiert und anschließend charakterisiert werden.

Diese Werte liegen nur knapp im messbaren Bereich und beschreiben das untere Detektionslimit einer Kompetition. Im Vergleich liegen diese Messwerte ein Vielfaches unter der Variante 1B1 (ca. 600 nM). Aufgrund der niedrigen Affinität ist eine Interaktion in zellulärer Umgebung unwahrscheinlich. Da die Nanobody- bzw. scFv-Varianten perspektivisch mit Adapterproteinen aus E3-Ligasen fusioniert werden sollen, könnten sie allerdings von weiteren Bindungsparametern wie Kofaktoren oder Aviditätseffekten bei Multimerisierung profitieren (196-198).

Trotz der geringen Affinitäten ist hervorzuheben, dass die Varianten 3H5 und 11B11 aus einem Peptidmatrix-unterstützten Phagen-Display stammen. Diese Technik der Antikörperselektion ist ein Novum und wurde in dieser Form bisher nicht beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit einer Kombination aus Peptidmatrix und Phagen-Display spezifisch bindende Antikörper selektiert werden können. Diese Methode eröffnet die Möglichkeit allein auf Basis von Sequenzinformationen und computergestützter Strukturanalyse Antikörper zu generieren. Heterolog schwer herzustellende Proteine wie Membranproteine, humane Antikörper oder Toxine könnten mit einer Peptidmatrix, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, abgebildet werden. Auf diese Weise ergeben sich neue Wege zur Gewinnung von Antikörpern gegen schwer herzustellende, komplexe Proteine (Membranprotein, besonders große Proteine). Zusätzlich ließe sich das Epitop bestimmen, welches ein selektierter Antikörper bindet. Sind die Affinitäten hoch genug, kann der selektierte Antikörper mit der Peptidmembran inkubiert werden und anschließend über einen Affinitäts-tag (c-Myc) sowie Antikörperkonjugate visualisiert werden. In abgewandelter Form wurde diese Vorgehensweise für ein Epitop-Mapping bereits etabliert (199).

Eine zusätzliche Verbesserung der Bindungseigenschaften kann durch Änderungen der Selektionsbedingungen oder einer nachfolgenden *in vitro*-Affinitätsreifung erzielt werden. Dabei ist besonders die *in vitro*-Affinitätsreifung ein oft verwendetes Konzept in der Industrie, um Affinitäten bereits selektierter Bindemoleküle zu steigern. Am Beispiel dieser Arbeit würde man auf Ergebnisse der Variante 1B1 aufbauen. Der

Sequenzvergleich der selektierten Varianten zeigt die größten Unterschiede in CDR3. Zufällige Punktmutationen innerhalb der CDR3 könnten bereits potentere Binder hervorbringen. Denkbar ist ebenfalls die Herstellung einer neuen Bibliothek durch Randomisierung der DNA-Sequenzbereiche von CDR1 und/ oder CDR2 über Mutagenese-PCR. Anhand dieser vorselektierten Bibliothek könnten ebenfalls bessere Binder gefunden werden. Die Kombination einzelner Mutationen kann additive oder synergistische Effekte auf das Bindeverhalten haben (200).

Auch die Verwendung anderer, etablierter Bibliotheken könnte zur Identifizierung hochaffiner Binder führen. Dabei ist die verfügbare Palette anderer *scaffolds* (Proteingrundgerüste) sehr groß. Gerade künstliche Bindeproteine (Affiline, Anticalline, Monobodies, DARPins) bilden eine interessante Gruppe, da ihre Grundstruktur bereits hinsichtlich bestimmter Eigenschaften ausgesucht werden kann. Zu den Affilinen gehören Bindeproteine auf Basis von Gamma-Kristallin (Patent U. Fiedler & R. Rudolph, 2001, Design von Beta-Faltblatt-Proteinen mit spezifischen Bindungseigenschaften, DE1999132688, *europaen patent register*). Sie haben ihren Ursprung im humanen Augenlinsenprotein und zeichnen sich aufgrund ihrer Struktur durch eine sehr hohe Stabilität aus. DARPINS (*Designed Ankyrin Repeat (AR) Proteins*) wurden abgeleitet von natürlich vorkommenden AR-Proteinen, die repetitive Motive aus zwei α -Helices, einer β -Schleife und insgesamt 33 Aminosäuren bestehen. Ihr modularer Aufbau begünstigt eine affinitätssteigernde *in vitro*- Affinitätsmaturierung (201). Gegenüber konventionellen Antikörpern ist besonders die hohe Thermostabilität (66-85°C) der DARPINS hervorzuheben. Inspiriert von solchen künstlichen Bindeproteinen deren *Scaffold* aus rationalen Gründen ausgewählt wurde, wäre eine Bibliothek auf Basis des Adapterproteins diverser E3-Ligasen denkbar. Bindemotive wie LLRs, WD40- oder MATH Domänen ließen sich über Mutagenese-PCR beliebig randomisieren und Bibliotheken mit hoher Diversität entwickeln. Durch Techniken wie das in dieser Arbeit verwendete Phagen-Display oder auch über Ribosomen-Display (202) ließe sich die genetische Information an die Proteinsequenz koppeln und über ein geeignetes Selektionsverfahren spezifische Binder gegen PbBSMT1 gewinnen. Weiterhin könnte die Sequenzinformation zum Paratop eines so selektierten, hochaffinen Binders verwendet werden, um mittels CRISPR/Cas9 einen *knock in* an einer E3-Ligase-Untereinheit vorzunehmen. Pflanzen denen auf diese Art eine Resistenz vermittelt wird, enthalten *per se* keine Transgene, da keine artfremde DNA in

das Genom integriert wird. Auch könnte argumentiert werden, dass eine solche Mutation durch natürliche Selektion hätte entstehen können.

Grundsätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass durch den gezielten Abbau von Proteinen im Zellkern verbesserte Züchtungsmethoden entwickelt und Resistenzen gegen Pathogene erzeugt werden können. Darüber hinaus werden Wege aufgezeigt, wie dafür notwendige rekombinante Antikörper effizienter isoliert werden können.

6. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass ein Abbau von Proteinen des Zellkerns in Pflanzen mittels chimärer E3-Ligasen prinzipiell möglich ist. Dies konnte anhand des Abbaus von EYFP-CENH3 und SAP11-GFP5 gezeigt werden. Der erfolgreiche Abbau von EYFP-CENH3 deutet auf eine potentielle Anwendungsmöglichkeit des Degradationssystems in der Züchtungsforschung hin, indem Haploidie-Induzierer Linien generiert werden könnten. Kreuzungen dieser Linien mit Wildtyp-Pflanzen würden im Vergleich zu langwierigen konventionellen Züchtungsmethoden eine schnelle Propagierung bestimmter elterlicher Eigenschaften ermöglichen. Der Abbau des Fusionsproteins SAP11-GFP5 ist ein erstes Beispiel für den Abbau eines pathogenen Effektorproteins mittels einer chimärer E3-Ligase (VHHGFP4-SPOP) in Pflanzen. Experimentell konnte der Abbau auf Proteinebene über Immundetektion und Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. Rekonstituierte Phänotypen sprechen ebenfalls für eine Reduktion des Zielproteins. Die Untersuchung eines physiologischen Parameters im direkten Zusammenhang mit der SAP11-Abundanz hat nicht funktioniert. Hier wurde die Jasmonsäure-Akkumulation verwundeter Pflanzen und unverwundeter Pflanzen verglichen. In einer vergleichenden Analyse könnten mehrere E3-Ligasen miteinander verglichen werden. Auf eine bestimmte Substratspezifität lässt sich durch den Ursprung der entsprechenden E3-Ligase schließen. Experimentell könnte in Betracht gezogen werden, diese Konstrukte anhand von transgenen Pflanzen mit gewebs- und/ oder kompartimentspezifischer Expression von Markerproteinen zu testen. Im dritten Teil der Arbeit sollte ein Antikörper gegen die Methyltransferase PbBSMT1 des Pflanzenpathogens *Plasmodiophora brassicae* hergestellt werden. Die drei selektierten Varianten erreichen Affinitätskonstanten von ca. 600 nM (Nanobody) und 1932 nM bzw. 1772 nM für zwei scFv-Varianten. Versuche, die Konstrukte mit einer E3-Ligase-Untereinheit zu fusionieren und hinsichtlich ihres Potentials PbBSMT1 abzubauen, stehen aus. Die geringe Affinität lässt allerdings Bedenken bezüglich des Bindeverhaltens in einer zellulären Umgebung zu. Dem könnte zukünftig eine Affinitätsmaturierung der bereits selektierten Varianten entgegengestellt werden. Dabei wäre eine Randomisierung der unveränderten CDRs und eine Negativ-Selektion gegen pflanzliche Methyltransferasen hilfreich, um einerseits die Affinität zu steigern und andererseits die *off-target*-Effekte zu minimieren. Interessant wären ebenfalls anschließende Resistenztests. Dafür müssten die entsprechenden Konstrukte verwendet

werden, um transgene Wirtspflanzen herzustellen, die nach einer Charakterisierung einem experimentellen Plasmodiophora-Befall ausgesetzt werden. Insbesondere Beobachtungen der oberirdischen Biomasseakkumulation und Morphologie des Wurzelwerkes ließen Schlüsse auf eine induzierte Resistenz zu.

