

Antikörper vermittelte Fusarien- Resistenz in transgenen Pflanzen

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte
Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Dieter Peschen

aus
Geilenkirchen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. R. Fischer
Universitätsprofessor Dr. F. Kreuzaler

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juni 2002

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Fischer für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Institut für Biologie VII anfertigen zu können.

Für die Übernahme des Koreferats und die Bereitstellung der Arbeitsräume danke ich Herrn Prof. Dr. F. Kreuzaler.

Herrn Prof. Dr. R. Fischer und Herrn Dr. Yu-Cai Liao danke ich für die gute Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Doktorarbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biologie VII und dem Fraunhofer IME danke ich für die gute Zusammenarbeit und stete Diskussionsbereitschaft. Mein besonderer Dank gilt Yu-Cai, Simone Bernd, Stefan, Neil und Rainer, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für wertvolle Hilfen bei der Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit danke ich Rainer, Ingrid und Stefan.

Ohne die Unterstützung meiner Eltern und meiner Freundin Svenja wäre mir diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen, dafür danke ich Ihnen von ganzem Herzen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Resistenz von Pflanzen gegen Pathogene	1
1.2. Fusarien.....	2
1.2.1. <i>F. graminearum</i> als Pathogen.....	2
1.2.2. Entwicklungszyklus von <i>F. graminearum</i>	4
1.3. Antifungale Peptide und Proteine in Pflanzen	4
1.4. Antikörper und Antikörperfragmente	6
1.4.1. „Phage Display“.....	8
1.4.2. Antikörper, Antikörperfragmente und Fusionsproteine in Pflanzen	9
1.5. Problemstellung.....	11
2. Material und Methoden	14
2.1. Material.....	14
2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	14
2.1.2. Enzyme und Reaktionskits.....	14
2.1.3. Antikörper und enzymkonjugierte Nachweisantikörper	15
2.1.4. Synthetische Oligonukleotide.....	15
2.1.5. Plasmide und Phagemide	16
2.1.6. Bakterienstämme, Pflanzen, Phagen und Helferphagen.....	18
2.1.7. Medien, Puffer und Lösungen.....	19
2.1.8. Geräte, Apparaturen und sonstiges Zubehör.....	19
2.1.9. Genehmigung der durchgeführten Arbeiten.....	20
2.2. Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1. Anzucht und Transformation von <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium</i>	
<i>tumefaciens</i>	21
2.2.2. Isolierung von Plasmid DNS aus <i>Escherichia coli</i>	24
2.2.3. Agarosegelelektrophorese von DNS und RNS	24
2.2.4. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNS	24
2.2.5. Isolierung und Reinigung genomischer DNS aus <i>Arabidopsis.thaliana</i>	25
2.2.6. DNS-Präzipitation.....	25
2.2.7. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion	25

2.2.8. Reinigung von DNS.....	26
2.2.9. DNS-Klonierungstechniken.....	26
2.2.10. Isolierung von Gesamt-RNS.....	26
2.2.11. Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNS.....	27
2.2.12. cDNA-Synthese.....	27
2.2.13. Polymerase-Kettenverlängerungsreaktion.....	27
2.3. Proteinchemische Methoden.....	30
2.3.1. „Phage Display“.....	30
2.3.2. Expression von scFvs in <i>Escherichia coli</i>	33
2.3.3. SDS-PAA-Gelelektrophorese.....	35
2.3.4. Immunoblot.....	35
2.3.5. „Chemiluminescence-Imaging“.....	36
2.3.6. Dot-Blot.....	36
2.3.7. Isolierung von Pilz-Antigenen.....	37
2.4. Immunologische Methoden.....	39
2.4.1. „Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay“ (ELISA).....	39
2.5. Immunisierung und Isolierung polyklonaler Antikörper.....	40
2.5.1. Immunisierung von Mäusen.....	40
2.5.2. Immunisierung von Hühnern.....	40
2.5.3. Isolierung von polyklonalen Hühner Antikörpern.....	41
2.5.4. ELISA zur Bestimmung des Antikörper-Titers im Serum oder Eigelb.....	41
2.5.5. Milzpräparation.....	42
2.6. Inhibitionstests.....	42
2.7. Transformation und Analyse von Pflanzen.....	42
2.7.1. Anzucht der Pflanzen.....	43
2.7.2. Transiente Transformation von Tabakpflanzen durch Vakkuminfiltration..	43
2.7.3. Transformation von Arabidopsis-Pflanzen.....	44
2.7.4. Kanamycin Selektion der Arabidopsis-Samen.....	45
2.7.5. Isolierung Gesamt-löslicher Proteine aus Pflanzen.....	45
2.7.6. Isolierung genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
2.7.7. Transformation von Reis und Weizen durch „Particle Bombardment“.....	46
2.7.8. Arabidopsis Resistenztests.....	50

2.8. Mikroskopische Analysen	50
2.8.1. <i>Präparation der Deckgläser</i>	50
2.8.2. <i>Antigenpräparation zur Fluoreszenzmikroskopie</i>	51
2.8.3. <i>Beschichten von Deckgläsern mit Pilz-Antigenen</i>	51
2.8.4. <i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	51
2.8.5. <i>Konfokale Lasermikroskopie</i>	52
3. Ergebnisse.....	53
3.1. Überblick	53
3.2. Isolierung von <i>F. graminearum</i> Antigenen	54
3.3. Immunisierung und Titerbestimmung.....	56
3.4. Klonierung der variablen Domänen der Immunglobulingene in das Phagemid pHENHi.....	59
3.4.1. <i>Gesamt-RNS- und mRNS-Isolierung</i>	59
3.4.2. <i>cDNS-Synthese und Amplifikation von V_H- und V_L-Domänen</i>	61
3.4.3. <i>Klonierung und Assemblierung von V_H- und V_L-Domänen als scFv-</i> <i>Bibliotheken</i>	62
3.4.4. <i>Überprüfung der Komplexität der scFv-Bibliothek</i>	63
3.5. Konstruktion und Funktionalität des Vektors pHENHi	66
3.6. „Phage Display“	69
3.7. Charakterisierung der scFvs	70
3.7.1. <i>Sequenzierung der scFv</i>	71
3.7.2. <i>Expression und Reinigung der scFv-Fragmente</i>	78
3.7.3. <i>Funktionsanalyse der scFvs mittels ELISA</i>	79
3.7.4. <i>Antigen-Charakterisierung der scFvs</i>	84
3.7.5. <i>Immunofluoreszenzuntersuchungen der scFvs</i>	85
3.8. Herstellung und Charakterisierung von scFv-Fusionen mit antifungalen Peptiden und Proteinen	86
3.8.1. <i>Klonierung der AFP-scFv Konstrukte</i>	87
3.8.2. <i>Bakterielle Expression und Charakterisierung der AFP-scFv Fusionen</i>	90
3.8.3. <i>Immunofluoreszenz mit AFP-scFv-Fusionsproteinen</i>	93

3.8.4. <i>Transiente Expression in Tabak</i>	95
3.9. Inhibitionstests.....	96
3.10. Transformation und Charakterisierung stabil transformierter <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	98
3.10.1. <i>Transformation und Selektion von Arabidopsis</i>	98
3.10.2. <i>Transformation und Selektion von Reis und Weizen</i>	98
3.10.3. <i>Charakterisierung der transgenen Arabidopsis-Pflanzen</i>	98
4. Diskussion	106
4.1. Isolierung von Pilz-Antigenen	106
4.2. Immunisierung von Hühnern und Mäusen	107
4.3. Herstellung von scFv-Bibliotheken.....	109
4.4. „Phage Display“	110
4.5. Charakterisierung der Pilz-spezifischen scFv	111
4.6. Die Herstellung von AFP-scFv-Fusionen und deren..... Charakterisierung	114
4.7. <i>In vitro</i> Inhibitionstest.....	116
4.8. Transformation von Pflanzen.....	117
4.8.1. <i>Transiente Transformation</i>	118
4.8.2. <i>Stabile Transformation</i>	119
4.9. Resistenztests	121
4.10. Ausblick.....	122
5. Zusammenfassung	125
6. Literatur	127
7. Anhang	139
7.1. Verzeichnis der Abbildungen	139
7.2. Verzeichnis der Tabellen	141
7.3. Verzeichnis der Abkürzungen.....	142
7.3.1. <i>Buchstaben-Kode für variable Basenpaare in Primern:</i>	145

7.4. Verzeichnis verwendeter Computerprogramme	146
7.5. Primer-Sequenzen.....	147
7.6. Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen	151
7.6.1. Nukleotidsequenzen.....	151
7.6.2. Aminosäuresequenzen	154
7.7. 3D-Struktur eines <i>Fusarium graminearum</i> Keimschlauches	157
7.8. <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen drei Wochen nach Infektion mit <i>Fusarium</i>	
<i>oxysporum</i> f.sp. <i>matthiolae</i>	159

1. Einleitung

1.1. Resistenz von Pflanzen gegen Pathogene

Schaderreger verursachen jährlich immense Ertragsverluste bei Kulturpflanzen (OERKE *et al.*, 1994). Sie liegen trotz prophylaktischer und postinfektioneller Maßnahmen weltweit zwischen 10-15% (RANGASWAMI, 1983, MULLINS und KANG, 2001). Allein in Deutschland werden jährlich 10000 Tonnen Fungizide mit einem Wert von ca. 5 Milliarden Euro verwendet (UMWELTBUNDESAMT, 1994). Neben Nematoden und Insekten sind es vor allem Viren, Bakterien und Pilze, welche Ernteauffälle bei Nutzpflanzen bewirken. Besonders Pilzkrankheiten stellen ein Problem dar, das durch die klassische Züchtung nicht gelöst werden kann, da natürliche Resistenzen kaum oder nicht vorhanden sind (HIATT *et al.* 2001).

Pflanzen besitzen im Gegensatz zu höheren Tieren kein Immunsystem, das mittels spezifisch bindender Antikörper potentielle Schaderreger abwehren kann. Sie haben im Laufe der Evolution andere Abwehrmechanismen entwickelt, um sich gegen Pathogene zu schützen. Pathogene können sowohl passiv als auch aktiv in die Wirtspflanze eindringen. Viren und Bakterien gelangen in der Regel passiv durch Vektoren, z.B. stechende und saugende Insekten, in die Pflanze. Pilze hingegen sind in der Lage, aktiv durch die Ausbildung von Appressorien und/oder durch Ausschüttung von Enzymen präformierte Resistenzfaktoren wie Kutikula und Zellwände zu überwinden. Die Zellwandbestandteile Pektin, Hemizellulose, Zellulose und in die Zellwände eingelagertes Lignin können durch entsprechende Enzyme abgebaut werden (HEATH, 1980). Zum anderen sind Pflanzen in der Lage, eindringende Pathogene zu identifizieren und Resistenzfaktoren zu induzieren. Diese prae- und postinfektionellen Abwehrreaktionen, wie zum Beispiel die niedermolekularen, antimikrobiell wirkenden Phytoalexine (MÜLLER und BÖRGER, 1940; BENHAMOU, 1996), der programmierte Zelltod oder lytische Enzyme wie Glucanasen und Chitinasen, sind bei suszeptiblen Pflanzen gegen einen Schaderreger allerdings nicht ausreichend (HEATH, 1980). Um Ernteverluste, welche durch Mikroorganismen verursacht werden, in Grenzen zu halten, werden spezifisch wirkende Chemikalien, wie Bakterizide, Fungizide und Insektizide, zur Bekämpfung dieser Organismen verwendet. Allerdings können diese Pestizide negative Auswirkungen für Mensch und Umwelt nach sich ziehen. Die Gefahr der Resistenzausbildung der pathogenen Organismen gegen die angewendeten Chemikalien ist ebenfalls sehr hoch (WÖPPEL, 1995).

Obwohl Pflanzen über eine Vielzahl möglicher Resistenzmechanismen gegen verschiedene Schädlinge verfügen, besitzen bestimmte Pathogenrassen die Fähigkeit, die jeweiligen Resistenzstrategien ihrer Wirtspflanzen zu umgehen oder auszuschalten. Natürliche genetische Resistenzen, welche durch klassische Züchtung und Kreuzung in den Genpool eingebracht werden können, sind in der Regel im Feld immer nur zeitlich begrenzt einsetzbar, bevor sie von einer veränderten Population an Pathogenen gebrochen werden. Hieraus resultiert die Suche nach neuen, innovativen Wegen der Krankheitsbekämpfung, die wichtigen Kulturpflanzen auf gentechnischem Wege Schutz vor schädigenden Pathogenen gewähren können. Ein vielversprechender Ansatz zur Minimierung von Pathogenbefall bei Kultur- und Zierpflanzen bietet dabei die Molekularbiologie, mit deren Hilfe auch nicht pflanzliche oder aus anderen Arten stammende Resistenzfaktoren in die Zielpflanze eingebracht werden können. Um diese innovativen Methoden einsetzen zu können, muss der Infektionszyklus des Pilzes und nahe verwandter Pilze berücksichtigt werden, damit Schwachpunkte des Pilzes gezielt bei der Bekämpfung ausgenutzt werden können.

1.2. Fusarien

Fusarien gehören zu der Gruppe der Ascomyceten und verursachen vor allem bei Nutz- und Zierpflanzen Fäulnis, Auflauf- und Umfallkrankheiten. Dabei sind besonders folgende Fusarienarten bei Getreide und Reis von Bedeutung: *Fusarium nivale*, *F. moniliforme*, *F. roseum*, *F. graminearum*, *F. culmorum* und *F. avenaceum* und deren Varianten. Zahlreiche Dikotyledonen werden ebenfalls von Fusarien befallen, z.B. Spargel, Cyclamen und Nelken von *F. oxysporum* und *Cucurbitaceae* von *F. solani*.

Ihre Morphologie verändert sich durch den Einfluss des Nährsubstrates bei der Kultivierung. Bis zu 88 Fusarien-Arten wurden bereits auf verschiedenen Pflanzen und Pflanzensamen nachgewiesen, deren Pathogenität im Keimlingsstadium äußerst variabel ist (CHAMPION, 1997).

1.2.1. *F. graminearum* als Pathogen

F. graminearum befällt eine Reihe von monokotylen Nutzpflanzen, wie Weizen, Gerste Hafer, Mais und Reis. Bei Getreide wird beim Auflaufen des Keimlings eine Fäulnis durch den Pilz verursacht. Bei einer späteren Infektion der Pflanze fault die Halmbasis weg und die oberen Regionen der Pflanze werden nicht mehr mit Nährsalzen und Wasser versorgt, dadurch kommt es zu der sogenannten „Umfallkrankheit“. Auch die Blattscheiden junger Pflanzen und der Halm können befallen werden. Es entstehen strichförmige Verbräunungen, die zu einem späteren Zeitpunkt in ein lockeres, weißliches Myzel an der Halminnenseite

übergehen können. Bei einer Infektion während der Getreideblüte kommt es häufig zum Absterben der Kornanlagen und in Folge dessen zur Taubährigkeit. Der Pilz bildet auch Mykotoxine (SHERWOOD und PEBERY, 1974; KALLELA und SAASTAMOINEN, 1981; MEGALLA *et al.*, 1986; DALCERO *et al.*, 1997), welche schon früh im Entwicklungsstadium auftreten können (HUNTER, 1990; DESJARDIS und HOHN, 1997). Diese Toxine spielen vermutlich eine nicht unbedeutende Rolle bei der Virulenz des Pilzes (DESJARDIS *et al.*, 1996; KANG und BUCHENAUER, 1999). Bei einer Infektion der Fruchtkörper können diese durch die Toxinproduktion so stark kontaminiert werden, dass das Korn von Menschen und Tieren nicht mehr verzehrt werden kann. Die Fusarium-Mykotoxine Trichothezene, Zearalenone und T2-Toxine binden an die 60S-Untereinheit der eukaryotischen Ribosomen und blockieren dadurch die Translation (SYDENHAM *et al.*, 1991; YUAN *et al.*, 1997). Nach Angaben der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) überschritten 1998 ca. 70% der untersuchten Proben die Deoxynivalenolkonzentration (gehört der Gruppe der Trichothezene an) von 500 µg Deoxynivalenol pro kg Weizen, welche die für die Bundesregierung angestrebte Höchstmengenkonzentration darstellt.

Weizen- und Reiskrankheiten, welche durch Fusarien verursacht werden, sind nur schwer zu bekämpfen und folglich treten in regelmäßigen Abständen hohe Ernteverluste auf (CONN, 1990). Natürliche Resistenzen sind nicht vorhanden und eine nachträgliche Behandlung mit Fungiziden ist nur unzureichend. Deswegen sind prophylaktische Maßnahmen, wie z.B. das Beizen der Samenkörner oder das Spritzen der Blüten bei günstigen Witterungsverhältnissen für Fusarien unausweichlich. Dies ist mit enormen Kosten verbunden (SCHLÖSSER, 1983). Die BBA hat Erhebungen angestellt, dass im Jahr 1999 ca. 37% und im Jahr 2000 ca. 46% der untersuchten Proben mit *F. graminearum* infiziert waren, was die enorme Bedeutung des Pilzes für die Landwirtschaft verdeutlicht.

Erst durch die genaue Kenntnis des Infektionsweges ist es möglich, nachfolgend Strategien zu entwickeln, bei denen gezielt Infektionen von Pilzen bei Pflanzen vermieden werden können. KANG und BUCHENAUER (2000a) konnten an *F. culmorum* einem mit *F. graminearum* sehr nah verwandten Pilz, der die gleichen Symptome, wie Fäulnis beim Auflaufen des Keimlings, strickförmige Verbräunungen des Halmes und der Blätter, lockeres, weißliches Myzel an der Halminnenseite und Taubährigkeit bei der Infektion während der Blüte, bei Weizen verursacht so wie die gleichen Mykotoxine bildet, nachweisen, dass ein bis zwei Tage nach der Inokulation der Spelzeninnenseite oder der Pollen ein dichtes Pilzmyzel entsteht. Der Pilz konnte durch die Kutikula in die oberen Zellschichten penetrieren und wuchs

apoplasmatisch parallel an den Zellwänden entlang. In seltenen Fällen konnte er auch in die sich an der Blattunterseite befindlichen Stomata eindringen. Nachfolgend verbreitete sich *F. culmorum* inter- und intrazellulär und besiedelte das Xylemgewebe. Haustorien und andere Infektionsstrukturen konnten nicht nachgewiesen werden. Drei Tage nach der Inokulation wurden lytische Enzyme festgestellt und am vierten Tag waren erste makroskopisch zu beobachtende Symptome sichtbar. Am fünften Tag begann die erste Ausbildung der Konidien, welche am sechsten abgeschlossen war und sich damit der Infektionszyklus schloss (KANG und BUCHENAUER 2000b).

1.2.2. Entwicklungszyklus von *F. graminearum*

F. graminearum stellt einen Vertreter der Ascomyceten dar, bei denen der Fruchtkörper, der Ascus, als Namesgeber diente. In den Ascis befinden sich die Ascosporen (Makrosporen), welche flugtüchtig sind, somit größere Strecken zurücklegen können und folglich hauptsächlich für den primären Befall verantwortlich sind. Zur Keimung der Makrosporen muss tropfbarflüssiges Wasser vorhanden sein. Selbst nach der Keimung können die Ascosporen Trockenperioden überstehen.

Der Ascus mit den Sexualorganen Ascogon und Antheridium stellt die Hauptfruchtform, welche zusammen mit dem Myzel in haploider Form vorliegen, dar. Die asexuelle Nebenfruchtform bildet sich in Sporenlagen, welche mit Konidiosporen (Mikrokonidien) bestückt sind. Die Konidiosporen sind gering flugtüchtig und verbreiten den Pilz im Bestand. Epidemien werden durch Konidiosporen verursacht, weil die Inkubationszeit sehr gering ist. *F. graminearum* ist endophytisch und gut auf Nährmedien kultivierbar.

Selbst Getreidesorten, welche bei Sporeninokulum Resistenz gegen *F. graminearum* aufweisen, geben bei zunehmendem Sporendruck nach. Die Bekämpfung mit Fungiziden ist kostspielig und nur prophylaktisch möglich. Dadurch entstehen Kosten, welche bei den heutigen Verkaufserlösen von Weizen kaum noch wirtschaftlich sind.

1.3. Antifungale Peptide und Proteine in Pflanzen

Antifungale Peptide und Proteine (AFPs) werden von Mikroorganismen, Pilzen, Pflanzen oder Tieren synthetisiert, um das Wachstum von Pilzen zu inhibieren. Dies dient dazu, sich gegen Pilze zu verteidigen oder einen Wachstumsvorteil zu erlangen. In der Regel stellt die Oberfläche des Pilzes den Angriffspunkt für AFP dar.

So sekretiert *Drosophila* sowohl als Larve als auch als adultes Tier Drosomyzin als AFP in ihre Hämolymphe, um dadurch das Wachstum von Pilzen zu vermeiden (FEHHLBAUM *et al.* 1994).

Chitinasen (LEGRAND *et al.*, 1987; NISHIZAWA und HIBI, 1991) und Glucanasen (KOMBRINK *et al.*, 1988) sind in die Abwehrmechanismen von Pflanzen involviert. Dabei katalysieren sie die Hydrolyse der β -1,4-Verbindungen von N-acetyl-D-Glucoseaminpolymeren und zerstören dadurch die Chitin- bzw. Chitosanstruktur.

Viele Arbeiten sind bereits veröffentlicht worden in denen transgen exprimierte Chitinasen in Pflanzen partielle Resistenz gegen Pilzkrankheiten induzieren (BROGLIE *et al.*, 1991; LIN *et al.*, 1995; NISHIZAWA *et al.*, 1993; AKUTSU *et al.*, 1997, TABELI *et al.*, 1998, BRIFFELD *et al.*, 1999).

Die in dieser Arbeit verwendete Chitinase wurde von LIAO *et al.* (1994) aus Weizen (*Triticum aestivum*) isoliert. Die Klasse Ib Chitinase wurde aus einer genomischen Weizen-Bibliothek durch PCR amplifiziert. Das Weizenchitinasegen beinhaltet einen 960 Bp großen „loop“, keine Introns, eine Cystein-reiche Domäne und eine katalytische Domäne am Carboxy-terminalen Ende.

Antifungale Peptide induzieren die Ausbildung von Löcher oder Poren in die Pilzmembranen, so dass der Ionengradient zwischen den Zellen und dem umgebenen Medium aufgehoben wird und der Mikroorganismus abstirbt (LIZHEN und ADAMS, 1998). In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene durch PCR amplifizierte AFPs AG, RS, MBP, ACE und Lactoferricin (Lacto) verwendet, welche aus verschiedenen Spezies isoliert wurden.

AG wurde aus *Aspergillus giganteus* isoliert. Es ist ein 5,8 kDa großes Peptid, welches das Wachstum einer Reihe von Pilzen inhibiert (WNENDT, 1990).

Aus Radieschen-Samen (*Raphanus sativus*) wurde das APF RS gewonnen, ein 5 kDa großes cysteinreiches, hitzesensitives Peptid, welches *in vitro* eine antifungale Aktivität zeigt (TERRAS *et al.*, 1995).

Das antimikrobielle Peptid MBP wurde aus Mais (*Zea mays*) isoliert, hat ein Molekulargewicht von 4,1 kDa, besitzt keine freien Cysteine und zeigt Homologien zu Thioninen einer Gruppe von Cystein-reichen Peptiden, welche in Weizen, Gerste, Hirse und vielen Dicotyledonen vorkommen. MBP besitzt *in vitro* sowohl antifungale Aktivität gegen *F. graminearum* als auch gegen einige bakterielle Pathogene (DUVICK *et al.*, 1992).

ACE ein fungitoxisches, nicht glykosiliertes, monomeres, protease- und hitzestabiles, 10 kDa großes Protein, welches in Zwiebelsamen (*Allium cepa*) zu finden ist und ein ungewöhnlich Argenin-reiches Protein ist, besitzt Homologien zu dem nichtspezifischen Lipidtransferprotein nsLTPs aus Pflanzen (Cammue *et al.*, 1995).

Lacto ist ein Peptid aus der N-terminalen Region des humanen Lactoferrins (hLF). Lactoferrin ist ein Eisen-bindendes Glycoprotein der Transferrinfamilie und kommt in biologischen

Flüssigkeiten wie z.B. Säugermilch bzw. Kolostrum vor. Dabei zeigt Lactoferricin eine höhere antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien und Pilze als Lactoferrin. Lactoferricin besitzt die Fähigkeit, an bakterielle und Pilz-spezifische Lipopolysaccharide zu binden und beeinflusst die Permeabilität der Membranen (CHAPPLE *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 1999; AGUILERA *et al.*, 1999 und HAUKLAND und VORLAND, 2001).

Tab. 1.1.: Übersicht über die Molekularen Massen und die *in vitro* inhibitorischen Eigenschaften einiger antifungaler Peptide und Proteine (AFPs) gegen Pilze und Bakterien. Erklärungen zu der Symbolik: + = inhibitorischer Effekt, - = kein inhibitorischer Effekt, n.d. = nicht durchgeführt.

AFP	Molekulare Masse in kDa	<i>In vitro</i> Inhibition von Pilzen	<i>In vitro</i> Inhibition von Bakterien
AG	5,8	+	-
ACE	10	+	+
MBP	4,1	+	+
RS	5	+	-
Lacto	5	+	+
Chi	30	n.d.	n.d.
Glu	30	n.d.	n.d.

1.4. Antikörper und Antikörperfragmente

Im Laufe der Evolution haben sowohl Pflanzen als auch Tiere spezifische und unspezifische Abwehrmechanismen entwickelt, um sich gegen Fremdstoffe und Pathogene zu verteidigen. Jedoch nur Wirbeltiere besitzen ein Immunsystem. Dieses Abwehrsystem ist in der Lage, körpereigene und körperfremde Stoffe von einander zu unterscheiden und dementsprechend Fremdstoffe und Pathogene zu neutralisieren und/oder zu eliminieren. Dabei stellt das Immunsystem der Säugetiere das komplexeste und anpassungsfähigste Abwehrsystem dar, welches als zentralen Bestandteil Antikörper (Ak) bzw. Immunglobuline (Ig) besitzt. Ak werden von Säugern in Plasmazellen, welche aus differenzierten B-Zellen (B-Lymphozyten) entstehen, synthetisiert. Die B-Lymphozyten, welche durch die Blutgefäße und lymphatischen Organe zirkulieren, werden durch T-Helferzellen oder ein bindendes Antigen zur Proliferation und zur Differenzierung in Plasmazellen angeregt. Die Ak werden in verschiedene Isotypen eingeteilt, IgA, IgD, IgG, IgM und IgE. Dabei spielen die Klassen IgA und IgG und ihre Subklassen IgA1, IgA2, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 bei Säugetieren die wichtigste Rolle im humoralen Immunsystem. Die IgG Antikörper bestehen aus vier Polypeptidketten, zwei identischen Schweren (H-Ketten) und Leichten Ketten (L-Kette), welche durch inter- und intramolekulare Disulfidbrückenbindungen miteinander kovalent verknüpft sind (BURTON,

1987). Die H-Kette besitzt wenigstens drei konstante C-Domänen (C_{H1} - C_{H3}) und eine variable V-Domäne (V_H). Die L-Kette hingegen besteht aus einer konstanten und einer variablen Domäne (V_L). Die V-Domänen setzen sich aus drei hypervariablen Bereichen (CDRs = „complementarity determining regions“) und den vier konservierten Regionen (FR = „frameworks“) mit ausgeprägter β -Faltblatt-Struktur (KABAT *et al.*, 1991) zusammen.

Um Ak modifizieren zu können, wurden diese in den Anfängen mit Protease behandelt, wobei monovalente Fab`s (Fragment der Antigenbindungsstelle) (PORTER, 1959), monovalente Fv`s (Fragment der variablen Region) (INBAR *et al.*, 1972) und bivalente $F(ab')_2$ s (PARHAM, 1986) hergestellt wurden (Abb. 1.1.).

Für die eigentliche Antikörper-Antigen-Bindung sind nur die V_H - und V_L -Domänen zuständig. Diese Domänen des Fv sind instabil und dissoziieren leicht, da sie nicht über Disulfidbrückenbindungen miteinander kovalent verbunden sind (SKERRA, 1993). Um Dissoziation der V_H - und der V_L -Domäne zu vermeiden, wurden die Domänen kovalent durch ein „Linker“-Peptid [10 bis 30 Aminosäuren (AS)] miteinander (WHITLOW *et al.*, 1993) zu einem stabilen Einzelketten-Antikörper verknüpft („single chain“-Ak oder scFv) (HUSTON *et al.*, 1988, BIRD *et al.*, 1988, TANG *et al.*, 1996, TURNER *et al.*, 1997, BEREGERE, 1997). Durch die geringe Größe des scFvs (1/5 eines Vollängenantikörpers) kann dieser leichter in Gewebe eindringen und damit leichter seinen Zielort erreichen (BEGENT *et al.*, 1996, WHITTINGTON *et al.*, 1998, WANG-JOHANNING *et al.*, 1998). Die scFvs sind einfach genetisch zu manipulieren, so kann z.B. die Linker Region der scFvs verkürzt werden, so dass sich die V_H - und V_L - Domänen eines scFvs nicht mehr zusammenlagern können. Es entstehen bivalente Diabodies, welche in der Lage sind, analog zu Ak zwei Epitope zu binden (Abb. 1.1.). Ein weiterer Vorteil ist die erleichterte Expression in heterologen Systemen wie Bakterien (PATOLIANO *et al.*, 1991), Hefen und Pflanzen. Außerdem ist die Konstruktion von scFv-Fusionsproteinen (LORIMER *et al.*, 1996; COLOMA und MORRISON, 1997), wie z.B. mit Peptiden oder Enzymen, die eine antifungale Wirkung zeigen, relativ einfach durchzuführen.

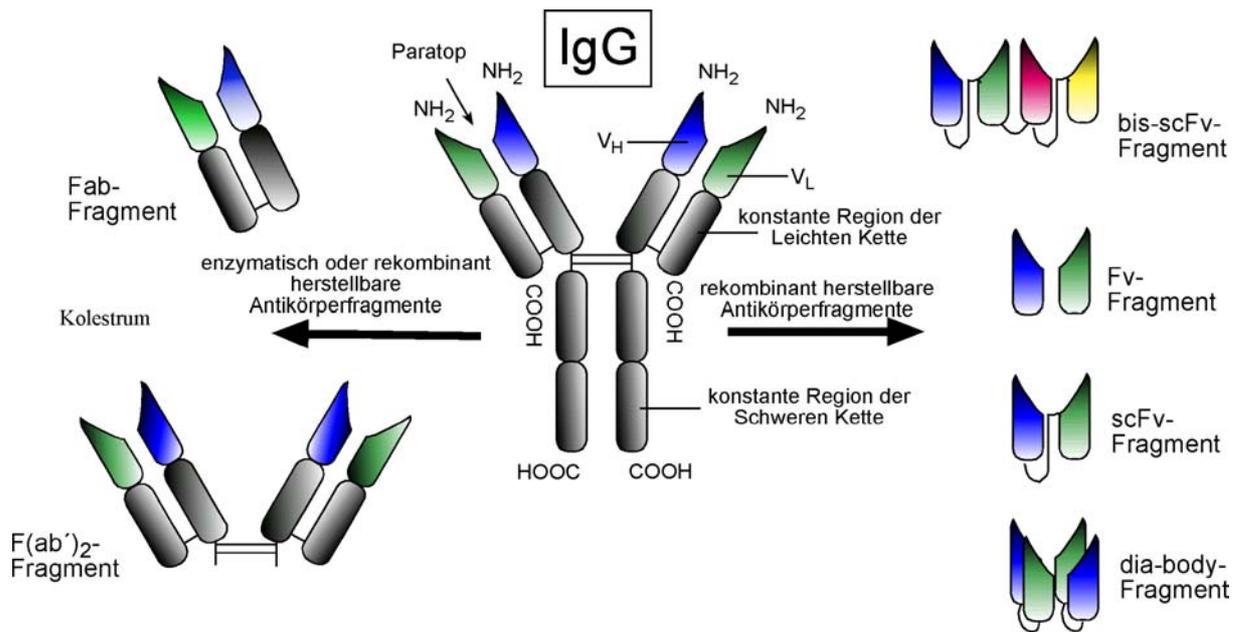


Abb. 1.1.: IgG-Ak und Ak-Fragmente. IgG = Immunglobuline G; Fab = Fragment der Antigen-Bindungsstelle; F(ab')₂ = Fab-Dimer; Fv = Fragment der variablen Region; scFv = „single chain Fragment der variablen Regionen“ = Einzelketten-Antikörper; bis-scFv-Fragment = zwei scFv mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten (bispesifisch), die über einen dritten Linker verknüpft sind (modifiziert nach PLÜCKTHUN und PACK, 1997).

1.4.1. „Phage Display“

Die „Phage Display“-Methode hat seit ihrer Einführung durch SMITH (1985) die Isolierung hochspezifischer Antigen-bindender Proteine stark vereinfacht und dient der Herstellung antigenbindender scFvs. Mit Hilfe von Bakteriophagen ist es möglich, das Immunsystem von Tieren in Bakterien *in vitro* nachzuahmen. Die variablen V_H- und V_L-Domänen der schweren und leichten Immunglobulinketten werden mit Hilfe Familien-spezifischer Primer in multiplen PCR-Reaktionen amplifiziert, in ein Phagemid *via* Restriktionsschnittstellen hineinkloniert, wobei die V_H mit der V_L durch einen flexiblen Linker zu einem scFv miteinander verbunden werden. Als Template hierzu dient die poly(A)⁺-mRNA aus Milzzellen immunisierter Tiere.

Als Trägersystem der zu präsentierenden scFvs wird der Phage M13 verwendet. Die zirkuläre DNS des filamentösen Bakteriophagen M13 besitzt eine Länge von 900 nm. Diese ist von ca. 2800 Kopien des Hüllproteins pVIII und drei bis fünf Kopien des Proteins pIII umgeben. Der Bakteriophage verwendet das pIII Protein, um an den F-Pilus von *Escherichia coli* zu binden, und injiziert nachfolgend seine DNS in das Bakterium. Die Vermehrung des M13 in *E. coli* erfolgt nach dem „rolling-circle“-Modell. Pro Bakterium können ca. 200 Phagen synthetisiert

werden (OPELLA *et al.*, 1987; HUNTER *et al.*, 1987; GLUCKSMAN *et al.*, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1995).

Beim „Phage Display“ wird das Genom des M13 Phagen so modifiziert, dass N-terminal an das pIII Protein scFvs (McCAFFERTY *et al.* 1990), Fabs (HOOGENBOOM *et al.* 1991) oder andere Antigen-bindende Peptide oder Proteine fusioniert werden. Dies geschieht mit Hilfe eines Phagemids, das gezielt in *E. coli* angebracht werden kann. Durch die Infektion des Bakteriums mit einem Helferphagen wird die Vermehrung und das „Assembling“ in der Zelle eingeleitet. Diese Phagen tragen dann die rekombinanten Antikörperfragment-Bibliotheken auf ihrer Oberfläche und können durch Bindung an ihr Antigen, das hierzu an eine Trägermatrix immobilisiert wurde, angereichert und unspezifische Phagenantikörper durch extensives Waschen entfernt werden. Die im „Panning“ spezifisch gebundenen Phagenantikörper werden dann vom Antigen gelöst und die Selektion mehrmals wiederholt, um spezifische Phagen weiter anzureichern. Die bei jeder Selektionsrunde eluierten Phagen werden zur Infektion von *E. coli*-Bakterien eingesetzt und das "Panning" wiederholt.

1.4.2. Antikörper, Antikörperfragmente und Fusionsproteine in Pflanzen

Die erste erfolgreiche Expression von rekombinanten Antikörpern (rAk) in Pflanzen erfolgte 1989 durch HIATT *et al.* und eröffnete ein völlig neues Forschungsgebiet. Seitdem konnten weitere volllängen rAk (DÜRING *et al.*, 1990; VOSS *et al.*, 1995; BAUM *et al.*, 1996), Fab-Fragmente (DE NEVE *et al.*, 1993; DE WILDE *et al.*, 1996), scFv-Fragmente (FIREK *et al.*, 1993; TAVLADORAKI *et al.*, 1993; FIEDLER *et al.*, 1995; ARTSAENKO *et al.*, 1995, FECKER *et al.*, 1996; SCHOUTEN *et al.*, 1996; ZIMMERMANN *et al.*, 1998), bispezifische scFv (FISCHER *et al.*, 1999a) und scFv-Fusionsproteine (Spiegel *et al.*, 1999) in Blättern, Samen und Speicherorganen von Tabak, Arabidopsis, Kartoffeln, Reis, Weizen und Erbsen akkumuliert werden (STÖGER *et al.*, 2000; TORRES *et al.*, 2000).

Durch heterologe Synthese von rAk und deren Derivaten wurde es möglich, eine Art „Immunsystem“ in Pflanzen aufzubauen und damit bei der Abwehr von pflanzlichen Pathogenen ganz neue Wege zu gehen (SCHOTS *et al.*, 1992). Die Expression von rAk und rAk-Fragmenten in der Pflanze stellt ein geringes Risiko dar, da in der Pflanze keine den Immunglobulinen analogen Gene vorkommen und damit die Erzeugung neuer Pathogene durch Rekombination extrem gering ist. Die Expression der rAk und deren Derivaten kann analog zum tierischen vaskulären und zirkulären System in allen Geweben und Kompartimenten der Pflanze durch den Einsatz spezifischer Promotoren sowie durch die Verwendung entsprechender „Targeting“-Signale verwirklicht werden (TAVLADORAKI *et*

al.; 1993; VOSS *et al.* 1995; FECKER *et al.*, 1996; ROSSO *et al.*, 1996; ZIMMERMANN *et al.*, 1998; SCHILLBERG *et al.*, 1999; FISCHER *et al.*, 1999a; SCHILLBERG *et al.*, 2000). Pflanzen mit rekombinant exprimierten rAk und scFv können Resistenz gegen Viren vermitteln (TAVLADORAKI *et al.*, 1993, FECKER *et al.*, 1996 und ZIMMERMANN *et al.*, 1998). Transgene Tabakpflanzen, bei denen Virus-spezifische rAk nach der Expression in den Apoplasten sekretiert wurden, wiesen bis zu 70% Reduktion der TMV-Infektiosität auf (NIERSBACH, 1994; VOSS *et al.* 1995; SCHILLBERG *et al.*, 2000). Ein scFv, welcher spezifisch gegen Phytoplasmenproteine reagierte, wurde von LE GALL *et al.* (1998) in Tabak exprimiert. Die Wurzeln der transgenen Tabakpflanzen zeigten im Gegensatz zum Wildtyp (wt) selbst nach 2 Monaten keine für Phytoplasmen typischen Symptome. Transgene Pflanzen, welche eine Resistenz gegen phytopathogene Bakterien, Pilze oder Insekten aufweisen, wurden bis heute nicht in der Literatur beschrieben. Die Expression von Nematodensekret-spezifischen rAk in Pflanzen wurden durch ROSSO *et al.* (1996) und BAUM *et al.* (1996) bereits erfolgreich demonstriert. HIATT *et al.* (2001) beschreibt aus Hybridomaüberstand isolierte mAk, welche in der Lage sind, das Pilzwachstum *in vitro* von *Neotyphodium coenophialum* zu inhibieren. Die mAk binden an eine Zellwandkomponente des Myzels, die vielleicht in der Assimilation des Pilzes involviert ist (HIATT *et al.*, 1997).

