

Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten Antikörpern und scFv Fusionsproteinen zur Generierung *Phytophthora infestans*-resistenter Kartoffelpflanzen

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH
Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Agraringenieurin

Sylvia Schleker

aus Düren

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Rainer Fischer
Privatdozent Dr. Joachim Hamacher

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2009

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

meinen Eltern

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Phytophthora infestans</i>	1
1.2	Antikörper	3
1.2.1	Herstellung von Antikörpern und Antikörperderivaten	3
1.2.2	Akkumulation von Antikörpern und Antikörperfragmenten in Pflanzen	5
1.3	Pathogenresistente Pflanzen	6
1.3.1	Antikörper-vermittelte Resistenz	6
1.3.2	Status quo <i>Phytophthora infestans</i>	8
1.4	Zielsetzung	10
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Material	12
2.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Reaktionskits	12
2.1.2	Geräte, Apparaturen und Zubehör	13
2.1.3	Puffer, Medien und Lösungen	14
2.1.4	Antikörper und Enzyme	14
2.1.5	Organismen	15
2.1.5.1	Pathogene	15
2.1.5.2	Tiere	16
2.1.5.3	Bakterienstämme und Pflanzen	16
2.1.6	Phagen	17
2.1.7	Plasmide, Phagemide	17
2.1.8	Oligonukleotide	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Transformation, Selektion und Charakterisierung rekombinanter Bakterien ..	19
2.2.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> und Herstellung von Stammkulturen	19
2.2.1.2	Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> und Herstellung von Stammkulturen	19
2.2.1.3	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	19
2.2.2	DNS und RNS Techniken	21
2.2.2.1	Plasmid-DNS Isolierung aus <i>Escherichia coli</i>	21
2.2.2.2	Restriktion von DNS	21
2.2.2.3	<i>Bst</i> NI-Verdau	21
2.2.2.4	Dephosphorylierung	22

2.2.2.5	Ligation	22
2.2.2.6	Ethanol-fällung von DNS	22
2.2.2.7	Agarosegel-Elektrophorese und Konzentrationsbestimmung von DNS und RNS	23
2.2.2.8	Isolierung von Gesamt-RNS aus Hybridomazellen	23
2.2.2.9	Isolierung von Gesamt-RNS und mRNA aus Milzzellen	24
2.2.2.10	cDNA-Synthese	24
2.2.2.11	Ligation eines Adapter-Oligonukleotids an Einzelstrang-cDNA	24
2.2.2.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.2.2.13	DNS Sequenzierung und Analyse	29
2.2.3	Kultivierung der Pathogene und Herstellung von Antigenen	29
2.2.3.1	Kultivierung der Pathogene	29
2.2.3.2	Antigenpräparation	29
2.2.3.3	Isolierung von Sporen	30
2.2.4	Proteinchemische und immunologische Methoden	30
2.2.4.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>Escherichia coli</i>	30
2.2.4.2	Isolierung und Reinigung periplasmatisch exprimierter Proteine	31
2.2.4.3	Reinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomenüberstand	32
2.2.4.4	Dialyse proteinhaltiger Lösungen	33
2.2.4.5	SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Konzentrationsbestimmung von Proteinen	33
2.2.4.6	Coomassie Brilliant Blue Färbung von SDS-PAGE-Gelen	34
2.2.4.7	Immunoblotanalyse	34
2.2.4.8	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	35
2.2.4.9	Immunofluoreszenzmikroskopie	38
2.2.4.10	Konzentrationsbestimmung mittels Oberflächen Plasmon Resonanz (SPR)	38
2.2.4.11	Immunisierung	39
2.2.4.12	Isolierung polyklonaler Antikörper aus Hühnereigelb	40
2.2.4.13	Herstellung monoklonaler Antikörper	40
2.2.5	Phagendisplay	41
2.2.5.1	Herstellung von scFv-Bibliotheken	41
2.2.5.2	Herstellung und Titration der Phagenbibliothek	41
2.2.5.3	Panning	42
2.2.5.4	Expression und Evaluierung angereicherter scFv Fragmente	43

2.2.6	Herstellung und Charakterisierung transgener Pflanzen.....	43
2.2.6.1	Kultivierung von <i>Nicotiana tabacum</i>	43
2.2.6.2	Kultivierung von <i>Solanum tuberosum</i>	43
2.2.6.3	Transiente Expression in Tabakblättern.....	43
2.2.6.4	Stabile Transformation von Kartoffelpflanzen	44
2.2.6.5	Proteinextraktion aus Tabakblättern.....	45
2.2.6.6	Inhibitionsversuche	46
2.2.6.7	Resistenzversuche	46
3	ERGEBNISSE.....	47
3.1	Herstellung von <i>Phytophthora infestans</i> Antigenen	47
3.2	Immunisierung von Mäusen und Hühnern.....	50
3.3	Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper sowie Klonierung korrespondierender scFvs.....	52
3.3.1	Herstellung monoklonaler Antikörper	52
3.3.2	Charakterisierung monoklonaler Antikörper	53
3.3.2.1	Isotypisierung.....	54
3.3.2.2	Immunoblotanalyse	55
3.3.2.3	Reaktivität der monoklonalen Antikörper gegenüber <i>Phytophthora</i> <i>infestans</i>	56
3.3.2.4	Kreuzreaktivitätstest.....	57
3.3.2.5	Immunofluoreszenzmikroskopie.....	59
3.3.2.6	Stabilität des monoklonalen Antikörpers mAkPi102.2.....	61
3.3.2.7	Inhibitionsversuche	62
3.3.3	Klonierung der korrespondierenden scFvs.....	64
3.4	Herstellung von scFv-Bibliotheken.....	66
3.4.1	RNS-Isolierung und cDNS-Synthese	66
3.4.2	Klonierung der scFv-Bibliotheken	68
3.5	Selektion <i>Phytophthora infestans</i> -spezifischer scFvs mittels Phagendisplay.....	70
3.5.1	Phagendisplay.....	70
3.5.2	Selektion <i>Phytophthora infestans</i> -spezifischer avianer scFvs	72
3.5.3	Selektion <i>Phytophthora infestans</i> -spezifischer muriner scFvs	74
3.6	Charakterisierung der scFvs	77
3.6.1	Sequenzen und Klassifizierung der scFvs	77

3.6.2	Immunoblotanalyse	79
3.6.3	Reaktivität der scFvs gegenüber <i>Phytophthora infestans</i>	80
3.6.4	Kreuzreaktivitätstest	82
3.6.5	Immunofluoreszenzmikroskopie	84
3.7	Generierung und Charakterisierung von scFv Fusionsproteinen	86
3.7.1	Klonierung von AFP-scFv Fusionsproteinen	87
3.7.2	Bakterielle Expression und Charakterisierung	89
3.7.3	Transiente Expression in <i>Nicotiana tabacum</i> und Charakterisierung	92
3.7.4	Inhibitionsversuche	93
3.8	Herstellung und Charakterisierung transgener Kartoffelpflanzen	97
4	DISKUSSION UND AUSBLICK	100
4.1	Antigene und Immunisierung	100
4.2	<i>Phytophthora infestans</i> -spezifische monoklonale Antikörper und korrespondierende scFvs	101
4.3	<i>Phytophthora infestans</i> -spezifische scFvs	105
4.4	AFP-scFv Fusionsproteine	111
4.5	Transgene Kartoffelpflanzen	113
4.6	Ausblick	114
5	ZUSAMMENFASSUNG	119
6	LITERATURVERZEICHNIS	121
7	ANHANG	134
7.1	Abkürzungsverzeichnis	134
7.2	Oligonukleotide	137
7.3	Vektorkarten	142
7.4	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	144

1 EINLEITUNG

1.1 *Phytophthora infestans*

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary (*P. infestans*), der Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel sowie der Kraut- und Braunfäule an Tomate gehört zu den bedeutendsten Krankheitserregern landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Die Erstbeschreibung des Pathogens erfolgte 1845 durch Marie Anne Libert. Die bis heute gültige Namensgebung, die Veröffentlichung des Entwicklungszykluses sowie die Beschreibung von *P. infestans* als Ursache der Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel wurden von De Bary um 1860 vorgenommen (Schöber-Butin 2001).

Der Ursprung des Erregers ist Mexiko (Grunwald und Flier 2005). *P. infestans* führte um 1845 zur Vernichtung großer Teile der Kartoffelbestände in Irland. Dadurch verhungerten etwa 1 Millionen Menschen und weitere 1,5 Millionen wanderten aus. In den 1990ern kam es durch aggressive und fungizidresistente *P. infestans* Stämme in Nordamerika und Europa zu großen Verlusten in der Kartoffelproduktion und zur Befürchtung einer Hungersnot in Osteuropa (Fry und Godwin 1997, Garelik 2002, Schiermeier 2001, Shattock 2002, Smart und Fry 2001). Bis heute sind die jedes Jahr durch *P. infestans* verursachten Schäden immens. Die weltweiten jährlichen Verluste in der Kartoffelproduktion werden auf 3 Milliarden US\$ geschätzt (Duncan 1999).

Die Klasse der Oomyceten, denen auch *P. infestans* angehört, wurde aufgrund morphologischer Merkmale ursprünglich zu den Pilzen gezählt. Jedoch erfolgte vor wenigen Jahren die Zuordnung der Oomyceten zu den Stramenopiles (Paquin *et al.* 1997, Sogin und Silberman 1998). Die Zellwand der Oomyceten besteht überwiegend aus beta-1,3- und beta-1,6-Glukanen sowie Zellulose und enthält nur sehr wenig Chitin (Bulone *et al.* 1992, Grenville-Briggs *et al.* 2008).

P. infestans überdauert in Knollen im Lager oder im Feld. Ausgehend von der infizierten Knolle durchwachsen Hyphen des Erregers die jungen Kartoffelpflanzenprosse sowie die Blätter und bilden Haustorien. Aus den Stomata oder direkt durch die Epidermis wachsen Sporangioophoren, welche als Traghyphen der Sporangien dienen. Die Sporangien werden durch Wind über weite Strecken oder durch Regen verbreitet und gelangen so auf gesunde Blätter oder werden in den Boden eingespült. Sporangien können nach Bildung eines Keimschlauches Knollen über Verletzungen infizieren. Dagegen sind nur die begeißelten Zoosporen, die aus den Sporangien bei Temperaturen unter 15 °C entlassen werden, in der

Lage nach Bildung eines Appressoriums am Ende des Keimschlauches entweder über die Stomata oder direkt durch die Epidermis mit der Infektionshyphse in das Blattgewebe einzudringen. Damit beginnt der vegetative Zyklus erneut. Zur sexuellen Reproduktion des heterothallischen Pathogens kommt es, wenn Hyphen beider Paarungstypen (A1 und A2) aufeinander treffen und Gametangien (Oogonium und Antheridium) bilden. Aus der Verschmelzung der beiden haploiden Kerne der Gametangien entsteht die besonders widerstandsfähige, dickwandige Oospore (Paquin *et al.* 1997). Oosporen werden für ein besonders frühes Auftreten der Krankheit in der Vegetationsperiode verantwortlich gemacht (Andersson *et al.* 1998, Widmark *et al.* 2007).

Die Ausbreitung des Erregers im Blattgewebe führt zur Verringerung der Assimilationsfläche, was sich negativ auf den Kartoffelertrag auswirkt. Infizierte Knollen können bereits im Feld faulen und führen während der Ernte zur Übertragung des Pathogens auf gesunde Knollen. Die Lagerverluste durch *P. infestans* und Sekundärinfektionen (vor allem *Erwinia carotovora*) können bis zu 100 % betragen. Latent infizierte Knollen führen bei Auspflanzung zur Bildung von Infektionsherden und zur Ausbreitung des Erregers im jungen Kartoffelbestand (Bartels und Backhaus 2000).

Derzeit gängige Bekämpfungsstrategien beinhalten die Verwendung zertifizierten Saatgutes, Hygienemaßnahmen zur Vermeidung von Infektionsherden, weite Fruchtfolge, den Anbau widerstandsfähiger Sorten sowie den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln verschiedener Wirkstoffklassen und deren zielgerichtete Applikation auf Grundlage von Prognosemodellen und Warnmeldungen. Im zehnjährigen Durchschnitt (1996 bis 2006) wurden in Deutschland sieben Fungizidapplikationen pro Saison durchgeführt. Dabei schwankte die Anzahl der Anwendungen vor allem aufgrund des sich aus den unterschiedlichen Witterungsbedingungen ergebenden Infektionsdruckes zwischen eins und 16. In Belgien, Frankreich und den Niederlanden lag der Pflanzenschutzmittelaufwand in diesem Zeitraum mit maximal 20 bzw. 23 (Frankreich) Applikationen pro Jahr noch höher (Grønbech-Hansen *et al.* 2007, Schepers 2001 und 2004, Schepers und Spitz 2005). Die monetären Aufwendungen für Pflanzenschutzmittel betragen alleine in den Niederlanden jährlich 100 Millionen € (Anonym 2008). In Deutschland wird die Summe der Pflanzenschutzmittelkosten und der Schäden als Folge von Ertrags- und Lagerverlusten auf etwa 470 € pro Hektar geschätzt (Darsow 2002). In den USA liegen diese mit 507 \$ pro Hektar in der gleichen Größenordnung (Guenthner *et al.* 2001).

1.2 Antikörper

Antikörper gehören zur Familie der Immunoglobuline (Ig) und nehmen eine zentrale Rolle im Immunsystem von Wirbeltieren ein. Die Y-förmigen Glykoproteine bestehen aus vier Polypeptidketten, jeweils zwei identischen schweren und leichten Ketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Schwere Antikörperketten bestehen aus mindestens drei konstanten und einer variablen Domäne. Leichte Antikörperketten setzen sich aus einer konstanten und einer variablen Region zusammen. Anhand des konstanten Bereichs der schweren Kette werden Antikörper in verschiedene Isotypen unterteilt (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM), wobei die IgA und IgG ihrerseits wiederum in Subtypen gegliedert werden (IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_{2c}, IgG₃). Bei der leichten Kette werden kappa und lambda Ketten unterschieden. Die variablen Domänen gliedern sich in drei hypervariable Regionen (CDR = complementary determining region) und vier konservierte Gerüstregionen (FR = framework region).

Lösliche Immunoglobuline werden von spezialisierten B-Lymphozyten, den Plasmazellen, sekretiert. Dabei kann jede Plasmazelle nur Antikörper einer Spezifität generieren, wobei Antikörper derselben Spezifität verschiedene Isotypen aufweisen können. Antikörper binden zum einen spezifisch an Antigene des die Immunantwort hervorrufenden Fremdkörpers. Zum anderen bewirkt die Bildung des Antikörper-Antigen-Komplexes die Aktivierung von Abwehrmechanismen. Dabei ist der konstante Bereich maßgeblich für die Serumstabilität, Struktur und Effektorfunktion des Antikörpers verantwortlich. Wohingegen die CDRs der variablen Antikörperdomänen die Antigenspezifität bestimmen.

1.2.1 Herstellung von Antikörpern und Antikörperderivaten

Die von Köhler und Milstein (1975) entwickelte Hybridomatechnologie macht die Herstellung hochspezifischer monoklonaler Antikörper gegen nahezu jedes Antigen möglich. Nach Hyperimmunisierung einer Maus mit dem ausgewählten Antigen werden die aktivierten B-Lymphozyten der Milz des immunisierten Tieres mit Maus-Myelomzellen fusioniert. Die Fusionszellen (Hybridomazellen) werden in geeignetem Medium kultiviert und zeichnen sich durch permanentes Wachstum sowie die Produktion muriner Antikörper aus. Durch Vereinzelung („limiting dilution“ Klonierung) der Hybridomazellkulturen, die antigenspezifische Antikörper produzieren, erhält man monoklonale Antikörper produzierende Hybridomazelllinien. Rekombinante DNS- und RNS-Techniken ermöglichen die Isolierung der RNS von Hybridomazellen mit anschließender cDNS-Synthese sowie

Amplifizierung und Klonierung der den Antikörper kodierenden Nukleotidsequenz (Krebber *et al.* 1997, Ruberti *et al.* 1994).

Alternativ zur zeit- und kostenintensiven Hybridomatechnologie ermöglicht die Methode des Phagendisplays die Selektion hochspezifischer rekombinanter Antikörperfragmente sowie die Identifizierung des Epitops eines Antikörpers *in vitro*. Das Phagendisplay basiert auf der 1985 von Smith veröffentlichten Methode, Peptide als Fusion mit dem GenIII Hüllprotein filamentöser Phagen auf der Phagenoberfläche zu präsentieren. Seitdem erfolgte die Präsentation von Proteinen und Peptiden auch in Fusion mit anderen Hüllproteinen filamentöser Bakteriophagen: GenVI (Hufton *et al.* 1999), GenVIII (Corey *et al.* 1993, Felici *et al.* 1993, Iannolo *et al.* 1997), GenVII und GenIX (Gao *et al.* 1999, Gao *et al.* 2002a und b).

Das heute gängige Prinzip des Phagendisplays zur Selektion spezifischer Antikörperfragmente beinhaltet die N-terminale Fusion eines scFv- oder Fab-Fragments mit dem GenIII-Hüllprotein filamentöser Phagen (M13, fd, f1) in einem Phagemidvektor. Dieser Vektor wird in *Escherichia coli* eingeschleust. Die Anzahl an Bakterienklonen mit unterschiedlichen rekombinanten Antikörpern gibt die Komplexität der Antikörper-Genbibliothek an. Durch Infektion von *E. coli* mit Helferphagen (z. B. M13KO7) erfolgt die Vermehrung und Assemblierung von Phagen im Bakterium und deren nicht lytische Sezernierung in den Kulturüberstand. Die vollständig assemblierten Phagen präsentieren das Fusionsprotein auf ihrer Oberfläche und beinhalten gleichzeitig die genetische Information des exponierten Antikörperfragments. Während der Selektion mit dieser Phagenbibliothek binden die spezifische Antikörper präsentierenden Phagen an das immobilisierte Antigen (Immobilisierung an ELISA Platte, Immunotube oder magnetischen Partikeln) und nicht bindende werden durch Waschen entfernt. Anschließend werden die gebundenen Phagen eluiert und zur Infektion von *E. coli* eingesetzt. Durch mehrere Selektionsrunden können spezifisch bindende Antikörper angereichert werden (Hoogenboom *et al.* 1991, Hoogenboom 2005, Winter *et al.* 1994). Die Ermittlung eines linearen Antikörperepitops kann mittels Peptiddisplay oder unter Verwendung von Genfragment-Phagenbibliotheken erfolgen (Fack *et al.* 1997, Mayrose *et al.* 2007, Sompuram *et al.* 2002, Holzem *et al.* 2001, Cwirla *et al.* 1990).

Die zum Phagendisplay verwendeten Antikörper-Genbibliotheken werden von naïven (De Haard *et al.* 1999, Gao *et al.* 1999, Griffiths *et al.* 1993, Marks *et al.* 1991, Schofield *et al.* 2007, Vaughan *et al.* 1996), synthetischen (Lee *et al.* 2004, Sidhu *et al.* 2004), semisynthetischen (Barbas *et al.* 1993, van Wyngaardt *et al.* 2004) oder immunisierten (Mao *et al.* 1999, Yamanaka *et al.* 1996) Quellen hergestellt. Der Einsatz nicht immunadaptierter

Bibliotheken erlaubt auch die Selektion von Antikörpern gegen toxische, humanpathogene und nicht immunogene Proteine, Peptide oder Haptene (Barbas *et al.* 1993, Vaughan *et al.* 1996, Strachan *et al.* 2002) und hat den Vorteil, dass nicht für jedes Antigen eine neue Bibliothek kloniert werden muss. Dies setzt jedoch eine hohe Komplexität und Qualität der Bibliothek voraus.

1.2.2 Akkumulation von Antikörpern und Antikörperfragmenten in Pflanzen

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit *P. infestans*-spezifische scFv und scFv Fusionskonstrukte zur Expression in transgenen Kartoffelpflanzen generiert werden sollten, werden im Folgenden Pflanzen als Expressionssystem für Immunoglobuline und deren Derivate dargestellt. Die Expression von Antikörpern in Pflanzen kann verschiedene Beweggründe haben. Zum einen eignen sich Pflanzen als Produktionssystem zur Herstellung großer Antikörpermengen für therapeutische oder diagnostische Zwecke („molecular farming“) (Fischer *et al.* 1999 und 2000, Peeters *et al.* 2001, Schillberg *et al.* 2003 und 2005, Stöger *et al.* 2005). Zum anderen kann durch die Akkumulation von Antikörpern gezielt in Stoffwechselprozesse der Pflanze eingegriffen werden („metabolic engineering“) (De Jaeger *et al.* 2000, Nölke *et al.* 2006) oder zu Resistenz gegenüber Herbiziden führen (Horsman *et al.* 2007, Weiss *et al.* 2006). Ein weiterer Aspekt ist die Herstellung pathogenresistenter Pflanzen, was die Akkumulation spezifischer Antikörper in bestimmten Kompartimenten der Pflanzenzelle erfordert (Nölke *et al.* 2004, Schillberg *et al.* 2001).

Hiatt *et al.* (1989) und Düring *et al.* (1990) konnten als erste die Expression eines funktionalen Volllängenantikörpers in Tabak zeigen. Es folgte die Expression verschiedener Antikörperisotypen, unter anderem IgA (Ma *et al.* 1995, Larrick *et al.* 2001) sowie Fab-Fragmenten (De Neve *et al.* 1993), scFv (u.a. Firek *et al.* 1993, Schouten *et al.* 1996, Villani *et al.* 2005), bispezifischer scFv (Fischer *et al.* 1999) und scFv Fusionsproteinen (Spiegel *et al.* 1999). Zur Akkumulation der rekombinanten Proteine wird zumeist Tabak, aber auch andere Pflanzenarten, wie Alfalfa, *Arabidopsis*, Erbse, Reis, Soja, Tomate und Weizen werden verwendet. Die Entscheidung über den zur Akkumulation zu wählenden Zielort hängt vor allem von der Verwendung des zu exprimierenden Proteins ab. Neben dem Aspekt der Funktionalität ist es im Bereich des „molecular farming“ entscheidend, hohe Ausbeuten zu erreichen (Stöger *et al.* 2002). Dem entgegen steht der gezielte Einsatz des Antikörpers zur Beeinflussung von Stoffwechselprozessen der Pflanze sowie zur Pathogenabwehr. Hier erfolgt die Expression in dem Kompartiment, wo der zu modulierende

Prozess abläuft bzw. das Pathogen angreifbar ist. Die gezielte Expression des rekombinanten Proteins in bestimmten Kompartimenten der Pflanzenzelle wird durch die Verwendung unterschiedlicher Signalpeptide gesteuert. Zur cytosolischen Expression eignen sich scFv (Nölke *et al.* 2005, Schillberg *et al.* 1999), da diese einzelkettigen Moleküle im Vergleich zum Volllängenantikörper nicht auf die Ausbildung von Disulfidbrücken angewiesen sind. Vergleichende Studien belegen, dass durch die Verwendung eines C-terminalen KDEL Motivs zur Retention des rekombinanten Proteins im endoplasmatischen Retikulum (ER) im Gegensatz zur cytosolischen Expression bis zu 100-fach höhere Akkumulationslevel von scFv erreicht werden konnten (Schouten *et al.* 1996, Wandelt *et al.* 1992).

1.3 Pathogenresistente Pflanzen

Das Bestreben klassischer Züchtungsverfahren ist seit jeher neben einer Vielzahl anderer Aspekte wie zum Beispiel die Steigerung der Ertragsfähigkeit auch, die Anfälligkeit von Kultur- und Zierpflanzen gegenüber Schaderregern zu mindern. Die Möglichkeiten sind durch gentechnologische Verfahren deutlich erweitert worden. Das Methodenspektrum zur Herstellung pathogenresistenter und -widerstandsfähiger transgener Pflanzen ist vielfältig. Die Ansätze haben die Steigerung pflanzeigener Abwehrmechanismen, das Erkennen des Pathogens und Einleiten einer Hypersensitivitätsreaktion durch Einbringen von Resistenzgenen, die Neutralisation pathogener Toxine, Proteine oder Metaboliten sowie die Inhibierung bzw. Tötung des Pathogens zum Ziel. In den letzten Jahren konnten transgene Pflanzen geschaffen werden, die Resistenzen gegenüber Viren (Sudarshana *et al.* 2007), Phytoplasmen (Le Gall *et al.* 1998, Malembic-Mahler *et al.* 2005), Bakterien (Zhang *et al.* 1999), Nematoden (Fuller *et al.* 2008), Pilzen (Dixon *et al.* 1996, Li *et al.* 2008) und Insekten (Christou *et al.* 2006) aufwiesen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten AFP-scFv Fusionsproteine zur Inhibierung des Oomyceten *P. infestans* hergestellt werden. Aus diesem Grund wird im Folgenden auf die Nutzung von Antikörpern zur Herstellung pathogenresistenter Pflanzen eingegangen sowie einige Daten zur Generierung *P. infestans*-resistenter Kartoffelpflanzen aufgezeigt.

1.3.1 Antikörper-vermittelte Resistenz

Resistenz, die durch Akkumulation von Antikörpern in Pflanzen bewirkt wird, basiert auf der Erkennung und Bindung des Antikörpers an das entsprechende Epitop des Pathogens. Die

Bildung des Antikörper-Antigen-Komplexes führt zur Inhibierung oder Neutralisation des Erregers. Diese Strategie führte vor allem bei Viren zum Erfolg. Tavladoraki *et al.* konnten 1993 zeigen, dass die cytosolische Akkumulation eines AMCV-spezifischen scFv („artichoke mottled crinkle virus“) das Virus inhibierte. Seit dem konnten Viren durch die Akkumulation membranverankerter scFv, die in den Apoplasten weisen, sowie cytosolisch und apoplasmatisch exprimierter scFv und Volllängenantikörper inhibiert werden bzw. zu vollständiger Resistenz der Pflanze führen. Der überwiegende Anteil der virusspezifischen Antikörper ist gegen Hüllproteine gerichtet (Fecker *et al.* 1997, Nölke *et al.* 2008, Schillberg *et al.* 2000, Villani *et al.* 2005, Voss *et al.* 1995, Zimmermann *et al.* 1998). Prins *et al.* (2005) zeigten, dass transgene *Nicotiana benthamiana* Pflanzen, die einen für das Nukleoprotein von TSWV („tomato spotted wilt virus“) spezifischen scFv exprimierten, Resistenz gegenüber dem Virus aufwiesen. Es wird angenommen, dass Strukturprotein-spezifische Antikörper die Replikation des Virus unterbinden in dem diese das „disassembly“ der Viruspartikel verhindern. Einige der generierten virusspezifischen Antikörper binden an Nicht-Strukturproteine von Viren. So konnten durch cytosolische Expression eines scFv, der spezifisch für eine virale RNS-abhängige RNS Polymerase war, transgene *N. benthamiana* Pflanzen hergestellt werden, die resistent gegenüber dem „tomato bushy stunt virus“ waren (Boonrod *et al.* 2004). Zhang *et al.* (2008) stellten fest, dass die Expression eines avianen scFv, der spezifisch für das „movement protein“ NS_M des TSWV ist, die Entwicklung von Symptomen verlangsamte.

Im Gegensatz zur durch Antikörper vermittelten Virusresistenz gibt es für Phytoplasmen und Pilze nur sehr wenige Beispiele. Le Gall *et al.* (1998) erreichten durch die Expression eines für ein Membranprotein von Stolbur Phytoplasma spezifischen scFv in Tabak vollständige Resistenz gegen das Pathogen. Bei weiteren Untersuchungen wurden transgene Tabakpflanzen, die den gleichen scFv im Apoplasten mit einem durchschnittlichen Akkumulationslevel von 0,04 % des gesamtlöslichen Proteins exprimierten, auf infizierte Wurzelstöcke gepfropft. Jedoch konnte lediglich eine verspätete Symptomentwicklung und eine verringerte Vermehrungsrate des Pathogens *Spiroplasma citri* festgestellt werden (Malembic-Mahler *et al.* 2005). Transgene Pflanzen, die alleine durch Akkumulation eines pilzspezifischen Antikörpers Resistenz gegenüber dem Pathogen aufweisen, sind nicht beschrieben. Hingegen zeigten transgene *Arabidopsis thaliana*, die ein Fusionsprotein bestehend aus einem *Fusarium*-spezifischen avianen scFv (AJ517190) und einem AFP im Apoplasten exprimierten, nach Inokulation mit *Fusarium oxysporum* eine hohe Resistenz. (Peschen *et al.* 2004). Li *et al.* (2008) berichten, dass transgene Weizenpflanzen, die ein

Fusionsprotein bestehend aus dem oben genannten avianen *Fusarium*-spezifischen scFv (AJ517190) und einem AFP von *Aspergillus giganteus* (Wnendt *et al.* 1990) exprimierten, erhöhte Resistenz gegenüber *Fusarium asiaticum* aufwiesen. Hier wird der Mechanismus der Bildung des Antikörper-Antigen-Komplexes durch die Inhibierung des Pilzes durch das antifungal wirkende Peptid (AFP) komplettiert. Es konnte gezeigt werden, dass die AFP-scFv Fusion wirksamer ist, als das AFP alleine bzw. in Fusion mit einem unspezifischen scFv.

1.3.2 Status quo *Phytophthora infestans*

Die Notwendigkeit zur Züchtung *P. infestans* widerstandsfähiger und resistenter Kartoffelsorten ergibt sich aus den zu Anfang dargestellten durch *P. infestans* entstehenden Schäden und stellt aufgrund der Diversität und Anpassungsfähigkeit des Erregers eine große Herausforderung dar. Mit der Entdeckung der ersten Resistenzgene (R-Gene) bei *Solanum demissum* in der ersten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts und nachfolgend bei anderen Wildarten rückte die Züchtung resistenter Kartoffelsorten unter Verwendung dieser Gene in den Fokus (Schick *et al.* 1954). Die R-Gene der potentiellen Wirtspflanze kodieren Proteine, die pathogenspezifische Effektormoleküle, die ihrerseits von Avirulenzgenen (avr-Gene) des Pathogens kodiert werden, erkennen. Bei Erkennen des Effektormoleküls durch das entsprechende Produkt des R-Gens wird eine Abwehrreaktion initiiert, die zu einer Hypersensitivitätsreaktion und damit zu Resistenz der Pflanze führt (Dodds *et al.* 2006, Laugé und De Witt 1998). Dies ist entsprechend der von Flor 1955 veröffentlichten Gen-für-Gen-Hypothese. Bis heute werden neue R-Gene kloniert und in Kartoffelpflanzen eingebracht. Jedoch konnte *P. infestans* die auf R-Genen basierende vertikale Resistenz zumeist schnell überwinden, so dass die ehemals resistenten Sorten anfällig wurden. Zuletzt wurden *P. infestans* Stämme gefunden, die Resistenzen gegenüber dem R_{pi-blb1} von *Solanum bulbocastanum* aufweisen, was wiederum die Hoffnung auf R-Gen-vermittelte dauerhafte Resistenz schmälerte (Fry 2008).

Die in der Literatur beschriebenen gentechnischen Ansätze zur Generierung *P. infestans* resistenter Sorten sind neben dem Einbringen von R-Genen (van der Vossen *et al.* 2003 und 2005, Song *et al.* 2003), die Detoxifizierung pathogener Metabolite (Schneider *et al.* 2002), die Expression antifungaler Peptide und Proteine (Strittmatter *et al.* 1995, Osusky *et al.* 2004 und 2005, Zakharchenko *et al.* 2007), von PR-Proteinen („pathogenesis related proteins“) (Liu *et al.* 1994, Zhu *et al.* 1996, Constabel *et al.* 1993, Li *et al.* 1999) und hydrolytischen

Enzymen (Borkowska *et al.* 1998) sowie die Regulation pflanzlicher Abwehrmechanismen durch Expression von Oxidasen (Wu *et al.* 1995) und Katalasen (Yu *et al.* 1999, Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht transgener Kartoffelpflanzen zur Inhibierung von *P. infestans*

Gen / Genprodukt	Effekt auf <i>P. infestans</i>	Referenz
Sojabohnen beta-1,3-Endoglukanase	Erhöhte Resistenz	Borkowska <i>et al.</i> 1998
verringerte Aktivität des plastidären ATP/ADP-Transporters (AATP1 anti-sense)	Verzögerte Entwicklung von Symptomen	Conrath <i>et al.</i> 2003
Kartoffel PR-Gen STH-2	Kein Effekt	Constabel <i>et al.</i> 1993
Tabak Osmotin Mutanten (delta C18 Osmotin und Osmotin-P)	Verringerte Wachstumsrate der Läsionen; Inhibierung des Pathogens im interzellularen Raum	Li <i>et al.</i> 1999
Tabak Osmotin	Spätere Ausbildung von Symptomen	Liu <i>et al.</i> 1994
Antimikrobielles Peptid MsrA3, ein Temporin A Derivat	Hohe Resistenz; Nekrosen an Inokulationsstelle; Knollen bleiben im Lager mehr als zwei Jahre befallsfrei	Osusky <i>et al.</i> 2004
Antimikrobielles Peptid MsrA2, ein Derivat von Dermaseptin B1 aus <i>Phyllomedusa bicolor</i>	Nekrosen, keine Sporulation	Osusky <i>et al.</i> 2005
Weizen Oxalatoxidase	Reduzierte Anzahl an Läsionen, geringere Sporulation	Schneider <i>et al.</i> 2002
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Barnase (RNase)	Geringere Sporulation	Strittmatter <i>et al.</i> 1995
RB Gen (R _{pi-blb1}) von <i>S. bulbocastanum</i>	Geringere Größe der Läsionen, Knollen nicht resistent (Fry 2008)	Van der Vossen <i>et al.</i> 2003, Song <i>et al.</i> 2003
R _{pi-blb2} von <i>S. bulbocastanum</i>	Nekrosen an Inokulationsstelle	Van der Vossen <i>et al.</i> 2005
<i>Aspergillus niger</i> Glukseoxidase	Spätere Bildung von Läsionen	Wu <i>et al.</i> 1995
Tabak Klasse II Katalase	Geringere Größe der Läsionen	Yu <i>et al.</i> 1999
Osmotin ähnliches Protein pA13 von <i>Solanum commersonii</i>	Erhöhte Widerstandsfähigkeit; abhängig von der Inokulumdichte	Zhu <i>et al.</i> 1996
Antimikrobielles Peptid Cecropin P1	Erhöhte Resistenz	Zakharchenko <i>et al.</i> 2007

Die überwiegende Anzahl der transgenen Kartoffelpflanzen zeigten nach Inokulation mit *P. infestans* eine spätere Ausbildung von Symptomen, eine geringere Größe der Läsionen und / oder ein verzögertes Einsetzen der Sporulation mit geringerer Sporulationsrate.

Akkumulationslevel des antifungaler Peptids MsrA2 von 1 bis 5 µg/g frischer Blätter führten an der Inokulationsstelle lediglich zur Bildung von Nekrosen (Osusky *et al.* 2005). Auch Blätter transgener Kartoffelpflanzen, die das antifungale Peptid MsrA3 exprimierten, wiesen zehn Tage nach der Inokulation mit *P. infestans* im Gegensatz zum vollständig befallenen Wildtyp nur an den Inokulationsstellen kleine Nekrosen auf (Osusky *et al.* 2004, Tabelle 1).

Die Expression von Antikörpern oder Antikörperfragmenten in Kartoffelpflanzen zur Erhöhung der Resistenz gegenüber *P. infestans* ist nicht beschrieben.

Hochrechnungen ergaben, dass durch den Anbau leistungsfähiger, *P. infestans* resistenter Kartoffelsorten auf 100 % der Anbaufläche die weltweit eingesetzte Fungizidmenge um 41.000 t reduziert werden könnte. Allein für Europa würde sich eine Wirkstoffmengenreduzierung von 25.600 t ergeben (Gehring *et al.* 2004). Gianessi *et al.* (2003) geben für die EU eine mögliche Reduzierung der eingesetzten Fungizidmenge um etwa 7.500 t an. Des Weiteren wird eine Produktionssteigerung im Kartoffelanbau um 858.000 t angenommen. Dies würde vor allem vor dem Hintergrund des stetigen Flächenverbrauchs unter anderem durch Bebauung und Ausgleichsmaßnahmen sowie zunehmender Konkurrenz zwischen Nahrungsmittel- und Biomasseproduktion zu einer Verbesserung der Situation durch Steigerung der Flächenproduktivität führen.

1.4 Zielsetzung

Vor dem Hintergrund der durch *P. infestans* weltweit verursachten Schäden sollte ein molekularbiologischer Ansatz zur Herstellung *P. infestans*-resistenter Kartoffelpflanzen erprobt werden. Dazu sollten pathogenspezifische rekombinante Antikörper generiert und mit antifungalen Peptiden fusioniert in transgenen Kartoffelpflanzen exprimiert werden. Die zur Zielerreichung im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente bauen wie folgt aufeinander auf (Abbildung 1): Zunächst sollten Zellwandfragmente von *P. infestans* isoliert werden. Diese wurden zur Immunisierung von Hühnern und Mäusen verwendet. Die Milzzellen der Mäuse dienten der Herstellung *P. infestans*-spezifischer monoklonaler Antikörper. Diese sollten hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber *P. infestans* sowie Kreuzreaktivität gegenüber anderen Pathogenen charakterisiert werden. Einige ausgewählte monoklonale Antikörper sollten zur Klonierung von scFv Fragmenten herangezogen werden. *P. infestans*-spezifische scFv sollten auch mittels Phagendisplays mit avianen und murinen scFv-Bibliotheken selektiert werden. Dazu wurde die aus Milzzellen der immunisierten Tiere isolierte RNS in cDNS transkribiert und zur Klonierung der scFv-Bibliotheken verwendet.

Die scFv sollten analog zu den monoklonalen Antikörpern charakterisiert werden, um eine Auswahl für die Fusion mit den AFPs zu treffen. Die Funktionalität der AFP-scFv Fusionsproteine sollte im ELISA bestätigt werden, um anschließend eine stabile Transformation von Kartoffelpflanzen durchführen zu können. Abschließend sollten die generierten transgenen Kartoffelpflanzen auf Resistenz gegenüber *P. infestans* getestet werden.

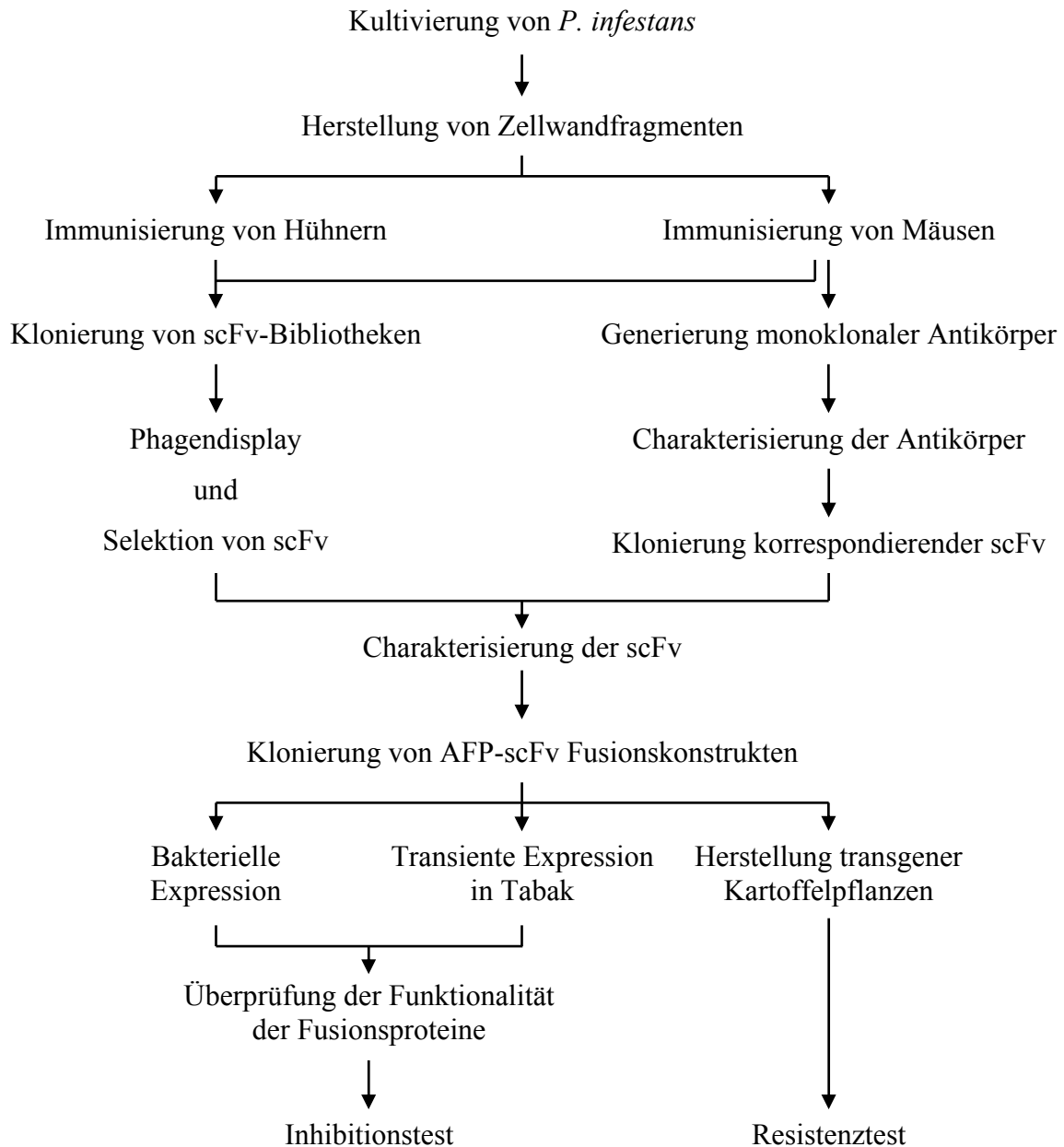


Abbildung 1: Übersicht des Versuchsablaufes zur Herstellung *P. infestans*-resistenter Kartoffelpflanzen

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Reaktionskits

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Bio-Rad (München), Brand (Wertheim), Braun (Melsungen), Corning (Kaiserslautern), Eppendorf (Hamburg), Fermentas (St. Leon-Rot), Fluka (Neu-Ulm), GE Healthcare (Freiburg), Gerbu (Gaiberg), Greiner bio-one (Frickenhäusen), Invitrogen (Karlsruhe), Labomedic (Bonn), Macherey-Nagel (Düren), Marienfeld (Lauda-Königshofen), Merck (Darmstadt), Mibius (Düsseldorf), Millipore (Schwalbach), MWG (Ebersberg), New England Biolabs (Frankfurt), Novagen (Darmstadt), Nunc (Biberich), Pall Life Science (Dreieich), Pierce (Bonn), Promega (Mannheim), Qiagen (Düsseldorf), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht), Schleicher & Schuell (Dassel), Schott (Mainz), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München), Spectrum Laboratories (Breda, Niederlande), Stratagene (Amsterdam, Niederlande), VWR (Darmstadt). Die verwendeten Reaktionskits sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Reaktionskits

Name	Hersteller
MinElute PCR Purification Kits	Qiagen
NucleoSpin [®] Extract II	Macherey & Nagel
NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey & Nagel
Oligotex Direct mRNA Mini Kit	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Qiagen
GeneJET [™] PCR Cloning Kit	Fermentas
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy Mini / Midi Kit	Qiagen
SuperSignal [®] West HisProbe [™] Kit	Pierce
SYBR [®] GreenER [™] qPCR SuperMix Universal	Invitrogen

2.1.2 Geräte, Apparaturen und Zubehör

- ABI *Prism* 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt)
- BIAcore T100 (BIAcore AB, Uppsala, Schweden)
- Bio Photometer (Eppendorf)
- CL-1000 Ultraviolett Crosslinker (UVP, Cambridge, UK)
- ELISA-Lesegerät Synergy HT (Bio-Tek, Bad Friedrichshall)
- ELISA Platten Waschgerät ELx405 (Bio-Tek)
- Magnetrührer IKA® RCT-Basic (IKA-Werke, Staufen)
- Membran-Vakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim)
- Mikroskope
 - Licht- und Fluoreszenzmikroskop DM R mit angeschlossenem Kamerasystem (Leica, Wetzlar)
 - Lichtmikroskop Diavert (Leitz, Wetzlar)
- Mini-Protean 3 Cell und Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad)
- Mini-Sub® Cell GT und Wide Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad)
- Multiporator (Eppendorf)
- NanoDrop® ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)
- PCR Workstation (Labcaire)
- Phytokammer OSRAM Powerstar, HQI 400W/DH (Osram, München)
- PowerPac Basic™ und PowerPac HC™ (Bio-Rad)
- Primus 96^{plus} und Primus (MWG-Biotech, Ebersberg)
- Reinstwasseranlage MembraPure (MembraPure GmbH, Bodenheim)
- Rotoren
 - JA-25.50, JA-10, JLA-8.1000 (Beckmann Coulter, Krefeld)
 - #75006445, #3057 (Heraeus, Hanau)
- Scanner CanoScan 8800F (Canon, Krefeld)
- Schüttler
 - Thermomixer comfort (Eppendorf)
 - Intelli-Mixer RM-2 (ELMI, Riga, Lettland)
 - VKS-75 Control (Bühler Hechingen)
- Sterilbank Biowizard KR 130 BW (Kojair Tech Oy, Vippula, Finnland)
- Trockenschränke (Heraeus)
- Ultraschallbad SONOREX RK100 (Bandelin electronic, Berlin)

- UV-Transluminator und Fotodokumentationssystem (Bio-Rad)
- Varioclav 135S (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)
- Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwede)
- Zentrifugen
 - Avanti J-26 XPI (Beckman Coulter)
 - Eppendorf Centrifuge 5415 D und 5415 R (Eppendorf)
 - Multifuge 3S und 3 S-R (Heraeus)

2.1.3 Puffer, Medien und Lösungen

Standardpuffer, -medien und -lösungen wurden nach Standardprotokollen unter Verwendung von deionisiertem Wasser hergestellt (Ausubel *et al.* 1994; Coligan *et al.* 1998; Sambrook und Russell 2001). Sofern notwendig wurden Medien und Lösungen autoklaviert (121 °C / 20 min). Bei hitzeinstabilen Komponenten, zum Beispiel Antibiotika, erfolgte die Sterilisation durch Filtration (0,2 µm) einer Stammlösung und deren Zugabe zu auf ca. 50 °C abgekühltem Medium.

2.1.4 Antikörper und Enzyme

Soweit nicht anders erwähnt, wurden Restriktionsenzyme von New England Biolabs (NEB) verwendet. Eine Übersicht der sonstigen verwendeten Enzyme gibt Tabelle 3. Die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 3: Übersicht verwendeter Enzyme

Enzym	Hersteller
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)	NEB
Enhanced Avian Reverse Transcriptase [eAMV TM RT]	Sigma-Aldrich
Expand High Fidelity PCR System, dNTPack	Roche
RNaseH	Invitrogen
RNS Ligase	NEB
SuperScript TM II Reverse Transcriptase	Invitrogen
T4 DNS Ligase	NEB
Taq DNS Polymerase	Fraunhofer IME (Aachen)

Tabelle 4: Übersicht verwendeter Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Abkürzung	Hersteller
Alexa Fluor® 568 Ziege anti-Maus IgM (μ Kette)	GAM ^{Alexa} IgM	Invitrogen
Kaninchen anti-his-Tag	RAhis	Rockland Immunochemicals, USA
Kaninchen anti-Huhn AP	RAC ^{AP}	Dianova, Hamburg
Kaninchen anti-Huhn HRP	RAC ^{HRP} Fc	Dianova
Kaninchen anti-Maus lambda leichte Kette AP	RAM ^{AP} λ	Rockland Immunochemicals
Kaninchen anti-Ratte AP	RAR ^{AP}	Sigma
Kaninchen anti-Ziege	RAG ^{AP} Fc	Jackson ImmunoResearch, USA
Maus anti-cmyc-Tag mAκ	α-cmyc mAκ	Fraunhofer IME
Maus IgM kappa l	IgM κ	Sigma
Maus anti-Mensch Fc	MAH Fc	Jackson ImmunoResearch
Maus IgM lambda leichte Kette, Isotypenkontrolle	IgM λ	BioLegend, USA
Ratte anti-Maus lambda leichte Kette mAκ	RAM λ	Sigma
Ziege anti-Kaninchen Fc AP	GAR ^{AP} Fc	Rockland Immunochemicals
Ziege anti-Kaninchen Fc HRP	GAR ^{HRP} Fc	Jackson ImmunoResearch
Ziege anti-Maus Fc AP	GAM ^{AP} Fc	Dianova
Ziege anti-Maus Fc HRP	GAM ^{HRP} Fc	Dianova
Ziege anti-Maus H+L AP	GAM ^{AP} H+L	Dianova
Ziege anti-Maus H+L FITC	GAM ^{FITC} H+L	Jackson ImmunoResearch
Ziege anti-Maus IgM Fc HRP	GAM ^{HRP} IgM	Chemicon, Schwalbach
Ziege Fab anti-Maus Fab	GAM Fab	Jackson ImmunoResearch

2.1.5 Organismen

2.1.5.1 Pathogene

Zur Selektion monoklonaler Antikörper und scFv Fragmente wurde *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, der Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel sowie der Kraut- und Braunfäule an Tomate eingesetzt. Das Pathogenisolat wurde freundlicherweise von Lars Bangemann (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

Zur Untersuchung der gegen *P. infestans* selektierten monoklonalen Antikörper und scFv Fragmente auf Kreuzreaktivität wurden folgende Pathogene verwendet:

- *Acremonium strictum* Gams (Jun.-Prof. Dr. G. Fischer / Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Universitätsklinikum Aachen (UK Aachen))
- *Alternaria alternata* (Fries : Fries) von Keissler (UK Aachen)
- *Aspergillus niger* van Tieghem (Fraunhofer IME)
- *Botrytis cinerea* Persoon : Fries (Fraunhofer IME)

- *Cladosporium cladosporioides* (Fresenius) de Vries (Fraunhofer IME)
- *Cylindrocarpon destructans* (Zinssmeister) Scholten (UK Aachen)
- *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saccardo (UK Aachen)
- *Penicillium hirsutum* Dierckx (UK Aachen)
- *Phoma glomerata* (Corda) Wollenweber & Hochapfel (UK Aachen)
- *Phytophthora cinnamomi* Rands (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig (DSMZ; Nr. 62654))
- *Phytophthora nicotianae* van Breda de Haan (DSMZ; Nr. 1828)
- *Pythium ultimum* Trow (DSMZ; Nr. 62987)
- *Rhizoctonia solani* Kühn (Dr. Casiana M. Vera Cruz, International Rice Research Institute, Philippinen)
- *Trichoderma viride* Persoon:Fries (UK Aachen)
- *Verticillium dahliae* Klebahn (Dr. R. Černusko, Institut für Pflanzenpathologie, Universität Göttingen)

2.1.5.2 Tiere

Zur Immunisierung wurden sechs bis acht Wochen alte BALB/c Mäuse und leger reife braune „Leghorn“-Hennen verwendet. Die Genehmigung zur Durchführung der Tierversuche wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen bzw. der Bezirksregierung Köln erteilt (Aktenzeichen 50.203.2 – AC 05/06 (Hühner) bzw. 9.93.2.10.54.07.003 (Mäuse)).

2.1.5.3 Bakterienstämme und Pflanzen

Als Rezipienten rekombinanter DNS sowie zur Vermehrung und Isolierung von Plasmiden wurden die *Escherichia coli*-Stämme DH5α und XL1-Blue MRF' verwendet. Zur Expression rekombinanter Proteine dienten die *E. coli*-Stämme BL21(λDE3) und XL1-Blue MRF'. Der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV 3101 wurde zur Transformation von *Nicotiana tabacum* L. cv. Petite Havana SR1 und *Solanum tuberosum* L. cv. Gala und Pirol mit rekombinanten Plasmiden eingesetzt (Tabelle 5). Die Kartoffelpflanzen wurden freundlicherweise von Dr. Holger Junghans und Dr. Katja Muders (NORIKA, Groß Lüsewitz) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Quelle	Genotyp
<i>Escherichia E. coli</i> BL21(λDE3)	Novagen	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)
DH5α	Ausubel <i>et al.</i> 1994	F ⁻ (<i>f80d Lac 2ΔM15</i>) Δ(<i>LacZYA-argF</i>) <i>U169end A1 rec1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1 λ⁻</i>
XL1-Blue MRF ⁺	Stratagene	Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [<i>F'</i> <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV 3101	Koncz und Schell 1986	pMP90RK Gm ^R , Km ^R , Rif ^R

2.1.6 Phagen

Der M13KO7 Helferphage (New England Biolabs) ist ein M13 Derivat mit einer Mutation im GenII (Met40Ile), dem Replikationsursprung von p15A und dem Kanamycinresistenzgen von Tn903 (Vieira und Messing 1987).

2.1.7 Plasmide, Phagemide

pHENHi

Zur Klonierung von scFv Fragmenten in Fusion mit dem GenIII Hüllprotein des M13 Phagen wurde der pHENHi-Vektor (Peschen 2002), der auf dem pHEN1-Phagemid basiert (Hoogenboom *et al.* 1991), verwendet. Der Vektor enthält eine *pelB*-Signalsequenz zur periplasmatischen Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*, ein carboxyterminales cmyc-Motiv zur immunologischen Detektion sowie ein His₆-Motiv zur Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die Kopplung der variablen Antikörperdomänen erfolgt über den im Vektor enthaltenen 218* Linker, welcher von dem 218 Linker (Whitlow *et al.* 1993) abgeleitet worden ist. Das sich zwischen dem scFv Fragment und dem GenIII befindende „Amber-Stoppodon“ wird in Supressor-Stämmen (z. B. XL1-Blue) unterdrückt, so dass die Expression des Fusionsproteins erfolgt. In Nicht-Supressor-Stämmen wie BL21 wird die Translation am „Amber-Stoppodon“ terminiert, wodurch lösliche scFv Fragmente exprimiert werden.

pTRAc

Zur Transformation von *A. tumefaciens* sowie zum Transfer der die scFv- bzw. AFP-scFv Fragmente enthaltenden Expressionskassetten in das Genom von *N. tabacum* und *S. tuberosum* wurde der Pflanzenexpressionsvektor pTRAc verwendet (Dr. T. Rademacher, Institut für Molekulare Biotechnologie, RWTH Aachen). Der vom pPAM-Vektor (GenBank: AY027531) abgeleitete pTRAc-Vektor verfügt über zwei Replikationspunkte, wodurch die Replikation in *E. coli* und *A. tumefaciens* möglich ist. Das Plasmid enthält einen 35S-Promotor sowie die Terminations- und Polyadenylierungssequenzen des CaMV. Die Expressionskassette wird von zwei SARs („scaffold attachment regions“) flankiert, welche aus dem 3'-Bereich des *rb7-5A*-Gens von *N. tabacum* stammen.

pJET1/blunt

Der pJET1/blunt-Vektor (Fermentas) wurde vor der Klonierung der variablen Domänen generierter monoklonaler Antikörper in einen Expressionsvektor zur direkten Klonierung der PCR-Fragmente mit nachfolgender Vermehrung in *E. coli* und Sequenzanalyse verwendet.

Schematische Abbildungen der Vektoren befinden sich im Anhang.

2.1.8 Oligonukleotide

Alle zur Sequenzierung, cDNS-Synthese und Amplifizierung von DNS verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg) oder Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert und sind im Anhang aufgelistet.