7. Literaturverzeichnis

1. M. Hochstrasser, Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* **30**, 405-439 (1996).
2. J. T. Winston *et al.*, The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IκappaBα and beta-catenin and stimulates IκappaBα ubiquitination in vitro. *Genes Dev* **13**, 270-283 (1999).
3. E. Caussinus, O. Kanca, M. Affolter, Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nature structural & molecular biology* **19**, 117-121 (2011).
4. B. Baudisch, I. Pfort, E. Sorge, U. Conrad, Nanobody-Directed Specific Degradation of Proteins by the 26S-Proteasome in Plants. *Frontiers in plant science* **9**, 130 (2018).
5. Y. Ju Shin *et al.*, Nanobody-targeted E3-ubiquitin ligase complex degrades nuclear proteins. *Scientific Reports* **5**, 14269 (2015).
6. U. Rothbauer *et al.*, Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods* **3**, 887-889 (2006).
7. I. Lermontova *et al.*, Loading of Arabidopsis centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *The Plant cell* **18**, 2443-2451 (2006).
8. E. Sorge, D. Demidov, I. Lermontova, A. Houben, U. Conrad, Engineered degradation of EYFP-tagged CENH3 via the 26S proteasome pathway in plants. *PLoS One* **16**, e0247015 (2021).
9. A. Sugio *et al.*, Diverse Targets of Phytoplasma Effectors: From Plant Development to Defense Against Insects. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 175-195 (2011).
10. C. M. Tan *et al.*, Phytoplasma SAP11 alters 3-isobutyl-2-methoxypyrazine biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* by suppressing NbOMT1. *J Exp Bot* **67**, 4415-4425 (2016).
11. S. Khorasanizadeh, The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation. *Cell* **116**, 259-272 (2004).
12. B. D. Strahl, C. D. Allis, The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45 (2000).
13. R. D. Kornberg, Eukaryotic transcriptional control. *Trends Cell Biol* **9**, M46-49 (1999).
14. T. R. Gregory, Synergy between sequence and size in large-scale genomics. *Nature reviews. Genetics* **6**, 699-708 (2005).
15. S. Buratowski, S. Hahn, P. A. Sharp, L. Guarente, Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system. *Nature* **334**, 37-42 (1988).
16. A. N. Imbalzano, K. S. Zaret, R. E. Kingston, Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *The Journal of biological chemistry* **269**, 8280-8286 (1994).
17. J. Zeitlinger *et al.*, RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat Genet* **39**, 1512-1516 (2007).
18. G. W. Muse *et al.*, RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat Genet* **39**, 1507-1511 (2007).
19. A. C. M. Cheung, P. Cramer, Structural basis of RNA polymerase II backtracking, arrest and reactivation. *Nature* **471**, 249-253 (2011).
20. J. Guhaniyogi, G. Brewer, Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* **265**, 11-23 (2001).
21. N. J. Proudfoot, A. Furger, M. J. Dye, Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell* **108**, 501-512 (2002).
22. J.-P. Hsin, J. L. Manley, The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev* **26**, 2119-2137 (2012).
23. A. Bonnet, B. Palancade, Regulation of mRNA trafficking by nuclear pore complexes. *Genes (Basel)* **5**, 767-791 (2014).

24. S. Varenne, J. Buc, R. Llobes, C. Lazdunski, Translation is a non-uniform process. Effect of tRNA availability on the rate of elongation of nascent polypeptide chains. *J Mol Biol* **180**, 549-576 (1984).
25. C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto Jr., Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angewandte Chemie International Edition* **44**, 7342-7372 (2005).
26. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto jr., L. Stryer, in *Stryer Biochemie*. (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2018), pp. 31-77.
27. F. U. Hartl, Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-579 (1996).
28. B. Kerem *et al.*, Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science (New York, N.Y.)* **245**, 1073-1080 (1989).
29. S. H. Cheng *et al.*, Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* **63**, 827-834 (1990).
30. M. J. Welsh, A. E. Smith, Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* **73**, 1251-1254 (1993).
31. G. A. Collins, A. L. Goldberg, The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* **169**, 792-806 (2017).
32. P. M. Masters, J. L. Bada, J. S. Zigler, Jr., Aspartic acid racemisation in the human lens during ageing and in cataract formation. *Nature* **268**, 71-73 (1977).
33. W. Chen, J. M. Smeekens, R. Wu, Systematic study of the dynamics and half-lives of newly synthesized proteins in human cells. *Chemical Science* **7**, 1393-1400 (2016).
34. B. H. Toyama, M. W. Hetzer, Protein homeostasis: live long, won't prosper. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 55-61 (2013).
35. K. D. Wilkinson, M. K. Urban, A. L. Haas, Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *The Journal of biological chemistry* **255**, 7529-7532 (1980).
36. A. Ciechanover, H. Heller, S. Elias, A. L. Haas, A. Hershko, ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 1365-1368 (1980).
37. A. Ciechanover, The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**, 13-21 (1994).
38. G. Goldstein *et al.*, Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 11-15 (1975).
39. J. Callis, T. Carpenter, C. W. Sun, R. D. Vierstra, Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics* **139**, 921-939 (1995).
40. R. T. Schimke, in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. (1973), pp. 135-187.
41. B. P. Jain, S. Pandey, WD40 Repeat Proteins: Signalling Scaffold with Diverse Functions. *Protein J* **37**, 391-406 (2018).
42. A. Bachmair, D. Finley, A. Varshavsky, In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science (New York, N.Y.)* **234**, 179-186 (1986).
43. G. A. Collins, J. R. Lipford, R. J. Deshaies, W. P. Tansey, Gal4 turnover and transcription activation. *Nature* **461**, E7; discussion E8 (2009).
44. M. Glotzer, A. W. Murray, M. W. Kirschner, Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138 (1991).
45. S. Sigismund, S. Polo, P. P. Di Fiore, Signaling through monoubiquitination. *Curr Top Microbiol Immunol* **286**, 149-185 (2004).
46. L. Hicke, Protein regulation by monoubiquitin. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 195-201 (2001).

47. V. Chau *et al.*, A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science (New York, N.Y.)* **243**, 1576-1583 (1989).
48. H. A. Fisk, M. P. Yaffe, A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **145**, 1199-1208 (1999).
49. J. M. Galan, R. Haguenaer-Tsapis, Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *The EMBO journal* **16**, 5847-5854 (1997).
50. C. Hoege, B. Pfander, G. L. Moldovan, G. Pyrowolakis, S. Jentsch, RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-141 (2002).
51. F. E. Reyes-Turcu, K. H. Ventii, K. D. Wilkinson, Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annual review of biochemistry* **78**, 363-397 (2009).
52. S. Murata, H. Yashiroda, K. Tanaka, Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 104-115 (2009).
53. Y. A. Lam, T. G. Lawson, M. Velayutham, J. L. Zweier, C. M. Pickart, A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* **416**, 763-767 (2002).
54. D. Finley, X. Chen, K. J. Walters, Gates, Channels, and Switches: Elements of the Proteasome Machine. *Trends Biochem Sci* **41**, 77-93 (2016).
55. K. Husnjak *et al.*, Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* **453**, 481-488 (2008).
56. Q. Deveraux, V. Ustrell, C. Pickart, M. Rechsteiner, A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 7059-7061 (1994).
57. T. Yao, R. E. Cohen, A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* **419**, 403-407 (2002).
58. R. Verma *et al.*, Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science (New York, N.Y.)* **298**, 611-615 (2002).
59. S. Bohn *et al.*, Structure of the 26S proteasome from *Schizosaccharomyces pombe* at subnanometer resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 20992-20997 (2010).
60. A. F. Kisselev, T. N. Akopian, K. M. Woo, A. L. Goldberg, The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 3363-3371 (1999).
61. H. J. Dyson, P. E. Wright, Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 197-208 (2005).
62. T. Grune, K. Merker, G. Sandig, K. J. Davies, Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 709-718 (2003).
63. J. M. Baugh, E. G. Viktorova, E. V. Pilipenko, Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol* **386**, 814-827 (2009).
64. K. Tanaka, A. Ichihara, Half-life of proteasomes (multiprotease complexes) in rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **159**, 1309-1315 (1989).
65. X. Huang, B. Luan, J. Wu, Y. Shi, An atomic structure of the human 26S proteasome. *Nature structural & molecular biology* **23**, 778-785 (2016).
66. J. Smalle, R. D. Vierstra, The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 555-590 (2004).
67. M. Lavy, M. Estelle, Mechanisms of auxin signaling. *Development (Cambridge, England)* **143**, 3226-3229 (2016).

68. I. B. Holme, P. L. Gregersen, H. Brinch-Pedersen, Induced Genetic Variation in Crop Plants by Random or Targeted Mutagenesis: Convergence and Differences. *Frontiers in plant science* **10**, (2019).
69. D. Shortle, D. DiMaio, D. Nathans, Directed mutagenesis. *Annu Rev Genet* **15**, 265-294 (1981).
70. A. Caplan *et al.*, Introduction of Genetic Material into Plant Cells. *Science (New York, N.Y.)* **222**, 815-821 (1983).
71. J. C. Sanford, T. M. Klein, E. D. Wolf, N. Allen, DELIVERY OF SUBSTANCES INTO CELLS AND TISSUES USING A PARTICLE BOMBARDMENT PROCESS. *Particulate Science and Technology* **5**, 27-37 (1987).
72. E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider, Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO journal* **1**, 841-845 (1982).
73. J. W. Gordon, G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa, F. H. Ruddle, Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 7380-7384 (1980).
74. D. Schaefer, J. P. Zryd, C. D. Knight, D. J. Cove, Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics MGG* **226**, 418-424 (1991).
75. A. Klug, D. Rhodes, Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**, 473-482 (1987).
76. J. Boch *et al.*, Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science (New York, N.Y.)* **326**, 1509-1512 (2009).
77. M. J. Moscou, A. J. Bogdanove, A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science (New York, N.Y.)* **326**, 1501-1501 (2009).
78. Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, A. Nakata, Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* **169**, 5429-5433 (1987).
79. R. Jansen, J. D. A. v. Embden, W. Gaastra, L. M. Schouls, Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* **43**, 1565-1575 (2002).
80. P. D. Hsu *et al.*, DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology* **31**, 827-832 (2013).
81. P. Mali *et al.*, CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature biotechnology* **31**, 833-838 (2013).
82. V. Pattanayak *et al.*, High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature biotechnology* **31**, 839-843 (2013).
83. Y. Fu *et al.*, High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature biotechnology* **31**, 822-826 (2013).
84. S. W. Cho *et al.*, Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* **24**, 132-141 (2014).
85. A. Fire, D. Albertson, S. W. Harrison, D. G. Moerman, Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development (Cambridge, England)* **113**, 503-514 (1991).
86. S. M. Elbashir *et al.*, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498 (2001).
87. R. L. Setten, J. J. Rossi, S.-p. Han, The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **18**, 421-446 (2019).
88. S. Qiu, C. M. Adema, T. Lane, A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acids Res* **33**, 1834-1847 (2005).