Einige *Fusarium spp.* produzieren, Mykotoxine, welche die Pflanze schwächen oder den Verzehr von Mensch und Tier der Nutzpflanzen unmöglich machen (RODEMANN, 1999; DÄNICKE und VALENTA, 1999). So produziert *F. graminearum* verschiedene Toxine z.B. Zearaleone [6-(10-Hydroxy-6-oxo-*trans*-1-Undecenyl)- β -Resorcylsäurelactone] (MEGALLA *et al.*, 1986). Das Mykotoxin wird nach der Infektion von Getreidekörnern produziert und verursacht bei Tieren Hyperestrogenismus mit Symptomen, wie Vergrößerung des Uterus und der Brustwarzen, vaginale Prolapsie und Unfruchtbarkeit (HIDY *et al.*, 1977). Anti-Zearaleone bindende und das Toxin inhibierende scFv wurden isoliert und in *E. coli* (YUAN *et al.*, 1997) und *Arabidopsis thaliana* (YUAN *et al.*, 2000) exprimiert. Ein inhibitorischer Effekt auf das Wachstum von Mykotoxin-produzierenden Pilzen oder auf die verminderte Aggressivität der Pilz-Pathogene gegenüber antitoxinbindenden scFv exprimierenden Pflanzen wurde bislang nicht nachgewiesen.

Die Expression von rAk und scFv in Pflanzen, welche spezifisch an pilzliche Oberflächen binden, sind bisher nicht beschrieben. Auch die Fusion von scFv mit AFP und deren Expression in *E. coli* und in Pflanzen wurden bisher nicht in der Literatur erwähnt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten daher die experimentellen Grundlagen geschaffen

werden, um Pilzkrankungen bei Kultur- und Zierpflanzen durch rAk und rAk-Fusionen gezielt zu bekämpfen.

1.5. Problemstellung

Ein großes Problem in der Landwirtschaft und im Zierpflanzenbau stellen Pilzkrankheiten dar. Besonders in Monokulturen besteht die Notwendigkeit, neue Resistenzen zu entwickeln, da sonst der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln unausweichlich ist. In Folge des Fungizid Einsatzes sind bereits heute Umweltschäden, wie z.B. Kontaminationen von Grundwasser und Belastung des geernteten Getreides durch Fungizidrückstände, zu beobachten. Die klassische Züchtung versucht dieses Problem zu lösen, indem sie Wildstämme in die Kulturpflanzen einkreuzt, welche Resistenzen gegen Pilzkrankheiten besitzt. Unglücklicherweise stehen diese kreuzbaren krankheitsresistenten Wildformen oftmals nicht zur Verfügung. Aus diesem Grunde sind neue innovative Strategien zur Erzeugung von Pilzresistenzen in Kulturpflanzen essentiell, und gentechnologische Methoden stellen eine vielversprechende Alternative dar.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten deswegen *F. graminearum* spezifische scFv isoliert werden. Dazu sollten *F. graminearum* spezifische, innovative Oberflächenantigene gewonnen werden, da Oberflächenantigene gegen Fusarien bisher nicht beschrieben worden sind und zur Immunisierung von Versuchstieren verwendet werden. Anschließend sollten immunkompetente scFv Bibliotheken generiert werden. Dazu sollte aus den Milzen der Versuchstiere mRNA isoliert und in Immunglobulinen kodierende cDNA umgeschrieben werden. Aus der cDNA sollten die V_H- und V_L-Fragmente mittels PCR amplifiziert und über Primer integrierte flankierende Restriktionsschnittstellen in einem Phagemid zu scFv-Bibliotheken vereinigt werden. Aus diesen scFv-Bibliotheken sollten mit Hilfe des „Phage Displays“ die besten Binder mit Spezifität für *F. graminearum* Oberflächenantigene selektioniert werden. Die *F. graminearum* spezifischen scFvs sollten in *E. coli* exprimiert, gereinigt und im ELISA, Immunoblot und durch Immunofluoreszenzmikroskopie genauer charakterisiert werden. Die besten scFvs sollten mit antifungalen Peptiden und Proteinen (AFP) fusioniert werden. Die AFP-scFv-Fusionsproteine sollten dann ebenfalls in *E. coli* exprimiert, im ELISA, im Immunoblot und in der Immunofluoreszenzmikroskopie charakterisiert und deren wachstumsinhibierende Funktion zusammen mit den scFvs durch *in vitro* Inhibitionstests untersucht werden. Zur transienten Expression in Tabak und der stabilen Transformation von *Arabidopsis thaliana* als Modellpflanze und Reis und Weizen als Zielpflanze, sollten diejenigen scFv, scFv-AFP-Fusionen und entsprechende Kontrollen ausgewählt werden, die als besonders vielversprechend einzustufen sind. Mit transgenen *A.*

thaliana Pflanzen sollten Resistenztests durchgeführt werden. Dazu musste eine *Fusarium* *ssp.* gewählt werden (*F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*), welche *Arabidopsis* befällt, um die Bindung und die biologischen Effekte der *F. graminearum* spezifischen scFvs und der AFP-scFv-Fusionsproteine *in planta* zu evaluieren. Mit diesem Ansatz sollte gezeigt werden, ob die scFvs und AFP-scFv-Fusionsproteine eine Resistenz in *Arabidopsis* bewirken, bevor zeit- und kostenintensive Resistenzversuche mit transgenen Reis- und Weizenpflanzen initiiert wurden.

Um *F. graminearum* spezifische scFv zu generieren, diese mit AFPs zu fusionieren, in den verschiedenen Expressionssystemen zu exprimieren und Resistenztests durchzuführen, wurden folgende Versuchsabläufe umgesetzt (Abb. 1.2.):

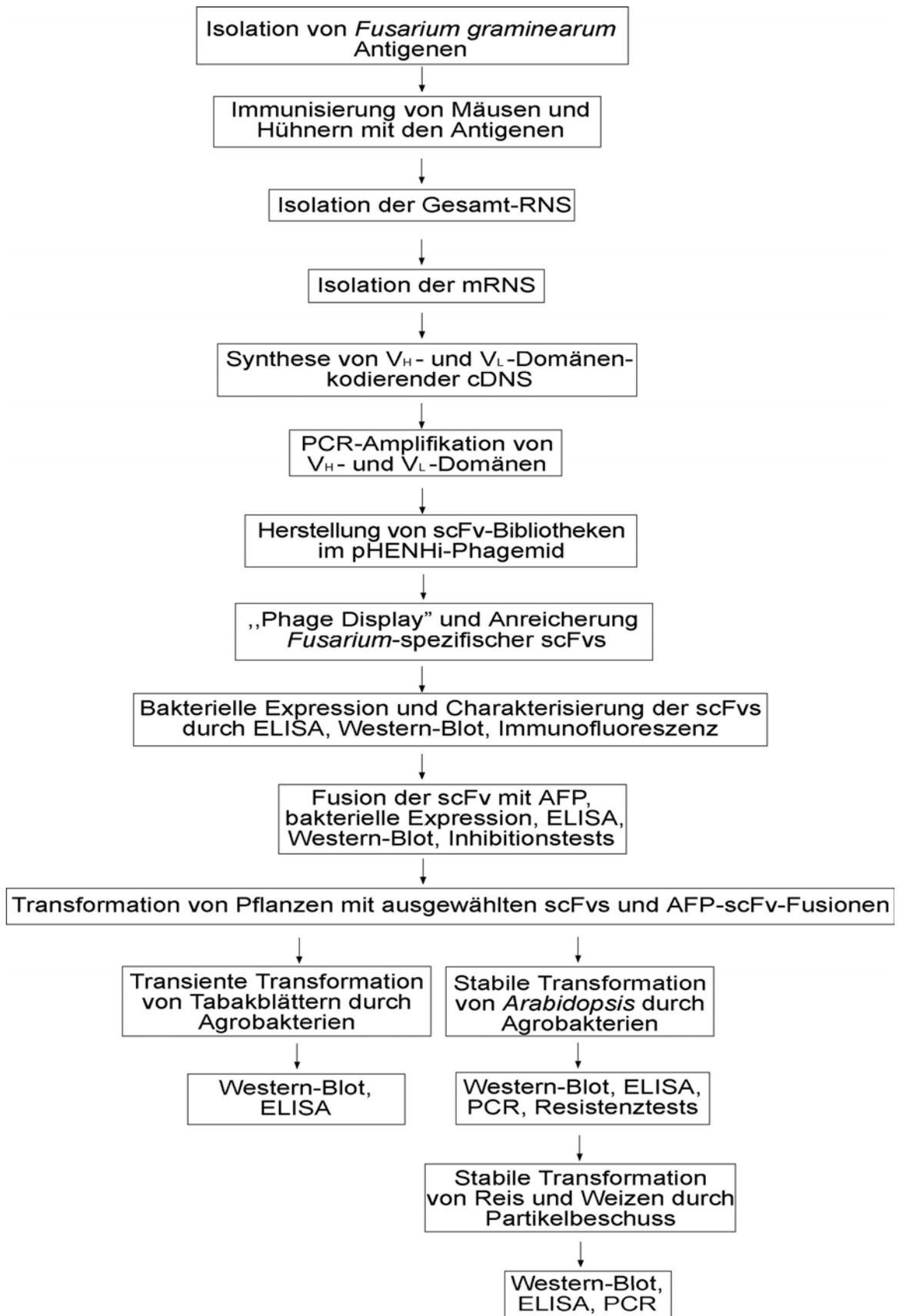


Abb. 1.2.: Übersicht zum Versuchsablauf der vorliegenden Doktorarbeit.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Fertiglösungen und Chemikalien wurden von folgenden Firmen mit mindestens einem Reinheitsgrad von *p.a.* bezogen: BASF (Ludwigshafen), BIACORE (Uppsala, Schweden), BioRad (München), Boehringer (Mannheim), Duchefa (Haarlem, Niederlande), GibcoBRL (Eggenstein), Gerbu (Gaiberg), ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt), Lehle Seeds (Texas, USA), Net Fluid Contents (Lehle, USA), Pharmacia (Uppsala, Schweden), Pierce (Illonois, USA), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Amersham (Braunschweig), Becton Dickenson (Fraga, Spanien), BioSeptra (München), Biozym (Hessisch Oldendorf), Dianova (Hamburg), DIFCO (Detroit, USA), Eppendorf (Hamburg), Fisher Scientific GmbH (Nidderau), Greiner (Solingen), Hewlett Packard (München), Kodak (Stuttgart), Millipore (Eschborn), MoBiTec (Göttingen), Novagen (Darmstadt), Nunc (Bieberich), Pharmacia (New Jersey, USA), Premier Brands (Moreton, UK), Schott (Mainz), Stratagene (Amsterdam, Niederlande), Whatman (Maidstone, England) und Zeiss (Oberkochen) bezogen.

2.1.2. Enzyme und Reaktionskits

Die verwendeten Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) und der Firma Boehringer (Mannheim) geliefert. Die *Taq*-DNS-Polymerase wurde von MWG-Biotech (Ebersberg) und GibcoBRL bezogen. Die Enzyme wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Herstellerangaben verwendet. Die folgenden Kits kamen zum Einsatz:

- „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden)
- „QIAquick Plasmid Midi Kit“ (Qiagen)
- „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen)
- „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen)
- „RNeasy Midi-Isolation Kit“ (Qiagen)
- „Oligotex mRNS-Mini-Isolation Kit“ (Qiagen)
- „NucleoSpin[®] Plus Kit“ (Macherey-Nagel, Düren)
- „NucleoSpin[®] Extract Kit“ (Macherey-Nagel)
- „Nucleobound[®] AX100 Kit“ (Macherey-Nagel)

- „SUPERSCRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Gibco BRL)
- „Thermostable fluorescence labeled cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (USB über Amersham, Braunschweig)

2.1.3. Antikörper und enzymkonjugierte Nachweisantikörper

Zum Nachweis bestimmter Proteine wurden folgende zum Teil enzymkonjugierte Antikörper (Ak) verwendet:

Im ELISA (2.4.1.), Western Blot (2.3.4.) und in Immunofluoreszenzmikroskopie (2.8.) kamen die monoklonalen Maus (mAk) anti c-myc Ak 9E10 (EVAN *et al.*, 1995, MUNRO und PELHAM, 1986) und Maus-anti-penta-His-mAk (Qiagen) zum Einsatz, welche zum Nachweis des c-myc-„tags“ bzw. den His6-„tags“ am C-terminalen des nachzuweisenden Proteins dienten. Die Detektion der gebundenen anti-c-myc mAk und anti-penta-His mAk erfolgte mit Hilfe von alkalischer Phosphatase (AP) konjugierten polyklonalen Ziege-anti-Maus-Ak (ZAM), die spezifisch gegen die konstante Region (Fc) der IgG reagieren [ZAM^{AP} (α -IgG Fc)] und von Dianova (Hamburg) bezogen wurden. Die Chemilumineszenzdetektion am Phosphorimager wurde sowohl mit Hilfe des bereits erwähnten ZAM^{AP} (α -IgG Fc) nach Zugabe des CDR-Star Substrates (Roche, Mannheim) als auch mit einem ZAM^{HRP} (α -IgG Fc)] durchgeführt. Letzterer war mit dem Enzym HRP („horseradish peroxidase“) markiert und dessen Bindung konnte nach Zugabe des Supersignal[®] West Pico (Pierce) Substrates nachgewiesen werden. Zum Nachweis der Hühner-Ak wurden IgY-Fc-spezifische und mit AP konjugierte Kaninchen-anti-Huhn Ak [KAH^{AP} (Fc)] verwendet. In der Immunofluoreszenzmikroskopie kam der Alexa Fluor™ 568 (578/603) markierte ZAM H+L-spezifisch der Firma MoBiTec zum Einsatz.

2.1.4. Synthetische Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden HPSF gereinigt von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Die zur Sequenzierung mit dem LiCor IR₂ 4000 (LiCor, USA) verwendeten Oligonukleotide wurden am 5'-Ende mit den Farbstoffen IRD-700 oder IRD-800 markiert. Alle eingesetzten Primer-Sequenzen zur cDNS-Synthese, zur Amplifikation der V_H- und V_L-Domänen und zur Sequenzierung mit dem LiCor IR₂ 4000 sind im Anhang 7.5. aufgeführt.

2.1.5. Plasmide und Phagemide

Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet:

pHENHi:

Das Phagemid pHENHi [4,6 kBp, Amp^R, ori [M13], *lacI*, *lacZ*, *pelB*, *c-myc*, His-6, Gen III, pMB1 ori (rop⁻)], welches auf dem pHENI-Phagemid (HOOGENBOOM *et al.*, 1991) basiert, wurde im Rahmen dieser Dissertation hergestellt. Durch Einführung des zusätzlichen His6-„tags“ war es möglich, die Methode des „Phage Displays“ (2.3.1.) von der Klonierung der scFv-Bibliothek bis zur Expression und Aufreinigung der Antigen-spezifisch bindenden scFvs *via* Ni-NTA (2.3.1.) ohne weitere Subklonierungen durchzuführen.

pET-22b:

Als bakterieller Expressionsvektor wurde neben pHENHi der pET-22b Vektor der Fima Novagen (Darmstadt) verwendet. Das Plasmid pET-22b besitzt eine N-terminale *pelB*-Signalsequenz, welche die Lokalisation des zu exprimierenden Proteins in das Periplasma bewirkt. Die Expression erfolgt mit Hilfe des T7 Promotors und der entsprechenden T7 Terminatorsequenz, die durch eine „multiple cloning site“ (MCS) voneinander separiert vorliegen.

pGEM:

Als Standard-Klonierungsvektor wurde das 3,2 kB große pGEM-3ZF+ Plasmid (Promega, Mannheim) eingesetzt. Das verwendete Plasmid besitzt eine MCS in der über *EcoRI* und *HindIII* die Expressionskassette inkloniert wurde. N-terminal wurde die 5' untranslatierte Region (UT) der Chalconsynthase (ZIMMERMANN *et al.*, 1998), das ursprüngliche Maus „leader“-Peptid (LP) der leichten Kette des rAb24 zur Proteinlokalisierung in den Apoplasten (VOSS *et al.*, 1995) eingefügt. C-terminal wurde ein *c-myc*- und His6-„tag“ integriert.

pTRAKc:

Zur Transformation von *A. tumefaciens* und der darauffolgenden transienten und stabilen Transformation der Pflanzen wurde der Pflanzenexpressionsvektor pTRAKc verwendet. Mit diesem Vektor konnte sowohl die transiente Transformation von Tabakblättern als auch die stabile Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen durchgeführt werden. Der Vektor pTRAKc [8,4 kBp, Amp^R, Cb^R, Km^R], ein Derivat des Vektors pPAM (GenBank: AY027531), ist ein binärer Pflanzenexpressionsvektor und wurde freundlicherweise von Thomas Rademacher (RWTH Aachen, Institut für Biologie VII) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pTRAKc enthält den *ColE1*- als auch den *RK2*-Replikationsursprung und kann dadurch in *E. coli* als auch in *A. tumefaciens* repliziert werden. Der Promotor stammt aus dem Vektor pRT101 (TÖPFER *et al.*, 1988) und besteht aus der *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV)-35S-Promotorkassette und der duplizierten 35S-Enhancer-Region (KAY *et al.*, 1987). Die Terminations- und Polyadenylierungssequenzen wurden ebenfalls vom CaMV verwendet. N-terminal wurde das LPH Signalpeptid (VAQUERO *et al.*, 1999) und C-terminal ein His6-„tag“ integriert.

pSS^{H1}:

Bevor der Vektor pTRAKc zur Verfügung stand, wurde auf den binären Pflanzenexpressionsvektor pSS^{H1} [9530 Bp Amp^R, Cb^R, Km^R] (VOSS *et al.* 1995) zurückgegriffen, bei dem es sich um ein Derivat des Vektors pPCV002 (KONCZ und SCHELL, 1986) handelt. pSS^{H1} enthält die CaMV-35S-Expressionskassette von pRT101 (TÖPFER *et al.*, 1988) mit der duplizierten 35S-Enhancer-Region (KAY *et al.*, 1987; BECKER, 1990) sowie der Terminations- und Polyadenylierungssequenz des CaMV.

pAHC25:

Als Pflanzenexpressionsvektor für Monokotyledonae wurde der Vektor pAHC25 (Krysiak *et al.*, 1999) verwendet. Das GUS-Reportergen über die *SmaI* und *SacI* Schnittstelle durch die Expressionskassette ersetzt und das Plasmid zum „Particle Bombardment“ von Reis- und Weizenembryonen verwendet.

2.1.6. Bakterienstämme, Pflanzen, Phagen und Helferphagen

Folgende Bakterienstämme wurden zur *in vivo* Amplifikation von Plasmid DNS (A), Transformation mit rekombinanter DNS (T), zur Plasmidisolierung (PI), zum „Phage Display“ (PD) und zur Proteinexpression (PE) verwendet:

Tab. 2.1.: Verwendete *E. coli*-Stämme: Folgende nicht allgemein verständliche Abkürzungen wurden verwendet: A = Amplifikation von Plasmid DNS; T = Transformation mit rekombinanter DNS; PI = Plasmidisolierung; PD = „Phage Display“; PE = Proteinexpression.

Bakterienstamm:	Beschreibung:
BL21 (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) (T, PE) (Novagen)
DH5α	supE44 lacU169 (Φ80dlacZ ΔM15) hsdR17 recA endA1 gyrA96 thi-1 relA1 (HANAHAN, 1983) (A,T, PI) (HANAHAN, 1983)
ER2566	F ⁻ λ ⁻ fhuA2[lon] ompT lacZ::T7geneI gal SulA11Δ(mcrC-mrr)114: IS10R (mcr-73::minTn10)2 R(zgb-210::Tn10)1 (TetS) end A1 [dcm] (T, PE) (NEB)
HB2151	K12 ara Δ(lac-pro) thi/F ⁺ pro A ⁺ B ⁺ lacI ^q ZΔM15 (T,PE) (Pharmacia)
XL1-Blue MRF ⁺	F ⁺ :Tn10 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(NaI ^r)thi hsdR17 (r _K ⁻ m _K ⁺) supE44 rel A1 lac (A,T, PI, PD, PE) (Stratagene)

Der Bakterienstamm *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 [pMP90RK, Gm^R, Km^R, Rif^R (KONCZ und SCHELL, 1986)] wurde für die Transformation von *Nicotiana tabacum* L. cv. Petite Havana SR1 und *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia mit rekombinanter DNA verwendet.

2.1.7. Medien, Puffer und Lösungen

Medien, Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders in der jeweiligen Methode vermerkt, nach AUSUBEL *et al.* (1995), COLIGAN *et al.* (1995) oder SAMBROOK *et al.* (1996) hergestellt. Der pH-Wert wurde, wenn nicht anders vermerkt, mit 1 M NaOH- bzw. 1 M HCl-Lösung eingestellt. Die jeweiligen Standard-Lösungen, -Medien und -Puffer wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert (25min/121°C/1bar). Thermoinstabile Komponenten wurden sterilfiltriert (0,2 µm) zugegeben.

2.1.8. Geräte, Apparaturen und sonstiges Zubehör

- BioRad PDS-1000/He Biolistic[®] Particle Delivery System (BioRad)
- Elektrobloiting-Kammer und Zubehör (BioRad)
- Elektrottransformation: „Gene Pulser“ und „Pulse Controller Unit“ (BioRad)
- Dot-Blot-Apparatur (BioRad)
- Fotodokumentationssystem 299 und UV-Transilluminator (Herolab, Wiesloch)
- Gelelektrophoresekammern, Gelträger, Käme und Stromversorgung (BioRad)
- Image Reader LAS-1000 (Raytest, Straubenhardt)
- LiCor IR₂ 4000 DNS-Sequenzierer (LiCor, USA)
- Mikroskope:

- Leica DM R Fluoreszenz Mikroskop und Zubehör (Leica, Heidelberg)
- Leica DM RE + TCS SP konfokales Laser Mikroskop und Zubehör (Leica)
- Multi-Kanal-Photometer, Spectramax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
- PCR-Termocycler, Primus 25/Primus 96 (MWG Biotech)
- Rührer RCT-Basic (IKA Labortechnik, Staufen)
- Schüttler:
 - Gerhardt Schüttelmaschine R020 (Krefeld)
 - GFC 3017 (Burgwedel)
- Sterilbänke:
 - Babcock-BSH Typ THL 1.33.1 (Bad Hersfeld)
 - Hera Safe HS12 (Kendro, Hanau)
- Trans Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad)
- UV-Licht-Pumpe (BioRad)
- UV-Licht-Transilluminator, Wellenlänge 302 nm (Bachhofer, Reutlingen)
- Vakuumexsikator (Glaswerk Wertheim)
- Vortex K-550-GE (Bender und Hobein AG, Zürich)
- Wasserbad, Thermostatischer Zirkulator LKB 2219 Multitemp II (Bromma, Schweden)
- Zentrifugen:
 - Beckman Avanti30 und AvantiJ25 (Beckman, Fullerton, USA)
 - Biofuge Pico (Heraeus, Hanau)
 - Eppendorffzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)
 - Rotina 35 (Hettich, Tuttlingen)
 - Sigma 3-10, 4-10, 11140 und 11222 (Sigma, Steinheim)
 - Sorval RC-5B/RC-5C (Sorval, Bad Homburg)

2.1.9. Genehmigung der durchgeführten Arbeiten

Sämtliche gentechnologischen und zellbiologischen Arbeiten wurden unter S1-Richtlinien durchgeführt und sind durch Bescheide des Regierungspräsidenten in Köln sowie vom BGA genehmigt worden [Aktenzeichen 521-K-1-8/98: Nr. AI3-04/1/0866/88 (S1), AI3-03/2/0867/88-2 (S2) und 55.8867/-4/93 (Gewächshäuser)]. Somit wurden alle nach dem GenTG und GenTSV erforderlichen Auflagen für die Durchführung der geplanten gentechnologischen und zellbiologischen Arbeiten erfüllt. Eine Tierversuchsgenehmigung lag vor (Aktenzeichen RP.NR.: 23.203.2 AC 12, 1/97 sowie RP.NR.: 23.203.2 AC 12, 10/98), und die für die Immunisierungen notwendigen Tiere wurden im Klinikum der RWTH Aachen gehalten. Dort wurde auch die Immunisierungen aller Tiere durchgeführt werden.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Anzucht und Transformation von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.1.1. Anzucht von *Escherichia coli* und Herstellung von Stammkulturen

Die Anzucht von *E. coli* zur Herstellung von Kulturen und Stammkulturen erfolgte in 2YT-Flüssigmedium bei 37°C auf dem Schüttler (225UpM) über Nacht (üN). Bei Ampizillin-vermittelter Resistenz der Bakterien wurde dem 2YT-Flüssigmedium 100 µg/ml Ampizillin zugefügt. Besaßen die rekombinanten Bakterienstämme einen Lac-Promotor, wurde dieser durch Zugabe von 1% (w/v) Glucose unterdrückt.

2YT-Medium:

Hefe-Extrakt	1,0 % (w/v)
Trypton	1,6 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

Zur Herstellung von 2TY-Platten wurden 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

2.2.1.2. Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* und Herstellung von Stammkulturen

Die durch PCR (2.2.11.2) identifizierten positiven Kolonien wurden in YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika [Rif, Km, Cb] bei 28°C und 250 ÜpM für 2-3 Tage ($E_{600nm} \sim 2,0$) herangezogen, 0,5 ml der Kulturen mit 50% (v/v) Glycerol versetzt und bei -80°C gelagert.

YEB-Medium:

„Nutrient Broth“	0,5% (w/v)
Hefe-Extrakt	0,1% (w/v)
Trypton	0,1% (w/v)
Sucrose	0,1% (w/v)

Es wurde auf 1 Liter mit *aqua dest.* aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung auf 50°C wurden MgSO₄ mit einer Endkonzentration von 2 mM sowie die entsprechenden Antibiotika zugesetzt:

Rifampizin (Rif) 50µg/ml
 Kanamycin (Km) 25µg/ml [nicht beim rekombinanten Wildstamm]
 Carbenizillin (Cb) 50µg/ml

Zur Herstellung von YEB-Platten wurden 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

2.2.1.3. Herstellung Hitzeschock-kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Ein ml einer 5 ml üN Bakterienkultur diente zur Inokulation einer 100 ml LB-Flüssigmediumkultur, die bis zu einer E_{600nm} von 0,6 auf einem Schüttler (225UpM/37°C) herangezogen wurde. Bevor die Zellen sedimentiert wurden, wurde die *E. coli* Kultur für 10 min auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation (5min/2000xg/4°C) wurden die Bakterienzellen in 20 ml TFB-1-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5min/2000xg/4°C). Das Bakterienpellet wurde anschließend in 2 ml eiskaltem TFB-2-Puffer resuspendiert, à 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Ein Aliquot wurde, wie unter 2.2.1.4. beschrieben, mit einer bekannten Menge Plasmid DNS transformiert, um die Transformationseffizienz der kompetenten *E. coli* Zellen zu bestimmen.

TFB-1-Puffer pH 5,8:

RbCl	100 mM
MnCl	745 mM
LiCl	0,5 mM
Kalziumacetat	35 mM
Glycerol	15% (v/v)

TFB-2-Puffer pH 6,8:

RbCl	10 mM
CaCl	75 mM
MOPS	10 mM
Glycerol	15% (v/v)

Die Puffer wurden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

2.2.1.4. Herstellung elektrokompeter *Escherichia coli* Zellen

Fünf ml einer üN Kultur des gewünschten *E. coli*-Stammes wurden in 500 ml LB-Flüssigmedium inokuliert und bis zu einer E_{600nm} von 0,6 auf einem Schüttler (225UpM) bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen für 30 min auf Eis gestellt und bei 4000xg für 15 min bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde 3x mit 250 ml eiskaltem Milli-Q H₂O und einmal mit 10%igen (v/v) Glycerol gewaschen (10min/4000xg/4°C) und schließlich in 2 ml eiskaltem 10%igen (v/v) Glycerol resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden zu 100 µl aliquotiert und bei -80°C weggefroren.

2.2.1.5. Hitzeschock-Transformation von *Escherichia coli* Zellen

Zur Hitzeschock-Transformation wurden die aliquotierten, kompetenten Zellen (2.2.1.3.) auf Eis aufgetaut und 20 min mit ca. 10 ng Plasmid-DNS gut gemischt auf Eis gelagert. Daraufhin wurden die Zellen mit Plasmid-DNS für 2 min in ein mit 42°C temperiertes Wasserbad gegeben (Hitzeschock) und dann 2 min auf Eis gehalten. Es wurden 500 µl LB-Flüssigmedium zum Transformationsansatz pipettiert und der Ansatz bei 37°C unter Schütteln (225 UpM) bei 37°C inkubiert. Ein angemessenes Volumen der *E. coli*-Zellen wurde auf LB-AMP₁₀₀-Platten mit gegebenenfalls 1% (w/v) Glucose plattiert und üN bei 37°C inkubiert.

2.2.1.6. Elektrotransformation von *Escherichia coli* Zellen

Zur Elektrotransformation wurde der durch Ethanol-fällung entsalzte (2.2.5.4.), Ligationsansatz (2.2.6.3.) oder ca. 1-10ng Plasmid-DNS zu einem auf Eis aufgetauten Aliquot elektrokompenter Zellen (2.2.1.4.) gegeben und vorsichtig gemischt. Die Elektrotransformation erfolgte mit der „Gene Pulser“-Apparatur von BioRad und einer Küvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω. Die transformierten Zellen wurden mit 500 µl SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C regeneriert. Ein Aliquot der *E. coli* Zellen wurde auf LB-AMP₁₀₀-Platten mit 1% (w/v) Glucose plattiert und üN bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium:

Baktotrypton	1%, (w/v)
Hefe-Extrakt	0,5% (w/v)
NaCl	0,5% (w/v)
MgCl ₂	10 mM*
MgSO ₂	10 mM*
Glucose	20% (w/v)

* = nach dem Autoklavieren und Abkühlen sterilfiltriert den anderen Komponenten hinzugegeben.

2.2.1.7. Herstellung elektrokompenter Agrobakterien

Nach der Anzucht von *A. tumefaciens* GV3101 in 10 ml YEB (Rif, Cb) üN mit 250 ÜpM bei 28°C (2.2.1.2.) wurden 5 ml in 100 ml YEB (Rif, Cb) überführt und 36-48h mit 250 ÜpM bei 28°C geschüttelt bis die E_{600nm} 1,5 bis 2,0 erreicht hatte. Daraufhin wurden die Zellen für 30 min auf Eis gestellt und bei 4000xg für 15 min bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde 3x mit 100 ml eiskaltem Milli-Q H₂O und einmal mit 100 ml 10%igen (v/v) Glycerol gewaschen (10min/4000xg/4°C) und schließlich in 2 ml eiskaltem 10%igen (v/v) Glycerol resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden zu 100 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.1.8. Elektrotransformation von Agrobakterien

Zur Elektrotransformation von *A. tumefaciens* GV3101 wurden 400 ng Plasmid-DNS zu einem auf Eis aufgetauten Aliquot elektrokompeter Zellen (2.2.1.7.) gegeben und vorsichtig gemischt. Die Elektrotransformation erfolgte mit der „Gene Pulser“-Apparatur von BioRad und einer Küvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand bei 2,5 kV, 25 μ F und 200 Ω . Die Zellen wurden in 500 μ l SOC-Medium resuspendiert und für 1 h bei 28°C regeneriert. Ein Aliquot (meist 1 bzw. 10 μ l) der *A. tumefaciens*-Zellen wurde auf YEB-Platten (Rif, Km, Cb) plattiert und 2-3 Tage bei 28°C inkubiert.

2.2.2. Isolierung von Plasmid DNS aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung von kleineren Mengen an Plasmid DNS aus *E. coli* wurden die Kits QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), NucleoSpin[®] Plus Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Für größere Mengen wurden die Kits QIAquick Plasmid Midi Kit (Qiagen) und Nucleobond[®] AX100 Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.3. Agarosegelelektrophorese von DNS und RNS

Die Auftrennung von DNS und RNS erfolgte in 0,8 bis 1,5%igen (w/v) Agarosegelen. Sowohl die Versuchsdurchführung als auch der Versuchsaufbau erfolgte nach SAMBROOK *et al.* (1996), in 1xTBE-Puffer unter Einsatz von BioRad-Elektrophoresekammern. Die Agarosegele wurden mit Hilfe des Fotodokumentationssystems 299 und einem UV-Transilluminator (Herolab, Wiesloch) dokumentiert.

2.2.4. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNS

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNS wurde eine Auftrennung im 0,8 bis 1,5%igen (w/v) Agarosegel (2.2.3) durchgeführt. Dabei wurden zum Größen- und Mengenvergleich 500ng einer mit *Pst*I geschnitten Lambda-DNS aufgetragen und je nach Intensität bzw. Lage der Banden die Konzentration bzw. Größe bestimmt.

Zur schnellen Konzentrationsabschätzung von DNS wurden „Spot“-Analysen durchgeführt. Dazu wurde eine Agarosegelplatte, welcher 0,1 μ g/ml Ethidiumbromid zugefügt wurde, hergestellt. Auf dieser Platte wurden 1 μ l Standard-DNS mit bekannter Konzentration aufgetragen und deren Intensität mit 1 μ l der zu analysierenden Probe unter UV-Licht (302nm) nach zehnmütiger Inkubationszeit bei RT verglichen.

2.2.5. Isolierung und Reinigung genomischer DNS aus *Arabidopsis thaliana*

200 mg (Frischgewicht) junger Blätter wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 200 µl *Arabidopsis*-Extraktionspuffer in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend im gefrorenen Zustand gemörsert. Nach dem vorsichtigen Auftauen wurde das gleiche Volumen eines Phenol/Chloroform-Gemisches (1:24; v/v) dem Homogenat zugefügt und anschließend zentrifugiert (5min/13.000xg/RT). Die obere Phase wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß transferiert und nach Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol die DNS gefällt. Durch Zentrifugation (5min/13.000g/RT) wurde das DNS-Pellet sedimentiert und mit 200µl 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet für 10 min bei RT getrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Die genomische DNS wurde zum Nachweis der stabilen Transformatanten in der PCR (2.2.13.) eingesetzt.

Arabidopsis-Extraktionspuffer pH 8,0:

Tris/HCl	50 mM
EDTA	25 mM
NaCl	250 mM
SDS	0,5 % (w/v)

2.2.6. DNS-Präzipitation

Zur Konzentrierung, Umpufferung und Reinigung von DNS wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt. Dazu wurde die wässrige DNS-haltige Lösung mit 2,5 Vol. absolutem Ethanol und 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt. Die DNS wurde bei -20°C für 30min gefällt und dann durch Zentrifugation (15min/13000xg/4°C) sedimentiert. Das DNS-Pellet wurde mit 70%igem (v/v), Ethanol gewaschen und zentrifugiert (10min/13000xg/4°C). Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in einem für die weitere Verwendung adäquaten Volumen sterilem TE-Puffer bzw. sterilem Milli-Q-Wasser (pH 8,0) aufgenommen.

2.2.7. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion

Um Proteine oder andere Verunreinigungen einer DNS-Lösung zu beseitigen, wurde eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI) durchgeführt. Dazu wurde der wässrigen DNS-Lösung 1 Vol. PCI (25:24:1; v/v/v) zugegeben und die entstehenden Phasen durch Zentrifugation (5min/13000xg/RT) getrennt. Die obere, wässrige, DNS-haltige Phase, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24/1; v/v) extrahiert. Die beiden entstehenden Phasen wurden erneut durch Zentrifugation

getrennt und die obere wässrige, DNS-haltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Danach erfolgte eine Ethanol-fällung, wie unter 2.2.6. beschrieben.

2.2.8. Reinigung von DNS

Die Reinigung der DNS aus Agarosegelen wurde mit dem Gelextraktionskit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) durchgeführt. Nach dem Restriktionsenzymverdau (2.2.9.1.), der Ligation (2.2.9.3.) oder der PCR (2.2.13.) erfolgte die Reinigung der DNS durch eine Ethanol-fällung (2.2.6.) bzw. durch das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen).

2.2.9. DNS-Klonierungstechniken

2.2.9.1. Restriktionsenzymverdau

Der Verdau von DNS mit Restriktionsenzymen erfolgte nach Angaben des Enzymherstellers unter Einhaltung der Puffer-, Temperatur- und Zeitoptima. Pro μg Plasmid-DNS wurden 1 bis 3 Units des jeweiligen Enzyms eingesetzt. Dabei wurde 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschritten, um mögliche „Star-Aktivität“ bedingt durch Glycerol zu vermeiden. Bei Temperaturoptima über 37°C wurde der Ansatz mit einem Tropfen Mineral-Öl (Sigma) überschichtet, um Verdunstungen zu minimieren.

2.2.9.2. *Bst*NI „Fingerprinting“

Um die Diversität einer Bakterienbibliothek festzustellen, wurde PCR-amplifizierte scFv DNS (2.2.13.2.) mit *Bst*NI nach Herstellerangaben restringiert und elektrophoretisch in einem 2%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt (2.2.3.).

2.2.9.3. DNS-Ligation

Die Ligation von restringierter DNS (2.2.9.1.) wurde mit Hilfe der T4 DNS Ligase durchgeführt. Das zu ligierende Insert wurde mit dreifachem molaren Überschuss gegenüber dem Vektor eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde nach Herstellerangaben angesetzt und anschließend entweder bei RT für 1-2 h oder üN bei 16°C inkubiert.