2.2 Methoden

2.2.1 Transformation, Selektion und Charakterisierung rekombinanter Bakterien

2.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli* und Herstellung von Stammkulturen

Die Anzucht der verschiedenen *E. coli* Stämme erfolgte in 2xYT-Flüssigmedium bei 37 °C und 160 UpM. Rekombinante Bakterienklone wurden unter Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin (Amp) kultiviert. Die Selektion rekombinanter Bakterienklone nach der Transformation sowie eine kurzfristige Lagerung bei 4 °C erfolgten auf 2xYT-Selektionsplatten (100 µg/ml Amp). Zur langfristigen Lagerung wurde die Bakterienkultur (160 UpM / 37 °C / üN) in 25 % (v/v) Glycerin bei -80 °C konserviert.

2xYT-Flüssigmedium / -Agar (pH 7,4) 1,6 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) Hefeextrakt,
0,5 % (w/v) NaCl, ggf. 1,5 % (w/v) Agar-Agar

2.2.1.2 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens* und Herstellung von Stammkulturen

Die Kultivierung von *A. tumefaciens* erfolgte in YEB-Flüssigmedium (50 µg/ml Rifampicin (Rif), 25 µg/ml Kanamycin (Km)) bei 28 °C und 160 UpM. Zur Selektion und Anzucht rekombinanter Klone wurde das Medium zusätzlich mit 50 µg/ml Carbencillin (Carb) versetzt. Stammkulturen wurden in 25 % (v/v) Glycerin bei -80 °C langfristig bzw. auf Agarplatten kurzfristig bei 4 °C gelagert.

YEB-Flüssigmedium / -Agar (pH 7,4) 0,5 % (w/v) Fleischextrakt, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt,
0,5 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Saccharose,
2 mM MgSO₄, ggf. 1,5 % (w/v) Agar-Agar

2.2.1.3 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

2.2.1.3.1 Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli*

500 ml 2xYT-Flüssigmedium wurden mit 5 ml einer über Nacht Kultur (üN-Kultur) von *E. coli* inokuliert und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,6 inkubiert (160 UpM / 37 °C). Die Kultur wurde 30 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend

zentrifugiert (2800 x g / 4 °C / 10 min). Das Bakterienpellet wurde dreimal in 400 ml eiskaltem sterilem deionisiertem Wasser und einmal in 200 ml eiskaltem sterilem 10 %-igem (v/v) Glycerin gewaschen. Das resultierende Sediment wurde in 1 ml 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert und aliquotiert (50 µl) bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3.2 Herstellung elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 100 ml YEB-Flüssigmedium (50 µg/ml Rif, 25 µg/ml Km) mit 1 ml Vorkultur (160 UpM / 28 °C / 24 h) inokuliert und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 bis 1,5 kultiviert (160 UpM / 28 °C). Die Zellen wurden 15 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (2800 x g / 4 °C / 5 min). Das Bakterienpellet wurde in 10 ml sterilem deionisiertem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde dreimal wiederholt. Das resultierende Sediment wurde in 500 µl sterilem 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert und aliquotiert (50 µl) bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3.3 Elektrotransformation von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Transformation elektrokompetenter Zellen (2.2.1.3.1, 2.2.1.3.2) wurden diese auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 bis 200 ng Plasmid-DNS (2.2.2.1) bzw. 1 bis 2 µl eines Ligationsansatzes (2.2.2.5) vorsichtig gemischt. Der Elektroschock erfolgte in eiskalten Küvetten (Elektrodenabstand 2 mm) bei 2,5 kV für 5 msec. Unmittelbar danach wurden die Zellen mit 800 µl SOC-Medium versetzt und bei 37 °C (*E. coli*) bzw. bei 28 °C (*A. tumefaciens*) eine Stunde inkubiert (160 UpM). Der Transformationsansatz wurde auf Selektionsagarplatten ausgestrichen und bei 37 °C üN (*E. coli*) bzw. bei 28 °C 48 bis 72 Stunden (*A. tumefaciens*) inkubiert. Bakterienkolonien wurden mittels Kolonie-PCR (2.2.2.12.3) untersucht.

<u>SOC-Medium (pH 7,5)</u>	2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO ₄
----------------------------	--

2.2.1.3.4 Hitzeschocktransformation von *Escherichia coli*

Hitzeschockkompetente Zellen (200 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 bis 200 ng Plasmid-DNS (2.2.2.1) bzw. mit bis zu 10 µl eines Ligationsansatzes (2.2.2.5) gemischt und für 20 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C. Nach Abkühlen der Zellen für zwei Minuten auf Eis wurden diese in 800 µl SOC-Medium für eine Stunde bei 37 °C regeneriert (160 UpM). Selektion und Evaluierung rekombinanter Bakterienkolonien erfolgte analog zur Elektrotransformation von *E. coli* (2.2.1.3.3).

2.2.2 DNS und RNS Techniken

2.2.2.1 Plasmid-DNS Isolierung aus *Escherichia coli*

Bakterielle Plasmid-DNS wurde unter Verwendung des „NucleoSpin® Plasmid“ (Macherey & Nagel) bzw. „Plasmid Mini Kits“ (Qiagen) isoliert. Dazu wurden 2 ml 2xYT-Flüssigmedium (100 µg/ml Amp) mit einer Bakterienkolonie oder 10 µl einer Glycerinstammkultur inokuliert und üN inkubiert (160 UpM / 37 °C). Die weitere Vorgehensweise entsprach den Herstellerangaben.

2.2.2.2 Restriktion von DNS

Enzymatische Restriktion von DNS (2.2.2.1, 2.2.2.12) wurde nach Herstellerangaben unter Beachtung der für den jeweiligen Zweck einzusetzenden Enzymmenge sowie den optimalen Temperatur- und Pufferbedingungen durchgeführt. Bei Restriktionsspaltung mit zwei oder mehr Endonukleasen, die nicht in einem Puffer funktionsfähig sind, oder verschiedene Temperaturoptima haben, wurde die DNS zwischen den einzelnen Restriktionsschritten mit dem „NucleoSpin® Extract II“ (Macherey & Nagel) bzw. „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) gereinigt.

2.2.2.3 *Bst*NI-Verdau

Die Methode des *Bst*NI-Fingerprintings wurde eingesetzt, um die genetische Variabilität der scFv Fragmente der hergestellten scFv-Bibliotheken (2.2.5.1) und der im Phagendisplay (2.2.5) selektierten scFvs beurteilen zu können. Dazu wurden die „Inserts“ ausgewählter Klone mittels Kolonie-PCR (2.2.2.12.3) amplifiziert, mit *Bst*NI inkubiert (4 U / 60 °C / 4 h)

und im 2 %-igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt (2.2.2.7). Die sich ergebenden Bandenmuster gaben Hinweise auf das Vorhandensein ähnlicher bzw. verschiedener Sequenzen der scFv Fragmente.

2.2.2.4 Dephosphorylierung

Um eine Religation des bei der Klonierung einzusetzenden Vektors zu verhindern, wurde die restringierte Plasmid-DNS (2.2.2.2) mit dem Enzym „Calf Intestinal Alkaline Phosphatase“ (CIP) nach Herstellerangaben inkubiert. Nach der Dephosphorylierungsreaktion wurde der Reaktionsansatz auf einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.2.7), die Vektorbande ausgeschnitten und die DNS unter Verwendung des „NucleoSpin[®] Extract II“ (Macherey & Nagel) bzw. des „QIAquick Gel Extraktion Kits“ (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

Die Effizienz der Dephosphorylierungsreaktion konnte durch Auszählen der nach Transformation kompetenter *E. coli* (2.2.1.3) mit jeweils gleicher Menge (10 bis 100 ng) nicht dephosphorylierter und dephosphorylierter Vektor-DNS auf Selektionsagarplatten gewachsenen Kolonien bestimmt werden.

2.2.2.5 Ligation

Nach Restriktionsspaltung (2.2.2.2) und Reinigung der DNS-Fragmente (2.2.2.7) wurden Vektor- und „Insert“-DNS im molaren Verhältnis von 1 zu 3 bis 5 ligiert. Die Ligation erfolgte mittels T4 DNS Ligase nach Herstellerangaben (NEB). Wenn nicht anders angegeben, wurden zur Ligation von DNS-Fragmenten mit „sticky-ends“ 20 bis 200 ng Vektor-DNS mit der entsprechenden Menge „Insert“-DNS unter Verwendung von 200 U T4 DNS Ligase bei 16 °C üN inkubiert. Der Ligationsansatz wurde entweder direkt, nach Dialyse gegen MilliQ-Wasser (0,025µm / RT / 1 h) oder nach Reinigung (2.2.2.6) zur Transformation (2.2.1.3) verwendet.

2.2.2.6 Ethanolfällung von DNS

Ligationsansätze (2.2.2.5) wurden vor der Transformation (2.2.1.3) gegebenenfalls mittels Ethanolfällung gereinigt und konzentriert. Dazu wurde der Ligationsansatz mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol gemischt und 30 Minuten bei -20 °C

gelagert. Nach Zentrifugation ($14000 \times g$ / 4°C / 10 min) wurde das Pellet mit 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt ($14000 \times g$ / 4°C / 10 min) luftgetrocknet und in deionisiertem Wasser resuspendiert.

2.2.2.7 Agarosegel-Elektrophorese und Konzentrationsbestimmung von DNS und RNS

DNS-Fragmente (2.2.2.2, 2.2.2.12) und -Plasmide (2.2.2.1) wurden unter Verwendung 0,8 bis 2 %-iger (v/v) Agarosegele, denen $0,3 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid zugesetzt war, im 1x TBE-Puffersystem bei 120 V aufgetrennt. Der Einsatz der 100 bp- und 1 kb-Leiter (Roth) in Kombination mit der Software „Aida Image Analyzer Version 4.14“ (Advanced Image Data Analyzer“) machte eine Größen- und Konzentrationsbestimmung möglich. Präparative Agarosegele dienten nach Auftrennung von PCR- oder Restriktionsansätzen unter Zuhilfenahme des „NucleoSpin® Extract II“ (Macherey & Nagel) bzw. des „QIAquick Gel Extraktion Kits“ (Qiagen) der Reinigung von DNS-Fragmenten. Die Konzentration wurde entweder photometrisch oder, wie oben beschrieben, im analytischen Agarosegel bestimmt.

Gesamt-RNS (2.2.2.8, 2.2.2.9) wurde 10 Minuten bei 70°C in Ladepuffer erhitzt und zur Qualitätskontrolle im 1x TAE-Puffersystem bei den oben beschriebenen Bedingungen aufgetrennt. Die Visualisierung und Dokumentation erfolgte mittels UV-Transluminator und Fotodokumentationssystem von Bio-Rad.

<u>1x TAE (pH 8,0)</u>	40 mM Tris, 1 mM Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA), pH mit Essigsäure einstellen
<u>10x TBE</u>	10,8 % (w/v) Tris, 5,5 % (w/v) Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA
<u>5x Ladepuffer</u>	0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerin, 5x TBE

2.2.2.8 Isolierung von Gesamt-RNS aus Hybridomazellen

Zellen einer in 10 ml R 10-Medium bei 37°C und 5 % CO_2 drei bis vier Tage im Dunklen kultivierten Hybridomazelllinie (2.2.4.13) wurden zentrifugiert ($300 \times g$ / 5 min) und die Gesamt-RNS der sedimentierten Zellen nach der im Qiagen-Handbuch beschriebenen Methode mit dem „RNeasy Mini Kit“ inklusive DNase-Verdau („RNase-Free DNase Set“) isoliert. Die gereinigte RNS wurde nach reverser Transkription in Einzelstrang-cDNS, RNaseH-Verdau (2.2.2.10) und Ligation eines Adapter-Oligonukleotids (2.2.2.11) zur Klonierung der variablen Antikörperdomänen (2.2.2.12.1) verwendet.

R 10-Medium

RPMI-1640 (Invitrogen) durch folgende Komponenten ergänzt:
10 % (v/v) Fetales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin,
0,001 % (w/v) Streptomycin, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

2.2.2.9 Isolierung von Gesamt-RNS und mRNA aus Milzzellen

Die Milzen immunisierter Mäuse (2.2.4.11.2) wurden entnommen, gewogen, zerteilt, durch ein Edelstahlsieb passiert und in dem entsprechenden Volumen Trizol[®] Reagent (Invitrogen) aufgenommen. Die Milzen immunisierter Hühner (2.2.4.11.1) wurden nach dem Entnehmen, Zerteilen und Wiegen ebenfalls in Trizol[®] Reagent gegeben, aber anschließend mittels Ultrathorax homogenisiert. Die Isolierung der Gesamt-RNS erfolgte nach Herstellerangaben. Die isolierte Gesamt-RNS wurde anschließend mit dem „RNeasy Mini Kit“ oder „RNeasy Midi Kit“ (Qiagen) inklusive DNase-Verdau („RNase-Free DNase Set“, Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt.

Die Isolierung von mRNA wurde mit dem „Oligotex Direct mRNA Mini Kit“ (Qiagen) unter Verwendung der wie oben beschrieben gereinigten Gesamt-RNS nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.2.10 cDNS-Synthese

Die reverse Transkription isolierter RNS (2.2.2.8, 2.2.2.9) in Einzelstrang-cDNS wurde zunächst mit „SuperScript[™] II Reverse Transcriptase“ (Invitrogen), später unter Verwendung der „Enhanced Avian Reverse Transcriptase“ (Sigma-Aldrich) und genspezifischer bzw. oligo-dT Primer nach Herstellerangaben durchgeführt. Optional erfolgte im Anschluss ein RNaseH-Verdau (2 U / 37 °C / 20 min).

2.2.2.11 Ligation eines Adapter-Oligonukleotids an Einzelstrang-cDNS

Zehn µl einer cDNS-Synthesereaktion wurden nach RNaseH-Verdau (2.2.2.10) mit 1 µl (100 pmol) des Adapter-Oligonukleotids „AS-linker“ in RNS Ligase Puffer unter Anwesenheit von RNS Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Ligase bei 65 °C für 15 Minuten. Vor der weiteren Verwendung zur Amplifizierung der V_H- und V_L-Antikörperfragmente

(2.2.2.12.1) wurde die cDNS unter Zuhilfenahmen des „NucleoSpin® Extract II“ (Macherey & Nagel) oder des „MinElute PCR Purification Kits“ (Qiagen) gereinigt.

2.2.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.2.12.1 Amplifizierung der variablen Domänen monoklonaler Antikörper zur Klonierung von scFvs

Zur Klonierung von scFv Fragmenten der mittels Hybridomatechnologie generierten monoklonalen Antikörper (2.2.4.13), erfolgte nach Isolierung der Gesamt-RNS (2.2.2.8), Einzelstrang-cDNS-Synthese (2.2.2.10) und Ligation eines Adapter-Oligonukleotids (2.2.2.11) die Amplifizierung der variablen Antikörperdomänen. Dazu wurde ein Primer eingesetzt, der mit dem Adapter-Oligonukleotid hybridisiert („AS04“) und einer, der im konstanten Bereich der schweren Ketten von IgG- und IgM-Antikörperisotypen bzw. kappa und lambda leichten Ketten bindet. Anschließend erfolgte die Klonierung der gereinigten DNS-Fragmente in den pJET1/blunt-Vektor nach Herstellerangaben (Fermentas). Ausgehend von diesem Zwischenvektor wurden die V_H- und V_L-Antikörperfragmente mit spezifischen Oligonukleotiden, welche Schnittstellen zur Klonierung in den pHENHi-Vektor enthielten, amplifiziert (Tabelle 6). Die verwendeten Oligonukleotide sind der Tabelle 30 im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 6: Übersicht zur Durchführung der PCR-Reaktionen zur Amplifizierung variabler Antikörperdomänen von cDNS und Plasmid-DNS (pJET1/blunt)

Komponente	Endkonzentration / -volumen	Amplifizierungsbedingungen	
cDNS / Plasmid-DNS	2 µl / 10-100 ng		
PCR-Puffer	1 x	94 °C	5 min
MgCl ₂	1,5 mM	94 °C	0,5 min
dNTPs	0,05 mM jedes	50 - 55 °C	0,5 min
„forward“ Primer	0,4 µM	72 °C	3 min
„backward“ Primer	0,4 µM	72 °C	15 min
Enzyme mix (Roche)	2,6 U		
H ₂ O _{dd}	-		
Endvolumen	50 µl		

2.2.2.12.2 Amplifizierung der variablen Domänen zur Klonierung von scFv-Bibliotheken

Zur Klonierung der avianen und murinen scFv-Bibliotheken mussten die variablen Antikörperdomänen von Einzelstrang-cDNS amplifiziert werden. Dazu wurden für jeden Reaktionsansatz jeweils 2 µl eines cDNS-Synthesereaktionsansatzes eingesetzt (2.2.2.10). Die Komponenten, deren Endkonzentrationen sowie die verwendeten Amplifizierungsbedingungen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Als Kontrollen wurden zum einen jeweils 2 µl von cDNS-Synthesereaktionen verwendet, die keine Reverse Transkriptase bzw. keine RNS enthielten, zum anderen wurden PCR-Ansätze ohne „Template“ durchgeführt, um ausschließen zu können, dass Amplifizierungsprodukte aufgrund von Verunreinigung einer oder mehrerer Komponenten entstanden sind. Die verwendeten Oligonukleotide sind in den Tabellen 30 bis 32 im Anhang aufgelistet.

Tabelle 7: Übersicht zur Durchführung einer PCR zur Amplifizierung avianer und muriner V_H- und V_L-Antikörperfragmente von cDNS

Komponente	Endkonzentration / -volumen	Amplifizierungsbedingungen	
cDNS	2 µl		
PCR-Puffer	1 x	94 °C	5 min
MgCl ₂	1,5 mM	94 °C	1 min
dNTPs	0,05 mM jedes	55 °C	1 min
„forward“ Primer	0,4 µM	72 °C	2 min
„backward“ Primer	0,4 µM	72 °C	10 min
Taq DNS Polymerase	2,5 U		
H ₂ O _{dd}	-		
Endvolumen	50 µl		

2.2.2.12.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR eignet sich zur schnellen Analyse einer großen Anzahl von Bakterienkolonien nach der Transformation (2.2.1.3). Dazu wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze Zellmaterial einer Kolonie in 20 µl steriles deionisiertes Wasser überführt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 99 °C wurde der Ansatz zentrifugiert (10000 x g / RT / 20 sec) und 10 µl des Überstandes einem PCR-Ansatz mit Fragment- und / oder Plasmid-spezifischen Oligonukleotiden zugeführt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie die typischerweise verwendeten Amplifizierungsbedingungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Übersicht zur Durchführung einer Kolonie-PCR

Komponente	Endkonzentration / -volumen	Amplifizierungsbedingungen
Überstand	10 µl	
PCR-Puffer	1 x	94 °C 5 min
MgCl ₂	1,5 mM	94 °C 0,5 min
dNTPs	0,05 mM jedes	48 °C 0,5 min
„forward“ Primer	0,2 µM	72 °C 2 min
„backward“ Primer	0,2 µM	72 °C 15 min
Taq DNS Polymerase	1 U	
H ₂ O _{dd}	-	
Endvolumen	20 µl	

2.2.2.12.4 SOE-PCR zur Verknüpfung der AFP und scFv

Die AFPs Cec, D4E1, GR7 und Mag sowie der scFvCWDP2 wurden unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide amplifiziert, so dass den (G₄S)₂ Linker kodierende überlappende Enden entstanden (Tabelle 9). Die Amplifikate wurden im Agarosegel aufgetrennt (2.2.2.7), unter Verwendung von „NucleoSpin® Extract II“ (Macherey & Nagel) gereinigt und in einer zweiten PCR unter Einsatz von jeweils 1 µl gereinigten AFP bzw. scFv fusioniert (Tabelle 10). Die verwendeten Oligonukleotide sind Tabelle 37 im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 9: Übersicht zur Durchführung einer PCR zur Amplifizierung der AFP und des scFvCWPD2

Komponente	Endkonzentration / -volumen	Amplifizierungsbedingungen
Plasmid	1 µl	
pJET-Cec		
pJET-D4E1		
pJET-GR7		
pJET-Mag		94 °C 5 min
pHENHi-Chi-scFvCWPD2		94 °C 0,5 min
PCR-Puffer	1 x	52 °C 0,5 min
MgCl ₂	1,5 mM	72 °C 2 min
dNTPs	0,05 mM jedes	72 °C 15 min
„forward“ Primer	0,4 µM	
„backward“ Primer	0,4 µM	
Enzyme mix (Roche)	2,6 U	
H ₂ O _{dd}	-	
Endvolumen	50 µl	

Tabelle 10: Übersicht zur Durchführung einer SOE-PCR zur Verknüpfung der AFP und des scFvCWPD2 sowie zur Amplifizierung der AFP-scFvCWPD2 Fragmente

Komponente	Endkonzentration / -volumen	Amplifizierungsbedingungen
geextrahiertes Fragment		
AFP	1 µl	
scFvCWPD2	1 µl	94 °C 5 min
PCR-Puffer	1 x	94 °C 0,5 min
MgCl ₂	1,5 mM	52 °C 0,5 min
dNTPs	0,05 mM jedes	72 °C 2 min
„forward“ Primer	0,4 µM	72 °C 15 min
„backward“ Primer	0,4 µM	
Enzyme mix (Roche)	2,6 U	
H ₂ O _{dd}	-	
Endvolumen	50 µl	

2.2.2.12.5 PCR zum Nachweis der Transgene in Kartoffelpflanzen

Zur Überprüfung, ob die regenerierten Kartoffelpflanzen die zur Transformation (2.2.6.4) eingesetzten Gene enthielten, wurde von jeder Pflanze ein etwa 1 cm² großes Blattstück zur Extraktion von DNS eingesetzt (Porcar *et al.* 2007). Das Blattstück wurde mit 40 µl 0,5 M NaOH mittels Elektropistil zerrieben und 6 µl des nach Zentrifugation (12000 x g / RT / 2 min) erhaltenen Überstandes mit 2 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) durch Pipettieren gemischt. Von der Mischung wurde nach Zentrifugation (12000 x g / RT / 30 sec) 1 µl zu 19 µl eines PCR-Reaktionsansatzes gegeben (Tabelle 11). Die verwendeten Oligonukleotide sind Tabelle 30 im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 11: Übersicht zur Durchführung einer PCR zum Nachweis von Fremd-DNS in regenerierten Kartoffelpflanzen

Komponente	Endkonzentration / -volumen	Amplifizierungsbedingungen
Überstand	1 µl	
PCR-Puffer	1 x	94 °C 5 min
MgCl ₂	1,5 mM	94 °C 0,5 min
dNTPs	0,05 mM jedes	55 °C 0,5 min
„forward“ Primer	0,2 µM	72 °C 2 min
„backward“ Primer	0,2 µM	72 °C 15 min
Taq DNS Polymerase	1 U	
H ₂ O _{dd}	-	
Endvolumen	20 µl	

2.2.2.13 DNS Sequenzierung und Analyse

Die Überprüfung der Sequenz klonierter DNS-Fragmente (2.2.2.5) erfolgte mittels Sequenzierung. Dazu wurden 150 ng/kb der aus *E. coli* isolierten Plasmid-DNS (2.2.2.1) in 28 µl H₂O_{dd} verdünnt und mit 2 µl eines vektorspezifischen Oligonukleotids (10 pmol) versetzt. Die Sequenzierung wurde vom Sequenzierservice (Fraunhofer IME, Aachen) unter Verwendung des ABI Prism 3700 Sequencer nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977) und des „cycle sequencing“ durchgeführt (Saiki *et al.* 1985). Die Auswertung erhaltener Sequenzdaten erfolgte unter Verwendung von SeqMan (DNASTAR Inc., USA) und die weitere Ver- und Bearbeitung der Daten mit Vector NTI Advance 10 (Invitrogen) sowie Clone Manager Suite 8 (Scientific and Educational Software, USA).

2.2.3 Kultivierung der Pathogene und Herstellung von Antigenen

2.2.3.1 Kultivierung der Pathogene

P. infestans wurde auf bzw. in Erbsen- und V8-Agar bzw. -Medium bei 16 °C bzw. 18 °C im Dunklen, alle übrigen Oomyceten auf V8-Agar bei Raumtemperatur (RT) kultiviert. Die Kultivierung der anderen Isolate (2.1.5.1) erfolgte auf Hafermehlagar (Difco) bei RT. Zur Erhaltung der Pilzstämme wurden Kulturen in Schrägagarröhrchen angelegt und bei 4 °C gelagert.

<u>V8-Medium / -Agar</u>	20 % (v/v) Gemüsesaft (TIP), 0,3 % (w/v) CaCO ₃ , 1,5 % (w/v) Agar-Agar, 100 µg/ml Rif
--------------------------	--

2.2.3.2 Antigenpräparation

Zur Herstellung der für die Immunisierung (2.2.4.11) und nachfolgende Versuche benötigten Zellwandfragmente von *P. infestans*, wurde Myzel des zehn bis 14 Tage kultivierten Pathogens (2.2.3.1) entweder vorsichtig von den Agarplatten abgekratzt oder durch Filtration aus einer Flüssigkultur isoliert. Zur Reinigung des Myzels wurde dieses mit sterilem deionisiertem Wasser gewaschen und durch drei Lagen Miracloth filtriert. Die Zerkleinerung erfolgte durch Mörsern in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurden die Myzelbruchstücke in eiskaltem Aufschlusspuffer resuspendiert (10 ml Aufschlusspuffer pro 1 g Myzel) und 30 Minuten auf einem Überkopfschüttler (50 UpM) bei 4 °C inkubiert. Zur

weitgehenden Entfernung des Cytosols wurde die Präparation jeweils dreimal mit eiskaltem Waschpuffer bzw. eiskaltem sterilem deionisiertem Wasser gewaschen (je Waschschrift 10 ml Waschpuffer bzw. Wasser pro 1 g Myzel). Jeder Waschschrift wurde für 10 Minuten bei 4 °C und 50 UpM auf einem Überkopfschüttler durchgeführt und die Gewinnung der Zellwandfragmente dazwischen geschah durch Zentrifugation (2000 x g / 4 °C / 5 min). Das resultierende Pellet wurde in sterilem 1x PBS (pH 7,4) resuspendiert und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Die Herstellung der Zellwandpräparation anderer Pathogene erfolgte analog unter Beachtung der jeweiligen Kulturbedingungen (2.2.3.1).

<u>Aufschlusspuffer</u>	10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
<u>Waschpuffer</u>	1 M NaCl, 1 mM PMSF
<u>1x PBS (pH 7,4)</u>	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O, 1,5 mM KH ₂ PO ₄

2.2.3.3 Isolierung von Sporen

Zur Gewinnung der Sporangien von *P. infestans* wurde eine bewachsene Agarplatte (2.2.3.1) mit zentrifugiertem V8-Medium (4000 x g / RT / 20 min) oder sterilem Leitungswasser überschichtet und die Sporangien durch Schwenken oder vorsichtiges Abkratzen mit einem Spatel vom Myzel gelöst. Die Sporangien-haltige Flüssigkeit wurde zur Abtrennung von Myzelbruchstücken durch drei Lagen Miracloth filtriert. Die Sporangienkonzentration im Filtrat wurde mit Hilfe einer Fuchs Rosenthal-Kammer (Marienfeld) bestimmt und durch Verdünnen auf die gewünscht Konzentration eingestellt. Bei Inkubation der Sporangien für ein bis vier Stunden bei 4 °C wurden Zoosporen entlassen. Zur Keimung wurden die Sporangien bzw. Zoosporen bei 16 °C üN in sterilem Leitungswasser oder V8-Medium inkubiert.

2.2.4 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.2.4.1 Expression rekombinanter Proteine in *Escherichia coli*

Um bei einer Vielzahl rekombinanter Bakterienklone gleichzeitig die Expression löslicher scFv Fragmente durchführen zu können, wurden diese im Kleinmaßstab in „96-well

Zellkulturplatten“ kultiviert. Dazu wurden einzelne Kolonien in 110 µl 2xYT-Flüssigmedium (100 µg/ml Amp) gepickt und bei 37 °C und 160 UpM üN inkubiert. Zehn µl dieser Kultur wurden in 140 µl 2xYT-Flüssigmedium (100 µg/ml Amp) überführt, nach weiteren drei bis vier Stunden (160 UpM / 37 °C) mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration 1 mM) induziert und üN exprimiert (160 UpM / 28 °C oder 30 °C). Die Kulturplatten wurden nach Zentrifugation (2000 x g / 20 min) bis zur weiteren Verwendung des Kulturüberstandes bei 4 °C aufbewahrt. Bei Ausführung des Experiments in „Deep-Well-Platten“ erfolgte die Kultivierung der Klone in einem Vielfachen der oben angegebenen Volumina.

Zur bakteriellen Expression von scFvs und AFP-scFv Fusionen erfolgte zunächst deren Klonierung in den pHENHi-Vektor. Die rekombinanten Plasmide wurden zur Transformation von *E. coli* BL21 oder *E. coli* XL1-Blue verwendet. Rekombinante Klone wurden zur Inokulation von 10 ml 2xYT-Flüssigmedium (100 µg/ml Amp) herangezogen und bei 37 °C und 160 UpM üN kultiviert. Es folgte die Zugabe der üN-Kultur zu 500 ml 2xYT-Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,08 bis 0,1 mit anschließender Inkubation bei 37 °C und 160 UpM bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,6 erreicht war. Die Expression der scFvs und AFP-scFv Fusionen wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration von 1 mM) induziert. Nach einer Inkubationsdauer von drei bis vier Stunden bei 28 °C und 160 UpM wurden die Zellen zentrifugiert (4000 x g / 4 °C / 20 min), um nach periplasmatischem Zellaufschluss die Zielproteine zu reinigen (2.2.4.2).

War das Ziel der Expression die in den Kulturüberstand sezernierten Proteine zu verwenden, erfolgte die Expression nach IPTG-Induktion bei 28 °C und 160 UpM üN. Die Kultur wurde zentrifugiert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.4.2 Isolierung und Reinigung periplasmatisch exprimierter Proteine

Das durch Zentrifugation der induzierten Bakterien erhaltene Sediment (2.2.4.1) wurde entweder bei -20 °C gelagert oder direkt zur Isolierung der periplasmatisch exprimierten Proteine eingesetzt. Dazu wurde dieses in 10 ml eiskaltem Aufschlusspuffer resuspendiert, nach Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Endkonzentration 1 mM) 10 Minuten auf Eis gelagert und anschließend zentrifugiert (8000 x g / 4 °C / 20 min). Der Überstand wurde auf Eis verwahrt, das Bakterienpellet in 10 ml eiskaltem 5 mM MgSO₄ aufgenommen und 10 Minuten auf Eis geschüttelt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt

(8000 x g / 4 °C / 20 min) wurde der Überstand mit dem vorherigen Überstand kombiniert und vor der Reinigung 10N gegen Lysepuffer bei 4 °C dialysiert (2.2.4.4).

Die Reinigung der scFv Fragmente und AFP-scFv Fusionsproteine mit C-terminalem His₆-Tag erfolgte unter Verwendung einer Nickel-NTA-Agarose Matrix (Qiagen). 500 µl Matrix wurden in eine Einwegsäule (Poly-Prep Chromatography Column 0,8 x 4 cm, Bio-Rad) pipettiert und mit zehn Säulenvolumen Lysepuffer äquillibriert. Danach wurde der dialysierte und sterilfiltrierte (0,2 µm) Überstand der IMAC-Affinitätschromatographie („Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography“) zugeführt und die Matrix anschließend mit 20 Säulenvolumen Waschpuffer von unspezifisch gebundenen Proteinen gereinigt. Die Elution erfolgte in fünf 0,5 ml Fraktionen. Die Eluate wurden zur Entfernung des Imidazols unverzüglich gegen 1x PBS (pH 7,4) bei 4 °C dialysiert (2.2.4.4). Gegebenfalls wurden die Proteine nach Analyse im SDS-PAGE (2.2.4.5) und Immunoblot (2.2.4.7) konzentriert (Vivaspin, Satorius).

<u>Aufschlusspuffer (pH 8,0)</u>	30 mM Tris-HCl, 20 % (w/v) Sucrose
<u>1x PBS (pH 7,4)</u>	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O, 1,5 mM KH ₂ PO ₄
<u>Lysepuffer (pH 8,0)</u>	1x PBS, 5 mM Imidazol
<u>Waschpuffer (pH 8,0)</u>	1x PBS, 15 mM Imidazol
<u>Elutionspuffer (pH 8,0)</u>	1x PBS, 250 mM Imidazol

2.2.4.3 Reinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomenüberstand

Zellen der Hybridomalinie, die den gewünschten Antikörper produzierte, wurden in serumfreien Medium (PFHM-II, Invitrogen) bei 37 °C und 5 % CO₂ etwa eine Woche im Dunkeln kultiviert. Nach zwei Zentrifugationsschritten (300 x g / 5 min und 4000 x g / 10 min) wurde der sterilfiltrierte (0,2 µm) Überstand der Reinigung unter Verwendung von 1 ml MEP HyperCell (Pall) zugeführt. Die Matrix wurde mit 10 ml Citratpuffer äquillibriert und anschließend der Überstand geladen. Es folgten zwei Waschschrte mit 2 ml Citratpuffer (pH 7,0) und 5 ml Citratpuffer (pH 6,0). Der pH-Wert des Citratpuffers wurde durch Beimischung von Citronensäurepuffer zunächst auf pH 4,0 zur Elution und anschließend auf pH 2,5 gesenkt. Beide Schritte erfolgten mit 10 ml, die in Fraktionen von 0,5 ml aufgefangen wurden. Die Flussgeschwindigkeit war während der

gesamten Prozedur konstant 1 ml/min. Im Anschluss wurden die den Antikörper enthaltenden Fraktionen gegen 1x PBS dialysiert (2.2.4.4) und bei 4 °C gelagert.

<u>Citratpuffer (pH 7,0)</u>	50 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, pH-Wert mit Citronensäurepuffer einstellen
<u>Citronensäurepuffer (pH 2,5)</u>	50 mM Citronensäure, pH-Wert mit Citratpuffer einstellen

2.2.4.4 Dialyse proteinhaltiger Lösungen

Die Dialyse dient der Entsalzung und Umpufferung proteinhaltiger Proben. Dazu wurde eine Dialysemembran (SpectraPor) mit einem MWCO (molecular weight cut off) von 6 bis 8 kDa nach Herstellerangaben vorbereitet und die Probe (2.2.4.2, 2.2.4.3, 2.2.4.12) in der Membran gegen mindestens das 100-fache Probenvolumen des gewünschten Puffers bei 4 °C dialysiert. Der Puffer wurde während der Prozedur gerührt und dreimal im Abstand von mindestens einer Stunde ausgetauscht.

2.2.4.5 SDS-PAA-Gelelektrophorese und Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Auftrennung von Proteinen (2.2.3.2, 2.2.4.1 – 4, 2.2.6.5) kam die diskontinuierliche SDS-PAA-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Anwendung (Laemmli 1970). Die zu analysierende Probe wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt, zehn Minuten bei 99 °C erhitzt und bei 250 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde „Page Ruler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) verwendet. Proteinbanden wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau (2.2.4.6) oder im Immunoblot (2.2.4.7) mit Hilfe spezifischer Antikörper visualisiert. Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte unter Verwendung der Software „AIDA“.

<u>Sammelgel</u>	3,645 ml deionisiertes Wasser, 625 µl Tris-HCl (pH 6,8), 50 µl 10 % (w/v) Natrium-Dodecylsulfat (SDS), 830 µl 30 % Acrylamid, 15 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), 5 µl 20 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
------------------	---

<u>Trenngel</u>	2,115 ml deionisiertes Wasser, 3,75 ml Tris-HCl (pH 8,8), 100 µl 10 % (w/v) SDS, 4 ml 30 % Acrylamid, 10 µl TEMED, 30 µl 20 % (w/v) APS
<u>5x SDS-Probenpuffer</u>	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 4 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) Glycerin, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau
<u>5x SDS-Laufpuffer (pH 8,3)</u>	125 mM Tris, 960 mM Glycin, 0,5 % (w/v) SDS

2.2.4.6 Coomassie Brilliant Blau Färbung von SDS-PAA-Gelen

Zur Visualisierung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine in SDS-PAA-Gelen (2.2.4.5) mittels Coomassie Brilliant Blau kamen zwei Methoden zum Einsatz. Proteinbanden konnten entweder durch Inkubation in Coomassie-Färbelösung (RT / 30 min) mit anschließendem Schwenken in Coomassie-Entfärbelösung (RT / üN) visualisiert, oder in Anlehnung an Fairbanks *et al.* (1971) und Wong *et al.* (2000) mit Puffer A (2 min Mikrowelle / 900 WATT / 15 min RT), Puffer B (2 min Mikrowelle / 900 WATT) und Puffer C (2 min Mikrowelle / 900 WATT) behandelt werden. Die Entfärbung des Gels erfolgte bei letzterer Methode in Puffer D (2 min Mikrowelle / 900 WATT / 2 h RT).

<u>Coomassie-Färbelösung</u>	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250, 50 % (v/v) Methanol, 9 % (v/v) Essigsäure
<u>Coomassie-Entfärbelösung</u>	5 % (v/v) Methanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure
<u>Puffer A</u>	0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250, 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure
<u>Puffer B</u>	0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250, 10 % (v/v) Isopropanol
<u>Puffer C</u>	0,002 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250, 10 % (v/v) Essigsäure
<u>Puffer D</u>	10 % (v/v) Essigsäure

2.2.4.7 Immunoblotanalyse

Die im SDS-PAGE getrennten Proteine (2.2.4.5) wurden auf Nitrozellulose (Schleicher & Schuell) transferiert und die Membran anschließend in 2 % (w/v) M-PBS eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit PBS-T gewaschen und im Anschluss mit dem bzw. den in 0,5 % (w/v) M-PBS nach Herstellerangaben verdünnten Nachweisantikörpern überschichtet. Die Inkubationsdauer betrug für jeden Antikörper eine Stunde, wobei die Membran zwischen den einzelnen Schritten jeweils dreimal mit PBS-T gewaschen wurde. Aufgrund der Kopplung des Sekundärantikörpers an Alkalische Phosphatase (AP), konnten die detektierten Proteinbanden durch Behandlung mit NBT/BCIP (1 : 100 in AP-Puffer) sichtbar gemacht werden. Wurden Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte Sekundärantikörper verwendet, erfolgte die Visualisierung mit 4-Chloro-1-naphthol (Sigma-Aldrich) oder dem „SuperSignal® West HisProbe™ Kit“ (Pierce) nach Herstellerangaben.

<u>Transferpuffer</u>	25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
<u>M-PBS</u>	0,5 % bzw. 2 % (w/v) Milchpulver in 1x PBS (pH 7,4)
<u>PBS-T</u>	0,05 % (v/v) Tween-20 in 1x PBS (pH 7,4)
<u>AP-Puffer</u>	100 mM Tris-HCl (pH 9,6), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂
<u>NBT/BCIP</u>	3,33 % (w/v) p-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (NBT), 1,65 % (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP) in Dimethylformamid

2.2.4.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Kavitäten der ELISA Platten wurden mit Zellwandfragmenten (200 µg/ml Trockengewicht (TG) in 1x PBS (pH 7,4)) des zu detektierenden Pathogenisolats (2.2.3.2) bei 4 °C bzw. Sporangien (3000 Sporangien/ml steriles Leitungswasser oder V8-Medium) von *P. infestans* (2.2.3.3) bei 16 °C, um das Auskeimen der Sporangien zu ermöglichen, üN beschichtet. Freie Bindungsstellen wurden mit 2 % (w/v) M-PBS für eine Stunde bei RT abgesättigt. Anschließend folgte entsprechend dem Ziel des Experiments die Inkubation mit Bakterienüberstand, mit bakteriell bzw. transient exprimierten, gereinigten scFv Fragmenten bzw. AFP-scFv Fusionsproteinen oder Blattextrakt transgener Kartoffelpflanzen (Tabelle 12), mit Hybridomenüberständen (Tabelle 14) oder mit Serum bzw. polyklonalen IgY-Antikörpern (Tabelle 13). Nach Zugabe eines enzymkonjugierten Sekundärantikörpers und nachfolgend des entsprechenden Substrates konnte die Stärke der Farbreaktion photometrisch ($E_{405\text{nm}}$)

erfasst werden. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die ELISA Platten dreimal mit PBS-T gewaschen.

Um die Konzentration monoklonaler Antikörper im Hybridomenüberstand berechnen zu können, wurde ein ELISA nach dem unten aufgezeigten Schema durchgeführt (Tabelle 15). Da es sich bei den monoklonalen Antikörpern um verschiedene Isotypen handelte, waren sowohl verschiedene Beschichtungs- als auch Standard- und Sekundärantikörper notwendig.

Zur Detektion rekombinanter AFP-scFv Fusionsproteine im Blattextrakt transgener Kartoffelpflanzen wurden Blätter in zwei Volumen 1x PBS homogenisiert und der nach Zentrifugation (10000 x g / 4 °C / 10 min) erhaltene Überstand zur Beschichtung der Kavitäten der ELISA Platte eingesetzt (Tabelle 16).

Tabelle 12: ELISA zur Detektion pilzlicher Antigene durch spezifische scFv Fragmente und AFP-scFv Fusionsproteine

Schritt	Komponente	Konzentration / Verdünnung	Volumen	Inkubation
Beschichten	Zellwandfragmente	200 µg/ml TG in 1x PBS (pH 7,4)	100 µl	üN, 4 °C
	Sporangien	3000 /ml in H ₂ O bzw. Medium	100 µl	üN, 16 °C
Blockieren	Milchpulver	2 % (w/v) in 1x PBS (pH 7,4)	150 µl	1 h, RT
Probe	Bakterienüberstand	siehe Ergebnisse		
	Blattextrakt		100 µl	2 h, RT
	scFv / AFP-scFv		100 µl	2 h, RT
1. Ak	α-cmyc mAb oder	1 : 5000	100 µl	1 h, RT
	RAhis	in 0,5 % (w/v) M-PBS (pH 7,4)		
2. Ak	GAM ^{HRP} Fc oder	1 : 10000	100 µl	1 h, RT
	GAR ^{HRP} Fc	in 0,5 % (w/v) M-PBS (pH 7,4)		
Substrat	ABTS	nach Herstellerangaben	100 µl	1 h, RT

Tabelle 13: ELISA zur Bestimmung des Antikörpertiters immunisierter Tiere

Schritt	Komponente	Konzentration / Verdünnung	Volumen	Inkubation
Beschichten	Zellwandfragmente	200 µg/ml TG in 1x PBS (pH 7,4)	100 µl	üN, 4 °C
Blockieren	Milchpulver	2 % (w/v) in 1x PBS (pH 7,4)	150 µl	1 h, RT
Probe		serielle Verdünnung		
	Serum	ab 1 : 500	100 µl	2 h, RT
	IgY	ab 1 : 500	100 µl	2 h, RT
		(10 mg/ml IgY Stammlösung)		
		in 0,5 % (w/v) M-PBS (pH 7,4)		
Ak	GAM ^{HRP} Fc oder	1 : 10000	100 µl	1 h, RT
	RAC ^{HRP} Fc	in 0,5 % (w/v) M-PBS (pH 7,4)		
Substrat	ABTS	nach Herstellerangaben	100 µl	1 h, RT

Tabelle 14: ELISA zur Detektion pathogenspezifischer poly- bzw. monoklonaler Antikörper im Hybridomenüberstand

Schritt	Komponente	Konzentration / Verdünnung	Volumen	Inkubation
Beschichten	ZWF	200 µg/ml TG in 1x PBS (pH 7,4)	100 µl	üN, 4 °C
	Sporangien	3000 /ml in H ₂ O bzw. Medium	100 µl	üN, 16 °C
Blockieren	Milchpulver	2 % (w/v) in 1x PBS (pH 7,4)	150 µl	1 h, RT
Probe	Überstand	verdünnt (siehe Ergebnisse)	100 µl	2 h, RT
		in 0,5 % (w/v) M-PBS (pH 7,4)	100 µl	2 h, RT
Ak	GAM ^{HRP} Fc	1 : 10000	100 µl	1 h, RT
		in 0,5 % (w/v) M-PBS (pH 7,4)		
	GAM ^{HRP} IgM	1 : 5000	100 µl	1 h, RT
		in 0,5 % (w/v) M-PBS (pH 7,4)		
Substrat	ABTS	nach Herstellerangaben	100 µl	1 h, RT

Tabelle 15: ELISA zur Konzentrationsbestimmung der monoklonalen Antikörper im Hybridomenüberstand

Schritt	Komponente	Konzentration / Verdünnung	Volumen	Inkubation
Beschichten	GAM Fab	1 : 2000 in 1x PBS (pH 7,4)	100 µl	1 h, 37 °C
	RAM ^{AP} λ	1 : 2000 in 1x PBS (pH 7,4)	100 µl	1 h, 37 °C
Blockieren	Milchpulver	2 % (w/v) in 1x PBS (pH 7,4)	150 µl	1 h, RT
Probe		serielle Verdünnung	100 µl	1 h, RT
	MAH Fc	ab 0,2 ng/µl	100 µl	1 h, RT
	IgM κ	ab 0,2 ng/µl	100 µl	1 h, RT
	IgM λ	ab 0,2 ng/µl	100 µl	1 h, RT
		in 0,5 % (w/v) M-PBS (pH 7,4)		
	Überstand	serielle Verdünnung	100 µl	1 h, RT
		in 0,5 % (w/v) M-PBS (pH 7,4)		
Ak	GAM ^{HRP} Fc	1 : 10000	100 µl	1 h, RT
		in 0,5 % (w/v) M-PBS (pH 7,4)		
	GAM ^{HRP} IgM	1 : 5000	100 µl	1 h, RT
		in 0,5 % (w/v) M-PBS (pH 7,4)		
Substrat	ABTS	nach Herstellerangaben	100 µl	RT

Tabelle 16: ELISA zur Detektion von AFP-scFv Fusionsproteinen in Kartoffelblattextrakt

Schritt	Komponente	Konzentration / Verdünnung	Volumen	Inkubation
Beschichten	Blattextrakt	unverdünnt	100 µl	1 h, RT
Blockieren	Milchpulver	2 % (w/v) in 1x PBS (pH 7,4)	150 µl	1 h, RT
1. Ak	RAhis	1 : 5000	100 µl	1 h, RT
		in 0,5 % (w/v) M-PBS (pH 7,4)		
2. Ak	GAR ^{AP} Fc	1 : 5000	100 µl	1 h, RT
		in 0,5 % (w/v) M-PBS (pH 7,4)		
Substrat	pNPP		100 µl	1 h, 37 C

<u>pNPP</u>	10 % (v/v) Diethanolamin, 10 mM MgCl ₂ , pH auf 9,8 einstellen, 1 mg/ml p-Nitrophenyl-Phosphat
-------------	---

2.2.4.9 Immunofluoreszenzmikroskopie

Runde Deckgläser wurden mit 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, mit Poly-L-Lysin beschichtet, luftgetrocknet und mit deionisiertem Wasser gespült. ÜN bei 16 °C in sterilem Leitungswasser oder geklärtem V8-Medium gekeimte Sporangien von *P. infestans* (2.2.3.3) wurden zu den in einer mit 2 % (w/v) M-PBS blockierten „12-well Zellkulturplatte“ liegenden Deckgläsern gegeben und zentrifugiert (2000 x g / 15 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und freie Bindungsstellen mit 2 % (w/v) M-PBS blockiert (RT / 1 h). Anschließend wurden die Deckgläser mit einem monoklonalen Antikörper oder scFv inkubiert (RT / 2 h). Im Fall der scFv Fragmente folgte zunächst eine Inkubation mit einem α -myc mAb (RT / 1 h) und im Anschluss mit einem GAM^{FITC} H+L (RT / 1 h). Die monoklonalen Antikörper konnten direkt nach Zugabe eines GAM^{FITC} H+L bzw. GAM^{Alexa} IgM Sekundärantikörpers (RT / 1 h) detektiert werden. Zur Mikroskopie wurden die Deckgläser mit der Oberseite nach unten auf einen Objektträger gelegt. Die Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) betragen 488 und 520 nm, die von Alexa Fluor liegen bei 578 und 603 nm.

2.2.4.10 Konzentrationsbestimmung mittels Oberflächen Plasmon Resonanz (SPR)

Die Konzentrationsbestimmung des mAkPi102.2 erfolgte auch mittels SPR unter Verwendung einer Biacore T100 und eines CM5 Sensorchips (GE Healthcare). Zur Aktivierung der Chipoberfläche wurde diese mit EDC/NHS gespült (10 µl/min / 7 min). Es folgte die Kopplung des Antikörpers (RAM Fc) bei einer Flussrate von 5 µl/min für 7 min und die Absättigung freier Bindungsstellen mit Ethanolamin Hydroxychlorid (10 µl/min / 7 min). Anschließend wurde der Chip mit 30 mM HCl regeneriert (30 µl / min, 3 mal 15 sec). Die mAkPi102.2 Proben sowie ein Standardantikörper gleichen Isotyps und bekannte Konzentration wurden in HBS-Puffer verdünnt injiziert (15 µl/min). Nach der Messung erfolgte wiederum die Regeneration der Chipoberfläche mit 30 mM HCl. Daten wurden mittels BIAevaluation 3.0 Software (BIAcore) dargestellt und die Standardgerade

sowie die Konzentrationen des mAkPi102.2 unter Verwendung der „response units“ berechnet.

<u>EDC/NHS</u>	50 % (v/v) N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC), 50 % (v/v) N-Hydroxysuccinimide (NHS)
<u>HBS-Puffer</u>	10 mM HEPES, 150mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% (v/v) Surfactant P20

2.2.4.11 Immunisierung

2.2.4.11.1 Immunisierung von Hühnern

Braunen „Leghorn“-Hennen wurde ein Gemisch von *P. infestans* Zellwandfragmenten (200 µg Trockengewicht in 1x PBS (pH 7,4)) (2.2.3.2) und Gerbu Adjuvant 100 (120 µl) mit einem Gesamtvolumen von 700 µl an jeweils einer Stelle beider Brustmuskeln subkutan alle zwei Wochen injiziert. Die Eier wurden gesammelt und bis zur Isolierung der IgY-Antikörper (2.2.4.12), die zur Bestimmung des Antikörpertiters herangezogen wurden, bei 4 °C gelagert. Drei Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die entnommenen Milzen zur RNS-Isolierung (2.2.2.9) herangezogen.

2.2.4.11.2 Immunisierung von Mäusen

Drei weibliche BALB/c Mäuse wurden mit 120 µg, 240 µg bzw. 480 µg Trockengewicht Zellwandfragmenten von *P. infestans* (2.2.3.2) in 1x PBS (pH 7,4) immunisiert. Die erste intraperitoneale Applikation mit einem Gesamtvolumen von 100 µl erfolgte unter Beimischung von 40 µl Gerbu Adjuvant MM. Bei allen jeweils im Abstand von zwei Wochen folgenden wurden 20 µl des gleichen Adjuvants mitinjiziert. Durch Anschneiden der Schwanzspitze konnte austretendes Blut mit einer Pipette aufgesogen werden. Das Blut wurde in 1x PBS (pH 7,4) verdünnt und zur Gewinnung des Serums zentrifugiert. Das so vor Beginn der Immunisierungsphase und eine Woche nach der jeweiligen Immunisierung erhaltene Serum diente der Bestimmung des Antikörpertiters (2.2.4.8). Fünf Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere getötet und die Milzzellen zur RNS-Isolierung (2.2.2.9) bzw. zur Fusion mit Myelomzellen (2.2.4.13) verwendet. Des Weiteren wurde das Herz nach

der Tötung zur Blutentnahme punktiert, um mit dem erhaltenen Serum die Bestimmung des letztendlichen Antikörpertiters (2.2.4.8) durchzuführen.

2.2.4.12 Isolierung polyklonaler Antikörper aus Hühnereigelb

Aus dem Eigelb von Eiern immunisierter Hühner (2.2.4.11.1) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Immunisierungsphase polyklonale IgY-Antikörper isoliert. Dies erfolgte in Anlehnung an die von Polson *et al.* 1985 beschriebene Methode.

Der vom Eiweiß separierte Eidotter wurde vorsichtig mit Leitungswasser abgespült. Nach der Bestimmung des Dottervolumens wurde das Eigelb in vier Dottervolumen 1x PBS (pH 7,4) durch zehn minütiges Rühren bei Raumtemperatur homogenisiert. Anschließend wurde 3,5 % (w/v) PEG-6000 zugegeben und für weitere zehn Minuten gerührt. Die Suspension wurde zehn Minuten auf Eis gekühlt, zentrifugiert (12000 x g / 4 °C / 20 min) und der Überstand nach Filtration durch drei Lagen Miracloth mit 8,5 % (w/v) PEG-6000 versetzt und für 20 Minuten bei 4 °C gerührt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (12000 x g / 4 °C / 20 min) wurde das Sediment in 2,5 Dottervolumen eiskaltem 1x PBS (pH 7,4) resuspendiert und nach Zugabe von 12 % (w/v) PEG-6000 20 Minuten bei 4 °C gerührt. Das nach der Zentrifugation (12000 x g / 4 °C / 20 min) erhaltene Pellet wurde in 0,25 Dottervolumen eiskaltem 1x PBS (pH 7,4) aufgenommen, mit dem gleichen Volumen 50 %-igem (v/v) Ethanol (-20 °C) aufgefüllt, acht Mal invertiert und zentrifugiert (15000 x g / 4 °C / 25 min). Das resultierende Sediment wurde in 0,25 Dottervolumen 1x PBS (pH 7,4) resuspendiert, gegen 1x PBS (pH 7,4) dialysiert (4°C / üN), sterilfiltriert (0,2 µm) und nach Zugabe von Natriumazid (Endkonzentration 0,02 % (w/v)) aliquotiert bei 4 °C und -20 °C gelagert.

2.2.4.13 Herstellung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper wurden in Zusammenarbeit mit Yvonne Olbrich (Institut für Molekulare Biotechnologie, RWTH Aachen) und Katrin Thees (Fraunhofer IME, Aachen) mit Hilfe der Hybridomatechnik hergestellt (Köhler und Milstein 1975, Monecke 1999). Dazu wurden die Milzen immunisierter Mäuse entnommen und die B-Lymphozyten mit Myelomzellen fusioniert. Die aus der Fusion entstandenen Hybridomazellen wurden angezogen und der Kulturüberstand im ELISA (2.2.4.8) auf Vorhandensein *P. infestans*-spezifischer polyklonaler Antikörper getestet. Positive Klone wurden durch die

Methode der „limiting dilution“ vereinzelt und die Kulturüberstände wiederum im ELISA analysiert, um Hybridomazelllinien, die *P. infestans*-spezifische monoklonale Antikörper produzieren, zu identifizieren.