89. P. Tavladoraki *et al.*, Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* **366**, 469-472 (1993).
90. O. Artsaenko *et al.*, Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **8**, 745-750 (1995).
91. A. D. Parry, A. D. Blonstein, M. J. Babiano, P. J. King, R. Horgan, Abscisic-acid metabolism in a wilted mutant of *Nicotiana glauca*. *Planta* **183**, 237-243 (1991).
92. J. Phillips *et al.*, Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. *The EMBO journal* **16**, 4489-4496 (1997).
93. R. Radchuk *et al.*, Abscisic acid deficiency of developing pea embryos achieved by immunomodulation attenuates developmental phase transition and storage metabolism. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **64**, 715-730 (2010).
94. N. Staroske *et al.*, Increasing abscisic acid levels by immunomodulation in barley grains induces precocious maturation without changing grain composition. *J Exp Bot* **67**, 2675-2687 (2016).
95. S. Miroshnichenko *et al.*, Immunomodulation of function of small heat shock proteins prevents their assembly into heat stress granules and results in cell death at sublethal temperatures. *The Plant Journal* **41**, 269-281 (2005).
96. H. Haruki, J. Nishikawa, U. K. Laemmli, The anchor-away technique: rapid, conditional establishment of yeast mutant phenotypes. *Molecular cell* **31**, 925-932 (2008).
97. S. Schornack *et al.*, Protein mislocalization in plant cells using a GFP-binding chromobody. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **60**, 744-754 (2009).
98. U. Rothbauer *et al.*, A versatile nanotrapp for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **7**, 282-289 (2008).
99. A. Pauli *et al.*, Cell-type-specific TEV protease cleavage reveals cohesin functions in *Drosophila* neurons. *Dev Cell* **14**, 239-251 (2008).
100. B. Harder *et al.*, TEV protease-mediated cleavage in *Drosophila* as a tool to analyze protein functions in living organisms. *Biotechniques* **44**, 765-772 (2008).
101. R. J. Dohmen, P. Wu, A. Varshavsky, Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants. *Science (New York, N.Y.)* **263**, 1273-1276 (1994).
102. P. Zhou, R. Bogacki, L. McReynolds, P. M. Howley, Harnessing the ubiquitination machinery to target the degradation of specific cellular proteins. *Molecular cell* **6**, 751-756 (2000).
103. K. Nishimura, T. Fukagawa, H. Takisawa, T. Kakimoto, M. Kanemaki, An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat Methods* **6**, 917-922 (2009).
104. R. J. Poljak *et al.*, Three-Dimensional Structure of the Fab' Fragment of a Human Immunoglobulin at 2.8-Å Resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **70**, 3305-3310 (1973).
105. R. J. Poljak, L. M. Amzel, B. L. Chen, R. P. Phizackerley, F. Saul, The Three-Dimensional Structure of the Fab' Fragment of a Human Myeloma Immunoglobulin at 2.0-Å Resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **71**, 3440-3444 (1974).
106. T. T. Wu, E. A. Kabat, An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* **132**, 211-250 (1970).
107. C. Hamers-Casterman *et al.*, Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446-448 (1993).
108. A. S. Greenberg *et al.*, A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* **374**, 168-173 (1995).

109. E. J. Sundberg, R. A. Mariuzza, in *Advances in Protein Chemistry*. (Academic Press, 2002), vol. 61, pp. 119-160.
110. V. K. Nguyen, R. Hamers, L. Wyns, S. Muyldermans, Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *The EMBO journal* **19**, 921-930 (2000).
111. B. Stijlemans *et al.*, Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *The Journal of biological chemistry* **279**, 1256-1261 (2004).
112. E. R. Goldman *et al.*, Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. *Anal Chem* **78**, 8245-8255 (2006).
113. K. Boonrod, D. Galetzka, P. D. Nagy, U. Conrad, G. Krczal, Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance. *Nat Biotechnol* **22**, 856-862 (2004).
114. U. Conrad, R. Manteuffel, Conrad, U. & Manteuffel, R. Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**, 399-402. *Trends in plant science* **6**, 399-402 (2001).
115. Y. J. Shin *et al.*, Nanobody-targeted E3-ubiquitin ligase complex degrades nuclear proteins. *Sci Rep* **5**, 14269 (2015).
116. W. C. Earnshaw, N. Rothfield, Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* **91**, 313-321 (1985).
117. D. W. Cleveland, Y. Mao, K. F. Sullivan, Centromeres and Kinetochores: From Epigenetics to Mitotic Checkpoint Signaling. *Cell* **112**, 407-421 (2003).
118. J. Scheller, D. Henggeler, A. Viviani, U. Conrad, Purification of Spider Silk-elastin from Transgenic Plants and Application for Human Chondrocyte Proliferation. *Transgenic Research* **13**, 51-57 (2004).
119. C. Xiang, P. Han, I. Lutziger, K. Wang, D. J. Oliver, A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol Biol* **40**, 711-717 (1999).
120. M. Bevan, Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* **12**, 8711-8721 (1984).
121. G. Ramsay, G. I. Evan, J. M. Bishop, The protein encoded by the human proto-oncogene c-myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 7742-7746 (1984).
122. G. I. Evan, G. K. Lewis, G. Ramsay, J. M. Bishop, Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **5**, 3610-3616 (1985).
123. R. Deblaere *et al.*, Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* **13**, 4777-4788 (1985).
124. H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama, High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23-28 (1990).
125. M. Mersereau, G. J. Pazour, A. Das, Efficient transformation of Agrobacterium tumefaciens by electroporation. *Gene* **90**, 149-151 (1990).
126. R. B. F. Horsch, J.E.; Hoffmann, N.L.; Eichholtz, D.; Rogers, S.G. & Fraley, R.T., A simple and general method for transferring genes into plants. *Science (New York, N.Y.)* **227**, 1229-1231 (1985).
127. M. Gahrtz, U. Conrad, Immunomodulation of plant function by in vitro selected single-chain Fv intrabodies. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **483**, 289-312 (2009).
128. K. B. Mullis, F. A. Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350 (1987).
129. K. J. Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).

130. U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
131. K. Weber, M. Osborn, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry* **244**, 4406-4412 (1969).
132. M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254 (1976).
133. S. Quan, A. Hiniker, J.-F. Collet, J. C. A. Bardwell, in *Bacterial Cell Surfaces: Methods and Protocols*, A. H. Delcour, Ed. (Humana Press, Totowa, NJ, 2013), pp. 359-366.
134. N. Aubrey *et al.*, Design and evaluation of a diabody to improve protection against a potent scorpion neurotoxin. *Cell Mol Life Sci* **60**, 617-628 (2003).
135. P. Martineau, in *Antibody Engineering*, R. Kontermann, S. Dübel, Eds. (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010), pp. 657-665.
136. G. U. Balcke *et al.*, An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. *Plant Methods* **8**, 47 (2012).
137. M. H. Kubala, O. Kovtun, K. Alexandrov, B. M. Collins, Structural and thermodynamic analysis of the GFP:GFP-nanobody complex. *Protein science : a publication of the Protein Society* **19**, 2389-2401 (2010).
138. V. Hauptmann *et al.*, In planta production of ELPylated spideroin-based proteins results in non-cytotoxic biopolymers. *BMC Biotechnology* **15**, 9 (2015).
139. A. Sugio, H. N. Kingdom, A. M. MacLean, V. M. Grieve, S. A. Hogenhout, Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, E1254-E1263 (2011).
140. K. Janik *et al.*, An effector of apple proliferation phytoplasma targets TCP transcription factors—a generalized virulence strategy of phytoplasma? *Mol Plant Pathol* **18**, 435-442 (2017).
141. L. Zhi *et al.*, Effect of Agrobacterium strain and plasmid copy number on transformation frequency, event quality and usable event quality in an elite maize cultivar. *Plant cell reports* **34**, (2015).
142. S. Li, The Arabidopsis thaliana TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development. *Plant Signal Behav* **10**, e1044192-e1044192 (2015).
143. G. J. Loake, P. Ayyar, S. Howat, in *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*, B. Thomas, B. G. Murray, D. J. Murphy, Eds. (Academic Press, Oxford, 2017), pp. 430-436.
144. J. Ludwig-Müller *et al.*, A novel methyltransferase from the intracellular pathogen *Plasmodiophora brassicae* methylates salicylic acid. *Mol Plant Pathol* **16**, 349-364 (2015).
145. C. Zubieta *et al.*, Structural Basis for Substrate Recognition in the Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase Family. *The Plant cell* **15**, 1704-1716 (2003).
146. A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* **5**, 725-738 (2010).
147. J. Yang *et al.*, The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods* **12**, 7-8 (2015).
148. Y. Zhang, I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40 (2008).
149. A. Drozdetskiy, C. Cole, J. Procter, G. J. Barton, JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* **43**, W389-W394 (2015).
150. B. Lee, J.-S. Huang, L. Jayathilaka, J. Lee, S. Gupta. (2016), vol. 1474, pp. 25-47.

151. D. Desplancq, D. J. King, A. D. G. Lawson, A. Mountain, Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3. *Protein Engineering, Design and Selection* **7**, 1027-1033 (1994).
152. M. H. Dezfulian, D. M. Soulliere, R. K. Dhaliwal, M. Sareen, W. L. Crosby, The SKP1-like gene family of Arabidopsis exhibits a high degree of differential gene expression and gene product interaction during development. *PLoS One* **7**, e50984-e50984 (2012).
153. J. M. Gagne, B. P. Downes, S. H. Shiu, A. M. Durski, R. D. Vierstra, The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11519-11524 (2002).
154. H. Weber *et al.*, Arabidopsis AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant physiology* **137**, 83-93 (2005).
155. H. Weber, H. Hellmann, Arabidopsis thaliana BTB/ POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family. *The FEBS journal* **276**, 6624-6635 (2009).
156. A.-S. Dielen, S. Badaoui, T. Candresse, S. German-Retana, The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: a never-ending hide-and-peek game. *Mol Plant Pathol* **11**, 293-308 (2010).
157. A. Devoto, P. R. Muskett, K. Shirasu, Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 307-311 (2003).
158. K. Nagaki, K. Terada, M. Wakimoto, K. Kashihara, M. Murata, Centromere targeting of alien CENH3s in Arabidopsis and tobacco cells. *Chromosome Res* **18**, 203-211 (2010).
159. T. Ishii *et al.*, Unequal contribution of two paralogous centromeric histones to function the cowpea centromere. *bioRxiv*, 2020.2001.2007.897074 (2020).
160. A. Kirchhofer *et al.*, Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nature structural & molecular biology* **17**, 133-138 (2010).
161. S. R. Wentz, M. P. Rout, The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000562-a000562 (2010).
162. L. Pintard, A. Willems, M. Peter, Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *The EMBO journal* **23**, 1681-1687 (2004).
163. P. Figueroa *et al.*, Arabidopsis Has Two Redundant Cullin3 Proteins That Are Essential for Embryo Development and That Interact with RBX1 and BTB Proteins to Form Multisubunit E3 Ubiquitin Ligase Complexes in Vivo. *The Plant cell* **17**, 1180-1195 (2005).
164. R. Karimi-Ashtiyani *et al.*, Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 11211 (2015).
165. V. Chaikam, W. Molenaar, A. Melchinger, P. Boddupalli, Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. *Theoretical and Applied Genetics* **132**, (2019).
166. S. Henikoff, Y. Dalal, Centromeric chromatin: what makes it unique? *Curr Opin Genet Dev* **15**, 177-184 (2005).
167. E. Duro, A. L. Marston, From equator to pole: splitting chromosomes in mitosis and meiosis. *Genes Dev* **29**, 109-122 (2015).
168. I. Lermontova *et al.*, Knockdown of CENH3 in Arabidopsis reduces mitotic divisions and causes sterility by disturbed meiotic chromosome segregation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **68**, 40-50 (2011).
169. M. Ravi, S. W. Chan, Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* **464**, 615-618 (2010).
170. L. Comai, E. H. Tan, Haploid Induction and Genome Instability. *Trends in Genetics* **35**, 791-803 (2019).