2.2.10. Isolierung von Gesamt-RNS

Die Isolierung von Gesamt-RNS aus Hühner- und Mäusemilzen erfolgte mit dem RNeasy Midi-Isolierungs Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Zur Kontrolle, ob die Isolierung erfolgreich verlaufen war, wurden $5\ \mu\text{l}$ des RNS-Eluates mit $5\ \mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser und $1\ \mu\text{l}$ 50%igem Glycerol versetzt, auf ein Agarosegel (2.2.3) aufgetragen,

elektrophoretisch aufgetrennt und die RNS-Qualität mit Hilfe des Fotodokumentationssystems 299 auf dem UV-Transilluminator dokumentiert.

2.2.11. Isolierung von mRNS aus Gesamt-RNS

Zur Isolierung von mRNS aus Gesamt-RNS (2.2.10.) wurde mit dem Oligotex mRNS-Mini-Isolierungs Kit (Qiagen, Hilden) gearbeitet. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Kontrolle der erfolgreichen mRNS Isolierung wurde 1 µl des Eluates und 1 µl eines bekannten DNS-Standards auf eine mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) versetzte Agarosegelplatte pipettiert und 10 min bei RT inkubiert. Die Platten wurden mit Hilfe des Fotodokumentationssystems 299 und UV-Transilluminators (Herolab, Wiesloch) dokumentiert und ausgewertet (2.2.4.).

2.2.12. cDNS-Synthese

Die cDNS-Synthese aus mRNS (2.2.11.) erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „SUPERSRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis“ Kit von Gibco BRL (Karlsruhe). Zur Synthese der murinen cDNS-Bibliotheken wurden die cDNS-Primer COH30 (IgG1), COH32 (IgG2a/2b) und MuPD (Kappa) (Tab. 7.2.) verwendet. Die Hühner cDNS-Bibliotheken wurden mit den Primern ChicVHM (V_H) und ChicVLM (V_L) (Tab. 7.3.) erstellt. Die synthetisierten cDNS wurden zur Amplifikation der V_H - und V_L -Domänen (2.2.13.1.) unter zur Hilfenahme V_H - und V_L -spezifischer Primer (Tab. 7.4. bis 7.8.) verwendet.

2.2.13. Polymerase-Kettenverlängerungsreaktion

Die Polymerase-Kettenverlängerungsreaktion (PCR) (SAIKI *et al.*, 1985) auch als enzymatische *in vitro*-Amplifikation von DNS bezeichnet, stellt eine der wichtigsten molekularbiologischen Methoden dar. In dieser Arbeit wurden mittels PCR Restriktionsenzymchnittstellen in DNS-Fragmente kloniert sowie bakterielle und eukaryotische DNS amplifiziert und sequenziert.

2.2.13.1. PCR zur Amplifikation von V_H - und V_L -Domänen aus cDNS

Die PCR wurde zur Amplifikation der V_H - und V_L -Domänen verwendet. Durch die gewählten Primer wurden Restriktionsschnittstellen an den 5'- und 3'-Enden eingefügt, um die Klonierung in den pHENHi-Vektor zu ermöglichen. Zur Amplifizierung der Hühner cDNS wurden die Primer CDPVHF, CDPVHB, CDPVLF, CDPVLB (Tab. 7.8.), die murinen Primer 5' MPDVHF1-MPDVHF16 (Tab. 7.4.) und ein Mix der 3' MPDVHBII-1-

MPDVHBII-5 (Tab. 7.5.) für die V_H -Domäne, die 5' MPDVLF1-MPDVLF13 (Tab. 7.6.) und ein Mix der 3' MPDVLB1-MPDVLB4 (Tab. 7.7.) für die V_L -Domäne verwendet. Der PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

cDNS	3 μ l
5'-Primer (10 pmol/ μ l)	1 μ l
3'-Primer-Mix (10 pmol/ μ l)	1 μ l
dNTP- Mix (10 mM)	0,5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l
DMSO	2,5 μ l
10x <i>Taq</i> -DNS-Polymerase Puffer	5 μ l
<i>Taq</i> -DNS-Polymerase (4 U/ μ l)	0,4 μ l
destilliertes Wasser	ad 50 μ l

Abschließend wurde ein Tropfen Mineral-Öl (Sigma) auf den Reaktionsmix gegeben, um Verdunstung zu vermeiden. Die Amplifikation wurde im Thermocycler (MWG) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1 x	5 min	95°C	Initiale Denaturierung
33 x	$\left[\begin{array}{l} 1 \text{ min} \\ 2 \text{ min} \\ 2 \text{ min} \end{array} \right.$	94°C	Denaturierung
		T_p	Primeranlagerung
		72°C	Primerverlängerung
1 x	5 min	72°C	Finale Verlängerung

Die Anlagerungstemperatur (T_p) war primerspezifisch und wurde nach folgender Formel empirisch bestimmt (WU *et al.*, 1991), falls die Primersequenz nicht vollständig komplementär zur Matrizen-DNS war, ansonsten wurde T_p nach der Schmelztemperatur T_m des Herstellerangaben berechnet, von der 5°C subtrahiert wurden.

$$T_p = 22 + 1,46 \times [2 \times (G + C) + A + T]$$

5 μ l der PCR-Ansätze wurden anschließend zur Kontrolle auf einem 1%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt (2.2.3.).

2.2.13.2. Amplifikation bakterieller und eukaryotischer DNS

Zur Integration neuer Schnittstellen oder zur Kontrolle von Klonierungsschritten transformierter Bakterienstämme wie *E. coli* oder *A. tumefaciens* oder transgener Pflanzen wurde eine nach JESNOWSKI *et al.* (1995) modifizierte PCR-Methode verwendet. Dazu wurde Plasmid-DNS bzw. genomische DNS in die enzymatische *in vitro*-Amplifikation

eingesetzt bzw. direkt rekombinante Agrobakterien oder *E. coli* verwendet. Die Bakterienklone wurden bei dem Erreichen einer stecknadelkopfgroßen Kolonie auf einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß mit 10 µl steriles Wasser überführt und mit 20 µl PCR-Öl überschichtet. Die Bakteriensuspension wurde im Thermocycler für 15 min auf 96°C erhitzt, um die Zellen aufzubrechen und die Plasmid-DNS freizusetzen. Dem Mix wurden anschließend 15 µl des folgenden Reaktionsgemisches zugegeben:

Prämix für 10 PCR-Ansätze:

H ₂ O Milli-Q	105,05 µl
10 x PCR Puffer	27,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	16,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2,75 µl
5'-Primer (10 pmol/µl)	5,5 µl
3'-Primer-Mix (10 pmol/µl)	5,5 µl
<i>Taq</i> -DNS-Polymerase (4 U/µl)	2,2 µl
Total Volumen	<u>165 µl</u>

und nach dem unten aufgeführten PCR-Programm amplifiziert.

1 x	5 min	94°C	Initiale Denaturierung
35 x	50 sec.	94°C	Denaturierung
		1,5 min	T _p (48°C) Primeranlagerung
		1,5 min	71°C Primerverlängerung
1 x	8 min	72°C	Finale Verlängerung

15 µl der amplifizierten PCR-Produkte wurden auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.) und die Größe der PCR-Produkte dokumentiert. Falls notwendig wurden die PCR-Banden aufgereinigt (2.2.8.), restringiert (2.2.9.1.) und für Ligationen (2.2.9.3.) verwendet.

2.2.13.3. Sequenzierung von Plasmid-DNS

Die Sequenzierung wurde zur Analyse PCR-amplifizierter und klonierter DNS-Sequenz verwendet. Dabei wurde die Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach SANGER *et al.* 1977 mit Hilfe der unter 2.2.13.1. beschriebenen PCR-Methode und folgendem Protokoll einem Thermocycler (MWG) durchgeführt:

1 x	5 min	95°C	Initiale Denaturierung	
35 x	[30 sec	94°C	Denaturierung
		30sec	50°C	Primeranlagerung
		45 sec	72°C	Primerverlängerung
1 x	5 min	72°C	Finale Verlängerung	

Zur Sequenzierung von pHENHi wurden die pHEN5'forward (IRD700) und pHEN3'back (IRD800) Primer eingesetzt. DNS-Fragmente in den Vektoren pTRAKc und pGEM wurden mit den Primern pSS-3 und pSS-5 (Tab. 7.9.) bzw. Universe 1 und 2, Reverse 3 und 4 (Tab. 7.10.) sequenziert. Die Analyse der Sequenzierreaktionen erfolgte mit dem LiCor IR₂ 4000 DNS-Sequenzierautomaten nach Herstellerangaben. Dazu wurde ein 6,0%iges (w/v) denaturierendes PAA-Gel (6 M Harnstoff) verwendet. Die Sequenzdaten wurden mit dem systemeigenen Computersystem aufgezeichnet und anschließend mit Chromas und DNASIS (7.4.) ausgewertet.

2.3. Proteinchemische Methoden

2.3.1. „Phage Display“

Das „Phage Display“ stellt eine schnelle Methode zum „Screenen“ von kombinatorischen Bibliotheken dar. Dabei präsentiert der Phage M13 einen scFv auf seiner Oberfläche, mit dem er an ein bestimmtes Antigen binden kann. Die spezifisch gebundenen Phagen werden durch mehrere Waschschriffe und einen Elutionsschritt selektioniert („Panning“). Durch Wiederholung des „Pannings“ kommt es zu einer Anreicherung spezifisch bindender Phagen. Nach jeder „Panning“-Runde stehen die Phagemide zur Verfügung, die die DNS-Sequenz für den an das Antigen bindenden scFv besitzen.

In dieser Arbeit wurden drei aviane und eine murine immunisierte Bibliothek hergestellt, die ursprünglich von drei Hühnern, welche mit den Antigenen CWP, FPCWP und SG immunisiert (2.5.2.) wurden, und einer Maus (injiziertes Antigen: CWP) abstammten (2.5.1.). Es sollten diejenigen Klone selektioniert werden, welche mit der höchsten Spezifität an die Antigene CWP, FPCWP, Pilztoxin (15-O-Acetyl-4-deoxynivalenol, SIGMA) und „Spores

germinated“ (SG) binden. Die Methode des Phage Displays kann man in vier Abschnitte einteilen:

- 1) Herstellung der Phagen-Bibliothek (2.3.1.1.)
- 2) Isolierung der Phagen aus *E. coli* (2.3.1.2.)
- 3) Titration der Phagen (2.3.1.3.)
- 4) Selektion Antigen-spezifischer Phagen (2.3.1.4.)

2.3.1.1. Herstellung der Phagen-Bibliothek

Zur Herstellung einer möglichst komplexen Phagen-Bibliothek wurden die Bibliotheken, welche aus den Milzen der mit den Antigenen CWP, FPCWP und SG immunisierten Hühner stammten (2.5.2.), miteinander vereinigt und in 50 ml 2TY-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampizillin und 1% (w/v) Glucose bei 37°C bis zu einem $E_{600\text{nm}}$ von 0,5 geschüttelt (225 UpM).

Zu 10 ml dieser Kultur wurden 50 µl M13-K07 Helferphagen (ca. 10^{11} Phagen pro ml) hinzu gegeben und im Wasserbad (37°C) ohne Schütteln für 30 min inkubiert. Die infizierten Zellen wurden (10 min/4000xg/4°C) zentrifugiert, in 200 ml 2TY mit 100 µg/ml Ampizillin und 25 µg/ml Kanamycin resuspendiert und üN bei 30°C geschüttelt (225 UpM).

2.3.1.2. Isolierung der Phagen aus *E. coli*

Die über Nacht gewachsenen Zellen wurden zentrifugiert (30 min/4000xg/4°C), der Überstand separiert, mit 1/5 Vol. (40 ml) PEG/NaCl [20% (w/v) Polyethylenglycol 6000, 2,5 M NaCl] versetzt, gründlich gemischt und die Phagen 1 h bei 4°C gefällt. Das Gemisch wurde anschließend für 30 min bei 6500xg und 4°C zentrifugiert und das entstehende Phagenpellet in 40 ml sterilem Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 8 ml PEG/NaCl [20% (w/v) Polyethylenglycol 6000, 2,5 M NaCl] und 20 min Fällung bei 4°C wurde das Phagenpellet bei 4000xg für 10 min bei 4°C sedimentiert. Das entstandene Pellet wurde mit 2,5 ml sterilem Wasser gelöst und für 10 min bei 4000xg und 4°C erneut zentrifugiert, um noch vorhandene Zellfragmente zu beseitigen. Der phagenhaltige Überstand wurde bei 4°C gelagert.

2.3.1.3. Titration der Phagen

Um den Phagentiter („colony forming units“, cfu) zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-4} bis 10^{-13} cfu hergestellt und 100 µl der Verdünnungen zu 900 µl *E. coli* XL1-Blue Kultur hinzugegeben und für 30 min bei 37°C im Wasserbad ohne Schütteln inkubiert. Die XL1-Blue-Zellen wurden zuvor in 2TY-Flüssigmedium bis zu einer $E_{600\text{nm}}$ von

0,5 inkubiert (225 UpM) und dann für die Titration verwendet. 100 µl der infizierten XL1-Blue-Zellen wurden anschließend auf 2TYGA-Agarplatten [1% (w/v) Glucose, 100 µg/ml Ampizillin] plattiert und üN bei 37°C inkubiert. Da es sich bei dem für das „Phage Display“ verwendeten Vektor um ein Phagemid handelte, welches die Eigenschaften eines Plasmids sowie eines Phagen vereinigt (VIEIRA und MESSING, 1987), konnten die cfu („colony forming units“) der ampizillinresistenten Zellen in direktem Zusammenhang mit der Anzahl der infektiösen Phagen gebracht werden.

2.3.1.4. Selektion von Antigen-spezifischen Phagen

Zur Selektion der spezifisch bindenden Phagen wurden „Immunotubes“ (Nunc-MaxisorpP4, Bieberich) mit 3,5 ml CWP (250 µg/ml) (2.3.7.3.), FPCWP (2.3.7.5.), SG (1 x 10⁵ Spores/ml) (2.3.7.2.) oder 15-O-Acetyl-4-deoxynivalenol (10 µg/ml) in PBS gefüllt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße 3 mal mit PBS gewaschen und mit 4 ml PBS mit 2% (w/v) Marvel (Premier Brands, Moreton, UK) für 2 h bei 37°C zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen behandelt. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS. Daraufhin wurden 3,5 ml PBS in 2% (w/v) Marvel und 10¹²-10¹³ cfu Phagen versetzt, in die „Immunotubes“ gefüllt und für 2 h bei RT auf einem Überkopfschüttler (50 UpM) inkubiert. Danach wurde das Tube 20 mal mit PBS 0,05% (v/v) Tween-20 und anschließend 20 mal mit PBS gewaschen. Zur Elution der Phagen wurde 1 ml 100 mM Triethylamin in das Reaktionsgefäß gegeben und 10 min bei RT auf einem Überkopfschüttler (50 UpM) inkubiert. Die eluierten Phagen wurden sofort mit 0,5 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,4 neutralisiert. In das „Immunotube“ wurden anschließend 200 µl 1 M Tris/HCl, pH 7,4 gegeben, um noch im Reaktionsgefäß befindliche Phagen zu neutralisieren und eluieren. Die beiden Eluate wurden vereinigt und bei 4°C gelagert.

Um eine neue „Panning“-Runde zu starten, wurden zu den eluierten Phagen mit XL1-Blue Bakterien gegeben. Dazu wurden die Bakterien zuvor bei 37°C bis zu einer E_{600nm} von 0,5 herangezogen, um optimale Infektionsbedingungen (effizienteste Ausbildung der F-Pili und damit verbunden bestmögliche Infektion durch M13-Phagen) zu erreichen. Zu 1 ml Phageneluat (1 x 10¹³ cfu) wurden 9 ml Bakterienzellen gegeben (E_{600nm} = 0,5) und für 30 min im Wasserbad bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Nach der Infektion wurden die Zellen zentrifugiert (10min/4000xg/4°C), in 2 ml LB-Medium aufgenommen, auf 2TYGA-Bioassay-Platten (1% (w/v) Glucose, 100 µg/ml Ampizillin) plattiert und bei 37°C üN inkubiert. Um den Phagen-Titer zu ermitteln, wurden ebenfalls Verdünnungsreihen zwischen 10⁻⁴ bis 10⁻⁹ cfu plattiert. Am nächsten Morgen wurden die Kolonien von den 2TYGA-Platten in LB-

Medium gelöst und als Glycerolstock bei -80°C weggefroren. Diese Zellen dienen in der nächsten Runde als Ausgangsbibliothek.

2.3.2. Expression von scFvs in *Escherichia coli*

2.3.2.1. Identifikation löslicher bakterieller scFvs

Nach der zweiten und dritten Runde des „Phage Displays“ wurden je Antigen 96 einzelne Bakterien-Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in eine sterile ELISA-Platte mit je 110 μl 2TY 1% (w/v) Glucose 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampizillin pro Vertiefung inokuliert und üN bei 37°C geschüttelt (225 UpM).

Am nächsten Morgen wurde mit 10 μl der Über-Nacht-Kultur eine sterile ELISA-Platte mit 140 μl 2TY 0,1% (w/v) Glucose 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampizillin je Vertiefung angeimpft und bis zur log-Phase ($E_{600\text{nm}}=0,5-0,8$) für 3-4 Stunden bei 37°C unter ständigem Schütteln (225 UpM) inkubiert. In die Vertiefungen wurden IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM (50 μl 4 mM IPTG 2TY) hinzugegeben und die ELISA-Platte üN bei 30°C geschüttelt (225 UpM). Mit der ELISA-Zentrifuge wurden die Zellen bei $2400\times g$ für 10 min bei RT pelletiert und 100 μl des Überstands im ELISA zur Identifizierung von Antigen-spezifischen scFv eingesetzt (2.4.1.3.). Zu der über Nacht inkubierten ELISA-Platte wurde je Vertiefung 100 μl 50 % (v/v) Glycerol hinzugegeben und bei -80°C als „Master“-Platte gelagert.

2.3.2.2. Expression von löslichen bakteriellen Proteinen

Zur Expression von löslichen scFvs, AFPs und AFP-scFv-Fusionsproteinen in *E. coli* wurden 50 μl des Glycerolstocks in 5 ml LB-Flüssigmedium (100 $\mu\text{g/ml}$ Ampizillin und 1% (w/v) Glucose) inokuliert und üN bei 37°C unter Schütteln (225 UpM) inkubiert. 2,5 ml der üN Kultur wurden zur Inokulation in 500 ml 2TY (Ampizillin 100 $\mu\text{g/ml}$ 0,1% (w/v) Glucose) pipettiert. Der Ansatz wurde bis zu einer $E_{600\text{nm}}$ von 0,5 bis 0,7 bei 37°C unter ständigem Schütteln (225 UpM) inkubiert. Zur Proteinexpression wurde IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und üN bei 30°C geschüttelt (UpM 225). Am nächsten Morgen wurden die Zellen zentrifugiert (10 min/ $6000\times g/4^{\circ}\text{C}$) und der Überstand auf ein Vorhandensein löslicher Proteine im ELISA (2.4.1.1.) und Western-Blot (2.3.4.) getestet oder nach dem Sterilfiltrieren bei der Ni-NTA-Aufreinigung eingesetzt (2.3.2.4.).

2.3.2.3. Expression und Isolierung von periplasmatischen Proteinen

Zur Expression von periplasmatischen scFvs, AFP und AFP-scFv-Fusionsproteinen in *E. coli* wurden 20 ml 2TY (100 $\mu\text{g/ml}$ Ampizillin, 1% (w/v) Glucose) mit 10 μl eines Glycerolstocks

mit proteinexprimierenden Zellen (2.3.2.1.) inokuliert und wie unter 2.3.2.1. beschrieben inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 10 ml der üN-Kultur zu 500 ml 2TY (100 µg/ml Ampizillin, 1% (w/v) Glucose) gegeben und bis zu einer E_{600nm} von 0,5 bei 37°C geschüttelt (225 UpM). Dann erfolgte die Induktion der Protein-Expression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM. Die Kultur wurde daraufhin bei 30°C unter Schütteln (225 UpM) 3-4h inkubiert. Danach wurden die 500 ml Kultur sedimentiert (10min/3000xg/4°C). Das entstandene Bakterienpellet wurde mit 5 ml periplasmatischer Puffer (PPP) resuspendiert. EDTA wurde bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Zellen für 15 min auf Eis gelagert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (15min/3000xg/4°C). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 5 ml 5 mM MgSO₄ aufgenommen, EDTA (Endkonzentration 1 mM) zugegeben und weitere 15 min auf Eis gehalten. Der Ansatz wurde zentrifugiert (15min/3000xg/4°C), die beiden Überstände vereinigt und wiederum zentrifugiert (15min/13000xg/4°C), um eventuelle Zelltrümmer zu beseitigen. Dann erfolgte eine Dialyse (16 h) mit 2 l PBS mit dreimaligem Pufferwechsel. Wenn ein His6-,tag“ am C-Terminus der Proteine vorhanden war, wurde eine Ni-NTA-Reinigung durchgeführt (2.3.2.3.) andernfalls wurden die Proteine direkt im ELISA (2.4.1.2.) und Dot-Blot (2.3.7.) eingesetzt.

PPP-Puffer (pH 8,0):

Tris/HCl	30 mM
Sucrose	20% (w/v)

2.3.2.4. Reinigung von Proteinen

Zur Reinigung der periplasmatisch exprimierten scFvs, AFP und AFP-scFv-Fusionsproteinen nach der Dialyse (2.3.2.3.) aus dem Überstand der *E. coli* Kultur oder nach Isolierung Gesamt-löslicher Proteine aus Pflanzen (2.7.5.) wurde eine 10 ml Säule (BioRad) mit 200 µl Ni-NTA-,Beads“ (Qiagen) gefüllt und mit 20 ml PBS equilibriert. Die Proben wurden insgesamt viermal über die Säule gegeben, um die His6-,tag“-Proteine vollständig an die Matrix zu binden. Die Säule wurde mit 20 ml PBS + 20 mM Imidazol gewaschen und anschließend die scFvs, AFP und AFP-scFv-Fusionsproteine viermal mit 2 ml PBS + 250 mM Imidazol eluiert. Zur Entfernung des Imidazols wurde eine weitere Dialyse des Eluates gegen PBS mit dreimaligem Pufferwechsel durchgeführt. Eine Konzentrationbestimmung erfolgte mittels SDS-PAA-Gel mit anschließender Coomassie Brilliant Blau Färbung (2.3.3.).

2.3.3. SDS-PAA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und der Nachweis von Proteinen wurde mit einer denaturierenden und diskontinuierlichen SDS-PAA-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970) durchgeführt (Sammelgel: T = 4%, C = 2,7%, pH 6,8; Trenngel: T = 12%, C = 2,7%, pH 8,8). Nachdem die proteinhaltigen Lösungen mit 1/10 Vol. 10 x SDS-PAA-Gelelektrophoreseprobenpuffer versetzt worden waren, wurden sie 5 min auf 100°C erhitzt und im denaturierten Zustand mit Hilfe der „Mini Protean“-Apparatur (BioRad) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine mit Coomassie Brillant Blau G-250 nach Herstellerangaben (Serva) visualisiert. Die Lufttrocknung der Gele erfolgte zwischen zwei Zellophanfolien und die getrockneten Gele wurden anschließend lichtgeschützt aufbewahrt.

2.3.4. Immunoblot

Der Western-Blot dient zum Nachweis geringer Mengen von Proteinen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach der denaturierenden und diskontinuierlichen SDS-PAA-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970) (2.3.3.). Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde durch Elektro-Blotting (TOWBIN *et al.*, 1979) auf eine Hybond-C-Nitrozellulosemembran übertragen (Mini Transblot Apparatur oder Semi-Dry Transfer Cell, BioRad). Als Größenstandard wurde der „Prestained Protein Marker; Broad Range“ von NEB verwendet. Zur Visualisierung der Proteine wurde folgendes Protokoll angewendet, wobei alle intermediären Waschschriffe mit PBS + 0,05% (v/v) Tween-20 durchgeführt wurden:

- | | | | |
|----|---|----------------------|----------------------|
| 1. | 1% (w/v) RSA in physiologischer Saline | 1 h, RT oder üN, 4°C | Blockieren |
| 2. | ZAM, Fc-spezifisch AP-markiert 1 : 5000 in PBS + 0,5% (w/v) RSA | 1,5 h, RT | Hybridisierung |
| 3. | PBS mit 0,05% (v/v) Tween-20 | Je 5 min | 2 x Waschen |
| 4. | AP-Puffer (siehe unter Dot-Blot 2.3.5) | Je 5 min | 2 x Waschen |
| 5. | NBT/BCIP (GIBCO-BRL) | 10 - 20 min, RT | Substratreaktion |
| 6. | H ₂ O | 5 min | Stoppen der Reaktion |

Die Detektion der scFv mit c-myc-„tag“ bzw. His6- „tag“ erfolgte durch eine zusätzliche Inkubation in PBS + 0,5% (w/v) RSA mit einem murinen α c-myc mAk (1 : 5000) bzw. in PBS + 0,5% (w/v) RSA mit einem murinen α His6 mAk (1 : 3000) nach dem Blocken für 1,5 h bei RT, ansonsten wurde wie unter Punkt 3.-6. verfahren. Nach der Trocknung der Membran wurden diese mit einem Scanner digitalisiert (Agfa Arcus2, Adobe Photoshop 6.0).

AP-Puffer pH 9,6:

Tris-HCl	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

2.3.5. „Chemiluminescence-Imaging“

Zur quantitativen Bestimmung geringer Mengen von Proteinen oder von Proteinen in einem Proteingemisch wurde der Phosphorimager LAS-1000 mit dem Dokumentationsprogramm AIDA 2.31 (Raytest, Straubenhardt) eingesetzt.

Die Vorbereitung der Hybond-C-Nitrozellulosemembran verläuft uniform zur Western-Blot-Methode (2.3.4.), anstelle des NBT/BCIP wurde lediglich als Substrat für den mit der alkalischen Phosphatase (AP) konjugierten polyklonalen Ziege-anti-Maus-Ak [ZAM^{AP} (α -IgG Fc)] von Dianova (Hamburg) CDP-Star Disodium 2-Chloro-5-(4-Methoxy Spiro{1,2-Dioxetane-3,2'-(5'-Chloro)Tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]Decan}-4-yl)-1-Phenyl Phosphat von Roche (Mannheim) verwendet. Alternativ wurde ein ZAM^{HRP} (α -IgG Fc) eingesetzt, welcher durch die HRP nach Zugabe des Supersignal[®] West Pico (Pierce) Substrates nachweisbar war. Die Inkubation der Membran mit CDP-Star oder Substrat Supersignal[®] West Pico und die darauffolgende Messung wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.6. Dot-Blot

Zur schnellen Identifizierung von scFv exprimierenden *E. coli* Zellen wurde das Dot-Blot-Verfahren angewendet. Die Apparatur (BioRad, München) wurde nach Herstellerangaben zusammengefügt, wobei eine mit PBS befeuchtete Hybond-C-Membran (Amersham) verwendet wurde.

In die Vertiefung der Apparatur wurden 100 μ l der mit IPTG induzierten Bakterienkulturüberstände und die jeweiligen Kontrollen pipettiert. Zur Probenapplikation wurde die Apparatur an eine Vakuum-Pumpe angeschlossen. Nachdem die 100 μ l auf die Nitrozellulosemembran transferiert waren, wurde die Membran wie folgt behandelt, wobei alle intermediären Waschschriffe mit PBS + 0,05% (v/v) Tween-20 durchgeführt wurden:

1.	1% (w/v) RSA in physiologischer Saline	1 h, RT oder \bar{u} N, 4°C	Blockieren
2.	Maus α c-myc 1 : 3000 in PBS + 0,5% (w/v) RSA	1,5 h, RT	Hybridisierung
3.	ZAM, Fc-spezifisch, AP-markiert, je 1 : 5000 in PBS + 0,5% (w/v) RSA	1,5 h, RT	Hybridisierung
4.	PBS mit 0,05% (v/v) Tween-20	Je 5 min	2 x Waschen
5.	AP-Puffer (siehe unter Dot-Blot 2.3.5)	Je 5 min	2 x Waschen
6.	NBT/BCIP (GIBCO-BRL)	10-20 min, RT	Substratreaktion
7.	H ₂ O	5 min	Stoppen der Reaktion

Nach dem Trocken der Membranen wurden diese mit einem Scanner digitalisiert (Agfa Arcus2, Adobe Photoshop 6.0) und ausgewertet.

2.3.7. Isolierung von Pilz-Antigenen

Um Antigene in Form von Sporen, Myzel und Zellwänden von den verschiedenen Pilzen zu isolieren, wurden die Pilze auf PDA-Platten (Potato dextrose Agar, DIFCO, Detroit, USA) in Form von Pilz-infizierten Agarstückchen ausgelegt und für 5-7 Tage bei 28°C im Inkubationsschrank angezogen.

2.3.7.1. Isolierung von Pilzsporen

Um Sporen von den unterschiedlichen Pilzen zu gewinnen, wurden zwei kleine infizierte Agarstückchen mit einer Impföse in 300 ml CM-Sporulationsmedium (Duvick *et al.*, 1992) transferiert und bei 28°C 3-10 Tage geschüttelt (175 UpM). Ab dem dritten Tag wurden Proben gezogen und diese auf Sporen untersucht. Die Sporendichte wurde in einer Thoma-Kammer bestimmt und notiert.

Lag die Sporendichte bei mindestens 10^7 Sporen pro ml, wurden diese durch zwei sterile Lagen Miracloth filtriert, um das Myzel zu entfernen, und anschließend für 5 min mit 4000xg bei RT pelletiert. Das Sporen-Pellet wurde zweimal mit 100 ml sterilem PBS gewaschen (5 min/4000g/RT) und zur Lagerung bei -80°C in 1 ml PBS mit 25% (v/v) Glycerol aufgenommen.

CM-Sporulations-Medium:

Carboxymethylcellulose	0,75 % (w/v)
Hefeextrakt	0,05 % (w/v)
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,025 % (w/v)
NH ₄ NO ₃	0,05 % (w/v)
KH ₂ PO ₄	0,05 % (w/v)

2.3.7.2. Herstellung von ausgekeimten Sporen

In PDB (Potato dextrose Broth, DIFCO, Detroit, USA) wurden 1×10^5 Sporen des jeweiligen Pilzes pro Liter hinzugefügt und dann für 16h bei 28°C auskeimen gelassen. Die Keimung wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und gegebenenfalls die Inkubationsdauer verlängert.

2.3.7.3. Isolierung von Zellwandproteinen

Zellwandproteine („Cell wall proteins“, CWP) sind Pilz-Proteine, die sich auf der Oberfläche eines Pilzes befinden. Die CWP wurden isoliert, um sie für die Immunisierung der Mäuse (2.5.1.) und Hühner (2.5.2.), im ELISA (2.4.1.), dem „Phage Display“ (2.2.13.) und in der Immunofluoreszenzmikroskopie (2.8.) einsetzen zu können.

Zur Isolierung der CWP wurden *F. graminearum* Sporen mit der Endkonzentration von 1×10^5 Sporen/l drei Tage bei 28°C unter Schütteln (225 UpM) in 2 x 250 ml Czapek Dox Flüssig-Medium (DIFCO, Detroit, USA) (35g/l) angezogen (modifiziert nach THORNTON *et al.*, 1997), durch drei Schichten „Miracloth“-Papier vakuum-filtriert und mit 500 ml entionisiertem Wasser gewaschen, um Sporen und eventuelle Medienreste zu entfernen.

Um die Zellwände mit den kovalent und nicht kovalent gebundenen Proteinen zu isolieren, wurde 1,0 g (Frischgewicht) des Myzels in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörsert und in 10 ml eiskaltem CWP-Aufschlusspuffer eluiert. Die aufgebrochenen Zellwände wurden 30 min bei 4°C auf einem Über-Kopf-Schüttler (50 UpM) inkubiert und anschließend dreimal mit eiskaltem CWP-Waschpuffer und dreimal mit 10 ml H₂O (1 mM PMSF) gewaschen (10 min/50UpM/4°C), um das Cytoplasma und das NaCl zu beseitigen. Zwischen den Waschschrritten wurden die Zellwände durch Zentrifugation (5 min/2000xg/4°C) pelletiert. Die Zellwände mit den Zellwandproteinen wurden in 10 ml 1xPBS aufgenommen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung (s.o.) bei -20°C gelagert bzw. zum Entfernen der nicht kovalent gebundenen Proteine wie unter 2.3.7.2. beschrieben weiter verarbeitet.

CWP-Aufschlusspuffer pH 7,8:

Tris-HCl	10 mM
PMSF	1 mM

CWP-Waschpuffer:

NaCl	1 M
PMSF	1 mM

2.3.7.4. Isolierung der kovalent gebundenen Zellwandproteine

Kovalent gebundene Zellwandproteine („cell wall covalent bound proteins“ = CWCBP) wurden zur genaueren Charakterisierung der Antigene gewonnen. Dazu wurden 10 ml der CWP aus 2.3.6.1. pelletiert (5min/2000xg/RT) und in 10 ml CWCBP-Extraktionspuffer resuspendiert und für 5 min gekocht. Die Suspension wurde zentrifugiert (5min/2000xg/4°C) und sechsmal mit 10 ml H₂O (1 mM PMSF) gewaschen, um SDS, β -Mercaptoethanol und EDTA zu entfernen. Das Zellwandpellet wurde in 10 ml 1xPBS aufgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

CWCBP-Extraktionspuffer:

Tris-HCl pH 7,8	50 mM
SDS	2% (w/v)
Na-EDTA	100 mM
β -Merkaptoethanol	40 mM
PMSF	1 mM

2.3.7.5. Isolierung von „Plate Culture Washing Proteins“

Die Isolierung von „Plate Culture Washing Proteins“ (PCWP) ist eine schnelle und einfache Technik, um an Pilz-Antigene zu gelangen (modifiziert nach CHRISTOPHER *et al.*, 1997). Dazu wurde *F. graminearum* auf PDA-Platten („potato dextrose agar“, Merck, Darmstadt) für 5 - 7 Tage bei RT inkubiert. Nachdem die Platten mit Myzel bedeckt waren und sich der Agar rot verfärbt hatte, wurden die Agarplatten mit je 5 ml sterilem PBS gewaschen. Das Myzel wurde durch Zentrifugation (15min/8500xg/4°C) entfernt und der PCWP enthaltene Überstand aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.4. Immunologische Methoden

2.4.1. „Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay“ (ELISA)

Der „Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay“ (ELISA) ist eine sehr schnelle und sensitive Festphasenmethode, welche bevorzugt zur Bestimmung von Antikörperbindungsspezifitäten und Antikörperbindungsreaktivitäten angewendet wird (CLARK und ADAMS, 1977).

2.4.1.1. ELISA zur Identifizierung von Antigen-spezifischen scFvs und scFv-AFP Fusionen

Zur Identifizierung von Antigen-spezifischen scFvs und scFv-AFP-Fusionsproteinen wurde, wie in Tab. 2.2. beschrieben, vorgegangen. Als Proben wurden gereinigte scFvs (2.3.2.3.) oder die Überstände von scFvs produzierenden *E. coli*-Stämmen (2.3.2.2.) verwendet. Alle intermediären Waschschriffe wurden mit PBS + 0,05% (v/v) Tween-20 durchgeführt.

Tab. 2.2.: Identifizierung von Antigen-spezifischen Fg-scFv mit C-terminalen c-myc-„tag“ und His-6-„tag“. Coating-Konzentrationen: Pilzliches Toxin = 10 µg/ml; FPCWP = 2,5 µg/ml; CWP = 200 µg/ml; SG = 1 x 10⁵ Sporen/ml.

Schritt	Konz./Verd.	Vol./Napf	Ink.-Zeit	Temp.
Coaten mit Antigenen (PBS)	1-250 µg/ml	100 µl	1,5 h	37°C
Blocken (RSA)	1% (w/v)	150 µl	üN (o.1h)	4°C (37°C)
scFv (Probe)	unverdünnt	100 µl	1,5 h	37°C
Maus α c-myc [PBS + 0,5% (w/v) RSA] oder Maus α His-6 [PBS + 0,5% (w/v) RSA]	1 : 3000	100 µl	1,5 h	37°C
ZAM, Fc oder H+L-spezifisch, AP-markiert [PBS + 0,5% (w/v) RSA]	1 : 5000	100 µl	1,5 h	37°C
AP-Substrat (p-Nitrophenyl-Phosphat, Sigma)	1 mg/ml	100 µl	1 h	37°C

2.5. Immunisierung und Isolierung polyklonaler Antikörper

Um aus den Milzen von Mäusen und Hühnern immunkompetente scFv-Bibliotheken zu gewinnen, wurden die Mäuse und Hühner mit den Antigenen CWP (2.3.7.3.), SG (2.3.7.2.) und FPCWP (2.3.7.5.) immunisiert. Die Antigene wurden mit Freund'schem Adjuvans gemischt, um ein polyklonales Serum bzw. spezifisch angereicherte B-Zellen in den Hühnermilzen zu erhalten (GLASER, 1995). Das Freund'sche Adjuvans, welches zur Immunisierung eingesetzt wurde, besteht aus einer Suspension von mykobakteriellen Zellwandbestandteilen, die als besonders starker Immunstimulus bekannt sind, und aus Mineralöl.

Die durchgeführten Tierversuche waren vom Regierungspräsidium des Landes Nordrhein-Westfalen genehmigt worden (Aktenzeichen RP.NR.: 23.203.2 AC 12, 1/97 sowie RP.NR.: 23.203.2 AC 12, 10/98) und wurden von dem Sicherheitsbeauftragten des Institutes für Biologie I der RWTH Aachen, Herrn Dr. Hirsch, überwacht.

2.5.1. Immunisierung von Mäusen

Die Immunisierung der Mäuse mit Pilz-Antigenen wurde mit 9 Wochen alten weiblichen BALB/c Mäusen durchgeführt. Jeweils drei Mäuse pro Antigen wurden mit 100 µl eines 120 µl MM Gerbu Adjuvands LQ MM (Gaiberg) und 380 µl Antigen-Gemisches drei Wochen lang wöchentlich unter die Schwanzwurzel injiziert. Alle Antigene wurden von dem Pilz *F. graminearum* hergestellt. CWP (2.3.7.3.) wurden mit einer Konzentration von 200 µg/ml, ausgekeimte Sporen mit einer Sporendichte 1×10^3 Sporen/ml (2.3.7.2.) und FPCWP (2.3.7.5.) frisch nach dem Abwaschen von einer mit *F. graminearum* bewachsenen PDA-Platte verwendet. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Tieren 100 µl Blut abgenommen und der Titer bestimmt (2.8.4.) Am nächsten Tag wurden die Mäusemilzen präpariert (2.5.4.) und die Gesamt-RNS isoliert (2.2.7.).