2.2.5 Phagendisplay

2.2.5.1 Herstellung von scFv-Bibliotheken

Zur Generierung der scFv-Bibliotheken wurde zunächst Gesamt-RNS bzw. mRNA (2.2.2.9) aus den Milzzellen immunisierten Mäuse (2.2.4.11.2) und Hühner (2.2.4.11.1) isoliert. Es folgte die reverse Transkription in Einzelstrang-cDNA (2.2.2.10) und die Amplifizierung der variablen Antikörperdomänen (2.2.2.12.2) sowie deren Klonierung in den pHENHi-Vektor. Die Verknüpfung der V_H - und V_L -Antikörperfragmente erfolgte durch Kreuzklonierung der aus der V_H -Subbibliothek isolierten V_H -Antikörperfragmente in die V_L -Subbibliothek und umgekehrt. Sowohl die Subbibliotheken, als auch die scFv-Bibliotheken wurden in *E. coli* XL1-Blue transformiert (2.2.1.3.4). Nach Fertigstellung der Genbibliotheken in *E. coli* wurden diese durch Kolonie-PCR (2.2.2.12.3) und *Bst*NI-Fingerprinting (2.2.2.3) charakterisiert. Die Bestimmung der Gesamtanzahl rekombinanter Bakterienklone einer scFv-Bibliothek erfolgte durch Titration. Dazu wurden diese in serieller Verdünnung auf 2xYT-Selektionsplatten (100 µg/ml Amp) plattiert und nach Inkubation (37 °C / üN) die Größe der Genbibliothek durch Auszählen der Kolonien berechnet. Im Anschluss wurden die scFv-Bibliotheken zur Selektion *P. infestans*-spezifischer scFv Fragmente mittels Phagendisplay eingesetzt.

2.2.5.2 Herstellung und Titration der Phagenbibliothek

Zu Anfang jeder Phagendisplay-Selektionsrunde wurden scFv-präsentierende polyklonale Phagen hergestellt. Dazu wurden 50 ml 2xYT-Flüssigmedium (100 µg/ml Amp, 1 % (w/v) Glukose) mit etwa 1×10^8 Bakterienzellen der scFv-Bibliothek inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,5 kultiviert (160 UpM / 37 °C). Zu 10 ml dieser Kultur (etwa 10^9 Bakterien) wurden Helferphagen (M13K07, NEB) im 10-fachen Überschuss in Relation zu den Bakterien gegeben und jeweils 30 Minuten bei 37 °C zuerst mit, dann ohne Schütteln (160 UpM) inkubiert. Das nach Zentrifugation (3500 x g / 10 min) erhaltene Sediment wurde in 50 bis 200 ml 2xYT-Flüssigmedium (100 µg/ml Amp, 25 µg/ml Km) resuspendiert und üN bei 30 °C inkubiert (225 UpM). Der nach Zentrifugation (3500 x g / 30 min) erhaltene

Kulturüberstand wurde mit 1/5 Volumen PEG / NaCl (20 % (w/v) PEG-6000, 2,5 M NaCl) versetzt und die Phagen durch Inkubation bei 4 °C für eine Stunde gefällt. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt (3500 x g / 30 min) und die vollständige Entfernung des PEG / NaCl-haltigen Überstandes. Das Sediment wurde in 1 ml 1x PBS (pH 7,4) resuspendiert, zentrifugiert (16000 x g / 5 min) und der Überstand zur Bestimmung des Phagentiters und zum „Panning“ eingesetzt.

Die Titration der Phagen erfolgte durch Infektion von *E. coli* XL1-Blue ($OD_{600} = 0,5$) mit einer seriellen Verdünnungsreihe der Phagen und Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten. Die Verdünnungen wurden auf 2xYT-Selektionsplatten (100 µg/ml Amp) bei 37 °C üN kultiviert und der Phagentiter durch Auszählen der Kolonien berechnet. Der zu erwartende Titer liegt bei 1 bis 5×10^{13} Phagen/ml.

2.2.5.3 Panning

Immunotubes (MaxisorP4, Nunc) wurden mit 200 µg/ml TG Zellwandfragmenten von *P. infestans* (2.2.3.2) in 1x PBS (pH 7,4) bzw. 3000 Sporangien/ml (2.2.3.3) sterilem Leitungswasser (Gesamtvolumen 1 bis 2,5 ml) üN bei 4 °C bzw. 16 °C beschichtet. Nach Blockierung des Immunotubes mit 4 ml 2 % (w/v) M-PBS (37 °C / 1 h) wurden die in 1 bis 2,5 ml 2 % (w/v) M-PBS inkubierten Phagen ($10^{12} - 10^{13}$ Phagen / RT / 30 min) in das Immunotube überführt. Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei RT wurde das Immunotube zur Entfernung unspezifisch gebundener Phagen 20 mal mit PBS-T und 20 mal mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Gebundene Phagen wurden durch Zugabe von 1 ml 100 mM Triethylamin (RT / 8 - 10 min) und Rotation auf einem Überkopfschüttler eluiert und anschließend umgehend zur Neutralisation mit 0,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5) gemischt. Die eluierten Phagen wurden zur Infektion von 9 ml einer *E. coli* XL1-Blue Kultur ($OD_{600} = 0,5$) verwendet. Nach einer Inkubation für jeweils 30 Minuten bei 37 °C zunächst ohne, dann mit Schütteln wurden 100 µl zur Herstellung einer Verdünnungsreihe mit nachfolgender Titerbestimmung der eluierten Phagen herangezogen. Die übrige Kultur wurde zentrifugiert (3000 x g / 10 min), das Sediment in 1 ml Überstand resuspendiert und auf 2xYT-Selektionsplatten (100 mg/ml Amp) bei 37 °C üN kultiviert. Die so erhaltenen Kolonien wurden mit einem sterilen Spatel in 2xYT-Flüssigmedium resuspendiert und für die nächste Selektionsrunde eingesetzt.

2.2.5.4 Expression und Evaluierung angereicherter scFv Fragmente

Nach der zweiten und/oder dritten Selektionsrunde wurden Bakterienkolonien hinsichtlich ihrer Expression *P. infestans*-spezifischer löslicher scFv Fragmente untersucht. Dazu erfolgte die Kultivierung der Bakterienklone und die Expression der scFv Fragmente im Kleinmaßstab (2.2.4.1). Der die löslichen scFv Fragmente enthaltene Kulturüberstand wurde im ELISA (2.2.4.8) zum Nachweis auf Antigenbindung eingesetzt.

2.2.6 Herstellung und Charakterisierung transgener Pflanzen

2.2.6.1 Kultivierung von *Nicotiana tabacum*

N. tabacum Saatgut wurde in Einheitserde Typ VM ausgelegt und die Keimlinge vier Wochen nach der Aussaat in Einheitserde vom Typ ED 73 gepflanzt. Die Kultivierung erfolgte bei 25 °C, 70 % relativer Luftfeuchte und einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16 und acht Stunden.

2.2.6.2 Kultivierung von *Solanum tuberosum*

Die Kultivierung von Kartoffelpflanzen erfolgte in Einheitserde vom Typ ED 73 bei 22 °C, 70 % relativer Luftfeuchte, 16 Stunden Licht und acht Stunden Dunkelheit. Die Vermehrung erfolgte vegetativ über Stecklinge oder Knollen.

In Sterilkultur wurden Pflanzen in 2 MS-Agar in sterilen Plastikbehältern kultiviert (23°C / 16 h Licht / 8 h Dunkel). Die Kulturerhaltung erfolgte durch Stecklinge.

<u>2 MS-Agar (pH 5,8)</u>	0,443 % (w/v) MS Salze (Murashige & Skoog),
	2 % (w/v) Saccharose,
	0,7 % (w/v) Agar-Agar

2.2.6.3 Transiente Expression in Tabakblättern

Ein Aliquot Glyzerinstammkultur von *A. tumefaciens* (2.2.1.2), die das Plasmid mit dem rekombinanten Fragment enthielten, wurde zu 50 ml YEB-Flüssigmedium (Rif / Km / Carb) gegeben. Nach einer Inkubation bei 28°C und 160 UpM für 48 h erfolgte die Zentrifugation (4000 x g /10 min) der Kultur bevor das resultierende Pellet in 200 ml Induktionsmedium resuspendiert wurde (160 UpM / 28 °C / 24 h). Das nach Zentrifugation (4000 x g /10 min)

erhaltene Sediment wurde in MMA aufgenommen und eine OD₆₀₀ zwischen 1,0 und 2,4 eingestellt. Es folgte die Inkubation der Kultur bei RT für 0,5 bis 2 Stunden. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension mit Hilfe einer 1 ml Spritze (ohne Nadel) an der Blattunterseite in die Blätter einer intakten Pflanze injiziert oder Blätter mittels Vakuum infiltriert. Zur Vakuuminfiltration wurden die frisch von höchstens drei Monate alten Tabakpflanzen abgetrennten Blätter in einem Becherglas übereinander geschichtet, mit einem weiteren wassergefüllten Gefäß beschwert und mit der Bakteriensuspension bedeckt. Die Vakuuminfiltration wurde im Autoklaven bei 70 mbar für 20 min durchgeführt. Infiltrierte Blätter wurden mit Leitungswasser abgespült und mit der Oberseite nach oben auf feuchte Tücher in einer Schale gelegt. Die Schale wurde mit Frischhaltefolie verschlossen und die Blätter drei Tage inkubiert (23°C / 16 h Licht / 8 h Dunkel / 7500 Lux). Die Blätter wurden zur Extraktion der rekombinanten Proteine herangezogen (2.2.6.5). Die mittels Spritze transformierten Blätter wurden neben der Proteinextraktion (2.2.6.5) für die Inhibitionsversuche (2.2.6.6) verwendet.

<u>Induktionsmedium (pH 5,6)</u>	0,5 % (w/v) Fleischextrakt, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Saccharose, 10 mM 2-(N-morpholino)ethansulfonsäure (MES) nach dem Autoklavieren hinzugeben: 2 mM MgSO ₄ , 50 µg/ml Rif, 25 µg/ml Km, 50 µg/ml Carb, 20 µM Acetosyringon (200 mM in DMSO)
<u>MMA (pH 5,6)</u>	0,43 % (w/v) MS Salze, 2 % (w/v) Saccharose, 10 mM MES, 200 µM Acetosyringon

2.2.6.4 Stabile Transformation von Kartoffelpflanzen

Die Herstellung stabiler transgener *S. tuberosum* Linien erfolgte unter Verwendung von Kartoffelblättern sowie rekombinanten *A. tumefaciens* und wurde freundlicherweise von Dr. Flora Schuster (Institut für Molekulare Biotechnologie, RWTH Aachen) durchgeführt. Dazu wurden Blätter vier bis fünf Wochen alter in Sterilkultur gewachsener Kartoffelpflanzen zweimal quer zur Mittelrippe eingeritzt sowie die Blattspitze und –basis abgeschnitten. Die präparierten Blätter wurden mit der Unterseite nach oben auf 15 ml 2 MS-Flüssigmedium in Petrischalen gelegt. Es folgte die Zugabe von 50 µl einer *A. tumefaciens*-üN-Kultur (OD₆₀₀ 3 bis 5). Nach einer zweitägigen Inkubation bei 22 °C im Dunkeln wurden die Blätter auf

CIM-Medium transferiert. Damit die gesamte Blattfläche Kontakt zum Medium hatte, wurde dieses mit einer sterilen Pinzette aufgelockert. Nach sieben Tagen wurden die Blätter erstmalig auf SIM umgesetzt. Die Blätter wurden anschließend alle zehn Tage auf frische SIM-Platten gelegt, wobei die Kalli von den Blättern getrennt wurden. Regenerierte Stängel wurden zur Entwicklung der Wurzeln auf RIM transferiert. Pflanzen von etwa zehn cm Größe wurden in Jiffy Torfquelltöpfe pikiert und ein bis zwei Wochen unter einer Plastikhaube in einer Klimakammer bei 22 °C kultiviert bevor sie in Einheitserde überführt wurden (2.2.6.2).

<u>2 MS-Flüssigmedium (pH 5,8)</u>	0,443 % (w/v) MS Salze, 2 % (w/v) Saccharose, 200 µM Acetosyringon
<u>CIM (Kallusinduktionsmedium) (pH 5,8)</u>	0,443 % (w/v) MS Salze, 1,6 % (w/v) Glukose, 0,7 % (w/v) Agar-Agar, 0,05 ‰ (w/v) α -Naphthylenessigsäure (NAA), 0,001 ‰ (w/v) Benzylaminopurin, 0,025 % (w/v) Cefatoxim, 0,005 % (w/v) Km
<u>SIM (Stängelinduktionsmedium) (pH 5,8)</u>	0,443 % (w/v) MS Salze, 1,6 % (w/v) Glukose, 0,7 % (w/v) Agar-Agar, 0,0002 ‰ (w/v) NNA, 0,0002 ‰ (w/v) Gibberellinsäure, 0,02 ‰ (w/v) Zeatiribosid, 0,025 % (w/v) Cefatoxim, 0,005 Km % (w/v)
<u>RIM (Wurzelinduktionsmedium) (pH 5,8)</u>	0,443 % (w/v) MS Salze, 0,7 % (w/v) Agar-Agar, 0,025 % (w/v) Cefatoxim

2.2.6.5 Proteinextraktion aus Tabakblättern

Zur Extraktion löslicher Proteine aus Tabakblättern (2.2.6.3) wurden diese nach Entfernung der Mittelrippen und Ermittlung des Frischgewichtes in flüssigem Stickstoff gemörsert. Anschließend erfolgte die Zugabe von zwei Volumen Extraktionspuffer (w/v). Der Extrakt wurde zentrifugiert (11000 x g / 4 °C / 30 min), der Überstand durch drei Lagen Miracloth filtriert und das Filtrat nach Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 500 mM für 30 min auf Eis gelagert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (50000 x g / 4 °C / 45 min) und die Filtration des Überstandes bevor dieser auf pH 8,0

eingestellt einer IMAC-Affinitätschromatographie zugeführt wurde (2.2.4.2). Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAA-Gelelektrophorese (2.2.4.5) und Immunoblot (2.2.4.7).

Extraktionspuffer (pH 7,0 bis 7,4) 1x PBS (pH 7,4),
1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP)

2.2.6.6 Inhibitionsversuche

Transient transformierte Tabakblätter wurden nach dreitägiger Inkubation bei den oben angegebenen Bedingungen (2.2.6.3) von den Pflanzen getrennt und mit der Unterseite nach oben auf feuchtes Papier in Petrischalen gelegt. Von einer vollständig mit *P. nicotianae* bewachsenen etwa sieben Tage alten Agarplatte wurden Agarstücke mit einer Größe von etwa 1 cm² ausgestochen. Diese wurden mit der Oberseite nach unten auf die Blattunterseite gelegt. Um eine hohe Luftfeuchte während der Inkubationsphase zu gewährleisten, wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei RT. Symptome waren nach etwa drei Wochen dokumentierbar.

2.2.6.7 Resistenzversuche

Zur Untersuchung transgener Kartoffellinien (2.2.6.4) auf Resistenz gegenüber *P. infestans* wurden mehrere Blätter aus dem mittleren Drittel der Pflanzen entnommen und mit der Unterseite nach oben auf feuchtes Papier in Petrischalen gelegt. Sporangien wurden von dem zehn Tage auf V8-Agar kultivierten Pathogen mit sterilem Leitungswasser isoliert (2.2.3.3). Die Sporangienkonzentration wurde auf 1x10⁴ Sporangien pro ml eingestellt und für ein bis zwei Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Sporangienkonzentration, die Entlassung von Zoosporen sowie die Vitalität der Zoosporen wurden mikroskopisch kontrolliert. Pro Blatt wurden mindestens zweimal 5 µl auf die Blattunterseite gegeben. Die Bonitur erfolgte fünf Tage nach der Inokulation (16 °C / 100 % Luftfeuchtigkeit / 48 h dunkel / 72 h hell/dunkel). Als Kontrollen dienten Wildtyppflanzen der gleichen Sorte.

3 ERGEBNISSE

3.1 Herstellung von *Phytophthora infestans* Antigenen

Ziel war die Generierung von Antikörpern, die Oberflächenantigene interzellulär im Blattgewebe wachsender Hyphen von *P. infestans* erkennen. Das bzw. die von den Antikörpern zu erkennenden Antigene mussten folglich in diesem Entwicklungsstadium des Pathogens an dessen Oberfläche exponierte möglichst native Targets beinhalten. Des Weiteren mussten die Antigene reproduzierbar und in größeren Mengen herstellbar sowie zur Immunisierung und für weitere Methoden (ELISA, Phagendisplay, Immunoblot) geeignet sein. Die Zellwand sowie gekeimte Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* waren vor diesem Hintergrund geeignete Antigene.

Zur Herstellung der zur Immunisierung und für Folgeexperimente verwendeten Zellwandpräparationen erfolgte die Kultivierung des Pathogens in bzw. auf Erbsen- und V8-Flüssigmedium bzw. -Agar (2.2.3). Das Myzel wurde geerntet und weitestgehend von Sporangien und Medienbestandteilen befreit. Es folgte die Zerkleinerung des Myzels durch Mörsern in flüssigem Stickstoff mit anschließenden Waschschritten zur Entfernung des Cytosols. Diese Art der Aufbereitung sollte gewährleisten, dass zur Immunisierung möglichst nur die Zellwandfragmente der Hyphen eingesetzt wurden (3.2). Um eine Degradierung von Zellwandproteinen zu verhindern, wurden alle Schritte auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Eine Analyse der Präparation erfolgte mittels SDS-PAA-Gelelektrophorese (2.2.4.5). Durch Behandlung mit Coomassie (2.2.4.6) wurden Proteinbanden von etwa 12 kDa bis über 170 kDa erkennbar (Abbildung 2). Bei der mikroskopischen Untersuchung der Zellwandpräparationen war festzustellen, dass die Fragmente überwiegend von cytosolischen Bestandteilen befreit werden konnten (Abbildung 3 E, F).

Zur Immunisierung von Hühnern und Mäusen (3.2) wurde nur die von dem in Erbsenmedium kultivierten Pathogen hergestellte Zellwandpräparation verwendet. Zur Bestimmung des polyklonalen Antikörpertiters (3.2), zum „Screening“ der Antikörper-haltigen Kulturüberstände der Hybridomen (3.3.1), zur Charakterisierung der Antikörper (3.3), scFv (3.6) und AFP-scFv Fusionsproteine (3.7) sowie im Phagendisplay (3.5.2, 3.5.3) wurden Zellwandfragmente, die von dem in V8-Medium gewachsenen Pathogen produziert wurden, eingesetzt. Diese Vorgehensweise sollte die Selektion von Antikörpern und scFv Fragmenten, die an Medienbestandteile binden, verhindern.

Die wie oben dargestellt hergestellten Zellwandfragmente konnten im Verlauf der Immunisierung dazu führen, dass auch Antikörper gegen nicht auf der Hyphenoberfläche exponierte Antigene gebildet wurden. Deshalb wurden neben den Zellwandfragmenten gekeimte Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* zum „Screening“ der Antikörper-haltigen Kulturüberstände der Hybridomen (3.3.1), zur Bestimmung der Reaktivität mAk gegenüber *P. infestans* (3.3.2.3), zur Verifizierung der Antikörperbindung an native Oberflächenantigene von *P. infestans* mittels Immunofluoreszenzmikroskopie (3.3.2.5, 3.6.5) sowie im Phagendisplay (3.5.2, 3.5.3) verwendet. Die Anzucht, Gewinnung und Keimung der Sporangien erfolgte wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben. Abbildung 3 zeigt mikroskopische Aufnahmen von Hyphen des auf Agarplatten gewachsenen Pathogens (A) sowie Sporangien bei der Entlassung der Zoosporen (B), gekeimte Sporangien (C) und gekeimte Zoosporen mit einem Appressorium am Ende des Keimschlauches (D).

Sowohl die Zellwandfragmente als auch die Sporangien und Zoosporen erwiesen sich als geeignete Antigene zur Verwendung im ELISA (2.2.4.8). Nach Inkubation der mit den Zellwandfragmenten (in 1x PBS) bzw. Sporangien und Zoosporen (in Leitungswasser oder V8-Medium) befüllten Kavitäten bei 16 °C üN waren sowohl die Zellwandfragmente als auch die während der Inkubationsphase gekeimten Sporangien an der aktivierten Polystyrol-Oberfläche adsorbiert. Die Bindung dieser Antigene an die Oberfläche der ELISA Platte wurde bei jedem Versuch mehrfach im Verlauf des Experiments durch mikroskopische Untersuchung bestätigt.

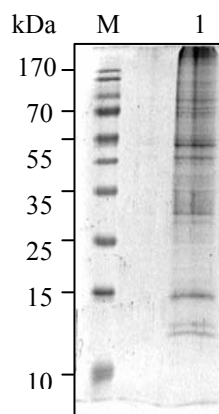


Abbildung 2: SDS-PAGE von *P. infestans* Zellwandfragmenten

Zellwandfragmente von *P. infestans* (150 µg TG) (2.2.3.2) wurden im 12 %-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.4.5). Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie visualisiert (2.2.4.6). M: Prestained Protein Marker (Fermentas); TG: Trockengewicht; 1: Zellwandfragmente von *P. infestans* (150 µg TG).

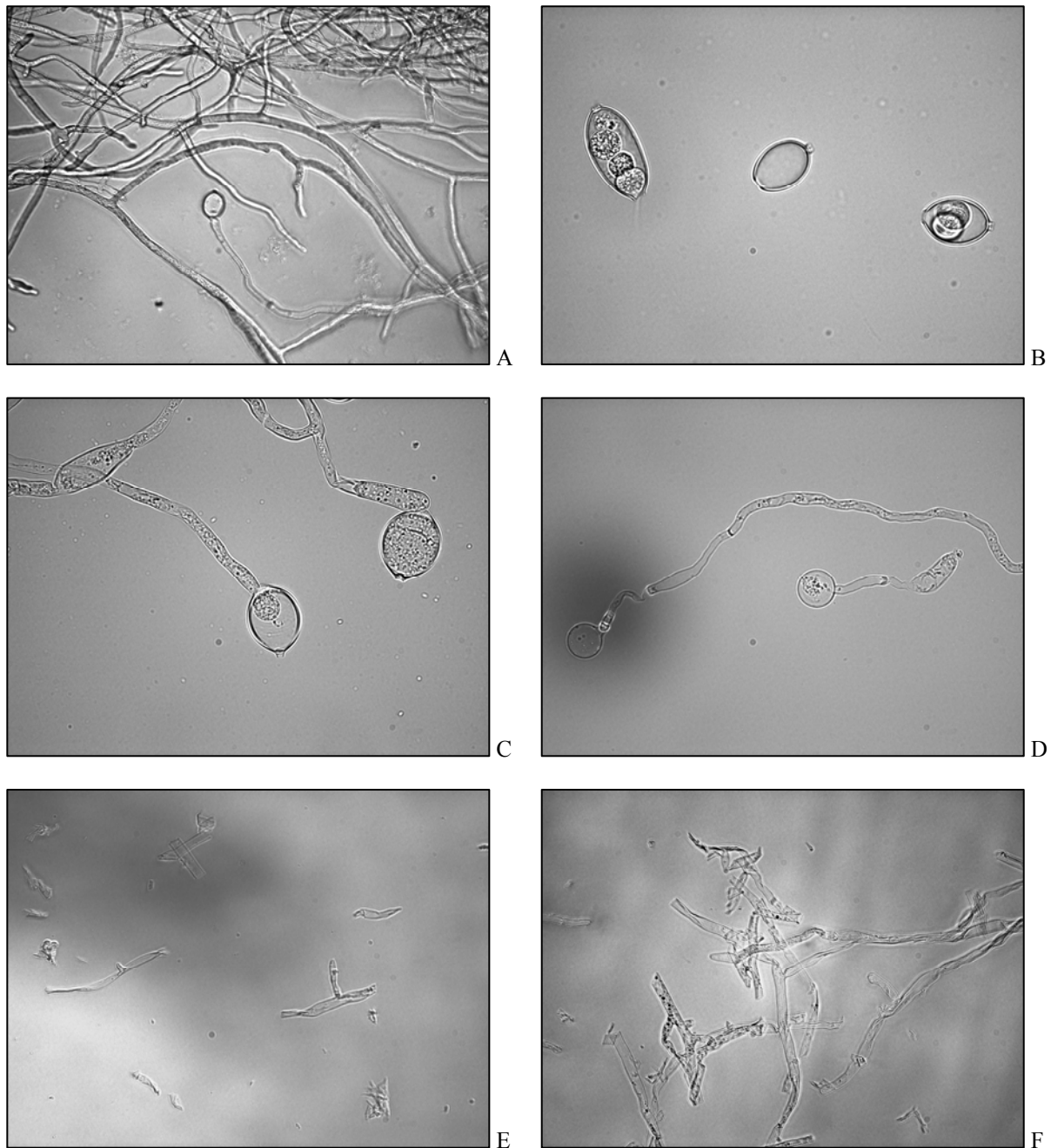


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahmen verschiedener Entwicklungsstadien von *P. infestans* und Zellwandfragmentpräparationen

P. infestans wurde auf V8- oder Erbsenagar bei 16 °C im Dunkeln kultiviert (2.2.3.1). An den Hyphen bildeten sich nach wenigen Tagen Sporangien (A), die nach Überschichten einer vollständig bewachsenen Platte mit sterilem Leitungswasser oder V8-Flüssigmedium durch vorsichtiges Abkratzen mit einem Spatel vom Myzel gelöst werden konnten. Durch Lagerung der Sporangien bei 4 °C für ein bis vier Stunden wurden Zoosporen entlassen (2.2.3.3) (B). Bei Lagerung der Sporangien (C) und Zoosporen (D) bei 16 °C üN konnte die Entwicklung eines Keimschlauches beobachtet werden. Gekeimte Zoosporen bildeten am Ende des Keimschlauches ein Appressorium (D). Zellwandfragmente wurden von dem in Flüssigmedium oder auf Agarplatten kultivierten Pathogen hergestellt (2.2.3.2, E, F).

3.2 Immunisierung von Mäusen und Hühnern

Drei Mäuse und zwei Hühner wurden mit *P. infestans* Zellwandfragmenten (3.1) immunisiert (2.2.4.11). Zur Bestimmung des Antikörpertiters mittels ELISA (2.2.4.8) dienten die sechs bis sieben Tage nach der jeweiligen Immunisierung und zum Zeitpunkt der Milzentnahme erhaltenen Blutseren der Mäuse bzw. die mittels PEG-Fällung aus dem Eigelb der fünf bis sieben Tage nach einer Immunisierung gesammelten Hühnereier isolierten polyklonalen IgY-Antikörper (2.2.4.12). Um falsch positive Signale, die durch an Medienbestandteile bindende Antikörper hervorgerufen werden konnten, zu vermeiden, erfolgte die Immunisierung mit Zellwandfragmentpräparationen des in Erbsenmedium kultivierten Pathogens und die Titerbestimmung mit einer Antigenpräparation von *P. infestans* aus V8-Flüssigmedium bzw. -Agar.

Der Antikörpertiter wird als die höchste Verdünnungsstufe angegeben, bei der die nach einer Stunde Substratinkubation im ELISA gemessene Extinktion wenigstens 0,2 betrug. Dies entsprach mindestens dem doppelten Hintergrundsignal. Der Titer wurde vor der ersten Immunisierung sowie mehrfach im Verlauf der Immunisierung unter Verwendung IgG- bzw. IgY-spezifischer Sekundärantikörper ermittelt (Tabelle 17). Der Titer aller Tiere betrug vor Beginn des Experiments unter 1 : 1.000. Die Immunisierung der Hühner erfolgte durchgehend mit 200 µg TG Zellwandfragmenten. Der finale Titer von Huhn 1 lag nach der dritten Immunisierung bei 1 : 30.000. Da die Immunantwort von Huhn 1 nicht zufriedenstellend war und auch beim Phagendisplay mit einer von Milzzellen dieses Huhns generierten scFv-Bibliothek kein *P. infestans*-spezifischer scFv selektiert werden konnte (Daten nicht dargestellt), wurde Huhn 2 länger immunisiert und mit den Mäusen wie im folgenden Absatz beschrieben verfahren. Huhn 2 erreichte vergleichbar mit Huhn 1 nach der dritten Immunisierung einen Titer von 1 : 25.000. Durch weitere Immunisierungen konnte der Antikörpertiter von Huhn 2 nach dem siebten Boost um Faktor zehn auf 1 : 250.000 gesteigert werden (Tabelle 17).

Um bei den Mäusen festzustellen, durch welche Antigenmenge eine möglichst optimale Immunantwort hervorgerufen werden konnte, wurden diese anfangs mit unterschiedlichen Mengen der Zellwandpräparation immunisiert (120 µg TG (Maus 1), 240 µg TG (Maus 2) und 480 µg TG (Maus 3)). Die Titerbestimmung nach der dritten Immunisierung ergab für Maus 1 1 : 50.000, für Maus 2 1 : 400.000 und für Maus 3 1 : 200.000. Daraufhin wurden alle weiteren Injektionen von Maus 1 und Maus 2 mit 240 µg TG durchgeführt und die Immunisierung von Maus 3 eingestellt. Nach der vierten Hyperimmunisierung lag der Titer

von Maus 1 bei 1 : 300.000 und konnte durch den letzten Boost auf über 1 : 1.000.000 gesteigert werden. Der bei Maus 2 nach dem vierten Boost ermittelte Titer von 1 : 3.000.000 veränderte sich durch die letzte Immunisierung nicht mehr (Tabelle 17).

Abschließend war festzuhalten, dass bei den mit *P. infestans* Zellwandfragmenten immunisierten Mäusen im Vergleich zu dem mit dem gleichen Antigen immunisierten Huhn 2 ein vier bis zwölfmal höher polyklonaler Antikörpertiter ermittelt werden konnte. Offen blieb, ob durch den Einsatz einer höheren Antigenmenge zur Immunisierung von Hühnern eine stärkere Immunantwort erzielt werden kann. Die Milzen der Hühner und die Hälfte der Milz von Maus 1 wurden zur Herstellung von scFv-Bibliotheken verwendet (3.4). Milzzellen beider Mäuse wurden zur Herstellung monoklonaler Antikörper mittels Hybridomatechnologie eingesetzt (3.3.1).

Tabelle 17: Zur Immunisierung der Hühner und Mäuse eingesetzte Mengen der *P. infestans* Zellwandfragmente (ZWF) sowie Veränderung des polyklonalen Antikörpertiters

Zur Bestimmung des Titers (2.2.4.8) wurden ELISA Platten mit Zellwandfragmenten von *P. infestans* (200 µg/ml TG) (2.2.3.2) beschichtet und mit Serum (2.2.4.11.2) bzw. polyklonalen IgY-Antikörpern (10 mg/ml) (2.2.4.12) in serieller Verdünnung inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mittels RAC^{HRP} Fc bzw. GAM^{HRP} Fc mit anschließender Visualisierung durch ABTS (1 h). Der Titer ist als die Verdünnung angegeben, bei der eine $E_{405nm} > 0,2$ nach einer Stunde Substratinkubation gemessen werden konnte. TG: Trockengewicht; ZWF: Zellwandfragmente von *P. infestans*.

Immunisierung	Huhn 1		Huhn 2	
	ZWF (µg TG)	Titer	ZWF (µg TG)	Titer
1	200		200	
2	200	1 : 3.000	200	
3	200	1 : 30.000	200	1: 25.000
4	200		200	
5			200	
6			200	1: 150.000
7			200	1: 250.000
8			200	

Immunisierung	Maus 1		Maus 2	
	ZWF (µg TG)	Titer	ZWF (µg TG)	Titer
1	120		240	
2	120		240	
3	120	1 : 50.000	240	1 : 400.000
4	240	1 : 300.000	240	1 : 3.000.000
5	240	> 1 : 1.000.000	240	1 : 3.000.000

3.3 Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper sowie Klonierung korrespondierender scFvs

Die Generierung spezifischer monoklonaler Antikörper (2.2.4.13) wurde im Rahmen dieser Arbeit neben dem Phagendisplay als besonders vielversprechend und zielführend angesehen. Dazu wurden die B-Lymphozyten der Milzzellen immunisierter Mäuse (3.2) mit Maus-Myelomzellen fusioniert. Die in die Kulturüberstände der Fusionszellen sezernierten Antikörper wurden im ELISA (2.2.4.8) auf Reaktivität gegenüber *P. infestans* getestet und positive Zellkulturen bis zum Erhalt der den *P. infestans*-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk) produzierenden Hybridomazelllinie vereinzelt. Die so selektierten monoklonalen Antikörper wurden mit dem primären Ziel, einzelne zur Klonierung der variablen Domänen auszuwählen, charakterisiert.

Der Fokus zur Generierung *P. infestans*-spezifischer Antikörper wurde nach den von Huhn 1 erhaltenen Ergebnissen bei der Immunisierung (3.2) und der ausbleibenden Selektion eines *P. infestans*-spezifischen scFv im Phagendisplay (Daten nicht dargestellt) bewusst auf die Hybridomatechnologie gelegt.

3.3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurden die Milzen von Maus 1 und 2 herangezogen. Es wurde die Hälfte der Milz von Maus 1 und die ganze Milz von Maus 2 verwendet, da es sich bei Maus 2 um das Individuum mit dem höchsten Antikörpertiter handelte. Die andere Milzhälfte der ersten Maus wurde zur Klonierung einer scFv-Genbibliothek für das Phagendisplay eingesetzt (3.5). Die den immunisierten Mäusen entnommenen Milzzellen wurden mit Myelomzellen fusioniert und in HAT-Selektionsmedium kultiviert, wodurch nur die Fusionszellen überlebten (2.2.4.13). Die Ermittlung von Hybridomakulturen, die *P. infestans*-spezifische Antikörper in den Kulturüberstand sezernierten, erfolgte mittels ELISA (2.2.4.8). Hierbei wurde parallel auf Antikörper der Isotypen IgM und IgG getestet.

Im initialen „Screening“ 15 Tage nach der Fusion wurde die Reaktivität der Antikörper-haltigen 1 zu 2 in 1x PBS verdünnten Kulturüberstände (insgesamt 808 Ansätze polyklonaler Hybridomakulturen aus 96-well Kulturplatten) gegenüber Zellwandfragmenten von *P. infestans* getestet. Bei 9,5 % der getesteten Überstände (77 Kavitäten) war nach einer Stunde Substratinkubation eine $E_{405nm} > 1,0$ festzustellen. Diese Daten konnten bei 52

Kulturüberständen mit IgG-spezifischen und bei 25 mit IgM-spezifischen Sekundärantikörpern ermittelt werden. Die polyklonalen Hybridomakulturen dieser Kavitäten wurden anschließend auf Produktion von Antikörpern, die Reaktivität gegenüber gekeimten Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* zeigten, analysiert. Dies erschien sinnvoll, da zum einen die Selektion von Antikörpern, die an native Oberflächenantigene des Pathogens binden, das Ziel war. Zum anderen musste aus Kapazitätsgründen die Anzahl von Hybridomakulturen für die anschließende „limiting dilution“ Klonierung reduziert werden. Es war festzustellen, dass sich beim ELISA zur Untersuchung der Reaktivität der Antikörper-haltigen Kulturüberstände der insgesamt 77 polyklonalen Kulturen gegenüber gekeimten Sporangien die Anzahl polyklonaler Antikörper, die eine E_{405nm} von über 1,0 hervorriefen, auf insgesamt vier IgG und zwölf IgM reduzierte. Nach fünf Selektionsrunden („limiting dilution“ Klonierung) konnten aus diesen 16 polyklonalen Kulturen 20 monoklonale Hybridomazelllinien identifiziert werden, die *P. infestans*-spezifische mAk produzierten. Davon konnten aufgrund der Verwendung IgG- und IgM-spezifischer Nachweisantikörper in den oben dargestellten Versuchen fünf mAk dem Isotyp IgG und 15 dem IgM-Isotyp zugeordnet werden. Da sich bei der anschließenden Untersuchung dieser mAk mittels Immunoblot herausstellte, dass einige mAk identische Proteinbandenmuster der im SDS-PAGE aufgetrennten Zellwandfragmente von *P. infestans* erkannten (3.3.2.2), reduzierte sich die Anzahl der mAk auf drei IgG (mAkPi102.2, 102.4 und 129) und neun IgM (mAkPi9, 32, 34, 76, 82, 86, 88, 107 und 109). Die mAkPi9, 32 und 34 sind auf Maus 1, alle übrigen auf Maus 2 zurückzuführen.

Die insgesamt zwölf mAk wurden im Folgenden charakterisiert (3.3.2), um einige mAk zur Klonierung der korrespondierenden scFv (3.3.3) und deren Fusion mit antifungal wirkenden Peptiden (3.7.1) auswählen zu können. Die Fusionsproteine sollten letztendlich stabil in Kartoffelpflanzen mit dem Ziel, eine Resistenz gegenüber *P. infestans* zu bewirken, exprimiert werden (3.8).

3.3.2 Charakterisierung monoklonaler Antikörper

Die generierten mAk wurden im Folgenden hinsichtlich ihres Isotyps (3.3.2.1), ihrer Reaktivität gegenüber *P. infestans* (3.3.2.3) sowie ihrer Kreuzreaktivität gegenüber anderen Pathogenen charakterisiert (3.3.2.4). Ferner erfolgte eine Immunoblotanalyse (3.3.2.2) sowie die Lokalisierung der Antikörper-Antigen-Bindung (3.3.2.5) und ein Inhibitionsversuch (3.3.2.7). Vielversprechende mAk wurden zur Langzeitlagerung bei -180 °C konserviert.

Da einige Hybridomazelllinien die Produktion des mAk nach einiger Zeit eingestellt hatten, standen diese nicht für alle Versuche zur Verfügung.

3.3.2.1 Isotypisierung

Die Ermittlung der Antikörperisotypen erfolgte im ELISA (2.2.4.8) und Immunoblot (2.2.4.7) unter Verwendung IgG, IgM, kappa bzw. lambda spezifischer Nachweisantikörper. Die Bestimmung der IgG-Subtypen wurde durch Auswertung der während der Klonierung korrespondierender scFv Fragmente (3.3.3) erhaltenen Sequenzdaten des konstanten Bereichs vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Isotypisierung *P. infestans*-spezifischer monoklonaler Antikörper

Zur Bestimmung des Isotyps der schweren Antikörperkette wurden ELISA Platten mit GAM Fab (1 : 2000) sowie zur Detektion von lambda leichten Ketten mit RAM^{AP} λ (1 : 2000) beschichtet und mit Kulturüberständen monoklonaler Antikörper inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mittels GAM^{HRP} Fc (1 : 10000) oder GAM^{HRP} IgM (1 : 5000) mit anschließender Visualisierung durch ABTS (2.2.4.8). Die erhaltenen Daten wurden durch Analyse im Immunoblot verifiziert. Dazu wurden Kulturüberstände (20 µl) der monoklonalen Antikörper im 12 %-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.4.5) und auf Nitrozellulose transferiert (2.2.4.7). Der Nachweis von IgG erfolgte mittels GAM^{AP} Fc (1 : 5000), der von IgM mittels GAM^{HRP} IgM (1 : 5000), der von kappa leichten Ketten mittels GAM^{AP} H+L (1 : 5000) und der von lambda leichten Ketten mittels RAM λ (1 : 5000) und RAR^{AP} (1 : 5000). Die Visualisierung AP-konjugierter Sekundärantikörper erfolgte durch Inkubation mit NBT/BCIP, die HRP-konjugierter durch Inkubation mit 4-Chloro-1-Naphthol. Die Ermittlung der IgG-Subtypen erfolgte durch Auswertung der während der Klonierung korrespondierender scFv erhaltenen Sequenzdaten (3.3.3). Ak: Antikörper.

Antikörper	Schwere Ak-Kette	Leichte Ak-Kette	Ursprungsindividuum
mAkPi9	IgM	kappa	Maus 1
mAkPi32	IgM	kappa	Maus 1
mAkPi34	IgM	kappa	Maus 1
mAkPi76	IgM	lambda	Maus 2
mAkPi82	IgM	kappa	Maus 2
mAkPi86	IgM	lambda	Maus 2
mAkPi88	IgM	kappa	Maus 2
mAkPi102.2	IgG ₁	lambda	Maus 2
mAkPi102.4	IgG ₁	kappa	Maus 2
mAkPi107	IgM	lambda	Maus 2
mAkPi109	IgM	kappa	Maus 2
mAkPi129	IgG ₁	kappa	Maus 2

Es konnten insgesamt drei IgG und neun IgM selektiert werden. In der Gesamtheit aller generierten mAk wiesen sowohl die vom Isotyp IgG als auch solche des IgM-Isotyps zu einem Drittel lambda leichte Ketten auf. Nach Zuordnung der mAk zum Ursprungsindividuum war festzustellen, dass alle drei aus Maus 1 stammenden IgM-Antikörper kappa leichte Ketten besaßen. Im Gegensatz dazu waren bei 50 % der von

Maus 2 hergestellten IgM und bei 33 % der IgG lambda leichte Ketten nachweisbar. Für die Gesamtverteilung bezüglich Maus 2 bedeutete dies einen Anteil von 44 % lambda leichten Ketten.

3.3.2.2 Immunoblotanalyse

Zur Untersuchung der mAk auf ihre jeweilige Antigenspezifität sowie zur Eingrenzung der Anzahl dieser für die weitere Charakterisierung erfolgte eine Analyse mittels Immunoblot (2.2.4.7). Dazu wurden Zellwandfragmente von *P. infestans* (2.2.3.2) im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.4.5) und nach deren Transfer auf Nitrozellulose mit Kulturüberständen der selektierten Hybridomazelllinien (3.3.1) inkubiert. Die Detektion gebundener mAk erfolgte mit IgG- bzw. IgM-spezifischen Sekundärantikörpern.

Die Analyse der von den 20 selektierten monoklonalen Hybridomazelllinien sezernierten mAk im Immunoblot zeigte, dass mit Ausnahme von mAkPi102.2 und mAkPi102.4 jeweils alle ausgehend von einer polyklonalen Hybridomenursprungskultur vereinzelter Hybridomazelllinien mAk produzierten, die ein identisches Proteinbandenmuster von *P. infestans* erkannten (3.3.1, Daten nicht dargestellt). Deshalb reduzierte sich die Anzahl der weiter zu untersuchenden mAk auf insgesamt zwölf (mAkPi9, 32, 34, 76, 82, 86, 88, 107, 109, 102.2, 102.4, 129) deren Ergebnis der Immunoblotanalyse in Abbildung 4 dargestellt ist. Des Weiteren war festzustellen, dass sich die mit mAkPi86 und mAkPi102.2 nachgewiesenen Bandenmuster stark ähnelten, obwohl es sich um Antikörper verschiedener Isotypen handelte. Die mAkPi86, 102.2 und 129 erkannten das gesamte im SDS-PAGE zu sehende Bandenspektrum der Zellwandfragmentpräparation. Durch mAkPi76 und mAkPi88 konnte der höher molekulare Bereich ab etwa 45 kDa detektiert werden. Der mAkPi32 wies auch Affinität zu etwa dem gleichen Spektrum auf, zeigte aber wie mAkPi102.4 eine sich durch die Signalintensität von den anderen deutlich abhebende Bande bei etwa 170 kDa. Der mAkPi9 wies bei etwa 170 kDa nur ein schwaches Signal auf. Bei mAkPi107 war oberhalb von 170 kDa eine verschwommene Bande festzustellen und für mAkPi82 und mAkPi109 war im Trennbereich des SDS-Gels kein Signal detektierbar (Abbildung 4).

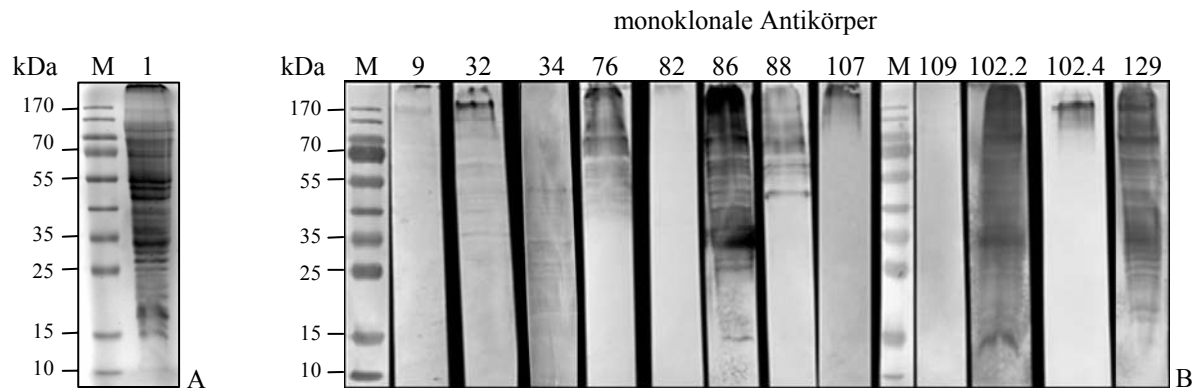


Abbildung 4: SDS-PAGE von *P. infestans* Zellwandfragmenten (A) und Immunoblotanalyse *P. infestans*-spezifischer monoklonaler Antikörper (B)

Zellwandfragmente von *P. infestans* (200 µg TG) (2.2.3.2) wurden im 12 %-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.4.5) (A), auf Nitrozellulose transferiert (2.2.4.7) und mit 1 ml Kulturüberstand der selektierten monoklonalen Hybridomazelllinien inkubiert. Der Nachweis gebundener monoklonaler Antikörper erfolgte mittels GAM^{AP} Fc (1 : 5000) bzw. GAM^{HRP} IgM (1 : 5000) mit anschließender Visualisierung durch NBT/BCIP bzw. 4-Chloro-1-Naphthol (B). M: Prestained Protein Marker (Fermentas), 1: *P. infestans* Zellwandfragmente (200 µg TG).

3.3.2.3 Reaktivität der monoklonalen Antikörper gegenüber *Phytophthora infestans*

Die Reaktivität der mAkPi32, 76, 82, 86, 88, 107, 109, 102.2, 102.4 und 129 gegenüber Zellwandfragmenten, gekeimten Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* sowie V8-Medium und Kartoffelblattextrakt wurde im ELISA bestimmt (2.2.4.8). Die mAkPi9 und 34 standen für diese Untersuchung nicht zur Verfügung, da die entsprechenden Hybridomakulturen die Produktion dieser mAk eingestellt hatten. Die Konzentrationsbestimmung der mAk erfolgte mittels ELISA (2.2.4.8) bzw. mittels Oberflächen Plasmon Resonanz (SPR) für mAkPi102.2 (2.2.4.9), da kein Standardantikörper zur Bestimmung der Konzentration von mAkPi102.2 mittels ELISA zur Verfügung stand. Kartoffelblattextrakt wurde durch Mörsern der Blätter in flüssigem Stickstoff mit anschließender Zentrifugation hergestellt. Der Überstand wurde 1 zu 20 verdünnt im ELISA eingesetzt.

Da IgG monomer und IgM als Pentamere vorliegen, ist ein direkter Vergleich der Reaktivität dieser Antikörperisotypen gegenüber *P. infestans* nicht möglich. Generell zeigten die mAkPi76, 86, 88, 107 und 102.2 die größte Reaktivität gegenüber *P. infestans*. Dabei wies mAkPi86 im IgM-Vergleich bzw. mAkPi102.2 im Vergleich der IgG die stärkste Reaktivität gegenüber Zellwandfragmenten und gekeimten Sporangien auf. Für mAkPi32, 82, 109, 102.4 und 129 war bei der eingesetzten Antikörperkonzentration von 0,2 µg/ml keine bzw. keine nennenswerte Reaktivität mit allen getesteten Antigenen zu verzeichnen. Für mAkPi107 war zwar Reaktivität gegenüber Zellwandfragmenten von *P. infestans*, nicht aber gegenüber

gekeimten Sporangien detektierbar. Als einziger der getesteten monoklonalen Antikörper zeigte mAkPi76 Kreuzreaktivität mit Kartoffelblattextrakt (Abbildung 5). Die Ergebnisse konnte für alle mAk in einem weiteren Versuch bestätigt werden (Daten nicht dargestellt). Dabei konnte für den mAkPi76 zum einen zusätzlich eine Affinität zu V8-Medium nachgewiesen werden. Zum anderen lagen die Extinktionswerte nach einer Stunde Substratinkubation mit 0,71 gegenüber V8-Medium und 0,54 gegenüber Kartoffelblattextrakt bei etwa dem sechs- bzw. vierfachen Hintergrundsignal.

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse, die eine vergleichsweise hohe Reaktivität der mAkPi86 und 102.2 gegenüber gekeimten Sporangien von *P. infestans* sowie keine Kreuzreaktivität mit Kartoffelblattextrakt und V8-Medium dokumentieren, wurden diese mAk bei den nachfolgenden Analysen besonders beachtet.

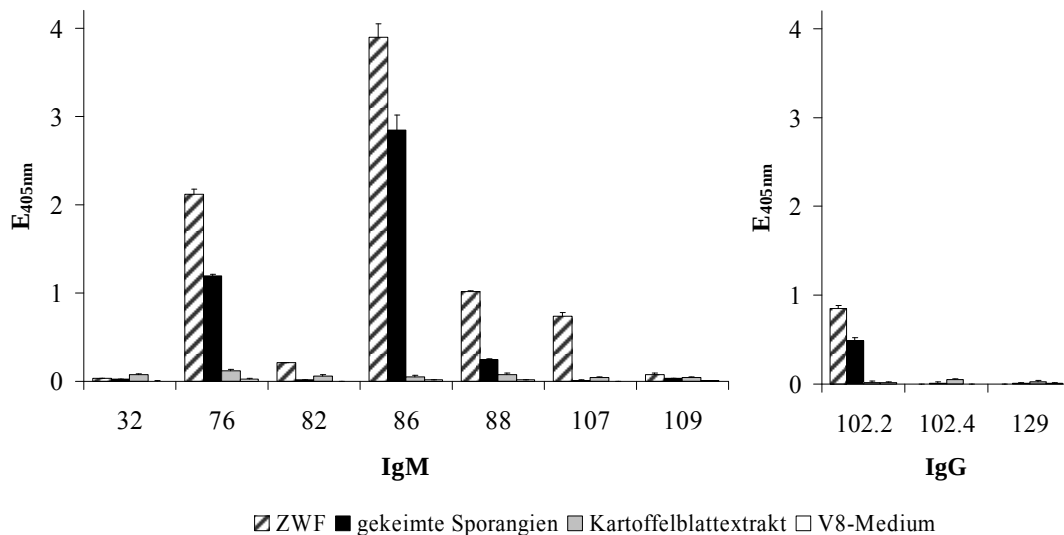


Abbildung 5: Reaktivität monoklonaler Antikörper gegenüber Zellwandfragmenten und gekeimten Sporangien von *P. infestans* sowie V8-Medium und Kartoffelblattextrakt

ELISA Platten wurden mit Zellwandfragmenten (200 µg/ml TG) von *P. infestans* (2.2.3.2), gekeimten Sporangien (3000 /ml) von *P. infestans* (2.2.3.3), V8-Medium (unverdünnt) bzw. Kartoffelblattextrakt (1 : 20) beschichtet und mit monoklonalen Antikörpern (0,2 µg/ml) inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit GAM^{HRP} Fc (1 : 10000) bzw. GAM^{HRP} IgM (1 : 5000). Daten wurden nach 1 h Substratinkubation (ABTS) bei E_{405nm} ermittelt (2.2.4.8). Dargestellt sind die Mittelwerte eines Experiments mit drei Wiederholungen. ZWF: Zellwandfragmente.

3.3.2.4 Kreuzreaktivitätstest

Zur Untersuchung der Pathogenspezifität der mAk erfolgte eine Analyse auf Kreuzreaktivität gegenüber Pathogenen aus den Klassen der Ascomyceten, Basidiomyceten und Oomyceten. Dazu wurden von allen Pathogenen Zellwandpräparationen angefertigt (2.2.3.2, 3.1) und zur Analyse im ELISA (2.2.4.8) und Immunoblot (2.2.4.7) verwendet. Die

Untersuchung im ELISA zeigte, dass mAkPi86 und mAkPi102.2 bei der hier verwendeten Auswahl an Pathogenen Oomyceten-spezifisch sind. Im Gegensatz dazu binden mAkPi76, 88, 107 und 109 auch an Epitope anderer Pathogene. Bei mAkPi82 konnte nur Reaktivität gegenüber *P. infestans* und *P. cinnamomi* nachgewiesen werden. Für mAkPi109 und mAkPi129 war gegenüber *P. infestans* geringere Reaktivität feststellbar als gegenüber anderen Oomyceten (Tabelle 19).

Tabelle 19: Kreuzreaktivität monoklonaler Antikörper gegenüber Pathogenen der Ascomyceten, Basidiomyceten und Oomyceten

ELISA Platten wurden mit Zellwandfragmenten (200 µg/ml TG) (2.2.3.2) beschichtet und mit monoklonalen Antikörpern (0,125 µg/ml) inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch GAM^{HRP} Fc bzw. GAM^{HRP} IgM (1 : 5000). Die Extinktion wurde bei 405 nm nach einer Stunde Substratinkubation gemessen (ABTS) (2.2.4.8).

-: E_{405nm} < 0,19; o: E_{405nm} 0,20 – 0,49; +: E_{405nm} 0,50 – 1,49; ++: E_{405nm} 1,50 – 2,99; +++: E_{405nm} >3,00

Pathogen	monoklonale Antikörper								
	76	82	86	88	107	109	102.2	102.4	129
<i>P. infestans</i>	+++	++	+++	+	+++	-	+++	-	-
<i>P. cinnamomi</i>	++	+	+++	++	++	+	+++	-	+
<i>P. nicotianae</i>	++	-	+++	++	+	+	+++	-	+
<i>P. ultimum</i>	++	-	+++	+	o	+	+++	-	-
<i>A. alternata</i>	o	-	-	-	++	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. strictum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. cinerea</i>	-	-	-	-	++	-	-	-	-
<i>C. cladosporioides</i>	-	-	-	o	+	-	-	-	-
<i>C. destructans</i>	-	-	-	+	o	-	-	-	-
<i>F. culmorum</i>	+++	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>P. glomerata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. hirsutum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>T. viride</i>	-	-	-	o	-	o	-	-	-
<i>V. dahliae</i>	-	-	-	++	+	+	-	-	-
<i>R. solani</i>	o	-	-	-	-	-	-	-	-

Die beiden mAkPi86 und 102.2 zeigten im Spektrum der eingesetzten mAk größte *P. infestans* Spezifität bei gleichzeitig hoher Affinität. Deshalb wurden diese zur Analyse im Immunoblot herangezogen. Zellwandfragmente verschiedener Pathogene wurden im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.4.5) und auf Nitrozellulose transferiert (2.2.4.7). Die Membran wurde mit den mAkPi86 und 102.2 inkubiert und gebundene Antikörper mit AP-gekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen (Abbildung 6). Die ELISA-Daten wurden durch die Analyse mittels Immunoblot insofern bestätigt, dass mit mAkPi86 und mAkPi102.2 Banden in den Zellwandpräparationen aller getesteten Oomyceten detektiert werden konnten. Ferner unterstreichen die Ergebnisse des ELISAs und des

Immunoblots die Vermutung, dass es sich bei mAkPi86 und mAkPi102.2 um Antikörper mit ähnlicher Sequenz der variablen Antikörperdomänen handeln könnte, die das gleiche Epitop erkennen.