171. C. SATO, Y. SETO, K. NABETA, H. MATSUURA, Kinetics of the Accumulation of Jasmonic Acid and Its Derivatives in Systemic Leaves of Tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc) and Translocation of Deuterium-Labeled Jasmonic Acid from the Wounding Site to the Systemic Site. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **73**, 1962-1970 (2009).
172. X. Bai *et al.*, AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 18-30 (2009).
173. A. Sugio, H. N. Kingdom, A. M. MacLean, V. M. Grieve, S. A. Hogenhout, Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, E1254-1263 (2011).
174. J. F. Palatnik *et al.*, Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**, 257-263 (2003).
175. A. Sugio, G. Dubreuil, D. Giron, J.-C. Simon, Plant–insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms. *J Exp Bot* **66**, 467-478 (2014).
176. G. Bannenberg, M. Martínez, M. Hamberg, C. Castresana, Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids* **44**, 85-95 (2009).
177. E. Bell, R. A. Creelman, J. E. Mullet, A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 8675-8679 (1995).
178. L. Beanland, C. Hoy, S. Miller, L. Nault, Influence of Aster Yellows Phytoplasma on the Fitness of Aster Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* **93**, 271-276 (2000).
179. L. Zhang, F. Zhang, M. Melotto, J. Yao, S. Y. He, Jasmonate signaling and manipulation by pathogens and insects. *J Exp Bot* **68**, 1371-1385 (2017).
180. H. S. Chung *et al.*, Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant physiology* **146**, 952-964 (2008).
181. A. J. Koo, X. Gao, A. D. Jones, G. A. Howe, A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **59**, 974-986 (2009).
182. P. E. Staswick, I. Tiryaki, The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **16**, 2117-2127 (2004).
183. P. E. Staswick, I. Tiryaki, M. L. Rowe, Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The Plant cell* **14**, 1405-1415 (2002).
184. W. Suza, P. Staswick, The role of JAR1 in jasmonoyl-L-isoleucine production during. *Planta* **227**, 1221-1232 (2008).
185. H. Chen *et al.*, Effects of overexpression of jasmonic acid biosynthesis genes on nicotine accumulation in tobacco. *Plant Direct* **2**, e00036 (2018).
186. B. Wang, S. Wang, Z. Wang, Genome-Wide Comprehensive Analysis the Molecular Phylogenetic Evaluation and Tissue-Specific Expression of SABATH Gene Family in *Salvia miltiorrhiza*. *Genes (Basel)* **8**, 365 (2017).
187. E. Attaran, T. E. Zeier, T. Griebel, J. Zeier, Methyl Salicylate Production and Jasmonate Signaling Are Not Essential for Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **21**, 954 (2009).
188. X. Geng, J. Cheng, A. Gangadharan, D. Mackey, The coronatine toxin of *Pseudomonas syringae* is a multifunctional suppressor of *Arabidopsis* defense. *The Plant cell* **24**, 4763-4774 (2012).

189. X. Y. Zheng *et al.*, Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* **11**, 587-596 (2012).
190. A.-C. WALLENHAMMAR, Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. *Plant Pathology* **45**, 710-719 (1996).
191. C. Donald, I. Porter, Integrated Control of Clubroot. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**, 289 (2009).
192. Y. Liu *et al.*, Screening of clubroot-resistant varieties and transfer of clubroot resistance genes to *Brassica napus* using distant hybridization. *Breed Sci* **68**, 258-267 (2018).
193. U. Conrad, J. Scheller, Considerations on Antibody-Phage Display Methodology. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **8**, 117-126 (2005).
194. C. Zubieta *et al.*, Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *The Plant cell* **15**, 1704-1716 (2003).
195. N. Zhao *et al.*, Structural, biochemical, and phylogenetic analyses suggest that indole-3-acetic acid methyltransferase is an evolutionarily ancient member of the SABATH family. *Plant Physiol* **146**, 455-467 (2008).
196. A. Sethi, B. Goldstein, S. Gnanakaran, Quantifying Intramolecular Binding in Multivalent Interactions: A Structure-Based Synergistic Study on Grb2-Sos1 Complex. *PLOS Computational Biology* **7**, e1002192 (2011).
197. A. Nyarko, Y. Song, J. Nováček, L. Židek, E. Barbar, Multiple Recognition Motifs in Nucleoporin Nup159 Provide a Stable and Rigid Nup159-Dyn2 Assembly*. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 2614-2622 (2013).
198. M. Welcker *et al.*, Fbw7 dimerization determines the specificity and robustness of substrate degradation. *Genes Dev* **27**, 2531-2536 (2013).
199. S. Gaseitsiwe *et al.*, Peptide microarray-based identification of *Mycobacterium tuberculosis* epitope binding to HLA-DRB1*0101, DRB1*1501, and DRB1*0401. *Clin Vaccine Immunol* **17**, 168-175 (2010).
200. M. Ho, R. J. Kreitman, M. Onda, I. Pastan, In vitro antibody evolution targeting germline hot spots to increase activity of an anti-CD22 immunotoxin. *The Journal of biological chemistry* **280**, 607-617 (2005).
201. L. Jermutus, A. Honegger, F. Schwesinger, J. Hanes, A. Plückthun, Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 75-80 (2001).
202. C. Zahnd, P. Amstutz, A. Plückthun, Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nature Methods* **4**, 269-279 (2007).
203. K. R. Siemering, R. Golbik, R. Sever, J. Haseloff, Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology* **6**, 1653-1663 (1996).

Anhang

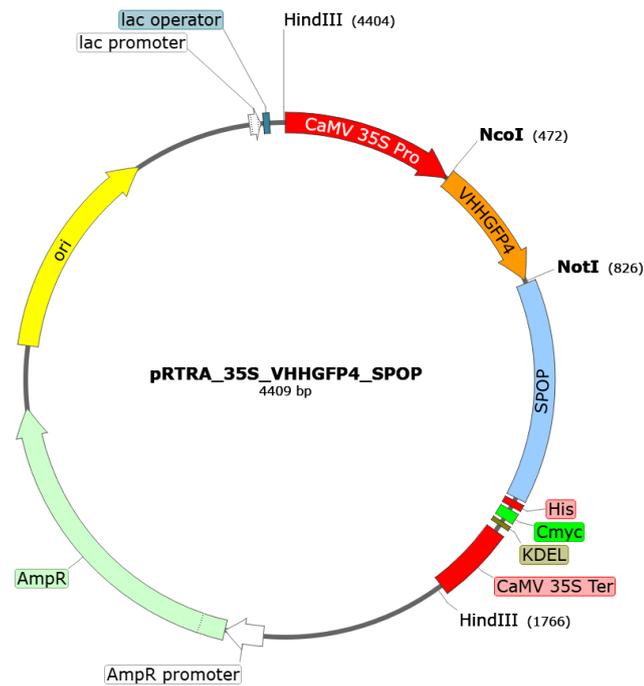


Abbildung A 1: Plasmidkarte des Klonierungsvektors pRTRA-VHHGFP4-SPOP mit dem SPOP-VHHGFP4-Konstrukt. CaMV 35 Pro: Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus (Cauliflower Mosaik Virus CaMV) für die Proteinüberexpression in Pflanzen. *NcoI/NotI*: Schnittstellen für die Integration von DNA-Konstrukten vor das E3-Ligase-Adapterprotein SPOP. His: 6xHistidin Affinitäts-tag. Cmyc: Affinitäts-tag. KDEL: ER-Retentionssignal.

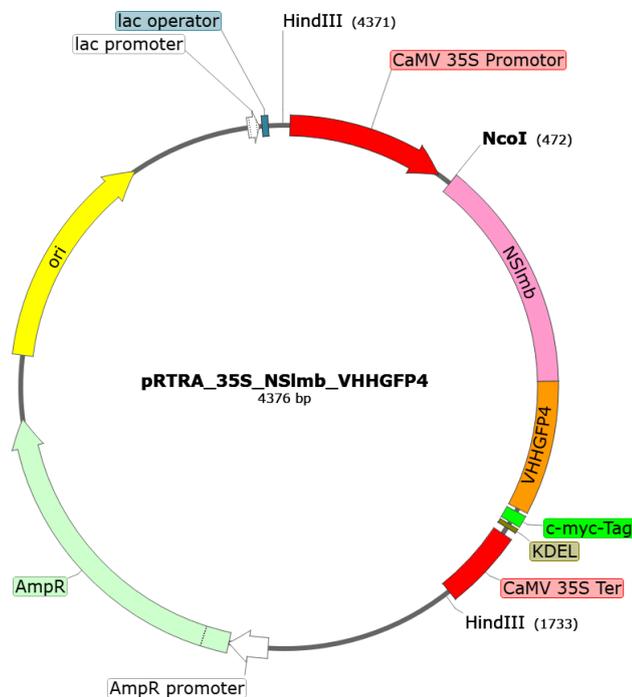


Abbildung A 2: Plasmidkarte des Zwischenvektors pRTRA-NSImb-VHHGFP4 mit dem F-Box-Nanobody-Konstrukt. CaMV 35 Pro: Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus (Cauliflower Mosaik Virus CaMV) für die Proteinüberexpression in Pflanzen. *NcoI/NotI*: Schnittstellen für die Integration von DNA-Konstrukten vor das E3-Ligase-Adapterprotein SPOP. His: 6xHistidin Affinitäts-tag. Cmyc: Affinitäts-tag. KDEL: ER-Retentionssignal.