2.5.2. Immunisierung von Hühnern

Für die Immunisierung von Hühnern wurden jeweils 300 µl des Antigen-Adjuvans-Gemisches in die beiden Brustmuskeln (*i.m.*) injiziert. Dazu wurden 580 µl der Antigene CWP (2.3.7.3.), SG (2.3.7.2.) und FPCWP (2.3.7.5.) mit der Konzentration, wie unter 2.5.1. beschrieben, mit 120 µl Gerbu 100 Adjuvans (Gaiberg) und 580 µl Antigen homogenisiert. Die Immunisierung erfolgte dreimal jede zweite Woche. Nach der letzten Immunisierung wurden die Eier sechs Tage lang gesammelt, die polyklonalen Antikörper aus dem Eigelb isoliert (2.5.3.) und die Hühner am siebten Tag geopfert, um die Hühnermilzen zu entnehmen (2.5.4.).

2.5.3. Isolierung von polyklonalen Hühner Antikörpern

Polyklonale Hühner Antikörper (IgY-Ak) wurden nach POLSON *et al.* (1985) aus dem Hühnereigelb gereinigt. Um die IgY-Ak von den restlichen Proteinen zu isolieren, wurden Fällungsschritte mit PEG und Ethanol durchgeführt.

Das Eigelb wurde vom Eiklar getrennt, mit eiskaltem Wasser gewaschen und das Dottervolumen in einem Glasmesszylinder bestimmt. Vier Volumen eiskaltes PBS wurden hinzugegeben und die Lösung für 10 min gerührt. Zur Präzipitation wurden 3,5% (w/v) PEG-6000 hinzugegeben und 10 min unter Rühren (150 UpM/4°C) gelöst. Die eisgekühlte Suspension wurde zentrifugiert (20 min/12000xg/4°C) und der Überstand abgenommen. Der Überstand, welcher die IgY Ak enthält, wurde durch drei Lagen Miracloth filtriert und das Volumen bestimmt. Zum Füllen der IgY Ak wurde 8,5% (w/v) PEG-6000 zugegeben und auf Eis durch Rühren (150 UpM/4°C) gelöst. Die Suspension wurde zentrifugiert (20 min/12000xg/4°C) und das Pellet, welches die IgY Ak enthält, in 2,5-fachem Dottervolumen eiskaltem PBS aufgenommen. Der Lösung wurde 12% (w/v) PEG-6000 zugegeben und auf Eis bei 150 UpM für 20 min resuspendiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (20 min/12000xg/4°C) und das Pellet (IgY Ak) in $\frac{1}{4}$ Eigelbvolumen eiskaltem PBS gelöst. Um das restliche PEG zu entfernen, wurde ein equivalentes Volumen -20°C kaltes 50% (v/v) Ethanol hinzugefügt und die Suspension ca. 8 mal invertiert. Die IgY-Ak wurden pelletiert (25 min/15000g/4°C) und in $\frac{1}{4}$ Dottervolumen PBS aufgenommen. Um das restliche Ethanol zu beseitigen, wurden die Ak ü/N gegen 2 l PBS dialysiert und die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Dabei entsprach eine Extinktion von 1 bei 280 nm einer IgY Konzentration von 1,4 mg IgY/ml. Den Proben wurden 0,02 % (w/v) Natriumazid hinzugegeben, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.5.4. ELISA zur Bestimmung des Antikörper-Titers im Serum oder Eigelb

Der Nachweis von antigenspezifischen Ak im murinen Serum oder im Hühnereigelb wurde in einem indirekten ELISA durchgeführt (Fischer, 1990). Die ELISA-Platten wurden, wie in der Tab. 2.3. angegeben, behandelt und eine Verdünnungsreihe der Ak von $1:10^3$ bis $1:10^9$ angesetzt.

Tab. 2.3.: Parameter des indirekten ELISAs zur Bestimmung des Ak-Titers im Serum immunisierter Mäuse bzw. im Eigelb immunisierter Hühner. Coating-Konzentrationen: FPCWP = 2,5 µg/ml; CWP = 200 µg/ml; SG = 1 x 10⁵ Sporen/ml.

Schritt	Konz./Verd.	Vol./Napf	Ink.-Zeit	Temp.
Coaten mit Antigenen (PBS)	1-250 µg/ml	100 µl	1,5 h	37°C
Blocken (RSA)	1% (w/v)	150 µl	üN (o.1h)	4°C (37°C)
Proben: (Serum/Eigelb) (PBS)	1:10 ³ -10 ⁹	100 µl	1,5 h	37°C
pZAM ^{AP} (Fc) oder pKAH ^{AP} (Fc) in [PBS + 0,5% (w/v) RSA]	1 : 5000	100 µl	1,5 h	37°C
AP-Substrat (p-Nitrophenylphosphat)	1 mg/ml	100 µl	1 h	37°C

2.5.5. Milzpräparation

Um aus den Milzzellen von Mäusen oder von Hühnern Gesamt-RNS zu isolieren (2.2.7.), wurden deren Milzen aus den immunisierten Tieren (2.5.1.; 2.5.2.) präpariert. Dazu wurden die Mäuse mit Ether eingeschlafert und in 70% (v/v) Ethanol Oberflächen sterilisiert. Nach dem Fixieren der Mäuse auf einer Unterlage wurde das Fell an der Bauchdecke aufgeschnitten und die Milz entnommen. Die Hühnermilzen wurden vom Tierpfleger präpariert. ¼ der Mäusemilz bzw. ein 0,5 cm² großes Hühnermilzstück wurde in RLT-Puffer aufgenommen (RNeasy Midi-Isolierungs Kit [Qiagen]), von einer 10 ml Spritze mit einer Microlane 3 Nadel (Becton Dickinson) durch einziehen und herausdrücken homogenisiert und wie unter 2.2.7. beschrieben fortgefahren.

2.6. Inhibitionstests

Um den inhibitorischen Effekt der exprimierten Proteine aus Bakterien zu verifizieren, wurden in ELISA-Platten Inhibitionsteste durchgeführt. Dazu wurden 100 µl PDB-Medium (Potato Dextrose Broth, DIFCO, Detroit, USA) mit 1 x 10⁵ *Fusarium*-Sporen versetzt und für 16 h bei 28°C inkubiert. Nachfolgend wurden 100 µl der sterilfiltrierten Bakterienüberstände, in denen die rekombinanten, bakteriellen Proteine mit einer Anfangskonzentration von 200 ng/ml vorhanden waren, eingesetzt. Eine Verdünnungsreihe wurde mit Verdünnungsschritten von 1:5 in 2TY_{AMP100}-Medium entsprechend eingesetzt. Die ELISA-Platten wurden für 2 Wochen bei 28°C inkubiert und anschließend photographisch dokumentiert.

2.7. Transformation und Analyse von Pflanzen

In dieser Arbeit wurden Tabak- und *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet, welche zur transienten und stabilen Transformation dienen und folglich als Expressionssystem und zum „proof of principle“ zur rAk-vermittelten Resistenz in Pflanzen verwendet wurden. Zusätzlich wurden

Reis- und Weizen-Pflanzen mit den vielversprechensten resistenzinduzierenden Konstrukten stabil transformiert.

2.7.1. Anzucht der Pflanzen

Die Anzucht der *Arabidopsis*-Pflanzen (*Arabidopsis thaliana* cv. Columbia) und der Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SR1) erfolgte bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16h/8h, 23°C, einer mittleren bis hohen Luftfeuchtigkeit und einer Beleuchtung von 10000 Lux. Sowohl die Aussaat der Samen als auch die Kultivierung der Pflanzen erfolgte in ED73 Einheitserde (Patzner, Sinntal-Jossa).

2.7.2. Transiente Transformation von Tabakpflanzen durch Vakkuminfiltration

Die transiente Transformation von Tabakpflanzen dient zur schnellen Produktion von rekombinanten Proteinen in Pflanzen. Sie wird oftmals der stabilen Transformation vorangestellt, um die Expression und die Stabilität des zu exprimierenden Proteins zu überprüfen und dadurch festzustellen, ob eine stabile Transformation des gewünschten Proteins in Pflanzen vielversprechend erscheint.

Die durchgeführte transiente Transformation von Tabakpflanzen durch Vakuum-Infiltration wurde nach KAPILA *et al.* (1997) modifiziert. Dazu wurde 1 ml eines Glycerol-Stocks von PCR positiv getesteten *A. tumefaciens* Klonen (2.2.13.2.) in 200 ml YEB-Medium (Rif, Km, Cb) inokuliert und üN mit 250 UpM bei 28°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Zellen für 15 min bei 4000xg und RT zentrifugiert und anschließend in 200 ml YEB-I-Medium und unter Schütteln (250 UpM) bei 28°C üN inkubiert. Der nächste Zentrifugationsschritt (15 min/4000xg/RT) wurde am darauffolgenden Morgen vollzogen, das entstandene Pellet in 50 ml MMA-Medium aufgenommen, die E_{600nm} ermittelt, auf 1,5-2,0 mit MMA-Medium eingestellt und 2 h bei RT stehen gelassen. 50-150 ml der Agrobaktériensuspension wurde in ein Weckglas überführt, in dem sich vier 6-15 cm große Wildtyp-Tabakpflanzenblätter (SR1) mit der Blattunterseite nach oben gedreht befanden. Mit einem Mörser wurden die Blätter so beschwert, dass sie vollständig bedeckt waren. Das Weckglas wurde mit einem Deckel versehen, so dass dieser nicht vollständig das Glas verschloss, dazu wurde zwischen dem Weckglasdeckel und dem –gefäß ein aufgerolltes Stück Papier fixiert und der Deckel mit Klebeband an dem Glas festgeklebt. Die präparierten Gläser wurden in den Exikator gestellt und die Vakuum-Pumpe angeschlossen. Es wurde für 20 min ein Unterdruck von 60-80 mbar erzeugt, dann die Vakuum-Pumpe abgeschaltet, das Manometerventil geschlossen und anschließend durch das Ziehen des Kükens an der Oberseite des Exikators der Unterdruck ruckartig ausgeglichen. Durch den entstandenen

Unterdruck in den Tabakblättern wurde die Agrobaktériensuspension beim Ausgleich über die Stomata in die Blätter hineingesogen.

Nach der Infektion wurden die Blätter mit Wasser abgewaschen und auf eine mit 2-3 Lagen angefeuchteten Filterpapier und einer Lage Whatmanpapier ausgelegten Inkubationsschale gelegt. Die Schale wurde mit einer Klarsichtfolie luftdicht verschlossen, damit die Blätter nicht austrockneten und anschließend für drei Tage bei 23°C und einem Tag- und Nachtrhythmus von 16/8h und 10000 Lux Beleuchtung in der Phytokammer inkubiert.

Die transformierten Blätter wurden direkt in den Proteinaufschluss eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zum Aufschluss gelagert.

I-YEB-Medium pH 5,6:

Nutrient Broth	0,5 % (w/v)
Yeast Extract	0,1 % (w/v)
Peptone	0,5 % (w/v)
Sucrose	0,5 % (w/v)
MES	10 mM

Nach dem Autoklavieren wurden dem auf 50°C abgekühlten I-YEB-Medium 20 µM Acetosyringon zur Aktivierung der Vir-Gene der Agrobakterien, 2 mM MgSO₄ sowie die Antibiotika Rifampizin (50 µg/ml), Carbenizillin (50 µg/ml) und Kanamycin (25µg/ml) zugegeben.

MMA-Medium pH 5,6:

MS-Salz (Murashige & Skoog, Basal Salz Mix):	0,43 % (w/v)
Sucrose	2,0 % (w/v)
MES	10 mM

Vor der Verwendung wurde dem MMA-Medium 200 µM Acetosyringon hinzugefügt.

2.7.3. Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen

Arabidopsis-Pflanzen können durch das „dipping“ der Blüten in Agrobaktériensuspension stabil transformiert werden. Die rekombinanten Agrobakterien transferieren ihre T-DNS in das sich entwickelnde weibliche Gymnoeciumgewebe von jungen Blüten ein. Durch die Selbstbefruchtung der *Arabidopsis*-Pflanzen entwickeln sich stabil transformierte Samen, die durch ein Markergen bei der Keimung selektioniert werden können.

Bei der nach DESFEUX *et al.* (2000) modifizierten Methode wurde 1 ml eines Glycerolstockes eines positiv getesteten rekombinanten Agrobakterienklones (2.2.13.2.) in 100 ml YEB (Rif, Km,Cb) für 16h mit 250 UpM bei 28°C heranwachsen gelassen und anschließend bei 4000xg und RT für 15 min sedimentiert und in 50 ml Dipping-Media

resuspendiert. 30 ml der Agrobaktériensuspension wurden in Petrischalen transferiert und die Arabidopsisblüten für 3 sec hineingetaucht. Die *Arabidopsis*-Pflanzen wurden anschließend bis zur Samenbildung bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16h/8h, 23°C, einer mittleren bis hohen Luftfeuchtigkeit und einer Beleuchtung von 10000 Lux herangezogen und die Samen nach dem Trocknen geerntet.

Dipping-Medium:

MS-Salz (Murashige & Skoog, Basal Salz Mix, Duchefa, Niederlande):	0,43 % (w/v)
Sucrose	5,0 % (w/v)
Silwent L-77 (Lehle Seeds, USA)	0,04 % (v/v)

Das Medium wurde frisch angesetzt und mit 50 µg/ml Kanamyzin versetzt.

2.7.4. Kanamyzin Selektion der Arabidopsis-Samen

Um stabil transformierte *Arabidopsis*-Samen zu selektionieren, wurden die Samen oberflächensterilisiert. Circa 10000 *Arabidopsis*-Samen (500mg) wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß 15 min auf einem Über-Kopf-Schüttler in 1 ml 70%igem (v/v) Ethanol sterilisiert und anschließend zweimal mit 99 % (v/v) Ethanol für jeweils 1 min auf einem Über-Kopf-Schüttler gewaschen, um das restliche Wasser zu entfernen. Die Samen wurden auf sterilem Whatman-Papier unter der Sterilbank getrocknet und anschließend ca. 2000 Samen pro Petrischale auf MSSA-Platten ausgesät. Die MSSA-Platten wurden nachfolgend zur Synchronisierung der Keimung für zwei Tage bei 4° inkubiert, um sie dann mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h und einer Temperatur von 25°C in der Phytokammer auskeimen zu lassen. Nach ca. 14 Tagen wurden die Platten gesichtet und die stabil transformierten Arabidopsispflanzen, welche zu starken grünen Pflänzchen herangewachsen waren, in Töpfe mit ED73 Einheitserde pikiert.

MSSA-Platen (pH 5,7):

MS-Salz	4,3 g/l
Agar	9,0 g/l

Nach dem Autoklavieren wurden 50 mg/l Kanamyzin hinzugegeben.

2.7.5. Isolierung Gesamt-löslicher Proteine aus Pflanzen

Um Pflanzenproteine zu stabilisieren, wurden die *Arabidopsis*-Blätter oder Tabakpflanzen mit flüssigem Stickstoff in einem vorgekühlten Mörser aufgeschlossen und in 1 Volumen eiskaltem Proteinextraktionspuffer aufgenommen. Das Homogenat wurde zentrifugiert (10

min/15.000xg/4°C) und der Überstand im ELISA (2.4.1.) oder Western-Blot (2.3.4.) eingesetzt.

Proteinextraktionspuffer:

Tris-HCl, pH 7,5	200 mM
EDTA	5mM
Tween-20	0,1% (v/v)
β-Mercaptoethanol	10 mM
Ascorbinsäure	10 mM

2.7.6. Isolierung genomischer DNS aus *Arabidopsis thaliana*

Um die verschiedenen Konstrukte in den stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen nachzuweisen, wurde folgende Methode angewandt: 200 mg (Frischgewicht) der jungen Blätter wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 200 µl eiskaltem Pflanzen-Extraktionspuffer transferiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und gemörsert. Ein Probenvolumen an Phenol/Chloroform (1:24) wurde zugegeben und die Probe für 5 min. bei 15000xg und RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde in einem equivalenten Volumen Isopropanol zur Präzipitation der genomischen DNS überführt und für 5 min bei 15000xg und RT pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen (10 min/15000xg/4°C), anschließend bei RT für 10 min getrocknet und in 50 µl 10mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Ein µl genomische DNS wurde zum Nachweis des Transgens in eine Kontroll-PCR (2.2.13.2.) mit den Primern pS-5' und pS-3' (Tab. 7.9) eingesetzt.

Pflanzen-Extraktionspuffer:

Tris-HCl, pH 8,0	50mM
EDTA	25mM
NaCl	250 mM
SDS	0,5% (w/v)

2.7.7. Transformation von Reis und Weizen durch „Particle Bombardment“

„Particle Bombardment“ mit Hochgeschwindigkeits Mikroprojektilen wurde erstmals von SANFORD *et al.* 1987 mit epidermalem Zwiebelgewebe beschrieben. Die ersten stabil transformierten Pflanzen wurden von CHRISTOU *et al.* 1988 und KLEIN *et al.* 1988 erzeugt. Sie verwendeten Tabak und Sojabohnen und waren in der Lage aus transgenen Zellen Pflanzen zu regenerieren und diese zur Samenausbildung zu bringen. Die Transformation von Reis und Weizen in dieser Doktorarbeit wurde nach CHRISTOU *et al.* 1991, VAIN *et al.* 1993, ALTPETER *et al.* 1996, VALDEZ *et al.* 1998, SUDHAKA *et al.*, 1998 und STOGER *et al.*, 1999 durchgeführt.

2.7.7.1. Präparation von DNS zum „Particle Bombardment“

Damit Zellen DNS aufnehmen können, muss diese an Goldpartikel gebunden werden. Dazu wurden 12,5 µl H₂O, welche 2,5 mg Goldpartikel (0,71µm) beinhalteten, in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Hinzu wurden 5 µl (1 µg/µl) des 1515 Plasmid (STOGER *et al.*, 1999) gegeben, welches das Resistenzgen für Hygromyzin trägt. 10 µl (1µg/µl) des pAHC25-Plasmids mit dem Zielgen wurden dem Gemisch hinzugefügt. Anschließend wurde der Mix mit 72,5 µl XOH-Buffer auf 100 µl aufgefüllt und gevortext. 100 µl Spermidin wurden hinzugegeben, um die DNS während der Präzipitation zu schützen, sowie 25% (w/v) PEG-6000 (100µl), welches die Bindung der DNS an die Goldpartikel verstärkte. Unter ständigem Vortexen wurde dem Gemisch von 100 µl 2,5 M CaCl₂ zugefügt und durch weitere 10 min vortexen die DNS zur Bindung an die Goldpartikel gefällt. Die Eppendorfgefäße wurden bei 13.000xg für 30 sec bei RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 ml 99% (v/v) Ethanol (13000xg/1min/RT) gewaschen. Der Überstand wurde entfernt, die an Goldpartikeln gebundene DNS in 5 ml 99% (v/v) Ethanol aufgenommen und bei -20°C bis zum Bombardment (2.7.7.2.) gelagert.

XOH-Buffer pH 7,5:

NaCl	150 mM
Tris/HCl	10 mM

2.7.7.2. Transformation von Reis

Um Reis zu transformieren, wurden die Reiskörner (*Oryza sativa*, A19) für 30 min mit 50 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen, in 50 ml 50% (v/v) Natriumhypochlorid aufgenommen und für 15 min in ein Ultraschallbad sowie für 15 min auf einen Rührer (150 UpM) gestellt. Der Überstand wurde dekantiert und die Samen einmal mit 100 ml sterilem H₂O gewaschen. Zur Vermeidung von Pilzinfektionen wurden die Samen in 50 ml des Fungizids Barvistin DF (BASF) (2 mg/ml) für 3 min unter Rühren (150 UpM) inkubiert. Die Samen wurden dreimal mit sterilem H₂O gewaschen und unter der Sterilbank auf sterilem Filterpapier für 15 min getrocknet. Danach wurden die Reissamen mit dem Embryo nach oben auf MS 2.4-D Medium-Platten gelegt und im Dunkeln bei 24°C inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die gebildeten Sprosse mit einer Pinzette entfernt, die Embryonen mit dem Skutellum nach oben auf MS 2.4 D Medium-Petrischalen transferiert und für einen weiteren Tag ohne Licht bei 24°C temperiert.

Am nächsten Tag erfolgte das Bombardment der Embryos mit der Fremd-DNS, welche aus dem Plasmid 1515 für den Resistenzmarker und dem Zielgen enthaltenem pAHC25 Plasmid

bestand (2.7.7.1.). Dazu wurden die Embryonen für 4 h in 4 cm² großen Bereichen auf MS Osm Medium-Platten transferiert. Dieses Medium enthielt in hohen Konzentrationen Manitol und Sorbitol, um aus den Reiseumbrionen Wasser zu entziehen und dadurch den Turgor zu senken (VAIN *et al.*, 1993).

Das Bombardment erfolgte mit einem „BioRad PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery System“ (BioRad) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden 8000 kPa und 25 Hg bei jedem Beschuss gewählt. Das Innere der Apparatur so wie alle mit der DNS bzw. den Embryos in Kontakt kommenden Verbrauchsmaterialien wurden in 70% (v/v) Ethanol für 15 min sterilisiert, anschließend in 99% (v/v) Ethanol getaucht und unter der Sterilbank getrocknet.

160 µl der mit DNS behafteten Goldpartikel-Lösung (2.7.7.1.) wurden je Bombardment eingesetzt. Vier Stunden nach der ersten Bombardment der Embryonen wurden sie unter den gleichen Bedingungen ein zweites Mal bombardiert, um die Transformationsrate zu erhöhen. Zur Proliferation wurden die Embryonen auf MD 2,4-D Medium-Platten transferiert und vier Tage bei 24°C im Dunkeln inkubiert, bevor die Selektion auf Hygromyzin resistente Zellen gestartet wurde (2.7.7.3.).

2.7.7.3. Anzucht transformierter Reispflanzen

Um die stabil transformierten embryonalen Reiszellen zu selektionieren, wurde der Selektionsmarker Hygromyzin, der sich auf dem zweiten Plasmid 1515 befindet, verwendet. Dazu wurden die Embryos 4 Tage nach der Bombardierung auf MS Hg30 Mediumplatten transferiert und im Dunkeln bei 24°C inkubiert. Alle drei Wochen wurden die Embryonen überprüft, ob sich Kalli gebildet hatten und gegebenenfalls umgesetzt. Absterbendes, schwarzes Gewebe wurde entfernt und sich gut entwickelnde weiße Kalli auf REGM6-Mediumplatten transferiert. Die Kalli wurden bei 24°C belichtet (10000 Lux) bis sich nach ca. 2-3 Wochen Blätter und Wurzeln ausbildeten. Danach wurden die kleinen Reispflanzen in MSM6 Medium-Reagenzgläser umgesetzt und für weitere 2 Wochen bei 24°C und 10000 Lux inkubiert. Die angewurzelten Reispflanzen wurden in Einheitserde ED73 mit 50 % (w/w) Sandanteil eingepflanzt und bei 28°C/24°C Tag/Nacht, 76%/72% Tag/Nacht relativer Luftfeuchtigkeit mit einer Photoperiode von 12h bei 10000 Lux kultiviert.

Tab. 2.4.: Medien zur Transformation, Selektion und Anzucht der transformierten Reispflanzen:

	Proliferation MS 2.4-D	Osmotikum (0,4 M) MS Osm	Selektions- medium MS Hg30	Regenerations- Medium REGM6	„rooting“ MSR6
MS-Medium*	4,4 g/L	4,4 g/L	4,4 g/L	4,4 g/L	4,4 g/L
Fe-EDTA	36 mg/L	36 mg/L	36 mg/L	36 mg/L	36 mg/L
Sucrose	20 g/L	20 g/L	20 g/L	4,4 g/L	10 g/L
Manitol	15 g/L	36,4 g/L	15 g/L	-	-
Sorbitol	15 g/L	36,4 g/L	15 g/L	-	-
Maltose	-	-	-	30 g/L	-
2,4-D	2 mg/L	2 mg/L	2 mg/L	-	-
Agarose	6 g/L	6 g/L	6 g/L	-	-
Phytigel	-	-	-	3 g/L	2 g/L
Bacto Agar	-	-	-	-	4 g/L

Der pH-Wert wurde bei allen Medien mit KOH auf pH 5,8 eingestellt und gegebenenfalls die folgenden tabellarisch aufgeführten Substanzen sterilfiltriert nach dem Autoklavieren hinzugefügt:

NAA	-	-	-	0,5 mg/L	-
Kinetin	-	-	-	2 mg/L	-
Hygromyzin	-	-	30 mg/L	30 mg/L	30 mg/L

*Murashige und Skoog Medium Micro und Macro Elemente inkl. Vitaminen wurden von Duchefa (Niederlande) bezogen.

2.7.7.4. Transformation von Weizen

Um Weizen zu transformieren, mussten Weizenpflanzen bis zur Kornbildung herangezogen werden. Dazu wurde *Triticum aestivum* bei 12°C/15°C (Tag/Nacht) im Gewächshaus mit einer zehnstündigen Photoperiode (10000 Lux) für 40 Tage inkubiert und anschließend die tägliche Belichtungszeit auf 16 h (10000 Lux) und die Temperatur auf 21°C/18°C (Tag/Nacht) für weitere 8 Wochen erhöht. Nicht vollaussgereifte Weizenähren wurden geerntet, ca. 1000 Körner präpariert und diese in 100 ml 20% (v/v) Natriumhypochlorid für 10 min unter Rühren (150 UpM) sterilisiert. Die Körner wurden dreimal mit 100 ml sterilem destilliertem H₂O gewaschen, die Stecknagelkopf großen Embryonen mit zwei Pinzetten unter dem Mikroskop präpariert, mit dem Skutellum nach oben auf MS 2.4-D Mediumplatten transferiert und bei 24°C im Dunkeln inkubiert. Nach drei bis vier Tagen erfolgte das Bombardment der Embryonen analog zur Reistransformation (2.7.7.2.). Die Kopplung der Plasmid-DNS (pAHC25-Plasmid) an die Goldpartikel erfolgte analog zu 2.7.7.1.. Es wurde jedoch kein Hygromyzin-Resistenz induzierendes Co-Plasmid 1515 verwendet. Die Selektion der transformierten Weizenembryozellen erfolgte durch Phosphinotrizin (PPT), dessen

Resistenzgen sich auf pAHC25 befindet. Nach dem zweiten Bombardment wurden die Embryonen auf MS 2.4-D Mediumplatten transferiert. Die Selektion auf stabil transformierte Weizenpflanzen wurde am JIC Norwich (England) von Dr. Eva Stöger durchgeführt.

2.7.8. Arabidopsis Resistenztests

Um Resistenzteste durchführen zu können, wurden F2-*Arabidopsis*-Pflanzen bis zu einer Größe von 5 Zentimeter großen Blättern herangezogen (4-5 Wochen nach der Aussaat). Diese wurden mit einer Sporensuspension von 1×10^5 Sporen/ml (*F. oxysporum* f.sp. *matthiola*), welche in PDB (Potato dextrose broth, DIFCO, Detroit, USA) gelöst waren, an drei aufeinanderfolgenden Tagen während der Dunkelperiode benetzt. Die Inkubation der *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12h/12h, 23°C, einer mittleren bis hohen Luftfeuchtigkeit und einer Beleuchtung von 10000 Lux. Die Pflanzen wurden vor der Inokulation und 1,5, 2 und 3 Wochen danach photographisch dokumentiert.

2.8. Mikroskopische Analysen

Zum Nachweis der scFv-Bindung wurden zusätzlich zum Immunoblot (2.3.4.) und ELISA (2.4.1.1.) Analysen mittels der durch Fluoreszenz- bzw. konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt. Durch fluoreszenzmarkierte mAk kann festgestellt werden, an welchen Stellen die durch das „Phage Display“ gewonnenen scFvs am Pilz binden und dadurch können Rückschlüsse auf das Antigen gezogen werden. Die konfokale Lasermikroskopie macht es möglich, dreidimensionale Strukturen, welche durch den scFv detektiert werden, zu evaluieren.

2.8.1. Präparation der Deckgläser

Um die Deckgläser mit den Pilzantigenen zu beschichten, wurden diese mit Lauge gesäubert und anschließend mit Poly-L-Lysin überschichtet. Dazu wurden runde Deckgläser für 2 Stunden in 2 M NaOH inkubiert, dreimal mit Milli-Q H₂O gewaschen und anschließend in 70% (v/v) Ethanol aufbewahrt. Um die Deckgläser mit Poly-L-Lysin zu bedecken, wurden diese getrocknet und für 3 sec in Poly-L-Lysin-Lösung (500µg/ml) getaucht, für 10 min bei RT inkubiert und dreimal mit sterilem Milli-Q H₂O gewaschen. Die mit Poly-L-Lysin überdeckten Deckgläser wurden zum Beschichten der Antigene (2.8.3.) eingesetzt.

2.8.2. Antigenpräparation zur Fluoreszenzmikroskopie

Zur Vorbereitung der Proben für die Mikroskopie wurden 1×10^5 Sporen/ml in 10 ml PDB (Potato dextrose broth, DIFCO, Detroit, USA) für 16h bei 28°C inkubiert bzw. 1×10^5 Sporen/ml für 3 Tage in 10 ml PDB bei 28°C unter Schütteln (225 UpM) heranwachsen gelassen. Die ausgekeimten Sporen und das Pilz-Myzel wurden dreimal mit jeweils 10 ml sterilem PBS gewaschen (5 min/4000xg/RT), um Medienreste und sekretierte Proteine zu entfernen, und zum Beschichten der Deckgläser verwendet (2.8.3.).

2.8.3. Beschichten von Deckgläsern mit Pilz-Antigenen

Vertiefungen der 12-Well Zell- und Gewebekulturplatten (Fisher Scientific GmbH) wurden bis zum Rand mit PBS 2% (w/v) BSA gefüllt und für 2 h bei 37°C inkubiert, um nicht spezifische Bindungsstellen zu blockieren, und anschließend dreimal mit PBS Tween 0,05 % (v/v) gewaschen. In die 12-Well Zell- und Gewebekulturplatten wurden mit einer Pinzette die mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläser gelegt. Jeweils 1 ml der ausgekeimten Sporen des Pilz-Myzels (2.8.2.) bzw. 50 mg/ml CWP in PBS wurden auf die vorbereiteten Deckgläser (2.8.1.) pipetiert und die Platte in einer ELISA-Zentrifuge (Rotina 35, Hettich) zentrifugiert (15 min/2000xg/RT), um die Antigene in das Poly-L-Lysin einzubetten. Der Überstand wurde abgenommen, die Deckgläser vorsichtig dreimal mit PBS Tween 0,05 % (v/v) gewaschen und 250 µl Maus α c-myc mAk (1:3000) in die Vertiefungen pipetiert und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Deckgläser vorsichtig mit PBS Tween 0,05% (v/v) gewaschen, der 1:100 verdünnte fluoreszenzmarkierte Ziege α IgG AB Alexa FlourTM 568 (578/603) (H+L) zugegeben (250 µl/Vertiefung) und die Platte für 1 h in den 37°C Inkubator gestellt. Danach folgten weitere drei Waschschrte mit PBS Tween 0,05% (v/v).

2.8.4. Fluoreszenzmikroskopie

Die präparierten Deckgläser (2.8.3.) wurden mit den eingebetteten Antigenen nach unten auf einen Objektträger gelegt und mit klarem Nagellack rundherum fixiert, um das Austrocknen der Proben zu vermeiden. Zum Mikroskopieren wurde ein Leica DM R Fluoreszenzmikroskop verwendet, das mit einer 100 Watt stabilisierten Quecksilber-Xenon Anregungslampe und einem LUDL Anregungsfilter Kontrollsystem ausgestattet war. Als Kamera diente eine „Photometric sensys cooled charge coupled device camera“ mit einem binokularem Kopfstück. Die Belichtungszeit betrug 250 msec und die entstandenen Daten wurden mit Hilfe des Programmes „Universal Imaging Metaview Software“ verarbeitet und in 8-bit-TIFF Dateien abgespeichert.

2.8.5. Konfokale Lasermikroskopie

Die Proben wurden, wie unter 2.8.4. beschrieben, vorbereitet. Um an der Pilz-Oberfläche bindende scFvs und AFP-scFvs zu verifizieren und dreidimensionale Strukturen darstellen zu können, wurden Daten mit dem konfokalen DM RE Laser Mikroskop von Leica aufgezeichnet. Zum Bearbeiten der Daten wurde die mitgelieferte Software „LEICA TCS image reconstruction software“ verwendet. Bilder wurden in 8-bit TIFF-Format exportiert und Filmsequenzen in Videoclip-Format gespeichert.

3. Ergebnisse

3.1. Überblick

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung von rekombinanten Antikörpern (rAk) und rAk-Fusionsproteinen gegen *F. graminearum* sowie deren Expression in transgenen Pflanzen zur Herstellung pilzresistenter Pflanzen. Dazu sollten scFv-Fragmente isoliert werden, welche auf der Pilz-Oberfläche binden. Diese pilzspezifischen scFvs sollten entweder direkt oder als Fusion mit antifungalen Peptiden oder Proteinen (AFPs) in transgenen Pflanzen akkumuliert werden und deren Effektivität bezüglich *Fusarium* evaluiert werden.

Ein entscheidendes Kriterium zur Isolierung hochspezifischer Antikörper ist die Wahl eines geeigneten Antigens. Da von Fusarien noch keine Targetmoleküle bekannt sind, die für die Pathogenität des Pilzes verantwortlich sind, wurden folgende pilzliche Präparationen als Antigen zur Immunisierung von Mäusen und Hühnern (3.3.) ausgewählt: pilzliche Zellwandproteine („cell wall proteins“ = CWP), ausgekeimte Sporen („spores germinated“ = SG) und „Fresh plate culture proteins“ (FPCWP) (3.2.). Aus den Milzzellen immunisierter Tiere wurde die Gesamt-RNS und mRNA isoliert (3.5.1.), cDNS synthetisiert (3.5.2.), die V_H- und V_L-Domänen der Ak amplifiziert (3.5.2.) und zu scFv-Bibliotheken zusammengefügt (3.5.3.). Anschließend wurden aus den Phagenbibliotheken spezifische scFvs gegen die verschiedenen Antigene CWP, SG, FPCWP und dem *F. graminearum* Toxin 15-O-Acetyl-4-deoxynivalenol (DON) im „Phage Display“ isoliert (3.6.). Nach der Charakterisierung der scFvs mittels Sequenzierung (3.7.1.), ELISA (3.7.2.) und Immunoblot (3.7.4.) wurden die identifizierten scFvs mit unterschiedlichen AFPs fusioniert und sowohl in *E. coli* (3.8.2.) als auch transient in Tabak (3.8.4.) und stabil in *Arabidopsis* (3.10.) exprimiert. Der inhibitorische Effekt der scFvs und scFv-AFP Fusionsproteine auf Fusarien wurde *in vitro* verifiziert (3.9.) und mit den scFvs und scFv-Fusionsproteinen wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, um deren Bindung an den Keimschlauch zu charakterisieren (3.7.5., 3.8.3.). In den stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden die integrierten DNS-Konstrukte *via* PCR (3.10.3.) und die Akkumulation der rekombinanten Proteine anhand eines Immunoblots (3.10.5.) überprüft. Abschließend wurden Resistenztests mit den stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen durchgeführt (3.10.2.), um zu evaluieren, ob die scFvs bzw. scFv-AFP Fusionsproteine produzierende

Pflanzen eine Resistenz gegen *Fusarium* vermitteln und welche der gewählten Strategien bzw. Konstrukte am effektivsten war.

3.2. Isolierung von *F. graminearum* Antigenen

Die Gewinnung von geeigneten Antigenen zur Immunisierung von Hühnern und Mäusen war der erste Meilenstein dieser Arbeit, und die Auswahl und Qualität der pilzlichen Antigene war ein wichtiges Kriterium für die Selektion spezifischer rAk, die zu dem gewünschten biologischen Effekt, der Inhibierung von Fusarien, führen sollte. Die Antigene sollten sich auf der Pilzoberfläche befinden, sollten leicht zu isolieren und stabil sein, eine Immunantwort hervorrufen können, im ELISA einsetzbar und reproduzierbar in großen Mengen erzeugt werden können. Hierzu wurden die Antigene CWP, SG und FPCWP, welche von *F. graminearum* isoliert wurden, verwendet.

Da die Keimungsrate und Infektiösität der *Fusarium*-Sporen sowohl nach der Lagerung bei 4°C, -20°C und -80°C mit und ohne Glycerol signifikant zurückging, wurden *Fusarium*-Sporen immer frisch in CM-Medium herangezogen (2.3.7.1.). Bei der Herstellung von CWP konnten aus einem Liter Czapek Dox Flüssig-Medium 2,8 g (Frischgewicht) *F. graminearum* CWP isoliert werden, welche einem Trockengewicht von 1,5 g entsprachen (2.3.7.3.). Wurden von den CWP die nicht kovalent gebundenen Proteine durch SDS und β -Merkaptoethanol-Behandlung entfernt (CWPWCBP) (2.3.7.4.), verringerte sich das Trockengewicht von 1,5 g auf die Hälfte (0,75g). Sowohl das Antigen SG (2.3.7.2.) als auch FPCWP (2.3.7.5.) wurden zur Immunisierung der Mäuse (2.5.1.) und Hühner (2.5.2.) als auch zur Verwendung in ELISA-Test 2.4.1.1. frisch hergestellt. Eine Makro- und Mikroskopische Darstellung einzelner Antigene von *F. graminearum* sind in der Abb. 3.1. zu sehen. Die FPCWP wurden von einer mit *F. graminearum* bewachsenen PDA-Platte (Abb. 3.1.A) durch umspülen der Hyphen isoliert. Dabei war die Konzentration an Oberflächenproteinen so gering, dass diese nicht durch ein SDS-Gel mit Coomassie-Blau-Färbung sichtbar gemacht werden konnten (Abb. 3.2.). Die Sporulation, das Auskeimen und junges Myzel von *F. graminearum* ist ebenfalls anhand der Bilder aus Abb. 3.1. ersichtlich. Zusätzlich ist auch die physiologische Struktur der Antigene CWP und CWCBP zu erkennen. Das auf ein SDS-Gel aufgetragene Antigen CWP ist nur in Form einer Bande bei ca. 55 kDa zu sehen. Andere Banden waren zu erkennen konnten jedoch aufgrund der geringen Konzentration nicht dokumentiert werden. Auf eine Aufkonzentrierung der Antigene wurde verzichtet, da diese in einem möglichst nativen Zustand zur Immunisierung der Hühner und Mäuse eingesetzt werden sollten.