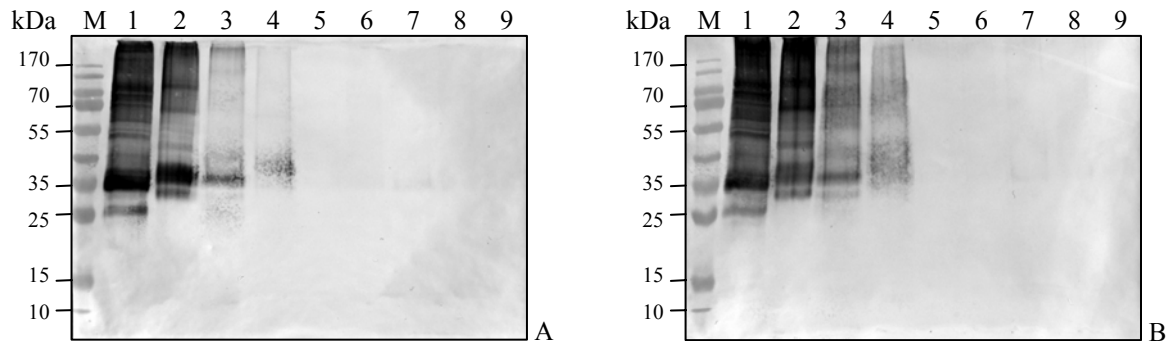


Abbildung 6: Immunoblotanalyse von mAkPi86 (A) und mAkPi102.2 (B) gegen Zellwandfragmente verschiedener Pathogene

Zellwandfragmente (200 µg/ml TG) (2.2.3.2) wurden im 12 %-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.4.5) und auf Nitrozellulose transferiert (2.2.4.7). Die Inkubation der Membran erfolgte mit 1 ml Hybridomenkulturüberstand des mAkPi86 (A) bzw. mAkPi102.2 (B). Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit GAM^{AP} Fc bzw. GAM^{HRP} IgM und RAG^{AP} Fc (1 : 5000) mit anschließender Visualisierung durch NBT / BCIP. M: Prestained Protein Marker (Fermentas), 1: *P. infestans*; 2: *P. cinnamomi*; 3: *P. nicotianae*; 4: *P. ultimum*; 5: *A. alternata*; 6: *B. cinerea*; 7: *F. culmorum*; 8: *P. hirsutum*; 9: *R. solani*.

3.3.2.5 Immunofluoreszenzmikroskopie

Zur Verifizierung der Antikörperbindung an native Antigene gekeimter Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* sowie zur Lokalisierung des Antikörper-Antigen-Komplexes erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (2.2.4.9). Dazu wurden die gekeimten Sporangien an Deckgläsern immobilisiert, mit den mAkPi76, 86, 88, 107, 109, 102.2, 102.4 und 129 inkubiert und mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit den mAkPi9, 32, 34 und 82 wurden nicht durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden anstelle der mAk die Antikörper MAH Fc und IgM κ eingesetzt. Hier konnte, wie bei den mAkPi102.4 und 109 kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Daten nicht dargestellt). Bei mAkPi76, 86, 107, 102.2 und 129 konnte Fluoreszenz auf der Oberfläche der Sporangien, des Keimschlauches sowie des Appressoriums detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte die Bindung von mAkPi88 an einzelne unregelmäßig in oder an der Zellwand lokalisierte Strukturen nachgewiesen werden (Abbildung 7).

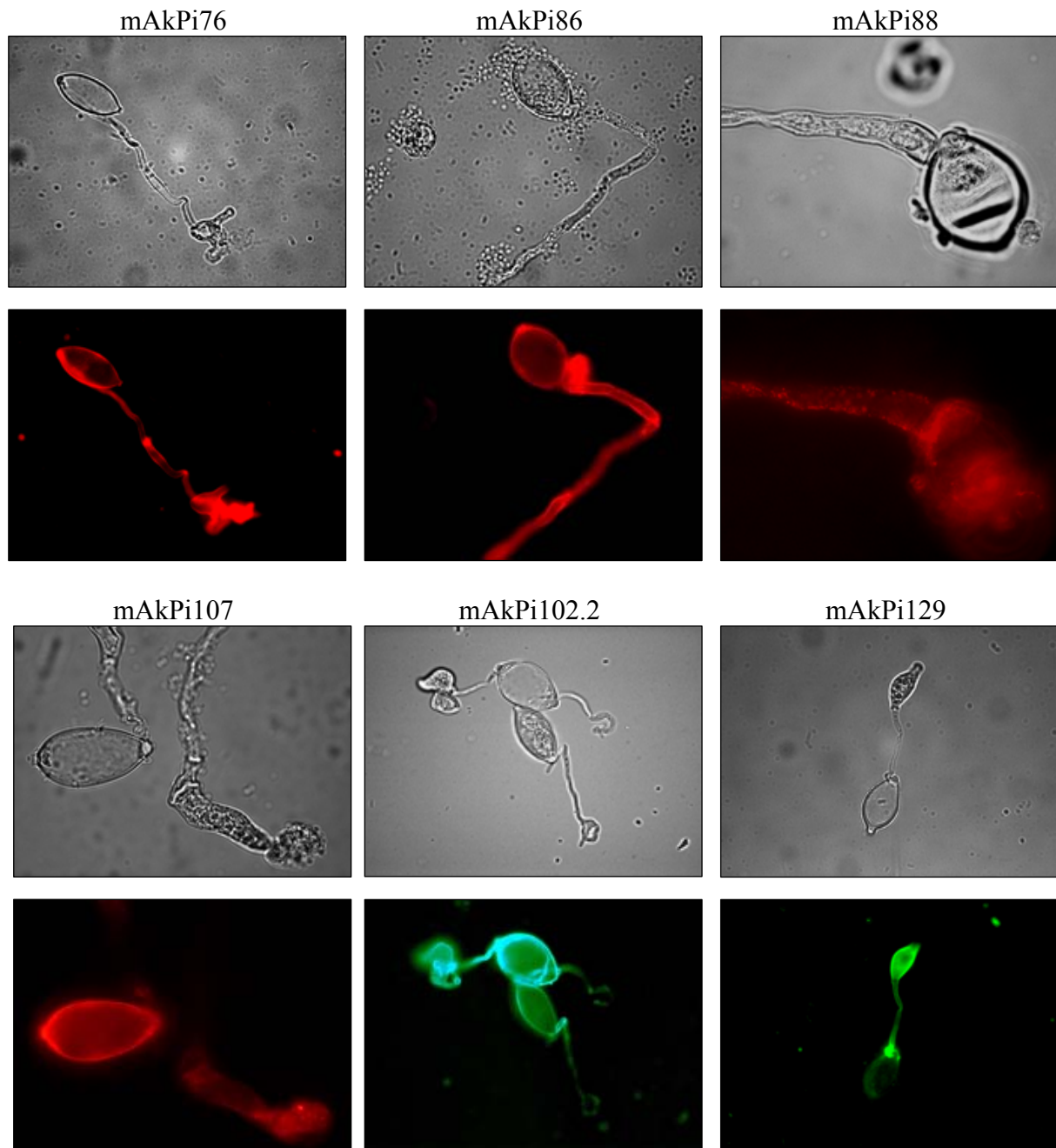


Abbildung 7: Immunofluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Bindung monoklonaler Antikörper an gekeimte Sporangien von *P. infestans*

Gekeimte Sporangien von *P. infestans* (2.2.3.3) wurden an mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern immobilisiert und mit monoklonalen Antikörpern inkubiert (0,2 ml Kulturüberstand). Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit GAM^{FITC} H+L bzw. GAM^{Alexa} IgM (1 : 500). Die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Reihen 2 und 4) (2.2.4.9). Lichtmikroskopische Aufnahmen sind vergleichend darüber gestellt (Reihen 1 und 3). Negativkontrollen wurden mit MAH Fc und IgM κ durchgeführt. Hier konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Daten nicht dargestellt).

Die Kombination aller zur Charakterisierung der mAk erhaltenen Daten ließen die beiden mAkPi86 und 102.2 als die zur Zielerreichung geeignetesten mAk erscheinen. Die Bindung beider mAk konnte an der gesamten Oberfläche des gekeimten Pathogens detektiert werden (3.3.2.5). Darüber hinaus erwiesen sich die mAkPi86 und 102.2 im Rahmen der getesteten Organismen als Oomyceten-spezifisch (3.3.2.4). Ferner zeigte mAkPi86 im Vergleich mit den anderen IgM (mAkPi32, 76, 82, 88, 107 und 109) und mAkPi102.2 im Vergleich mit den anderen IgG (mAkPi102.4 und mAkPi129) im ELISA die höchste Reaktivität gegenüber *P. infestans* Antigenen (3.3.2.3). Auffallend war, dass für die mAkPi86 und 102.2 identische Ergebnisse erzielt werden konnten. So weisen beide mAk eine lambda leichte Antikörperkette auf, obwohl die schwere Antikörperkette unterschiedlichen Isotyps ist (3.3.2.1). Zudem war Kreuzreaktivität zu den gleichen Organismen (3.3.2.4) und bei den Immunoblotanalysen konnte mit beiden mAk das gleiche Bandenspektrum detektiert werden (3.3.2.2, 3.3.2.4). Ob die variablen Domänen der mAkPi86 und 102.2 eine ähnliche Sequenz aufweisen sollte durch Klonierung und Sequenzierung der korrespondierenden scFv geklärt werden (3.3.3, 3.6.1). Weiterhin sollte untersucht werden, ob der mAkPi102.2 einen inhibitorischen Effekt auf die Infektiosität von *P. infestans* hat (3.3.2.7).

Da der mAkPi88 der einzige mAk war, der bei der immunofluoreszenzmikroskopischen Untersuchung offensichtlich ein anderes Antigen erkannte, welches auch an der gesamten Oberfläche der gekeimten Sporangien von *P. infestans* detektiert werden konnte (3.3.2.5), wurde auch dieser mAk zur Klonierung der variablen Antikörperdomänen herangezogen (3.3.3).

3.3.2.6 Stabilität des monoklonalen Antikörpers mAkPi102.2

Der mAkPi88 war zwar aufgrund der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung durchaus interessant, da dieser im Gegensatz zu der mAkPi76, 86, 107, 102.2 und 129 nicht gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche des gekeimten Pathogens, sondern nur an in oder an der Zellwand von Keimschlauch und Sporangium unregelmäßig vorkommenden Strukturen detektiert werden konnte (3.3.2.5). Jedoch erwies sich der mAkPi88 schon bei niedrigen Temperaturen als sehr instabil. Nach wenigen Tagen Lagerung bei 4 °C konnte im ELISA (2.2.4.8) keine Reaktivität dieses Antikörpers gegenüber Zellwandfragmenten von *P. infestans* nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden mit mAkPi88 keine *in vitro* Inhibitionsversuche durchgeführt.

Die Stabilität von mAkPi102.2 in verdünntem Kartoffelblattextrakt wurde untersucht. Der nach Mörsern von Kartoffelblättern in flüssigem Stickstoff und Zentrifugation der zerkleinerten Blätter gewonnene Überstand (Kartoffelblattextrakt) wurde 1 zu 20 mit 1x PBS verdünnt. Der Antikörper-haltige Hybridomenkulturüberstand wurde 1 zu 1000 in diesem Extrakt verdünnt eine Woche bei Raumtemperatur gelagert. Die zu verschiedenen Zeitpunkten gezogenen Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Reaktivität des mAk gegenüber Zellwandfragmenten von *P. infestans* erfolgte mit allen Proben gleichzeitig mittels ELISA (2.2.4.8). Die Reaktivität des mAk zum Zeitpunkt Null wurde gleich 100 % gesetzt. Der mAkPi102.2 erwies sich über einen Zeitraum von vier Tagen mit einem durchschnittlichen Reaktivitätsverlust von 20 % als recht stabil. Nach insgesamt sieben Tagen war nur noch eine Reaktivität von 50 % festzustellen (Tabelle 20). Folglich war dieser Antikörper in *in vitro* Inhibitionsversuchen einsetzbar (3.3.2.7).

Tabelle 20: Stabilität des mAkPi102.2 in Kartoffelblattextrakt bei RT

Die Reaktivität des 1 : 1000 in Kartoffelblattextrakt (1 : 20 in 1x PBS) bei RT inkubierten mAkPi102.2 gegen *P. infestans* Zellwandfragmente (200 µg/ml TG) (2.2.3.2) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten im ELISA (2.2.4.8) bestimmt. Die Reaktivität zum Zeitpunkt Null wurde gleich 100 % gesetzt. Der Nachweis gebundener monoklonaler Antikörper erfolgte mit GAM^{HRP} Fc (1 : 10000). Die Extinktion wurde nach einer Stunde Substratinkubation (ABTS) bei 405 nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen biologischen Wiederholungen mit je drei Replikaten.

Inkubationsdauer (h)	0	8	24	48	96	168
Reaktivität (%)	100	90,8 +/- 4,5	85,8 +/- 2,9	84,2 +/- 4,5	80,0 +/- 10,0	46,5 +/- 7,2

3.3.2.7 Inhibitionsversuche

Da sich der mAkPi102.2 im Verlauf der Charakterisierung aufgrund seiner vergleichsweise hohen Reaktivität gegenüber gekeimten Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* (3.3.2.3) sowie seiner Spezifität für Oomyceten und nicht vorhandener Kreuzreaktivität gegenüber den getesteten Vertretern der Asco- und Basidiomyceten (3.3.2.4) als besonders interessant erwies, sollte untersucht werden, ob der mAkPi102.2 eine Inhibierung von *P. infestans* bewirkt. Dazu wurde die den mAkPi102.2 produzierende Hybridomazelllinie in serumfreiem Medium kultiviert und der Antikörper aus dem Kulturüberstand gereinigt. Der gereinigte Antikörper wurde in unterschiedlichen Konzentrationen mit Sporangien von *P. infestans*

inkubiert. Anschließend wurde die Antikörper-haltige Sporangienlösung auf Kartoffelscheiben gegeben und für zehn Tage bei 16 °C im Dunkeln inkubiert.

Die mAkPi102.2 produzierende Hybridomazelllinie wurde an serumfreies Medium adaptiert. Die Reinigung des Antikörpers aus 10 ml Kulturüberstand erfolgte unter Verwendung von MEP HyperCell (Pall). Zur Elution wurde ein pH-Stufengradient von pH 6,0 bis pH 2,5 verwendet (2.2.4.3). Festzustellen war, dass der gebundene Antikörper bei einem pH-Wert von 4,2 bis 5,5 von der Matrix gelöst werden konnte. Die Überprüfung der Qualität der Reinigung sowie die Konzentrationsbestimmung erfolgten mittels SDS-PAA-Gelelektrophorese (2.2.4.5). Im SDS-PAGE waren nur die schwere und leichte Antikörperkette nachweisbar, Verunreinigungen konnten nicht detektiert werden (Abbildung 8). Des Weiteren bestätigte der Einsatz des Antikörpers im ELISA dessen Funktionalität (2.2.4.8). Dazu wurden gekeimte Sporangien von *P. infestans* an ELISA Platten adsorbiert und mit einer seriellen Verdünnungsreihe des Antikörpers inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit GAM^{HRP} Fc mit anschließender Visualisierung mittels ABTS. Aus den ELISA-Daten konnte geschlossen werden, dass bei etwa 0,5 µg/ml des Antikörpers alle Bindungsstellen der eingesetzten gekeimten Sporangien (1500 /ml) abgesättigt waren. Erstaunlich war jedoch, dass ab einer Konzentration von 0,5 µg/ml die gemessene Extinktion etwas sank (Abbildung 8). Dies konnte in einem weiteren Versuch bestätigt werden.

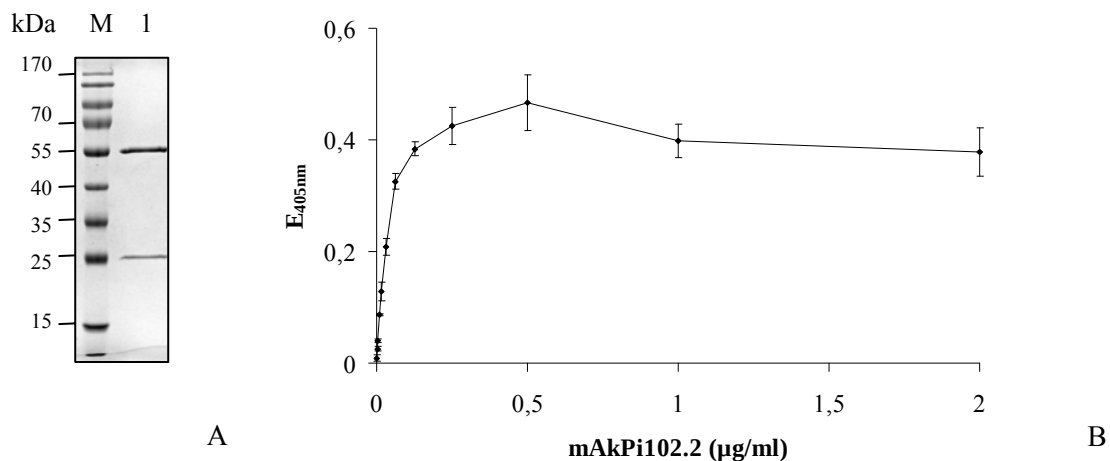


Abbildung 8: SDS-PAGE (A) und ELISA (B) mit gereinigtem mAkPi102.2

Der mAkPi102.2 wurde aus Kulturüberstand der in serumfreien Medium kultivierten Hybridomazelllinie mittels MEP HyperCell (Pall) gereinigt (2.2.4.3), bei pH 4,2 bis 5,5 von der Matrix eluiert und gegen 1x PBS (pH 7,4) dialysiert (2.2.4.4). Die Elutionsfraktion (10 µl) wurde im 12 %-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.4.5) (A). Zur Überprüfung der Funktionalität des mAkPi102.2 wurden ELISA Platten mit Sporangien (1500 /ml) (2.2.3.3) beschichtet und mit einer seriellen Verdünnungsreihe des gereinigten Antikörpers inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mittels GAM^{HRP} Fc. Daten wurden bei 405 nm nach einer Stunde Substratinkubation (ABTS) ermittelt (2.2.4.8). Dargestellt sind die Mittelwerte eines Experiments mit drei Wiederholungen (B). M: Prestained Protein Marker (Fermentas); 1: 10 µl Elutionsfraktion mAkPi102.2.

Um festzustellen, ob mAkPi102.2 einen Effekt auf die Infektiosität des Erregers hat, wurden Sporangien von *P. infestans* (1500 /ml) (2.2.3.3, 3.1) mit verschiedenen Konzentrationen des gereinigten Antikörpers (80, 40, 20 und 10 µg/ml) inkubiert und anschließend jeweils 20 µl zur Inokulation von Kartoffelscheiben verwendet. Zur Kontrolle wurde die gleiche Versuchsreihe zum einen mit äquivalenten Volumina 1x PBS und zum anderen mit gleichen Konzentrationen eines nicht *P. infestans*-spezifischen mAk (mAk54), der in gleicher Weise kultiviert und gereinigt worden war, durchgeführt. Bei der Auswertung zehn Tage nach der Inokulation war kein Unterschied zwischen den Kontrollen und den mit mAkPi102.2 behandelten Kartoffelscheiben zu sehen. Daraus folgt, dass mAkPi102.2 keine Inhibierung des Pathogens bewirkt. Aus diesem Grund sollte der nach Klonierung der variablen Antikörperdomänen des mAkPi102.2 resultierende scFvPi102.2 (3.3.3) an verschiedene antifungal wirkende Peptide, die einen inhibitorischen Effekt auf *P. infestans* haben, fusioniert werden (3.7.1).

3.3.3 Klonierung der korrespondierenden scFvs

Die mAkPi86, 88, 102.2, 102.4, 129 wurden zur Klonierung der korrespondierenden scFv Fragmente ausgewählt. Zu diesem Zeitpunkt lagen lediglich die Ergebnisse der Isotypisierung (3.3.2.1) und der Immunoblotanalyse (3.3.2.2) vor. Nach Abschluss der Charakterisierung der mAk war ersichtlich, dass die Klonierung der variablen Antikörperdomänen der mAkPi102.4 und 129 vor allem aufgrund der vergleichsweise geringen Reaktivität dieser mAk gegenüber *P. infestans* (3.3.2.3, 3.3.2.5) nicht notwendig gewesen wäre. Hingegen erwiesen sich die mAkPi86 und 102.2 wie unter 3.3.2.5 zusammengefasst als die zur Zielerreichung geeignetesten mAk. Der mAkPi88 war aufgrund der bei der immunofluoreszenzmikroskopischen Untersuchung detektierten offensichtlich im Vergleich zu den anderen mAk anderen Lokalisierung der Antikörper-Antigen-Bindung auf der gesamten Oberfläche des gekeimten Pathogens interessant (3.3.2.5).

Die Klonierungsstrategie ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt. Die die mAk produzierenden Hybridomazellen wurden zur Isolierung von Gesamt-RNS herangezogen (2.2.2.8). Nach Inkubation mit DNase erfolgte die Generierung von Einzelstrang-cDNS (2.2.2.10), die nach Entfernung der RNS durch RNase-Verdau an das Oligonukleotid „AS-linker“ ligiert wurde (2.2.2.11). Der gereinigte Ligationsansatz wurde in zwei getrennten PCR-Reaktionen zur Amplifizierung der schweren und leichten Antikörperkette verwendet (2.2.2.12.1). Die PCR-Reaktionsansätze wurden im Agarosegel aufgetrennt (2.2.2.7) und die

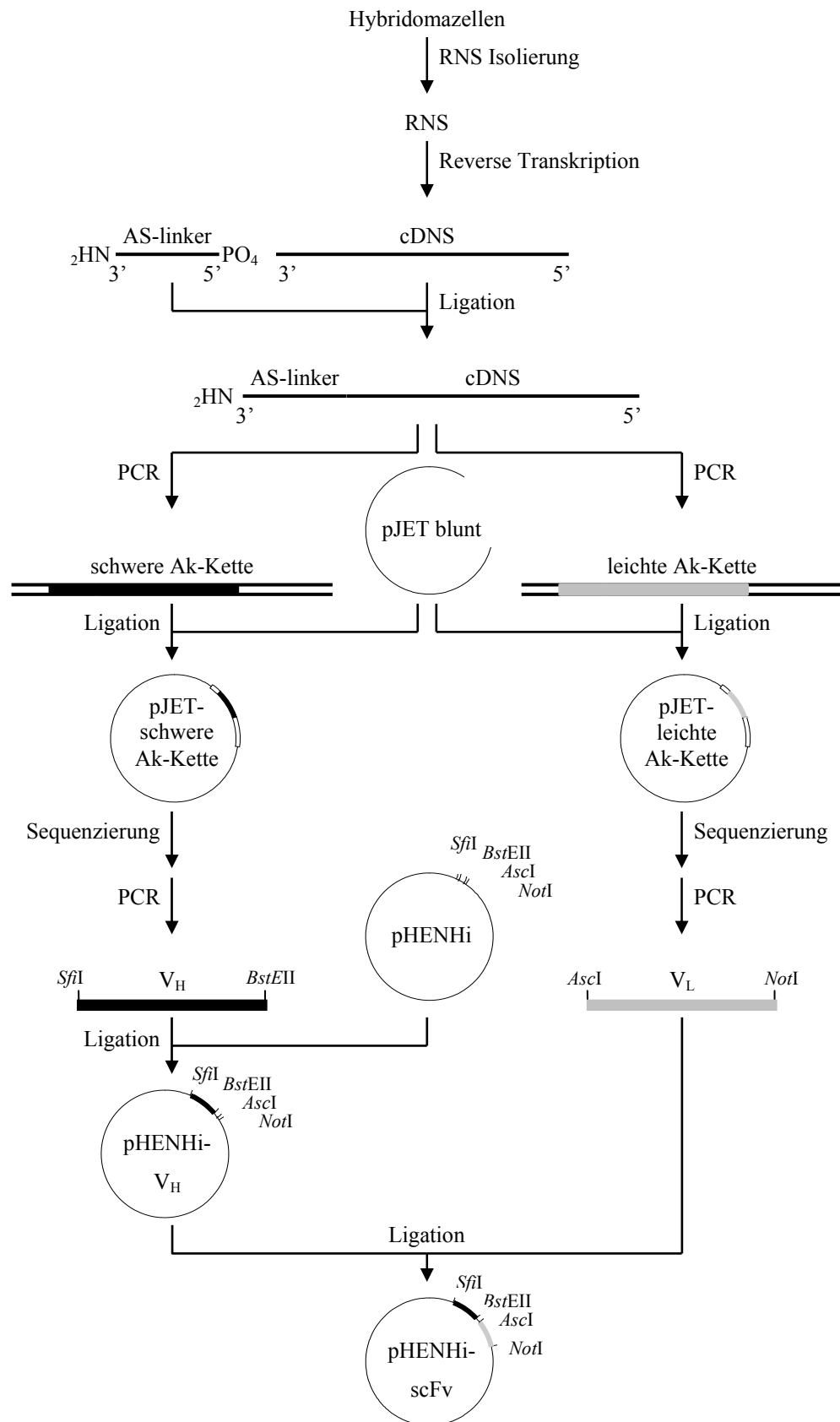


Abbildung 9: Schematische Übersicht der Klonierungsstrategie der variablen Domänen monoklonaler Antikörper

Amplifizierungsprodukte nach Isolierung aus dem Gel „blunt-end“ in den pJET-Vektor kloniert (2.1.7). Nach Überprüfung der Sequenzen (2.2.2.13) erfolgte die Amplifizierung der V_H- und V_L-Antikörperfragmente (2.2.2.12.1). Die V_H-Antikörperfragmente wurden mit *Sfi*I und *Bst*EII geschnitten (2.2.2.2) und nach Gelextraktion in den mit den gleichen Enzymen restringierten pHENHi-Vektor kloniert (2.1.7, 2.2.2.5). Die V_L-Antikörperfragmente wurden nach deren Verdau mit *Asc*I und *Not*I in die entsprechenden pHENHi-V_H Vektoren ligiert (2.2.2.5). Die zur Amplifizierung verwendeten Oligonukleotide sind der Tabelle 30 im Anhang zu entnehmen.

Die so in den pHENHi-Vektor klonierten scFvPi86, 88, 102.2, 102.4 und 129 wurden sequenziert (3.6.1) und auf ihre Reaktivität gegenüber *P. infestans* mittels ELISA untersucht (3.6.3). Die scFvPi86, 88, 102.2 und 129 wurden mit antifungalen Peptiden verknüpft (3.7.1), charakterisiert (3.7) und anschließend zur Herstellung transgener Kartoffelpflanzen verwendet (3.8), um eine Resistenz der Pflanzen gegenüber *P. infestans* hervorzurufen.

3.4 Herstellung von scFv-Bibliotheken

3.4.1 RNS-Isolierung und cDNS-Synthese

Aus Milzzellen der mit Zellwandfragmenten von *P. infestans* (3.1) immunisierten Hühner und Mäuse (3.2) wurde Gesamt-RNS isoliert (2.2.2.9). Reinheit und Konzentration wurden photometrisch bestimmt, wonach die Ausbeute 1,2 mg aviane bzw. 0,45 mg murine Gesamt-RNS je 100 mg Milz betrug. Ein Teil der aus der Hühnermilz gereinigten Gesamt-RNS wurde zur Isolierung von Poly(A)⁺-mRNS verwendet (2.2.2.9). Die Qualität der isolierten Gesamt-RNS wurde nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel beurteilt (2.2.2.7). Es sind zwei distinkte Banden der 28 S und 18 S RNS sowie ein Schmier, der die mRNS unterschiedlicher Länge repräsentiert, zu sehen (Abbildung 10).



Abbildung 10: Analyse der aus immunisierten Tieren isolierten avianen (A) und murinen (B) Gesamt-RNS

Die aus Milzzellen von Huhn 2 (A) und Maus 1 (B) isolierte Gesamt-RNS (2.2.2.9) wurde im 1 %-igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt (2.2.2.7). 1: 1 μ l aviane Gesamt-RNS; 2: 2,5 μ l murine Gesamt-RNS.

Für die cDNS-Synthese wurden je Ansatz 4 μ g aviane oder murine Gesamt-RNS bzw. 300 ng aviane mRNA eingesetzt (2.2.2.10). Die einzelnen Reaktionen wurden entweder mit genspezifischen oder oligo-dT Primern versetzt. Zur Transkription der RNS mit avianem Ursprung wurde jeweils ein genspezifischer Primer für die schwere und leichte Antikörperkette verwendet (Tabelle 32). Die cDNS-Synthese von muriner RNS wurde mit Oligonukleotiden durchgeführt, die jeweils spezifisch an den konstanten Bereich der IgG schweren Kette bzw. der kappa und lambda leichten Kette hybridisieren (Tabelle 33).

Die Amplifizierung der variablen Antikörperdomänen (2.2.2.12.2) erfolgte unter Verwendung von Primern, die an das FR 1 bzw. das FR 4 der V_H und V_L binden und die notwendigen Schnittstellen für die nachfolgende Klonierung kodieren. Während zur Generierung der avianen variablen Antikörperdomänen jeweils nur ein spezifisches Primerpaar für die V_H bzw. die V_L notwendig war (Tabelle 34, Abbildung 11), erfolgte die Synthese der murinen variablen Antikörperdomänen in getrennten PCR-Reaktionen mit jeweils einem der für die schwere bzw. leichte Antikörperkette spezifischen „forward“ Primer und einer Mischung aus fünf „backward“ Primern (Tabelle 35, Tabelle 36). In der Gesamtheit aller Reaktionen zur Amplifizierung der murinen V_H - und V_L -Antikörperfragmente ergaben mit Ausnahme der beiden Oligonukleotide MPDVH9 und 16 alle für die V_H spezifischen Primer ein positives Amplifizierungsergebnis. V_L -Antikörperfragmente konnten unter Verwendung von 12 der 13 kappa spezifischen Oligonukleotide und des lambda spezifischen Primers MPDVL15 von cDNS amplifiziert werden. Eine Reamplifizierung resultierte in PCR-Produkten für MPDVL7 und MPDVL14, was darauf schließen ließ, dass diese Antikörperfragmente zwar vorhanden, aber höchstwahrscheinlich während der Immunisierungsphase nicht durch das verwendete Antigen angesprochen worden waren (Tabelle 21).



Abbildung 11: Produkte der Amplifizierung avianer V_H- (A) und V_L-Antikörperfragmente (B)

V_H- und V_L-Antikörperfragmente wurden von mit den genspezifischen Primern ChicVH und ChicVL synthetisierter cDNS (2.2.2.10) unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide amplifiziert (2.2.2.12.2). 40 µl der PCR-Reaktionen wurden im 1,2 %-igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt (2.2.2.7). M: 100 bp-Leiter (ROTH), 1: V_H-spezifische Oligonukleotide CPDVHF und CPDVHB; 2: V_L-spezifische Oligonukleotide CPDVLF und CPDVLB.

Tabelle 21: Ergebnis der Amplifizierung muriner V_H- und V_L-Antikörperfragmente

V_H- und V_L-Antikörperfragmente wurden unter Verwendung V_H- und V_L-spezifischer Oligonukleotide von cDNS (2.2.2.10) amplifiziert (2.2.2.12.2). PCR-Reaktionen ohne detektierbares Produkt wurden reamplifiziert. MPDVH: V_H-spezifische Oligonukleotide (Tabelle 35); MPDVL: V_L-spezifische Oligonukleotide (Tabelle 36). ++: starke Bande; +: Bande; -: schwache Bande; o: Bande nach Reamplifizierung; nd: auch nach Reamplifizierung kein Produkt detektierbar.

V _H	MPDVH															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
COH 30	++	++	+	++	+	++	++	+	nd	+	++	++	++	+	+	nd
COH 32	+	+	nd	++	-	++	+	-	nd	+	++	++	++	+	+	nd
oligo-dT	++	++	nd	++	+	++	++	+	nd	+	++	++	++	+	+	nd

V _L	MPDVL														lambda	
	1	2	3	4	5	6	kappa 7	8	9	10	11	12	13		14	15
Mu PD 31/32	o	o	o	o	o	o	nd	o	o	o	o	o	o		nd	nd
oligo-dT	++	+	+	+	-	+	o	+	-	++	-	++	-		o	-

3.4.2 Klonierung der scFv-Bibliotheken

Bei der Generierung der scFv-Bibliothek (2.2.5.1) wurden die V_H- und die V_L-Domänen über einen „Linker“ verbunden und „in frame“ mit dem GenIII-Hüllprotein des filamentösen M13 Phagen kloniert. Das sich zwischen scFv und GenIII befindende „Amber“ Stopp-Kodon ermöglichte je nach Wahl des *E. coli*-Stammes die Expression des Fusionsproteins oder die Expression löslicher scFv Fragmente. Der hierzu verwendete pHENHi-Vektor (2.1.7) enthält

die notwendigen Schnittstellen zur Klonierung der variablen Domänen und kodiert einen 218* Linker, der bis auf ein Prolin dem 218 Linker entspricht (Whitlow *et al.* 1993).

Die amplifizierten avianen und murinen variablen Antikörperdomänen (3.4.1) dienten nach Restriktion mit *SfiI* und *BstEII* (V_H) bzw. *AscI* und *NotI* (V_L) und Gelextraktion der 350 bis 400 bp langen Fragmente zur Klonierung von V_H - und V_L -Subbibliotheken. Anschließend erfolgte die Herstellung der scFv-Bibliotheken durch Klonierung der durch Restriktion aus der V_H -Subbibliothek gewonnenen V_H -Antikörperfragmente in die V_L -Subbibliothek und umgekehrt. Der bei den jeweiligen Klonierungsschritten verwendete pHENHi-Vektor (2.1.7) wurde nach Restriktion (2.2.2.2) mit den entsprechenden Endonukleasen dephosphoryliert (2.2.2.4) und vor Ligation (2.2.2.5) mit den jeweiligen Fragmenten durch eine Testtransformation (2.2.1.3) hinsichtlich vollständiger Restriktion untersucht. Sowohl für die V_H - und V_L -Subbibliotheken als auch die scFv-Bibliotheken wurden mittels Titration die Anzahl rekombinanter Bakterienklone bestimmt. Des Weiteren wurden die Genbibliotheken durch Kolonie-PCR (2.2.2.12.3) von mindestens 28 zufällig ausgewählten Klonen auf die Klonierungseffizienz sowie auf das Vorhandensein von Vollängeninserts untersucht. Die Größe aller hergestellten Subbibliotheken betrug 10^5 bis 10^6 Bakterienklone mit einer Klonierungseffizienz von 95 bis 100 %. Die finale murine scFv-Bibliothek wies eine Größe von 2×10^7 Klonen bei einer Klonierungseffizienz von 96 % auf. Jedoch ließ sich durch Analyse der Amplifizierungsprodukte der Kolonie-PCR nur ein Anteil von 86 % Vollängeninsert feststellen. Die aviane scFv-Bibliothek hatte eine Größe von 1×10^6 mit einer Klonierungseffizienz von 94 %, die dem Anteil von Vollängeninserts entsprach (Tabelle 22).

Tabelle 22: Größe und Klonierungseffizienz der hergestellten scFv-Bibliotheken

Die Größe der Genbibliotheken (2.2.5.1) wird als Anzahl von Kolonien angegeben, die mittels Titration (2.2.5.1) berechnet werden konnten. Zur Bestimmung der Klonierungseffizienz wurden mindestens 28 zufällig ausgewählte Kolonien durch Kolonie-PCR (2.2.2.12.3) und Auftrennung der PCR-Ansätze im 1,2 %-igen (w/v) Agarosegel (2.2.2.7) analysiert.

		V_H -Subbibliothek	V_L -Subbibliothek	scFv-Bibliothek
Huhn 2	Anzahl Kolonien	$3,7 \times 10^6$	$5,1 \times 10^5$	1×10^6
	Klonierungseffizienz (%)	95	95	94
Maus 1	Anzahl Kolonien	$7,3 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	2×10^7
	Klonierungseffizienz (%)	100	97	96

Zur Abschätzung der Diversität der avianen scFv-Bibliothek wurden die scFv Fragmente von 54 Kolonien mittels Kolonie-PCR amplifiziert (2.2.2.12.3) und anschließend mit *BstNI*

inkubiert (2.2.2.3). Die Amplifizierungsprodukte sowie die Restriktionsansätze wurden nach Auftrennung im Agarosegel analysiert (2.2.2.7). Von den getesteten Kolonien wiesen etwa 94% das erwartete Volllängeninsert von etwa 1000 bp auf und das nach Inkubation mit *Bst*NI erhaltene Bandenmuster unterschied sich bei etwa 70% der Kolonien, was auf eine hohe Diversität der scFv-Bibliothek schließen ließ (Abbildung 12).

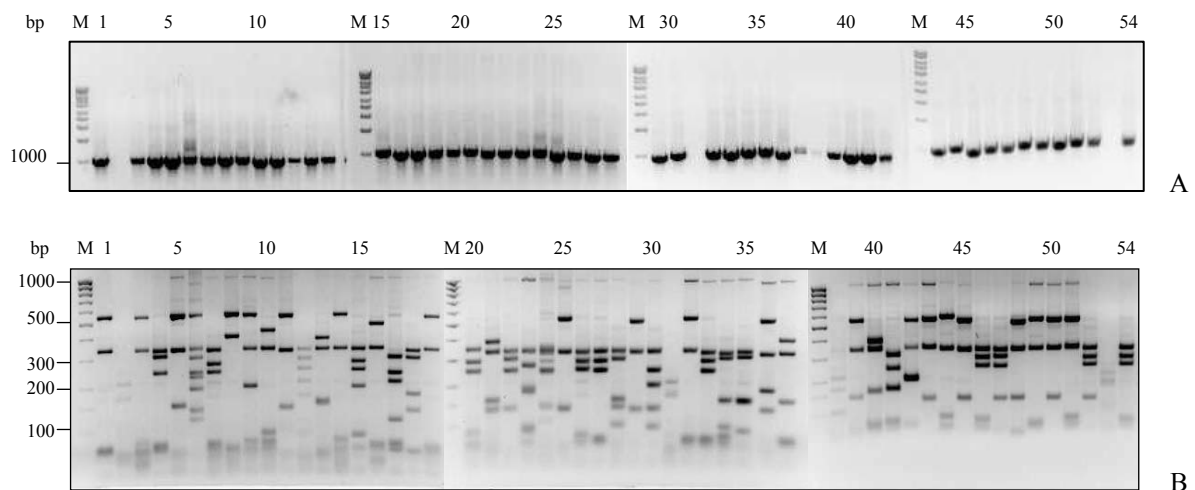


Abbildung 12: Analyse der avianen scFv-Bibliothek auf Volllängeninserts und Diversität

Von der avianen scFv-Bibliothek wurden 54 zufällig ausgewählte Kolonien mittels Kolonie-PCR (2.2.2.12.3) (A) und *Bst*NI-Verdau (2.2.2.3) (B) untersucht. Die PCR-Ansätze (20 µl) wurden im 1,2 %-igen (w/v) und die Restriktionsansätze im 2 %-igen (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.2.7). M: 1 kp-Leiter (ROTH) (A), M: 100 bp-Leiter (ROTH) (B).

3.5 Selektion *Phytophthora infestans*-spezifischer scFvs mittels Phagendisplay

3.5.1 Phagendisplay

Mit der avianen und der murinen scFv-Bibliothek (3.4) sowie einer naïven avianen scFv-Bibliothek (van Wyngaardt *et al.* 2004) wurden Phagendisplay Selektionsrunden durchgeführt (2.2.5). Die Größe der naïven avianen Bibliothek war mit 2×10^9 Klonen angegeben. Jede Bibliothek wurde getrennt gegen *P. infestans* Zellwandfragmente sowie gekeimte Sporangien und Zoosporen des gleichen Pathogens „gepannt“ (3.1). Durch Preinkubation der eingesetzten scFv-präsentierenden Phagen mit dem Blockierungsreagenz in jeder Selektionsrunde sollte eine Selektion von scFv Fragmenten gegen dieses vermieden werden.

Die in den Selektionsrunden eingesetzten Antigenkonzentrationen sowie die Phagenanreicherung und die Veränderung des Anteils von Phagen mit Volllängeninsert sind der Tabelle 23 zu entnehmen. Vor und nach jeder Selektionsrunde wurde mittels Titration bestimmt (2.2.5.2), wie viele Phagen zur Selektion eingesetzt (etwa 1×10^{13} Phagen) und wie viele nach der Selektion eluiert wurden. Daraus ließ sich die relative Anreicherung eluierter Phagen im Laufe des Experiments errechnen ((eluierte Phagen_{Runde n+1} : eingesetzte Phagen_{Runde n+1}) : (eluierte Phagen_{Runde n} : eingesetzte Phagen_{Runde n})). Zur Ermittlung des Anteils von Phagen mit Volllängeninsert wurden nach jeder Runde jeweils acht (naïve aviane scFv-Bibliothek) bzw. 16 Kolonien (Huhn 2 und Maus 1) mittels Kolonie-PCR (2.2.2.12.3) unter Verwendung vektorspezifischer Oligonukleotide untersucht.

Tabelle 23: Phagenanreicherung und prozentualer Anteil an Volllängeninserts

Die Anzahl eingesetzter und eluierter Phagen (2.2.5.3) im Verlauf von drei Selektionsrunden (2.2.5) wurde bestimmt. Die Phagenanreicherung wurde durch Division des Quotienten aus eluierten und eingesetzten Phagen der $n + 1$ -ten Runde durch den Quotienten aus eluierten und eingesetzten Phagen der n -ten Runde berechnet. Die Phagenanreicherung der ersten Runde wurde gleich 1 gesetzt. Der prozentuale Anteil von Volllängeninserts wurde nach Kolonie-PCR (2.2.2.12.3) von acht (naïve aviane scFv-Bibliothek, van Wyngaardt *et al.* 2004) bzw. 16 (Huhn 2, Maus 1) zufällig ausgewählten Kolonien und Auftrennung der PCR-Ansätze im 1,2 %-igen (w/v) Agarosegel (2.2.2.7) ermittelt.

scFv-Bibliothek		<i>P. infestans</i> Antigene					
		Zellwandfragmente			Gekeimte Sporangien und Zoosporen		
		(200 µg/ml TG)			(3000 Sporangien/ml)		
	Selektionsrunde	1	2	3	1	2	3
Naïve aviane scFv-Bibliothek	Phagenanreicherung	1	1,9	0,8	1	0,6	3,2
	Volllängeninsert (%)	65,5	25	12,5	87,5	37,5	37,5
Huhn 2	Phagenanreicherung	1	0,1	27	1	0	65
	Volllängeninsert (%)	75	56	31	88	50	38
Maus 1	Phagenanreicherung	1	59	93	1	0,2	22
	Volllängeninsert (%)	100	88	88	100	67	75

Beim Phagendisplay mit der naïven avianen scFv-Bibliothek war keine Anreicherung eluierter Phagen im Verlauf der Selektionsrunden festzustellen. Die scheinbare Verdreifachung eluierter Phagen nach der dritten Selektionsrunde gegen gekeimte Sporangien und Zoosporen wurde durch den geringen prozentualen Anteil von Phagen mit Volllängeninsert (37,5 %) nivelliert. Nach der dritten Phagendisplay Selektionsrunde mit der von Huhn 2 generierten scFv-Genbibliothek konnte eine 27-fache (Zellwandfragmente) bzw.

65-fache (gekeimte Sporangien und Zoosporen) Phagenanreicherung beobachtet werden. Auch hier sank der prozentuale Anteil von Phagen mit Volllängeninsert kontinuierlich im Verlauf der Selektionsrunden auf 31 % bzw. 38 %. Phagen der Selektionsrunden mit der murinen scFv-Bibliothek wiesen mit 67 bis 100 % den vergleichsweise höchsten prozentualen Anteil von Volllängeninserts auf. Des Weiteren war beim „Panning“ gegen Zellwandfragmente bereits nach der zweiten Runde eine 59-fache Phagenanreicherung und nach der dritten Runde eine weitere Anreicherung um den Faktor 93 festzustellen. Im Fall der Selektion gegen gekeimte Sporangien und Zoosporen betrug die Phagenanreicherung nach der dritten Runde den 22-fachen Wert. Folglich schienen die aus dem Phagendisplay mit der murinen scFv-Bibliothek gegen Zellwandfragmente selektierten scFv Fragmente die vielversprechendsten zu sein.

Die nach der zweiten und dritten Selektionsrunde mit der avianen und murinen scFv-Bibliothek gegen Zellwandfragmente sowie gekeimte Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* eluierten Phagen wurden zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet. Von den resultierenden Bakterienkolonien wurden jeweils 96 der beiden dritten Runden mit der avianen scFv-Bibliothek und jeweils 192 der zweiten und dritten Phagendisplayrunde mit der murinen scFv-Bibliothek gegen Zellwandfragment sowie 96 Bakterienklone der dritten Selektionsrunde gegen gekeimte Sporangien und Zoosporen der murinen scFv-Bibliothek zufällig ausgewählt. Diese Bakterienklone wurden mittels ELISA auf Expression löslicher *P. infestans*-spezifischer scFv analysiert (3.5.2, 3.5.3).

3.5.2 Selektion *Phytophthora infestans*-spezifischer avianer scFvs

Die im Phagendisplay mit der avianen scFv-Bibliothek nach der jeweiligen dritten Selektionsrunde gegen Zellwandfragmente bzw. gekeimte Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* eluierten Phagen wurden zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet (3.5.1, 2.2.5.4). Von den resultierenden Bakterienkolonien wurden für jedes während des Phagendisplays verwendete Antigen 96 Klone auf Expression löslicher *P. infestans*-spezifischer scFv untersucht. Dazu wurden die nach bakterieller Expression (2.2.4.1) zufällig ausgewählter Kolonien erhaltenen Kulturüberstände im ELISA (2.2.4.8) eingesetzt. Entsprechend des im Phagendisplay verwendeten Antigens wurden jeweils *P. infestans* Zellwandfragmente (2.2.3.2) oder gekeimte Sporangien und Zoosporen (2.2.3.3, 3.1) an die ELISA Platten adsorbiert. Parallel wurden die in die Bakterienüberstände

sezernierten löslichen scFv Fragmente im ELISA auf Bindung an das während des Phagendisplays und im ELISA verwendete Blockierungsreagenz analysiert.

Von den beim Phagendisplay mit der naïven avianen scFv-Bibliothek selektierten Klonen konnte kein *P. infestans*-spezifischer löslicher scFv identifiziert werden. Parallel zum Phagendisplay der naïven avianen scFv-Bibliothek gegen *P. infestans* Antigene wurde diese Genbibliothek auch gegen MBP (maltose binding protein) „gepannt“. Für diesen Versuchsteil konnte ein MBP-spezifischer scFv selektiert werden (Daten nicht dargestellt), so dass der ausgebliebene Erfolg der Selektion spezifischer avianer scFv Fragmente nicht auf einen Systemfehler während des Phagendisplays zurückgeführt werden konnte. Folglich ist anzunehmen, dass diese naïve aviane scFv-Bibliothek keinen *P. infestans*-spezifischen scFv enthält. Der MBP-spezifische scFv wurde nicht weiter verwendet.

Die untersuchten Klone nach dem Phagendisplay (3.5.1) mit der von Huhn 2 generierten scFv-Bibliothek (3.4.2) gegen Zellwandfragmente ließen im ELISA (2.2.4.8) nach einer Stunde Substratinkubation nur Signale erkennen, die sich kaum vom Hintergrund abhoben (Daten nicht dargestellt). Nach Sequenzanalyse von fünf ausgewählten Klonen erwiesen sich diese als identisch (scFvPi46).

Beim Test von 96 Klonen der dritten Phagendisplayrunde (3.5.1) mit der von Huhn 2 generierten scFv-Bibliothek (3.4.2) gegen gekeimte Sporangien und Zoosporen, konnte ein scFv (scFvPi68) mit Reaktivität gegenüber *P. infestans* identifiziert werden (Abbildung 13). Dieser scFv wies keine Kreuzreaktivität mit dem Blockierungsreagenz auf.

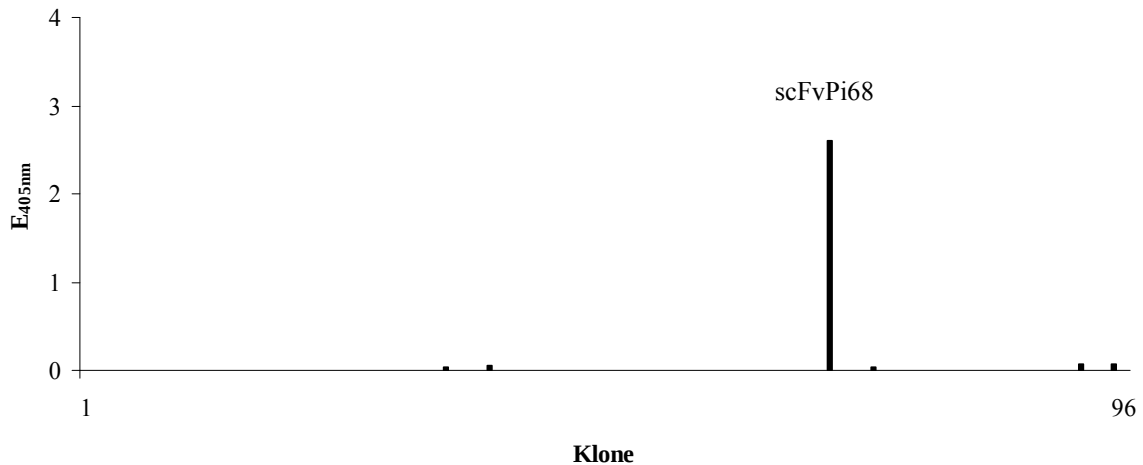


Abbildung 13: Reaktivität löslicher avianer scFv Fragmente gegenüber gekeimten Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* Antigenen

ELISA Platten wurden mit gekeimten Sporangien und Zoosporen (3000 Sporangien/ml) (2.2.3.3) beschichtet und mit Kulturüberständen einer bakteriellen scFv Expression (2.2.4.1) von 96 zufällig ausgewählten Klonen der dritten Phagendisplayrunde (3.5.1) mit der von Huhn 2 generierten scFv-Bibliothek (3.4.2) inkubiert. Der Nachweis gebundener scFv Fragmente erfolgte mit α -cmv mAb (1 : 5000) und GAM^{HRP} Fc (1 : 10000). Die Extinktion wurde nach einer Stunde Substratinkubation (ABTS) bei 405 nm gemessen (2.2.4.8). Dargestellt sind die Werte nach Abzug des Hintergrundsignals.

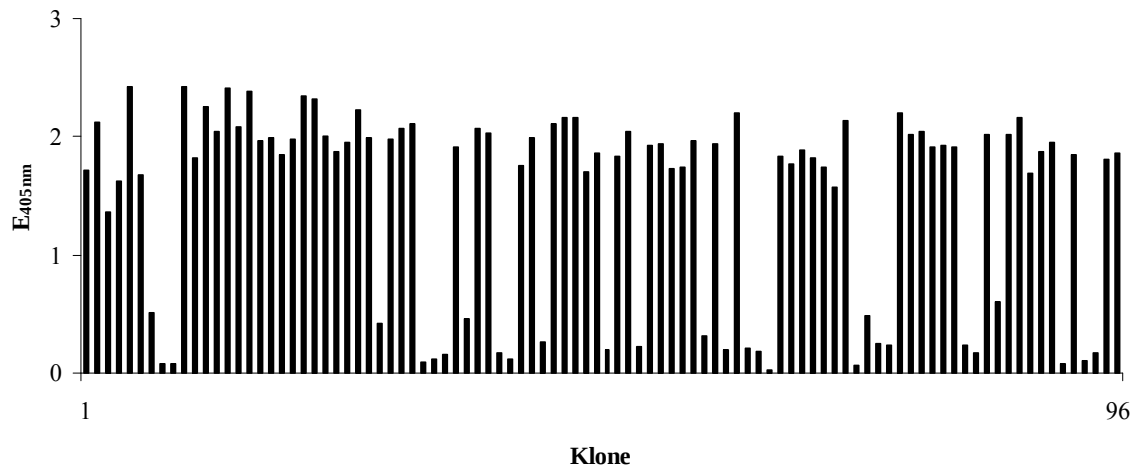
Die beiden avianen scFvPi46 und 68 wurden sequenziert (3.6.1) und im Anschluss mittels Immunoblot (3.6.2) und Immunofluoreszenzmikroskopie (3.6.5) auf Bindung an *P. infestans* Antigene sowie im ELISA auf Reaktivität gegenüber *P. infestans* untersucht (3.6.3). Ferner erfolgte eine Analyse auf Kreuzreaktivität dieser beiden scFv gegenüber Pathogenen der Asco-, Basidio- und Oomyceten mittels ELISA (3.6.4).

3.5.3 Selektion *Phytophthora infestans*-spezifischer muriner scFvs

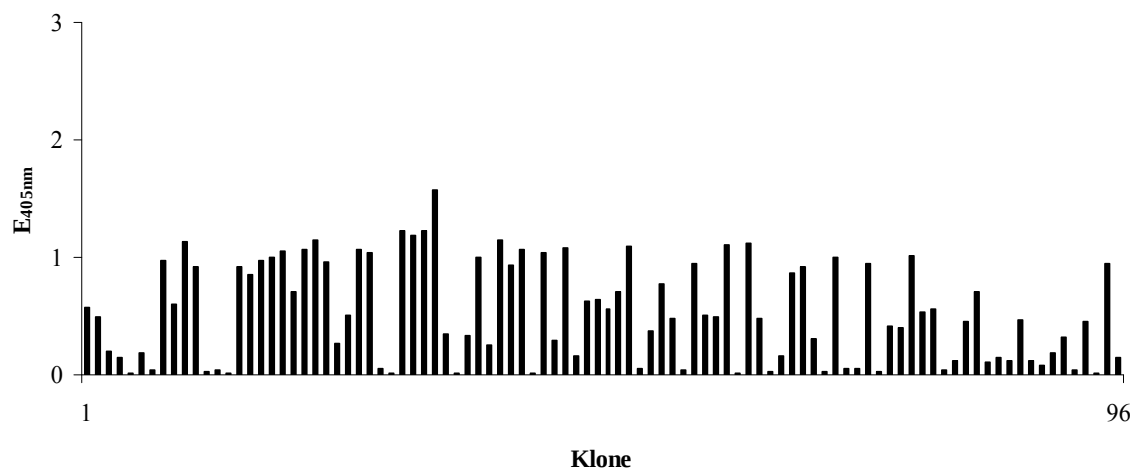
Analog zur in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Analyse wurden jeweils 192 zufällig ausgewählte Kolonien der zweiten und dritten Phagendisplayrunde mit der murinen scFv-Bibliothek gegen Zellwandfragment sowie 96 Bakterienklone der dritten Selektionsrunde gegen gekeimte Sporangien und Zoosporen (3.5.1) exprimiert. Die im Bakterienüberstand enthaltenen löslichen scFv wurden auf Spezifität gegenüber *P. infestans* Zellwandfragmenten bzw. gekeimten Sporangien und Zoosporen sowie Bindung an das Blockierungsreagenz untersucht.

Im ELISA (2.2.4.8) (Abbildung 14) war festzustellen, dass die Extinktion bei 405 nm nach einer Stunde Substratinkubation von 22 % der gegen gekeimte Sporangien und Zoosporen selektierten murinen scFv über 1,0 lag. Von den gegen Zellwandfragmente selektierten scFv zeigten 67% nach der zweiten und 71% nach der dritten Runde Signale über 1,0. Dargestellt

sind die durch Analyse der Kulturüberstände von jeweils 96 Klonen der dritten Selektionsrunde des Phagendisplays der murinen scFv-Bibliothek gegen Zellwandfragmente bzw. gekeimte Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* im ELISA erhaltenen Extinktionswerte (Abbildung 14).