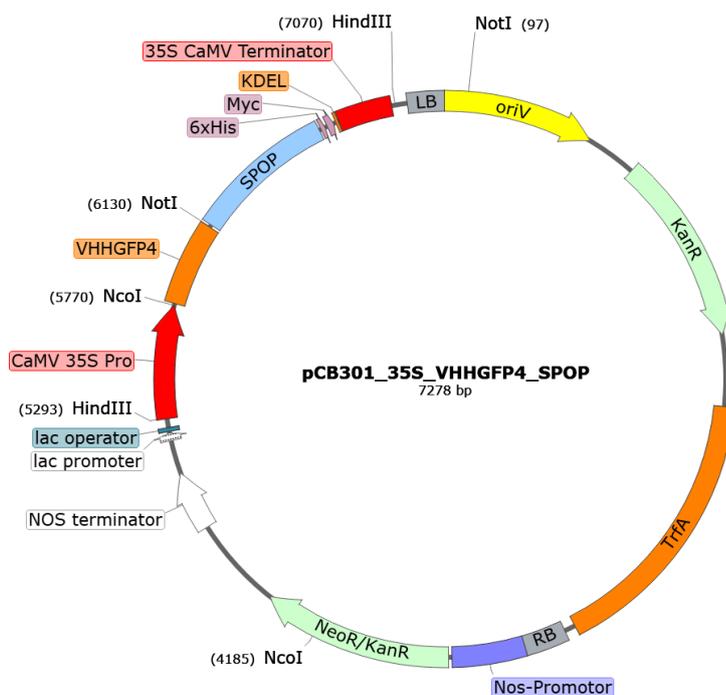


Abbildung A 3: Binärer Pflanzenexpressionsvektor pCB301-35SVHHGFP4-SPOP für die Expression der chimären E3-Ligase VHHGFP4-SPOP. DNA-Konstrukte zwischen *left* (LB)- und *right border* (RB) werden in das Genom der Pflanze integriert. Der dargestellte Vektor überführt damit die Resistenz gegen Kanamycin (nptII-Gen) unter Kontrolle des Nopalinsynthese-Promotors (Nos-P), was zur Selektion transformierter Pflanzen dient. Das VHHGFP4-SPOP-Konstrukt steht unter Kontrolle des CaMV-Promotors

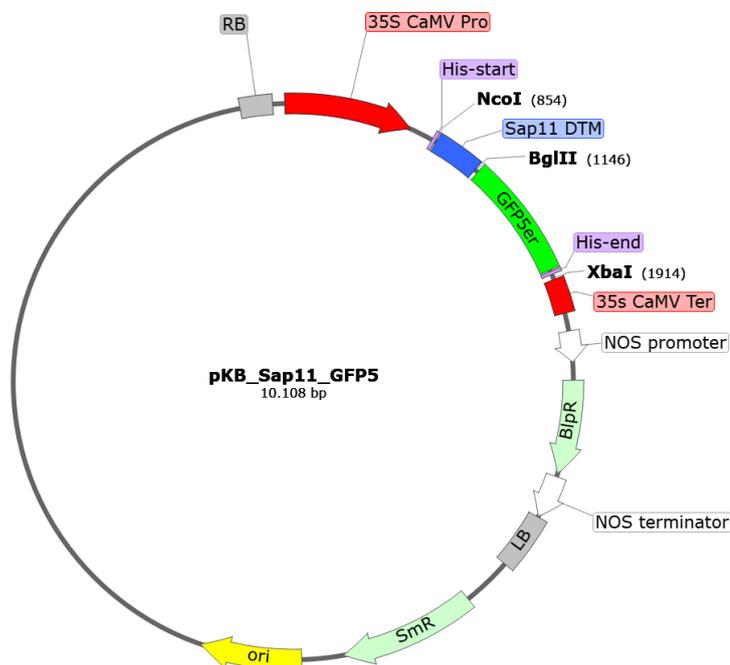


Abbildung A 4: Der binäre Pflanzenexpressionsvektor pKB-His-SAP11-GFP5-His für die Expression der Proteinfusion aus GFP5 und des pathogenen Effektorproteins SAP11. Die Selektion von transformierten Pflanzen erfolgte auf Basis der Phosphinothricinresistenz die durch die Phosphinothricin N-Acetyltransferase vermittelt wird. Dieses Enzym wird von dem Bar-Gen codiert und durch einen Nopalinsynthese Promotor kontrolliert. Plasmid-DNA wurde bereitgestellt durch Alisa Stohmayer (RLP AgroScience GmbH).

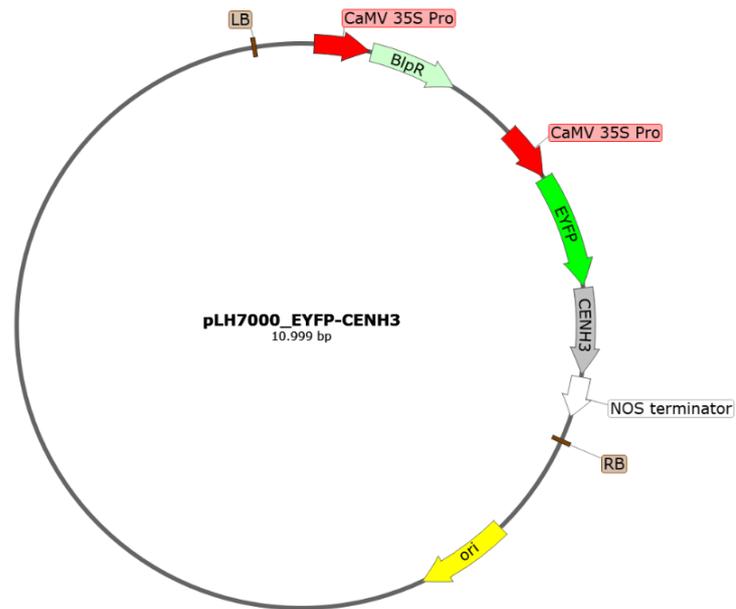


Abbildung A 5: Binärer Expressionsvektor pLH7000_EYFP-CENH3 für die Expression von EYFP-CENH3, als Zielprotein für den modellhaften Versuch kernlokalisierte Proteine zu degradieren. Transformierte Pflanzen wurden über die Ti-Plasmid vermittelte Phosphinothricinresistenz (Bar-Gen) selektiert. Plasmid-DNA wurde bereitgestellt durch Frau Inna Lermontova, IPK Gatersleben.

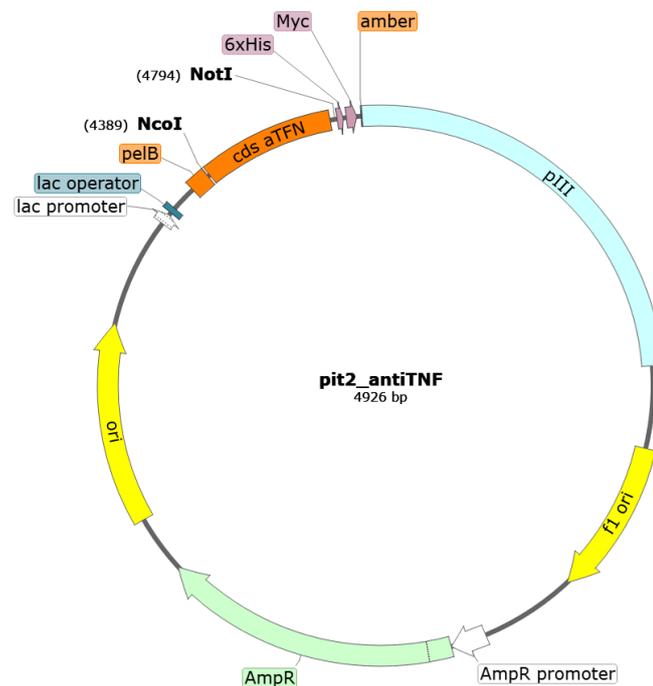


Abbildung A 6: Phagemidvektor pit2 für das Nanobody-Screening. Phagemidvektor zur Präsentation von Nanobodies auf der Membranoberfläche rekombinanter Bakteriophagen. Nanobodies oder scFvs werden als N-terminale pIII-Proteinfusion synthetisiert. Die pelB-Signalsequenz, für die Sekretion ins Periplasma, wird am Zielort durch eine Peptidase entfernt. Das Amber-Stopcodon (UAG) am 3'-Ende des DNA-Konstruktes wird in amber non-Stop-*E.coli* Stämmen überlesen.

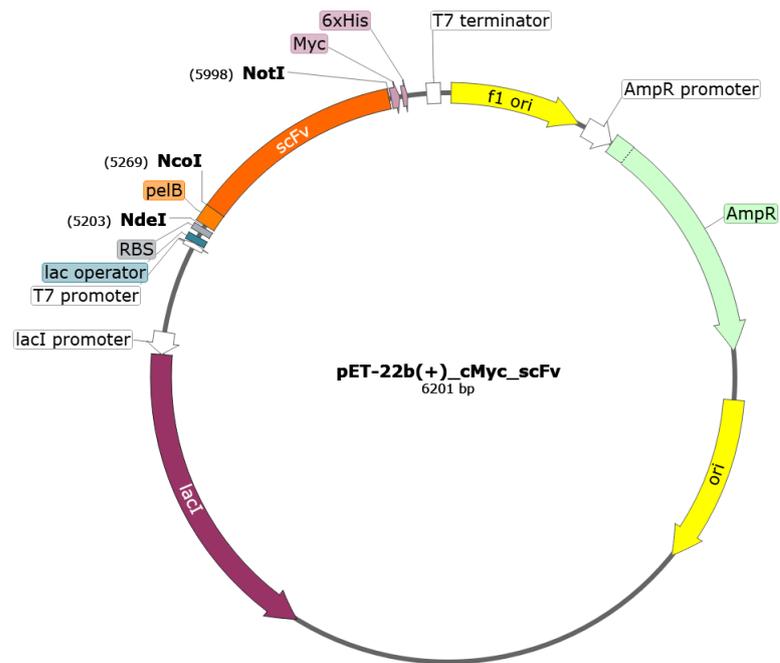


Abbildung A 7: Bakterieller Expressionsvektor pET-22b(+)_cMyc zur Überexpression von Zielproteinen.
Darstellung mit scFv-Sequenz die über *NcoI*- und *NotI*-Schnittstellen eingefügt wurde.