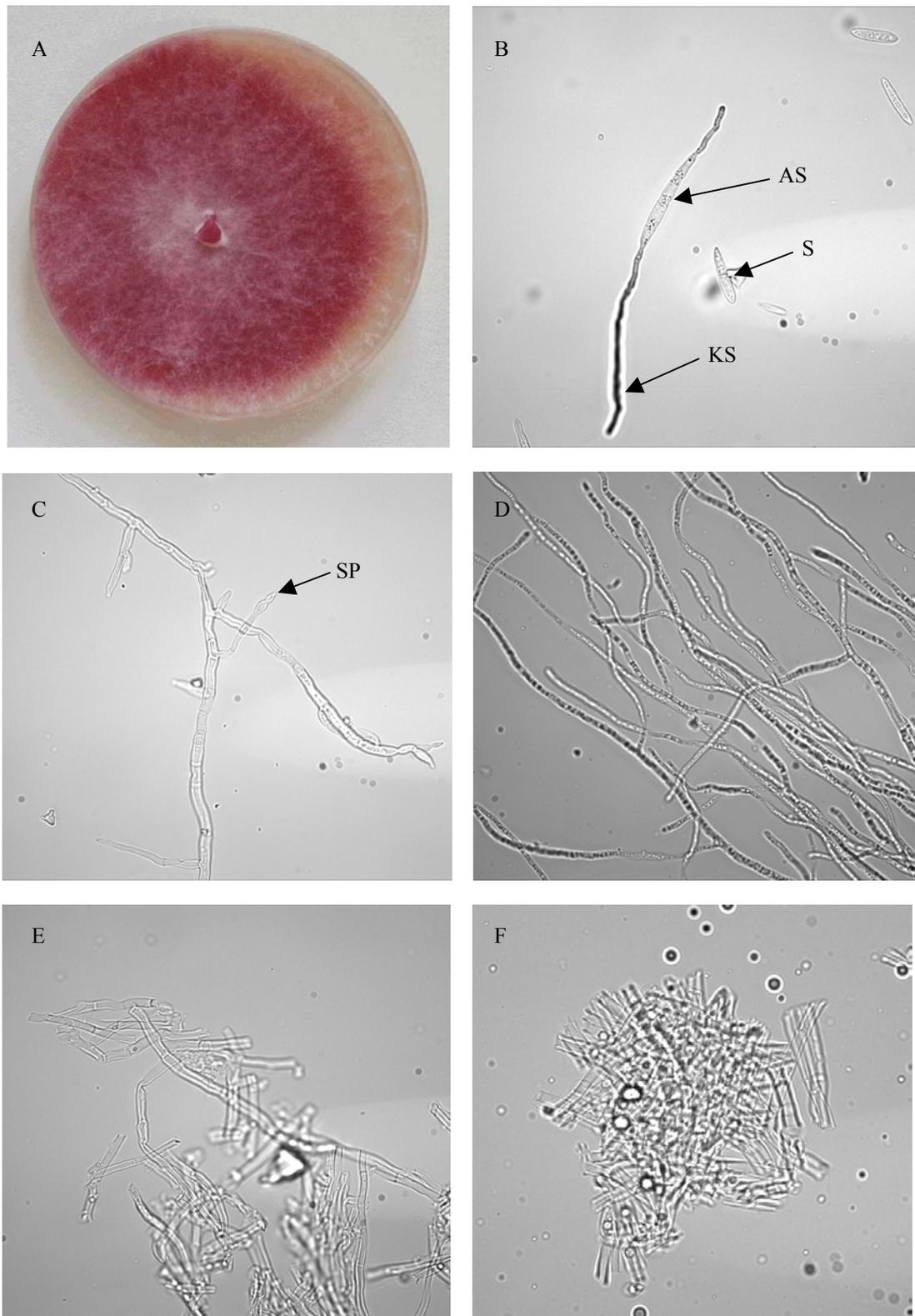


Abb. 3.1.: Makro- und Mikroskopische Darstellung von *F. graminearum* Antigenen.
 A = *F. graminearum* nach einer Woche Wachstum auf PDA-Platte, B = Ausgekeimte Spore nach 8 Stunden in PDB, C = junges *F. graminearum* Myzel und Ausbildung von Sporen nach 2 Tagen in CM-Medium, D = junges *F. graminearum* Myzel nach 2 Tagen in PDB-Medium, E = *F. graminearum* Zellwände nach dem Entfernen von Cytosol durch Waschen (CWP, 2.3.7.3.), F = *F. graminearum* Zellwände (CWCBP) nach der Behandlung mit SDS und β -Merkaptoethanol (2.3.7.4.).

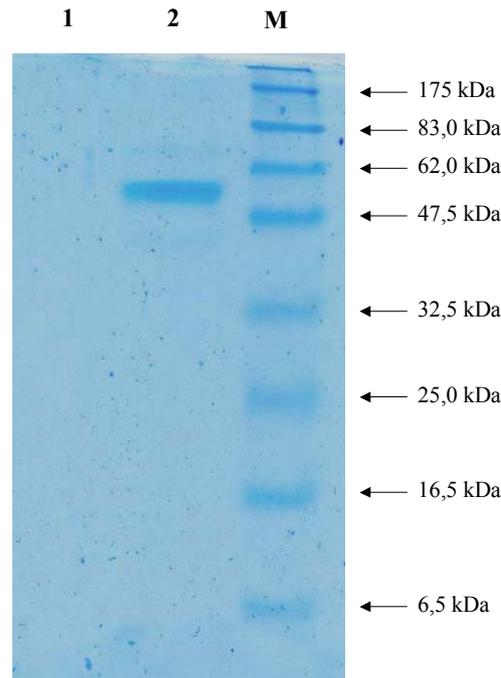
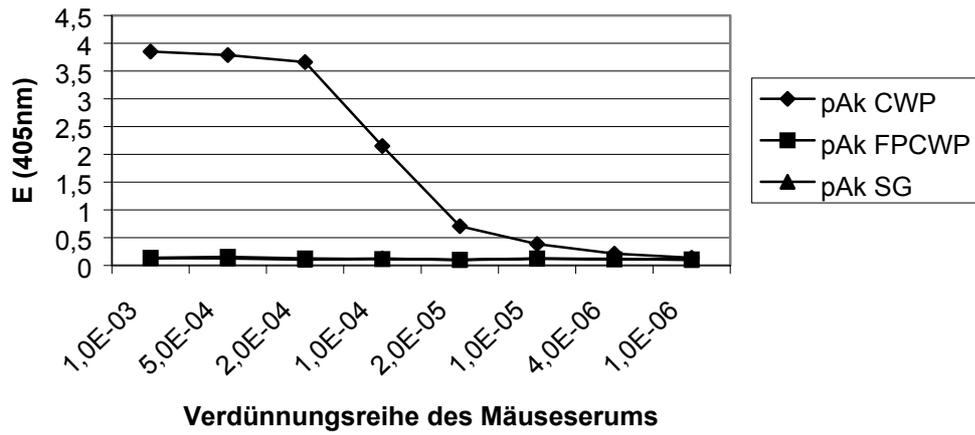


Abb. 3.2.: Elektrophoretische Auftrennung von FPCWP und CWP im SDS-PAA-Gel. Die Isolierung der FPCWP und CWP erfolgte wie unter 2.3.7.3. und 2.3.7.5. beschrieben. Die Antigene wurden ungereinigt mit einem Marker auf ein 14%-iges (SDS-PAA-Gel (2.3.3.) aufgetragen: M = „Prestained“-Protein-Marker (NEB) (5 μ l); Spur 1 = FPCWP (20 μ l); Spur 2 = CWP (20 μ l). Die Färbung erfolgte mittels Coomassie-Blau (2.3.3.).

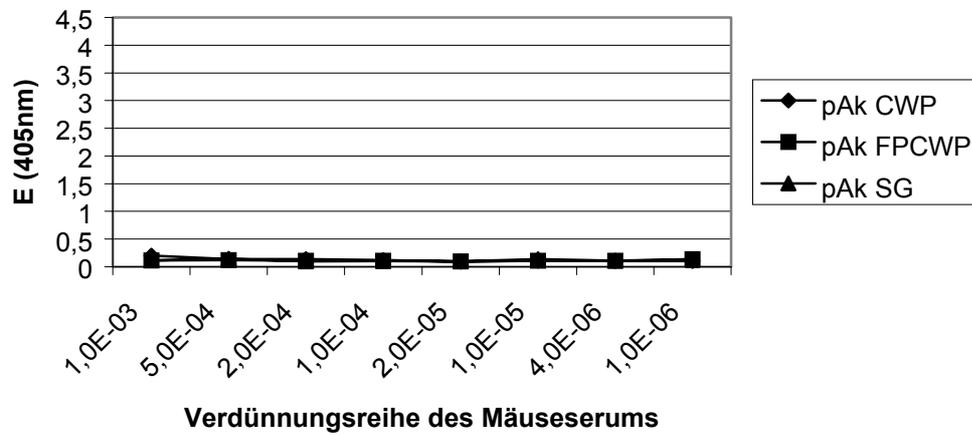
3.3. Immunisierung und Titerbestimmung

Um scFv-Bibliotheken aus den Mäuse- und Hühnermilzen herstellen zu können, wurden diese wie unter 2.5.1. und 2.5.2. beschrieben immunisiert und der Titer bestimmt. Dazu wurden die Eier der Hühner am sechsten Tag nach der dritten Injektion gesammelt, die IgY Ak aus dem Eigelb aufgereinigt und deren Titer ermittelt (2.5.3.; 2.5.4.). Dabei lagen die Ausbeuten zwischen 3,7 und 5,7 mg IgY pro ml Eidotter. Die Mäuse wurden 7 Tage nach der dritten Immunisierung geopfert und dabei Blut zur Titerbestimmung abgenommen (2.5.4.). Wie aus den Graphen der Abb. 3.3. zu entnehmen ist, reagierten die murinen pAk nur mit CWP. Bei den Mäuse-Seren der mit FPCWP und SG immunisierten Mäuse konnte keine Immunreaktion festgestellt werden. Eine Kreuzreaktion der murinen pAk mit den nicht immunisierten Pilz-Antigenen ist nicht zu beobachten. Die avianen pAk der mit CWP, FPCWP und SG immunisierten Hühner reagieren bis zu einer Verdünnung von 2×10^{-5} sowohl gegen die immunisierten Antigene als auch gegen die nicht in das jeweilige Huhn injizierten Pilz-Antigene.

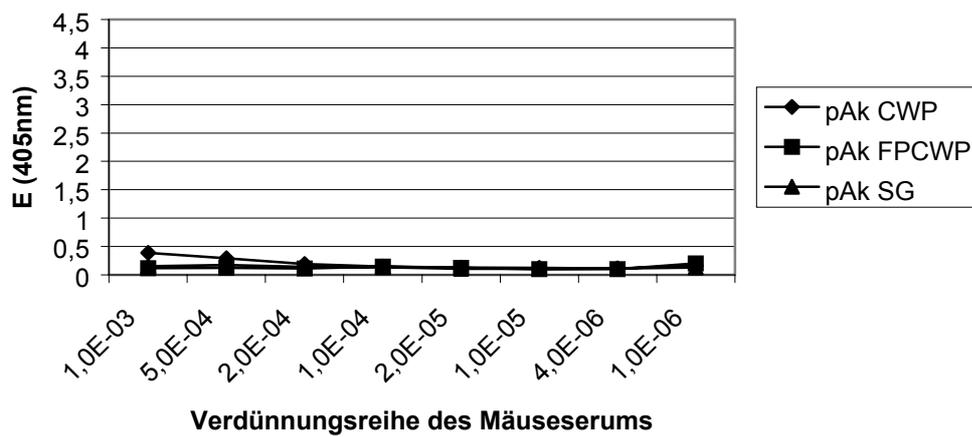
A



B



C



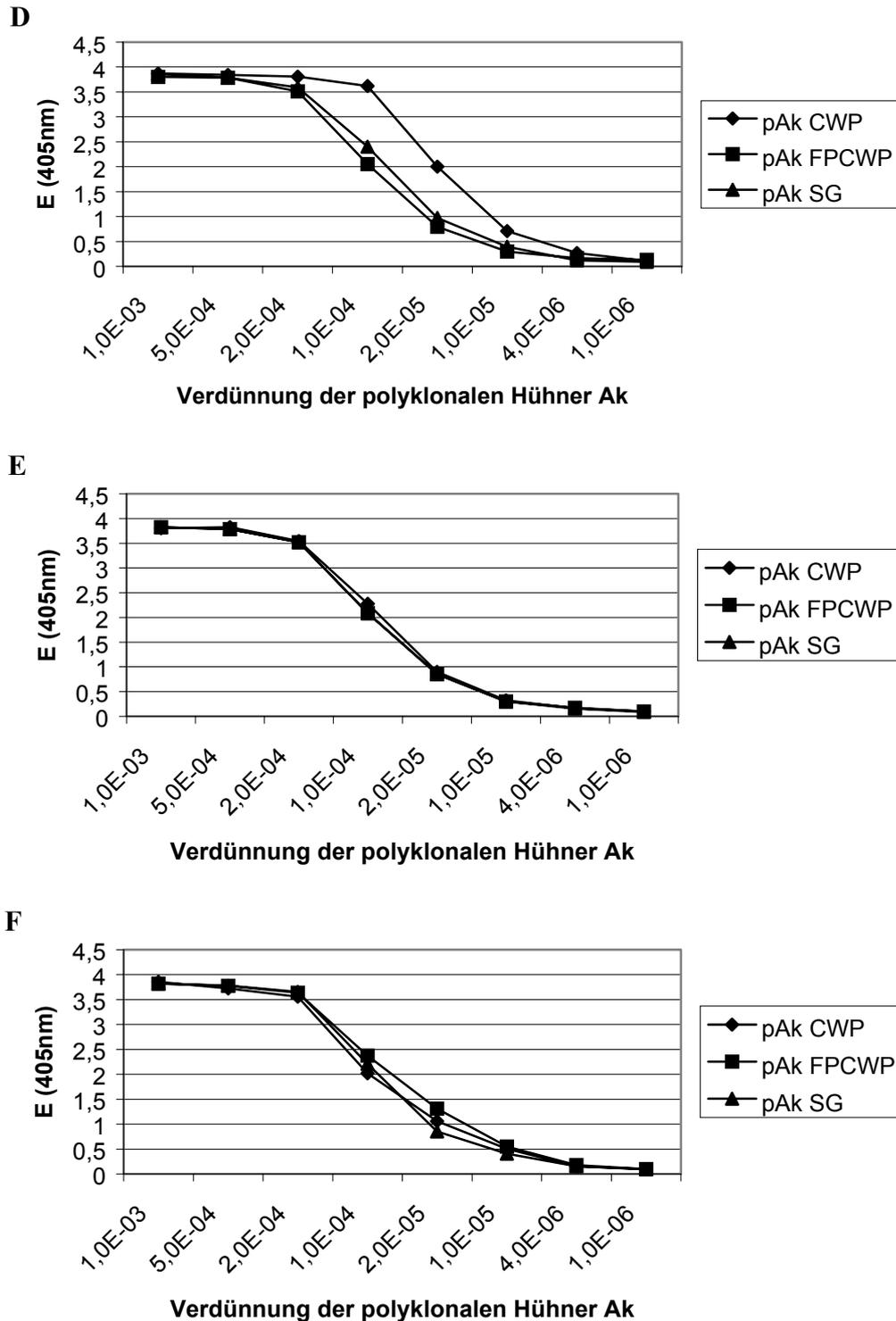


Abb. 3.3.: Reaktivität polyklonaler Ak aus Hühnereigelb und Mäuseseren gegen verschiedene pilzliche Antigene im ELISA. Die Extinktion (405nm) wurde gegen die Verdünnung der pAk aufgetragen. In den Graphen A und D wurden CWP (200 μ g/ml), in den Graphen B und E FPCWP und in den Graphen C und F SG (1×10^5 Sporen/ml) zur Beschichtung der ELISA-Platten verwendet. Die murinen pAk-Seren wurden in der angegebenen Verdünnung aufgetragen. Die avianen pAk der Eier, welche die immunisierten Hühner am 6 Tag gelegt hatten, wurden von einer 1 mg/ml ausgehenden pAk-Suspension entsprechend den angegebenen Verdünnungen verwendet. Die Detektion im ELISA erfolgte durch den Maus anti c-myc (1:5000) und anschließender

ZAM Fc-spezifischen AP-markierten Ak-Inkubation (1:5000) (2.4.1.1.). Als AP-Substrat wurde p-Nitrophenyl-Phosphat verwendet und die Extinktion bei 405 nm nach einer Stunde Inkubation gemessen. Als Negativ- Kontrolle wurde RSA verwendet, gegen das keine Kreuzreaktivität mit den getesteten Ak-Seren auftrat.

3.4. Klonierung der variablen Domänen der Immunglobulingene in das Phagemid pHENHi

Obwohl die Titerwerte der Mäuse, welche mit den Antigenen FPCWP und SG immunisiert wurden im Gegensatz zu den Titerwerten der Hühner und der mit CWP immunisierten Maus keine vielversprechenden Ergebnisse zeigten, wurde von diesen Mäusen ebenfalls cDNS hergestellt, da dies die stabilste und eine leicht zu lagernde Form der murinen Bibliotheken darstellte. Der recht geringe Arbeitsaufwand favorisierte diese Art der Lagerung im Gegensatz zur instabilen Lagerung als Milzzellen, bei deren Auftauen große Mengen der mRNA degradieren. Daraufhin wurde zur Klonierung der variablen Domänen der Immunglobulingene in das Phagemid pHENHi (3.5.) aus den Milzzellen der Hühner und der Mäuse Gesamt-RNS isoliert (3.4.1.) und die polyA⁺-mRNA mit Hilfe von Oligo-dT-Zellulose angereichert (3.4.1.) und diese durch Reverse Transkription in cDNS umgeschrieben (3.4.2.). Aus der cDNS der mit CWP immunisierten Maus und aus den Hühner cDNS wurde nach Zugabe spezifischer V_H- und V_L-Primer, welche Restriktionschnittstellen beinhalteten, die V_H- und V_L-Domänen amplifiziert (3.4.2.). Diese wurden über Restriktionschnittstellen in den Vektor pHENHi ligiert (3.4.3.) und die Komplexität der scFv-Bibliotheken durch PCR mit anschließendem „finger printing“ überprüft (3.4.4.).

3.4.1. Gesamt-RNS- und mRNA-Isolierung

Aus den Milzzellen der durch die Antigene CWP, FPCWP und SG immunisierten Hühner und Mäuse wurde die Gesamt-RNS mit Hilfe des „RNeasy Midi-Isolierungskits“ (Qiagen) isoliert (2.2.10.). Die erfolgreiche Isolierung der Gesamt-RNS wurde durch Agarosegelelektrophorese (2.2.3.) überprüft, welche in Abb. 3.4. und Abb. 3.5. dargestellt ist. Die höchste Konzentration an Gesamt-RNS befand sich in den Eluaten 2 für CWP und FPCWP sowie im Eluat 1 für SG bei der avianen RNS (Abb. 3.4.) bzw. für die Antigene CWP, FPCWP und SG in den Eluaten 2 bei der murinen RNS (Abb. 3.5.). Es wurden 30µl der jeweiligen RNS in die mRNA Isolierung übernommen, welche mit Hilfe des „Oligotex mRNA-Mini-Isolierungskits“ (2.2.11.) durchgeführt wurde.

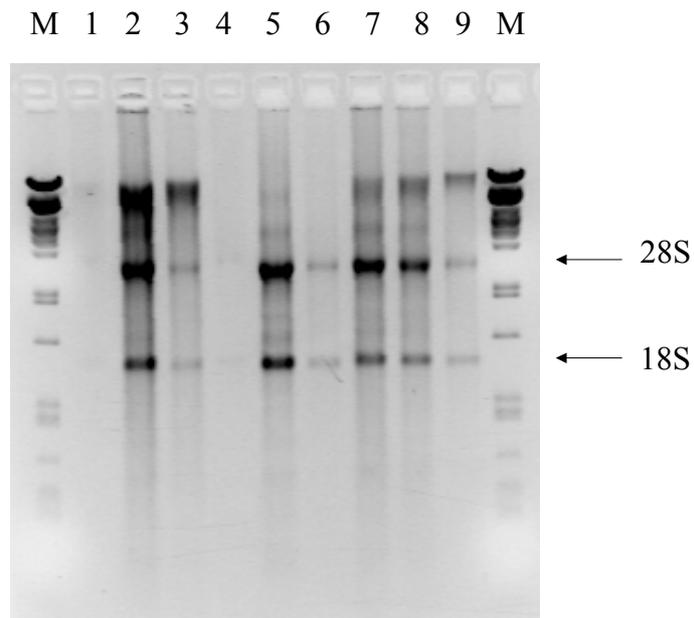


Abb. 3.4.: Inverse Darstellung der avianen Gesamt-RNS-Isolierung nach Auftrennung im Agarosegel. Die Gesamt-RNS aus Hühnermilzzellen wurde mit dem „RNeasy Midi-Isolierungskit“ (Qiagen) isoliert (2.2.10.). 5 μ l der Gesamt-RNS-Eluate + 5 μ l 50%igen (v/v) Glycerol wurden auf ein 1,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.). Folgende Proben wurden aufgetragen: M = λ -PstI-Marker (500 ng); Spur 2 = RNS-Eluat 1 vom Huhn CWP; Spur 3 = RNS-Eluat 2 vom Huhn CWP; Spur 4 = RNS-Eluat 3 vom Huhn CWP; Spur 5 = RNS-Eluat 1 vom Huhn FPCWP; Spur 6 = RNS-Eluat 2 vom Huhn FPCWP; Spur 7 = RNS-Eluat 3 vom Huhn FPCWP; Spur 8 = RNS-Eluat 1 vom Huhn SG; Spur 9 = RNS-Eluat 2 vom Huhn SG; Spur 10 = RNS-Eluat 3 vom Huhn SG. Die Bezeichnungen 18S und 28S weisen auf die Banden der 18S-rRNS und 28S- rRNS hin.

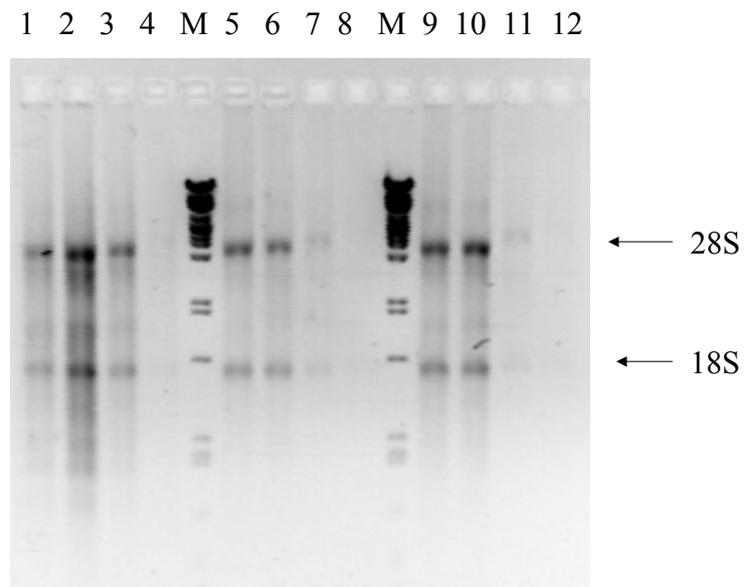


Abb. 3.5.: Inverse Darstellung der murinen Gesamt-RNS-Isolierung nach Auftrennung im Agarosegel. Die Gesamt-RNS aus Mäusemilzzellen wurde mit dem „RNeasy Midi-Isolierungskit“ (Qiagen) isoliert (2.2.10.). 5 µl der Gesamt-RNS-Eluate + 5 µl 50%igen (v/v) Glycerol wurden auf ein 1,8%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.). Folgende Proben wurden aufgetragen: M = λ -PstI-Marker (500 ng); Spur 1 = RNS-Eluat 1 von der Maus CWP; Spur 2 = RNS-Eluat 2 von der Maus CWP; Spur 3 = RNS-Eluat 3 von der Maus CWP; Spur 4 = RNS-Eluat 4 von der Maus CWP; Spur 5 = RNS-Eluat 1 von der Maus FPCWP; Spur 6 = RNS-Eluat 2 von der Maus FPCWP; Spur 7 = RNS-Eluat 3 von der Maus FPCWP; Spur 8 = RNS-Eluat 4 von der Maus FPCWP; Spur 9 = RNS-Eluat 1 von der Maus GS; Spur 10 = RNS-Eluat 2 von der Maus GS; Spur 11 = RNS-Eluat 3 von der Maus GS; Spur 12 = RNS-Eluat 4 von der Maus GS; 18S = 18S-rRNS; 28S = 28S-rRNS.

3.4.2. cDNS-Synthese und Amplifikation von V_H- und V_L-Domänen

Die cDNS-Synthese (2.2.12.) erfolgte mit dem „SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis“ Kit von Gibco BRL (Karlsruhe) und den entsprechenden Erststang-cDNS-Primern. Für die aviane mRNA wurden der Primer ChicVHM, der sich ca. 250 Bp abwärts vom D-J-Element der Schwere Kette anlagert, und der Primer ChicVLM, der sich ca. 330 Bp abwärts vom J-Element der Leichten Kette anlagert, verwendet (Tab. 7.3.). Für die murine mRNA wurden der Primer COH30, der sich an die variable Region der Schwere Kette der IgG₁ Ak-Subfamilie anlagert, der Primer COH32, der sich an die C_{H1}-Domäne der Schwere Kette der Subfamilien IgG_{2a/b} anlagert und der Primer MuPD3, der sich an die C_{H1}-Domäne der Leichten Kette Ig κ anlagert, eingesetzt (Tab. 7.2.). Die murine Leichte λ -Kette wurde nicht in cDNS umgeschrieben, da diese nur zu einem geringen Prozentsatz in der Maus vorkommt und folglich vernachlässigbar war. Die nachfolgende Amplifikation der V_H- und V_L-Domänen (2.2.13.1.) wurde ebenfalls mit Hilfe spezifischer unterschiedlicher avianer und muriner Primersätze (Tab. 7.4.; 7.5.; 7.6.; 7.7.; 7.8.) durchgeführt, an deren Enden sich Restriktionsschnittstellen befanden, um die anschließende Klonierung in den pHENHi Vektor zu gewährleisten. Die V_H- und V_L-Domänen der murinen cDNS Banken FPCWP und SG wurden nicht amplifiziert, da diese bei der Bestimmung des Titors ein wenig vielversprechendes Ergebnis lieferten und folglich ein „Phage Display“ mit den resultierenden scFv Bibliotheken geringe Erfolgsaussichten bot. Die aviane cDNS der mit CWP, FPCWP und SG immunisierten Hühner wurden separat amplifiziert.

Die amplifizierten V_H- und V_L-Domänen wurden auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.). Im Gel waren 400 Bp große Banden zu erkennen, welche die erfolgreiche V_H- und V_L-Amplifikation bestätigten (2.10.1.). Dies ist exemplarisch an den amplifizierten avianen V_H- und V_L-Domänen in Abb. 3.6 dargestellt.

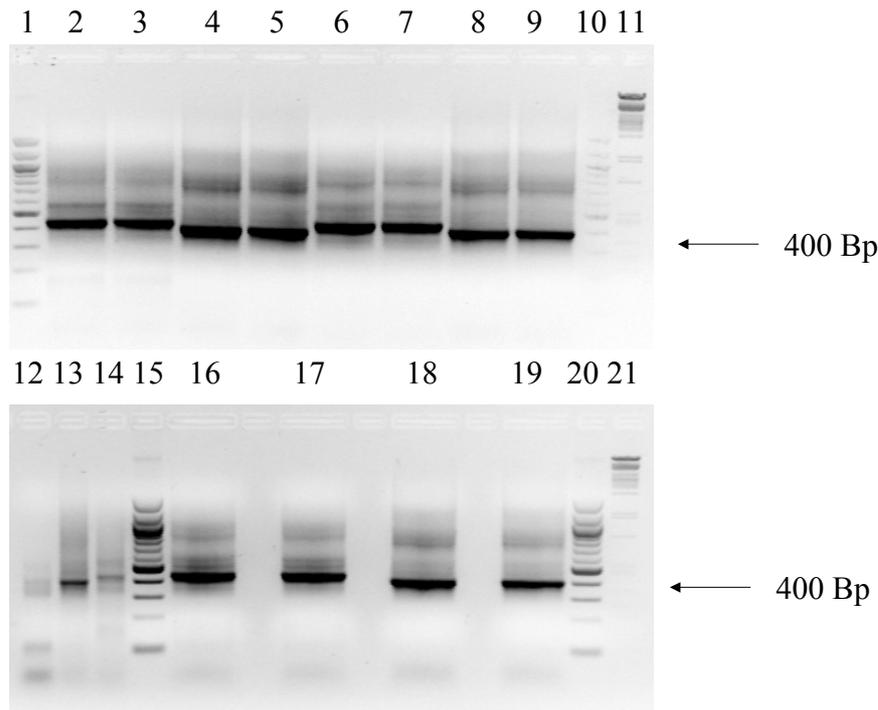


Abb. 3.6.: Inverse Darstellung der Agarosegelelektrophorese der amplifizierten V_H - und V_L -Domänen aus den mit CWP, FPCWP und SG immunisierten Hühnern. Die V_H - und V_L -Domänen der avianen mRNA wurden mit spezifischen Primern (ChicVHM und ChicVLM; Tab. 7.3.) in cDNS umgeschrieben (2.2.12.). Diese cDNS dienten als Template zur Amplifikation der V_H - und V_L -Domänen in einer PCR-Reaktion, wobei die 5'-Primer CDPVHF und CDPVLF (Tab. 7.8.) in Kombination mit den 3'-Primern CDPVHB und CDPVHB (Tab. 7.8.) eingesetzt wurden (2.2.13.1.). Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden in den Spuren 2 und 3: V_H des mit CWP immunisierten Huhns, 4 und 5: V_L des mit CWP immunisierten Huhns, 6 und 7 V_H des mit FPCWP immunisierten Huhns, 8 und 9 V_L des mit FPCWP immunisierten Huhns, 16 und 17: V_H des mit SG immunisierten Huhns, 18 und 19: V_L des mit SG immunisierten Huhns, auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3). In den Spuren 1, 10, 15 und 20 wurden 10 μ l 100 Bp-„ladder“ Marker (NEB) und in den Spuren 11 und 21 10 μ l λ -*Pst*I-Marker (500 ng) aufgetragen. Die Negativ-Kontrolle wurde in Spur 12 aufgetragen und bestand aus 10 μ l eines Mixes aus den Primern CDPVHF, CDPVHB, (V_H) CDPVLF und CDPVLB (V_L) (Tab. 7.8.) ohne Template DNS. Die Positiv-Kontrolle für die V_L - ist in der Spur 13 und für die V_H -Amplifikation in Spur 14 zu sehen, bei beiden wurden der pHENHi-Vektor mit integriertem scFv SPIII7 und die entsprechenden Primer [CDPVHF, CDPVLF, CDPVHB und CDPVLB (Tab. 7.8.)] verwendet.

3.4.3. Klonierung und Assemblierung von V_H - und V_L -Domänen als scFv-Bibliotheken

Zur Entfernung von Verunreinigungen in Form von *Taq*-DNS-Polymerase, Primern und nicht gewünschten PCR Artefakten wurden die amplifizierten (2.2.13.1.) avianen und murinen V_H - und V_L -Domänen elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.) und die ca. 400 Bp großen V_H - bzw. V_L -Banden aufgereinigt (2.2.8.). Anschließend wurden die V_H -Domänen mit *Sfi*I und *Bst*EII und die V_L -Domänen mit *Asc*I und *Not*I geschnitten (2.2.9.1.), wiederum elektrophoretisch

aufgetrennt (2.2.3.), aufgereinigt und separat in den kompatibel geschnittenen pHENHi Phagemid-Vektor (3.5.) ligiert (2.2.9.3.). Die V_H -Domänen wurden *via SfiI* und *BstEII* und die V_L -Domänen *via AscI* und *NotI* in pHENHi integriert und anschließend die V_H -Produkte in V_L -Bibliotheken und *v.v.* umkloniert, um V_H - und V_L -Domänen mit eventuell vorhandenen internen Schnittstellen nicht zu verlieren.

Durch Kontroll-Restriktionen (2.2.9.1.) mit *SfiI* und *BstEII* für die V_H - und *AscI* und *NotI* für die V_L -pHENHi Vektoren konnte festgestellt werden, dass 90% der V_H -CWP-Hühner Klone, 100% der V_H -FPCWP-Hühner Klone, 100% der V_H -SG-Hühner Klone, 90% der V_L -CWP-Hühner Klone, 80% der V_L -FPCWP-Hühner Klone, 80% der V_L -SG-Hühner Klone, 100% der murinen V_H -CWP Klone und 100% der murinen V_L -CWP Klone das zu erwartende 400 Bp PCR-Produkt besaßen (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden sowohl die V_H -Domänen in den V_L -Vektor *via SfiI* und *NotI* als auch *v.v.* über *AscI* und *NotI* kloniert (2.2.3., 2.2.8., 2.2.9.1., 2.2.9.3.). Alle Transformationsschritte wurden in *E. coli* XL1-Blue MRF' durchgeführt (2.2.1.5.).

3.4.4. Überprüfung der Komplexität der scFv-Bibliothek

Um die Komplexität der scFv-Bibliotheken zu überprüfen wurden, je 10 Kolonien der jeweiligen Bakterien-Bibliotheken gepickt und eine Kolonie-PCR durchgeführt (2.2.13.1.), das PCR-Produkt auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.). Dazu wurden die avianen Bibliotheken und die murine Bibliothek, welche aus der Milz der mit CWP immunisierten Maus generiert wurde, verwendet, da diese aufgrund der Titerwerte als besonders vielversprechend erschienen (3.3.).

90% der gepickten Klone der avianen scFv Bibliothek, welche von dem mit CWP immunisierten Huhn abstammte und von dem die V_H - in die V_L -Domäne umkloniert wurde (aviane scFv CWP $V_H \rightarrow V_L$ Bibliothek), besaßen ein ca. 1,1 kB großes PCR-Produkt, welches der Größe einer mit den Primern LMB3 und fdseq1 (Tab. 7.9.) amplifiziertem scFv entsprach. 80% der avianen scFv CWP $V_L \rightarrow V_H$ Bibliothek Amplifikationsprodukte zeigten einen in pHENHi integrierten scFv. 80% der avianen scFv FPCWP $V_H \rightarrow V_L$ Bibliothek und der avianen scFv FPCWP $V_L \rightarrow V_H$ Bibliothek und 90% der avianen scFv SG $V_H \rightarrow V_L$ Bibliothek und avianen scFv SG $V_L \rightarrow V_H$ Bibliothek beinhalteten einen scFv (Abb. 3.10).

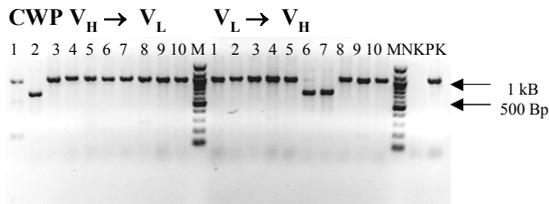
Die murinen scFv CWP $V_H \rightarrow V_L$ und CWP $V_L \rightarrow V_H$ Bibliotheken besaßen zu 90% ein 1,1 kB großes PCR-Produkt (Daten nicht dargestellt). Die Größe der Hühner- und Mausbibliotheken lag zwischen 1×10^7 und 7×10^7 und ist aus der folgenden Tabelle (Tab. 3.1.) ersichtlich. Die Komplexität der avianen und murinen Bibliotheken wurde durch einen *BstNI*-Verdau

ermittelt (2.2.9.2.), dabei konnte nach elektrophoretischer Auftrennung (2.2.3.) festgestellt werden, dass die durch die Restriktion entstandenen Fragmente divergent auftraten, was eine hohe Komplexität und Diversität der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Bibliotheken nahe legte. In der Abbildung 3.7. ist dies exemplarisch anhand der avianen Bibliotheken dargestellt.

Tab. 3.1.: Größen und Komplexität der hergestellten avianen und murinen scFv-Bibliotheken. Die Erklärungen zu den Bibliotheken sind dem umliegenden Text zu entnehmen. Die Größe der Bibliotheken wurde aus der Kolonienanzahl und die Komplexität aus der Multiplikation der Größe mit der prozentualen Häufigkeit intakter scFvs in den Bibliotheken ermittelt.

Bibliotheken	Größe	Komplexität
aviane scFv $V_H \rightarrow V_L$ CWP	7×10^7	$6,3 \times 10^7$
aviane scFv $V_L \rightarrow V_H$ CWP	7×10^7	$5,6 \times 10^7$
aviane scFv $V_H \rightarrow V_L$ FPCWP	3×10^7	$2,4 \times 10^7$
aviane scFv $V_H \rightarrow V_L$ FPCWP	6×10^7	$4,8 \times 10^7$
aviane scFv $V_H \rightarrow V_L$ SG	5×10^7	$4,5 \times 10^7$
aviane scFv $V_H \rightarrow V_L$ SG	6×10^7	$5,4 \times 10^7$
murine scFv $V_H \rightarrow V_L$ CWP	1×10^7	$9,0 \times 10^6$
murine scFv $V_H \rightarrow V_L$ CWP	1×10^7	$9,0 \times 10^6$

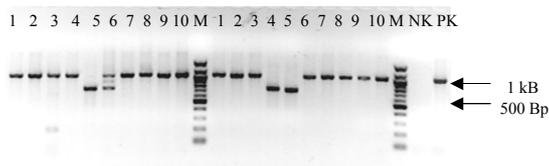
PCR-Produkte der Kolonie-PCR



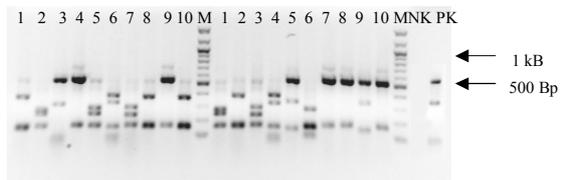
*Bst*NI Verdau der PCR-Produkte aus der Kolonie-PCR



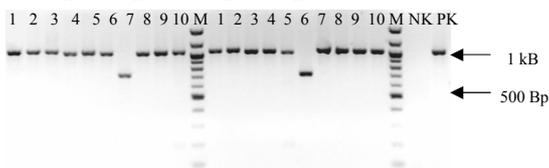
FPCWP



FPCWP



SG



SG



Abb. 3.7.: Inverse Darstellung der Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte der Kolonie-PCR und deren Verdau mit *Bst*NI. Pro avianer scFv-Bibliothek wurden 10 Kolonien gepickt und mittels Kolonie-PCR durch die Primer LMB3 und fdseq1 (Tab. 7.9.) amplifiziert. V_H - und V_L -Domänen beinhaltende pHENHi Vektoren weisen ein ca. 1,1 kB großes PCR-Produkt auf. Solche mit nur einer variablen Domäne ein 700 Bp großes PCR-Produkt (2.2.13.2.). Nach der PCR wurden die Produkte mit *Bst*NI restringiert (2.2.9.2.) und anschließend erneut auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.). Die Agarosegele der PCR-Produkte der Kolonie PCR sind links und die des *Bst*NI-Verdaues rechts dargestellt. Die mit den Hühner V_H - und V_L - Bibliotheken CWP, FPCWP und SG in Beziehung stehenden scFv-Bibliotheken sind zusammen mit der Klonierungsrichtung $V_H \rightarrow V_L$ und $V_L \rightarrow V_H$ oberhalb des betreffenden Geles beschriftet. In den Spuren 1-10 wurden die jeweiligen Proben aufgetragen. Als Marker M wurden 10 μ l des 100 Bp-„ladder“ Markers (NEB) aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle (PK) diente ein bereits identifizierter scFv SPIII7. Die Negativ-Kontrolle (NK) bestand aus dem Primermix LMB3 und fdseq1 (Tab. 7.9.).