A



B

Abbildung 14: Reaktivität löslicher muriner scFv Fragmente gegenüber Zellwandfragmenten (A) bzw. gekeimten Sporangien und Zoosporen (B) von *P. infestans* Antigenen

ELISA Platten wurden mit Zellwandfragmenten (200 µg/ml TG) (2.2.3.2) (A) bzw. gekeimten Sporangien und Zoosporen (3000 Sporangien/ml) (2.2.3.3) (B) beschichtet und mit Kulturüberständen einer bakteriellen scFv Expression (2.2.4.1) von 96 zufällig ausgewählten Klonen der dritten Phagendisplayrunde (3.5.1) mit der murinen scFv-Bibliothek (3.4.2) inkubiert. Der Nachweis gebundener scFv Fragmente erfolgte mit α -myc mAb (1 : 5000) und GAM^{HRP} Fc (1 : 10000). Die Extinktion wurde nach einer Stunde Substratinkubation (ABTS) bei 405 nm gemessen (2.2.4.8). Dargestellt sind die Werte nach Abzug des Hintergrundsignals.

Von den gegen Zellwandfragmente selektierten scFv Fragmenten wurden insgesamt 47 Klone der zweiten und dritten Runde und von den gegen gekeimte Sporangien und Zoosporen selektierten zehn Klone der dritten Runde mit den höchsten Signalen zur erneuten

Untersuchung mittels ELISA (2.2.4.8) ausgewählt. Neben der Verifizierung der Pathogenspezifität wurde auch auf Kreuzreaktivität gegenüber dem Blockierungsreagenz, löslicher Bestandteile von V8-Agarplatten und Zellwandfragmenten von *Fusarium graminearum* (2.2.3.2) getestet. Für die weitere Untersuchung wurden die Klone ausgewählt, deren scFv keine Kreuzreaktivität mit V8-Bestandteilen und dem Blockierungsreagenz aufwiesen. Abbildung 15 zeigt das für diese Klone typische Ergebnis am Beispiel von sechs gegen Zellwandfragmente (scFvPi5, 10, 14, 16, 21, 22) und vier gegen gekeimte Sporangien von *P. infestans* selektierte scFv (scFvPi30 bis 33). Anhand der ELISA Daten war festzustellen, dass sowohl die gegen Zellwandfragmente, als auch die gegen gekeimte Sporangien und Zoosporen selektierten scFv Fragmente jeweils Epitope in beiden *P. infestans* Antigenvarianten erkannten. Dagegen war keine Kreuzreaktivität mit Zellwandfragmenten von *F. graminearum* festzustellen, was ein erster Hinweis auf eine hohe Spezifität der murinen scFv gegenüber *P. infestans* war. Weitere Aussagen waren an dieser Stelle nicht möglich, da erstens die Konzentration der scFv Fragmente im Überstand nicht bekannt war und zweitens die Zellwandfragmente nicht direkt mit den gekeimten Sporangien verglichen werden konnten.

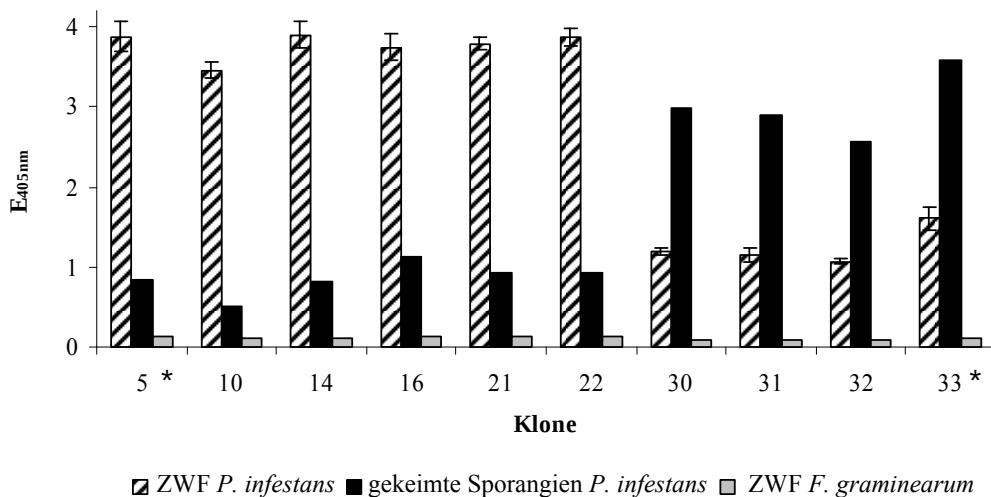


Abbildung 15: Reaktivität muriner scFv Fragmente gegenüber Zellwandfragmenten und gekeimten Sporangien von *P. infestans* sowie Zellwandfragmenten von *F. graminearum*

ELISA Platten wurden mit Zellwandfragmenten von *P. infestans* bzw. *F. graminearum* (200 µg/ml TG) (2.2.3.2) und gekeimten Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* (3000 Sporangien/ml) (2.2.3.3) beschichtet und mit Kulturüberständen einer bakteriellen scFv Expression (2.2.4.1) ausgewählter Klone inkubiert. Der Nachweis gebundener scFv Fragmente erfolgte mit α -cmv mAb (1 : 5000) und GAM^{HRP} Fc (1 : 10000). Die Extinktion wurde nach einer Stunde Substratinkubation (ABTS) bei 405 nm gemessen (2.2.4.8). Die scFvPi5 bis 22 wurden beim Phagendisplay gegen Zellwandfragmente, die scFvPi30 bis 33 beim Phagendisplay gegen gekeimte Sporangien und Zoosporen selektiert (3.5.1). ZWF: Zellwandfragmente, *: für Folgeexperimente ausgewählte scFv.

Zur Ermittlung mögliche Sequenzunterschiede folgte die PCR-Amplifizierung (2.2.2.12.3) der scFv Fragmente von 25 gegen Zellwandfragmente und zehn gegen gekeimte Sporangien selektierte scFv sowie die Analyse der Amplifikate mittels *Bst*NI-Verdau (2.2.2.3). Durch Sequenzierung (2.2.2.13) konnten vier sich in wenigen Aminosäuren unterscheidende gegen Zellwandfragmente selektierte scFv (scFvPi5=14=22, scFvPi10, scFvPi16, scFvPi21) und zwei sich in einer Aminosäure unterscheidende gegen gekeimte Sporangien und Zoosporen selektierte scFv (scFvPi30, scFvPi33) ermittelt werden (Abbildung 15). Des Weiteren war anhand des *Bst*NI-Verdaus der 25 scFv Fragmente festzustellen, dass dem scFvPi5 entsprechende scFv sowohl in der zweiten Runde als auch in der dritten Runde mit über 70 % dominant vertreten waren. Der scFvPi5 und der scFvPi33 wurden für Folgeexperimente ausgewählt (3.6, 3.7).

3.6 Charakterisierung der scFvs

Die aus Klonierung der variablen Domänen monoklonaler Antikörper generierten scFv (3.3.3) sowie die im Phagendisplay selektierten scFv (3.5.2, 3.5.3) wurden sequenziert (3.6.1), im Immunoblot analysiert (3.6.2), hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber *P. infestans* (3.6.3) und Vertretern der Asco-, Basidio- und Oomyceten charakterisiert (3.6.4) sowie die Antikörper-Antigen-Bindung mittels Immunofluoreszenzmikroskopie lokalisiert (3.6.5).

3.6.1 Sequenzen und Klassifizierung der scFvs

Sequenzanalyse (2.2.2.13) der auf den mAk basierenden scFvPi86, 88, 102.2, 102.4 und 129 (3.3.3) sowie der aus dem Phagendisplay stammenden murinen (scFvPi5 und 33) (3.5.3) und avianen scFv (scFvPi46 und 68) (3.5.2) zeigte, dass sich alle scFv mit Ausnahme von scFvPi86 und scFvPi102.2 vor allem in den hypervariablen Regionen gravierend unterscheiden (Tabelle 24). Die Bestimmung der CDRs erfolgte nach Kabat *et al.* (1991).

Tabelle 24: Aminosäuresequenzen der hypervariablen Regionen (CDR) der scFv

Die Aminosäuresequenzen der scFvs wurden aus den mittels Sequenzierung (2.2.2.13) erhaltenen Daten abgeleitet. Die Bestimmung der CDRs erfolgte nach Kabat *et al.* (1991).

scFv	CDR H1	CDR H2	CDR H3
murine scFv			
scFvPi5	GYSFTG-YTMN	LINP--YNGGSSYNQKFKG	GSTTGPY-----FDV
scFvPi33	GYTFTN-YIMH	YINP--YNDATKYNEKFKG	VGDVSG-----FAY
scFvPi86	GYTFTS-SWMH	EIHP--NSGESHHNEKFKG	GQLG-----PSY
scFvPi88	GFTFSD-FYME	ASRNKANDYTTEYSASVKG	DYYGSSYWY-----FDV
scFvPi102.2	GYSFTS-TWMH	EIHP--NSGDTHYNEKFKG	GPLG-----PSY
scFvPi102.4	GYSITSGYSWH	YIY---YNGNTNYNPSLKS	YGN-YEGGA-----MDY
scFvPi129	GYTFTN-YGMN	WINT--YTGEPTYVDDFKG	R-----V-----EAY
aviane scFv			
scFvPi46	GFSFSD-YNMG	GIYN--TATDTNYGAAVKG	ASGNVYNWNG---ADNIDA
scFvPi68	GFTFSS-VSMG	AISS-GSGSNIYYATAVKG	NAYGTPDCYIAIGCTGNIDA
scFv	CDR L1	CDR L2	CDR L3
murine scFv			
scFvPi5	Q-----DISNY	YTSRLHS	QQGHT--LPYT
scFvPi33	QSLLY-SSNQKNY	WASTRES	QQYYS--YPLT
scFvPi86	T----GAVTTSNY	GTNNRAP	ALWYSN-HFWV
scFvPi88	ESLYS-SKHKVHY	GASNRYI	AQFYR--YPLT
scFvPi102.2	T----GAVTTSNY	GTNNRAP	ALWYSN-HFWV
scFvPi102.4	STVTS-----SY	STSNLAS	HQYHR--SPFT
scFvPi129	SSVS-----H	DTSKLAS	QQWSS--NPWT
aviane scFv			
scFvPi46	SGSS-----DAY	GNTDRPS	GSADSSGLVGI
scFvPi68	SGGG-----GSY	GSSSRPS	GGYDSS-NPGI

Festzustellen war, dass sich die scFvPi86 und 102.2 nur in elf Aminosäuren unterscheiden, von denen sechs in den CDR der V_H lokalisiert sind. Dies erklärt, dass die entsprechenden mAkPi86 und 102.2 im Immunoblot das gleiche Bandenspektrum von *P. infestans* Zellwandfragmenten detektierten (3.3.2.2) und für beide mAk im ELISA und Immunoblot Kreuzreaktivität zu den gleichen Pathogenen festgestellt werden konnte (3.3.2.4).

Anhand der Aminosäuresequenzen wurden die variablen Domänen der murinen scFv in Anlehnung an veröffentlichte scFv-Sequenzen bezüglich der Familienzugehörigkeit der variablen Antikörperdomänen klassifiziert (IMGT[®], the international ImMunoGeneTics information system[®] <http://imgt.cines.fr> 2008).

Tabelle 25: Klassifizierung *P. infestans*-spezifischer muriner scFv

Die Bestimmung der Familienzugehörigkeit der variablen Antikörperdomänen erfolgte durch Vergleich der Aminosäuresequenzen der murinen scFv mit veröffentlichten Sequenzen (IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® <http://imgt.cines.fr> 2008). PD: Phagendisplay; mAk: monoklonaler Antikörper.

scFv	V _H	V _L	Herkunft
scFvPi5	1	kappa 10	PD murin
scFvPi33	1	kappa 8	PD murin
scFvPi86	1	lambda 1	mAk murin
scFvPi88	5	kappa 7	mAk murin
scFvPi102.2	1	lambda 1	mAk murin
scFvPi102.4	3	kappa 4	mAk murin
scFvPi129	9	kappa 4	mAk murin

3.6.2 Immunoblotanalyse

Die Antigenspezifität der aus dem Phagendisplay stammenden scFv wurde im Immunoblot untersucht (2.2.4.7). Dazu wurde *P. infestans* Myzel von einer vollständig bewachsenen V8-Agarplatte abgekratzt (2.2.3.1), mit einem Elektropistil zerkleinert und in SDS-LB zehn Minuten bei 99 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mittels SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.2.4.5) und auf Nitrozellulose transferiert (2.2.4.7). Die Membranstreifen wurden mit Kulturüberständen der bakteriell exprimierten scFvPi5, 33, 46 und 68 inkubiert (2.2.4.1) und gebundene scFv mittels α -cmv mAb und GAM^{AP} Fc nachgewiesen (Abbildung 16 B). Die Expression der scFvPi5, 33, 46 und 68 sowie deren Integrität wurden zuvor mittels Immunoblot bestätigt (2.2.4.7, Daten nicht dargestellt).

Mit den scFvPi5 und scFvPi46 konnten mittels Immunoblot keine Banden der Myzelpräparation detektiert werden (Abbildung 16 B), so dass angenommen werden kann, dass entweder diskontinuierliche Epitope erkannt werden, oder die Anzahl gebundener Antikörper unterhalb der Nachweisgrenze lag. Dagegen zeigte sich für scFvPi68 eine starke Bande bei über 170 kDa und ein davon ausgehender Schmier bis etwa 45 kDa. Durch scFvPi33 konnte ein Bandenspektrum von etwa zwölf bis über 170 kDa detektiert werden. Dabei hoben sich drei Banden mit einer Größe von etwa 25, 120 und über 170 kDa durch ihre Signalintensität deutlich von den anderen durch scFvPi33 erkannten Banden ab.

Vergleichend zum Ergebnis mit der so hergestellten Myzelpräparation ist ein Immunoblot dargestellt, bei dem Zellwandfragmente (2.2.3.2) nach Auftrennung im SDS-PAGE (2.2.4.5) auf Nitrozellulose transferiert (2.2.4.7) und mit Kulturüberstand der bakteriell exprimierten

scFvPi33 und 68 (2.2.4.1) inkubiert wurden (Abbildung 16 C). Festzustellen war, dass hier durch den scFvPi33 nur noch eine definierte Bande mit einer Größe von etwa 120 kDa detektiert werden konnte. Dem entgegen war auf dem mit scFvPi68 inkubierten Membranstreifen kein Signal erkennbar. Es war anzunehmen, dass bei der Herstellung der Zellwandfragmente wahrscheinlich durch die Waschschrte Komponenten, an die die beiden scFvPi33 und 68 binden, entfernt wurden.

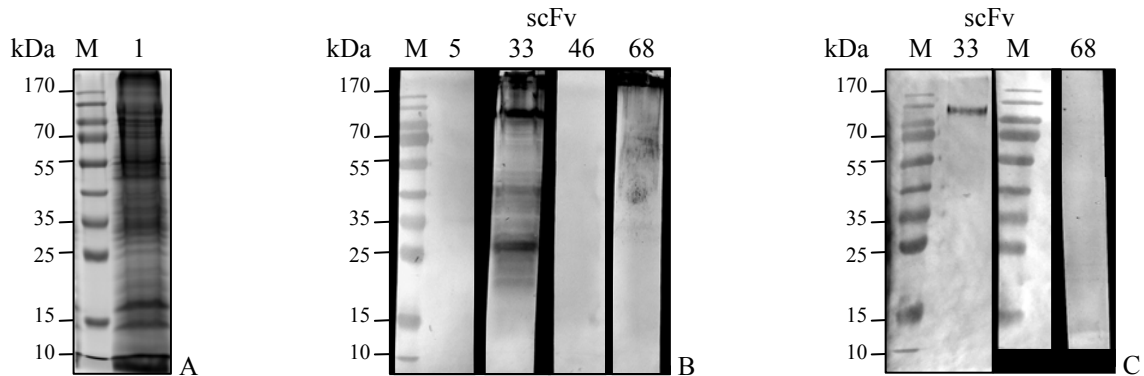


Abbildung 16: SDS-PAGE einer *P. infestans* Myzelpräparation (A) und Immunoblotanalyse *P. infestans*-spezifischer scFv (B, C)

Myzel von *P. infestans* (2.2.3.1) wurde mittels Elektropistil zerrieben und in SDS-LB 10 min bei 99 °C erhitzt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand im 12 %-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.4.5) (A), auf Nitrozellulose transferiert (2.2.4.7) und mit den scFv-haltigen Überständen einer bakteriellen scFv Expression (2.2.4.1) inkubiert (B). Zellwandfragmente von *P. infestans* (150 µg TG) (2.2.3.2) wurden im 12 %-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.4.5), auf Nitrozellulose transferiert (2.2.4.7) und mit dem scFv-haltigen Überstand einer bakteriellen scFv Expression (2.2.4.1) inkubiert (C). Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mittels α -cmv mAb (1 : 5000) und GAM^{AP} Fc (1 : 5000) mit anschließender Visualisierung durch NBT/BCIP. M: Prestained Protein Marker (Fermentas), 1: Myzelpräparation von *P. infestans*.

3.6.3 Reaktivität der scFvs gegenüber *Phytophthora infestans*

Zur Verifizierung der Reaktivität der scFv gegenüber *P. infestans*, wurden diese in *E. coli* XL1-Blue exprimiert (2.2.4.1) und die Zielproteine nach periplasmatischem Zellaufschluss mittels IMAC-Affinitätschromatographie gereinigt (2.2.4.2). Die Mengenbestimmung erfolgte nach Auftrennung der Proben im SDS-PAGE (2.2.4.5). Die Ausbeuten gereinigter scFv betrugen bei den aus dem Phagendisplay stammenden scFvPi5, 33 und 68 etwa 15 µg/l Kultur und für den scFvPi46 etwa 80 µg/l Kultur. Die Reinigungsausbeuten der auf den monoklonalen Antikörpern basierenden gereinigten scFv waren im Vergleich zu scFvPi5 mit etwa 100 ng/l (scFvPi88), etwa 200 ng/l (scFvPi86, 102.2, 129) und etwa 375 ng/l (scFvPi102.4) Bakterienkultur um den Faktor 40 bis 150 geringer.

Die gereinigten scFv wurden im ELISA (2.2.4.8) auf Reaktivität gegenüber *P. infestans* Zellwandfragmenten getestet. Als Negativkontrolle wurde der scFvODC3/2 (Nölke 2002), welcher an Ornithine Decarboxylase (ODC) bindet, verwendet. Es war festzustellen, dass scFvPi102.2 mit einem $E_{405\text{nm}}$ -Wert von 1,62 die höchste Reaktivität aufwies. Nach einer Stunde Substratinkubation betrug die bei 405 nm gemessene Extinktion des scFvPi102.2 bei der eingesetzten Konzentration von 0,375 µg/ml im Vergleich zum scFvPi86 etwa den dreifachen Wert. Dieses Ergebnis war vor dem Hintergrund, dass die beiden scFv bis auf elf Aminosäuren identische Sequenzen aufwiesen (3.6.1), erstaunlich. Eine mögliche Erklärung könnte die geringere Stabilität des scFvPi86 sein, was durch die im Immunoblot zu sehende Degradationsbande untermauert würde (Daten nicht dargestellt). Die ermittelten Extinktionen für scFvPi5 und 33 waren etwa 4,5x und die für scFvPi88 etwa neunmal geringer als die von scFvPi102.2. Die aus dem Phagendisplay stammenden avianen scFvPi46 und 68 sowie die auf den mAk basierenden murinen scFvPi102.4 und 129 wiesen bei der eingesetzten Konzentration keine Reaktivität mit Zellwandfragmenten von *P. infestans* auf (Abbildung 17). Die hier ermittelten Daten decken sich tendenziell mit den bei Untersuchung der mAkPi86, 88, 102.2, 102.4 und 129 auf Reaktivität gegenüber *P. infestans* Zellwandfragmenten erhaltenen Werten. Auch hier konnte bei einer Antikörperkonzentration von 0,2 µg/ml keine Reaktivität der mAkPi102.4 und 129 gegenüber *P. infestans* festgestellt werden. Der mAkPi102.2 zeigte im Vergleich der *P. infestans*-spezifischen IgG und der mAkPi86 im Vergleich der IgM die höchste Reaktivität gegenüber Zellwandfragmenten. Ferner war die für den mAkPi88 gemessene Extinktion etwa viermal niedriger als die für mAkPi86 (3.3.2.3).

In einem weiteren Versuch wurde die Reaktivität der scFvPi5, 33, 46, 68 und 102.2 gegenüber gekeimten Sporangien von *P. infestans* mittels ELISA bestimmt (2.2.4.8, Daten nicht dargestellt). Bei scFvPi5, 46 und 68 konnte im Gegensatz zu den scFvPi33 und 102.2 keine positive Reaktion detektiert werden. Keiner der scFv zeigte Affinität gegenüber V8-Medium und dem Blockierungsreagenz. Die scFvPi86, 88 und 102.4 wurden diesbezüglich nicht untersucht, da Daten mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern vorliegen. Hier konnte mittels ELISA bei einer mAk-Konzentration von 0,2 µg/ml Reaktivität der mAkPi86 und 88 gegenüber gekeimten Sporangien von *P. infestans* (3000 Sporangien/ml) gemessen werden. Dabei war die für mAkPi86 bei 405 nm gemessene Extinktion etwa zehnmal so hoch wie die für mAkPi88. Für mAkPi102.4 konnte bei der eingesetzten Antikörperkonzentration keine Reaktivität gegenüber *P. infestans* festgehalten werden (3.3.2.3).

Aufgrund der erhaltenen Daten schienen der mittels Phagendisplay selektierte murine scFvPi33 und der auf dem mAkPi102.2 basierende scFvPi102.2 die vielversprechendsten scFv zu sein. Im Folgenden wurden die aus dem Phagendisplay stammenden scFvPi5, 33, 46 und 68 auf Kreuzreaktivität gegenüber anderen Pathogenen im ELISA (3.6.4) sowie die Bindung dieser scFv sowie die des scFvPi102.2 an native Oberflächenantigene von *P. infestans* immunofluoreszenzmikroskopisch analysiert (3.6.5).

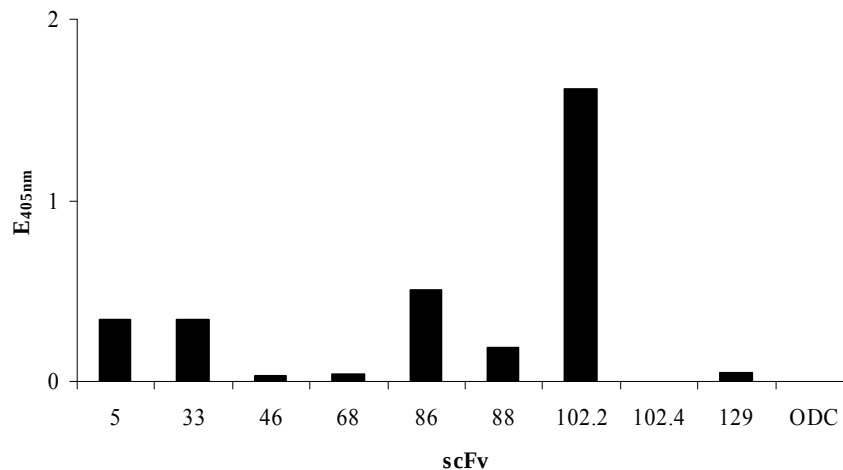


Abbildung 17: Reaktivität *P. infestans*-spezifischer scFv gegenüber Zellwandfragmenten

ELISA Platten wurden mit Zellwandfragmenten von *P. infestans* (200 µg/ml TG) (2.2.3.2) beschichtet und mit 0,375 µg/ml gereinigter scFv (2.2.4.2) inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mittels α-cmyc mAb (1 : 5000) und GAM^{HRP} Fc (1 : 10000). Daten wurden nach einer Stunde Substratinkubation (ABTS) bei 405 nm ermittelt (2.2.4.8). ODC: scFvODC3/2 (Nölke 2002).

3.6.4 Kreuzreaktivitätstest

Die Affinität der aus dem Phagendisplay stammenden scFv gegenüber Vertretern der Oomyceten, Basidiomyceten und Ascomyceten wurde mittels ELISA untersucht (2.2.4.8). Dazu wurden ELISA Platten mit Zellwandfragmenten aller Pathogene beschichtet (2.2.3.2) und mit den gereinigten scFv inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit α-cmyc mAb und einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper. Mit den auf den mAk basierenden scFvPi86, 88, 102.2, 102.4 und 129 wurde dieser Versuch nicht durchgeführt, da entsprechende Daten von den mAkPi86, 88, 102.2, 102.4 und 129 vorlagen (3.3.2.4), wonach die mAkPi86 und 102.2 aufgrund ihrer Spezifität für Oomyceten bei gleichzeitig hoher Reaktivität die interessantesten waren.

Der aus dem Phagendisplay stammende scFvPi5 zeigte genau wie mAkPi82 (3.3.2.4) nur Reaktivität gegenüber Zellwandfragmenten von *P. infestans* und *P. cinnamomi*. Der scFvPi33 erwies sich im Rahmen der getesteten Organismen als *P. infestans*-spezifisch und scFvPi68

zeigte Reaktivität gegenüber Vertretern aller Klassen. Für scFvPi46 konnte keine Reaktivität gegenüber allen eingesetzten Pathogenen ermittelt werden (Tabelle 26).

Tabelle 26: Kreuzreaktivität der scFvPi5, 33, 46 und 68 gegenüber Pathogenen der Ascomyceten, Basidiomyceten und Oomyceten

ELISA Platten wurden mit Zellwandfragmenten (200 µg/ml TG) (2.2.3.2) beschichtet und mit den gereinigten scFv (0,125 µg/ml) (2.2.4.2) inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mittels α -cmv mAb (1 : 5000) und GAM^{HRP} Fc (1 : 10000). Die Extinktion wurde bei 405 nm nach einer Stunde Substratinkubation gemessen (ABTS) (2.2.4.8).

-: $E_{405nm} < 0,19$; o: $E_{405nm} 0,20 - 0,49$; +: $E_{405nm} 0,50 - 1,49$; ++: $E_{405nm} 1,50 - 2,99$; +++: $E_{405nm} > 3,00$

Pathogen	scFv			
	5	33	46	68
<i>P. infestans</i>	++	+	-	+
<i>P. cinnamomi</i>	o	-	-	++
<i>P. nicotianae</i>	-	-	-	+
<i>P. ultimum</i>	-	-	-	+
<i>A. alternata</i>	-	-	-	o
<i>A. niger</i>	-	-	-	-
<i>A. strictum</i>	-	-	-	++
<i>B. cinerea</i>	-	-	-	o
<i>C. cladosporioides</i>	-	-	-	+
<i>C. destructans</i>	-	-	-	+
<i>F. culmorum</i>	-	-	-	+
<i>P. glomerata</i>	-	-	-	+
<i>P. hirsutum</i>	-	-	-	-
<i>T. viride</i>	-	-	-	o
<i>V. dahliae</i>	-	-	-	-
<i>R. solani</i>	-	-	-	++

Die Ergebnisse für scFvPi33 wurden mittels Immunoblotanalyse erhärtet (2.2.4.7). Dazu wurden Zellwandfragmente der Pathogene (2.2.3.2) mittels SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.2.4.5), auf Nitrozellulose transferiert und mit dem scFv-haltigen Überstand einer bakteriellen scFv Expression inkubiert (2.2.4.1). Auch hier konnte nur die Bindung des scFvPi33 an Zellwandfragmente von *P. infestans* nicht aber an *P. cinnamomi*, *P. nicotianae*, *P. ultimum*, *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. culmorum*, *P. hirsutum* und *R. solani* Zellwandfragmente ermittelt werden (Daten nicht dargestellt).

In Kombination mit den Daten des vorhergehenden Kapitels ist nach Analyse der Kreuzreaktivität der scFvPi33 aufgrund seiner mittels ELISA ermittelten Affinität zu gekeimten Sporangien von *P. infestans* sowie seiner Spezifität für *P. infestans* der vielversprechendste der im Phagendisplay selektierten scFv. Die Bindung des scFvPi33 an

native Oberflächenantigene von *P. infestans* sollte im Folgenden immunofluoreszenzmikroskopisch verifiziert werden (3.6.5).

3.6.5 Immunofluoreszenzmikroskopie

Die Lokalisierung der Antikörper-Antigen-Bindung erfolgte analog zu der in Kapitel 3.3.2.5 beschriebenen Vorgehensweise für die scFvPi5, 33, 46, 68 und 102.2 (2.2.4.9). Der Nachweis der an gekeimte Sporangien und Zoosporen gebundenen scFv erfolgte durch Inkubation mit α -cmv mAb und GAM^{FITC} H+L. Als Negativkontrolle wurde der scFvODC3/2 verwendet (Nölke 2002). Hier konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Die von den entsprechenden mAk abgeleiteten scFvPi86, 88, 102.4 und 129 wurden aus Zeitgründen nicht immunofluoreszenzmikroskopisch untersucht, zumal bei den entsprechenden mAkPi86, 88 und 129 eine Bindung dieser an native Oberflächenantigene gekeimter Sporangien von *P. infestans* nachgewiesen werden konnte. Für den mAkPi102.4 konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (3.3.2.5).

Wie für mAkPi102.2 (3.3.2.5) konnte für scFvPi102.2 die Antikörperbindung auf der gesamten Oberfläche von Sporangien, Keimschlauch und Appressorium nachgewiesen werden (Abbildung 18). Dagegen zeigte der aus dem Phagendisplay stammende scFvPi33 eine deutlich stärkere Affinität zu den Sporangien als den Keimschläuchen von *P. infestans*. Die könnte auch eine Erklärung für die im Immunoblot (3.6.2) festgestellten Unterschiede in der Reaktivität des scFvPi33 gegenüber Zellwandfragmenten und frischer Myzelpräparation, die im Vergleich zur Zellwandpräparation deutlich mehr Sporangien enthält, sein. Die für scFvPi68 ermittelten Fluoreszenzsignale sind vergleichsweise schwach und auf die Oberfläche der Zoosporen sowie intrazelluläre Komponenten beschränkt (Abbildung 18). Dieses Resultat für scFvPi68 deckt sich mit den im Immunoblot erhaltenen Daten (3.6.2). Hier konnte eine Bindung des scFvPi68 an eine frische Myzelpräparation, welche alle intrazellulären Bestandteile enthielt, nicht aber an die Zellwandfragmente von *P. infestans*, bei denen durch mehrere Waschschrte cytosolische Bestandteile weitgehend entfernt wurden, festgestellt werden. Für scFvPi5 und scFvPi46 konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie keine Bindung detektiert werden (Daten nicht dargestellt). Dies bestätigte die mittels ELISA erhaltenen Daten für die scFvPi5 und 46, wo keine Reaktivität gegenüber gekeimten Sporangien festgestellt werden konnte (3.6.3). Da bei Analyse der Reaktivität des scFvPi5 gegenüber Zellwandfragmenten von *P. infestans* ein Signal im ELISA

detektiert werden konnte (3.6.3), besteht die Möglichkeit, dass dieser scFv Affinität gegenüber für diesen beim intakten Pathogen nicht zugängliche Epitope hat.

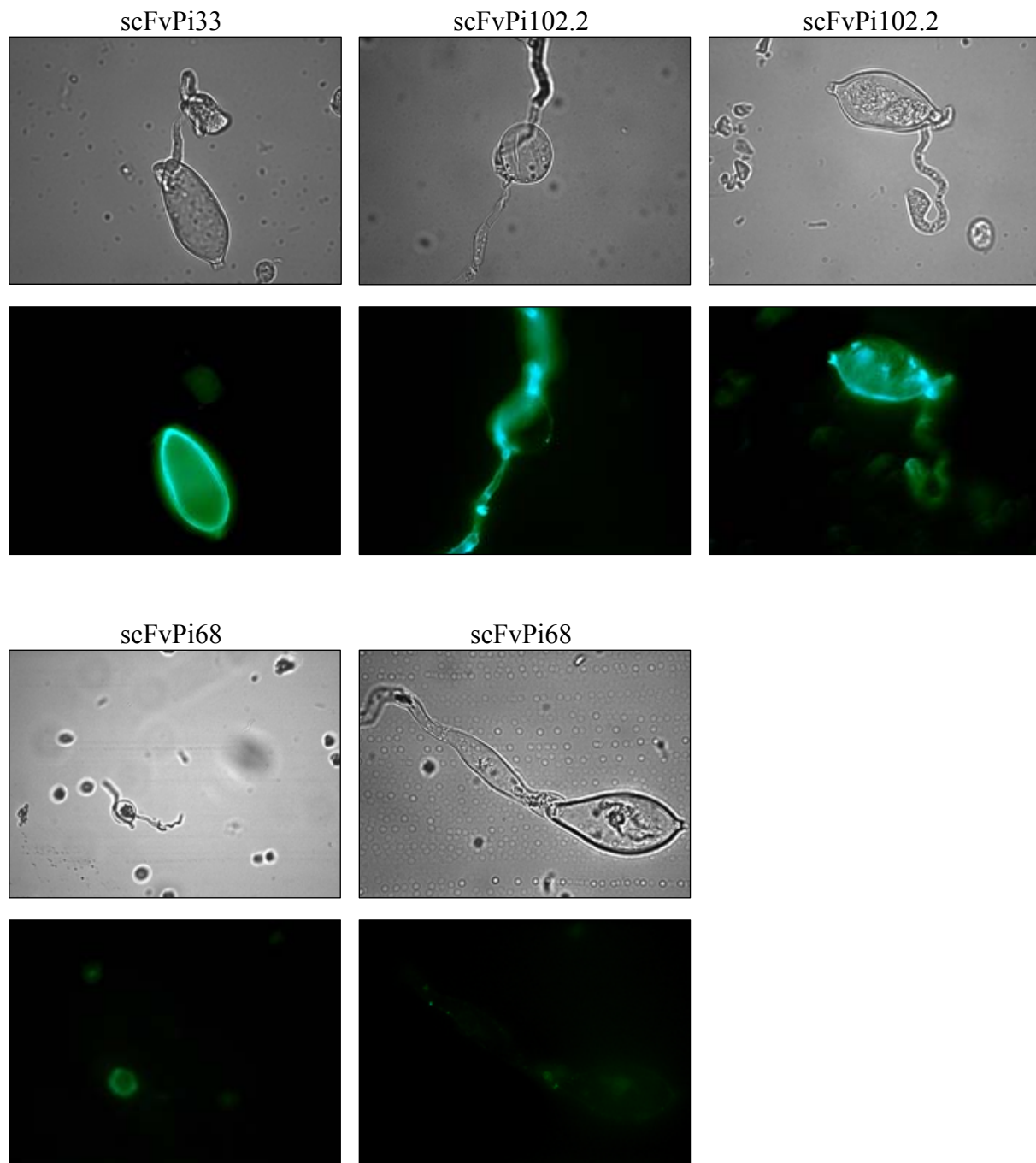


Abbildung 18: Immunofluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Bindung von scFv an gekeimte Sporangien und Zoosporen von *P. infestans*

Gekeimte Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* (2.2.3.3) wurden an mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern immobilisiert und mit gereinigten scFv (2.2.4.2) inkubiert. Der Nachweis gebundener scFv erfolgte mit α -myc mAb (1 : 500) und GAM^{FITC} H+L (1 : 500). Die Visualisierung der Antikörper-Antigen-Komplexe erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Reihen 2 und 4) (2.2.4.9). Lichtmikroskopische Aufnahmen sind vergleichend darüber gestellt (Reihen 1 und 3). Die Negativkontrolle wurde mit scFvODC3/2 (Nölke 2002) durchgeführt. Hier konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Daten nicht dargestellt).

Nach Abschluss der Charakterisierung der scFv Fragmente erscheint der auf dem mAkPi102.2 basierende scFvPi102.2 der zur Zielerreichung geeignetste scFv. Dies begründet sich in einer vergleichsweise zu scFvPi5, 33, 46, 68, 86, 88, 102.4 und 129 hohen Reaktivität des scFvPi102.2 gegenüber *P. infestans* (3.6.3) sowie der Bindung des scFvPi102.2 an die gesamte Oberfläche von Sporangien, Keimschlauch und Appressorium von *P. infestans* (3.6.5). Der scFvPi102.2 sollte im Anschluss an verschiedene antifungal wirkende Peptide fusioniert werden (3.7) mit dem Ziel die Fusionsproteine in transgenen Kartoffelpflanzen zu exprimieren, um eine Resistenz gegenüber *P. infestans* hervorzurufen (3.8).

3.7 Generierung und Charakterisierung von scFv Fusionsproteinen

Da anzunehmen war, dass die generierten scFv Fragmente nur eine geringe bzw. keine wachstumshemmende Wirkung auf *P. infestans* haben, wurden die antimikrobiell und antifungal wirkenden Peptide (AFP) Cec, D4E1, GR7 und Mag (Tabelle 27) mit den *P. infestans*-spezifischen scFvPi5, 33, 86, 88 und 102.2 genetisch fusioniert. Die Kombination von scFv und AFP sollte folgende Eigenschaften miteinander verbinden: Zum einen sollte das AFP einen wachstumshemmenden Effekt auf das Pathogen ausüben und zum anderen sollte der scFv das AFP an seinem Wirkort halten. Dies sollte zu einer Anreicherung der Fusionsproteine am Pathogen führen. Dadurch ist anzunehmen, dass bereits ein geringes Akkumulationslevel des Fusionsproteins in der transgenen Pflanze ausreichend sein kann, das Pathogenwachstum effektiv zu inhibieren. Des Weiteren sollte aufgrund der kontinuierlichen Expression des Fusionsproteins der Schutz der Pflanze gegenüber *P. infestans* aufrechterhalten bleiben. Da lediglich die Haustorien des Erregers in der Lage sind, die Zellwand, jedoch nicht die Zellmembran zu durchdringen, wurden die Fusionsproteine in den Apoplasten dirigiert. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die antifungal wirkenden Fusionsproteine das Pathogen frühstmöglich in der Infektion erreichen.

Die Fusionsproteine (AFP-scFv) wurden bezüglich ihrer Funktionalität und Wirksamkeit gegenüber *P. infestans* (3.7.2, 3.7.3) und *P. nicotianae* (3.7.4) charakterisiert sowie ausgewählte Kombinationen zur Herstellung stabiler *S. tuberosum* Pflanzenlinien verwendet (3.8).

3.7.1 Klonierung von AFP-scFv Fusionsproteinen

Zur bakteriellen Expression (3.7.2) der scFv- und AFP-scFv Fragmente diente der pHENHi-Vektor (2.1.7). Zur transienten Expression in *N. tabacum* (3.7.3, 3.7.4) sowie zur Herstellung stabiler *S. tuberosum* Pflanzenlinien (3.8) wurde der pTRAc-Vektor verwendet (2.1.7). Da zu Beginn der Klonierung die Charakterisierung der generierten scFv Fragmente (3.6) noch nicht vollständig abgeschlossen war, wurden zur Herstellung der AFP-scFv Fusionen die mittels Phagendisplay selektierten murinen scFvPi5 und 33 (3.5.3), die auf den entsprechenden mAk basierenden scFvPi86, 88, 102.2 und 129 (3.3.3) sowie der nicht *P. infestans*-spezifische scFvODC3/2 (Nölke 2002) herangezogen. Die verwendeten AFPs (Cec, D4E1, GR7 und Mag) sind der Tabelle 27 zu entnehmen.

Im Verlauf der Charakterisierung der scFvs (3.6) stellte sich heraus, dass der auf dem mAkPi102.2 basierende scFvPi102.2 der zur Zielerreichung vielversprechendste scFv war. Deshalb wurde der Fokus zunehmend auf diesen scFv gelegt.

Tabelle 27: Übersicht verwendeter antimikrobieller und antifungaler Peptide (AFP)

Bezeichnung	Aminosäuresequenz	Referenz
Cec	KWKLFKKILKVL	Cavallarin <i>et al.</i> 1998
D4E1	FKLRAKIKVRLRAKIKL	Cary <i>et al.</i> 2000
GR7	MASRAARLAARLARLALRAL	Dykes <i>et al.</i> 1998.
Mag	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	Zasloff 1987

Die Klonierung der scFv Fragmente und AFP-scFv Fusionen in die beiden Vektorsysteme pHENHi und pTRAc erfolgte in mehreren Schritten (Abbildung 19). Die pHENHi-scFv Konstrukte waren aus dem Phagendisplay (3.5) und aus vorhergehenden Klonierungen (3.3.3) vorhanden. Zur Klonierung der AFP-scFv Fusionskonstrukte wurden zunächst Zwischenkonstrukte in pJET1/blunt (Fermentas) hergestellt. Dazu wurden die verschiedenen AFPs jeweils mittels SOE-PCR mit dem scFvCWPD2 über einen (G₄S)₂-Linker verknüpft (2.2.2.12.4). Die PCR-Produkte wurden „blunt-end“ in den pJET1/blunt-Vektor kloniert. Als „Templates“ für die SOE-PCR dienten die pJET-AFP Konstrukte (Celen 2007) und pHENHi-Chi-scFvCWPD2 (Peschen 2002). Die verwendeten Oligonukleotide sind der Tabelle 37 im Anhang zu entnehmen. Ausgehend von den Zwischenvektoren (pJET-AFP-scFvCWPD2) wurden durch Restriktion (2.2.2.2) mit *Nco*I und *Sfi*I die „AFP-linker“ Fragmente für die Ligation (2.2.2.5) mit den scFv (pHENHi-scFv / *Sfi*I / *Not*I) und den Vektoren pHENHi und pTRAc (pHENHi-scFvCWPD2 bzw.

pTRAc-scFvCWPD2 / *NcoI* / *NotI*) generiert. Durch Restriktion (2.2.2.2) der so hergestellten pHENHi-AFP-scFv und pTRAc-AFP-scFv Konstrukte mit *SalI* bzw. *NcoI* und Religation des jeweiligen Vektors konnten die pHENHi-AFP und pTRAc-scFv Konstrukte kloniert werden, die jeweils nur die AFPs bzw. die scFvs enthielten (2.2.2.5).

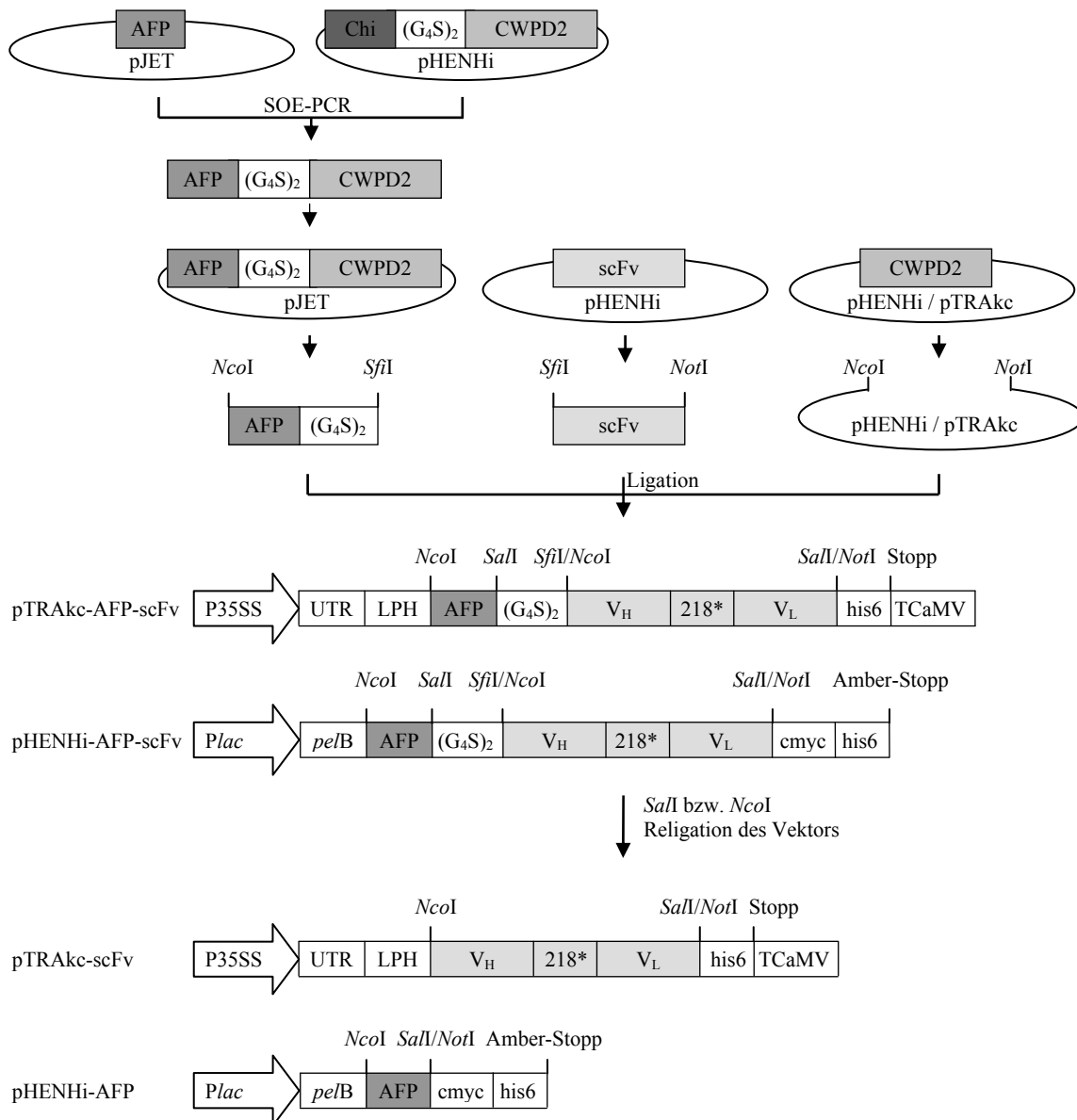


Abbildung 19: Schematische Übersicht der Klonierungsstrategie der AFP-scFv Fusionskonstrukte und der Expressionskassetten in pHENHi und pTRAc

218*: modifizierter Linker (Whitlow *et al.* 1993), **P35SS:** 35S Promotor des Cauliflower Mosaic Virus mit duplizierter Enhancer-Region, **AFP:** antifungales Peptid, **cmc:** cmc-Tag zur Detektion des rekombinanten Proteins, **(G₄S)₂:** Glycin-Serin-Linker, **his6:** His₆-Tag zur Detektion und Reinigung des rekombinanten Proteins, **Plac:** lacZ-Promotor, **LPH:** kodonoptimierte Version des murinen Signalpeptids der schweren Kette des anti-TMV mAk24 (Vaquero *et al.* 1999), **pelB:** Signalsequenz zur periplasmatischen Expression, **TCaMV:** Terminationsequenz des Cauliflower Mosaic Virus, **UTR:** 5' untranslatierte Region der Chalconsynthase aus *Petroselinum*.

Tabelle 28 beinhaltet eine Übersicht der 66 klonierten Konstrukte. Anschließend wurden die rekombinanten Proteine bakteriell (3.7.2) und transient exprimiert (3.7.3), um deren Bindung an *P. infestans* mittels ELISA zu verifizieren. Es folgten ein Inhibitionsversuch (3.7.4) sowie die stabile Transformation von *S. tuberosum* unter Verwendung mit pTRAc-D4E1-scFvPi102.2 und pTRAc-GR7-scFvPi102.2 transformierter *A. tumefaciens* (3.8).

Tabelle 28: Übersicht der in die beiden Vektoren pHENHi und pTRAc klonierten scFv, AFP und AFP-scFv

+: kloniert, -: nicht kloniert

	Cec	D4E1	pHENHi / pTRAc GR7	Mag	ohne AFP
scFvPi5	+/-	++	++	++	+/-
scFvPi33	+/-	++	++	++	++
scFvPi86	++	++	++	++	+/-
scFvPi88	++	++	++	++	++
scFvPi102.2	+/-	++	++	++	++
scFvPi129	++	++	++	++	+/-
scFvODC3/2	++	++	+/-	++	++
ohne scFv	-/-	+/-	+/-	+/-	

3.7.2 Bakterielle Expression und Charakterisierung

Die hergestellten pHENHi-AFP, pHENHi-scFv- und pHENHi-AFP-scFv Konstrukte (3.7.1) wurden zunächst zur Expression in *E. coli* XL1-Blue verwendet (2.2.4.1). Eine Übersicht der sieben exprimierten scFv Fragmente und der 23 AFP-scFv Fusionsproteine gibt Tabelle 29. Die Detektion der im Bakterienpellet sowie im Kulturüberstand enthaltenen rekombinanten Proteine erfolgte mittels Immunoblotanalyse (2.2.4.7). Hier war zum einen festzustellen, dass die überwiegende Anzahl der Zielproteine nur anhand einer vergleichsweise schwachen Bande in der Pelletfraktion der nach Induktion mit IPTG vier Stunden bei 28°C inkubierten *E. coli* Kulturen visualisiert werden konnten. Die D4E1-scFvPi33, GR7-scFvPi33 und Mag-scFvPi33 Fusionsproteine konnten nicht detektiert werden. Zum anderen konnten mit Ausnahme der scFvPi5, scFvPi33, scFvPi86, scFvPi102.2, scFvODC3/2 und des Mag-scFvODC3/2 Fusionsproteins keines der rekombinanten Proteine im Kulturüberstand der mit IPTG induzierten und üN bei 28 °C inkubierten Bakterienkulturen detektiert werden (Tabelle 29). Da aufgrund dieses Ergebnisses die Reinigung der periplasmatisch exprimierten scFv und AFP-scFv Fusionsproteine notwendig war, erfolgte

aus Kapazitätsgründen nur die Expression (2.2.4.1) des vielversprechendsten scFvPi102.2 sowie der Cec-, D4E1-, GR7- und Mag-scFvPi102.2 Fusionsproteine in *E. coli* BL21 im 3 l-Maßstab mit anschließender Reinigung via Ni-NTA (2.2.4.2) und Charakterisierung mittels ELISA (2.2.4.8). Als Kontrollen dienten der in gleicher Weise exprimierte scFvODC3/2 sowie die entsprechenden Cec-, D4E1-, GR7- und Mag-scFvODC3/2 Fusionsproteine.

Tabelle 29: Übersicht der mittels Immunoblotanalyse im Pellet und Kulturüberstand einer bakteriellen Expression detektierten rekombinanten AFP-scFv Fusionsproteine und scFv

E. coli XL1-Blue wurden mit den sieben pHENHi-scFv und den 23 klonierten pHENHi-AFP-scFv Vektoren (Tabelle 28) transformiert (2.2.1). Kulturen rekombinanter *E. coli* wurden mit IPTG (Endkonzentration 1mM) induziert und vier Stunden bei 28 °C und 160 UpM inkubiert (2.2.4.1). Ein ml dieser Kulturen wurde zentrifugiert, das Sediment in SDS-LB aufgenommen, 10 min bei 99 °C erhitzt und der Überstand nach Zentrifugation einer SDS-PAA-Gelelektrophorese zugeführt (2.2.4.5). Der Kulturüberstand wurde nach Inkubation der induzierten Bakterienkulturen üN bei 28 °C, 160 UpM analog zum Bakterienpellet behandelt. Die im 12 %-igen SDS-PAGE (2.2.4.5) elektrophoretisch aufgetrennten Proben wurden auf Nitrozellulose transferiert (2.2.4.7). Der Nachweise der rekombinanten Proteine erfolgte mittels α -cmv mAb (1 : 5000) und GAM^{AP} Fc (1 : 5000) mit anschließender Visualisierung durch NBT/BCIP. +: Proteinbande richtiger Größe im Immunoblot detektierbar, -: keine Bande detektierbar, n: nicht exprimiert, da Klonierung nicht abgeschlossen.

	Cec	D4E1	pHENHi GR7 (Pellet/Überstand)	Mag	ohne AFP
scFvPi5	n	+/-	+/-	+/-	+/+
scFvPi33	+/-	-/-	-/-	-/-	+/+
scFvPi86	n	+/-	+/-	+/-	+/+
scFvPi88	n	+/-	+/-	+/-	+/-
scFvPi102.2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+
scFvPi129	n	+/-	+/-	n	+/-
scFvODC3/2	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+

Mengenbestimmungen der affinitätsgereinigten Proteine ergaben für den scFvPi102.2 12 µg/l. Die Reinigungsausbeuten der Fusionsproteine betrugen etwa 70 ng (Cec-scFvPi102.2), 100 ng (D4E1-scFvPi102.2), 50 ng (GR7-scFvPi102.2) und etwa 900 ng (Mag-scFvPi102.2) pro Liter Bakterienkultur. Es war festzustellen, dass die Ausbeuten der AFP-scFv Fusionsproteine im Vergleich zum scFvPi102.2 um den Faktor 13 bis 240 niedriger waren. Dies deckte sich mit der Beobachtung, dass die Expression der AFPs D4E1, GR7 und Mag ohne Fusionspartner in *E. coli* XL1-Blue nicht möglich war. Kulturen von *E. coli*, die mit pHENHi-D4E1, pHENHi-GR7 und pHENHi-Mag transformiert waren, wiesen eine im Vergleich zu mit pHENHi-scFvPi102.2 transformierten *E. coli* stark verringerte Wachstumsrate auf. Dies äußerte sich darin, dass diese *E. coli* Kulturen nach sechs Stunden eine OD₆₀₀ von etwa 0,2 vorwiesen, wohingegen bei Kulturen der mit pHENHi-scFvPi102.2

transformierten *E. coli* bereits nach zwei bis drei Stunden eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 gemessen werden konnte. Dies lässt sich mit den bakteriziden Eigenschaften der AFPs erklären.

Die gereinigten Fusionsproteine wurden ausgehend von 0,4 µg/ml in serieller Verdünnung im ELISA auf Reaktivität gegenüber *P. infestans* Zellwandfragmenten getestet (2.2.4.8). Dabei konnte nach einer Stunde Substratinkubation nur für Mag-scFvPi102.2 eine Extinktion bei 405 nm detektiert werden (Abbildung 20). Für die Fusionsproteine Cec-scFvPi102.2, D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 konnte bei einer Konzentration von 0,4 µg/ml keine Reaktivität gegenüber *P. infestans* Zellwandfragmenten dokumentiert werden. Dies könnte an einer zu geringen Konzentration dieser Fusionsproteine, der Behinderung der Bindung des scFv durch das jeweilige AFP und/oder der Instabilität der Fusionsproteine liegen. Aus Zeitgründen wurde dies nicht weiter untersucht, zumal die Bindung von Mag-scFvPi102.2 nachgewiesen werden konnte, so dass eine zu geringe Konzentration bzw. die Instabilität der Fusionsproteine wahrscheinlicher war als die Behinderung der Bindung des scFvPi102.2 durch die AFPs Cec, D4E1 und GR7. Für die als Negativkontrolle verwendeten Cec-, D4E1-, GR7- und Mag-scFvODC3/2 Fusionsproteine war im ELISA kein Signal messbar (Abbildung 20).