Anhang

Tabelle A 1: Aminosäure Sequenzen der schweren (V_H) und leichten (V_L) Ketten Regionen selektierter scFv nach der Mutagenese-PCR und Sequenzierung. Jede Kette besteht aus drei variablen CDRs und vier strukturebenden Framework (Fr) Regionen. Sequenzunterschiede innerhalb der CDRs sind mit einem * markiert. 11B11 enthält als einzige Variante Mutation in CDR1 der V_H. Framework-Bereiche enthalten erwartungsgemäß keine Mutationen. Zwischen den V_H und V_L befindet sich ein flexibles S2G4SG4SG4S2 Verbindungselement.

V_H							
Var.	Fr1	CDR1	Fr2	CDR2	Fr3	CDR3	Fr4
		**		* * * * *	*	*****	
3H5	MAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	TIQDTGHPTSYADSVKGR	FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK	SRGRFDY	WGQGT LVTVSS
4E10	MAEVQLLESGGGLVQPRGSLRLSCAASGFTFS	SSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	RILSRGQSTMYADSVKGR	FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK	TRSLFDY	WGQGT LVTVSS
4H2	MAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLFCAASGFTFS	SSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	RIFQPGWATSYADSVKGR	FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	WASLCDY	WGQGT LVTVSS
11A6	MAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	PIRNRGQCTSYADSVKGW	FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK	SFPAPDY	WGQGT LVTVSS
11B11	MAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	TYKMR	WVRQAPEKGLEWVS	AISGSGSTYYADSVKGR	FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK	TTWLFDY	WGQGT LVTVSS
V_L							
Var.	Fr1	CDR1	Fr2	CDR2	Fr3	CDR3	Fr4
		*****		** *		**** *	
3H5	TDIQTQSPSSLSASVGDRTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPKGKAPKLLIY	PASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC	QQGRMSPST	FGQGT KVEIKR
4E10	TDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPKGKAPKLLIY	SASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC	QQSYGTPNT	FGQGT KVEIKR
4H2	TDIQTQSPSSLSASVGDRTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPKGKAPKLLIY	AASRLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFVYTYC	QQVPEPPT	FGQGT KVEIKR
11A6	TDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPKGKAPKLLIY	LASYLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC	QQARVPHT	FGQGT RVEIKR
11B11	TDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	QSIYGYLK	WYQQKPKGKAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC	QQSYSTPYT	FGQGT KVEIKR

Sequenzinformation der verwendeten DNA-Konstrukte

Die hier dargestellten Sequenzen beziehen sich auf die in der Arbeit verwendeten DNA-Konstrukte und sind im FASTA-Format abgebildet. Bei Fusionskonstrukten bezieht sich die Farbcodierung auf die Einzelfragmente.

SPOP

Sequenz der humanen E3-Ligase. Dargestellt ist die synthetisierte SPOP-Sequenz, inklusive der beschriebenen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme.

```
CCATGGgtGCGGCCGCATCTGTCAACATTTCTGGCCAGAATACCATGAACATGGTAA
AGGTTCCCTGAGTGCCGGCTGGCAGATGAGTTAGGAGGACTGTGGGAGAATTCCCGG
TTCACAGACTGCTGCTTGTGTGTTGCCGGCCAGGAATTCCAGGCTCACAAGGCTATC
TTAGCAGCTCGTTCTCCGGTTTTTAGTGCCATGTTTGAACATGAAATGGAGGAGAGC
AAAAAGAATCGAGTTGAAATCAATGATGTGGAGCCTGAAGTTTTTAAGGAAATGAT
GTGCTTCATTTACACGGGGAAGGCTCCAAACCTCGACAAAATGGCTGATGATTTGC
TGGCAGCTGCTGACAAGTATGCCCTGGAGCGCTTAAAGGTCATGTGTGAGGATGCC
CTCTGCAGTAACCTGTCCGTGGAGAACGCTGCAGAAATTCTCATCCTGGCCGACCT
CCACAGTGCAGATCAGTTGAAAACCTCAGGCAGTGGATTTTCATCAACTATCATGCTT
CGGATGTCTTGGAGACCTCTGGGTGGAAGTCAATGGTGGTGTACATCCCCACTTG
GTGGCTGAGGCATACCGCTCTCTGGCTTCAGCACAGTGCCCTTTTCTGGGACCCCCA
ggggcccagGAACAAAACCTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATctcgag
```

VHGF4-SPOP

Chimäre E3-Ligase für den Abbau kernlokalisierter Proteine.

```
atggatcaagtccaactggtggagtctggtggcgcttgggtgcagccaggtggctctctgcgttgcctgtgccgcttggcttcccagtgaaccgctatt
ccatgcgctggtatgccaggctccaggcaagagcgtgagtggttagccggtatgccagcgggtgatcgtagctctatgaagactcgtgaag
ggcggttaccatcagcgtgacgatcccgtaacacgggtgatctgcaaatgaacagctgaaacctgaagatacgccggtgtattactgtaatgtaa
cgtgggcttcgagtattggggccaaggcaccaggtcaccgtctccagcGCGGCCGCATCTGTCAACATTTCTGGCCAGA
ATACCATGAACATGGTAAAGGTTCCCTGAGTGCCGGCTGGCAGATGAGTTAGGAGGACTGTG
GGAGAATTCCCGGTTACAGACTGCTGCTTGTGTGTTGCCGGCCAGGAATTCCAGGCTCACA
AGGCTATCTTAGCAGCTCGTTCTCCGGTTTTTAGTGCCATGTTTGAACATGAAATGGAGGAG
AGCAAAAAGAATCGAGTTGAAATCAATGATGTGGAGCCTGAAGTTTTTAAGGAAATGATGT
GCTTCATTTACACGGGGAAGGCTCCAAACCTCGACAAAATGGCTGATGATTTGCTGGCAGCT
GCTGACAAGTATGCCCTGGAGCGCTTAAAGGTCATGTGTGAGGATGCCCTCTGCAGTAACCT
GTCCGTGGAGAACGCTGCAGAAATTCTCATCCTGGCCGACCTCCACAGTGCAGATCAGTTGA
AAACTCAGGCAGTGGATTTTCATCAACTATCATGCTTCGGATGTCTTGGAGACCTCTGGGTGG
AAGTCAATGGTGGTGTACATCCCCACTTGGTGGCTGAGGCATACCGCTCTCTGGCTTCAGC
ACAGTGCCCTTTTCTGGGACCCCCA
```

NSlmb-VHHGFP4

Konstrukt einer chimären E3-Ligase für den Abbau von GFP im Zytosol.

atgatgaaaatggagactgacaaaataatggacgaaaccaactccaatgcacaggccttcacaaccactatgctgtacgaccgggtgcgc
 aagaaagactcatgcccacctaccaaacggagcgggaactctgcttcagtactcaccagtgagcagtcgggcccaggtggacttt
 gtggagcacctgctgtcgcgcgatgtgccactatcaacacggacagatcaatgcctatctcaagccgatgctccagcgggactttatcacatt
 gctgccaatcaagggctggtacacatcgagaaaacatttgcgtacttggatgccgaatcgctcaaatcatccgagctggctgcaagg
 aatggctgcgctcatttccgagggcatgctctggaagaagctcatgaacgaaggtgcgcacagattccttggcgcggactggccg
 agcggcgtaatggatgcagtaccttcaagccaagaccggccagactcaacggccacactcattccatcgcgagttgtcccaagat
 aatgaatgacattgacagcatagagaacaactggcggactggccgccacCTCGAGATGGATCAAGTCCAAGTGG
 TGGAGTCTGGTGGCGCTTTGGTGCAGCCAGGTGGCTCTCTGCGTTTGTCTGTGCCG
 CTTCTGGCTTCCCAGTGAACCGCTATTCCATGCGCTGGTATCGCCAGGCTCCAGGCA
 AAGAGCGTGAGTGGGTAGCCGGTATGTCCAGCGCGGGTGATCGTAGCTCCTATGAA
 GACTCCGTGAAGGGCCGTTTCACCATCAGCCGTGACGATGCCCCGTAACACGGTGTA
 TCTGCAAAATGAACAGCTTGAAACCTGAAGATACGGCCGTGTATTACTGTAATGTGA
 ACGTGGGCTTCGAGTATTGGGGCCAAGGCACCCAGGTCACCGTCTCCAGC

EYFP-CENH3

Modellprotein für den Abbau kernlokalisierter Proteine. Kloniert und bereitgestellt von
 Frau Dr. Inna Lermontova, IPK Gatersleben.

Atggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgccatcctggcgcagctggacggcgacgtaaaccggccacaagttcagc
 ggtccggcgagggcgaggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtccctggc
 ccacctcgtgaccacctcggctacggcctgcagtgttcgcccctaccggaccacatgaagcagcagacttctcaagtcgccat
 gcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgccgaggtgaagttcgaggcgca
 caccctggtgaaccgcatcgagctgaaggcatcgactcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaac
 agccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcg
 tgcagctcgggaccactaccagcagaacacccccatcgcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagctaccagtc
 cggcctgagcaagacccaacgagaagcgcgatcatatgctctgctggagttcgtgaccggcgccgggatcactctcggcatggac
 gagctgtacaagGGATCCCCCGGGATGGCGAGAACCAAGCATCGCGTTACCAGGTCACAA
 CCTCGGAATCAAAGTATGCCGCGGTGCTTCATCTTCTCAGGCGGCAGGTCCAAC
 TACGACCCCGACAAGGAGAGGCGGTGAAGGTGGAGATAATACTCAACAAACAAAT
 CCTACAACCTCACCAGCTACTGGTACAAGGAGAGGGGCTAAGAGATCCAGACAGG
 CTATGCCACGAGGCTCACAGAAGAAGTCTTATCGATACAGGCCAGGAACCGTTGCT
 CTAAAAGAGATTCGCCATTTCCAGAAGCAGACAAACCTTCTTATTCCGGCTGCCAG
 TTTCATAAGAGAAGTGAGAAGTATAACCCATATGTTGGCCCCCTCCCCAAATCAATC
 GTTGGACAGCTGAAGCTCTTGTGCTCTTCAAGAGGCGGCAGAAGATTACTTGGTT
 GGTTTGTCTCAGATTCAATGCTCTGTGCTATCCATGCAAGACGTGTTACTCTAATG
 AGAAAAGACTTTGAACTTGCACGCCGGCTTGGAGGAAAAGGCAGACCATGGTGA