3.5. Konstruktion und Funktionalität des Vektors pHENHi

Das Plasmid, welches auf dem Phagemid pHEN1 basiert (HOOGENBOOM *et al.*, 1991), wurde in dieser Arbeit durch einen His6-„tag“ ergänzt. Dadurch wurden in Kombination mit dem Bakterienstamm XL1-Blue MRF' folgende Eigenschaften in einem System vereinigt:

- 1.) „Phage Display“
- 2.) Expression der scFvs
- 3.) Aufreinigung der scFvs mittels des integrierten C-terminalen His6-„tags“ über IMAC
- 4.) Erleichterte DNS-Präparation
- 5.) Erleichterte Sequenzierung
- 6.) Leichte genetische Manipulation
- 7.) Zeitersparnis und Kostenreduktion

Die erleichterte DNS-Präparation resultiert daraus, dass im Gegensatz zum sonst verwendeten „Phage Display“ Stamm TG1 oder zum Expressionsstamm ER2566 eine hohe Konzentration von Plasmid-DNS isoliert werden kann, die zudem einfach zu manipulieren und durch ihren hohen Reinheitsgrad einfach zu sequenzieren ist.

Zur Modifikation des Vektors pHEN4II wurden zwei „forward“-Primer verwendet, der Primer pHENHiP2 (Tab. 7.1.) wurde in der ersten PCR-Reaktion in Kombination mit dem „backward“-Primer GeneIII-int (Tab. 7.1.) und dem Plasmid pHEN4II als Template eingesetzt (2.2.13.1.), um den His6-„tag“ zu integrieren. Das amplifizierte DNS-Fragment wurde nach Agarosegelelektrophorese (2.2.3.) aufgereinigt (2.2.8.). In der zweiten PCR-Reaktion mit den Primern pHENHiP1 („forward“) (Tab. 7.1.) und GeneIII-int („backward“) diente das isolierte DNS-Fragment als Template (2.2.13.1.). Die PCR-Reaktion wurde auf ein Agarosegel geladen, aufgetrennt (2.2.3.), das entstandene Fragment P-Hi aufgereinigt (2.2.8.) und mit *NotI* und *BamHI* geschnitten (2.2.9.1.). Der Vektor pHEN4II wurde mit den gleichen Enzymen geschnitten und das Insert P-Hi hineinligiert (2.2.9.3.) (Abb. 3.8.). Das neu entstandene Plasmid pHENHi mit integriertem scFv SPIII7 (muriner scFv, Peschen 1999) wurde zusammen mit dem Bakterienstamm XL1-Blue MRF' getestet. Dazu wurde der scFv SPIII7 exprimiert (2.3.2.3.) und *via* His6-„tag“ aufgereinigt (2.3.2.4.) (Abb. 3.9.). Aus einem halben Liter Bakteriensuspensionslösung konnte nach der Induktion durch IPTG bei einer E_{600nm} von 0,6 am nächsten Morgen 50 µg des über IMAC gereinigten scFv SPIII7 gewonnen werden. Der Proteingehalt wurde anhand eines SDS-Gels durch standardisierte RSA-Lösungen bestimmt. Der scFv SPIII7 war mit einer Größe von ca. 34 kDa sowohl auf dem

SDS-Gel als auch auf dem Western-Blot zu detektieren. Im SDS-Gel als auch im Immunoblot ist eine zweite Bande in Höhe von ca. 23 kDA zu erkennen, welche vermutlich eine Degradation des scFvs darstellt. Die Reaktivitäten des SPIII7 gegen verschiedene pilzliche Antigene sind aus der Abb. 3.10. ersichtlich, dabei fällt auf, dass der scFv besonders mit *F. graminearum* Antigenen reagiert. Gegen andere Pilzfamilien zeigte der SPIII7 hingegen keine oder nur nicht signifikante Bindungsspezifitäten. Diese Ergebnisse zeigen, dass der scFv SPIII7 funktionell aufgereinigt werden konnte, was die korrekte Faltung des scFv impliziert.

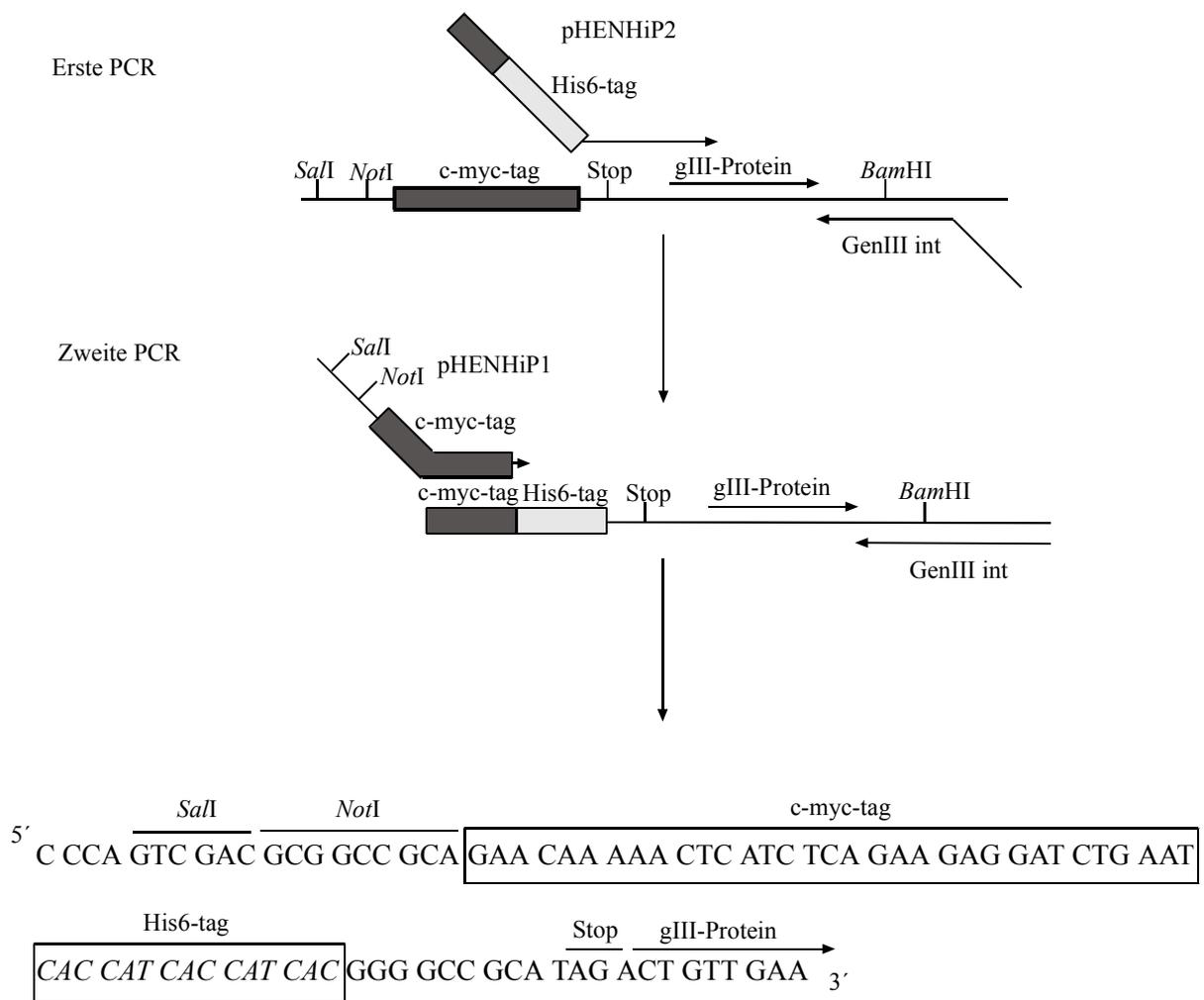


Abb. 3.8.: Klonierungsschema zur Herstellung des Vektors pHENHi. Durch zwei PCR-Schritte (2.2.13.1.) mit anschließender Restriktion mit *SalI* und *BamHI* (2.2.9.1.) wurden in den Vektor pHEN4II (2.1.5.) ein His6-,tag“ C-terminal zum c-myc-,tag“ integriert.

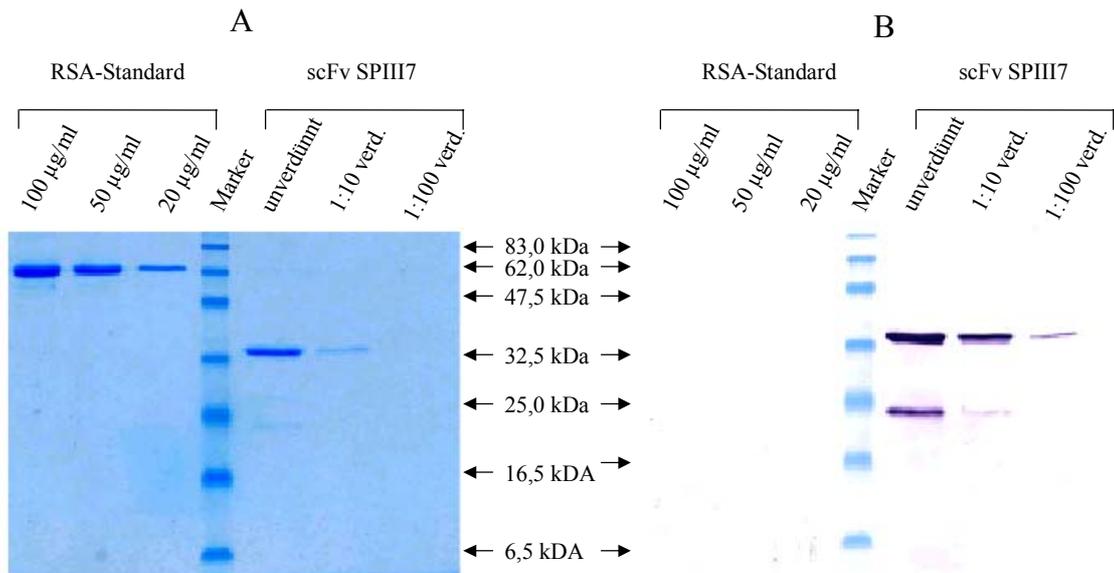


Abb. 3.9.: SDS-PAGE- und Immunoblot-Analyse von Ni-NTA-gereinigten scFv SPIII7 aus pHENHi. Der scFv SPIII7 wurde periplasmatisch mit dem Phagemid pHENHi in XL1-Blue MRF' exprimiert, mittels eines osmotischen Schocks isoliert (2.3.2.2.), durch eine Ni-NTA-Matrix über den His6-,tag“ gereinigt (2.3.2.3.), auf ein SDS-PAA-Gel (A) aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt (2.3.3.) und auf eine Nitrozellulosemembran (B) transferiert (2.3.4.). Die Detektion der auf eine Nitrozellulosemembran transferierten scFv erfolgte durch Zugabe eines 1:2000 verdünnten Maus α His6-,tag“ mAk sowie eines 1:5000 verdünnten AP-markierten Ziege α Maus Fc mAk (2.3.4.). Es wurden jeweils 20 μ l der Proben auf das SDS-Gel mit Ausnahme des Markers (5 μ l) aufgetragen.

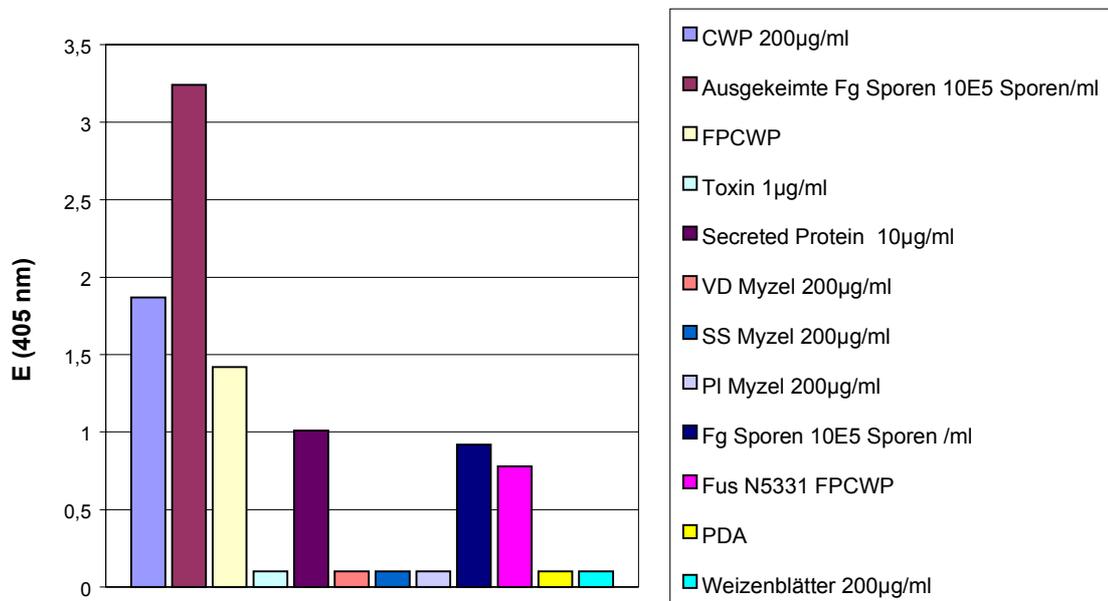


Abb. 3.10.: Funktionalitätstest des murinen, IMAC gereinigten, in pHENHi integrierten scFv SPIII7 gegen verschiedene pilzliche Antigene. Die verschiedenen Antigene wurden mit aus der Legende ersichtlichen Konzentrationen auf eine ELISA-Platte immobilisiert, 50 μ g/ml Ni-NTA-gereinigter scFv SPIII7 (2.3.2.4.) hinzugegeben und *via* Maus anti c-myc (1:5000) und ZAM Fc-spezifisch AP-markiert (1:5000)

nachgewiesen (2.4.1.1.). Als AP-Substrat wurde p-Nitrophenyl-Phosphat verwendet und die Extinktion bei 405 nm gemessen. Dabei wurden, wenn nicht ausdrücklich erwähnt, *F. graminearum* Antigene verwendet. Bei dem Toxin handelt es sich um 15-O-Acetyl-4-deoxynivalenol einem aus *F. graminearum* gewonnenen Mykotoxin. SS = *Sclerotinia sclerotiorum*, Fg = *F. graminearum*, VD = *Verticillium dahliae*, Pl = *Phoma linga*, Fus N5331 = *Fusarium*-Erreger, welcher Bananen befällt.

3.6. „Phage Display“

Um die besten Binder aus den scFv-Bibliotheken zu selektionieren, wurde die Methode des „Phage Displays“ gewählt. Hierzu wurden die avianen Bibliotheken, welche von den mit CWP, FPCWP und SG immunisierten Hühnern abstammen, um die Diversität zu erhöhen, vereinigt und gegen die einzelnen Antigene CWP, FPCWP, SG und das Mykotoxin 15-O-Acetyl-4-deoxynivalenol (DON) (DESJARDINS *et al.*, 1996) der Firma Sigma in drei Runden selektioniert. Während aller drei „Panning“-Runden wurden zur Anzucht der Phagen und zur Phageninfektion XL1-Blue MRF' verwendet (2.3.1.2.). Der Phagen-Titer nach der ersten und den nachfolgenden Runden lag zwischen 10^{13} bis 10^{14} cfu/ml (2.3.1.3.). Zur Selektion und Anreicherung der Antigen-bindenden Phagen aus den vereinigten scFv-Bibliotheken wurden die Reaktionsgefäße jeweils mit CWP [200 µg/ml (Trockengewicht)], FPCWP (frisch eluiert), SG (1×10^5 ausgekeimten Sporen/ml) und 10 µg/ml DON beschichtet. Zur Vermeidung der Anreicherung von RSA-Bindern wurde alternierend mit 2% (w/v) RSA und 2% (w/v) Milchpulver geblockt. Dabei kam es bei dem „Panning“ gegen die Antigene CWP, FPCWP und SG zu einer Anreicherung antigenbindender scFvs (Tab. 3.2.). Nach der dritten Runde wurden jeweils zehn Kolonien mittels PCR (2.2.13.2.) mit anschließendem *Bst*NI-Verdau (2.2.9.2.) getestet, um die Diversität der scFv-Klone abzuschätzen (3.7.). Bei DON konnte keine Anreicherung beobachtet werden.

Tab. 3.2.: Selektion und Anreicherung CWP-, FPCWP-, SG- und DON-bindender Phagen aus der Bibliothek der vereinigten avianen scFv-Bibliotheken CWP, FPCWP und SG. Die „Panning“-Runden erfolgten jeweils unter Verwendung von 200 µg/ml CWP, frisch von PDA-Platten abgewaschenen FPCWP, 1×10^5 ausgekeimten *F. graminearum* Sporen/ml und 10 µg/ml 15-O-Acetyl-4-deoxynivalenol (2.3.1.). Bei jeder „Panning“-Runde wurden 1×10^{13} Gesamt-cfu (cfu = „colony forming unit“ = Kolonienanzahl nach Infektion von *E. coli* XL1-Blue MRF') eingesetzt. Nach jeder „Panning“-Runde wurde der Phagentiter durch Reinfektion der selektierten und angereicherten Phagen in *E. coli* XL1-Blue MRF' bestimmt. Als Negativ-Kontrolle diente ein mit RSA bzw. Milchpulver beschichtetes Reaktionsgefäß (2.3.1.).

Antigen	„Panning“-Runden		
	1	2	3
CWP	6×10^5	6×10^6	3×10^7
FPCWP	4×10^3	1×10^4	2×10^7
SG	3×10^3	1×10^5	2×10^8
DON	1×10^2	1×10^2	-

3.7. Charakterisierung der scFvs

Nach der dritten Runde des „Phage Displays“ wurden jeweils 96 Bakterien-Kolonien der gegen die Antigene CWP, FPCWP und SG angereicherten scFvs gepickt und in einer 96-Napf-Platte herangezogen (2.3.2.1.), welche darauffolgend als Masterplatte diente. Diese Platten dienten zur Inokulation der Bakterien zur Expression der scFvs durch IPTG. Der Überstand wurde am nächsten Morgen abgenommen und durch einen ELISA, bei dem die Platten mit den jeweiligen Antigenen CWP (200µg/ml), FPCWP und SG (1×10^5 Sporen/ml) beschichtet wurden, auf antigenspezifische Binder untersucht (2.4.1.1.). Auf ein Screenen nach DON-spezifisch bindenden Klonen wurde verzichtet, da es während der Selektion (Tab. 3.6.) nicht zu einer Anreicherung von spezifisch bindenden Phagen gekommen war. Dies deutete darauf hin, dass nur unspezifische Binder gegen dieses Antigen zur Verfügung standen. Bei der Untersuchung der antigenspezifischen Binder wurde festgestellt, dass zehn von den 96 Überständen der gegen CWP selektierten scFv-Kolonienüberstände eine E_{405nm} nach 1 h Substratinkubation für das CWP Antigen von über 3,0 aufwiesen. 50 der 96 Überstände der gegen FPCWP selektierten scFv-Kolonien zeigten eine E_{405nm} von über 3,0 für die FPCWP Antigen und 22 der E_{405nm} der gegen SG selektierten scFv-Kolonienüberstände aus 96 lagen ebenfalls bei den beschichteten SG-Antigen über dem Wert von 3,0. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die jeweiligen scFv-Überstände bei den Tests gegen die jeweiligen korrespondierenden Antigene hohe Kreuzreaktivitäten gegen diese aufwiesen. Der E_{405nm} -Wert lag dabei immer über 1,5. Zehn Kolonien der jeweils stärksten Binder wurde durch eine Kolonie-PCR (2.2.13.1.) mit anschließendem *Bst*NI-Verdau (2.2.9.2.) und elektrophoretischer Auftrennung der DNS-Fragmente (2.2.3.) genauer untersucht (Abb. 3.11.). Dabei wurde deutlich, dass die Diversität der gepickten Klone nur äußerst gering war. Das Bandenmuster der CWP und FPCWP Klone waren untereinander

identisch, lediglich die SG Klone 3 und 7 wichen von dem sonst üblichen Bandenmuster der restlichen SG Klone ab. Die drei stärksten Binder gegen die Antigene CWP, FPCWP und SG wurden durch DNS-Sequenzierung genauer analysiert (3.8.).

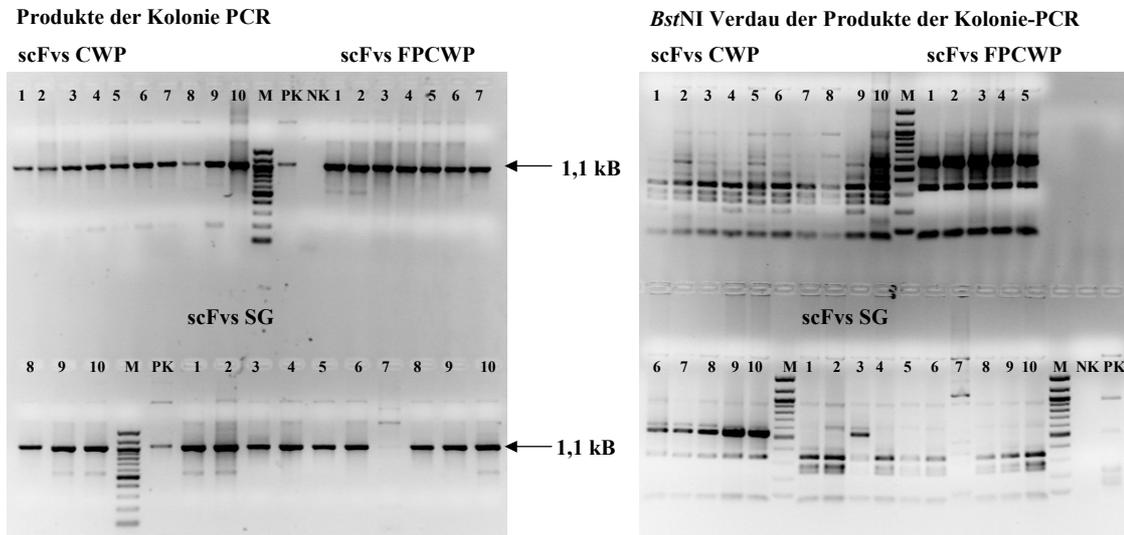


Abb. 3.11. Inverse Darstellung des Agarosegels nach *Bst*NI-Verdau der Kolonie-PCR-Produkte der stärksten Binder aus der dritten Runde des „Phage Displays“. Nach der dritten Runde des „Phage Displays“ (3.7.) wurden je Antigen CWP, FPCWP und SG zehn Kolonien gepickt und *via* Kolonie-PCR (2.2.13.2.) die scFvs durch die Primer LMB3 und fdseq1 (Tab. 7.9.) amplifiziert. Nach der PCR wurden die Produkte mit *Bst*NI restringiert (2.2.9.2.) und anschließend erneut auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.). In den Spuren 1-10 wurden die Restriktionsprodukte der positiven Binder der dritten Runde des „Phage Displays“, welche gegen die Antigene CWP, FPCWP und SG selektiert wurden, aufgetragen. Als Marker M wurden 10 µl des 100 Bp-„ladder“ Markers (NEB) verwendet. Als Positiv-Kontrolle (PK) diente ein bereits identifizierter scFv SPIII7. Die Negativ-Kontrolle (NK) bestand aus dem PCR-Mix mit dem Primermix LMB3 und fdseq1 ohne DNS (Tab. 7.9.).

3.7.1. Sequenzierung der scFv

Nach der Sequenzierung der jeweils drei besten Binder gegen die Antigene CWP, FPCWP und SG wurde festgestellt, dass die scFvs CWPA8, CWPD2 und CWPE12 sowohl in der Basenpaarabfolge und folglich auch der Aminosäuresequenz identisch waren. Entsprechendes wurde bei den scFvs SGB3, SGE3 und SGH3 festgestellt. Die Basenpaarabfolge der scFvs FPCWPA4 und FPCWPA5 waren ebenfalls identisch, diejenige des scFv FPCWPD3 unterschied sich in den Basenpaaren 666 und 720 von den scFvs FPCWPA4 und FPCWPA5 (Abb.3.12.). Dies wirkte sich jedoch nicht auf die Aminosäuresequenz aus, hier waren alle drei scFvs identisch. Wenn man die hypervariablen Regionen (CDR) und die konservierten „Framework“ Regionen (FR) zwischen den unterschiedlichen scFv-Gruppen miteinander vergleicht, fällt auf, dass es besonders in den CDR-Regionen zu AS Unterschieden kommt.

Zusätzlich ist bemerkenswert, dass in den CDR-H3 Regionen der scFvs CWP und FPCWP die AS Cystein zweimal vorhanden ist. Diese Regionen sind von besonderem Interesse, weil diese Regionen insbesondere zur Antigen-spezifität beitragen, da der scFv über diese Regionen mit dem Targetmolekül interagiert. Die CDR-Regionen sind in der Abb. 3.16. farbig markiert und wurden nach den Regeln von KABAT *et al.* (1991) bestimmt, welche nachfolgend aufgelistet sind.

Identifizierung der CDRs nach KABAT (1991): (strikte Regeln wurden rot markiert)

- CDR-H1** Beginn des CDR-H1 direkt nach der AS-Folge **C-X-X-X**
Am Ende des CDR-H1 befindet sich ein **W**
Länge 10 – 12 AS
- CDR-H2** Beginnt **15 AS** nach dem Ende von CDR-H1
Vor dem Beginn die AS-Sequenz **L-E-W-I-G**, mit diversen
Variationen **K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A**
Die Länge beträgt zwischen 16 und 19 AS
- CDR-H3** Beginnt immer **33 AS** nach dem Ende CDR-H2 (immer zwei nach einem **C**)
AS vorher **C-X-X** (typisch C-A-R)
AS danach **W-G-X-G**
Länge zwischen 3 und 25 AS
- CDR-L1** Beginn mit der **24 AS**
AS vorher **C**
AS nachher **W**
Nach dem Ende typischerweise W-Y-Q, aber auch, W-L-Q, W-F-Q, W-Y-L
Länge zwischen 10 und 17 AS
- CDR-L2** Beginn **16 AS** nach dem Ende von CDR-L1
AS vorher **I-Y**, aber auch, **V-Y, I-K, I-F**
Länge **immer 7 AS**
- CDR-L3** Beginn **33 AS** nach dem Ende von CDR-L2
(Ausnahme 7FAB, welche eine Deletion aufweisen)
Vor CDR-L3 immer ein **C**
AS-Sequenz nachher **F-G-X-G**
Länge zwischen 7 und 11 AS

3. Ergebnisse

		1	<i>Sfi</i> I	<i>Nco</i> I	$V_H \rightarrow$	50
scFv	CWPA8	(1)	GCGGCCAGCCGGCCATGGCTGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGG			
scFv	CWPD2	(1)	GCGGCCAGCCGGCCATGGCTGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGG			
scFv	CWPE12	(1)	GCGGCCAGCCGGCCATGGCTGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGG			
scFv	FPCWPA4	(1)	GCGGCCAGCCGGCCATGGCTGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGG			
scFv	FPCWPA5	(1)	GCGGCCAGCCGGCCATGGCTGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGG			
scFv	FPCWPD3	(1)	GCGGCCAGCCGGCCATGGCTGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGG			
scFv	SGB3	(1)	GCGGCCAGCCGGCCATGGCTGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGG			
scFv	SGE3	(1)	GCGGCCAGCCGGCCATGGCTGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGG			
scFv	SGH3	(1)	GCGGCCAGCCGGCCATGGCTGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGG			
		51				100
scFv	CWPA8	(51)	CCTCCAGACGCCGGAGGAGGGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGGCTCCGGGT			
scFv	CWPD2	(51)	CCTCCAGACGCCGGAGGAGGGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGGCTCCGGGT			
scFv	CWPE12	(51)	CCTCCAGACGCCGGAGGAGGGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGGCTCCGGGT			
scFv	FPCWPA4	(51)	CCTCCAGACGCCGGAGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGT			
scFv	FPCWPA5	(51)	CCTCCAGACGCCGGAGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGT			
scFv	FPCWPD3	(51)	CCTCCAGACGCCGGAGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGT			
scFv	SGB3	(51)	CCTCCAGACGCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGT			
scFv	SGE3	(51)	CCTCCAGACGCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGT			
scFv	SGH3	(51)	CCTCCAGACGCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGT			
		101				150
scFv	CWPA8	(101)	TTGACTTCAGCAGTGACACCATGATGTGGGTGCGCCAGGCGCCCGGCAAG			
scFv	CWPD2	(101)	TTGACTTCAGCAGTGACACCATGATGTGGGTGCGCCAGGCGCCCGGCAAG			
scFv	CWPE12	(101)	TTGACTTCAGCAGTGACACCATGATGTGGGTGCGCCAGGCGCCCGGCAAG			
scFv	FPCWPA4	(101)	TCACCTTCAGCAGTTATGCCATGGTGTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAA			
scFv	FPCWPA5	(101)	TCACCTTCAGCAGTTATGCCATGGTGTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAA			
scFv	FPCWPD3	(101)	TCACCTTCAGCAGTTATGCCATGGTGTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAA			
scFv	SGB3	(101)	TCACCTTCAGCAGTTATGGCATGGCCTGGGTGCGACAGGCGCCTGGCAAG			
scFv	SGE3	(101)	TCACCTTCAGCAGTTATGGCATGGCCTGGGTGCGACAGGCGCCTGGCAAG			
scFv	SGH3	(101)	TCACCTTCAGCAGTTATGGCATGGCCTGGGTGCGACAGGCGCCTGGCAAG			
		151				200
scFv	CWPA8	(151)	GGGTGGAAATTCGTCGCTGGTATTAGTGGTGATGGTAGTGACACAACCTA			
scFv	CWPD2	(151)	GGGTGGAAATTCGTCGCTGGTATTAGTGGTGATGGTAGTGACACAACCTA			
scFv	CWPE12	(151)	GGGTGGAAATTCGTCGCTGGTATTAGTGGTGATGGTAGTGACACAACCTA			
scFv	FPCWPA4	(151)	GGGATGGAGTGGGTGCGTGGTATTGGCAAGGATGGTGGTGGCACAACCTA			
scFv	FPCWPA5	(151)	GGGATGGAGTGGGTGCGTGGTATTGGCAAGGATGGTGGTGGCACAACCTA			
scFv	FPCWPD3	(151)	GGGATGGAGTGGGTGCGTGGTATTGGCAAGGATGGTGGTGGCACAACCTA			
scFv	SGB3	(151)	GGGCTGGAGTGGGTGCGGGGTATTGATGATGGTGGTAGTTTACAGGATA			
scFv	SGE3	(151)	GGGCTGGAGTGGGTGCGGGGTATTGATGATGGTGGTAGTTTACAGGATA			
scFv	SGH3	(151)	GGGCTGGAGTGGGTGCGGGGTATTGATGATGGTGGTAGTTTACAGGATA			
		201				250
scFv	CWPA8	(201)	CGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGA			
scFv	CWPD2	(201)	CGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGA			
scFv	CWPE12	(201)	CGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGA			
scFv	FPCWPA4	(201)	CGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGA			
scFv	FPCWPA5	(201)	CGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGA			
scFv	FPCWPD3	(201)	CGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGA			
scFv	SGB3	(201)	TGGGGCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGA			
scFv	SGE3	(201)	TGGGGCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGA			
scFv	SGH3	(201)	TGGGGCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGA			

3. Ergebnisse

		251		300
scFv	CWPA8	(251)	GCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCCACC	
scFv	CWPD2	(251)	GCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCCACC	
scFv	CWPE12	(251)	GCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCCACC	
scFv	FPCWPA4	(251)	GCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACC	
scFv	FPCWPA5	(251)	GCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACC	
scFv	FPCWPD3	(251)	GCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACC	
scFv	SGB3	(251)	GCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCCACC	
scFv	SGE3	(251)	GCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCCACC	
scFv	SGH3	(251)	GCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCCACC	
		301		350
scFv	CWPA8	(301)	TACTACTGCAACCAGAGGTCCTTGTAGTCCTACGAAGAATTGTGCTGCTGA	
scFv	CWPD2	(301)	TACTACTGCAACCAGAGGTCCTTGTAGTCCTACGAAGAATTGTGCTGCTGA	
scFv	CWPE12	(301)	TACTACTGCAACCAGAGGTCCTTGTAGTCCTACGAAGAATTGTGCTGCTGA	
scFv	FPCWPA4	(301)	TACTACTGCGGCAAAACTAGTTGTACT---ACCTCATCTTGGTGTGCTAG	
scFv	FPCWPA5	(301)	TACTACTGCGGCAAAACTAGTTGTACT---ACCTCATCTTGGTGTGCTAG	
scFv	FPCWPD3	(301)	TACTACTGCGGCAAAACTAGTTGTACT---ACCTCATCTTGGTGTGCTAG	
scFv	SGB3	(301)	TACTATTGCGCCAGAGGTACTGGTGGT-----TT-TGGTGGTGA	
scFv	SGE3	(301)	TACTATTGCGCCAGAGGTACTGGTGGT-----TT-TGGTGGTGA	
scFv	SGH3	(301)	TACTATTGCGCCAGAGGTACTGGTGGT-----TT-TGGTGGTGA	
		351	← V _H BstEII	400
scFv	CWPA8	(351)	TCGTATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAGGTCACCGTCTCCTCAGGCT	
scFv	CWPD2	(351)	TCGTATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAGGTCACCGTCTCCTCAGGCT	
scFv	CWPE12	(351)	TCGTATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAGGTCACCGTCTCCTCAGGCT	
scFv	FPCWPA4	(348)	TCACATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAGGTCACCGTCTCCTCAGGCT	
scFv	FPCWPA5	(348)	TCACATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAGGTCACCGTCTCCTCAGGCT	
scFv	FPCWPD3	(348)	TCACATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAGGTCACCGTCTCCTCAGGCT	
scFv	SGB3	(339)	TCGTATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAGGTCACCGTCTCCTCAGGCT	
scFv	SGE3	(339)	TCGTATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAGGTCACCGTCTCCTCAGGCT	
scFv	SGH3	(339)	TCGTATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAGGTCACCGTCTCCTCAGGCT	
		401	218* Linker	AscI
scFv	CWPA8	(401)	CCACCTCAGGCTCCGGTAAACCTGGCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGC	
scFv	CWPD2	(401)	CCACCTCAGGCTCCGGTAAACCTGGCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGC	
scFv	CWPE12	(401)	CCACCTCAGGCTCCGGTAAACCTGGCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGC	
scFv	FPCWPA4	(398)	CCACCTCAGGCTCCGGTAAACCTGGCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGC	
scFv	FPCWPA5	(398)	CCACCTCAGGCTCCGGTAAACCTGGCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGC	
scFv	FPCWPD3	(398)	CCACCTCAGGCTCCGGTAAACCTGGCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGC	
scFv	SGB3	(389)	CCACCTCAGGCTCCGGTAAACCTGGCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGC	
scFv	SGE3	(389)	CCACCTCAGGCTCCGGTAAACCTGGCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGC	
scFv	SGH3	(389)	CCACCTCAGGCTCCGGTAAACCTGGCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGC	
		AscI V _L →		500
scFv	CWPA8	(451)	GCGCCTGCGCTGACTCAGCCGTCCCTCGGTGTCAGCAAACTTGGGAGGAAC	
scFv	CWPD2	(451)	GCGCCTGCGCTGACTCAGCCGTCCCTCGGTGTCAGCAAACTTGGGAGGAAC	
scFv	CWPE12	(451)	GCGCCTGCGCTGACTCAGCCGTCCCTCGGTGTCAGCAAACTTGGGAGGAAC	
scFv	FPCWPA4	(448)	GCGCCTGCGCTGACTCAGCCGTCCCTCGGTGTCAGCAAACTCAGGAGAAAC	
scFv	FPCWPA5	(448)	GCGCCTGCGCTGACTCAGCCGTCCCTCGGTGTCAGCAAACTCAGGAGAAAC	
scFv	FPCWPD3	(448)	GCGCCTGCGCTGACTCAGCCGTCCCTCGGTGTCAGCAAACTCAGGAGAAAC	
scFv	SGB3	(439)	GCGCCTGCGCTGACTCAGCCGTCCCTCGGTGTCAGCGAACTTGGGAGGAAC	
scFv	SGE3	(439)	GCGCCTGCGCTGACTCAGCCGTCCCTCGGTGTCAGCGAACTTGGGAGGAAC	
scFv	SGH3	(439)	GCGCCTGCGCTGACTCAGCCGTCCCTCGGTGTCAGCGAACTTGGGAGGAAC	
		501		550