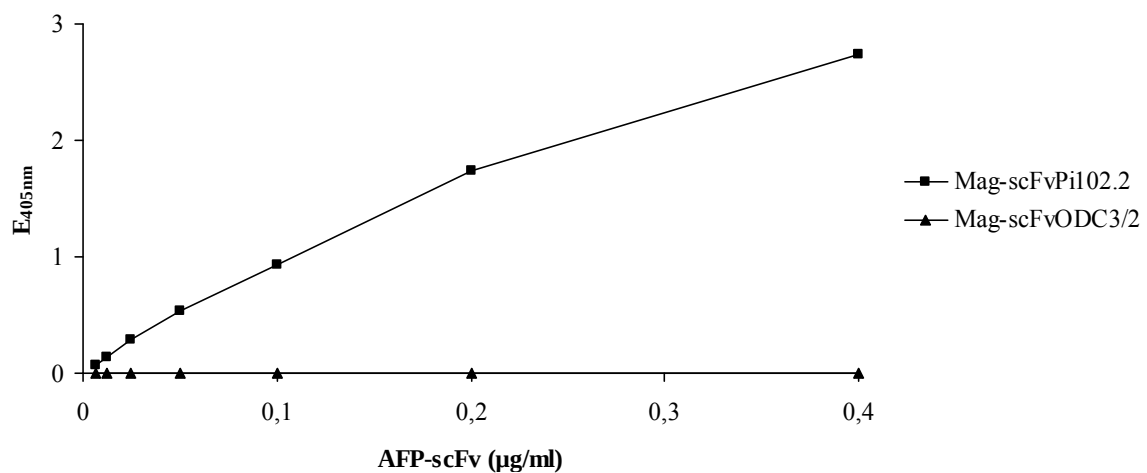


Abbildung 20: Reaktivität von AFP-scFv Fusionsproteinen gegenüber Zellwandfragmenten von *P. infestans*

ELISA Platten wurden mit Zellwandfragmenten von *P. infestans* (200 µg/ml TG) (2.2.3.2) beschichtet und mit den bakteriell in *E. coli* BL21 exprimierten (2.2.4.1) und via IMAC-Affinitätschromatographie gereinigten (2.2.4.2) Fusionsproteinen in serieller Verdünnung (0,006 bis 0,4 µg/ml) inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit α-cmyc mAb (1 : 5000) und GAM^{HRP} Fc (1 : 10000). Daten wurden nach 1 h Substratinkubation (ABTS) bei E_{405nm} ermittelt (2.2.4.8). Die Ergebnisse konnten in einem zweiten unabhängigen Versuch belegt werden.

Das Ergebnis zeigte, dass eine Bindung des scFvPi102.2 in Fusion mit dem AFP Mag an *P. infestans* erfolgt. Für die Durchführung von *in vitro* Inhibitionsversuchen waren die Ausbeuten der gereinigten Fusionsproteine zu gering. Im Anschluss an die bakterielle Expression wurden die AFP-scFv Fusionsproteine transient in Tabak exprimiert, um deren Reaktivität gegenüber *P. infestans* zu untersuchen (3.7.3).

3.7.3 Transiente Expression in *Nicotiana tabacum* und Charakterisierung

Zur Überprüfung der Funktionalität der Fusionsproteine D4E1-, GR7-, Mag-scFvPi5, Cec-, D4E1-, GR7-, Mag-scFvPi88, D4E1-, GR7-scFvPi102.2 und Mag-scFvODC3/2 wurden diese transient in *N. tabacum* exprimiert (2.2.6.3). Für die anderen pTRAc-Konstrukte (Tabelle 28) war die Transformation von *A. tumefaciens* zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch nicht abgeschlossen. Drei Tage nach der Infektion mit *A. tumefaciens* wurden jeweils 100 mg frische Blattmasse zur Extraktion löslicher Proteine verwendet (2.2.6.5). Bei der Analyse der Blattextrakte mittels Immunoblot (2.2.4.7) war keines der rekombinanten Proteine (D4E1-, GR7-, Mag-scFvPi5, Cec-, D4E1-, GR7-, Mag-scFvPi88, D4E1-, GR7-scFvPi102.2 und Mag-scFvODC3/2) detektierbar (Daten nicht dargestellt). Aus diesem Grund erfolgte nur die transiente Expression der Fusionsproteine D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 in *N. tabacum* (2.2.6.3, 2.2.6.5) mit anschließender Reinigung mittels IMAC-Affinitätschromatographie (2.2.4.3) sowie Analyse im Immunoblot (2.2.4.7) und ELISA (2.2.4.8). Dazu wurden Tabakblätter mit rekombinanten *A. tumefaciens* infiziert und nach einer Inkubation von drei Tagen zur Extraktion der Proteine verwendet. Der Nachweis der rekombinanten Proteine erwies sich in sofern als schwierig, dass die Akkumulationslevel so niedrig waren, dass diese im Blattextrakt nicht nachweisbar waren. Die Detektion gelang mittels Chemilumineszenz im Immunoblot unter Einsatz der Elutionsfraktion der aus mindestens 10 g frischer Blattmasse gereinigten Proteine. Die Reinigungsausbeuten waren jedoch zur Mengenbestimmung zu niedrig.

Zum Nachweis der Reaktivität der Fusionsproteine D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 gegenüber *P. infestans* wurden ELISA Platten mit Zellwandfragmenten von *P. infestans* beschichtet und mit den gereinigten Proteinen in serieller Verdünnung inkubiert (2.2.4.8). Die Bindung der AFP-scFv Fusionsproteine konnte nach Inkubation mit den entsprechenden Nachweisantikörpern und ABTS visualisiert werden. In Abbildung 24 sind die Extinktionswerte für die Fusionsproteine D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 dargestellt. Parallel wurde die gleiche Menge Tabakblätter analog zu den transformierten

Blättern behandelt und der Extrakt ebenfalls einer IMAC-Affinitätschromatographie zugeführt (2.2.4.3). Die entsprechende Elutionsfraktion wurde im ELISA als Negativkontrolle eingesetzt. Hier konnte kein Signal gemessen werden.

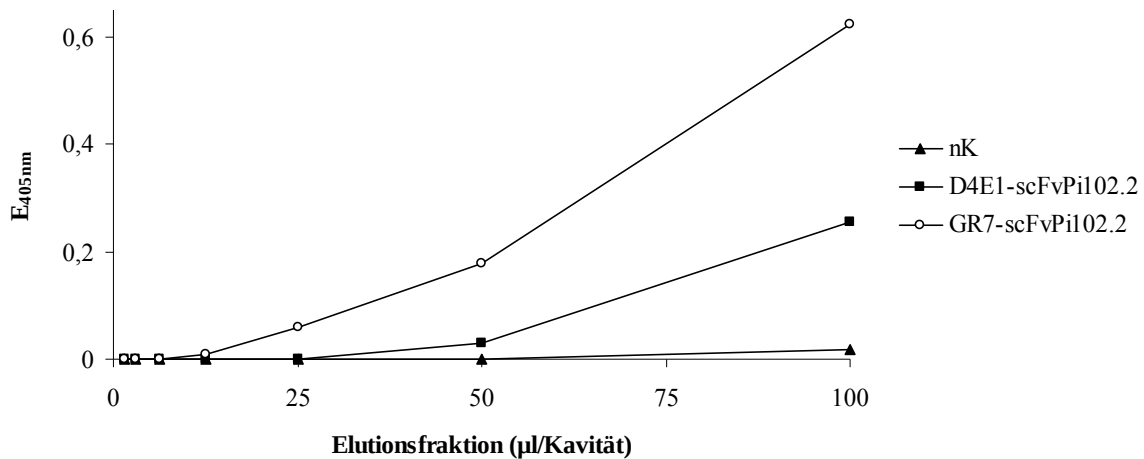


Abbildung 21: Reaktivität von AFP-scFv Fusionsproteinen gegenüber Zellwandfragmenten von *P. infestans*

ELISA Platten wurden mit Zellwandfragmenten von *P. infestans* (200 µg/ml TG) (2.2.3.2) beschichtet und mit den transient in *N. tabacum* exprimierten (2.2.6.3) und via IMAC-Affinitätschromatographie gereinigten Fusionsproteinen (2.2.6.5, 2.2.4.2) in serieller Verdünnung (1,56 bis 100 µl Elutionsfraktion) inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit RAhis (1 : 5000) und GAR^{HRP} Fc (1 : 10000). Daten wurden nach 1 h Substratinkubation (ABTS) bei E_{405nm} ermittelt (2.2.4.8). Als Negativkontrolle diente die Elutionsfraktion des in gleicher Weise gereinigten Extraktes von Wildtyp tabakblättern. nK: Negativkontrolle.

Die Daten zeigten, dass die transient in *N. tabacum* exprimierten Fusionsproteine D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 funktional sind und an *P. infestans* binden. Folglich eigneten sich diese zur Herstellung transgener Kartoffelpflanzen (3.8). Zuvor wurde im Wirt-Pathogen-System *N. tabacum*-*P. nicotianae* getestet, ob bei transienter Expression der Fusionsproteine Cec-scFvPi86, D4E1-scFvPi102.2, GR7-scFvPi102.2 und Mag-scFvPi102.2 in *N. tabacum* eine Inhibierung von *P. nicotianae* beobachtet werden kann (3.7.4).

3.7.4 Inhibitionsversuche

Da die geringen Reinigungsausbeuten der bakteriell (3.7.2) bzw. transient (3.7.3) exprimierten Fusionsproteine Cec-, D4E1-, GR7- und Mag-scFvPi102.2 die erfolgreiche Durchführung von *in vitro* Inhibitionsversuchen nicht zuließen, musste ein System verwendet werden, das eine Nachlieferung des Fusionsproteins während der Entwicklung des Pathogens gewährleistete. Hierzu bot sich die Nutzung des Wirt-Pathogen-Systems

N. tabacum-*P. nicotianae* an. Bei transienter Expression des Fusionsproteins in *N. tabacum* kann davon ausgegangen werden, dass dieses über einen gewissen Zeitraum exprimiert wird. *P. nicotianae* ist im Gegensatz zu *P. infestans* in der Lage *N. tabacum* zu infizieren und eignet sich als Testsystem, da der mAkPi102.2, auf dem der scFvPi102.2 basiert, auch an dieses Pathogen bindet.

Tabakblätter wurden an intakten Pflanzen mit den entsprechend vorbereiteten Suspensionen rekombinanter *A. tumefaciens*, die mit pTRAc-scFvPi102.2, pTRAc-Cec-scFvPi86, pTRAc-D4E1-scFvPi102.2, pTRAc-GR7-scFvPi102.2, pTRAc-Mag-scFvPi102.2, pTRAc-scFvODC3/2, pTRAc-Cec-scFvODC3/2 und pTRAc-Mag-scFvODC3/2 transformiert waren, inokuliert (2.2.6.3). Da zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung das pTRAc-Cec-scFvPi102.2 Konstrukt noch nicht kloniert war, wurde der Versuch ersatzweise mit pTRAc-Cec-scFvPi86 durchgeführt. Die Aminosäuresequenz des scFvPi86 ist bis auf elf Aminosäuren identisch mit der des scFvPi102.2 (3.6.1). Ferner bindet der dem scFvPi86 entsprechende mAkPi86 wie der mAkPi102.2 an *P. nicotianae* (3.3.2.4). Die OD₆₀₀ aller zur Injektion von Tabakblättern verwendeten *A. tumefaciens* Suspensionen wurde auf den gleichen Wert eingestellt und mit Hilfe einer Spritze in die Blätter appliziert. Nach drei Tagen wurden die Blätter mit der Blattunterseite nach oben auf feuchtes Papier in Petrischalen gelegt und durch Aufbringen von etwa 1 cm² großen mit Myzel von *P. nicotianae* bewachsenen Agarstücken inokuliert (2.2.6.6).

Die Auswertung erfolgte nach dreiwöchiger Inkubation bei Raumtemperatur und 100 % Luftfeuchtigkeit durch Vergleich der durch *P. nicotianae* hervorgerufenen Läsionen. Zum Zeitpunkt der Auswertung konnte bei den mit Cec-scFvPi86 und GR7-scFvPi102.2 transformierten Tabakblättern im Vergleich zum scFvPi102.2 alleine eine geringere Entwicklung der durch *P. nicotianae* verursachten Läsionen festgehalten werden. Bei den schwarzen kleineren Punkten auf den Blättern handelt es sich um die Injektionsstellen der *A. tumefaciens* Suspensionen. Die größeren gelben bis braunen meist kreisförmigen Stellen sind die durch *P. nicotianae* verursachten Läsionen (Abbildung 22, oberste Reihe). Der inhibitorische Effekt gegenüber *P. nicotianae* bei mit Cec-scFvPi86 und GR7-scFvPi102.2 transformierten Tabakblättern im Vergleich zu dem scFvPi102.2 alleine konnte in einem weiteren Versuch bestätigt werden. Hier wurden als weitere Kontrolle Blätter mit Cec-scFvODC3/2 transformiert. Diese wiesen drei Wochen nach der Inokulation mit *P. nicotianae* eine mit scFvPi102.2, scFvODC3/2, Mag-scFvPi102.2 vergleichbare Symptomentwicklung auf (Abbildung 22). Dies zeigte (unter der Annahme, dass die

Akkumulationslevel vergleichbar waren), dass die Inhibierung der durch *P. nicotianae* verursachten Symptome auf die Kombination des AFP Cec mit dem scFvPi86 zurückzuführen war. Eine entsprechende Kontrolle für GR7-scFvPi102.2 konnte nicht durchgeführt werden, da zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung die Klonierung von pTRAc-GR7-scFvODC3/2 noch nicht abgeschlossen war. Bei den gleichen Versuchen mit Mag-scFvPi102.2 konnte kein Unterschied der Symptomentwicklung im Vergleich zu den scFvPi102.2 und Mag-scFvODC3/2 Kontrollen beobachtet werden (Abbildung 22). Die Durchführung dieses Experiments mit D4E1-scFvPi102.2 konnte nicht zu Ende geführt werden, da in allen Wiederholungsversuchen wenige Tage nach der Inokulation mit *A. tumefaciens* ein Verbräunen der Blätter festgestellt werden musste (Daten nicht dargestellt). Die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden.

Eine Relation der Entwicklung von Symptomen durch *P. nicotianae* zum Akkumulationslevel der transient exprimierten Proteine konnte nicht aufgestellt werden, da der Nachweis der rekombinanten Proteine, wie unter 3.7.3 dargestellt, nur nach Reinigung des Proteins aus mindestens 10 g frischer Blattmasse in der Elutionsfraktion mittels Chemilumineszenz im Immunoblot möglich war.

Zusammenfassend blieb festzuhalten, dass durch die transiente Expression der Fusionsproteine Cec-scFvPi86 und GR7-scFvPi102.2 in *N. tabacum* eine Inhibierung von *P. nicotianae* auftrat. Dieser inhibitorische Effekt war für Mag-scFvPi102.2 nicht festzustellen. Der Inhibitionsversuch mit D4E1-scFvPi102.2 konnte aufgrund des frühzeitigen Verbräunens der Blätter nicht zu Ende geführt werden, so dass die Frage, ob dieses Fusionsprotein eine Inhibierung des Pathogens hervorruft, offen blieb.

Die Vektoren pTRAc-D4E1-scFvPi102.2 und pTRAc-GR7-scFvPi102.2 wurden im Folgenden zur Herstellung transgener Kartoffelpflanzen verwendet, welche auf Resistenz gegenüber *P. infestans* getestet wurden (3.8).

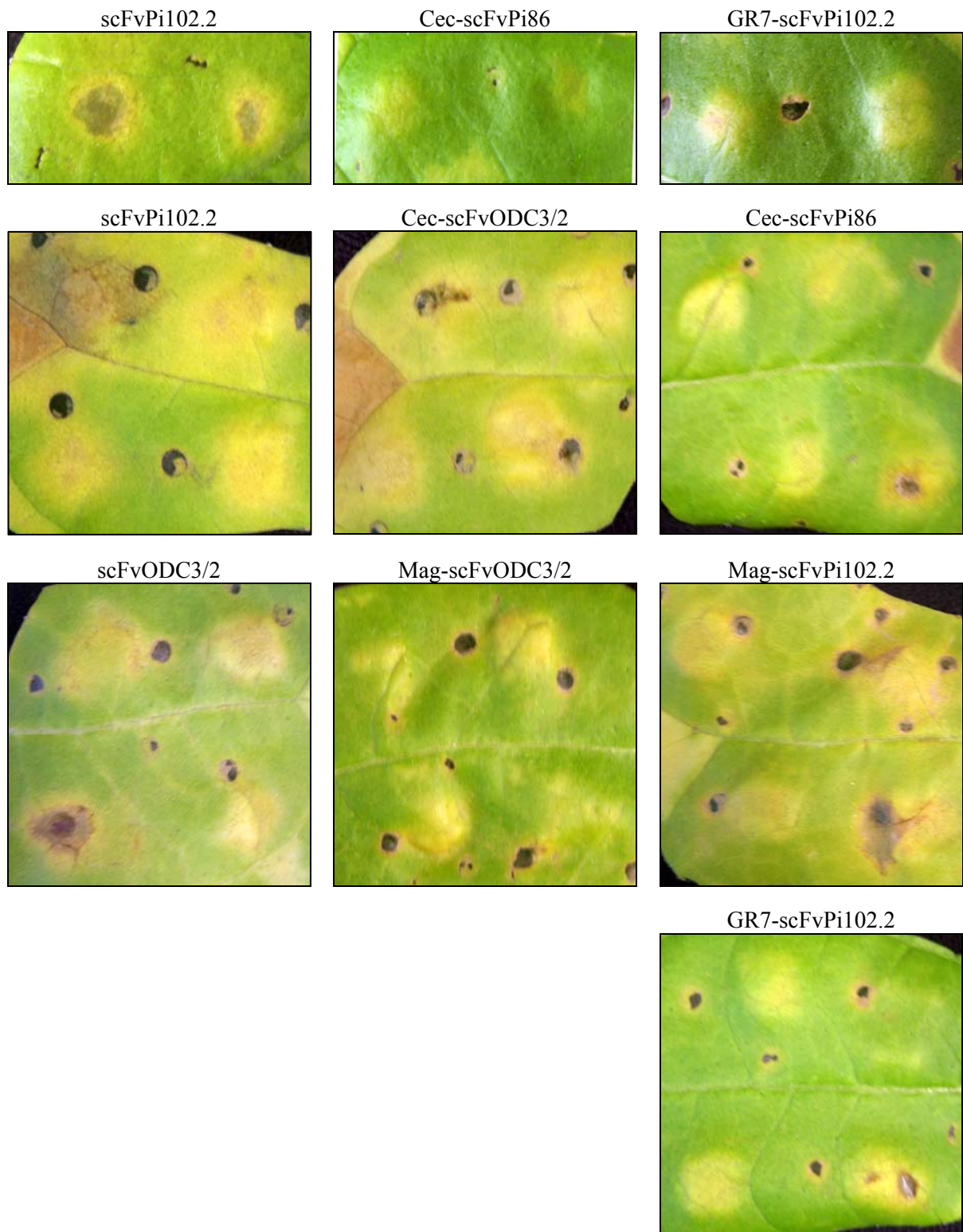


Abbildung 22: Inhibition von *P. nicotianae* durch transiente Expression von AFP-scFv Fusionsproteinen in *N. tabacum*

Der scFvPi102.2 sowie Cec-scFvPi86 und GR7-scFvPi102.2 wurden mittels *A. tumefaciens* transient in Tabakblättern exprimiert (2.2.6.3). Drei Tage nach der Inokulation wurden die Tabakblätter mit der Oberseite nach unten auf feuchtes Papier in Petrischalen gelegt und mit *P. nicotianae* inokuliert (2.2.6.6) (1 cm² große mit Myzel bewachsene Agarstücke). Die Inkubation erfolgte bei RT und 100 % Luftfeuchte. Bilder wurden drei Wochen nach der Inokulation aufgenommen.

3.8 Herstellung und Charakterisierung transgener Kartoffelpflanzen

Zur Herstellung transgener Kartoffelpflanzen der Sorten Gala und Pirol wurden die beiden Konstrukte pTRAc-D4E1-scFvPi102.2 und pTRAc-GR7-scFvPi102.2 verwendet (2.2.6.4). Von Blättern regenerierter Pflanzen wurde genomische DNS isoliert und diese zur Überprüfung der Integration der Fremd-DNS in das Pflanzengenom mittels PCR unter Verwendung V_H-spezifischer Oligonukleotide untersucht (2.2.2.12.5). Nach Auftrennung der PCR-Reaktionen im 1,2 %-igen (w/v) Agarosegel (2.2.2.7) konnten Kartoffellinien, die das Transgen enthielten, anhand einer definierten etwa 400 bp großen DNS-Bande identifiziert werden (Daten nicht dargestellt). Für die Kartoffelsorte Gala konnten so 21 transgene Linien, die das Transgen D4E1-scFvPi102.2 und vier Linien, die die Sequenz von GR7-scFvPi102.2 enthielten, identifiziert werden. Fünf Linien der Kartoffelsorte Pirol enthielten das Transgen D4E1-scFvPi102.2 und 21 GR7-scFvPi102.2.

Zur Detektion der rekombinanten Proteine D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 wurden Kartoffelblätter in zwei Volumen 1x PBS homogenisiert und der nach Zentrifugation erhaltene Extrakt im ELISA eingesetzt. Zum einen wurde der Blattextrakt zur Beschichtung von ELISA Platten verwendet, zum anderen zu mit *P. infestans* Zellwandfragmenten beschichteten ELISA Platten gegeben (2.2.4.8). Die rekombinanten Proteine konnten weder im Blattextrakt nachgewiesen, noch konnte eine Bindung der rekombinanten Proteine an *P. infestans* Zellwandfragmente gemessen werden. Anzunehmen war, dass die Akkumulationslevel der Fusionsproteine D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 zur Detektion zu gering waren. Dies ist konform mit den transient in *N. tabacum* exprimierten Fusionsproteinen D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2. Hier war ein Nachweis der Fusionsproteine erst nach deren Reinigung aus mindestens 10 g Blattmasse im Immunoblot mittels Chemilumineszenz sowie im ELISA möglich war (3.7.3). Ein derartiger Konzentrierungsprozess war für die stabil in Kartoffeln exprimierten Proteine nicht machbar, da hierzu in der T₀-Generation nicht genügend Pflanzenmaterial zur Verfügung stand.

Um festzustellen, ob die transgenen Pflanzen der Sorte Pirol Resistenz gegenüber *P. infestans* aufweisen, wurden Blätter aus dem mittleren Drittel der Pflanzen mit der Unterseite nach oben auf befeuchtetes Papier in Petrischalen gelegt. Sporangien von *P. infestans* wurden von dem auf V8-Agar gewachsenen Pathogen mit sterilem Leitungswasser isoliert und die Sporangienkonzentration auf 1x10⁴ Sporangien/ml eingestellt. Bei 4 °C erfolgte die Entlassung der Zoosporen, deren Vitalität mikroskopisch untersucht wurde. Nur wenn mindestens 80 % der Sporangien Zoosporen entließen und die Mobilität der

begeißelten Zoosporen beobachtet werden konnte, wurden diese zur Inokulation der Blätter verwendet. Von den so erhalten Zoosporen in Leitungswasser wurden je zwei Tropfen pro Blatt aufgebracht. Die Bonitur erfolgte fünf Tage nach der Inokulation (2.2.6.7). Als Kontrollen dienten Wildtyppflanzen der gleichen Sorte. Da die Pflanzen noch sehr klein waren, konnte dieser Versuch nur mit vier der fünf (D4E1-scFvPi102.2) und 15 der 21 (GR7-scFvPi102.2) transgenen Linien der Sorte Pirol durchgeführt werden. Außerdem konnten von den jungen Pflanzen nur maximal drei Blätter für den Versuch genommen werden. Die Einstufung der Resistenz erfolgte makroskopisch anhand der Dichte weißer Sporangienträger auf der Blattoberfläche.

Die Blätter der Wildtyppflanzen waren fünf Tage nach der Inokulation zu 100 % befallen und wiesen auf der gesamten Blattfläche weiße Sporangienträger auf (Abbildung 23 A). Für die das Transgen D4E1-scFvPi102.2 enthaltenden Pflanzen konnte eine zu 100 % befallsfreie Linie (#10) identifiziert werden. Linie #12 zeigte keine Unterschiede zum Wildtyp und die beiden Linien #2 und #8 zeigten eine erhöhte Resistenz, was sich in einer im Vergleich zum Wildtyp geringeren Dichte der Sporangienträger auf der Blattoberfläche äußerte. Ferner war eines der von Linie #2 getesteten Blätter befallsfrei (Daten nicht dargestellt). Für die 15 getesteten das Transgen GR7-scFvPi102.2 enthaltenden Linien wiesen fünf (#11, 18, 25, 26, 35) keinen optischen Unterschied zum Wildtyp auf. Auf Blättern der Linien #1, 8, 9, 10, 13, 16, 17 und 22 konnte eine geringere Dichte des Sporangienträgers dokumentiert werden. Darüber hinaus waren bei den Linien #9, 10, 13 und 22 von den drei je Linie untersuchten Blättern ein bis zwei Blätter ohne erkennbare Sporangienträger (Abbildung 23 B, C). Die Linien #14 und #24 waren zu 100 % resistent, was sich in einer Nekrotisierung der Inokulationsstelle sowie befallsfreien Blättern ohne sichtbare Sporangienträger äußerte (Abbildung 23 D). Da der Nachweis der Fusionsproteine D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 nicht möglich war, konnte eine Relation der Akkumulationslevel zum Grad der Resistenz der transgenen Pflanzen gegenüber *P. infestans* nicht aufgestellt werden.

Abschließend ist festzuhalten, dass unter den die Transgene D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 enthaltenden Kartoffelpflanzen der Sorte Pirol Linien identifiziert werden konnten, die zu 100 % resistent gegen *P. infestans* waren. Dies äußerte sich in einer Nekrotisierung der Inokulationsstelle sowie befallsfreien Blättern ohne erkennbare Sporangienträger. Zur näheren Untersuchung der Inokulationsstellen von Blättern der resistenten Pflanzen wurden diese in Chloralhydrat fixiert. Die dadurch entfärbten Blätter sollen nach Anfärben des Pathogens mikroskopisch analysiert werden. Zur Verifizierung der Ergebnisse sowie zur Durchführung von Resistenztests mit den transgenen Linien der Sorte

Gala werden die Pflanzen derzeit herangezogen und anschließend durch Stecklinge vermehrt. Dadurch steht dann auch genügend Blattmaterial zum Nachweis sowie zur Bestimmung der Akkumulationslevel der Proteine D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 zur Verfügung.

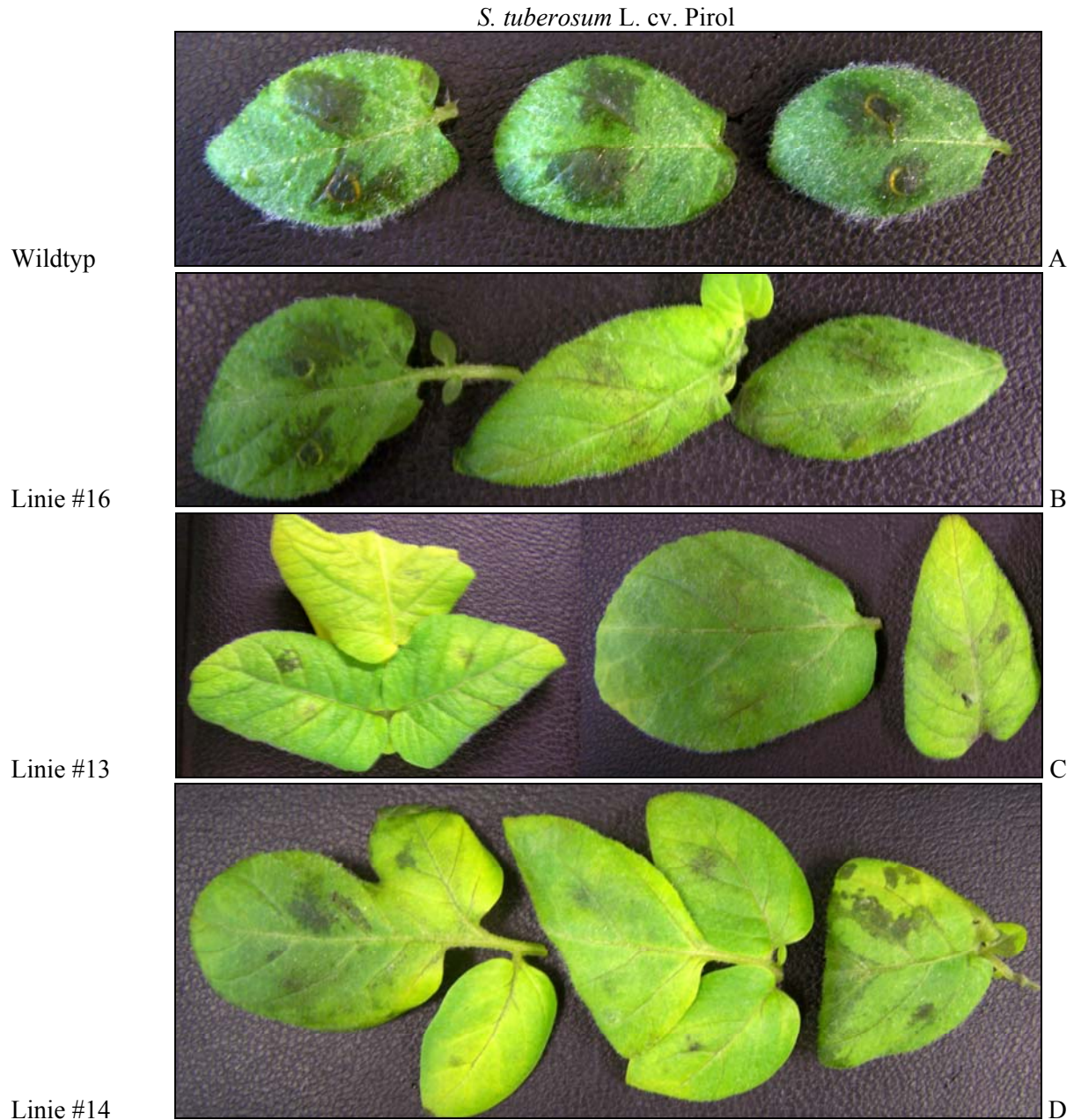


Abbildung 23: Resistenz transgener *S. tuberosum* L. cv. Pirol gegenüber *P. infestans*

Blätter transgener Kartoffelpflanzen (2.2.6.4) der Sorte Pirol, die das Transgen GR7-scFvPi102.2 enthielten wurden aus dem mittleren Drittel der Pflanzen entnommen und mit der Unterseite nach oben auf feuchtes Papier in Petrischalen gelegt. Die Inokulation erfolgte durch Aufbringen von fünf μl einer Zoosporenlösung (1×10^4 Sporangien/ml) an je zwei Stellen eines Blattes (2.2.6.7). Bilder wurden fünf Tage nach der Inokulation aufgenommen. A: Blätter von mit *P. infestans* inokulierter Wildtyppflanzen, B: Blätter der Linie #16, die im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Sporulation aufweisen, C: Blätter der Linie #13, von denen eins eine geringere Sporulation im Vergleich zum Wildtyp und für zwei keine Sporangienträger auf der Blattfläche sichtbar waren, D: Blätter der Linie #14 weisen keine sichtbaren Sporangienträger vor.

4 DISKUSSION UND AUSBLICK

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung *P. infestans*-spezifischer scFv zur Herstellung pathogenresistenter Kartoffelpflanzen. Dazu wurden *P. infestans*-spezifische monoklonale Antikörper (mAk) und scFv unter Anwendung der Hybridomatechnologie (3.3.1) sowie des Phagendisplay (3.5) hergestellt. Die mAk wurden hinsichtlich Isotyp (3.3.2.1), Antigenspezifität im Immunoblot (3.3.2.2) und mittels Fluoreszenzmikroskopie (3.3.2.5) sowie Reaktivität gegenüber *P. infestans* (3.3.2.3) und Vertretern der Ascomyceten, Basidiomyceten und Oomyceten charakterisiert (3.3.2.4). Die mAkPi86, 88, 102.2, 102.4 und 129 wurden zur Klonierung von scFv herangezogen (3.3.3). Die auf den mAk basierenden scFv und die aus dem Phagendisplay erhaltenen avianen scFvPi46 und 68 sowie murinen scFvPi5 und 33 wurden analog zu den mAk untersucht (3.6). Ausgewählte scFv wurden zur Fusion mit den antifungalen Peptiden (AFP) Cec, D4E1, GR7 und Mag verwendet (3.7.1). Die Fusionsproteine wurden zur Überprüfung der Funktionalität bakteriell in *E. coli* (3.7.2) und transient in *N. tabacum* exprimiert (3.7.3). Erste Hinweise auf einen inhibitorischen Effekt der Fusionsproteine D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 gegenüber *P. nicotianae* konnten nach transienter Expression dieser in *N. tabacum* und Inokulation mit *P. nicotianae* erhalten werden (3.7.4). Beide Konstrukte wurden zur Herstellung transgener Kartoffelpflanzen der Sorte Gala und Pirol verwendet (3.8). Bei Inokulationsversuchen von Blättern transgener Linien der Sorte Pirol mit *P. infestans* konnten für beide Konstrukte Pflanzen identifiziert werden, deren inokulierte Blätter fünf Tage nach der Inokulation im Gegensatz zu den Kontrollpflanzen keinen sichtbaren Befall aufwiesen (3.8).

4.1 Antigene und Immunisierung

Die Grundvoraussetzung zur Selektion hochspezifischer Antikörper mittels Hybridomatechnologie und Phagendisplay ist die effiziente Stimulierung der Zellen des Immunsystems durch Hyperimmunisierung eines Tieres. Da die Herstellung von Antikörpern, die native Oberflächenantigene der im Blattgewebe wachsenden Hyphen von *P. infestans* erkennen, das Ziel war, sollte das zur Immunisierung verwendete Antigen diesen strukturell so ähnlich wie möglich sein. Sporangien und Zoosporen, die sich ausschließlich auf der Pflanzenoberfläche befinden, sowie lösliche Proteine des Pathogens kamen aufgrund der Zielsetzung nicht in Frage. Als Antigen zur Immunisierung von Hühnern und Mäusen wurde

die Zellwand des Oomyceten *P. infestans* verwendet. Dazu wurde Myzel weitestgehend von Sporangien und Medienbestandteilen befreit, zerkleinert und zur Entfernung cytosolischer Bestandteile mehrfach gewaschen (3.1). Ähnliche Verfahren zur Herstellung pilzlicher Antigene sind beschrieben, wobei die zur Immunisierung eingesetzten Mengen mit 50 µg bis 3000 µg Trockengewicht stark voneinander abweichen (Bermingham *et al.* 1995, Burdsall und Banik 1990, Dewey *et al.* 1989, Dorfmueller 2002, Peschen 2002, Ste-Marie *et al.* 1990, White *et al.* 1994).

Eine Steigerung des Antikörpertiters im Verlauf der Immunisierung deutet in der Regel auf eine Anreicherung von B-Lymphozyten, die spezifische Antikörper produzieren, hin. Die durch Immunisierung von Hühnern erreichten finalen Antikörpertiter lagen bei 1 : 30.000 bzw. 1 : 250.000. Die Titer der Mäuse waren mit über 1 : 1.000.000 bzw. 1 : 3.000.000 deutlich höher (3.2). Dies sprach für einen Erfolg der Immunisierungsstrategie. Der Antikörpertiter der Mäuse war im Vergleich zu dem der Hühner maximal 100 Mal höher. Diese Feststellung deckt sich mit Daten von Dorfmueller (2002). Hier konnte nach Immunisierung mit Myzelpräparationen von *Verticillium dahliae* ein 20-fach und nach Immunisierung mit Myzelpräparationen von *Phoma lingam* ein 128-fach höherer Antikörpertiter bei Mäusen im Vergleich zu den mit dem gleichen Antigen immunisierten Hühnern ermittelt werden. Zu niedrige und zu hohe Antigenmengen bei der Immunisierung führen zu einer geringen Immunantwort. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass die zur Immunisierung der Hühner eingesetzten Mengen nicht im optimalen Bereich lagen.

Hühner bieten bei der Bestimmung des Antikörpertiters sowie bei der Klonierung der scFv-Bibliothek Vorteile gegenüber Mäusen. So konnten die zur Titerbestimmung benötigten polyklonalen IgY aus dem Eigelb isoliert werden, während bei Mäusen die Entnahme von Blut notwendig war. Ferner konnten die variablen Antikörperdomänen der Hühner aufgrund fehlender Variabilität der FR1 und FR4 mit jeweils einem Primerpaar für die V_H und die V_L amplifiziert werden (Hof *et al.* 2008, Yamanaka *et al.* 1996). Im Gegensatz dazu waren zur Amplifizierung der murinen Antikörpersequenzen 41 familienspezifische Oligonukleotide notwendig, um die gesamte Antikörperdiversität zu erfassen (3.4.1).

4.2 *Phytophthora infestans*-spezifische monoklonale Antikörper und korrespondierende scFvs

Der Fokus zur Herstellung *P. infestans*-spezifischer Antikörper wurde aufgrund der anfangs ausbleibenden Selektion eines *P. infestans*-spezifischen scFv mittels Phagendisplay

unter Einsatz einer naïven avianen scFv-Bibliothek (van Wyngaardt *et al.* 2004) sowie einer immunadaptierten avianen scFv-Bibliothek (3.5.2) auf die Herstellung monoklonaler Antikörper mittels Hybridomatechnologie gelegt. Mit dieser Technologie konnten zwölf *P. infestans*-spezifische mAk generiert werden (3.3.1).

Die erhaltenen mAk waren aufgrund der verwendeten Nachweisantikörper zur Detektion *P. infestans*-spezifischer mAk während der Klonierung der Hybridomazellen ausschließlich vom IgG- oder IgM-Isotyp, wobei alle selektierten IgG den IgG₁-Subtyp aufwiesen. Bei den drei von Maus 1 erhaltenen mAk handelte es sich um IgM mit kappa leichten Ketten. Dagegen konnten aus der Fusion der Milzzellen von Maus 2 drei IgG und sechs IgM kloniert werden, wobei bei 44 % der mAk lambda leichte Ketten festzustellen waren (3.3.2.1). Dies ist zunächst aufgrund der bei Mäusen vorhandenen Deletion im lambda Gencluster und der daraus resultierenden Expression von kappa leichten Antikörperketten mit einem Anteil von 95% erstaunlich. Jedoch ist vielfach beschrieben, dass nach Immunisierung mit Myzel- und Sporenpräparationen sowie Pathogenen mit Polysaccharidkapsel die überwiegende Bildung von IgM und ein hoher Anteil von lambda leichten Antikörperketten festzustellen war (Bermingham *et al.* 1995, Casadevall und Scharff 1991, Ste-Marie *et al.* 1990, White *et al.* 1994). Das trotz des hohen Anteils von IgM ein Klassenwechsel von IgM zu IgG₁ stattgefunden haben muss, kann neben der Tatsache, dass bei der Titerbestimmung IgG-spezifische Nachweisantikörper verwendet wurden (3.2), auch anhand der Sequenzen der variablen Domänen der mAkPi86 (IgM) und mAkPi102.2 (IgG₁) belegt werden (3.6.1). Diese unterscheiden sich nur in elf Aminosäuren, von denen sechs in den CDR der V_H lokalisiert sind. Es ist anzunehmen, dass mAkPi86 und mAkPi102.2 auf die gleiche B-Zelle zurückzuführen sind, wobei die Aminosäureunterschiede durch somatische Hypermutation entstanden sind.

Die überwiegende Selektion von IgM trotz hohem IgG-Serumtiter (3.2, 3.3.1) und allgemein höherer Stabilität von IgG könnte dadurch erklärt werden, dass der Großteil der IgG Affinität zu Epitopen aufwies, die nur bei den zur Immunisierung verwendeten Zellwandfragmenten, nicht aber bei dem nativen Pathogen zugänglich waren. Diese Vermutung wurde durch die Ergebnisse des „Screenings“ der Hybridomakulturen, wo sich die Anzahl *P. infestans*-spezifischer polyklonaler IgG von 52 auf vier durch Wechsel des im ELISA verwendeten Antigens von Zellwandfragmenten auf gekeimte Sporangien und Zoosporen reduzierte, untermauert. Demgegenüber erkannte etwa die Hälfte der IgM, die Reaktivität gegenüber den Zellwandfragmenten zeigte, auch Epitope der gekeimten Sporangien und Zoosporen (3.3.1). Nicht auszuschließen ist jedoch die Verdrängung

spezifische mAk produzierender Zelllinien durch andere Hybridomazellen in der polyklonalen Kultur. Durch die Verwendung gekeimter Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* als Antigene im ELISA sollte die Selektion mAk, die an Epitope binden, die im nativen Zustand des Pathogens nicht zugänglich sind, ausgeschlossen werden.

Die Untersuchung der mAk auf Kreuzreaktivität (3.3.2.4) gegenüber anderen Pathogenen sollte zum einen eine hohe Spezifität des Antikörpers für *P. infestans* sicherstellen, um mögliche negative Effekte auf Nutzorganismen ausschließen zu können. Zum anderen hätten möglicherweise bei Reaktivität gegenüber einem oder mehreren Krankheitserregern der Kartoffel Synergieeffekte insofern genutzt werden können, dass durch Einbringen einer Expressionskassette transgene Pflanzen mit Resistenz gegenüber mehreren Pathogenen hergestellt werden könnten. Neben *P. infestans* kann die Kartoffel unter anderem noch von *Phytophthora erythroseptica*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, *Alternaria solani*, *Fusarium* sp., *Botrytis* sp. und *Verticillium* sp. befallen werden. Vor diesem Hintergrund erwiesen sich der mAkPi76, der sowohl Epitope der eingesetzten Oomyceten, als auch von *A. alternata*, *F. culmorum* und *R. solani* erkannte, und der mAkPi107, welcher neben Spezifität für Oomyceten auch Reaktivität gegenüber *A. alternata*, *B. cinerea* und *V. dahliae* aufwies, als besonders interessant. Zu testen wäre in diesem Zusammenhang, ob beide mAk auch Epitope der oben genannten Kartoffel-pathogenen Erreger, die für die Untersuchungen leider nicht zur Verfügung standen, sowie solche von Nichtzielorganismen erkennen. Da für mAkPi76 auch Kreuzreaktivität zu Kartoffelblattextrakt und V8-Medium festgestellt werden konnte (3.3.2.3), wurde dieser trotz der aufgezeigten Vorzüge nicht weiter bearbeitet. Ferner wiesen die beiden mAkPi76 und 107 im vergleichenden ELISA eine geringere Reaktivität gegenüber *P. infestans* auf als der mAkPi86 (3.3.2.3). Weiterhin war anzunehmen, dass nach Klonierung der entsprechenden scFv je nach Epitopspezifität aufgrund möglicher Aviditätseffekte eine deutlich geringere Affinität zu beobachten sein kann, zumal es sich um IgM handelt. Roggenbuck *et al.* (1994) wiesen eine 800-fach geringere Bindungskonstante des scFv eines polyreaktiven IgM mit Spezifität für kappa Kasein und humanem Myoglobin nach.

Im Rahmen der zur Untersuchung der Kreuzreaktivität der mAk eingesetzten Organismen fiel auf, dass der mAkPi109 neben *Phytophthora* Arten und *P. ultimum* auch Affinität zu *F. culmorum*, *T. viride* und *V. dahliae* hatte. Der mAkPi88 zeigte zusätzlich zu den von mAkPi109 erkannten Pathogenen Affinität zu *C. destructans* (3.3.2.4). *C. destructans*, *F. culmorum*, *T. viride* und *V. dahliae* gehören innerhalb der Abteilung der Ascomycota zur Klasse der Sordariomycetes. Deshalb scheint das von mAkPi88 und 109 bei *P. infestans*

erkannte Epitop strukturelle oder sequentielle Homologie oder Ähnlichkeit mit Epitopen anderer Oomyceten sowie Vertretern der Klasse der Sordariomycetes innerhalb der Abteilung der Ascomycota aufzuweisen.

Die mAkPi86 und 102.2 waren im Rahmen der getesteten Organismen Oomyceten-spezifisch (3.3.2.4). Zu untersuchen bleibt, ob diese mAk auch Affinität zu dem Kartoffelpathogen *P. erythroseptica* aufweisen, welcher für die Untersuchungen leider nicht zur Verfügung stand.

Die exakte Ermittlung der Dissoziationskonstanten der mAk war aufgrund der Heterogenität des verwendeten Antigens nicht möglich. Aus diesem Grund erfolgte ein Vergleich der im ELISA ermittelten Extinktionswerte bei Einsatz gleicher Antigen- und Antikörperkonzentrationen (3.3.2.3). Dies konnte jedoch nur Hinweise auf die Reaktivität der mAk gegenüber *P. infestans* geben, da erstens anzunehmen war, dass die Antikörper an unterschiedliche Epitope banden und zweitens nicht bekannt war, wie häufig das jeweilige Epitop in der Antigenpräparation auftrat. Die beiden mAkPi86 und 102.2 wiesen im Vergleich mit den anderen IgM bzw. IgG die höchste Reaktivität gegenüber *P. infestans* auf. In Kombination mit der ermittelten Spezifität für Oomyceten (3.3.2.4) machte dies diese beiden mAk im Hinblick auf die Verwendung der korrespondierenden scFv zur Fusion mit antifungalen Peptiden (3.7.1) und der Expression der Fusionsproteine in transgenen Kartoffelpflanzen mit dem Ziel eine Resistenz gegenüber *P. infestans* hervorzurufen (3.8) besonders interessant.

Anhand immunofluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen konnten die Epitope der mAkPi76, 86, 88, 102.2, 107 und 129 in oder auf der Hyphen- und Sporangienwand lokalisiert werden (3.3.2.5). Ferner schienen die Epitope gleichmäßig über das gesamte Pathogen verteilt zu sein. Eine Ausnahme stellte der mAkPi88 dar, welcher einzelne unregelmäßig über die gesamte Oberfläche des Pathogens verteilte Strukturen erkannte. Da es für die Zielerreichung der Arbeit wichtig sein könnte, eine möglichst hohe Anzahl der AFP-scFv Fusionsproteine auf der Pathogenoberfläche anzureichern, wurden die mAkPi86 und 102.2, die im vergleichenden ELISA die höchsten Extinktionen hervorriefen (3.3.2.3), zur Klonierung der korrespondierenden scFvPi86 und 102.2 ausgewählt (3.3.3).

Um zu untersuchen, ob der mAkPi102.2 alleine die Infektiosität von *P. infestans* beeinflusst, wurden Inhibitionsversuche durchgeführt (3.3.2.7). Diese zeigten, dass der mAkPi102.2 Infektion und Befall von Kartoffelscheiben mit *P. infestans* nicht verhindern konnte (3.3.2.7). Dies ist analog zu Beobachtungen von Gough *et al.* (1999), wo bei *P. infestans*-spezifischen scFv keine antifungale Aktivität nach Inkubation dieser mit

Sporangien von *P. infestans* und Inokulation von Tomatenblättern festgestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten Selvakumar *et al.* (2006) zeigen, dass anti-idiotypische scFv, die gegen einen das „HM-1 killer toxin“ von *Williopsis saturnus* var. *mrakii* neutralisierenden mAk gerichtet waren, antifungale Aktivität gegenüber *Candida sp.* bei Konzentrationen von 1,56 bis 12,5 µg/ml aufwiesen. Die für die scFv angegebenen IC₅₀-Werte liegen zwischen 73 und 160 nM.

Die Klonierung der variablen Antikörperdomänen der mAkPi86, 88, 102.2, 102.4 und 129 erfolgte mittels RACE-PCR (3.3.3). Dies hat gegenüber der Verwendung der zur Herstellung der scFv-Phagenbibliotheken eingesetzten degenerierten Primer den Vorteil, dass erstens sofern Bedarf besteht, die gesamte den Antikörper kodierende Sequenz amplifiziert und sequenziert werden kann. Und zweitens scFv Fragmente ohne die sonst durch die degenerierten Primer möglicherweise eingefügten Mutationen generiert werden können. Von entscheidender Bedeutung zum Gelingen beider Verfahren ist eine hohe Qualität der von den Hybridomazellen isolierten RNS sowie der daraus synthetisierten cDNS.

Der Datenbankvergleich (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) der variablen Antikörperregionen des mAkPi88 offenbarte eine 99 %-ige Homologie der V_H und der V_L des mAkPi88 mit schweren (AAP33814.1) und leichten Antikörperketten (AAP33836.1, AAP33832.1) von anti-Phosphocholin Antikörpern (Wiens *et al.* 2003). Phosphocholin ist eine Komponente der Lipopolysaccharide der bakteriellen und pilzlichen Zellwand. Die Bindung des C-reaktiven Proteins an mikrobielles Phosphocholin führt zur Aktivierung des Komplementsystems. Es konnte gezeigt werden, dass anti-Phosphocholin IgG₃ und IgM bei Mäusen Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* verhindern konnten (Briles *et al.* 1981a, Briles *et al.* 1981b).

Für die variablen Regionen der mAkPi86, 102.2, 102.4 und 129 konnten keine derartigen Sequenzübereinstimmungen gefunden werden, die Schlussfolgerungen über mögliche Antigene zuließen.

4.3 *Phytophthora infestans*-spezifische scFvs

Zur Selektion *P. infestans*-spezifischer scFv mittels Phagendisplay wurden scFv-Genbibliotheken von immunisierten Hühnern und Mäusen kloniert (3.4). Die aviane scFv-Bibliothek hatte eine Größe von etwa 1×10^6 und die murine scFv-Bibliothek eine Größe von etwa 2×10^7 Bakterienklonen (3.4.2). Zusätzlich wurde eine naive aviane scFv-Bibliothek mit einer Größe von etwa 2×10^9 Klonen verwendet (van Wyngaardt *et al.* 2004). Jede scFv-Bibliothek wurde separat auf Vorhandensein spezifischer scFv gegen

Zellwandfragmente sowie gekeimte Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* untersucht (3.5). Von der naïven scFv-Bibliothek konnte kein *P. infestans*-spezifischer scFv selektiert werden (3.5.2). Das Phagendisplay mit den immunadaptierten scFv-Bibliotheken resultierte letztendlich in zwei avianen (scFvPi46 und scFvPi68) (3.5.2) und zwei murinen scFv (scFvPi5 und scFvPi33) (3.5.3).

Die zur Selektion verwendeten Antigene (Zellwandfragmente sowie gekeimte Sporangien und Zoosporen von *P. infestans*) wiesen eine Vielzahl möglicher Epitope auf, die in ungleichen und nicht bestimmbar Verhältnissen und Konzentrationen in den Antigenpräparationen vertreten waren (3.1). Die Selektion hochaffiner scFv gegen derartig komplexe Antigene ist deutlich schwieriger als bei Verwendung eines definierten Antigens. Mögliche Einflussfaktoren sind die Zugänglichkeit von Epitopen sowie die Konzentrationen einzelner Targets. Die Wahrscheinlichkeit der Selektion niedrigaffiner scFv, die an anteilmäßig selten vorkommende Antigene binden, ist gering. Jedoch können hochaffine scFv von niedrigaffinen, die an in der Antigenpräparation häufig vorkommende Epitope binden und/oder sich durch hohe Expressionsraten im Komplex mit dem Phagen auszeichnen, verdrängt werden (Mutuberria *et al.* 1999). Andererseits korreliert die Affinität des selektierten scFv mit der eingesetzten Konzentration des Antigens. Persson *et al.* (2008) zeigten durch einen Vergleich mehrerer Selektionsstrategien, dass durch Verringerung der Antigenkonzentration während der Selektionsrunden scFv mit der höchsten Affinität selektiert werden konnten.

Im Verlauf der Selektionsrunden mit den avianen scFv-Bibliotheken war eine erhebliche Abnahme von Phagen mit Volllängeninsert auf 12,5 bis 38 % zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnte der Anteil von Phagen mit Volllängeninsert bei Verwendung der murinen scFv-Bibliothek auf 75 % bzw. 88 % stabilisiert werden (3.5.1). Es ist bekannt, dass Phagemide ohne bzw. mit kürzerem Insert *E. coli* Wachstumsvorteile verschaffen und Phagen, die keinen scFv exprimieren, „sticky“ sind (de Bruin *et al.* 1999, Tur *et al.* 2001). Durch Vorinkubation der Phagen mit dem Blockierungsreagenz sowie stringente Waschbedingungen wurde versucht die Selektion solcher Phagen zu unterbinden. Die Versuchsdurchführung war bei allen Selektionsrunden und bei Verwendung der unterschiedlichen scFv-Bibliotheken gleich, so dass die Anreicherung von Phagen ohne Insert bei einigen der scFv-Bibliotheken auch auf das Fehlen spezifischer löslicher scFv mit ausreichender Affinität in der jeweiligen Bibliothek zurückzuführen sein könnte. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass die Elutionsbedingungen nicht ausreichend zur Elution hochaffiner scFv waren und diese deshalb verloren gingen. De Bruin *et al.* (1999) stellten

fest, dass durch Inkubation mit 100 mM Triethylamin für zehn bis 30 Minuten der Anteil hochaffiner scFv sowie der Anteil von Phagen mit Volllängeninsert gegenüber zehnminütiger Inkubation gesteigert werden konnte. Diese durch die Elutionsbedingungen auftretenden Schwierigkeiten könnten durch die Nutzung eines anderen Systems, bei dem eine Elution gebundener Phagen mit Trypsin erfolgt, umgangen werden (Goletz *et al.* 2002).

Die Anreicherung eluierter Phagen im Vergleich zur jeweiligen vorhergehenden Selektionsrunde gab Aufschluss über die Vermehrung von Phagen, die an Antigene bindende scFv präsentierte (3.5.1). Bei der naiven avianen scFv-Bibliothek (van Wyngaardt *et al.* 2004) war im Gegensatz zu den immunadaptierten scFv-Bibliotheken keine Anreicherung im Verlauf von drei Selektionsrunden zu beobachten. Das Phagendisplay der murinen scFv-Bibliothek gegen Zellwandfragmente von *P. infestans* war mit einer 5488-fachen Gesamtanreicherung eluierter Phagen nach der dritten Selektionsrunde im Vergleich zur ersten Runde am erfolgreichsten. Im Vergleich dazu betrug die Gesamtanreicherung eluierter Phagen im Fall der murinen scFv-Bibliothek gegen gekeimte Sporangien und Zoosporen etwa 4,6. Für die aviane scFv-Bibliothek konnten Gesamtanreicherungen um den Faktor 2,7 (Zellwandfragmente) und 1,3 (gekeimte Sporangien und Zoosporen) berechnet werden. Ersichtlich ist, dass die höchste Gesamtanreicherung gegen das Antigen, welches zur Immunisierung verwendet wurde, bei dem Individuum mit dem höchsten polyklonalen Antikörpertiter erfolgte.

Klone der zweiten und dritten Selektionsrunde wurden zur Verifizierung der Expression *P. infestans*-spezifischer scFv mittels ELISA untersucht (3.5.2, 3.5.3). Sequenzen der Bakterienklone, deren lösliche scFv die höchste Reaktivität gegenüber *P. infestans* und keine Kreuzreaktivität mit Komponenten von V8-Agarplatten sowie dem Blockierungsreagenz aufwiesen, wurden mittels *Bst*NI-Fingerprinting und Sequenzierung charakterisiert (3.5.3, 3.6.1). Dabei konnten vier gegen Zellwandfragmente selektierte murine scFv identifiziert werden, welche sich in wenigen hauptsächlich in den FR lokalisierten Aminosäuren unterschieden. Alle scFv wiesen vergleichbare Reaktivität gegenüber Zellwandfragmenten sowie gekeimten Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* auf (3.5.3), weshalb der anteilsgemäß häufigste scFv (scFvPi5) für die weiteren Untersuchungen gewählt wurde. Gegen gekeimte Sporangien und Zoosporen konnten zwei sich aufgrund eines Basenaustausches in einer Aminosäure, die in der CDR H1 lokalisiert ist, unterscheidende murine scFv selektiert werden (3.5.3). Sequenzunterschiede könnten durch während der Amplifizierung der variablen Domänen mittels *Taq* DNS Polymerase eingefügte Mutationen erklärt werden. *Taq* DNS Polymerase besitzt keine proof-reading Aktivität und die in der

Literatur angegebene Fehlerrate liegt bei 0,0083 % pro Zyklus (Guatelli *et al.* 1989). Das bedeutet, dass bei einer PCR mit 30 Zyklen pro 400 Nukleotiden ein Austausch stattfindet. Andererseits könnten die Sequenzunterschiede auf somatische Hypermutation der reifenden B-Zelle zurückzuführen sein.