SAP11-GFP5

Proteinfusion aus dem pathogenen Effektorprotein SAP11 aus *Phytoplasma mali* und dem zellulären Markerprotein GFP. Die thermostabile Faltungsmutante GFP5 geht auf Siemering *et al.* 1996 zurück (203).

```
atggcctcccctccaaagaaggactccaacaagggaagaaagtatagacaagagcgtatcttcaaagcgagaacagttctattcgtgaat
ataggaattagaaatggcttgaaccaactccggaagaggagagaacactattatggagacccttaacaatcccgataagatggaggt
gttctcaaaaaagctcaggatgaggcgaataaaaaagaggtgggagttcatctagccagcatgatgataataataaagataaaggcaa
aaaGGATCCGGAGATCTGACTAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCTACTGGAGTTGTCCC
AATTCTTGTGTAATTAGATGGTGTATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGA
GGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTG
GAAAACCTACCTGTTCCGTGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAT
GCTTTTCAAGATAACCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATG
CCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGGAACCTACA
AGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAGCTT
AAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACA
ACTACAACCTCCACAACGTATACATCATGGCCGACAAGCAAAAAGAACGGCATCAA
AGCCAACCTTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGACGGCGGCGTGCAACTCGCTGATC
ATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATT
ACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATG
GTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATAC
AAA
```

1B1

Die Nanobody-Variante 1B1 wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Phagen-Display selektiert.

```
ATGGGATCTCAAGTTCAGCTTCAAGAATCTGGTGGAGGACTTGTTCAACCTGGTGG
ATCTCTTAGGCTTTCTTGCGCTGCTTCTGGAAGGACTTTCTCTGATCACTCTGGATAC
ACTTACACTATTGGATGGTTCAGACAGGCTCCAGGAAAAGAGAGAGAGTTCGTTGC
TAGGATCTACTGGTCATCTGGAAACACTTACTACGCTGATTCTGTGAAGGGAAGAT
TCGCTATTTCTAGGGATATTGCTAAGAACACTGTGGATCTTACTATGAACAGCCTTG
AGCCAGAGGATACTGCTGTTTACTATTGCGCTGCTATCGGGCGTAGTCTCGTTCTCC
CGCACGCCAGGGTTGCTGCGGTTTGGGGACAGGGAACTCAAGTGACTGTTTCTTCT
GCCGGCGCGGCCGC
```

3H5

Eine scFv-Variante die im Rahmen dieser Arbeit auf Basis von Phagen-Display anhand einer Peptid-Matrix selektiert wurde.

```
ATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTG
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACGATTCAGGATACTG
GTCATCCGACATCGTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGAC
AATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGG
CCGTATATTACTGTGCGAAATCACGGGGTTCGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACC
CTGGTCACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTCAAGGCGAGGTGGCAGCGGCGGTG
GCGGGTTCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG
GAGACAGAGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAAT
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCCGGCATCCTC
TTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA
```

CTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGG
GGCGGATGTCGCCTTCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGGC
GGCCGC

11B11

Eine scFv-Variante die im Rahmen dieser Arbeit auf Basis von Phagen-Display anhand einer Peptid-Matrix selektiert wurde.

ATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCACGTATAAGATGCGTTG
GGTCCGCCAGGCTCCAGAGAAGGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTG
GTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTACCATCTCCAGAGAC
AATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGG
CCGTATATTACTGTGCGAAAACCTACGTGGCTGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACC
CTGGTCACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTACAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTG
GCGGGTCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG
GAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTATGGTTATTTAAAG
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAG
TTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA
CTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGA
GTTACAGTACCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGGCG
GCCGCA

Tabelle A 2: Messwerte aus Kompetitions-ELISA für 1B1. Das Antigen (PbBSMT1) wurde in einheitlicher Konzentration (1ng/μL) zum Beschichten der ELISA-Platten eingesetzt. Je Platte wurde eine scFv- oder Nanobody-Variante mit jeweils 5 Messwerten (Replikate) pro Kompetitor-Konzentration analysiert. Die Konkurrenz der Antigenbindung erfolgte in abfallenden Konzentrationen von 20000 nM bis 100 nM. Alle Messwerte entsprechen dem Absorptionswert bei 405 nm, nach Abzug des Signals der BSA-Kontrolle.

	20000 nM	10000 nM	5000 nM	2000 nM	1000 nM	750 nM	500 nM	250 nM	100 nM	0 nM
1	-0,002	0,029	0,032	0,134	0,307	0,275	0,417	0,656	0,963	1,013
2	0,005	0,016	0,024	0,133	0,297	0,273	0,439	0,662	0,985	1,068
3	0,006	0,011	0,027	0,151	0,306	0,288	0,433	0,688	1,001	1,066
4	0,000	0,015	0,031	0,145	0,305	0,292	0,424	0,635	1,022	1,165
5	0,003	0,016	0,026	0,146	0,298	0,286	0,442	0,641	1,034	1,047
Mittelwert	0,002	0,017	0,028	0,142	0,302	0,283	0,431	0,657	1,001	1,072
Standard- abweichung	0,003	0,007	0,003	0,008	0,005	0,008	0,010	0,021	0,028	0,057

Tabelle A 3: Auswahl der Peptide für die Peptidmatrix. Die Peptidsequenzen wurden auf Basis der Strukturvorhersage des PbBSMT1 Proteins ausgewählt.

PbBSMT			
Lfd. Nr.	Sequenz	n AA	Sekundärstruktur
1	<u>MAGVVMAGDGEYNAASSGQ</u>	19	α -Helix
2	<u>NAASSGQAHSLMLMLPEIL</u>	19	α -Helix
3	<u>PEILDDVRSRRGP</u>	13	α -Helix
4	<u>SQGRTSLTIFESILH</u>	15	
5	<u>ESILHACPGQSFTMF</u>	15	
6	<u>SFTMFLIDQPGNDWA</u>	15	
7	<u>GNDWATTRQMFSNWP</u>	15	
8	<u>FSNWPVEPSTSTCFT</u>	15	
9	<u>TSTCFTSRHDIEAAL</u>	15	α -Helix
10	<u>IEAALAESNPSP</u>	13	
11	<u>PSPIRIFLCGISFFE</u>	15	β -Faltblatt
12	<u>ISFFEQVLPDGILD</u>	15	
13	<u>LSQRPHIGAGTTFRSLPQ</u>	18	
14	<u>RSLPQESRIGVEDAA</u>	15	α -Helix
15	<u>VEDAAAQDWERILRH</u>	15	α -Helix
16	<u>RILRHRNRETKPGAR</u>	15	α -Helix
17	<u>YNILSTYCPFTWHD</u>	15	α -Helix
18	<u>FTWHDYSSFMERTL</u>	15	α -Helix
19	<u>ERTLTELLSSGTIT</u>	15	
20	<u>HEQSFNAVQAVYFR</u>	15	
21	<u>AVYFRSNAEFEAPF</u>	15	α -Helix
22	<u>FEAPFYAGHPAVDG</u>	15	
23	<u>PAVDGMSLLRIDWR</u>	15	
24	<u>RIDWRTFQNTDWDD</u>	15	
25	<u>TDWDDDPDTFAWNY</u>	15	α -Helix
26	<u>FAWNYRRSLLAVVS</u>	15	α -Helix
27	<u>LAVVSNIWQTAFPE</u>	15	Loop
28	<u>TAFPEHVTTLLRER</u>	15	α -Helix
29	<u>LLRERLLDDIKTNP</u>	15	α -Helix
30	<u>IKTNPLVYKDNWL</u>	14	α -Helix

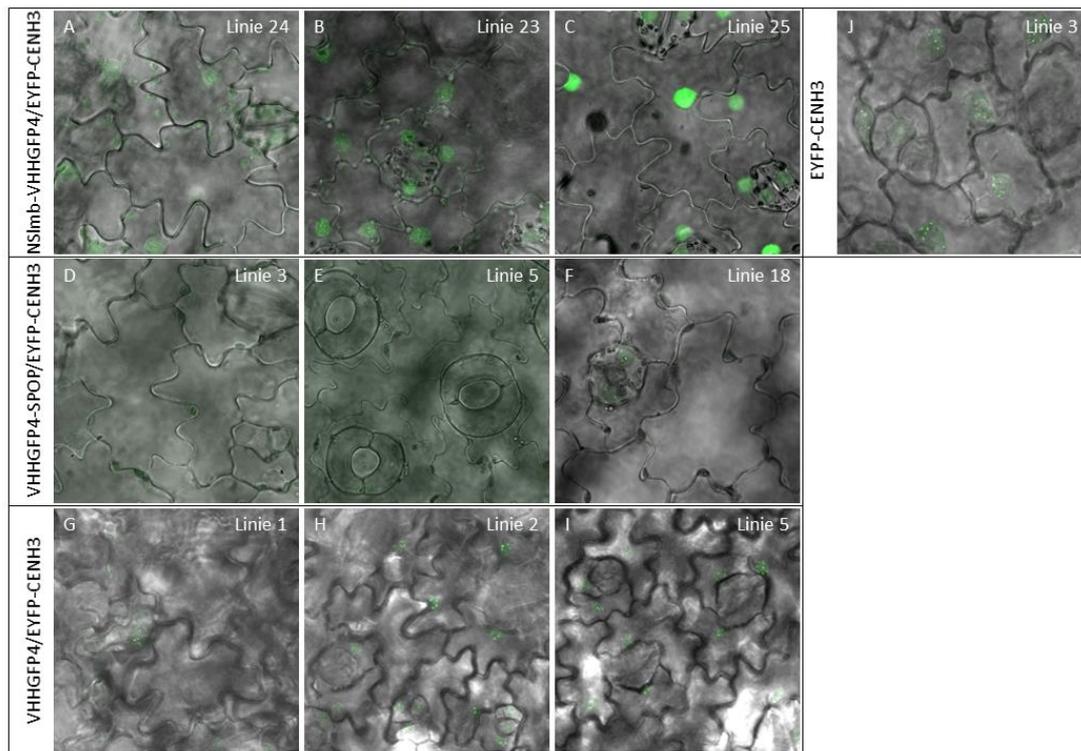


Abbildung A 8: Aufnahmen von jeweils drei individuellen Pflanzenlinien mittels konfokalem Laser Scanning Mikroskop für die Analyse transgener Tabakpflanzen. (A, B, C): Blattmaterial von transgenen Pflanzen mit NSlmb-VHHGFP4 / EYFP-CENH3 Koexpression. Die Bilder verdeutlichen, dass sich EYFP-CENH3 im nukleoplasmatischen Raum akkumuliert, solange NSlmb-VHHGFP4 koexprimiert wird. Unterschiedliche Signalintensitäten in Abhängigkeit der Pflanzenlinie kann auf unterschiedlich Kopienzahl (nicht analysiert) des Transgens zurückgeführt werden. (D, E, F): Pflanzen mit VHHGFP4-SPOP/ EYFP-CENH3 Koexpression. Es konnte kaum bis gar kein Fluoreszenz Signal detektiert werden. Linie 18 (F) zeigt als einzige sporadisch auftretende Signale in den Zellkernen der Stomata. (G, H, I): Pflanzen mit VHHGFP4/EYFP-CENH3 Überexpression zeigen das typische Fluoreszenzsignal welches sich an den Zentromeren akkumuliert. (J) Transgene Pflanzen die ausschließlich EYFP-CENH3 überexprimieren. 40-fache Vergrößerung.