3. Ergebnisse

```

scFv CWPA8 (501) CGTCGAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGCTATAGGTATGGCTGGTCCAGC
scFv CWPD2 (501) CGTCGAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGCTATAGGTATGGCTGGTCCAGC
scFv CWPE12 (501) CGTCGAGATCACCTGCTCCGGGGGTGGCTATAGGTATGGCTGGTCCAGC
scFv FPCWPA4 (498) CGTCAAGGTCACCTGTTCCGGGGGTAGTGGCAGCTATGGCTGGTATCAGC
scFv FPCWPA5 (498) CGTCAAGGTCACCTGTTCCGGGGGTAGTGGCAGCTATGGCTGGTATCAGC
scFv FPCWPD3 (498) CGTCAAGGTCACCTGTTCCGGGGGTAGTGGCAGCTATGGCTGGTATCAGC
scFv SGB3 (489) CGTCAAGATCACCTGCTCCGGGAGTACTGCTCACTATAGCTGGCACCAGC
scFv SGE3 (489) CGTCAAGATCACCTGCTCCGGGAGTACTGCTCACTATAGCTGGCACCAGC
scFv SGH3 (489) CGTCAAGATCACCTGCTCCGGGAGTACTGCTCACTATAGCTGGCACCAGC

551 600
scFv CWPA8 (551) AGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCCCTGTCACAGTGATCTACTGGGATGATGAC
scFv CWPD2 (551) AGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCCCTGTCACAGTGATCTACTGGGATGATGAC
scFv CWPE12 (551) AGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCCCTGTCACAGTGATCTACTGGGATGATGAC
scFv FPCWPA4 (548) AGAAGTCACTGGCAGTGCCCCCTGTCAC TCTGATCT-----ATAGC
scFv FPCWPA5 (548) AGAAGTCACTGGCAGTGCCCCCTGTCAC TCTGATCT-----ATAGC
scFv FPCWPD3 (548) AGAAGTCACTGGCAGTGCCCCCTGTCAC TCTGATCT-----ATAGC
scFv SGB3 (539) AGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCCCTGTCAC TCTGATCT-----CTTTC
scFv SGE3 (539) AGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCCCTGTCAC TCTGATCT-----CTTTC
scFv SGH3 (539) AGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCCCTGTCAC TCTGATCT-----CTTTC

601 650
scFv CWPA8 (601) AGCGCCAACAGACCCTCGAACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCACATC
scFv CWPD2 (601) AGCGCCAACAGACCCTCGAACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCACATC
scFv CWPE12 (601) AGCGCCAACAGACCCTCGAACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCACATC
scFv FPCWPA4 (589) AACGACAAGAGACCCTCGAACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCCAAATC
scFv FPCWPA5 (589) AACGACAAGAGACCCTCGAACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCCAAATC
scFv FPCWPD3 (589) AACGACAAGAGACCCTCGAACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCCAAATC
scFv SGB3 (580) AACAAACCAGAGACCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCCAAATC
scFv SGE3 (580) AACAAACCAGAGACCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCCAAATC
scFv SGH3 (580) AACAAACCAGAGACCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCCAAATC

651 700
scFv CWPA8 (651) TGGTCCACAGCCACATTAACCATCAC TGGGGTCC AAGCCGACGACGAGG
scFv CWPD2 (651) TGGTCCACAGCCACATTAACCATCAC TGGGGTCC AAGCCGACGACGAGG
scFv CWPE12 (651) TGGTCCACAGCCACATTAACCATCAC TGGGGTCC AAGCCGACGACGAGG
scFv FPCWPA4 (639) CGGCTCTGCAAACACATTAACCATCAC TGGGGTCC AAGTCGAGGACGAGG
scFv FPCWPA5 (639) CGGCTCTGCAAACACATTAACCATCAC TGGGGTCC AAGTCGAGGACGAGG
scFv FPCWPD3 (639) CGGCTCTGCAAACACATTAACCATCAC AAGGGTCC AAGTCGAGGACGAGG
scFv SGB3 (630) CGGCTCCACGGGCACATTAACCATCAC TGGGGTCC GAGCCGAGGACGAGG
scFv SGE3 (630) CGGCTCCACGGGCACATTAACCATCAC TGGGGTCC GAGCCGAGGACGAGG
scFv SGH3 (630) CGGCTCCACGGGCACATTAACCATCAC TGGGGTCC GAGCCGAGGACGAGG

701 750
scFv CWPA8 (701) CTGTCTATTTCTGTGGGAGCTATGACAGGAGTAGTGGTTATGTTCTATA
scFv CWPD2 (701) CTGTCTATTTCTGTGGGAGCTATGACAGGAGTAGTGGTTATGTTCTATA
scFv CWPE12 (701) CTGTCTATTTCTGTGGGAGCTATGACAGGAGTAGTGGTTATGTTCTATA
scFv FPCWPA4 (689) CTGTCTATTACTGTGGGAGTGCAGACAGTAACTAATGCT-----ATA
scFv FPCWPA5 (689) CTGTCTATTACTGTGGGAGTGCAGACAGTAACTAATGCT-----ATA
scFv FPCWPD3 (689) CTGTCTATTACTGTGGGAGTGCAGACAGTAACTAATGCT-----ATA
scFv SGB3 (680) CTGTCTATTACTGTGGTGGCTGGGACAGGAGCATTACTGCTGTT---TA
scFv SGE3 (680) CTGTCTATTACTGTGGTGGCTGGGACAGGAGCATTACTGCTGTT---TA
scFv SGH3 (680) CTGTCTATTACTGTGGTGGCTGGGACAGGAGCATTACTGCTGTT---TA

```

3. Ergebnisse

		751		← V _L SalI NotI
scFv	CWPA8	(751)	TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTAGGCCAG	CCCCGTCGACGCGGC
scFv	CWPD2	(751)	TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTAGGCCAG	CCCCGTCGACGCGGC
scFv	CWPE12	(751)	TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTAGGCCAG	CCCCGTCGACGCGGC
scFv	FPCWPA4	(733)	TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTAGGCCAG	CCCCGTCGACGCGGC
scFv	FPCWPA5	(733)	TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTAGGCCAG	CCCCGTCGACGCGGC
scFv	FPCWPD3	(733)	TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTAGGCCAG	CCCCGTCGACGCGGC
scFv	SGB3	(727)	TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTAGGCCA	ACCCGTCGACGCGGC
scFv	SGE3	(727)	TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTAGGCCA	ACCCGTCGACGCGGC
scFv	SGH3	(727)	TTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTAGGCCA	ACCCGTCGACGCGGC
		NotI	c-myc-„tag“	His6-„tag“850
scFv	CWPA8	(801)	CGCAGAACAAAAA	ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATCACCATCACC
scFv	CWPD2	(801)	CGCAGAACAAAAA	ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATCACCATCACC
scFv	CWPE12	(801)	CGCAGAACAAAAA	ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATCACCATCACC
scFv	FPCWPA4	(783)	CGCAGAACAAAAA	ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATCACCATCACC
scFv	FPCWPA5	(783)	CGCAGAACAAAAA	ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATCACCATCACC
scFv	FPCWPD3	(783)	CGCAGAACAAAAA	ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATCACCATCACC
scFv	SGB3	(777)	CGCAGAACAAAAA	ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATCACCATCACC
scFv	SGE3	(777)	CGCAGAACAAAAA	ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATCACCATCACC
scFv	SGH3	(777)	CGCAGAACAAAAA	ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATCACCATCACC
		851		867
scFv	CWPA8	(851)	ATCACGGGGCCGCATAG	
scFv	CWPD2	(851)	ATCACGGGGCCGCATAG	
scFv	CWPE12	(851)	ATCACGGGGCCGCATAG	
scFv	FPCWPA4	(833)	ATCACGGGGCCGCATAG	
scFv	FPCWPA5	(833)	ATCACGGGGCCGCATAG	
scFv	FPCWPD3	(833)	ATCACGGGGCCGCATAG	
scFv	SGB3	(827)	ATCACGGGGCCGCATAG	
scFv	SGE3	(827)	ATCACGGGGCCGCATAG	
scFv	SGH3	(827)	ATCACGGGGCCGCATAG	

Abb. 3.12.: DNS-Sequenz von neun selektionierten avianen *F. graminearum* spezifischen scFv-Klone. Die scFv-Klone CWPA8, CWPD2 und CWPE12 stellen die stärksten Binder der scFv-Bibliothek gegen das Antigen CWP dar. Entsprechendes gilt für die scFv-Klone FPCWPA4, FPCWPA5, FPCWPD3 und dem entsprechenden Antigen FPCWP sowie SGB3, SGE3 und SGH3 für das Antigen SG. Die Nukleotidsequenz der neun scFv-Klone mit der variablen Region der schweren Kette V_H, dem 218* Linker [* = AS-Austausch eines Tyrosins zu Prolin; WHITLOW *et al.*, 1993], der variablen Region der leichten Kette V_L, dem c-myc-„tag“, dem His6-„tag“ und auftretende Basenpaarabweichungen sind farbig markiert.

3. Ergebnisse

		1		CDR-H1	
scFv	CWPA8	(1)	MAAVTLDES	GGGLQTPGGGLSLVCKGSGFD	FSSDTMMWVRQAPGKGL
scFv	CWPD2	(1)	MAAVTLDES	GGGLQTPGGGLSLVCKGSGFD	FSSDTMMWVRQAPGKGL
scFv	CWPE12	(1)	MAAVTLDES	GGGLQTPGGGLSLVCKGSGFD	FSSDTMMWVRQAPGKGL
scFv	FPCWPA4	(1)	MAAVTLDES	GGGLQTPGRALSLVCKASGFT	FSSYAMVWVRQAPGKMEWV
scFv	FPCWPA5	(1)	MAAVTLDES	GGGLQTPGRALSLVCKASGFT	FSSYAMVWVRQAPGKMEWV
scFv	FPCWPD3	(1)	MAAVTLDES	GGGLQTPGRALSLVCKASGFT	FSSYAMVWVRQAPGKMEWV
scFv	SGB3	(1)	MAAVTLDES	GGGLQTPGALS	LVCKASGFTFSSNGMAWVRQAPGKLEWV
scFv	SGE3	(1)	MAAVTLDES	GGGLQTPGALS	LVCKASGFTFSSNGMAWVRQAPGKLEWV
scFv	SGH3	(1)	MAAVTLDES	GGGLQTPGALS	LVCKASGFTFSSNGMAWVRQAPGKLEWV
		51		CDR-H2	100
scFv	CWPA8	(51)	AGISGDGSDT	NYGSAVKGRATISRDN	QSTVRLQLNNLRAEDT
scFv	CWPD2	(51)	AGISGDGSDT	NYGSAVKGRATISRDN	QSTVRLQLNNLRAEDT
scFv	CWPE12	(51)	AGISGDGSDT	NYGSAVKGRATISRDN	QSTVRLQLNNLRAEDT
scFv	FPCWPA4	(51)	AGIGKDG	GGTNYGSAVKGRATISRDN	QSTVRLQLNNLRAEDT
scFv	FPCWPA5	(51)	AGIGKDG	GGTNYGSAVKGRATISRDN	QSTVRLQLNNLRAEDT
scFv	FPCWPD3	(51)	AGIGKDG	GGTNYGSAVKGRATISRDN	QSTVRLQLNNLRAEDT
scFv	SGB3	(51)	AGIDG	GGSF	TGYAAVKGRATISRDN
scFv	SGE3	(51)	AGIDG	GGSF	TGYAAVKGRATISRDN
scFv	SGH3	(51)	AGIDG	GGSF	TGYAAVKGRATISRDN
		101		CDR-H3	150
scFv	CWPA8	(101)	GPCSPTKNC	AADRIDAWGHGTEVT	VSSGSTSGSGKPGPEGSTK
scFv	CWPD2	(101)	GPCSPTKNC	AADRIDAWGHGTEVT	VSSGSTSGSGKPGPEGSTK
scFv	CWPE12	(101)	GPCSPTKNC	AADRIDAWGHGTEVT	VSSGSTSGSGKPGPEGSTK
scFv	FPCWPA4	(101)	TSCT-TSS	WCASHIDAWGHGTEVT	VSSGSTSGSGKPGPEGSTK
scFv	FPCWPA5	(101)	TSCT-TSS	WCASHIDAWGHGTEVT	VSSGSTSGSGKPGPEGSTK
scFv	FPCWPD3	(101)	TSCT-TSS	WCASHIDAWGHGTEVT	VSSGSTSGSGKPGPEGSTK
scFv	SGB3	(101)	G----	TGGFGGDRIDAWGHGTEVT	VSSGSTSGSGKPGPEGSTK
scFv	SGE3	(101)	G----	TGGFGGDRIDAWGHGTEVT	VSSGSTSGSGKPGPEGSTK
scFv	SGH3	(101)	G----	TGGFGGDRIDAWGHGTEVT	VSSGSTSGSGKPGPEGSTK
		151		CDR-L1	CDR-L2200
scFv	CWPA8	(151)	QPSSVSANL	GGTV	EITCSGGGYR
scFv	CWPD2	(151)	QPSSVSANL	GGTV	EITCSGGGYR
scFv	CWPE12	(151)	QPSSVSANL	GGTV	EITCSGGGYR
scFv	FPCWPA4	(150)	QPSSVSANP	GETVKVTC	SGGSGSYGWY
scFv	FPCWPA5	(150)	QPSSVSANP	GETVKVTC	SGGSGSYGWY
scFv	FPCWPD3	(150)	QPSSVSANP	GETVKVTC	SGGSGSYGWY
scFv	SGB3	(147)	QPSSVSANL	GGTV	KITCSGSTAHYS
scFv	SGE3	(147)	QPSSVSANL	GGTV	KITCSGSTAHYS
scFv	SGH3	(147)	QPSSVSANL	GGTV	KITCSGSTAHYS
		201		CDR-L3	250
scFv	CWPA8	(201)	SNIPSRFSGS	TSGST	ATLTITGVQAD
scFv	CWPD2	(201)	SNIPSRFSGS	TSGST	ATLTITGVQAD
scFv	CWPE12	(201)	SNIPSRFSGS	TSGST	ATLTITGVQAD
scFv	FPCWPA4	(197)	SNIPSRFSGS	KSGSAN	TLTITGVQVE
scFv	FPCWPA5	(197)	SNIPSRFSGS	KSGSAN	TLTITGVQVE
scFv	FPCWPD3	(197)	SNIPSRFSGS	KSGSAN	TLTITGVQVE
scFv	SGB3	(194)	SDIPSRFSGS	KSGST	GTLTITGVRAE
scFv	SGE3	(194)	SDIPSRFSGS	KSGST	GTLTITGVRAE
scFv	SGH3	(194)	SDIPSRFSGS	KSGST	GTLTITGVRAE

		251	283
scFv CWPA8	(251)	TLTVLGQPVDAAAEQKLI SEEDLNHHHHHHGAA	
scFv CWPD2	(251)	TLTVLGQPVDAAAEQKLI SEEDLNHHHHHHGAA	
scFv CWPE12	(251)	TLTVLGQPVDAAAEQKLI SEEDLNHHHHHHGAA	
scFv FPCWPA4	(245)	TLTVLGQPVDAAAEQKLI SEEDLNHHHHHHGAA	
scFv FPCWPA5	(245)	TLTVLGQPVDAAAEQKLI SEEDLNHHHHHHGAA	
scFv FPCWPD3	(245)	TLTVLGQPVDAAAEQKLI SEEDLNHHHHHHGAA	
scFv SGB3	(243)	TLTVLGQPVDAAAEQKLI SEEDLNHHHHHHGAA	
scFv SGE3	(243)	TLTVLGQPVDAAAEQKLI SEEDLNHHHHHHGAA	
scFv SGH3	(243)	TLTVLGQPVDAAAEQKLI SEEDLNHHHHHHGAA	

Abb. 3.13.: Aminosäuresequenz von neun selektionierten avianen *F. graminearum* spezifischen scFv-Klone. Die scFv-Klone CWPA8, CWPD2 und CWPE12 stellen die stärksten Binder der scFv-Bibliothek gegen das Antigen CWP dar. Entsprechendes gilt für die Klone FPCWPA4, FPCWPA5, FPCWPD3 und dem entsprechenden Antigen FPCWP und SGB3, SGE3 und SGH3 für das Antigen SG. Die CDR-Regionen der V_H- und V_L-Domänen sind farbig markiert genauso wie AS-Unterschiede in den FR-Regionen.

3.7.2. Expression und Reinigung der scFv-Fragmente

Die scFvs wurden in *E. coli* exprimiert, dabei wurden die Expressionssysteme pET-22b/BL21 (Novagen, Darmstadt) und das bereits vorgestellte pHENHi/XL1-Blue verwendet. Nach einem Vergleich der Expressionssysteme untereinander konnte kein signifikanter Expressionsvorteil des Expressionssystems pET-22b/BL21 gegenüber pHENHi/XL1-Blue festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). Folglich wurde das pHENHi/XL1-Blue System nachfolgend verwendet, da sich die Klonierung und Charakterisierung der Klone als zeiteinsparender herausstellte. Dabei konnten die scFvs nach der Induktion mit IPTG und einer anschließenden ü/N Inkubation bei 28°C (2.3.2.1.) sowohl im Überstand als auch periplasmatisch drei Stunden nach der IPTG-Induktion auf Grund des *pelB* bei 37°C angereichert (2.3.2.2.) und *via* Ni-NTA aufgereinigt werden (2.3.2.3.). Obwohl versucht wurde, die Expression der scFvs durch eine Veränderung der IPTG-Konzentration und durch Veränderung der Inkubationszeit und der Temperatur weiter zu optimieren, konnten die Expressionraten der scFvs nicht gesteigert werden (Daten nicht dargestellt). Aus einem halben Liter Bakteriensuspension konnte bei den scFvs SPIII7, CWPD2, SGB3 und FPCWPA5 50 µg aufgereinigt werden (Abb.3.14.). Die gereinigten scFvs konnten nachfolgend in Funktionalitätstests und zur Charakterisierung des Antigens eingesetzt werden.

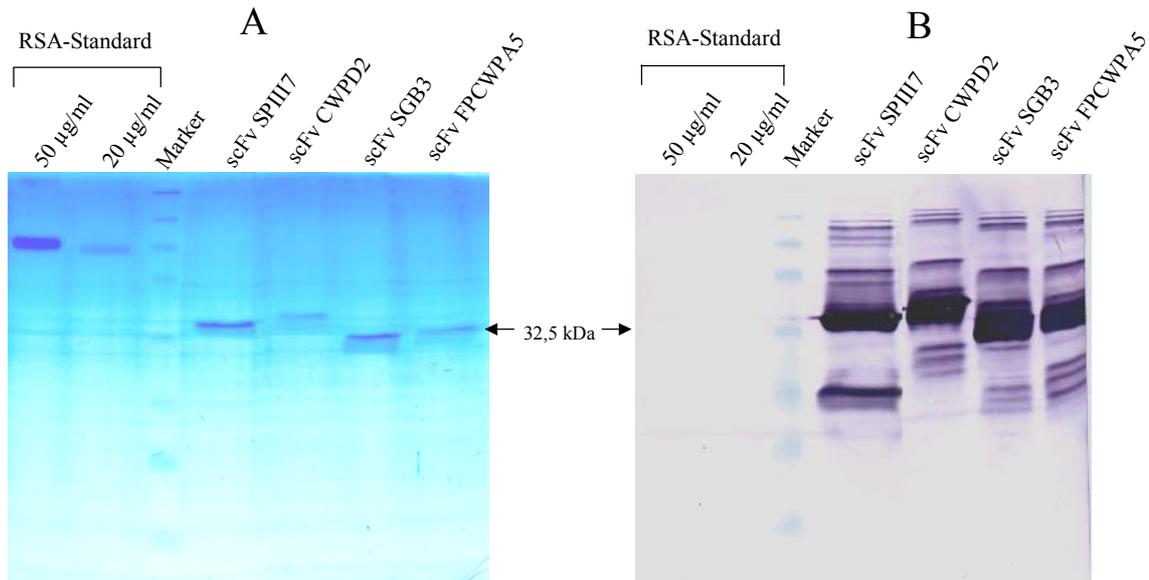


Abb. 3.14.: SDS-PAGE- und Immunoblot Ni-NTA-gereinigter scFvs. Die scFv SPIII7, CWPD2, SGB3 und FPCWPA5 wurden periplasmatisch in *E.coli* exprimiert, mittels osmotischen Schocks isoliert (2.3.2.2.), durch eine Ni-NTA-Matrix über den His6-,tag“ gereinigt (2.3.2.3.), auf ein SDS-PAA-Gel (A) aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt (2.3.3.) und auf eine Nitrozellulosemembran (B) transferiert (2.3.4.). Die Detektion der auf eine Nitrozellulosemembran transferierten scFv erfolgt durch Zugabe eines 1:5000 verdünnten Maus α c-myc mAk sowie eines 1:5000 verdünnten AP-markiertem Ziege α Maus mAk (2.3.4.). Es wurden jeweils 20 μ l der Proben auf das SDS-Gel mit Ausnahme des Markers (5 μ l) aufgetragen. M = „Prestained“-Protein-Marker (NEB); scFv SPIII7 = gereinigter scFv SPIII7; scFv CWPD2 = gereinigter scFv CWPD2; scFv SGB3 = gereinigter scFv SGB3; scFv FPCWPA5 = gereinigter scFv FPCWPA5.

3.7.3. Funktionsanalyse der scFvs mittels ELISA

Mit den gereinigten scFvs wurden verschiedene ELISA Tests durchgeführt, um die Bindungsspezifitäten der scFvs festzustellen. Dabei wurde sich aus zeitlichen Gründen auf die vielversprechendsten avianen scFvs CWPD2, FPCWPA5 und SGB3 aus den Phagenbibliotheken sowie dem murinen Kontroll-scFv SPIII7 beschränkt und diese gegen die Antigene CWP, FPCWP und SG getestet. Dabei zeigte sich eine hohe Kreuzreaktivität der scFvs zu den entsprechenden Antigenen. Sowohl die scFvs CWPD2, FPCWPA5 und SGB3, als auch der scFv SPIII7 reagierte gegen alle drei Antigene (Abb.3.15.). Aus den Graphen der Abbildung 3.16. ist zu ersehen, dass die scFvs CWPD2, FPCWPA5, SGB3 und SPIII7 gegen alle getesteten Fusarienarten kreuzreagierten. Die Extinktionen der scFvs CWPD2 und SGB3 sind um die Extinktion von 1,5 bis 2,5 höher als die der entsprechenden scFvs FPCWPA5 und SPIII7. Dies impliziert eine höhere Bindungsreaktivität gegen die ausgekeimten Sporen der jeweiligen *Fusarium* ssp.. Dabei muß noch verifiziert werden, ob dies an der relativen

Häufigkeit des Epitops auf dem Antigengemisch oder an der höheren Affinität des jeweiligen scFvs zum Epitop liegt.

In der Tab. 3.3. sind die Reaktivitäten der avinanen scFvs CWPD2, FPCWPA5 und SGB3 zusammen mit dem murinen scFv SPIII7 gegen *Fusarium* ssp. und anderer Pilzarten zusammengestellt. Sporen der Pilzarten *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae* und *Phoma lingam* standen nicht zur Verfügung, von diesen wurde folglich Myzel zur Beschichtung der ELISA-Platten verwendet. Wenn man sich die Reaktivitäten der scFvs gegen Antigene anderer Pilze betrachtet, fällt auf, dass hier nur Kreuzreaktivitäten zwischen *Plectospora* ssp. bei den scFvs CWPD2, SGB3 und FPCWPA5 und zwischen dem scFv FPCWPA5 und *Verticillium dahliae* auftraten. Wurde die Konzentration der scFvs auf 50 µg/ml erhöht, wurden auch signifikante Kreuzreaktionen mit den Pilzen festgestellt, welche in der Tab. 3.3. als negativ getestet dargestellt wurden (Daten nicht dargestellt). Entsprechende Tests mit Blattmaterial weisen auch bei höheren scFv-Konzentrationen keine Kreuzreaktivitäten auf. Diese Ergebnisse implizierten, dass die scFvs CWPD2, FPCWPA5, SGB3 und SPIII7 auch gegen die Bekämpfung von anderen Fusarien als *F. graminearum* eingesetzt werden könnten. Folglich wurde ein Modellsystem etabliert, an dem vielversprechende scFvs und scFv-Fusionsproteine zeit- und kostensparend getestet werden konnten. Die Wahl fiel dabei auf *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia, da diese Pflanze leicht zu transformieren und der Generationswechsel mit ca. 6-8 Wochen sehr kurz ist. Desweiteren gibt es einen spezifischen *Fusarium*-Pathotyp (*F. oxysporum* f.sp. *matthiola*) der *Arabidopsis* befällt und an den alle getesteten scFvs (Tab. 3.3.) spezifisch banden.

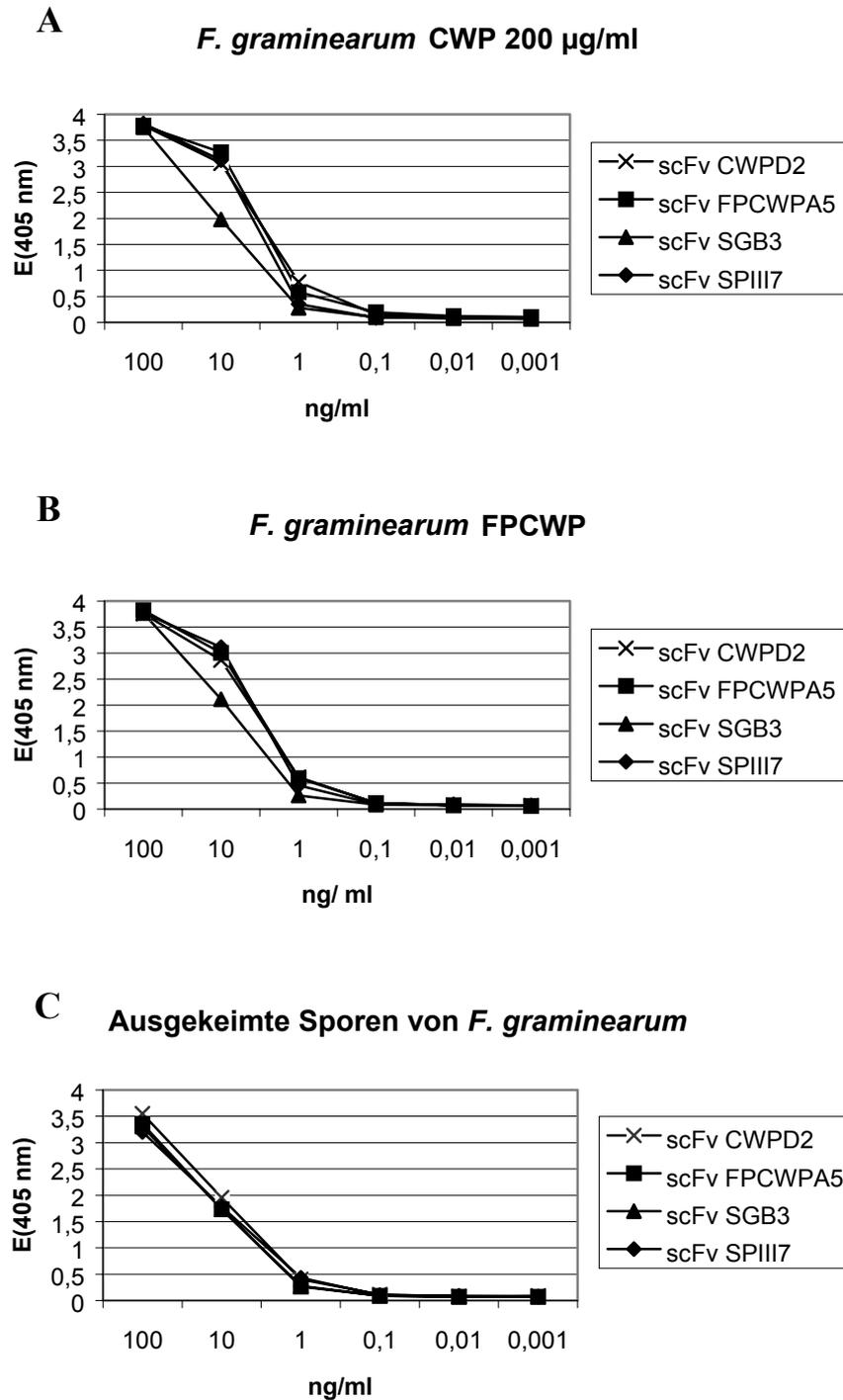


Abb. 3.15.: Reaktivität verschiedener scFv gegen diverse *F. graminearum* Antigene im ELISA. Die scFv Konzentrationen der scFvs CWP22, FPCWPA5, SGB3 und SPIII7 wurden gegen die Extinktion (405nm) aufgetragen. Im Graphen A wurde CWP mit einer Konzentration von 200 µg/ml (Trockengewicht) (2.3.7.3.), im Graphen B wurden frisch mit PBS abgewaschene Oberflächenproteine (2.3.7.5.) und im Graphen C wurden 1×10^5 ausgekeimte Sporen (16h) pro ml auf der ELISA-Platte immobilisiert (2.3.7.2.). Erster Nachweisantikörper: Maus anti c-myc (1:5000); zweiter Nachweisantikörper ZAM IgG Fc-spezifisch AP-markiert (1:5000); Substrat p-Nitrophenyl 1h Inkubationszeit.

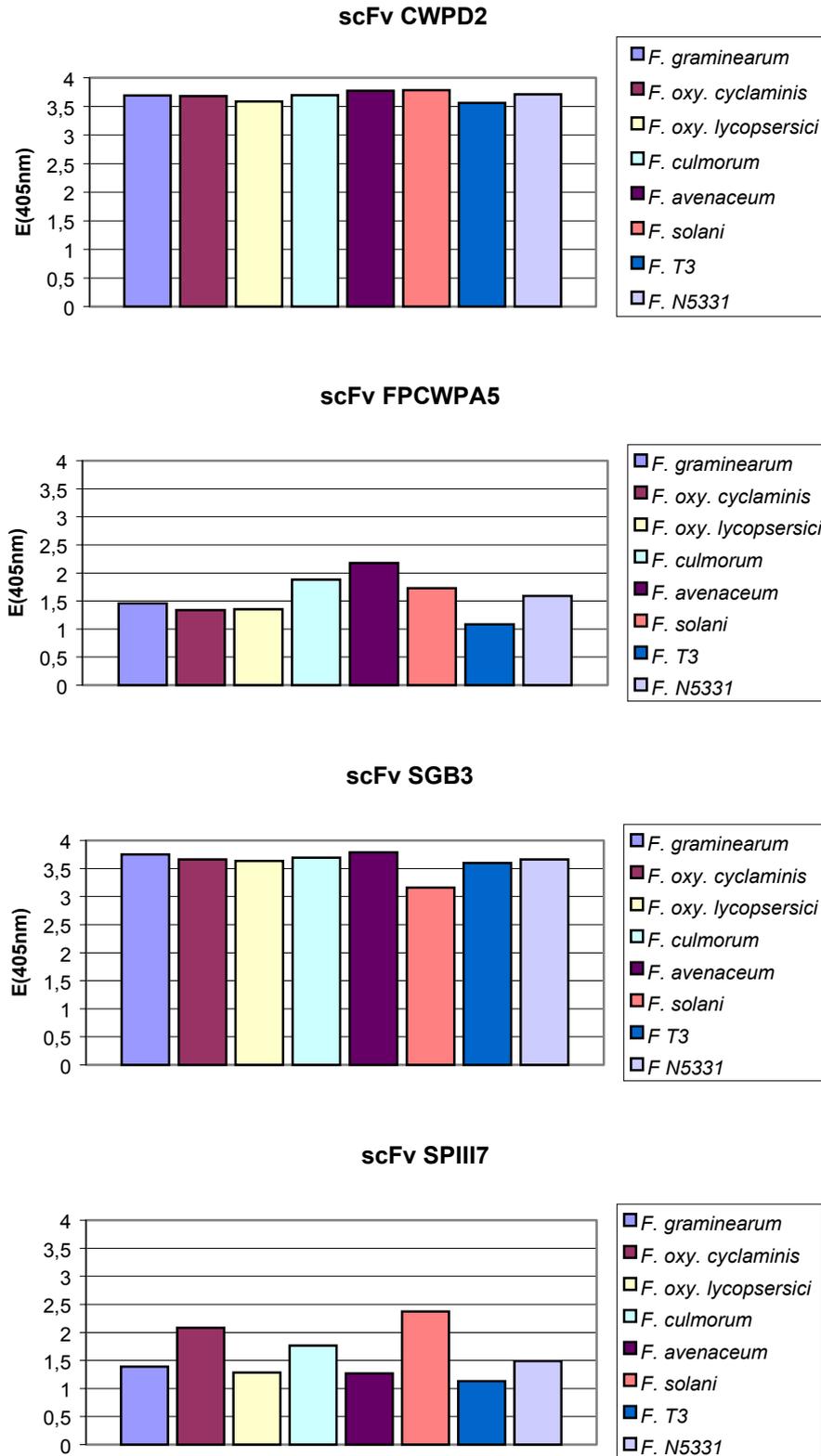


Abb. 3.16.: Reaktivität verschiedener scFv mit diversen *Fusarium ssp.* im ELISA. Es wurden ausgekeimte Sporen von 1×10^5 Sporen/ml der verschiedenen *Fusarium ssp.* immobilisiert (2.4.1.1.). Die scFvs CYPD2, FPCWPA5, SGB3 und SPIII7 wurden mit einer Konzentration von 50 ng/ml zugegeben und anschließend folgende Nachweisantikörper verwendet: Erster Nachweisantikörper Maus anti c-myc (1:5000); zweiter Nachweisantikörper ZAM IgG Fc-spezifisch, AP-markiert (1:5000); Substrat p-

Nitrophenyl 1h Inkubationszeit. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 405 nm (2.4.1.). Bei den Fusarien *F. T3* und *F. N5331* handelt es sich um Pathogene, welche bei Bananen eine Fäule verursachen und freundlicherweise von Dr. László Sági, Laboratory of Tropical Crop Improvement, katholische Universität Leuven, Belgien, zur Verfügung gestellt wurden.

Tab. 3.3.: Spezifität und Kreuzreaktivität avianer und muriner scFvs mit diversen Pilzantigenen. Ausgekeimte Sporen mit einer Konzentration von 1×10^5 Sporen/ml^{*1} bzw. wenn Sporen nicht zur Verfügung standen Myzel mit einer Konzentration von 200µg/ml^{*2} wurden auf einer ELISA-Platte immobilisiert, geblockt mit 50 ng/ml der jeweiligen scFv inkubiert und nach einer Stunde Substratinkubation detektiert (2.4.1.): Maus anti c-myc (1:5000); ZAM IgG Fc-spezifisch, AP-markiert (1:5000); Substrat p-Nitrophenyl. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 405 nm (2.4.1.). Erklärung der Symbolik: E_{405nm} - = 0,0-0,1; + = 0,1-0,8; ++ = 0,8-2,5; +++ = 2,5-4,0.

	scFv SPIII7	scFv CWPD2	scFv SGB3	scFv FPCWPA5
<i>F. graminearum</i> ^{*1}	++	+++	+++	++
<i>F. oxy. f.sp. cyclaminis</i> ^{*1}	++	+++	+++	++
<i>F. oxy. f.sp lycopersici</i> ^{*1}	++	+++	+++	++
<i>F.culmorum</i> ^{*1}	++	+++	+++	++
<i>F. avenaceum</i> ^{*1}	++	+++	+++	++
<i>F. solani</i> ^{*1}	++	+++	+++	++
<i>F. T3</i> ^{*1}	++	+++	+++	++
<i>F. N5331</i> ^{*1}	+	+++	+++	++
<i>F. oxy. f.sp. matthiolae</i> ^{*1}	+	+++	+++	+++
<i>Plectosporella spp.</i> ^{*1}	-	+	++	+++
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ^{*2}	-	-	-	-
<i>Verticillium dahliae</i> ^{*2}	-	-	-	+
<i>Phoma lingam</i> ^{*2}	-	-	-	-

3.7.4. Antigen-Charakterisierung der scFvs

Um festzustellen, ob die avianen scFvs ein Protein oder ein mit einem Protein assoziiertes Epitop erkennen, wurde das Antigengemisch CWP in drei Bahnen, welche durch einen Marker getrennt waren, auf ein SDS-Gel geladen und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die drei Bahnen wurden getrennt und die Ni-NTA gereinigten scFvs CWPD2, FPCWPA5 und SGB3 mit der geblockten Membran inkubiert und nachfolgend durch einen AP-markierten anti c-myc-„tag“ pAk nachgewiesen (2.3.4.). Die Muster der angefärbten Banden der scFvs CWPD2 und SGB3 sind sehr ähnlich. Dabei wird besonders eine Bande um die 50 kDa sichtbar. Mit dem scFv FPCWPA5 läßt sich eine starke Bande um 120 kDa anfärben, diese Bande ist bei den scFv CWPD2 und SGB3 ebenfalls angefärbt. Bei allen drei scFvs CWPD2, FPCWPA5 und SGB3 sind jedoch noch weitere, schwächere Banden erkennbar. Im zugehörigen SDS-Gel (Abb. 3.2.), auf dem das Antigen CWP aufgetragen wurde, sind eine starke Bande in der Höhe von ca. 50 kDa und mehrere schwache Banden sichtbar. Die am stärksten gefärbte Bande aus dem Immunoblot (Abb. 3.17.), bei dem die scFvs CWPD2 und SGB3 zur Detektion verwendet wurden, korrelieren mit einer 50 kDa Bande im entsprechenden SDS-Gel, was auf eine hohe Konzentration des Antigens im CWP Antigengemisch hindeutet. Durch diesen Versuch konnte nachgewiesen werden, dass die avianen scFvs CWPD2, FPCWPA5 und SGB3 an ein Protein, ein Proteinkomplex oder an ein Protein gekoppeltes Epitop mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa binden.