Abschließend kann gesagt werden, dass sowohl unter Verwendung der Hybridomatechnologie als auch des Phagendisplays die Selektion *P. infestans*-spezifischer mAk und scFv möglich war. Ein Vorteil der Hybridomatechnologie war, dass diese die Selektion mehrerer spezifische mAk produzierender Zelllinien möglich machte. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Hybridomazellen, die unterschiedliche Antikörper produzieren, während der Kultivierung der polyklonalen Kulturen in den Kavitäten der Zellkulturplatten durch die räumliche Trennung nur begrenzt in Konkurrenz zueinander standen. Beim Phagendisplay kann durch Verwendung von *Taq* DNS Polymerase zusätzliche Diversität der scFv geschaffen werden. Ein weiterer Vorteil des Phagendisplays ist neben den geringeren Kosten die Koselektion des scFv und der den scFv kodierenden Sequenz, die ohne aufwendige Klonierungen sofort zur Verfügung steht. Ferner können bei den mittels Phagendisplay selektierten scFv Aviditätseffekte und ein Affinitätsverlust, welcher bei der Klonierung des auf einem mAk basierenden scFv erfolgen kann, ausgeschlossen werden. Jedoch spielen im Gegensatz zur Hybridomatechnologie beim Phagendisplay unter anderem Faktoren wie Antigenkonzentration, Elutionsbedingungen, wachstumsfördernde und -inhibierende Effekte des Inserts eine entscheidende Rolle. Das bedeutet, dass die mittels Phagendisplay selektierten scFv nicht unbedingt die Binder der scFv-Bibliothek mit der höchsten Affinität zum verwendeten Antigen repräsentieren müssen.

Die auf den mAkPi86, 88, 102.2, 102.4 und 129 basierenden sowie die mittels Phagendisplay selektierten scFvPi5, 33, 46 und 68 wurden analog zu den mAk charakterisiert (3.6). Dazu wurden die scFv in *E. coli* exprimiert. Das N-terminal fusionierte *pelB*-Signalpeptid steuert die Sekretion des scFv ins Periplasma (Lei *et al.* 1987). Dies ist aufgrund des oxidativen Milieus für die Ausbildung von Disulfidbrücken vorteilhaft. Die erfolgreiche Anreicherung löslicher Proteine im Periplasma ist unter anderem von der Stabilität, Sequenz, Proteaselabilität sowie der Toxizität des rekombinanten Proteins abhängig. Die Ausbeuten der gereinigten auf den mAk basierenden scFv waren um den Faktor 40 bis 150 geringer als die des aus dem Phagendisplay stammenden scFvPi5 (3.6.3). Zudem konnten von den auf den mAk basierenden scFv nur die scFvPi86 und 102.2 im Kulturüberstand einer bakteriellen Expression nachgewiesen werden (3.7.2). Dabei waren die im Immunoblot detektierten Banden der scFvPi86 und 102.2 im Vergleich zu den aus dem

Phagendisplay stammenden scFv deutlich schwächer. Die relativ geringen Reinigungsausbeuten der scFv sowie die geringe bzw. fehlende Akkumulation der auf den mAk basierenden scFv können teilweise auf das Vorhandensein von Kodons, die in *E. coli* nur selten verwendet werden, zurückgeführt werden. Jedoch ist die vergleichsweise deutlich niedrigere Akkumulation löslicher scFv, die aus den mAk kloniert wurden, nicht unbedingt durch eine suboptimale Kodonnutzung erklärbar, da zwischen allen scFv diesbezüglich keine gravierenden Unterschiede zu verzeichnen waren. Andererseits ist bekannt, dass der Austausch bestimmter Aminosäuren die Löslichkeit und Stabilität rekombinanter Proteine um ein Vielfaches erhöhen kann. Kipriyanov *et al.* (1997) konnten zeigen, dass durch Substitution von Glutaminsäure durch Glutamin in Position 6 der V_H die Expression löslicher scFv um den Faktor 30 gesteigert werden konnte. Bei den scFvPi88 und 129 befindet sich an dieser Position ein Leucin, welches aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften zur geringeren Löslichkeit der scFv beitragen könnte. Nach Nieba *et al.* (1997) führte die Substitution einer Aminosäure der V_H (V84D) zu einer 25-fachen Steigerung des Anteils funktionalen scFv im Periplasma. Dies wurde auf den Einfluss der Aminosäure auf die korrekte Faltung des Proteins zurückgeführt.

Die Charakterisierung der scFv wurde analog zu der der mAk durchgeführt (3.6). Der scFvPi33 erwies sich im Rahmen der zur Untersuchung der scFv auf Kreuzreaktivität eingesetzten Pathogene als *P. infestans*-spezifisch (3.6.4). Die Analyse der Antigenpezifität des scFvPi33 mittels Immunoblot erfolgte unter Verwendung von zwei verschiedenen Antigenpräparationen. Zum einen wurden Zellwandfragmente von *P. infestans* verwendet und zum anderen erfolgte die Untersuchung mit einer frischen Myzelpräparation, die lediglich aus zerkleinertem, ungewaschenem von einer V8-Agarplatte abgekratztem Myzel bestand. Es zeigte sich, dass der scFvPi33 bei der Myzelpräparation ein Proteinbandenspektrum mit einem Molekulargewicht von etwa zwölf bis über 170 kDa erkannte, im Fall der Zellwandpräparation jedoch nur eine Bande von etwa 120 kDa detektiert werden konnte (3.6.2). Aus den unterschiedlichen Ergebnissen der Immunoblotanalyse konnte geschlossen werden, dass der scFvPi33 unter anderem an Komponenten des Pathogens bindet, die durch Waschen des zerkleinerten Myzels entfernt wurden. Dabei könnte es sich um sekretierte oder leicht lösliche Bestandteile oder intern liegende Epitope handeln, die durch Aufbrechen der Zellwandwand und -membran freigesetzt werden. Ferner konnte mittels Immunofluoreszenzmikroskopie eine stärkere Affinität des scFvPi33 zu Sporangien als zu den Hyphen von *P. infestans* detektiert werden (3.6.5). Aufgrund dessen war der scFvPi33 für die Fusion mit den AFPs und die Expression in Kartoffeln zur Abwehr von *P. infestans* nicht

gut geeignet. Eine denkbare Anwendungsmöglichkeit dieses scFv könnte aufgrund der Spezifität für *P. infestans* in der Verwendung zur Detektion von *P. infestans* Sporangien aus Freilandproben liegen. Dies könnte zum Beispiel eine mögliche Unterstützung der auf Klimadaten basierenden Prognosemodelle darstellen.

Der aviane scFvPi68, der wie der murine scFvPi33 gegen gekeimte Sporangien und Zoosporen im Phagendisplay selektiert worden war, zeigte Reaktivität gegenüber nahezu allen im Kreuzreaktivitätstest eingesetzten Organismen (3.6.4). Dadurch ist eine Affinität dieses scFv gegenüber Nichtzielorganismen möglich, wodurch negative Effekte des scFvPi68 auf Nutzorganismen nicht ausgeschlossen werden können. Wie für den scFvPi33 erfolgte die Untersuchung der Antigenspezifität des scFvPi68 mittels Immunoblot unter Verwendung von Zellwandfragmenten und einer frischen Myzelpräparation von *P. infestans* (3.6.2). Hier konnten Komponenten der Myzelpräparation, nicht aber der Zellwandfragmente detektiert werden. Dadurch ist anzunehmen, dass Komponenten, an die der scFvPi68 bindet, durch die Waschschrte bei der Herstellung der Zellwandfragmente entfernt wurden. Diese Daten sind konform mit den Ergebnissen der Immunofluoreszenzmikroskopie (3.6.5), wo die Bindung des scFvPi68 an innerhalb von Sporangium und Keimschlauch liegenden Strukturen nachgewiesen werden konnte. Da die Reaktivität des scFvPi68 gegenüber *P. infestans* vergleichsweise gering war (3.6.3), mittels Immunofluoreszenz die Bindung des scFvPi68 an intrazelluläre Komponenten des Pathogens sowie an die Oberfläche der Zoosporen dokumentiert (3.6.5) und darüber hinaus eine beachtliche Kreuzreaktivität ermittelt werden konnte, eignete sich dieser nicht für die weiteren Versuche.

Bei der Analyse der Antigenspezifität des aus der murinen scFv-Bibliothek selektierten scFvPi5 konnten im Immunoblot keine Banden der Myzelpräparation von *P. infestans* detektiert werden (3.6.2). Dies lässt vermuten, dass dieser scFv ein diskontinuierliches Epitop erkennt. Der Nachweis der Reaktivität des scFvPi5 gegenüber Zellwandfragmenten erfolgte bei einer scFv-Konzentration von 0,125 µg/ml im ELISA (3.6.3), hingegen konnte gegenüber gekeimten Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* bei der dreifachen scFv-Konzentration im ELISA keine Reaktivität gemessen werden (3.6.3). Eine Reaktivität des scFvPi5 gegenüber gekeimten Sporangien konnte lediglich bei dessen Analyse im ELISA unter Einsatz des unverdünnten Kulturüberstandes einer bakteriellen Expression dieses scFv detektiert werden (3.5.3). Auch bei den immunofluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte keine Bindung des scFvPi5 an gekeimte Sporangien und Zoosporen festgestellt werden (3.6.5). Es scheint, dass das Epitop in der vom scFvPi5 erkannten Konformation beim intakten Pathogen nicht ungehindert zugänglich ist, oder nur zu einem geringen Anteil

vorkommt. Da die Bindung des scFvPi5 an native Oberflächenantigene der Hyphen von *P. infestans* nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurde dieser scFv als ungeeignet für die Herstellung transgener Kartoffelpflanzen zur Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegenüber *P. infestans* eingestuft.

Für den im Phagendisplay gegen Zellwandfragmente von *P. infestans* selektierten avianen scFvPi46 (3.5.2) konnte weder im Immunoblot (3.6.2), noch im ELISA (3.6.3) und mittels Immunofluoreszenzmikroskopie (3.6.5) eine Bindung an *P. infestans* Antigene nachgewiesen werden. Auch bei der Untersuchung auf Kreuzreaktivität gegenüber Vertretern der Asco-, Basidio- und Oomyceten konnte im ELISA keine Reaktivität dieses scFv gegenüber einem der Pathogene festgestellt werden (3.6.4). Folglich wurde dieser scFv nicht für die Fusion mit den AFPs verwendet. Bei dem avianen scFvPi46 könnte es sich um einen niedrigaffinen scFv handeln, der im Phagendisplay selektiert wurde, weil er *E. coli* Wachstumsvorteile verschafft und/oder eine hohe Expressionsrate im Komplex mit dem Phagen aufweist (Mutuberria *et al.* 1999).

Beim Vergleich der Reaktivität der mittels Phagendisplay selektierten scFvPi5, 33, 46 und 68 mit den auf den mAk basierenden scFvPi86, 88, 102.2, 102.4 und 129 gegenüber *P. infestans* Antigenen im ELISA unter Einsatz gleicher Antigen- und Antikörperkonzentrationen wies der scFvPi102.2 die höchsten Extinktionswerte auf (3.6.3). Mittels Immunofluoreszenzmikroskopie konnte wie bei dem mAkPi102.2 dessen Affinität zur gesamten Oberfläche gekeimter Sporangien und Zoosporen von *P. infestans* nachgewiesen werden (3.6.5). Aufgrund dessen und der für den mAkPi102.2 erhaltenen Ergebnisse wurde der Fokus auf diesen scFv gelegt.

4.4 AFP-scFv Fusionsproteine

AFP-scFv Fusionskonstrukte wurden zur Expression in *E. coli* in den pHENHi-Vektor und zur Expression in *N. tabacum* und *S. tuberosum* in den pTRAc-Vektor kloniert (3.7.1). Der Fokus wurde dabei mit zunehmender Charakterisierung der scFv auf den scFvPi102.2 gelegt. Mit den bakteriell bzw. transient in *N. tabacum* exprimierten Fusionsproteinen D4E1-scFvPi102.2, GR7-scFvPi102.2 und Mag-scFvPi102.2 konnte deren Reaktivität gegenüber *P. infestans* mittels ELISA bestätigt werden (3.7.2, 3.7.3).

Der Versuch, die AFPs D4E1, GR7 und Mag ohne Fusionspartner in *E. coli* zu exprimieren, blieb erfolglos (3.7.2). Eine Kultur rekombinanter *E. coli*, die mit einem pHENHi-AFP Vektor transformiert waren, wies nach sechs Stunden erst eine OD₆₀₀ von etwa

0,2 auf. Dem entgegen konnte bei Kulturen von mit pHENHi-scFvPi102.2 transformierten *E. coli* bereits nach zwei bis drei Stunden eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 gemessen werden. Es ist beschrieben, dass antimikrobielle Peptide in *E. coli* als Fusion mit Proteinen exprimiert wurden, die zur Bildung von „inclusion bodies“ führten. Dadurch blieben die Zellen von dem toxischen Peptid verschont (Haught *et al.* 1997, Lee *et al.* 2000). Kim *et al.* (2006) konnten 60 mg Lactoferrin, welches in Fusion mit einem neutralisierenden Peptid in *E. coli* exprimiert wurde, aus einem Liter Kultur reinigen. Huang *et al.* (2008) beschreiben die Expression löslicher Defensin-Thioredoxin A Fusionsproteine in *E. coli* mit Akkumulationsleveln von etwa 1,5 mg/l Kultur. Durch die Fusion der AFPs Cec, D4E1, GR7 und Mag mit dem scFvPi102.2 konnten diese zwar exprimiert werden, aber die Ausbeuten gereinigten Proteins waren sehr niedrig. Da die Reinigungsausbeuten mit 70 ng (Cec-scFvPi102.2), 100 ng (D4E1-scFvPi102.2), 50 ng (GR7-scFvPi102.2) und etwa 900 ng (Mag-scFvPi102.2) noch um den Faktor 13 bis 240 geringer waren als die des scFvPi102.2, konnten ausreichende Mengen zur erfolgreichen Durchführung von *in vitro* Inhibitionsversuche mit *P. infestans* nicht produziert werden (3.7.2).

Aufgrund dessen wurde das Pathogen-Wirt-System *P. nicotianae*-*N. tabacum* zum Nachweis der antifungalen Aktivität der Fusionsproteine herangezogen (3.7.4). Dazu wurden Blätter von *N. tabacum*, die die scFv bzw. die Fusionskonstrukte transient exprimierten, mit *P. nicotianae* inokuliert. Die Abnahme der Läsionsgröße und –intensität gab Hinweise auf die Wirksamkeit der Fusionsproteine gegenüber *P. nicotianae*. Dieser Versuch konnte mit dem scFvPi102.2 und den Fusionsproteinen Cec-scFvPi86, D4E1-scFvPi102.2, GR7-scFvPi102.2 und Mag-scFvPi102.2 durchgeführt werden, da die zu den scFvPi86 und 102.2 korrespondierenden mAk neben *P. infestans* auch Affinität zu anderen Oomyceten aufwiesen (3.3.2.4). Es konnte ein inhibitorischer Effekt der Fusionsproteine Cec-scFvPi86 und GR7-scFvPi102.2 im Vergleich zu dem scFvPi102.2 alleine und der Cec-scFvODC3/2-Kontrolle beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte die Wirksamkeit von Mag-scFvPi102.2 nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis der scFv sowie AFP-scFv mittels des His₆-Motivs erwies sich als schwierig. So konnten die rekombinanten Proteine nur nach Extraktion und Reinigung des in mindestens 10 g frischer Blattmasse akkumulierten Proteins in der Elutionsfraktion mittels Chemilumineszenz detektiert werden (3.7.3). Unter der Annahme, dass die Akkumulationslevel aller Proteine vergleichbar waren, kann der ausbleibende inhibitorische Effekt der Mag-Fusion durch die im Vergleich zu Cecropin höhere Konzentration, die zur Permeabilisierung der Membran notwendig ist, erklärt werden (Oard *et al.* 2004).

4.5 Transgene Kartoffelpflanzen

Unter Verwendung der beiden Vektoren pTRAc-D4E1-scFvPi102.2 und pTRAc-GR7-scFvPi102.2 konnten insgesamt 26 (D4E1-scFvPi102.2) und 25 (GR7-scFvPi102.2) transgene *S. tuberosum* Linien der Sorten Gala und Pirol hergestellt werden (3.8).

Die AFP-scFv Konstrukte standen unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35SS Promotors. Dieser Promotor wurde zur Durchführung der dargestellten Versuche gewählt, da dadurch die ständige Expression des Fusionsproteins sichergestellt war. Ferner ist beschrieben, dass unter Verwendung des 35S bzw. des 35SS Promotors mit 4 % (Nölke *et al.* 2005), 6,8 % (Fiedler *et al.* 1997) und 8 % des gesamt löslichen Proteins (Zhang *et al.* 2008) hohe Akkumulationslevel von scFvs in transgenen Tabakpflanzen erreicht werden konnten.

Da Hyphen von *P. infestans* sich in den Interzellularen des Pflanzengewebes ausbreiten und Haustorien zwar die Zellwand, nicht aber die Zellmembran durchdringen, wurde die Akkumulation der Fusionsproteine in den Apoplasten dirigiert. Dies wurde durch Verwendung des kodonoptimierten murinen LPH-Signalpeptids der schweren Antikörperkette des anti-TMV mAk24 sichergestellt (Vaquero *et al.* 1999).

Die Herstellung transgener Pflanzen, die durch Expression antimikrobieller Peptide und Proteine weniger anfällig gegenüber Pathogenen sind, ist beschrieben. So zeigten beispielsweise transgene Tabakpflanzen, die D4E1 exprimierten, signifikante Aktivität gegenüber *Colletotrichum destructivum* *in vivo* sowie *Aspergillus flavus* und *Verticillium dahliae* *in vitro* (Cary *et al.* 2000). Im Gegensatz zu Pflanzen, die durch Expression virusspezifischer scFv Resistenz gegenüber dem Virus aufweisen (Sudarshana *et al.* 2007), gibt es unserer Kenntnis nach keine transgene Pflanze, die nur durch Expression eines pilzspezifischen scFv gegenüber diesem Pathogen resistent ist. Durch die Kombination von AFP und *P. infestans*-spezifischem scFv ist erstens anzunehmen, dass transgene Kartoffelpflanzen spezifisch die Abwehr von *P. infestans* bewerkstelligen können. Zweitens sind möglicherweise die zur effektiven Pathogenabwehr notwendigen Konzentrationen des Fusionsproteins im Vergleich zur Verwendung des AFPs alleine niedriger, da die antifungal wirkende Substanz durch den *P. infestans*-spezifischen scFv an ihrem Wirkort akkumuliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei mit D4E1-scFvPi102.2 bzw. GR7-scFvPi102.2 stabil transformierten Kartoffelpflanzen der Sorte Pirol, die Entwicklung von *P. infestans* vollständig unterbunden wurde (3.8). Zur Untersuchung der Widerstandsfähigkeit transgener Linien der Sorte Pirol wurden Blätter mit einer

Zoosporenlösung von *P. infestans* inokuliert. Als Kontrolle dienten Wildtyppflanzen der gleichen Sorte. Anhand der Dichte der sich nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen auf den Blättern entwickelnden Sporangienträger konnten die Pflanzen bonitiert werden. Für beide Konstrukte (D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2) konnten sowohl transgene Linien identifiziert werden, die genauso stark befallen waren, wie die Wildtypblätter, als auch solche, die eine erhöhte Widerstandsfähigkeit bzw. eine vollständige Resistenz gegenüber *P. infestans* aufwiesen. An den Inokulationsstellen der Blätter resistenter Linien konnte lediglich eine Nekrotisierung beobachtet werden.

Die unter Verwendung der Konstrukte D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 hergestellten transgenen Kartoffelpflanzen wiesen im Vergleich zum Wildtyp keine offensichtlichen Wachstumsstörungen auf. Dies ist konform mit Untersuchungen von Ali und Reddy (2000), die bei einer Peptidkonzentration von 200 μ M keine Phytotoxizität von GR7 und einem bis auf eine Aminosäure D4E1 entsprechenden Peptids gegenüber Kartoffelpflanzen in Zellkultur feststellen konnten. Zu überprüfen bliebe noch, ob und in wie fern sich die Expression des Fusionsproteins auf den Ertrag sowie die Anfälligkeit der Pflanze gegenüber anderen Schaderregern auswirkt.

4.6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Expression eines Fusionsproteins bestehend aus einem *P. infestans*-spezifischen scFv und einer antifungal wirkenden Komponente in transgenen Kartoffelpflanzen zur vollständigen Inhibierung des Pathogenwachstums und damit zu Resistenz gegenüber *P. infestans* führen kann.

Zwei Expressionskassetten, die die Sequenz der AFP-scFv Konstrukte D4E1-scFvPi102.2 bzw. GR7-scFvPi102.2 enthielten, wurden stabil in das Genom der *S. tuberosum*-Sorten Gala und Pirol integriert. Bei ersten Resistenzuntersuchungen mit den jungen transgenen Pflanzen der Sorte Pirol konnten für die das Transgen D4E1-scFvPi102.2 und für solche, die das Transgen GR7-scFvPi102.2 enthalten, Linien identifiziert werden, die erhöhte Widerstandsfähigkeit bzw. vollständige Resistenz gegenüber *P. infestans* aufwiesen (3.8). Weitere Untersuchungen mit allen transgenen Pflanzen bezüglich ihrer Resistenz gegenüber *P. infestans* sollen unternommen werden. Dazu werden die Pflanzen derzeit herangezogen und vermehrt. Das Prüfverfahren beinhaltet die Inokulation von Blättern mit Zoosporen und die Befallsbonitur nach fünf Tagen. Zhu *et al.* (1996) berichten, dass bei transgenen Kartoffelpflanzen, die ein Osmotin ähnliches Protein exprimieren, die Anzahl befallender

Blätter bei einer höheren Inokulumdichte steigt. Aus diesem Grund sind auch Untersuchungen zur Relation von Inokulumdichte und Widerstandsfähigkeit notwendig.

Die nächsten Schritte beinhalten neben der Verifizierung der Resistenz gegenüber *P. infestans* die umfassende Charakterisierung der transgenen Pflanzen hinsichtlich der Anzahl der integrierten Kopien des Fremdgens in das Pflanzengenom, des Akkumulationslevels des rekombinanten Fusionsproteins, sowie einen Vergleich von Wachstumsparametern der transgenen Pflanzen und des Wildtyps (Frischgewicht grüner Pflanzenteile und der Knollen). Letzteres könnte Aufschluss über mögliche Effekte des Fusionsproteins auf die Ertragsfähigkeit der Pflanzen geben.

Des Weiteren wird die Interaktion zwischen Pathogen und Pflanze/Fusionsprotein untersucht werden. Dazu wurden während der Resistenzversuche Blattproben in Chloralhydrat fixiert, deren mikroskopische Untersuchung nach Anfärben des Pathogens durchgeführt werden soll. Ferner wäre durch Herstellung eines zum Beispiel mit GFP transformierten *P. infestans* Isolates die Beobachtung des Infektionsverlaufes *in planta* möglich. Die Lokalisierung der Antikörper-Antigen-Bindung *in planta* könnte durch fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper erfolgen.

Die Ermittlung des Epitops des mAkPi102.2 bzw. scFvPi102.2 stellt ein weiteres Ziel dar. Da dieser Antikörper im Rahmen der getesteten Pathogene Oomyceten-spezifisch war, könnte die Identifizierung des Antigens Aufschluss über eine möglicherweise nur für Oomyceten typische Komponente geben. Ferner könnten, sofern entsprechende Daten zur Verfügung stehen, Nichtzielorganismen auf Vorhandensein dieses Epitops geprüft werden, um mögliche negative Effekte durch die Fusionsproteine D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 auszuschließen. Ähnliches gilt für den scFvPi33, der sich in dieser Arbeit als *P. infestans*-spezifisch erwies. Das Methodenspektrum zur Identifizierung des Epitops umfasst unter anderem das „Screening“ von Peptid- und Genfragment-Phagenbibliotheken von *P. infestans* mittels Phagendisplay sowie die Immunopräzipitation, das „Fischen“ der Antigene mit zum Beispiel über den His₆-Tag an eine Ni-Matrix gebundene *P. infestans*-spezifische scFv und die Analyse der Targetmoleküle mittels Massenspektroskopie. Vorab könnte durch Verdau mit PNGase F die Bindung des Antikörpers an Glykostrukturen untersucht werden. Das Enzym spaltet Asparagin-gebundene N-Glykane von Glykoproteinen ab.

Ein weiterer Ansatz wäre die Modifizierung des vorhandenen *P. infestans*-spezifischen scFv zur Erhöhung dessen Stabilität, Expression sowie Affinität. Durch eine Kodonoptimierung zur Expression in *S. tuberosum* könnten Translationsraten gesteigert

werden. Ferner könnten durch den gezielten Austausch bestimmter Aminosäuren, den Austausch der FR bzw. die Kombination verschiedener Mutagenesemethoden mit Displaytechnologien Stabilität, Löslichkeit und Affinität gesteigert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Affinität von Antikörpern und Antikörperderivaten durch Methoden wie „error-prone PCR“ (Hawkins *et al.* 1992), *E. coli* Mutationsstämme (Irving *et al.* 1996, Low *et al.* 1996), „DNA shuffling“ (Stemmer 1994, Crameri *et al.* 1996), „chain shuffling“ (Marks *et al.* 1992, Lu *et al.* 2003) und CDR Mutagenese (Schier *et al.* 1996) in Verbindung mit Displaytechnologien wie dem Phagen-, Hefen- oder Ribosomendisplay (Boder *et al.* 2000, Zahnd *et al.* 2004) verbessert werden kann. Dadurch konnten Affinitäten mehr als 1000-fach gesteigert und Affinitätskonstanten im pM und fM Bereich erreicht werden (Schier *et al.* 1996, Boder *et al.* 2000). Jung und Plückthun (1997) konnten mittels „CDR grafting“, wobei die CDR Regionen eines bestehenden Antikörpers in ein Framework eines anderen Antikörpers eingebracht wurden, die Löslichkeit und Stabilität eines Fluorescein-bildenden Antikörpers deutlich steigern. Baca *et al.* (1997) zeigten, dass durch Optimierung des Frameworks eine Affinitätssteigerung erreicht werden kann. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang auch nur die für die Bindung verantwortlichen Regionen des *P. infestans*-spezifischen scFv zu verwenden (Qui *et al.* 2007).

Vor dem Hintergrund, dass etwa 900 antimikrobiell wirkende Peptide beschrieben sind (Montesinos 2007), besteht die Möglichkeit, weitere zur Fusion mit einem *P. infestans*-spezifischen scFv auszuwählen und zur Herstellung transgener Kartoffelpflanzen zu verwenden. Umfassende Recherchen hierzu sind notwendig. Darüber hinaus müssen für alle zum Einsatz kommenden AFPs und Fusionsproteine Toxizitätsuntersuchungen durchgeführt werden. Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten AFPs D4E1 und GR7 gibt es Untersuchungen, die deren Unbedenklichkeit für Säugetierzellen und Pflanzen annehmen lassen (Cary *et al.* 2000, Dykes *et al.* 1998, Rajasekaran *et al.* 2001).

Die verwendeten AFPs D4E1 und GR7 interagieren mit der Membran des Pathogens, führen zur Permeabilisierung dieser und damit zur Lyse der Zellen (De Lucca *et al.* 1998, Rajasekaran *et al.* 2005, Westerhoff *et al.* 1989). Aus den Erfahrungen mit R-Genen ist bekannt, dass *P. infestans* sehr anpassungsfähig ist, und dadurch eine R-Gen vermittelte Resistenz schnell überwinden kann (Fry 2008). Die Bildung von Resistenzen gegenüber AFPs wird als gering eingeschätzt. Zusätzlich könnte einer möglichen Resistenzbildung durch Einbringen mehrerer AFPs entgegengewirkt werden. Dies könnte zum einem durch N- und C-terminale Fusion von verschiedenen AFPs an einen scFv und zum anderen durch Einbringen unterschiedlicher Fusionskonstrukte passieren. Durch Herstellung transgener

Pflanzen, die mehrere jeweils für ein Pathogen spezifische Fusionsproteine oder ein Fusionsprotein mit Affinität zu mehreren diese Pflanze befallenden Pathogenen exprimieren, könnten Pflanzen mit multipler Resistenz generiert werden. Ein möglicher Kandidat in diesem Zusammenhang wäre der mAkPi107, der Kreuzreaktivität gegenüber *A. alternata*, *B. cinerea* und *V. dahliae* aufweist, da die Kartoffel unter anderem auch von *A. solani*, *Botrytis* sp. und *Verticillium* sp. befallen werden kann. Eine intensive Untersuchung des mAkPi107 bezüglich dessen Kreuzreaktivität gegenüber Nichtzielorganismen sowie die Identifizierung des Epitops wären dann unabdingbare Voraussetzung. Ferner besteht eventuell die Notwendigkeit, den korrespondierenden scFvPi107 hinsichtlich Stabilität, Affinität und Löslichkeit zu optimieren, da es sich bei dem mAkPi107 um einen IgM handelt und Aviditätseffekte nicht auszuschließen sind. Andererseits besteht wie gesagt die Möglichkeit durch das Einbringen mehrerer rekombinanter Antikörper, die jeweils spezifisch für einen Erreger oder eine Pathogenfamilie sind, Pflanzen mit multipler Resistenz zu generieren. Dadurch könnte die Problematik der Kreuzreaktivität gegenüber Nichtzielorganismen umgangen werden. Ein möglicher Kandidat in diesem Zusammenhang ist der auf dem Oomyceten-spezifischen mAkPi102.2 basierende scFvPi102.2.

Zu überlegen ist die Verwendung eines Promotors, der die Expression des antifungalen Fusionsproteins nur bei Infektion der Pflanze bewirkt. Dies hätte den Vorteil, dass eventuelle negative Effekte des Fusionsproteins auf die Pflanze auf das notwendige Maß beschränkt werden könnten. Sinnvoll wäre, einen Promotor zu verwenden, der durch alle Rassen von *P. infestans* und möglichst alle die Kartoffel befallenden Schaderreger aktiviert wird. Ein pathogeninduzierbarer Promotor, der in Frage kommen könnte, wäre zum Beispiel der des Kartoffel *gstI* Gens. Dieser wird nicht durch abiotische Faktoren, wie Verletzungen, Hitze und Licht aktiviert. Es konnte nachgewiesen werden, dass es nach Infektion mit *P. infestans* und anderen pathogenen sowie symbiontischen Organismen zu einer lokalen Transkription des unter der Kontrolle dieses Promotors stehenden Gens kommt. Ferner ist der Promotor in nicht infiziertem Gewebe nicht aktiv (Martini *et al.* 1993, Strittmatter *et al.* 1996). Fraglich ist jedoch, ob die Expression des Fusionsproteins nach der Infektion der Pflanze mit dem Pathogen ausreichend ist, den sich bereits im Blattgewebe ausbreitenden Schaderreger effektiv zu stoppen. Eine weitere Möglichkeit wäre die organspezifische Expression der Fusionsproteine. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die spezifische Expression in den grünen Pflanzenteilen. Dai *et al.* (2000) beschreiben die Blatt-spezifische Expression des *Acidothermus cellulolyticus* Endoglukanase *E1* Gens unter Kontrolle des „Rubisco small subunit“ Promotors (tomato RbcS-3C) (Sugita *et al.* 1987) in transgenen Tabakpflanzen. Die

Akkumulationslevel lagen bei maximal 1,35 % gesamt löslichem Protein. Die Verwendung eines konstitutiven Blatt-spezifischen Promotors in Kombination mit entsprechenden Signalpeptiden hätte den Vorteil, dass das rekombinante Protein nicht in den Kartoffelknollen angereichert und folglich auch nicht vom Verbraucher verzehrt würde.

Des Weiteren ist die Herstellung anderer transgener Pflanzenarten mit den in dieser Arbeit generierten Konstrukten D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 denkbar. Die Tomate zum Beispiel ist eine *P. infestans*-anfällige Pflanze und mit einem weltweiten Produktionsvolumen von etwa 126 Millionen Tonnen oder rund 14 % der Weltgemüseerzeugung die bedeutendste Gemüseart (Riester *et al.* 2007).

Ein weiterer Aspekt wäre der mögliche Einsatz *P. infestans*-spezifischer Antikörper zu Diagnosezwecken. Ein schnelles und zuverlässiges Detektionssystem könnte die auf Klimadaten basierenden Prognosemodelle unterstützen. Hierzu käme vor allem der scFvPi33, der keine Kreuzreaktivität zu allen anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Organismen sowie eine stärkere Affinität zu den Sporangien als zu Hyphen von *P. infestans* aufwies, in Frage.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Kartoffelanbau erstreckt sich weltweit auf einer Fläche von etwa 19 Millionen Hektar. Mit einem Produktionsvolumen von etwa 315 Millionen Tonnen (2006) ist die Kartoffel nach Mais, Reis und Weizen die produktionsstärkste Kulturpflanze der Welt. Die weltweit im Kartoffelanbau durch *Phytophthora infestans* verursachten Schäden werden jährlich auf etwa 3 Milliarden US\$ geschätzt.

Ziel dieser Arbeit war durch die Herstellung *P. infestans*-spezifischer monoklonaler Antikörper (mAk) und scFv Antikörperfragmenten, deren Fusion mit antifungalen Peptiden (AFP) und die Expression der AFP-scFv Fusionsproteine in Kartoffelpflanzen die Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber *P. infestans* zu erhöhen.

Zur Herstellung geeigneter scFv wurden zwei Strategien verfolgt. Erstens wurden Milzzellen der mit Zellwandfragmenten von *P. infestans* hyperimmunisierten Mäuse zur Fusion mit Maus-Myelomzellen verwendet. Dieser Ansatz resultierte in zwölf *P. infestans*-spezifischen mAk; drei IgG₁ (mAkPi102.2, 102.4, 129) und neun IgM (mAkPi9, 32, 34, 76, 82, 86, 88, 107, 109). Die mAkPi86 und 102.2 zeigten im Vergleich der IgM bzw. IgG₁ die höchste Reaktivität gegenüber *P. infestans*. Bei Kreuzreaktivitätsuntersuchungen mit Vertretern der Asco-, Basidio- und Oomyceten erwiesen sich die mAkPi86 und 102.2 als Oomyceten-spezifisch. Hingegen hatten die mAkPi88 und 109 neben *P. infestans* und anderen Oomyceten auch Affinität zu Pathogenen der Klasse der Sordariomycetes innerhalb der Abteilung der Ascomycota. Der mAkPi107 zeigte Reaktivität gegenüber allen *Phytophthora* Arten und *Pythium ultimum* sowie sieben der neun verwendeten Ascomyceten. Die Epitope der mAkPi76, 86, 88, 107, 102.2 und 129 konnten auf der gesamten Oberfläche von Sporangium, Keimschlauch und Appressorium des intakten Pathogens nachgewiesen werden. Die auf den mAkPi86, 88, 102.2, 102.4 und 129 basierenden scFv wurden kloniert.

Die zweite Strategie beinhaltete die Klonierung von scFv-Bibliotheken aus Milzzellen der mit *P. infestans* Zellwandfragmenten hyperimmunisierten Hühner und Mäuse. Die scFv-Bibliotheken wurden zur Selektion *P. infestans*-spezifischer scFv mittels Phagendisplay verwendet. Es konnten zwei aviane (scFvPi46, scFvPi68) sowie zwei murine scFv (scFvPi5, scFvPi33) selektiert werden. Sowohl die auf den mAk basierenden scFvPi86, 88, 102.2, 102.4 und 129 als auch die aus dem Phagendisplay stammenden scFv wurden charakterisiert. Sequenzanalysen zeigten, dass sich alle scFv mit Ausnahme der scFvPi86 und 102.2, bei denen lediglich elf Aminosäuren verschieden sind, vor allem in den CDRs gravierend

unterscheiden. Der scFvPi102.2 wies im Vergleich der scFv die höchste Reaktivität gegenüber *P. infestans* auf. Kreuzreaktivitätsuntersuchungen zeigten, dass der scFvPi33 *P. infestans*-spezifisch ist und der scFvPi68 Affinität zu nahezu allen Pathogenen der Asco-, Basidio- und Oomyceten hat. Für den scFvPi5 konnte nur dessen Bindung an Zellwandfragmente von *P. infestans*, nicht aber an das native Pathogen eindeutig nachgewiesen werden. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte eine stärkere Affinität des scFvPi33 zu Sporangien als zu den Hyphen detektiert werden. Epitope des scFvPi68 konnten an der Oberfläche der Zoosporen und an intrazellulären Komponenten lokalisiert werden.

Im Laufe der Charakterisierung kristallisierte sich der auf dem mAkPi102.2 basierende scFvPi102.2 als der zur Zielerreichung geeigneteste Antikörper heraus. Der IgG₁ erwies sich im Rahmen der getesteten Organismen als Oomyceten-spezifisch. Sowohl der mAkPi102.2 als auch der scFvPi102.2 zeigten im Vergleich zu den anderen IgG₁ und scFv die höchste Reaktivität gegenüber *P. infestans*. Das Epitop konnte auf der gesamten Oberfläche von Sporangien, Keimschlauch und Appressorium des intakten Pathogens detektiert werden. Da der mAkPi102.2 alleine keinen inhibitorischen Effekt auf *P. infestans* ausübte, erfolgte die Fusion des scFvPi102.2 an die AFPs Cec, D4E1, GR7 und Mag. Die Reaktivität der bakteriell in *E. coli* und transient in *N. tabacum* exprimierten Fusionsproteine gegenüber *P. infestans* wurde mittels ELISA bestätigt. In einem Testsystem, bei dem transient mit dem scFvPi102.2 und den Fusionskonstrukten Cec-scFvPi86, D4E1-scFvPi102.2, GR7-scFvPi102.2 und Mag-scFvPi102.2 transformierte Tabakblätter mit *Phytophthora nicotianae* inokuliert wurden, konnte eine Inhibition von *P. nicotianae* auf den mit Cec-scFvPi86 und GR7-scFvPi102.2 transformierten Tabakblättern im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Die mit D4E1-scFvPi102.2 transformierten Blätter verbräunten frühzeitig während des Experiments. Die Konstrukte D4E1-scFvPi102.2 und GR7-scFvPi102.2 dienten zur stabilen Transformation der *S. tuberosum*-Sorten Gala und Pirol. Bei Resistenzuntersuchungen konnten drei transgene Linien identifiziert werden, die im Vergleich zum vollständig befallenen Wildtyp zu 100 % befallsfreie Blätter aufwiesen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Entwicklung von AFP-scFv Fusionsproteinen und deren Expression in transgenen Kartoffelpflanzen eine Möglichkeit zur Bekämpfung von *P. infestans* ist. Der Anbau *P. infestans*-resistenter Kartoffelsorten würde zu erheblichen Einsparungen von Pflanzenschutzmitteln, der damit verbundenen Kosten für deren Herstellung und Ausbringung auf dem Feld sowie zu einer reduzierten Umweltbelastung mit Fungiziden führen. Darüber hinaus könnte ein wichtiger Beitrag zur nachhaltigen Sicherstellung der Ernährung geleistet werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ali, G. S. und Reddy, A. S. (2000). Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens by synthetic peptides: *in vitro* growth inhibition, interaction between peptides and inhibition of disease progression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(8): 847-59.
- Andersson, B., Sandstrom, M. und Stromberg, A. (1998). Indications of soil borne inoculum of *Phytophthora infestans*. *Potato Research* 41: 305-310.
- Anonym (2008). *Agrarisch Dagblad* 19.07.2008
- Ausubel, F. M., Brent, R. und Kingston, R. E. (1994). *Current protocols in molecular biology*. New York, Wiley Interscience.
- Baca, M., Presta, L. G., O'Connor, S. J. und Wells, J. A. (1997). Antibody humanization using monovalent phage display. *Journal of Biological Chemistry* 272(16): 10678-84.
- Barbas, C. F., 3rd, Amberg, W., Simoncsits, A., Jones, T. M. und Lerner, R. A. (1993). Selection of human anti-hapten antibodies from semisynthetic libraries. *Gene* 137(1): 57-62.
- Bartels, G. und Backhaus, G. F. (2000). Die Prüfung von Pflanzen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Schadorganismen in der Biologischen Bundesanstalt. Teil 2: Resistenzprüfungen von Kulturpflanzen im Acker- und Gartenbau gegen Pilze, Bakterien und Viren. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Heft 373*, Parey Buchverlag Berlin.
- Bermingham, S., Dewey, F. M. und Maltby, L. (1995). Development of a monoclonal antibody-based immunoassay for the detection and quantification of *Anguillospora longissima* colonizing leaf material. *Applied and Environmental Microbiology* 61(7): 2606-2613.
- Boder, E. T., Midelfort, K. S. und Wittrup, K. D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(20): 10701-5.
- Boonrod, K., Galetzka, D., Nagy, P. D., Conrad, U. und Krczal, G. (2004). Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance. *Nature Biotechnology* 22(7): 856-62.
- Borkowska, M., Krzymowska, M., Talarczyk, A., Awan, M. F., Yakovleva, L., Kleczkowski, K. und Wielgat, B. (1998). Transgenic potato plants expressing soybean beta-1,3-endoglucanase gene exhibit an increased resistance to *Phytophthora infestans*. *Zeitschrift für Naturforschung C* 53(11-12): 1012-6.
- Briles, D. E., Claflin, J. L., Schroer, K. und Forman, C. (1981). Mouse IgG₃ antibodies are highly protective against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 294(5836): 88-90.
- Briles, D. E., Nahm, M., Schroer, K., Davie, J., Baker, P., Kearney, J. und Barletta, R. (1981). Anti-phosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type-3 *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Experimental Medicine* 153(3): 694-705.
- Bulone, V., Chanzy, H., Girard, V., Gay, L. und Fevre, M. (1992). Chitin components from the cellulosic cell wall fungus *Saprolegnia monoïca*. *Experimental Mycology* 16: 8-21.
- Burdsall, H. H., Banik, M. und Cook, M. E. (1990). Serological differentiation of 3 species of *Armillaria* and *Lentinula edodes* by enzyme-linked-immunosorbent-assay using immunized chickens as a source of antibodies. *Mycologia* 82(4): 415-423.

- Cary, J. W., Rajasekaran, K., Jaynes, J. M. und Cleveland, T. E. (2000). Transgenic expression of a gene encoding a synthetic antimicrobial peptide results in inhibition of fungal growth in vitro and in planta. *Plant Science* 154(2): 171-181.
- Casadevall, A. und Scharff, M. D. (1991). The mouse antibody response to infection with *Cryptococcus neoformans*: V_H and V_L usage in polysaccharide binding antibodies. *Journal of Experimental Medicine* 174(1): 151-60.
- Cavallarin, L., Andreu, D. und San Segundo, B. (1998). Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11(3): 218-27.
- Celen, A. (2007). Klonierung von antifungalen Peptid-Sequenzen und Charakterisierung von transgenen *Fusarium* resistenten Weizenpflanzen. Diplomarbeit, RWTH Aachen.
- Christou, P., Capell, T., Kohli, A., Gatehouse, J. A. und Gatehouse, A. M. (2006). Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends in Plant Science* 11(6): 302-8.
- Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M. und Margulies, D. H. (1998). *Current Protocols in Immunology*. New York, Wiley Interscience.
- Conrath, U., Linke, C., Jeblick, W., Geigenberger, P., Quick, W. P. und Neuhaus, H. E. (2003). Enhanced resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani* in leaves and tubers, respectively, of potato plants with decreased activity of the plastidic ATP/ADP transporter. *Planta* 217(1): 75-83.
- Constabel, C. P., Bertrand, C. und Brisson, N. (1993). Transgenic potato plants overexpressing the pathogenesis-related STH-2 gene show unaltered susceptibility to *Phytophthora infestans* and potato virus X. *Plant Molecular Biology* 22(5): 775-82.
- Corey, D. R., Shiau, A. K., Yang, Q., Janowski, B. A. und Craik, C. S. (1993). Trypsin display on the surface of bacteriophage. *Gene* 128(1): 129-34.
- Crameri, A., Cwirla, S. und Stemmer, W. P. (1996). Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nature Medicine* 2(1): 100-2.
- Cwirla, S. E., Peters, E. A., Barrett, R. W. und Dower, W. J. (1990). Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(16): 6378-82.
- Dai, Z. Y., Hooker, B. S., Anderson, D. B. und Thomas, S. R. (2000). Expression of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase E1 in transgenic tobacco: biochemical characteristics and physiological effects. *Transgenic Research* 9(1): 43-54.
- Darsow, U. (2002). *Phytophthora-Resistenz der Kartoffel - Das Wunschmerkmal für den ökologischen Kartoffelbau*. ForschungsReport Verbraucherschutz - Ernährung – Landwirtschaft 1: 16-19.
- de Bruin, R., Spelt, K., Mol, J., Koes, R. und Quattrocchio, F. (1999). Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nature Biotechnology* 17(4): 397-9.
- de Haard, H. J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S. E., Roovers, R. C., Henderikx, P., de Bruine, A. P., Arends, J. W. und Hoogenboom, H. R. (1999). A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *Journal of Biological Chemistry* 274(26): 18218-30.
- De Jaeger, G., De Wilde, C., Eeckhout, D., Fiers, E. und Depicker, A. (2000). The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. *Plant Molecular Biology* 43(4): 419-28.
- De Lucca, A. J., Bland, J. M., Grimm, C., Jacks, T. J., Cary, J. W., Jaynes, J. M., Cleveland, T. E. und Walsh, T. J. (1998). Fungicidal properties, sterol binding, and proteolytic resistance of the synthetic peptide D4E1. *Canadian Journal of Microbiology* 44(6): 514-20.

- De Neve, M., De Loose, M., Jacobs, A., Van Houdt, H., Kaluza, B., Weidle, U., Van Montagu, M. und Depicker, A. (1993). Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Res* 2(4): 227-37.
- Dewey, F. M., Munday, C. J. und Brasier, C. M. (1989). Monoclonal-antibodies to specific components of the dutch elm disease pathogen *Ophiostoma ulmi*. *Plant Pathology* 38(1): 9-20.
- Dixon, R. A., Lamb, C. J., Masoud, S., Sewalt, V. J. und Paiva, N. L. (1996). Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses - a review. *Gene* 179(1): 61-71.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Teh, T., Wang, C. I., Ayliffe, M. A., Kobe, B. und Ellis, J. G. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(23): 8888-93.
- Dorfmueller, S. (2002). Herstellung, Expression und Charakterisierung von rekombinanten Antikörpern und Immuntoxinen gegen *Phoma lingam*, *Sclerotinia sclerotiorum* und *Verticillium dahliae*. Dissertation, RWTH Aachen.
- Duncan, J. (1999). *Phytophthora* – an abiding threat to our crops. *Microbiology Today* 26: 114-116.
- Düring, K., Hippe, S., Kreuzaler, F. und Schell, J. (1990). Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology* 15(2): 281-93.
- Dykes, G. A., Aimoto, S. und Hastings, J. W. (1998). Modification of a synthetic antimicrobial peptide (ESF1) for improved inhibitory activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248(2): 268-72.
- Fack, F., Hugle-Dorr, B., Song, D., Queitsch, I., Petersen, G. und Bautz, E. K. (1997). Epitope mapping by phage display: random versus gene-fragment libraries. *Journal of Immunological Methods* 206(1-2): 43-52.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. und Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10(13): 2606-17.
- Fecker, L. F., Koenig, R. und Obermeier, C. (1997). *Nicotiana benthamiana* plants expressing beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) coat protein-specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection. *Archives of Virology* 142(9): 1857-63.
- Felici, F., Luzzago, A., Folgori, A. und Cortese, R. (1993). Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the *Bordetella pertussis* toxin from phage peptide libraries. *Gene* 128(1): 21-7.
- Fiedler, U., Phillips, J., Artsaenko, O. und Conrad, U. (1997). Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology* 3(3): 205-16.
- Firek, S., Draper, J., Owen, M. R., Gandecka, A., Cockburn, B. und Whitelam, G. C. (1993). Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures. *Plant Molecular Biology* 23(4): 861-70.
- Fischer, R., Drossard, J., Commandeur, U., Schillberg, S. und Emans, N. (1999). Towards molecular farming in the future: moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 30 (Pt 2): 101-8.
- Fischer, R., Schumann, D., Zimmermann, S., Drossard, J., Sack, M. und Schillberg, S. (1999). Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *European Journal of Biochemistry* 262(3): 810-6.

- Fischer, R., Hoffmann, K., Schillberg, S. und Emans, N. (2000). Antibody production by molecular farming in plants. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 14(2): 83-92.
- Flor, H. H. (1955). Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology* 45(12): 680-685.
- Fry, W. (2008). *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* 9(3): 385-402.
- Fry, W. E. und Goodwin, S. B. (1997). Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Disease* 81(12): 1349-1357.
- Fuller, V. L., Lilley, C. J. und Urwin, P. E. (2008). Nematode resistance. *New Phytologist* 180(1): 27-44.
- Gao, C., Mao, S., Lo, C. H., Wirsching, P., Lerner, R. A. und Janda, K. D. (1999). Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(11): 6025-30.
- Gao, C., Mao, S., Ditzel, H. J., Farnaes, L., Wirsching, P., Lerner, R. A. und Janda, K. D. (2002). A cell-penetrating peptide from a novel pVII-pIX phage-displayed random peptide library. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 10(12): 4057-65.
- Gao, C., Mao, S., Kaufmann, G., Wirsching, P., Lerner, R. A. und Janda, K. D. (2002). A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(20): 12612-6.
- Gao, X., Huang, Y. und Zhu, S. (1999). Construction of murine phage antibody library and selection of ricin-specific single-chain antibodies. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 48(5): 513-7.
- Garelik, G. (2002). Agriculture - Taking the bite out of potato blight. *Science* 298(5599): 1702-1704.
- Gehring, K., Wurzer-Faßnacht, U. und Zellner, M. (2004). Anbau gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP): Auswirkungen auf den Verbrauch von Pflanzenschutzmitteln und Bewertung möglicher Veränderungen hinsichtlich der Belastung der Umwelt und des Naturhaushaltes. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL). ISSN 1611-4159, 1. Auflage.
- Gianessi, L., Sankula, S. und Reigner, N. (2003). Potential impact for improving pest management in European agriculture – a summary of three case studies. National Center for Food and Agricultural Policy (NCFAP). www.ncfap.org
- Goletz, S., Christensen, P. A., Kristensen, P., Blohm, D., Tomlinson, I., Winter, G. und Karsten, U. (2002). Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *Journal of Molecular Biology* 315(5): 1087-1097.
- Gough, K. C., Li, Y., Vaughan, T. J., Williams, A. J., Cockburn, W. und Whitlam, G. C. (1999). Selection of phage antibodies to surface epitopes of *Phytophthora infestans*. *Journal of Immunological Methods* 228(1-2): 97-108.
- Grenville-Briggs, L. J., Anderson, V. L., Fugelstad, J., Avrova, A. O., Bouzenzana, J., Williams, A., Wawra, S., Whisson, S. C., Birch, P. R., Bulone, V. und van West, P. (2008). Cellulose synthesis in *Phytophthora infestans* is required for normal appressorium formation and successful infection of potato. *Plant Cell* 20(3): 720-38.
- Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Marks, J. D., Bye, J. M., Embleton, M. J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K. P., Gorick, B. D., Hughes-Jones, N. C., Hoogenboom, H. R. und Winter, G. (1993). Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *The EMBO Journal* 12(2): 725-34.

- Grønbech-Hansen, J., Andersson, B., Bain, R., Besenhofer, G., Bradshaw, N., Bucena, L., Bugiani, R., Cakir, E., Cooke, L., Dubois, L., Fillippov, A., Hannukkala, A., Hausladen, H., Hausvater, E., Heldak, J., Hermansen, A., Kapsa, J., Koppel, M., Lebecka, R., Lees, A., Musa, T., Nugteren, W., Ronis, A., Schepers, H., Spits, H. und Vanhaverbeke, P. (2007). The development and control of *Phytophthora infestans* in Europe in 2006. PPO-Special Report no. 12: 13-26.
- Grunwald, N. J. und Flier, W. G. (2005). The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. Annual Review of Phytopathology 43: 171-90.
- Guatelli, J. C., Gingeras, T. R. und Richman, D. D. (1989). Nucleic-acid amplification *in vitro*- detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type-1 infection. Clinical Microbiology Reviews 2(2): 217-226.
- Guenther, J. F., Michael, K. C. und Nolte, P. (2001). The economic impact of potato late blight on US growers. Potato Research 44(2): 121-125.
- Haight, C., Davis, G. D., Subramanian, R., Jackson, K. W. und Harrison, R. G. (1998). Recombinant production and purification of novel antisense antimicrobial peptide in *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering 57(1): 55-61.
- Hawkins, R. E., Russell, S. J. und Winter, G. (1992). Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. Journal of Molecular Biology 226(3): 889-96.
- Hiatt, A., Cafferkey, R. und Bowdish, K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. Nature 342(6245): 76-8.
- Hof, D., Hoeke, M. O. und Raats, J. M. H. (2008). Multiple-antigen immunization of chickens facilitates the generation of recombinant antibodies to autoantigens. Clinical and Experimental Immunology 151(2): 367-377.
- Holzem, A., Nähring, J. M. und Fischer, R. (2001). Rapid identification of a tobacco mosaic virus epitope by using a coat protein gene-fragment-pVIII fusion library. Journal of General Virology 82(Pt 1): 9-15.
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P. und Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Nucleic Acids Research 19(15): 4133-7.
- Hoogenboom, H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. Nature Biotechnology 23(9): 1105-16.
- Horsman, J., McLean, M. D., Olea-Popelka, F. C. und Hall, J. C. (2007). Picloram resistance in transgenic tobacco expressing an anti-picloram scFv antibody is due to reduced translocation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(1): 106-12.
- Huang, L., Ching, C. B., Jiang, R. R. und Leong, S. S. J. (2008). Production of bioactive human beta-defensin 5 and 6 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. Protein Expression and Purification 61(2): 168-174.
- Hufton, S. E., Moerkerk, P. T., Meulemans, E. V., de Bruine, A., Arends, J. W. und Hoogenboom, H. R. (1999). Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. Journal of Immunological Methods 231(1-2): 39-51.
- Iannolo, G., Minenkova, O., Gonfloni, S., Castagnoli, L. und Cesareni, G. (1997). Construction, exploitation and evolution of a new peptide library displayed at high density by fusion to the major coat protein of filamentous phage. Biological Chemistry 378(6): 517-21.
- Irving, R. A., Kortt, A. A. und Hudson, P. J. (1996). Affinity maturation of recombinant antibodies using *E. coli* mutator cells. Immunotechnology 2(2): 127-43.