Abbildung A 9: Charakterisierung der SAP11-Phänotypen in *N. tabacum*. A: Gegenüberstellung eines Wildtyp-Blattes und einer Blattprobe aus einer transgenen Pflanze mit SAP11-GFP5 Überexpression. Größenmaßstab \triangleq 1 cm. B: Pflanze mit SAP11-GFP5 Überexpression zu einem späten Entwicklungszeitpunkt.

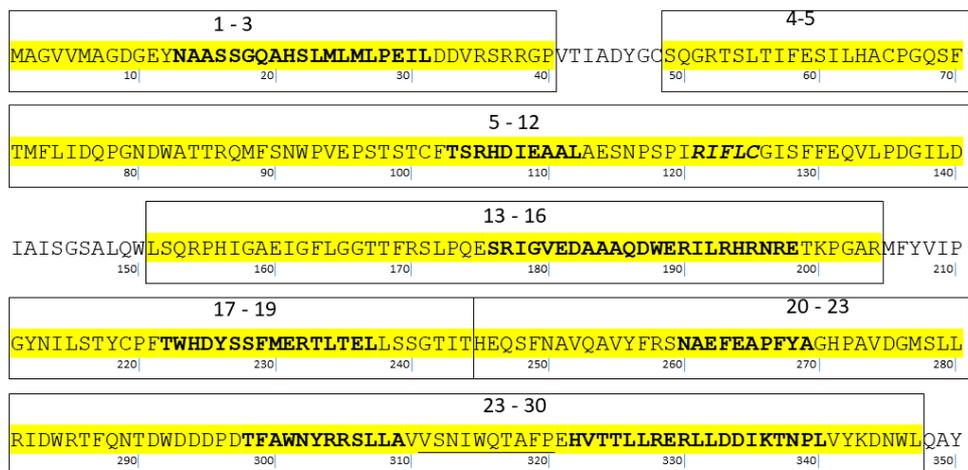


Abbildung A 10: Peptidauswahl im Gesamtkontext der PbBSMT1-Aminosäuresequenz. Peptide für das Array-basierte Phagen-Display ausgewählt wurden sind gelb hervorgehoben. Die Nummerierung bezieht sich auf Einzelpeptide wie sie in

Tabelle A 3 aufgelistet sind. Die ausgewählten Sequenzbereiche decken alle oberflächenexponierten Aminosäuren ab.

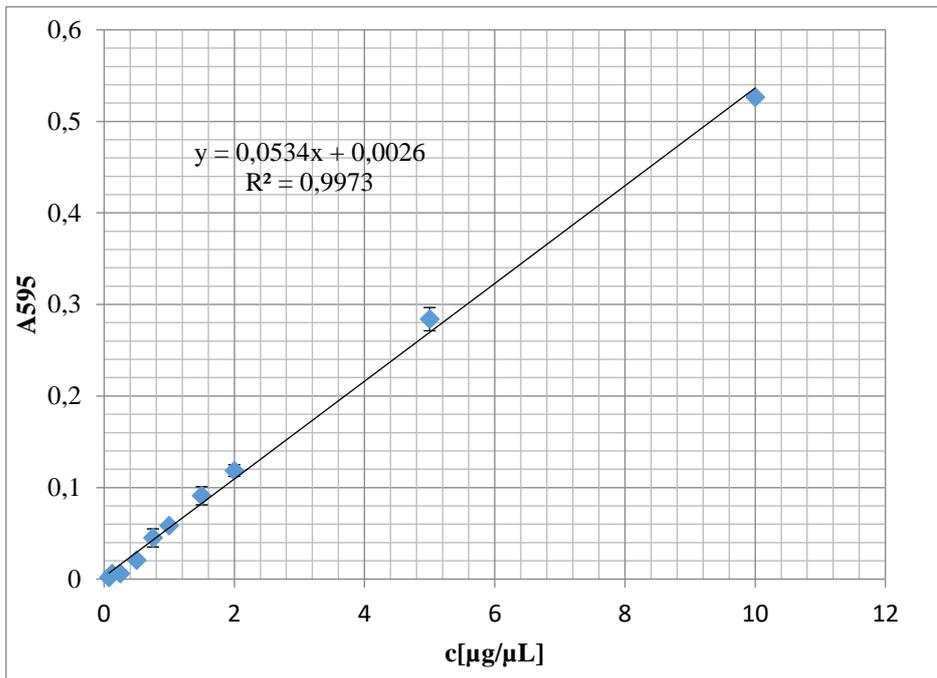


Abbildung A 11: Bradford-Eichgerade. Die Messwerte für die Gerade wurden Anhand von BSA-Verdünnungsstufen experimentell ermittelt. Berechnungen von Proteinkonzentrationen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten auf Basis der dargestellten Geradengleichung und der verwendeten Bradford-Reagenz.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Udo Conrad für die Vergabe des Themas und Betreuung dieser Arbeit. Vielen Dank für konstruktive Kritik, fachliche Diskussionen und interessante Gespräche über die Wissenschaft hinaus. Das entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheiten die mir gegeben wurden, um mich wissenschaftlich zu entfalten sind keine Selbstverständlichkeit. Auch möchte ich mich für die Gelassenheit und Geduld bedanken, die mir rückwirkend betrachtet überraschend groß erscheint.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Thomas Altmann für die Finanzierung des Projektes und viele kritische Fragen im Anschluss an regelmäßige Progress Reports.

Dr. Hoang Trong Phan danke ich für die Unterstützung in Proteinbiochemischen Fragestellungen und Klonierungsangelegenheiten. Danke für ein stets offenes Ohr unabhängig von der eigenen Belastung. Die kulinarischen Kurzurlaube zu feierlichen Anlässen sind eine angenehme Abwechslung gewesen.

Ich danke allen ehemaligen und derzeitigen technischen Mitarbeitern der AG Phytoantikörper für fortwährende Unterstützung in allen Lebenslagen. Christine Helmold, Ingrid Pfort, Isolde Tillack, Ulrike Gresch, Daniel Gast,

Allen ehemaligen Studenten die die AG Phytoantikörper bereichert haben. Besonderer Dank wird Mina Daoud, Asma El Araiedh, Bernardinus zuteil mit denen ich das Letzte Jahr meiner Promotion verbracht habe. Rückwirkend betrachtet war die gemeinsame Zeit, allen Widrigkeiten zum Trotz, sehr lustig und lehrreich. Ich hoffe, dass das IPK auch in Zukunft ein Magnet für junge Wissenschaftler aus aller Welt bleibt und einen interkulturellen Dialog fördert.

Der gesamten IPK Arbeitsgruppe Chromosomenstruktur und -Funktion unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Houben für die gute Zusammenarbeit die in einer gemeinsamen Publikation mündete. Im speziellen danke ich Dr. Inna Lermontova, Dr. Dmitri Demidov, Heike und Ola für hilfreiche Anmerkungen und experimentelle Unterstützung.

Frau Prof. Dr. Hause danke ich für die experimentelle Unterstützung bei der Bestimmung der Jasmonsäure Dynamiken in transgenen Pflanzen. Ich weiß den unkomplizierten und stets kooperativen Umgang sehr zu schätzen.

Dr. Kajohn Boonrod und Alisa Stohmayer von RLP AgroScience GmbH, AIPlanta-Institute für Plant Research, Breitenweg 71, 67435 Neustadt für die Bereitstellung von SAP11-GFP5-Plasmid-DNA.

Großen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Armin Djamei von der Universität in Bonn für die Bereitstellung der Peptidarrays zuteilwerden lassen.

Dr. Yeong Shin aus dem Department of Molecular Bioscience, college of Biomedical Science, Kangwon National University, Republic of Korea für die Bereitstellung der SPOP-Sequenz

Herzlicher Dank geht an Dr. Tobias Meitzel, dessen kreative und oft pragmatische Sicht auf die Wissenschaft hoffentlich etwas auf mich abgefärbt hat. Unserer philosophischen Gespräche während gemeinsamer Mittagspausen oder Pendelfahrten werden mir im Gedächtnis bleiben.

Dr. Andreas Hoffmann und Dr. Dominik Schneider haben mich bereits 2010 das erste Mal mit der Proteinanalytik infiziert haben. Seither ist weder mein Interesse an künstlichen Bindeproteinen, noch der rege Kontakt zu diesen beiden „Kernmitgliedern“ der AG Künstliche Bindeproteine (ehemals unter Leitung von Prof. R. Rudolph) abgeflaut. Vielen Dank für über einem Jahrzehnt der geduldigen Unterstützung, ich werde euch auch in Zukunft nicht schonen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Meinen Eltern, denn nicht nur aus reproduktionsbiologischer Sicht wäre diese Arbeit ohne sie nicht möglich gewesen. Meinen Freunden, die meine Marotten aushalten und meiner lieben Anja die mir stets Rückhalt gegeben hat.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher weder mit dieser noch einer anderen Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle (Saale), den
Ort, Datum

Eberhard Sorge