- Jung, S. und Plückthun, A. (1997). Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting. *Protein Engineering* 10(8): 959-66.
- Kabat, E. A., Wu, T. T., Reid-Miller, M., Perry, H. M. und Gottesman, K. S. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest. U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC, 5th edition.
- Kim, H. K., Chun, D. S., Kim, J. S., Yun, C. H., Lee, J. H., Hong, S. K. und Kang, D. K. (2006). Expression of the cationic antimicrobial peptide lactoferricin fused with the anionic peptide in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(2): 330-338.
- Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G., Martin, A. C. R., Kupriyanova, O. A. und Little, M. (1997). Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity. *Protein Engineering* 10(4): 445-453.
- Köhler, G. und Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Koncz, C. und Schell, J. (1986). The promotor of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* 204: 383-396.
- Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H. R. und Plückthun, A. (1997). Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *Journal of Immunological Methods* 201(1): 35-55.
- Larrick, J. W., Yu, L., Naftzger, C., Jaiswal, S. und Wycoff, K. (2001). Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomolecular Engineering* 18(3): 87-94.
- Lauge, R. und De Wit, P. J. (1998). Fungal avirulence genes: structure and possible functions. *Fungal Genetics and Biology* 24(3): 285-97.
- Le Gall, F., Bove, J. M. und Garnier, M. (1998). Engineering of a single-chain variable-fragment (scFv) antibody specific for the stolbur phytoplasma (Mollicute) and its expression in *Escherichia coli* and tobacco plants. *Applied and Environmental Microbiology* 64(11): 4566-72.
- Lee, C. V., Liang, W. C., Dennis, M. S., Eigenbrot, C., Sidhu, S. S. und Fuh, G. (2004). High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *Journal of Molecular Biology* 340(5): 1073-93.
- Lee, J. H., Kim, J. H., Hwang, S. W., Lee, W. J., Yoon, H. K., Lee, H. S. und Hong, S. S. (2000). High-level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277(3): 575-580.
- Lei, S.-P., Lin, H.-C., Wang, S.-S., Callaway, J. und Wilcox, G. (1987). Characterization of the *Erwinia carotovora pelB* gene and its product pectate lyase. *Journal of Bacteriology* 169(9): 4379-4383.
- Li, H.-P., Zhang, J.-B., Shi, R.-P., Huang, T., Fischer, R. und Liao, Y.-C. (2008). Engineering fusarium head blight resistance in wheat by expression of a fusion protein containing a fusarium-specific antibody and an antifungal peptide. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(9): 1242-8.
- Li, R., Wu, N., Fan, Y. und Song, B. (1999). Transgenic potato plants expressing osmotin gene inhibits fungal development in inoculated leaves. *Chin J Biotechnol* 15(2): 71-5.
- Liu, D., Raghothama, K. G., Hasegawa, P. M. und Bressan, R. A. (1994). Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(5): 1888-92.

- Low, N. M., Holliger, P. H. und Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *Journal of Molecular Biology* 260(3): 359-68.
- Lu, D., Shen, J., Vil, M. D., Zhang, H., Jimenez, X., Bohlen, P., Witte, L. und Zhu, Z. (2003). Tailoring in vitro selection for a picomolar affinity human antibody directed against vascular endothelial growth factor receptor 2 for enhanced neutralizing activity. *Journal of Biological Chemistry* 278(44): 43496-507.
- Ma, J. K., Hiatt, A., Hein, M., Vine, N. D., Wang, F., Stabila, P., van Dolleweerd, C., Mostov, K. und Lehner, T. (1995). Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 268(5211): 716-9.
- Malembic-Maher, S., Le Gall, F., Danet, J. L., de Borne, F. D., Bove, J. M. und Garnier-Semancik, M. (2005). Transformation of tobacco plants for single-chain antibody expression via apoplastic and symplasmic routes, and analysis of their susceptibility to stolbur phytoplasma infection. *Plant Science* 168(2): 349-358.
- Mao, S., Gao, C., Lo, C. H., Wirsching, P., Wong, C. H. und Janda, K. D. (1999). Phage-display library selection of high-affinity human single-chain antibodies to tumor-associated carbohydrate antigens sialyl Lewisx and Lewisx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(12): 6953-8.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. und Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of Molecular Biology* 222(3): 581-97.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. und Winter, G. (1992). Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *Journal of Biological Chemistry* 267(23): 16007-10.
- Martini, N., Egen, M., Runtz, I. und Strittmatter, G. (1993). Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection. *Molecular and General Genetics* 236(2-3): 179-186.
- Mayrose, I., Shlomi, T., Rubinstein, N. D., Gershoni, J. M., Ruppin, E., Sharan, R. und Pupko, T. (2007). Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries: a graph-based algorithm. *Nucleic Acids Research* 35(1): 69-78.
- Monecke, M. (1999). Immunologische Untersuchungen zur Expression von Nicht-Strukturproteinen des Kartoffel Blattrollvirus (PLRV) mit spezifischen Antikörpern. Dissertation, RWTH Aachen.
- Montesinos, E. (2007). Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiology Letters* 270(1): 1-11.
- Mutuberria, R., Hoogenboom, H. R., van der Linden, E., de Bruine, A. P. und Roovers, R. C. (1999). Model systems to study the parameters determining the success of phage antibody selections on complex antigens. *Journal of Immunological Methods* 231(1-2): 65-81.
- Nieba, L., Honegger, A., Krebber, C. und Plückthun, A. (1997). Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved *in vivo* folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Engineering* 10(4): 435-44.
- Nölke, G. (2002). Engineering and characterization of single chain antibody fragments (scFvs) specific to key enzymes in polyamine biosynthesis and manipulation of polyamine pathway by constitutive expression of recombinant ODC and SDE enzymes in transgenic tobacco. Dissertation, RWTH Aachen.
- Nölke, G., Fischer, R. und Schillberg, S. (2004). Antibody-based pathogen resistance in plants. *Journal of Plant Pathology* 86(1): 5-17.

- Nölke, G., Schneider, B., Fischer, R. und Schillberg, S. (2005). Immunomodulation of polyamine biosynthesis in tobacco plants has a significant impact on polyamine levels and generates a dwarf phenotype. *Plant Biotechnology Journal* 3(2): 237-47.
- Nölke, G., Fischer, R. und Schillberg, S. (2006). Antibody-based metabolic engineering in plants. *Journal of Biotechnology* 124(1): 271-83.
- Nölke, G., Cobanov, P., Uhde-Holzem, K., Reustle, G., Fischer, R. und Schillberg, S. (2008). Grapevine fanleaf virus (GFLV)-specific antibodies confer GFLV and Arabis mosaic virus (ArMV) resistance in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology* 9(6): in press.
- Oard, S., Rush, M. C. und Oard, J. H. (2004). Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. *Journal of Applied Microbiology* 97(1): 169-180.
- Osusky, M., Osuska, L., Hancock, R. E., Kay, W. W. und Misra, S. (2004). Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. *Transgenic Research* 13(2): 181-90.
- Osusky, M., Osuska, L., Kay, W. und Misra, S. (2005). Genetic modification of potato against microbial diseases: in vitro and in planta activity of a dermaseptin B1 derivative, MsrA2. *Theoretical and Applied Genetics* 111(4): 711-22.
- Paquin, B., Laforest, M. J., Forget, L., Roewer, I., Wang, Z., Longcore, J. und Lang, B. F. (1997). The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Current Genetics* 31(5): 380-95.
- Peeters, K., De Wilde, C., De Jaeger, G., Angenon, G. und Depicker, A. (2001). Production of antibodies and antibody fragments in plants. *Vaccine* 19(17-19): 2756-61.
- Persson, H., Wallmark, H., Ljungars, A., Hallborn, J. und Ohlin, M. (2008). *In vitro* evolution of an antibody fragment population to find high-affinity hapten binders. *Protein Engineering Design and Selection* 21(8): 485-93.
- Peschen, D. (2002). Antikörper vermittelte Fusarien-Resistenz in transgenen Pflanzen. Dissertation, RWTH Aachen.
- Peschen, D., Li, H. P., Fischer, R., Kreuzaler, F. und Liao, Y. C. (2004). Fusion proteins comprising a *Fusarium*-specific antibody linked to antifungal peptides protect plants against a fungal pathogen. *Nature Biotechnology* 22(6): 732-8.
- Polson, A., Coetzer, T., Kruger, J., von Maltzahn, E. und van der Merwe, K. J. (1985). Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunological Investigations* 14(4): 323-7.
- Porcar, M., Ramos, S. und Latorre, A. (2007). A simple DNA extraction method suitable for PCR detection of genetically modified maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(14): 2728-2731.
- Prins, M., Lohuis, D., Schots, A. und Goldbach, R. (2005). Phage display-selected single-chain antibodies confer high levels of resistance against tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology* 86(Pt 7): 2107-13.
- Qui, X.-Q., Wang, H., Cai, B., Wang, L.-L. und Yue, S.-T. (2007). Small antibody mimetics comprising two complementary-determining regions and a framework region for tumour targeting. *Nature Biotechnology* 25(8): 921-9.
- Rajasekaran, K., Stromberg, K. D., Cary, J. W. und Cleveland, T. E. (2001). Broad-spectrum antimicrobial activity *in vitro* of the synthetic peptide D4E1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(6): 2799-803.
- Rajasekaran, K., Cary, J. W., Jaynes, J. M. und Cleveland, T. E. (2005). Disease resistance conferred by the expression of a gene encoding a synthetic peptide in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Plant Biotechnology Journal* 3(6): 545-54.

- Riester, R., Soika, C., Honold, C.-H., Schmid, W., Janorschke, B.,ENZLER, J., Bundschuh, R., Stark, G., Sutor, P., Goldhofer, H. und Graser, S. (2007). Agrarmärkte 2007. Landesanstalt für Entwicklung der Landwirtschaft und der Ländlichen Räume (LEL) ISSN: 0931-5055.
- Roggenbuck, D., Marx, U., Kiessig, S. T., Schoenherr, G., Jahn, S. und Porstmann, T. (1994). Purification and immunochemical characterization of a natural human polyreactive monoclonal IgM antibody. *Journal of Immunological Methods* 167(1-2): 207-18.
- Ruberti, F., Cattaneo, A. und Bradbury, A. (1994). The use of the RACE method to clone hybridoma cDNA when V region primers fail. *Journal of Immunological Methods* 173(1): 33-9.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.
- Sambrook, J. und Russell, D. (2001). *Molecular cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, 3rd edition.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12): 5463-7.
- Schepers, H. T. A. M. (2001). The development and control of *Phytophthora infestans* in Europe in 2001. PPO-Special Report no. 8: 9-20.
- Schepers, H. T. A. M. (2004). The development and control of *Phytophthora infestans* in Europe in 2003. PPO-Special Report no. 10: 9-18.
- Schepers, H. T. A. M. und Spits, H. G. (2005). The development and control of *Phytophthora infestans* in Europe in 2004-2005. PPO-Special Report no. 11: 11-22.
- Schick, R., Schick, E. und Hank, H. (1954). Einige Bemerkungen zu einer internationalen Nomenklatur der *Phytophthora*-Rassen und der die *Phytophthora*-Widerstandsfähigkeit kontrollierenden Gene der Kartoffel. *Theoretical and Applied Genetics* 24(9): 249-280.
- Schier, R., McCall, A., Adams, G. P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Weiner, L. M., Marks, C. und Marks, J. D. (1996). Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *Journal of Molecular Biology* 263(4): 551-67.
- Schiermeier, Q. (2001). Russia needs help to fend off potato famine, researchers warn. *Nature* 410(6832): 1011.
- Schillberg, S., Zimmermann, S., Voss, A. und Fischer, R. (1999). Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic Research* 8(4): 255-263.
- Schillberg, S., Zimmermann, S., Findlay, K. und Fischer, R. (2000). Plasma membrane display of anti-viral single chain Fv fragments confers resistance to tobacco mosaic virus. *Molecular Breeding* 6(3): 317-326.
- Schillberg, S., Zimmermann, S., Zhang, M. Y. und Fischer, R. (2001). Antibody-based resistance to plant pathogens. *Transgenic Research* 10(1): 1-12.
- Schillberg, S., Fischer, R. und Emans, N. (2003). Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60(3): 433-445.
- Schillberg, S., Twyman, R. M. und Fischer, R. (2005). Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants - technology assessment. *Vaccine* 23(15): 1764-1769.
- Schneider, M., Droz, E., Malnoe, P., Chatot, C., Bonnel, E. und Métraux, J.-P. (2002). Transgenic potato plants expressing oxalate oxidase have increased resistance to oomycete and bacterial pathogens. *Potato Research* 45: 177-185.

- Schöber-Butin, B. (2001). Die Kraut- und Braunfäule der Kartoffel und ihr Erreger *Phytophthora infestans* (MONT.) DE BARY. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Heft 384, Parey Buchverlag Berlin.
- Schofield, D. J., Pope, A. R., Clementel, V., Buckell, J., Chapple, S., Clarke, K. F., Conquer, J. S., Crofts, A. M., Crowther, S. R., Dyson, M. R., Flack, G., Griffin, G. J., Hooks, Y., Howat, W. J., Kolb-Kokocinski, A., Kunze, S., Martin, C. D., Maslen, G. L., Mitchell, J. N., O'Sullivan, M., Perera, R. L., Roake, W., Shadbolt, S. P., Vincent, K. J., Warford, A., Wilson, W. E., Xie, J., Young, J. L. und McCafferty, J. (2007). Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. *Genome Biology* 8(11): R254.
- Schouten, A., Roosien, J., van Engelen, F. A., de Jong, G. A., Borst-Vrensens, A. W., Zilverentant, J. F., Bosch, D., Stiekema, W. J., Gommers, F. J., Schots, A. und Bakker, J. (1996). The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 30(4): 781-93.
- Selvakumar, D., Miyamoto, M., Furuichi, Y. und Komiyama, T. (2006). Inhibition of fungal beta-1,3-glucan synthase and cell growth by HM-1 killer toxin single-chain anti-idiotypic antibodies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(9): 3090-7.
- Shattock, R. C. (2002). *Phytophthora infestans*: populations, pathogenicity and phenylamides. *Pest Management Science* 58(9): 944-50.
- Sidhu, S. S., Li, B., Chen, Y., Fellouse, F. A., Eigenbrot, C. und Fuh, G. (2004). Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *Journal of Molecular Biology* 338(2): 299-310.
- Smart, C. D. und Fry, W. E. (2001). Invasions by the late blight pathogen: renewed sex and enhanced fitness. *Biological Invasions* 3: 235-243.
- Sogin, M. L. und Silberman, J. D. (1998). Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *International Journal of Parasitology* 28: 11-20.
- Sompuram, S. R., Kodela, V., Ramanathan, H., Wescott, C., Radcliffe, G. und Bogen, S. A. (2002). Synthetic peptides identified from phage-displayed combinatorial libraries as immunodiagnostic assay surrogate quality-control targets. *Clinical Chemistry* 48(3): 410-20.
- Song, J., Bradeen, J. M., Naess, S. K., Raasch, J. A., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., Liu, J., Kuang, H., Austin-Phillips, S., Buell, C. R., Helgeson, J. P. und Jiang, J. (2003). Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(16): 9128-33.
- Spiegel, H., Schillberg, S., Sack, M., Holzem, A., Nähring, J., Monecke, M., Liao, Y. C. und Fischer, R. (1999). Accumulation of antibody fusion proteins in the cytoplasm and ER of plant cells. *Plant Science* 149(1): 63-71.
- Ste-Marie, L., Senechal, S., Boushira, M., Garzon, S., Strykowski, H., Pedneault, L. und de Repentigny, L. (1990). Production and characterization of monoclonal antibodies to cell wall antigens of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* 58(7): 2105-14.
- Stöger, E., Sack, M., Perrin, Y., Vaquero, C., Torres, E., Twyman, R. M., Christou, P. und Fischer, R. (2002). Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Molecular Breeding* 9(3): 149-158.
- Stöger, E., Sack, M., Nicholson, L., Fischer, R. und Christou, P. (2005). Recent progress in plantibody technology. *Current Pharmaceutical Design* 11(19): 2439-57.
- Strachan, G., McElhiney, J., Drever, M. R., McIntosh, F., Lawton, L. A. und Porter, A. J. (2002). Rapid selection of anti-hapten antibodies isolated from synthetic and semi-

- synthetic antibody phage display libraries expressed in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Letters 210(2): 257-61.
- Strittmatter, G., Janssens, J., Opsomer, C. und Batterman, J. (1995). Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell-death. Biotechnology 13(10): 1085-1089.
- Strittmatter, G., Gheysen, G., GianinazziPearson, V., Hahn, K., Niebel, A., Rohde, W. und Tacke, E. (1996). Infections with various types of organisms stimulate transcription from a short promoter fragment of the potato *gst1* gene. Molecular Plant-Microbe Interactions 9(1): 68-73.
- Sudarshana, M. R., Roy, G. und Falk, B. W. (2007). Methods for engineering resistance to plant viruses. Methods in Molecular Biology 354: 183-95.
- Sugita, M., Manzara, T., Pichersky, E., Cashmore, A. und Gruissem, W. (1987). Genomic organization, sequence-analysis and expression of all 5 genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase - oxygenase from tomato. Molecular and General Genetics 209(2): 247-256.
- Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A. und Galeffi, P. (1993). Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. Nature 366(6454): 469-72.
- Tur, M. K., Huhn, M., Sasse, S., Engert, A. und Barth, S. (2001). Selection of scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to a significant loss of insert-free phages. Biotechniques 30(2): 404-13.
- van der Vossen, E., Sikkema, A., Hekkert, B. L., Gros, J., Stevens, P., Muskens, M., Wouters, D., Pereira, A., Stiekema, W. und Allefs, S. (2003). An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. The Plant Journal 36(6): 867-82.
- van der Vossen, E. A., Gros, J., Sikkema, A., Muskens, M., Wouters, D., Wolters, P., Pereira, A. und Allefs, S. (2005). The Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. The Plant Journal 44(2): 208-22.
- van Wyngaardt, W., Malatji, T., Mashau, C., Fehrsen, J., Jordaan, F., Miltiadou, D. und du Plessis, D. H. (2004). A large semi-synthetic single-chain Fv phage display library based on chicken immunoglobulin genes. BMC Biotechnology 4: 6.
- Vaquero, C., Sack, M., Chandler, J., Drossard, J., Schuster, F., Monecke, M., Schillberg, S. und Fischer, R. (1999). Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(20): 11128-33.
- Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope, A. R., Earnshaw, J. C., McCafferty, J., Hodits, R. A., Wilton, J. und Johnson, K. S. (1996). Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. Nature Biotechnology 14(3): 309-14.
- Vieira, J. und Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. Methods in Enzymology 153: 3-11.
- Villani, M. E., Roggero, P., Bitti, O., Benvenuto, E. und Franconi, R. (2005). Immunomodulation of cucumber mosaic virus infection by intrabodies selected in vitro from a stable single-framework phage display library. Plant Molecular Biology 58(3): 305-16.
- Voss, A., Niersbach, M., Hain, R., Hirsch, H. J., Liao, Y. C., Kreuzaler, F. und Fischer, R. (1995). Reduced virus infectivity in *Nicotiana tabacum* secreting a TMV-specific full-size antibody. Molecular Breeding 1(1): 39-50.

- Wandelt, C. I., Khan, M. R., Craig, S., Schroeder, H. E., Spencer, D. und Higgins, T. J. (1992). Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *The Plant Journal* 2(2): 181-92.
- Weiss, Y., Shulman, A., Ben Shir, I., Keinan, E. und Wolf, S. (2006). Herbicide-resistance conferred by expression of a catalytic antibody in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology* 24(6): 713-7.
- Westerhoff, H. V., Juretic, D., Hendler, R. W. und Zasloff, M. (1989). Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(17): 6597-601.
- White, J. G., Lyons, N. F., Wakeham, A. J., Mead, A. und Green, J. R. (1994). Serological profiling of the fungal genus *Pythium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44(5): 349-361.
- Whitlow, M., Bell, B. A., Feng, S. L., Filpula, D., Hardman, K. D., Hubert, S. L., Rollence, M. L., Wood, J. F., Schott, M. E., Milenic, D. E. und et al. (1993). An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Engineering* 6(8): 989-95.
- Widmark, A. K., Andersson, B., Cassel-Lundhagen, A., Sandstrom, M. und Yuen, J. E. (2007). *Phytophthora infestans* in a single field in southwest Sweden early in spring: symptoms, spatial distribution and genotypic variation. *Plant Pathology* 56(4): 573-579.
- Wiens, G. D., Brown, M. und Rittenberg, M. B. (2003). Repertoire shift in the humoral response to phosphocholine-keyhole limpet hemocyanin: V_H somatic mutation in germinal center B cells impairs T15 Ig function. *Journal of Immunology* 170(10): 5095-5102.
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E. und Hoogenboom, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annual Review of Immunology* 12: 433-55.
- Wnendt, S., Ulbrich, N. und Stahl, U. (1990). Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding the antifungal-protein of *Aspergillus giganteus* and preliminary characterization of the native gene. *Nucleic Acids Research* 18(13): 3987.
- Wong, C., Sridhara, S., Bardwell, J. C. und Jakob, U. (2000). Heating greatly speeds coomassie blue staining and destaining. *Biotechniques* 28(3): 426-8, 430, 432.
- Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Levine, E. B., Fitzsimmons, K. C. und Shah, D. M. (1995). Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7(9): 1357-68.
- Yamanaka, H. I., Inoue, T. und IkedaTanaka, O. (1996). Chicken monoclonal antibody isolated by a phage display system. *Journal of Immunology* 157(3): 1156-1162.
- Yu, D., Xie, Z., Chen, C., Fan, B. und Chen, Z. (1999). Expression of tobacco class II catalase gene activates the endogenous homologous gene and is associated with disease resistance in transgenic potato plants. *Plant Molecular Biology* 39(3): 477-88.
- Zahnd, C., Spinelli, S., Luginbuhl, B., Amstutz, P., Cambillau, C. und Plückthun, A. (2004). Directed in vitro evolution and crystallographic analysis of a peptide-binding single chain antibody fragment (scFv) with low picomolar affinity. *Journal of Biological Chemistry* 279(18): 18870-7.
- Zakharchenko, N. S., Rukavtsova, E. B., Gudkov, A. T., Yukhmanova, A. A., Shkol'naya, L. A., Kado, C. I. und Bur'yanov, Y. I. (2007). Expression of the artificial gene encoding anti-microbial peptide cecropin P1 increases the resistance of transgenic potato plants to potato blight and white rot. *Doklady Biological Sciences* 415: 267-9.
- Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin - isolation, characterization of 2 active forms, and partial cDNA sequence of a precursor.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84(15): 5449-5453.
- Zhang, L., Xu, J. und Birch, R. G. (1999). Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. *Nature Biotechnology* 17(10): 1021-4.
- Zhang, M.-Y., Zimmermann, S., Fischer, R. und Schillberg, S. (2008). Generation and evaluation of movement protein-specific single-chain antibodies for delaying symptoms of Tomato spotted wilt virus infection in tobacco. *Plant Pathology* 57(5): 854-860.
- Zhu, B., Chen, T. H. und Li, P. H. (1996). Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. *Planta* 198(1): 70-7.
- Zimmermann, S., Schillberg, S., Liao, Y.-C. und Fischer, R. (1998). Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum*. *Molecular Breeding* 4(4): 369-379.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

35SS	35S-Promoter mit doppelter Enhancerregion des CaMV
A	Ampère
ABTS	2,2'-Azino-Di-(3-Ethylbenzthiazolin Sulfonat) Diammoniumsalz
AFP	antifungales Peptid
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
avr-Gen	Avirulenzgen
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Dinatriumsalz
bp	Basenpaar
CaMV	„cauliflower mosaic virus“, Blumenkohlmosaikvirus
Carb	Carbenicillin
cDNS	komplementäre DNS
CDR	„complementarity determining region“; hypervariable Region
CIP	„calf intestinal alkaline phosphatase“
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cv.	Kultivar
Da	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	2-Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
<i>et. al.</i>	„und andere“
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
Fab	Antikörperfragment (monovalent)
F(ab') ₂	Antikörperfragment (bivalent)
Fc	konstante Antikörperregion
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FR	„framework region“; Gerüstregion der variablen Domänen
g	Erdbeschleunigung (9,806 ms ⁻²)
g	Gramm
GAR	„goat anti-rabbit“; Ziege anti-Kaninchen
GAM	„goat anti-mouse“; Ziege anti-Maus
h	Stunde
H + L	spezifisch für die schwere und leichte Antikörperkette
His ₆	Aminosäuresequenz aus sechs Histidinen
HRP	„horse radish peroxidase“, Meerrettichperoxidase
Ig	Immunoglobulin
IgY	Antikörper im Hühnereigelb („Y“: engl. „yolk“)

IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
Km	Kanamycin
κ	kappa
λ	lambda
l	Liter
μ	mikro
m	milli
M	Molar
MAH	„mouse anti-human“; Maus anti-Mensch
mAk	monoklonaler Antikörper
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
NBT	p-Nitroblautetrazoliumblauchlorid
n	nano
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	PAA-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PBS-T	0,05% (v/v) Tween-20 in 1x PBS
PCR	„polymerase chain reaction“; Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R-Gen	Resistenzgen
RAC	„rat anti-chicken“; Ratte anti-Huhn
RAG	„rabbit anti-goat“; Kaninchen anti-Ziege
RAM	„rabbit anti-mouse“; Kaninchen anti-Maus oder „rat anti-mouse“; Ratte anti-Maus
RAR	„rabbit anti-rat“; Kaninchen anti-Ratte
Rif	Rifampicin
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SAR	„scaffold attachment region“
sec	Sekunden
scFv	„single-chain fragment variable“; Einzelkettenantikörper aus V_H und V_L
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	„unit“, Einheit
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen

V_H bzw. V_L	variable Region der schweren (H) bzw. leichten (L) Ig-Kette
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
ZWF	Zellwandfragmente

Buchstabencode für variable Basenpaare

R	A oder G
Y	C oder T
M	A oder C
K	G oder T
W	A oder T
S	C oder G
B	C, G oder T
D	A, G oder T
H	A, C oder T
V	A, C oder G
N	A, C, G oder T

Buchstabencode für Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

7.2 Oligonukleotide

Tabelle 30: Oligonukleotide zur Amplifizierung und Klonierung variabler Domänen muriner monoklonaler Antikörper

Name	Sequenz 5' → 3'
Oligonukleotid zur Ligation an cDNS	
AS linker	PO ₄ -CTG CAG AAA GCT TGG TGG ATC CTA-NH ₂
Oligonukleotide zur Amplifizierung der schweren und leichten Antikörperketten von cDNS	
AS04	TAG GAT CCA CCA AGC TTT CTG CAG
SR-MHC1	GTC GAC TCA TTT ACC AGG AGA GTG GGA GAG G
SR-MLCk2	CTC GAG TCA ACA CTC ATT CCT GTT GAA GCT CTT GAC
SR-MLCk1	CTC GAG TCA ACA CTC ACC CCT GTT G
IgM const5	GAA GAC ATT TGG GAA GGA CTG ACT
MLC1ambda1+5	CTC GAG TCT GGC AGC TGT AAC TGC TAT G
MLC1ambda2+3	CTC GAG TCC AGA CTC TTC TCC ACA GTG TC
Oligonukleotide zur Amplifizierung der V _H und V _L von den schweren und leichten Antikörperketten	
86_102.2_VHF	CAT GAC TCG CGG CCC AGC CGG CCA TGG CCC AGG TCC AAC TGC AGC AGC C
88_VHF	CAT GAC TCG CGG CCC AGC CGG CCA TGG GTG AGG TGA AGC TGG TGG AAT C
129_VHF	CAT GAC TCG CGG CCC AGC CGG CCA TGG CAC AGA TCC AGT TGG TGC AGT C
102.4_VHF	CAT GAC TCG CGG CCC AGC CGG CCA TGG CTG ATG TGC AGC TTC AGG AGT C
86_129_VHB	AGC TGA GAC GGT GAC CAG AGT CCC TTG GCC CCA G
88_VHB	AGC TGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TGC GCC CCA G
102.2_VHB	AGC TGA GAC GGT GAC CAG AGT CCC CTG GCC CCA G
102.4_VHB	AGC TGA GAC GGT GAC CGA GGT TCC TTG ACC CCA G
86_102.2_VLF	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCC CAG GCT GTT GTG ACT CAG
88_VLF	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCA GAC ATT GTG ATG ACT CAG
129_VLF	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCA CAA ATT GTT CTC ACC CAG
102.4_VLF	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCA CAA ATT GTT TTC ACC CAG
86_102.2_VLB	CTA GTG GTA CTC CAC GCG GCC GCC TTG GGC TGG CCT AGG ACA G
88_VLB	CTA GTG GTA CTC CAC GCG GCC GCA GCA TCA GCC CGT TTC AG
129_VLB	CTA GTG GTA CTC CAC GCG GCC GCA GCA TCA GCC CGT TTG ATT TC
102.4_VLB	CTA GTG GTA CTC CAC GCG GCC GCA GCA TCA GCC CGT TTT ATT TC

Tabelle 31: Oligonukleotide zur Sequenzierung und Amplifizierung rekombinanter DNS

Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
LMB3	CAG GAA ACA GCT ATG AC	pHENHi
fdseq	GAA TTT TCT GTA TGA GG	pHENHi
pss 3'	AGA GAG AGA TAG ATT TGT AGA GA	pTRAc
pss 5'	ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT CT	pTRAc
pHEN 5'	GGA GAC AGT CAT AAT GAA ATA CC	pHENHi
pHEN 3' back	GAC GTT AGT AAA TGA ATT TTC	pHENHi
MHCS1	ACA TCC TTG GGC TTT GGG GGG AAG ATG	IgG1
MHCS2	AGG GAT TGT GGT TGT AAG CCT TGC ATA	IgG1
MHCS3	AGG GGC CAG TGG ATA GAC AGA TGG GGG	IgG1
pJET forward	TAA CTT GGA GCA GGT TCC ATT C	pJET1/blunt
pJET reverse	TAT AAG TTT TAA TAT ACA GCC TG	pJET1/blunt

Tabelle 32: Oligonukleotide zur cDNS-Synthese von RNS aus Hühnern

Name	Sequenz 5' → 3'
Chic VL M	CGG TGG GGG ACA TCT GAG TGG G
Chic VH N	AGG GGT GGA GGA CCT GCA CCT C

Tabelle 33: Oligonukleotide zur cDNS-Synthese von RNS aus Mäusen

Name	Sequenz 5' → 3'
COH 30	GGC CAG TGG ATA GAC AGA
COH 32	TAA CCC TWG ACC AGG CAT CC
Mu PD 31	GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC GTC GAC GCG GCC GCG ACT AGT
Mu PD 32	TTT CCA CCT TCC TCT GAR GAG CTT GTC GAC GCG GCC GCG ACT AGT

Tabelle 34: Oligonukleotide zur Amplifizierung avianer variabler Antikörperdomänen

Name	Sequenz 5' → 3'
CPDVHF	A TCT AGG CAT CCC TT G GCC CAG CCG GCC ATG G CT GCC GTG ACG TTG GAC GAG TCC
CPDVHB	CTA GTG CAT GCT GGA GGT GAC C TC GGT CCC GTG GCC CCA TGC GTC
CPDVLF	TCC ACA CAT GCT CCA GGC GCG CC T GCG CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG
CPDVLB	TGA CCT TCG AGG ATG C GC GGC CGC GTC GAC GGG CTG GCC TAG GAC GGT CAG

Tabelle 35: Oligonukleotide zur Amplifizierung muriner V_H-Antikörperfragmente

K= G oder T; M = A oder C; S = C oder G; R = A oder G; W = A oder T

Name	Sequenz 5' → 3'
MPDVHF1	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAK GTR CAG CTT CAG GAG TCR GGA
MPDVHF2	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG MAG CTG AWG GAR TCT GG
MPDVHF3	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTC CAG CTR CAR CAR TCT GGA CC
MPDVHF4	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTW CAG CTS CAG CAG TCT G
MPDVHF5	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC SAG GTC CAR CTG CAG SAR YCT G
MPDVHF6	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTT CAG CTG CAG SAR YCT GGR
MPDVHF7	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAR GTG AAG CTG GTG GAR TCT GGR
MPDVHF8	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG AAG STY MTC GAG TCT GGA
MPDVHF9	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAR GTG AAG CTK GAK GAG WCT GR
MPDVHF10	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAV GTG MWG CTK GTG GAG TCT G GK
MPDVHF11	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAR CTK GTT GAG TCT G GK
MPDVHF12	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC SAG GTY CAG CTK CAG CAG TCT GGA
MPDVHF13	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GGA
MPDVHF14	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTS CAC STG RWG SAG TCT GGG
MPDVHF15	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTT ACT CTR AAA GWG TST GGC C
MPDVHF16	C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAT GTG AAC TTG GAA GTG TCT GG
MPDVHB1	CTA GTG GTA CTC CAC GGC GCG CCT MRG AGA CDG TGA SMG TRG TC
MPDVHB2	CTA GTG GTA CTC CAC GGC GCG CCT MRG AGA CDG TGA SRG TRG TG
MPDVHB3	CTA GTG GTA CTC CAC GGC GCG CCT MRG AGA CDG TGA SCA GRG TC
MPDVHB4	CTA GTG GTA CTC CAC GGC GCG CCT MRG AGA CDG TGA STG AGG TT
MPDVHB5	CTA GTG GTA CTC CAC GGC GCG CCT MRG AGA CDG TGA STG ARA TT

Tabelle 36: Oligonukleotide zur Amplifizierung muriner V_L-Antikörperfragmente

K= G oder T; M = A oder C; S = C oder G; R = A oder G; W = A oder T

Name	Sequenz 5' → 3'
MPDVLF1	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT GAC ATT GTG MTG WCH CAG TCC CCA
MPDVLF2	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT GAC ATT CAG ATG ATT CAG TCT CC
MPDVLF3	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT GAC ATT GTT CTC WHC CAG TCT CC
MPDVLF4	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT GAC ATT GTG MTG WCH CAG TCT CAA
MPDVLF5	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT GAT RTT KTG ATG ACC CAR RCK GCA
MPDVLF6	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT GAT RTT KTG ATG ACC CAR RCK CCA
MPDVLF7	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT GAC ATT GTG ATG ACC CAR BHT G
MPDVLF8	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT GAT ATT KTG ATG ACC CAR AYT CC
MPDVLF9	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT RAM ATT GTG MTG ACC CAA TYT CCW
MPDVLF10	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT SAA AWT GTK CTS ACC CAG TCT CCA
MPDVLF11	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT GAY ATY CAG ATG ACM CAG WCT AC
MPDVLF12	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT GAY ATY CAG ATG ACH CAG WCT CC
MPDVLF13	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT GAC ATT GTG ATG ACT CAG GCT AC
MPDVLF14	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT CAR SYT GTK STS ACT CAG KAA T
MPDVLF15	CAT GCC ATG ACT CGC GGC GCG CCT CAR SYT GTK STS ACT CAG KCA T
MPDVLB1	CT AGT GGT ACT CCA CGC GGC CGC GTC GAC AGC MCG TTT CAG YTC CAR YTT
MPDVLB2	CT AGT GGT ACT CCA CGC GGC CGC GTC GAC AGC MCG TTT KAT YTC CAR YTT
MPDVLB3	CT AGT GGT ACT CCA CGC GGC CGC GTC GAC AGC MCG TTT BAK YTC TAT CTT TGT
MPDVLB4	CT AGT GGT ACT CCA CGC GGC CGC GTC GAC AGC MCG AGC MCG TTT TAT TTC CAA MKT
MPDVLB5 (λ)	CT AGT GGT ACT CCA CGC GGC CGC GTC GAC CTG RCC TAG GAC AGT SAS YTT GGT

Tabelle 37: Oligonukleotide zur Amplifizierung und Klonierung der antifungalen Peptide (AFP) und AFP-scFv Fusionen in pHENHi und pTRAc

Name	Sequenz 5' → 3'
Cec-For1	GTC CAT GGC TAA GTG GAA GTT GTT TAA GAA GAT T
Cec-For2	GTT GTT TAA GAA GAT TTT GAA GGT TTT GGT CGA CGG TGG AGG C
Cec-linker-backward	CAC CAG ATC CGC CTC CAC CGT CGA CCA AAA CCT TC
Cec-PCR-Forw	GTC CAT GGC TAA GTG GAA
D4E1-linker-backward	CAC CAG ATC CGC CTC CAC CGT CGA CCA ACT TAA TCT T
D4E1-PCR-Forw	GTC CAT GGG ATT TAA GTT
fdseq (backward)	GAA TTT TCT GTA TGA GG
GR7-linker-backward	CAC CAG ATC CGC CTC CAC CGT CGA CGA GCG CCC TGA G
GR7-PCR-Forw	GTC CAT GGG AAT GGC TTC
linker-forward	GGT GGA GGC GGA TCT GGT G
Mag-linker-backward	CAC CAG ATC CGC CTC CAC CGT CGA CAG ACT TCA TAA TTT C
Mag-PCR-Forw	GTC CAT GGG AGG TAT TGG
pJET forward	TAA CTT GGA GCA GGT TCC ATT C

7.3 Vektorkarten

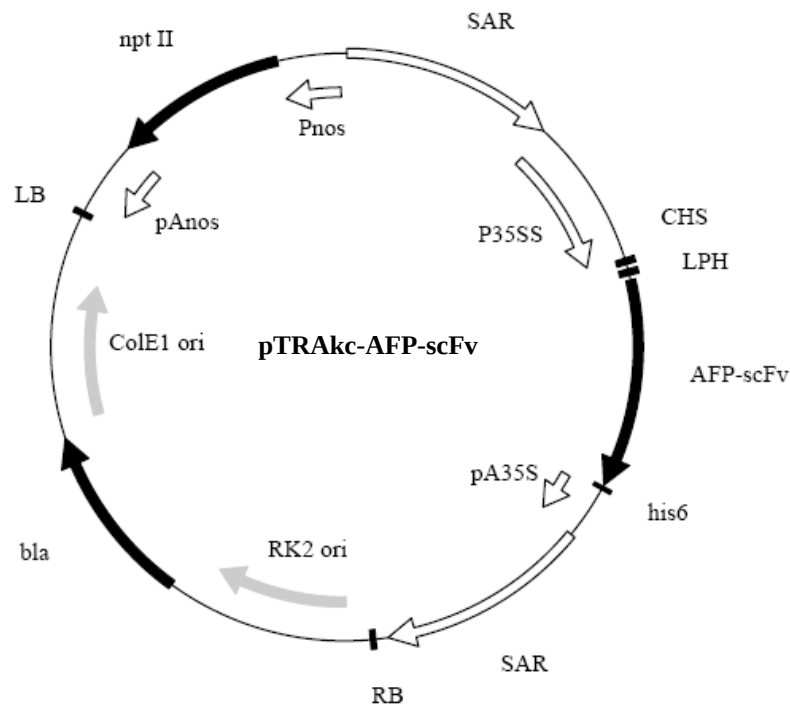


Abbildung 24: Schematische Abbildung des pTRAc-Vektors

RK2 ori: Replikationsursprung des Vektors in *A. tumefaciens*; **bla:** β-Lactamase (Ampicillin- bzw. Carbenicillin-Resistenz in *E. coli* bzw. *A. tumefaciens*); **ColE1 ori:** Replikationsursprung des Vektors in *E. coli*; **LB und RB:** „left border“, „right border“; linke und rechte Bordersequenzen des Nopal-Ti-Plasmids pTiT37; **pAnos:** Terminations- und Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthasegens (*nos*) aus *A. tumefaciens*; **nptII:** Neomycin-Phosphotransferase-Gen (Kanamycin-Resistenz in Pflanzen); **Pnos:** Promotor des Gens *nos* aus *A. tumefaciens*; **SAR:** „scaffold attachment region“; **P35SS:** 35S Promotor des CaMV mit duplizierter Enhancer-Region; **CHS:** 5'-UTR der Chalkonsynthase aus *Petroselinum*; **LPH:** kodonoptimierte Version des murinen Signalpeptids der schweren Kette des anti-TMV mAk24 (Vaquero *et al.* 1999); **AFP-scFv:** Sequenz bestehend aus antifungalem Peptid und scFv; **his6:** His₆-Tag zur Detektion und Reinigung des rekombinanten Proteins; **pA35S:** 3'-UTR des CaMV 35S Gens.

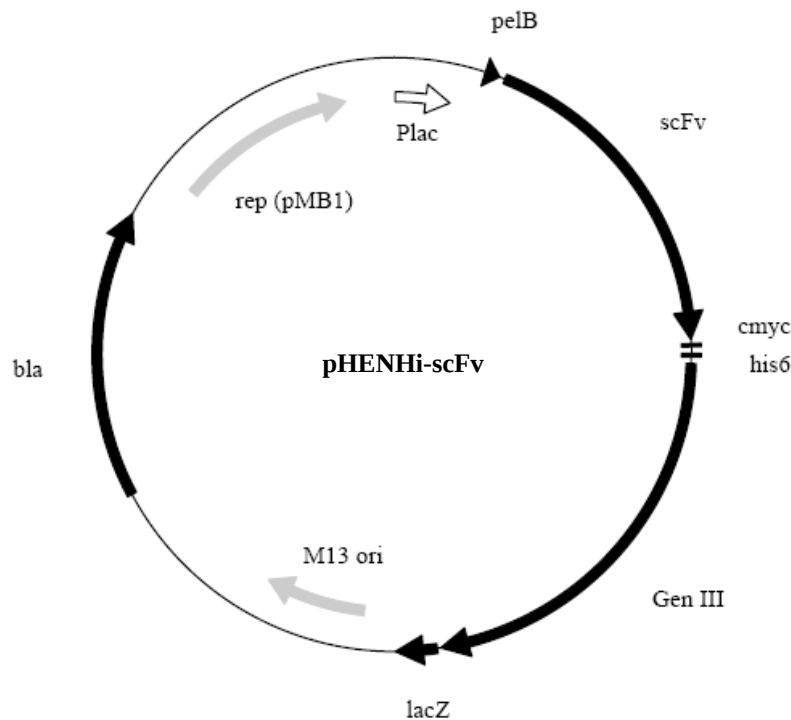


Abbildung 25: Schematische Abbildung des pHENHi-Vektors

rep (pMBP): Replikationsursprung des Vektors; **Plac**: *lacZ* Promotor; **cmv**: cmv-Tag zur Detektion des rekombinanten Proteins; **his6**: His₆-Tag zur Detektion und Reinigung des rekombinanten Proteins; **Gen III**: Gen III Hüllprotein des M13 Phagen; **lacZ**: 5' Sequenz des *lacZ* Gens, welches den N-Terminus von beta-Galaktosidase kodiert; **M13 ori**: Replikationsursprung des Vektors in M13 Phagen; **bla**: β-Lactamase (Ampicillin-Resistenz in *E. coli*).

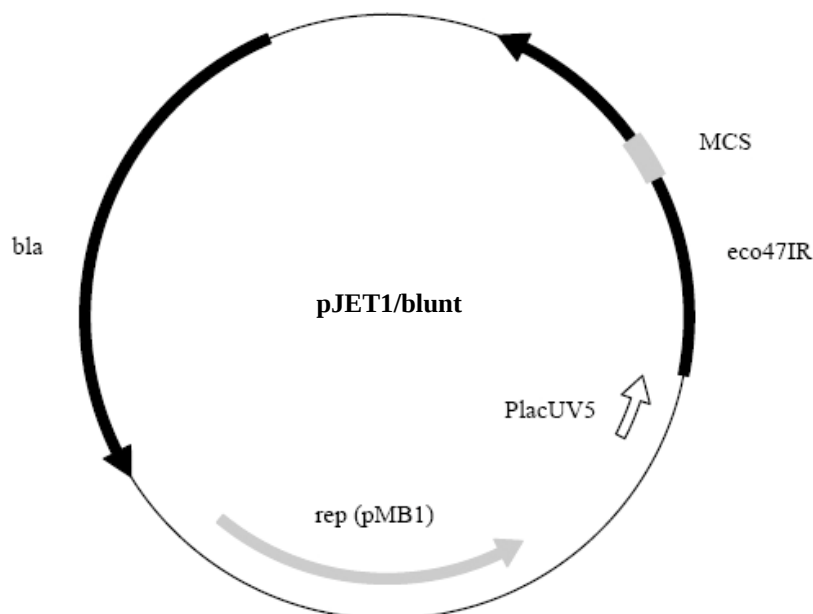


Abbildung 26: Schematische Abbildung des pJET1/blunt-Vektors

rep (pMBP): Replikationsursprung des Vektors; **PlacUV5**: modifizierter Plac Promotor zur Expression von *eco47IR* ohne IPTG; **eco47IR**: Letales Gen, welches die Selektion von Klonen mit Insert erlaubt; **MCS**: Multiple Klonierungsstelle; **bla**: β-Lactamase (Ampicillin-Resistenz in *E. coli*).

7.4 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Übersicht des Versuchsablaufes zur Herstellung <i>P. infestans</i> -resistenter Kartoffelpflanzen	11
Abb. 2: SDS-PAGE von <i>P. infestans</i> Zellwandfragmenten.....	48
Abb. 3: Lichtmikroskopische Aufnahmen verschiedener Entwicklungsstadien von <i>P. infestans</i> und Zellwandfragmentpräparationen.....	49
Abb. 4: SDS-PAGE von <i>P. infestans</i> Zellwandfragmenten (A) und Immunoblotanalyse <i>P. infestans</i> -spezifischer monoklonaler Antikörper (B).....	56
Abb. 5: Reaktivität monoklonaler Antikörper gegenüber Zellwandfragmenten und gekeimten Sporangien von <i>P. infestans</i> sowie V8-Medium und Kartoffelblattextrakt.....	57
Abb. 6: Immunoblotanalyse von mAkPi86 (A) und mAkPi102.2 (B) gegen Zellwandfragmente verschiedener Pathogene.....	59
Abb. 7: Immunofluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Bindung monoklonaler Antikörper an gekeimte Sporangien von <i>P. infestans</i>	60
Abb. 8: SDS-PAGE (A) und ELISA (B) mit gereinigtem mAkPi102.2.....	63
Abb. 9: Schematische Übersicht der Klonierungsstrategie der variablen Domänen monoklonaler Antikörper	65
Abb. 10: Analyse der aus immunisierten Tieren isolierten avianen (A) und murinen (B) Gesamt-RNS	67
Abb. 11: Produkte der Amplifizierung avianer V _H - (A) und V _L -Antikörperfragmente (B)	68
Abb. 12: Analyse der avianen scFv-Bibliothek auf Vollängeninserts und Diversität	70
Abb. 13: Reaktivität löslicher avianer scFv Fragmente gegenüber gekeimten Sporangien und Zoosporen von <i>P. infestans</i> Antigenen	74
Abb. 14: Reaktivität löslicher muriner scFv Fragmente gegenüber Zellwandfragmenten (A) bzw. gekeimten Sporangien und Zoosporen (B) von <i>P. infestans</i> Antigenen	75
Abb. 15: Reaktivität muriner scFv Fragmente gegenüber Zellwandfragmenten und gekeimten Sporangien von <i>P. infestans</i> sowie Zellwandfragmenten von <i>F. graminearum</i>	76
Abb. 16: SDS-PAGE einer <i>P. infestans</i> Myzelpräparation (A) und Immunoblotanalyse <i>P. infestans</i> -spezifischer scFv (B, C)	80
Abb. 17: Reaktivität <i>P. infestans</i> -spezifischer scFv gegenüber Zellwandfragmenten.....	82

Abb. 18: Immunofluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Bindung von scFv an gekeimte Sporangien und Zoosporen von <i>P. infestans</i>	85
Abb. 19: Schematische Übersicht der Klonierungsstrategie der AFP-scFv Fusionskonstrukte und der Expressionskassetten in pHENHi und pTRAcKc	88
Abb. 20: Reaktivität von AFP-scFv Fusionsproteinen gegenüber Zellwandfragmenten von <i>P. infestans</i>	91
Abb. 21: Reaktivität von AFP-scFv Fusionsproteinen gegenüber Zellwandfragmenten von <i>P. infestans</i>	93
Abb. 22: Inhibierung von <i>P. nicotianae</i> durch transiente Expression von AFP-scFv Fusionsproteinen in <i>N. tabacum</i>	96
Abb. 23: Resistenz transgener <i>S. tuberosum</i> L. cv. Pirol gegenüber <i>P. infestans</i>	99
Abb. 24: Schematische Abbildung des pTRAcKc-Vektors.....	142
Abb. 25: Schematische Abbildung des pHENHi-Vektors	143
Abb. 26: Schematische Abbildung des pJET1/blunt-Vektors.....	143
Tab. 1: Übersicht transgener Kartoffelpflanzen zur Inhibierung von <i>P. infestans</i>	9
Tab. 2: Übersicht der verwendeten Reaktionskits.....	12
Tab. 3: Übersicht verwendeter Enzyme	14
Tab. 4: Übersicht verwendeter Primär- und Sekundärantikörper	15
Tab. 5: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	17
Tab. 6: Übersicht zur Durchführung der PCR-Reaktionen zur Amplifizierung variabler Antikörperdomänen von cDNS und Plasmid-DNS (pJET1/blunt)	25
Tab. 7: Übersicht zur Durchführung einer PCR zur Amplifizierung avianer und muriner V _H - und V _L -Antikörperfragmente von cDNS	26
Tab. 8: Übersicht zur Durchführung einer Kolonie-PCR	27
Tab. 9: Übersicht zur Durchführung einer PCR zur Amplifizierung der AFP und des scFvCWPD2.....	27
Tab. 10: Übersicht zur Durchführung einer SOE-PCR zur Verknüpfung der AFP und des scFvCWPD2 sowie zur Amplifizierung der AFP-scFvCWPD2 Fragmente.....	28
Tab. 11: Übersicht zur Durchführung einer PCR zum Nachweis von Fremd-DNS in regenerierten Kartoffelpflanzen	28
Tab. 12: ELISA zur Detektion pilzlicher Antigene durch spezifische scFv Fragmente und AFP-scFv Fusionsproteine	36
Tab. 13: ELISA zur Bestimmung des Antikörpertiters immunisierter Tiere.....	36

Tab. 14: ELISA zur Detektion pathogenspezifischer poly- bzw. monoklonaler Antikörper im Hybridomenüberstand.....	37
Tab. 15: ELISA zur Konzentrationsbestimmung der monoklonalen Antikörper im Hybridomenüberstand	37
Tab. 16: ELISA zur Detektion von AFP-scFv Fusionsproteinen in Kartoffelblattextrakt.....	37
Tab. 17: Zur Immunisierung der Hühner und Mäuse eingesetzte Mengen der <i>P. infestans</i> Zellwandfragmente (ZWF) sowie Veränderung des polyklonalen Antikörpertiters	51
Tab. 18: Isotypisierung <i>P. infestans</i> -spezifischer monoklonaler Antikörper	54
Tab. 19: Kreuzreaktivität monoklonaler Antikörper gegenüber Pathogenen der Ascomyceten, Basidiomyceten und Oomyceten.....	58
Tab. 20: Stabilität des mAkPi102.2 in Kartoffelblattextrakt bei RT	62
Tab. 21: Ergebnis der Amplifizierung muriner V _H - und V _L -Antikörperfragmente	68
Tab. 22: Größe und Klonierungseffizienz der hergestellten scFv-Bibliotheken.....	69
Tab. 23: Phagenanreicherung und prozentualer Anteil an Vollängeninserts.....	71
Tab. 24: Aminosäuresequenzen der hypervariablen Regionen (CDR) der scFv	78
Tab. 25: Klassifizierung <i>P. infestans</i> -spezifischer muriner scFv	79
Tab. 26: Kreuzreaktivität der scFvPi5, 33, 46 und 68 gegenüber Pathogenen der Ascomyceten, Basidiomyceten und Oomyceten.....	83
Tab. 27: Übersicht verwendeter antimikrobieller und antifungaler Peptide (AFP)	87
Tab. 28: Übersicht der in die beiden Vektoren pHENHi und pTRAc klonierten scFv, AFP und AFP-scFv	89
Tab. 29: Übersicht der mittels Immunoblotanalyse im Pellet und Kulturüberstand einer bakteriellen Expression detektierten rekombinanten AFP-scFv Fusionsproteine und scFv	90
Tab. 30: Oligonukleotide zur Amplifizierung und Klonierung variabler Domänen muriner monoklonaler Antikörper	137
Tab. 31: Oligonukleotide zur Sequenzierung und Amplifizierung rekombinanter DNS.....	138
Tab. 32: Oligonukleotide zur cDNS-Synthese von RNS aus Hühnern.....	138
Tab. 33: Oligonukleotide zur cDNS-Synthese von RNS aus Mäusen	138
Tab. 34: Oligonukleotide zur Amplifizierung avianer variabler Antikörperdomänen.....	138
Tab. 35: Oligonukleotide zur Amplifizierung muriner V _H -Antikörperfragmente	139
Tab. 36: Oligonukleotide zur Amplifizierung muriner V _L -Antikörperfragmente.....	140
Tab. 37: Oligonukleotide zur Amplifizierung und Klonierung der antifungalen Peptide (AFP) und AFP-scFv Fusionen in pHENHi und pTRAc.....	141

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Fischer für die Möglichkeit, diese Dissertation am Fraunhofer Institut für Molekulare Biotechnologie und Angewandte Oekologie in Aachen anfertigen zu können.

Herrn PD Dr. Joachim Hamacher danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. Alan Slusarenko möchte ich mich für seine freundliche Bereitschaft, weiterer Prüfer bei der mündlichen Prüfung zu sein, bedanken.

Herrn Dr. Dieter Peschen danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Doktorarbeit.

Herrn Dr. Stefan Schillberg danke ich für die Durchsicht dieser Arbeit.

Bei derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft sowie die schönen Zeiten außerhalb der Arbeit bedanken. Herzlichen Dank denjenigen, die durch ihren Einsatz zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Freunden danke ich vielmals fürs Zuhören und auf andere Gedanken bringen. Euch allen viel Erfolg bei dem, was vor euch liegt!

Meinen Geschwistern Philipp, Susanne und Sabine danke ich für das gute, herzliche, sich gegenseitig unterstützende und verständnisvolle Miteinander. Schön, dass es euch gibt!

Meinen Eltern, die mir immer zur Seite standen und mich in dem, was ich gemacht habe, bestärkt und unterstützt haben, kann ich gar nicht genug danken. Aus ganzem Herzen vielen Dank für alles!

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315094 geförderten Projektes.

Teile dieser Arbeit wurden als internationale Patentanmeldung unter dem Aktenzeichen EP 09 168 541.4 beim Europäischen Patentamt angemeldet.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Sylvia Schleker

Geburtsdatum 27. November 1980

Geburtsort Düren - Birkesdorf

Staatsangehörigkeit deutsch

Ausbildung

1986 – 1990 Städtische katholische Grundschule St. Arnold
Düren – Arnoldsweiler

1990 – 1999 Städtisches Gymnasium am Wirteltor
Düren

1999 – 2004 Studium der Agrarwissenschaften
Rheinische Friedrich – Wilhelms – Universität, Bonn

2003 – 2004 Diplomarbeit
Institut für Pflanzenkrankheiten
Rheinische Friedrich – Wilhelms – Universität, Bonn
„Untersuchungen zur Wirkung von Prothioconazol und
Fluoxastrobin an Winterweizen gegen *Puccinia recondita* und
Septoria tritici“

2005 – 2008 Promotion
Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen
Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte
Ökologie, Aachen
„Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten Antikörpern
und scFv Fusionsproteinen zur Generierung *Phytophthora infestans*-
resistenter Kartoffelpflanzen“

22. Juni 2009 mündliche Promotionsprüfung

Berufstätigkeit

02/2005 – 12/2007 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Molekulare
Biotechnologie der RWTH Aachen

seit 01/2008 Wissenschaftliche Angestellte am Fraunhofer-Institut für
Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Aachen