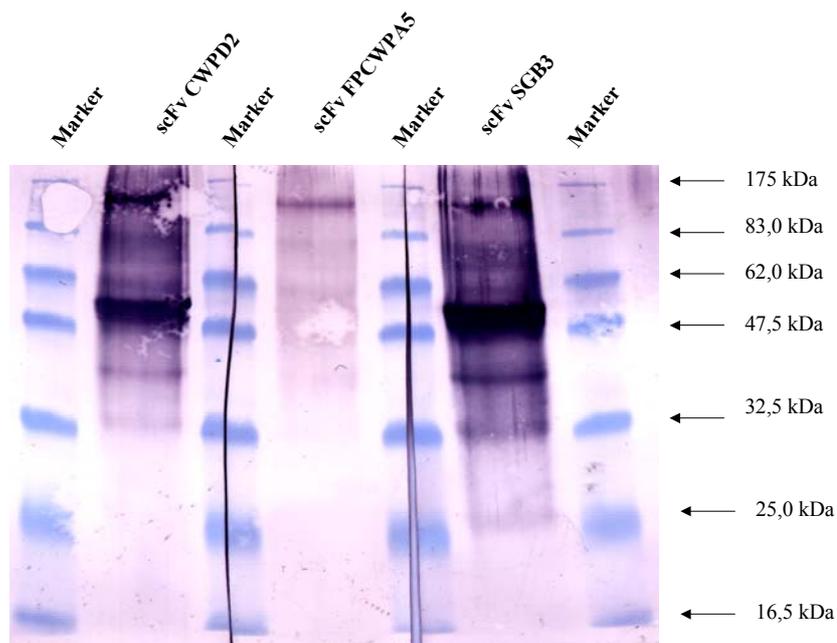
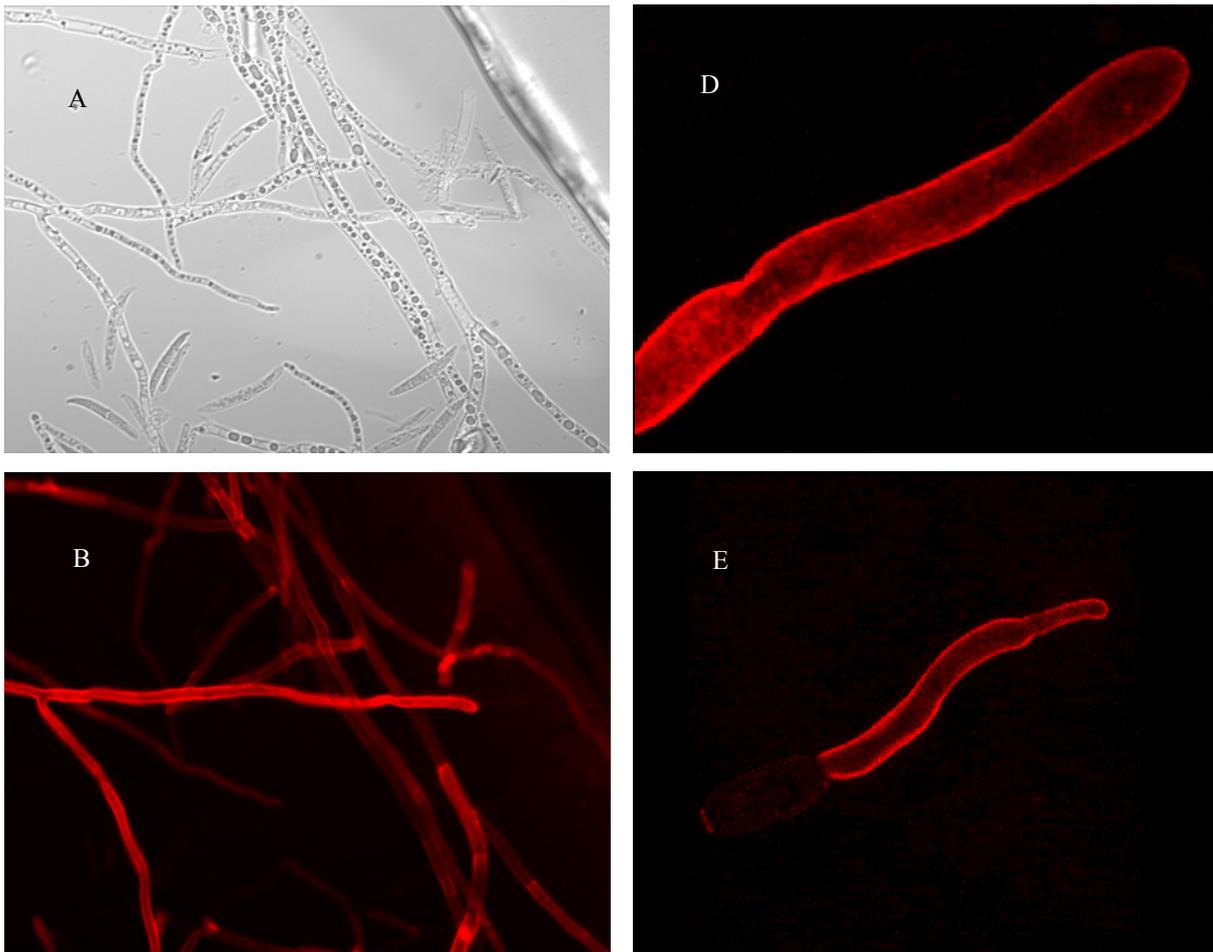


Abb. 3.17.: Immunoblot-Analyse Ni-NTA-gereinigter scFvs gegen das Antigen CWP. Das Antigen CWP wurde in drei Spuren auf ein SDS-Gel geladen, welche durch den „Prestained“-Protein-Marker (NEB) getrennt waren, und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (2.3.4.). Nichtspezifische Bindungen wurden durch RSA abgesättigt und die Membran in drei einzelne Nitrozellulosemembranstücke geschnitten, auf denen sich je eine Spur der CWP befand. Die einzelnen Stücke wurden nachfolgend jeweils mit 500 ng/ml der scFvs CWPD2, FPCWPA5 und SGB3 inkubiert. Anschließend wurde ein Maus anti c-myc (1:5000) und ein ZAM IgG Fc-spezifisch AP-markiert (1:5000) zugegeben und nach Zugabe des NBT/BCIP-Substrates gebundene scFvs nachgewiesen.

3.7.5. Immunofluoreszenzuntersuchungen der scFvs

Durch die Immunofluoreszenzmikroskopie sollte nachgewiesen werden, an welche Strukturen die scFvs an *F. graminearum* binden. Aus den Immunfluoreszenzaufnahmen war zu entnehmen, dass die avianen scFvs CWPD2, FPCWPA5 und SGB3 und auch der murine scFv SPIII7 an der Oberfläche von Myzel bindet (beispielhaft dargestellt anhand des



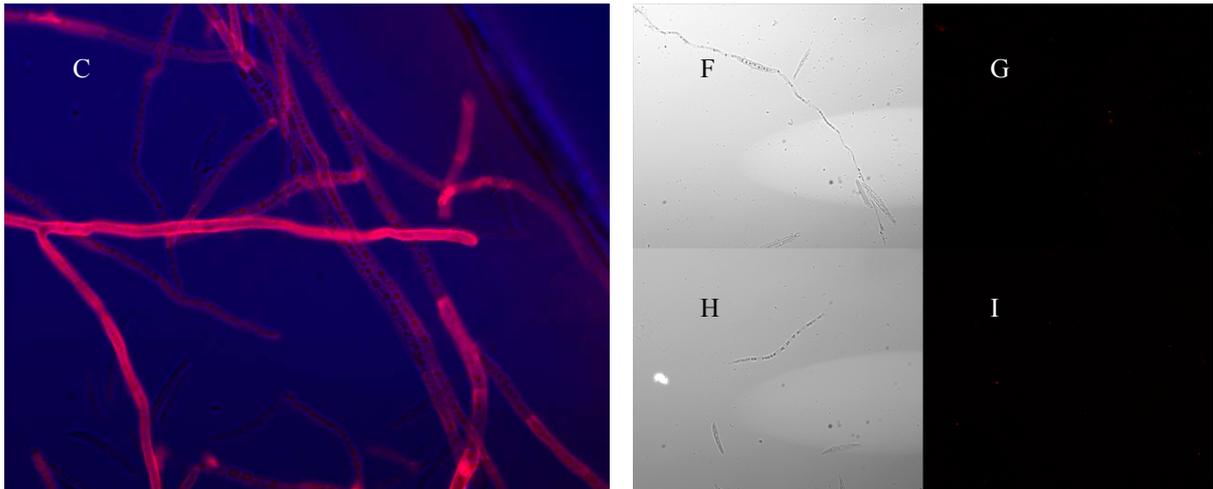


Abb. 3.18.: Immunofluoreszenz-, Durchlicht- und „Overlay“-Analyse von ausgekeimten Sporen und jungem Myzel von *F. graminearum* inkubiert. Zum Nachweis der Bindungsspezifität der scFvs wurden ausgekeimte *F. graminearium* Sporen auf einem Deckglas immobilisiert, mit 500 µg/ml scFv SPIII7 inkubiert und über den c-myc-,tag“ durch Maus α c-myc mAk (1:5000) und nachfolgend durch Ziege α Maus IgG AB Alexa Flour™ 568 (578/603) (H+L) (1:100) fluoreszenzmarkiert (2.8.). Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (2.8.4.) und mit einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen (2.8.5.). In A ist das Durchlichtbild einer ausgekeimten *F. graminearum* Spore, in B ist die Bindung des scFv SPIII7 anhand der Fluoreszenz des Alexa Flour™ zu sehen. C stellt ein „Overlay“ aus A und B dar. In C und D ist eine Myzelspitze und eine ausgekeimte Spore mit einem Keimschlauch zu erkennen. F und H stellen Durchlichtbilder ohne scFv (F) und mit dem Kontroll scFv PIPP (H) dar. G und I sind die korrespondierenden Fluoreszenzbilder zu F (G) und H (I).

murinen scFv SPIII7 in der Abb. 3.18.). Diese Bindung konnte immer nach dem Auskeimen der Sporen detektiert werden. Der gesamte Keimschlauch und das sich daraus entwickelnde Myzel konnte durch die scFvs CWPD2, FPCWPA5, SGB3 und scFv SPIII7 detektiert werden. Die Sporen selber konnten nicht durch die scFvs markiert werden. Durch die Immunfluoreszenzaufnahmen konnten die positiven Daten aus den ELISA-Experimenten weiter verifiziert werden. Die scFvs konnten erfolgreich gereinigt werden, und ihre Funktionalität blieb ebenfalls erhalten. Die Fluoreszenzaufnahmen demonstrieren, dass die scFvs auch an ein natives pilzliches Epitop, d.h. somit auch an infektiöse Pilzstrukturen binden können. Die Fusion der charakterisierten scFvs mit AFP und deren Expression in der Pflanze konnte unter Berücksichtigung der erzielten Daten als sinnvoll eingestuft werden.

3.8. Herstellung und Charakterisierung von scFv-Fusionen mit antifungalen Peptiden und Proteinen

Da die Wahrscheinlichkeit, pilzspezifische scFvs mit einer hohen Inhibitionseffizienz zu generieren, als äußerst gering einzustufen war, wurden die avianen scFvs CWPD2, FPCWPA5 und SGB3 als auch der murine scFv SPIII7 mit antifungalen Peptiden und

Proteinen fusioniert. Bei einer späteren Expression der scFv-AFP-Fusionen in Pflanzen sollte es zu einer Akkumulation der AFP an der Oberfläche des Pilzes kommen und dadurch deren inhibitorischer Effekt verstärkt werden. Folglich sollten schon geringe Expressionraten der scFv-Fusionsproteine zu einer Inhibierung des Pilzwachstums in der Pflanze und dies zu einer Resistenz führen.

3.8.1. Klonierung der AFP-scFv Konstrukte

Um die regenerierten scFvs und deren Fusionsproteine in *E.coli* oder Pflanzen zu exprimieren, wurden verschiedene Expressionskassetten zu Hilfe genommen, welche in Abb. 3.19. dargestellt sind. Mit den Expressionskassetten zu pET-22b und pHENHi war es möglich, die scFvs und AFP in *E. coli* zu exprimieren. Dabei wurden für pET-22b der *E. coli* Stamm BL21 verwendet, wohingegen für pHENHi der *E. coli* Stamm XL1-Blue zur Expression verwendet wurde. Die transiente Expression in Tabakpflanzen wurde durch die in Abb. 3.19. dargestellten Expressionskassetten, welche in den Vektor pSSH1 und pTRAc integriert waren, verwirklicht. Die stabile Transformation von *A. thaliana* wurde mit Hilfe des Vektors pTRAc mit zugehöriger Expressionskassette (Abb. 3.19.) durchgeführt. Der Vektor pAHC25 wurde zusammen mit der Expressionskassette, welche anstelle des GUS-Gens in den Vektor integriert wurde, zur Transformation durch „partikel bombardment“ von Reis und Weizen verwendet. In der Tabelle 3.4. soll eine Übersicht über die klonierten Konstrukte in den jeweiligen Vektoren, die Transformation von *E. coli* und Pflanzen, die Expression in Bakterien und *in planta* der unterschiedlichen transgenen Proteine und deren Charakterisierung durch ELISA und Immunoblot gegeben werden.

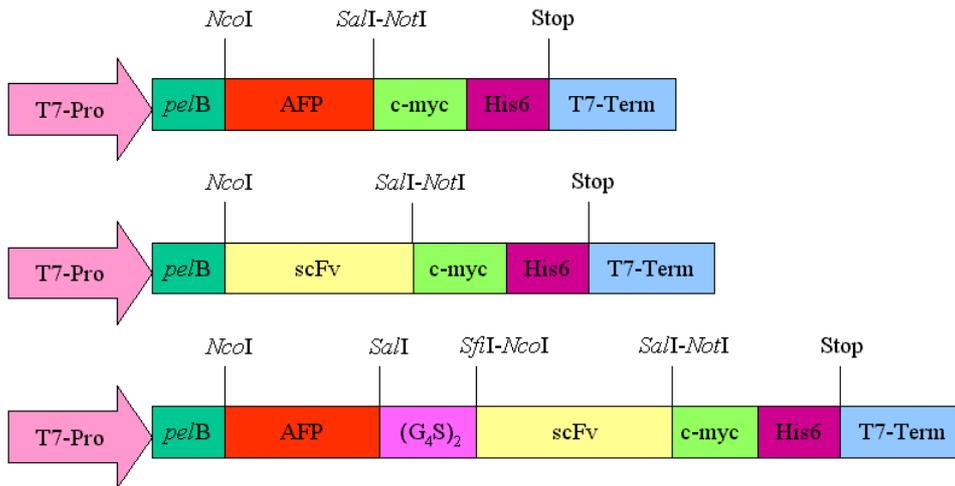
3. Ergebnisse

Tab. 3.4.: Auflistung aller 56 klonierten Konstrukte in den jeweiligen Vektoren und deren Charakterisierung in Bakterien und Pflanzen. + = kloniert bzw. transformiert, + (+) = transformiert und erfolgreich exprimiert, der Nachweis erfolgte durch Immunoblot und/oder ELISA, + (-) = transformiert jedoch keine Expression nachweisbar.

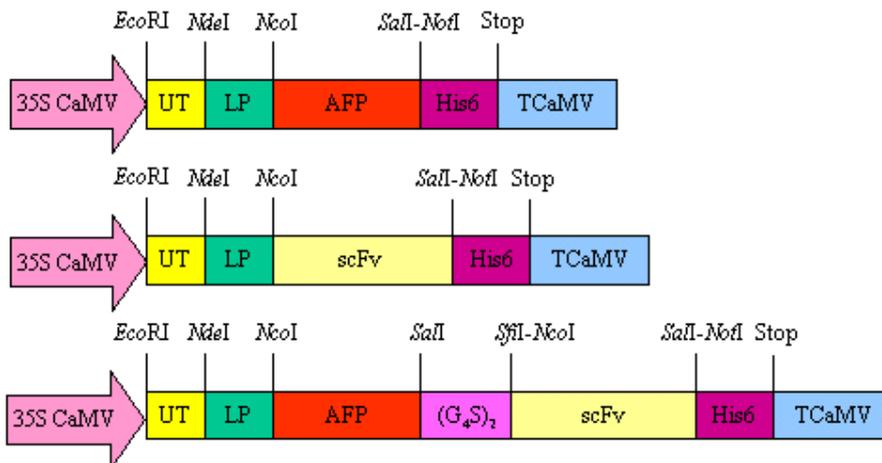
Klonierte Konstrukte	Vektoren						Trans-formation u. Expression in <i>E. coli</i> XL1-Blue	Trans-formation u. Expression in Tabak	Trans-formation u. Expression in <i>Arabidopsis thaliana</i>	Trans-formation von Reis	Trans-formation von Weizen
	pGEMGS	pET22b	pHENHi	pSSH1	pTRAKC	pAHC25					
scFv SPIII7	+	+	+	+	+	+	+(+)	+(+)	+	+	-
scFv CWPD2	+	+	+	+	+	+	+(+)	+(+)	+(+)	+	-
scFv SGB3	+	-	+	-	+	+	+(+)	+(+)	+	+	-
scFv FPCWPA5	+	-	+	-	+	+	+(+)	+(+)	+	+	-
AG-scFv SPIII7	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
ACE-scFv SPIII7	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
MB-scFv SPIII7	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
RS-scFv SPIII7	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Chi-scFv SPIII7	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Glu-scFv SPIII7	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Lacto-scFv SPIII7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AG-scFv CWPD2	+	+	+	-	+	+	+(+)	+(+)	+(+)	+	+
ACE-scFv CWPD2	+	+	+	-	+	+	+(+)	-	-	-	-
MBP-scFv CWPD2	+	+	+	-	-	+	+(+)	-	-	-	-
RS-scFv CWPD2	+	+	+	-	+	+	+(+)	+(+)	+(+)	+	+
Chi-scFv CWPD2	+	+	+	-	+	+	+(+)	+(+)	+(+)	+	+
Glu-scFv CWPD2	+	+	+	-	+	+	+(+)	-	-	-	-
Lacto-scFv CWPD2	+	-	+	-	+	+	+(+)	+(+)	+	+	+
AG-scFv SGB3	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
ACE-scFv SGB3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBP-scFv SGB3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RS-scFv SGB3	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Chi-scFv SGB3	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Glu-scFv SGB3	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Lacto-scFv SGB3	+	-	+	-	+	-	+(+)	-	-	-	-
AG- scFv FPCWPA5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ACE- scFv FPCWPA5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBP- scFv FPCWPA5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RS- scFv FPCWPA5	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Chi- scFv FPCWPA5	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Glu- scFv FPCWPA5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacto- scFv FPCWPA5	+	-	+	-	+	-	+(+)	-	-	-	-
AG	+	-	+	-	+	+	+(+)	+(+)	+	+	-
ACE	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MBP	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RS	+	-	+	-	+	+	+(+)	+(+)	+	+	-
Chi	+	-	+	-	+	+	+(+)	+(+)	+	+	-
Glu	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacto	+	-	-	-	+	+	+(+)	+(+)	+	+	-
AG-scFv PIPP	+	-	+	-	+	+	+(+)	+	+	+	-
ACE-scFv PIPP	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MBP-scFv PIPP	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RS-scFv PIPP	+	-	+	-	+	+	+(+)	+	+	+	-
Chi-scFv PIPP	+	-	+	-	+	+	+(+)	+	+	+	-
Glu-scFv PIPP	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacto-scFv PIPP	+	-	+	-	+	+	+(+)	+	+	+	-
Diabody SPIII7	+	-	+	-	-	-	+(+)	-	-	-	-
Diabody CWPD2	+	-	+	-	+	+	+(+)	+(+)	+	-	-
Diabody SGB3	+	-	+	-	+	-	+(+)	+(+)	+	-	-
Diabody FPCWPA5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
AG-Diabody CWPD2	+	-	+	-	+	-	+(+)	+(+)	+	-	-
AG-Diabody SGB3	+	-	+	-	+	-	+(+)	+(+)	+	-	-
ACE-Diabody SGB3	+	-	+	-	+	-	+(+)	+(+)	+	-	-
MBP-Diabody SGB3	+	-	+	-	+	-	+(+)	+(+)	+	-	-
RS-Diabody SGB3	+	-	+	-	+	-	+(+)	+(+)	+	-	-
Chi Diabody SGB3	+	-	+	-	+	-	+(+)	+(+)	+	-	-

3. Ergebnisse

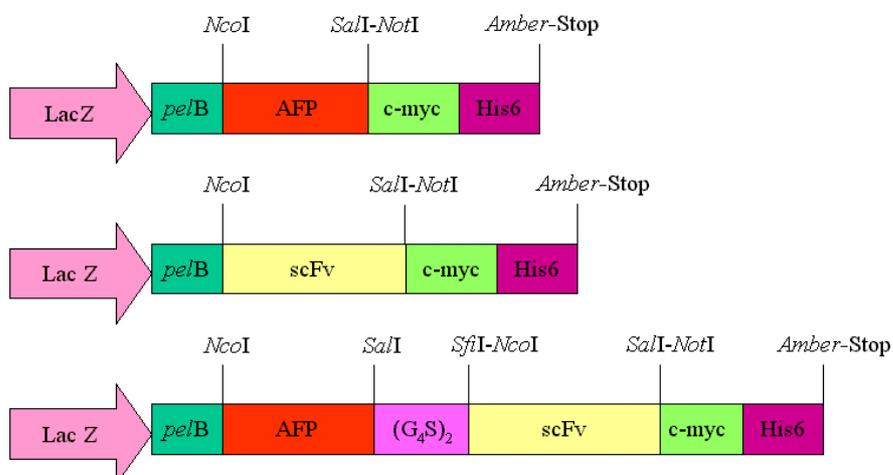
Expressionskassetten in pET-22b:



Expressionskassetten in pTRAcK und pSS^{HI}:



Expressionskassetten in pHENHi:



Expressionskassetten in pAHC25:

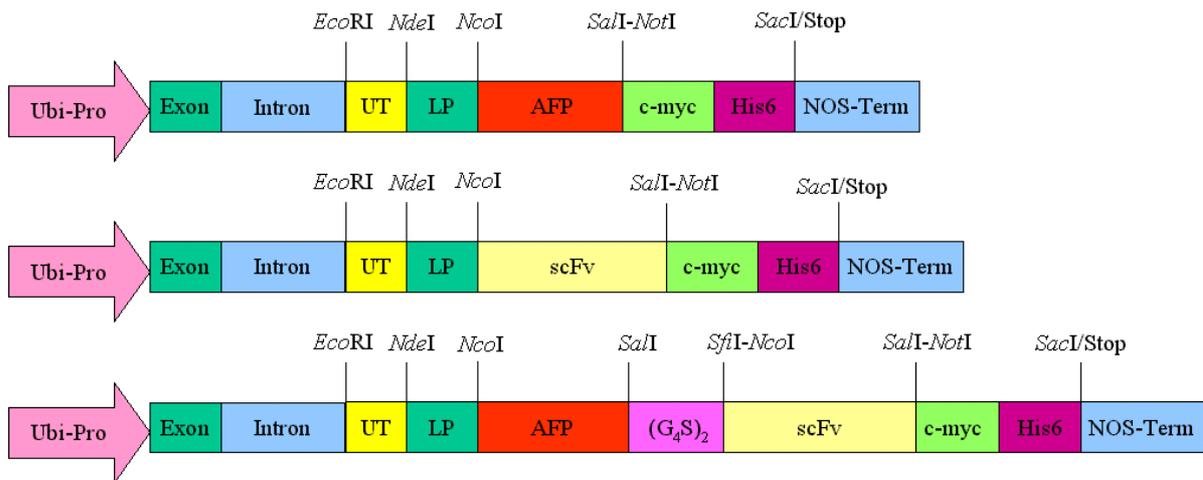


Abb. 3.19.: Expressionskassetten der scFvs, AFP und AFP-scFv Fusionsproteine für die Vektorsysteme pET-22b, pHENHi, pSSH^{HI}, pTRAc und pAHC25. T7-Pro = T7-Promotor; LacZ = LacZ-Promotor; 35S-CaMV = 35S Promotor des „Cauliflower Mosaic Virus“; Ubi-Pro; Ubiquitin-Promotor; *pelB* = Signalsequenz für den Transport ins Periplasma; Exon und Intron = Ubiquitin-Sequenz; UT = 5' untranslatierte Region der Chalconsynthase; LP = codon optimiertes Maus „leader“-Peptid der leichten Kette des rAb24 zum Transport in den Apoplasten (VOSS *et al.*, 1995); AFP = Antifungale Peptide oder Proteine; (G₄S)₂ = Glycin-Serin-Linker (GGGGSGGGGS); c-myc = c-myc-„tag“; His6 = His6-„tag“; T7-Term = T7-Terminationssequenz; TCaMV = Terminationssequenz des „Cauliflower Mosaic Virus“; NOS-Term = NOS-Terminationssequenz. Die Nukleotid- und AS-Sequenzen der AFP, scFvs und des Glycin-Serin-Linkers können dem Anhang 7.6. entnommen werden.

3.8.2. Bakterielle Expression und Charakterisierung der AFP-scFv Fusionen

Sowohl die scFvs als auch die scFv-AFP-Konstrukte wurden in *E. coli* exprimiert, dabei wurden das Expressionssystem pHENHi/XL1-Blue verwendet. Durch die Verwendung von anderen Expressionssystemen wie z.B. pET-22b/BL21 konnten die Expressionsraten nicht gesteigert werden (Daten nicht dargestellt), folglich wurde das Expressionssystem pHENHi/XL1-Blue aus klonierungstechnischen Gründen verwendet. Da die generierten scFvs nach dem „Phage Display“ in diesem System direkt zur Verfügung standen, konnten die AFP leicht integriert werden. Im Überstand der durch IPTG induzierten AFP-scFv-Klone konnten nach einer Inkubation bei 28°C über Nacht (2.3.2.2.) die AFP-scFv Produkte AG-scFv, RS-scFv, Chi-scFv im Immunoblot detektiert werden (2.3.4.). Dies ist beispielhaft an den AFP-scFv CWPD2-Fusionsproteinen in Abb. 3.20. dargestellt. Die AFP-scFv-Fusionsproteine ACe-scFv; MBP-scFv; Glu-scFv konnten nicht in *E. coli* exprimiert werden. Daher wurde im weiteren Verlauf die AFP AG, RS und Chi als Fusionspartner verwendet. Bei der Aufreinigung des scFv-AFP-Konstrukten mittels Ni-NTA konnten diese nicht aufkonzentriert

werden. Zudem waren die scFvs als auch die scFv-AFP-Konstrukte instabil und deren Antigen-spezifität wurde mit zunehmender Lagerung bei 4°C geringer. Bei der Lagerung der scFvs und scFv-AFPs bei -20°C oder -80°C kam es beim Auftauen der Proben ebenfalls zu einer Reduktion der Aktivität gegen das entsprechende Antigen. Der Abbau der scFvs und scFv-AFPs konnte auch nicht durch gängige Proteinaseinhibitoren verhindert werden, nur durch eine entsprechende Aliquotierung konnte dieses Problem minimiert werden (Daten nicht dargestellt). Aus diesem Grunde wurden für nachfolgende Untersuchungen, die sich im Überstand befindlichen, stabilen und sterilfiltrierten scFvs, AFPs und scFv-AFP-Fusionsproteine verwendet. Die Konzentrationen der scFvs, AFPs und scFv-AFP-Fusionen wurden durch „Chemiluminescence-Imaging“ (2.3.5.) anhand eines gereinigten scFv-Standards bestimmt, auf 200 ng/ml eingestellt und konnten nachfolgend bei 4°C stabil gelagert werden. Die auf 200 ng/ml eingestellten scFvs-, AFPs und scFv-AFP-Fusionsproteine wurden in ELISA's und Inhibitionstests eingesetzt (3.9.). Dabei wurde sich zunehmend auf die Untersuchung des scFvs CWPD2 beschränkt, da dieser die größte Affinität zum Antigen aufwies, einer der stabilsten scFvs war und keine internen Restriktionsschnittstellen aufwies, welche die Klonierung erschwert hätten. In den ELISA-Tests wurde festgestellt, dass die scFv-CWPD2-AFP Fusionen eine vergleichbare Affinität zu den entsprechenden Pilzantigenen aufweisen, wie der scFv CWPD2 (Abb.3.21.). Dabei fiel auf, dass die Extinktionswerte des Chitinase-scFv-CWPD2-Fusionsproteins gegenüber den scFv CWPD2 und den anderen AFP-scFv-CWPD2-Fusionen um den Wert 2,4 geringer waren. Diese vielversprechenden Ergebnisse sollten durch Immunfluoreszenzuntersuchungen weiter verifiziert werden.

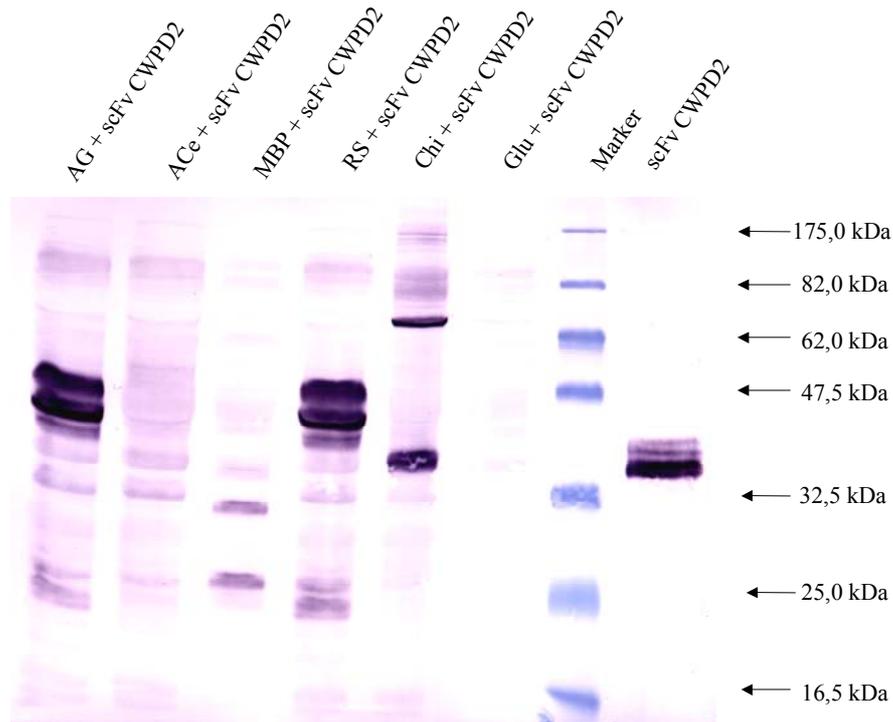


Abb. 3.20.: Immunoblot von *E. coli* Überständen mit AFP-scFv und scFv. Bakterielle AFP-scFv CWP2-Fusionsproteine und scFv CWP2-Klone wurden durch IPTG induziert (2.3.2.2.). 20 µl des Überstandes wurden am nächsten Morgen auf ein SDS-Gel geladen (2.3.3.) und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (2.3.4.). Folgende Nachweisantikörper wurden verwendet: Erster Nachweisantikörper Maus anti c-myc (1:5000); zweiter Nachweisantikörper ZAM IgG Fc-spezifisch AP-markiert (1:5000). Die Färbung erfolgte mit NBT/BCIP. In die Spur Marker wurden 5 µl der „Prestained“-Protein-Marker (NEB) geladen.

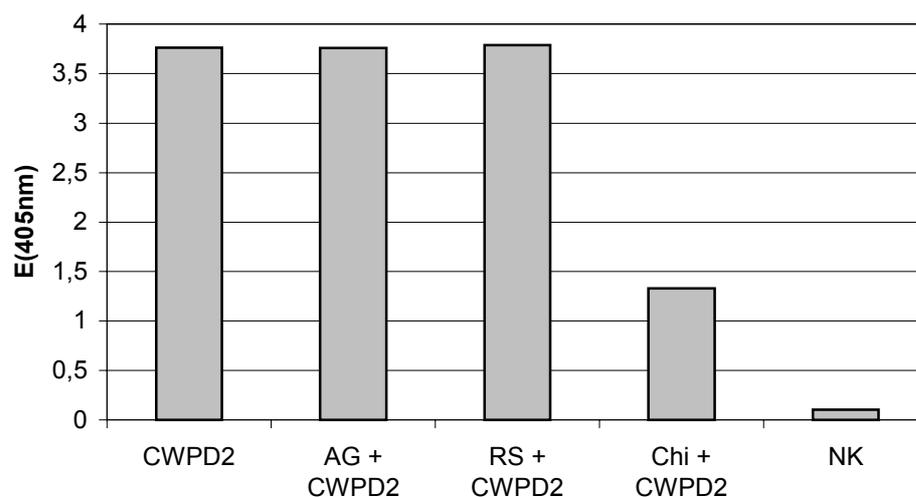


Abb. 3.21.: Reaktivität der bakteriell exprimierten CWP-spezifischen scFv CWP2 und der AFP-scFv CWP2-Fusionen im ELISA. Die ELISA-Platte wurde mit 200 µg/ml CWP beschichtet. Mit einer Konzentration von 50 ng/ml wurden der scFv CWP2 und die AFP-scFv CWP2-Fusionsproteine hinzugegeben und anschließend mit den

Nachweisantikörpern Maus anti c-myc (1:5000) und ZAM IgG Fc-spezifisch AP-markiert (1:5000) inkubiert. Als Substrat wurde p-Nitrophenyl verwendet. Die Extinktion wurde nach einer Stunde Substratinkubation bei 405nm ermittelt. Die Negativ-Kontrolle (NK) stellt Bakterienüberstand ohne rekombinante Proteine dar.

3.8.3. Immunofluoreszenz mit AFP-scFv-Fusionsproteinen

Um die Bindung und biologische Funktion der AFP-scFv-Fusionsproteine auf Pilzstrukturen zu verifizieren, wurden diese zusammen mit ausgekeimten *F. graminearum* Sporen inkubiert und nachfolgend die Bindung der scFv-AFP-Fusionsproteine an der Pilzoberfläche durch einen murinen c-myc-spezifischen mAk und durch einen Ziege α Maus IgG AB Alexa FluorTM detektiert (2.8.). Dabei wurde festgestellt, dass bei den scFvs CWPD2 und den AG-scFv-CWPD2-Fusionsproteinen keine morphologischen Veränderungen des Pilzmyzels zu beobachten waren (Abb. 3.22.). Myzel, welches mit RS-scFv-CWPD2-Fusionsproteinen behandelt wurde, wies eine perforierte Struktur auf (Abb. 3.22.). Pilzhyphen, welche mit Chi-scFv-CWPD2-Fusionsproteinen inkubiert wurden, waren nach der Inkubation völlig verschwunden, lediglich die *F. graminearum* Sporen blieben unversehrt (Abb 3.22.). Dies legt die Vermutung nahe, dass RS als auch die Chitinase physiologisch aktiv waren. So konnte RS die pilzliche Zellwand perforieren und die Chitinase war in der Lage die gesamte Pilzzellwand abzubauen. Basierend auf diesen Daten wurden die Konstrukte AG-scFv-CWPD2, RS-scFv-CWPD2 und Chi-scFv-CWPD2 in Pflanzen exprimiert, um deren Stabilität und Funktionalität *in planta* testen zu können.

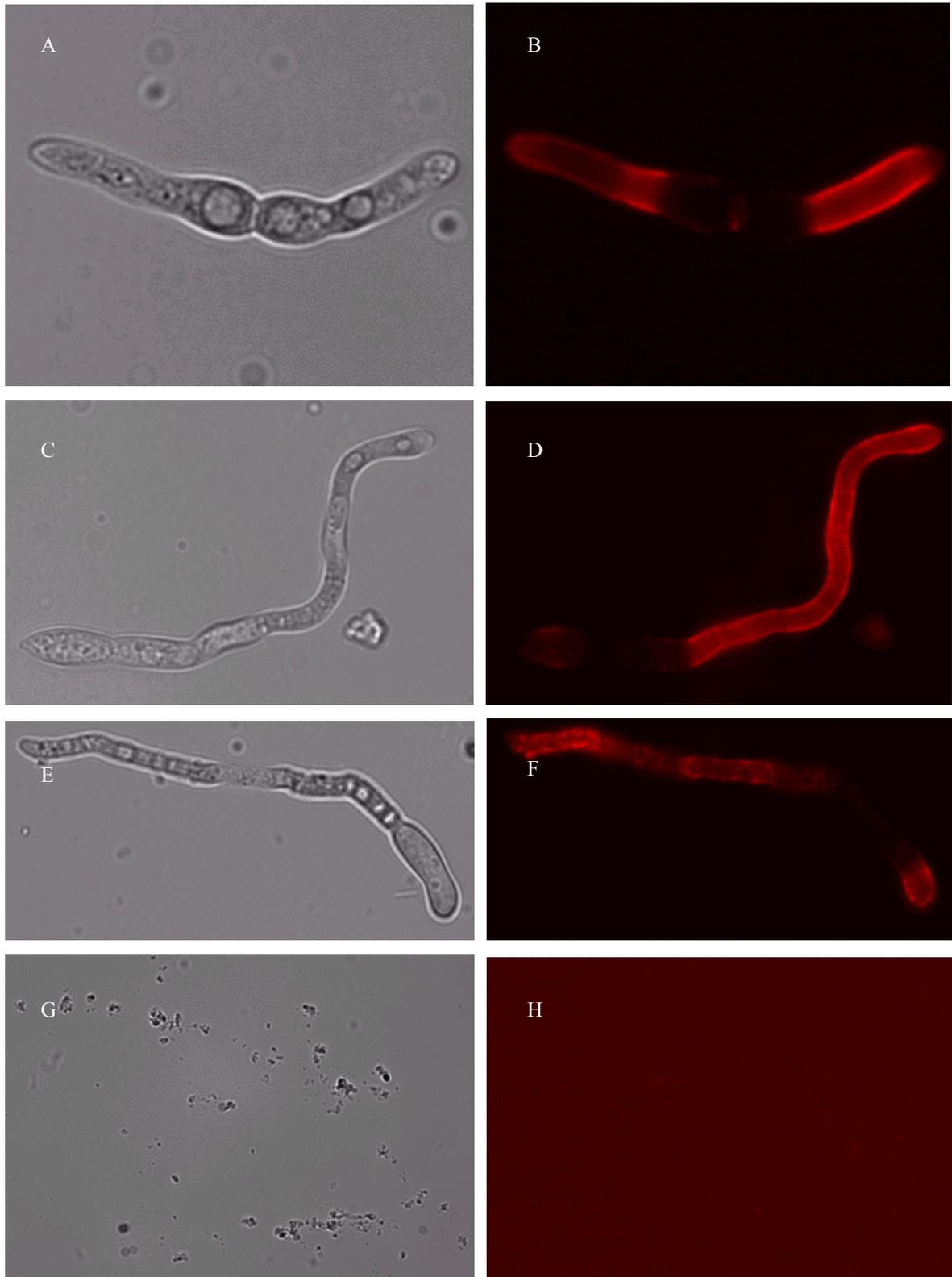


Abb. 3.22.: Immunfluoreszenzanalyse von ausgekeimten *F. graminearum* Sporen inkubiert mit dem scFv CWPD2 und AFP-scFv-CWPD2-Fusionsproteinen. Zum Nachweis der Bindung und biologischen Funktion der scFvs und AFP-scFv-Fusionsproteinen wurden ausgekeimte *F. graminearium* Sporen auf einem Deckglas immobilisiert, mit 500 ng/ml scFv CWPD2 bzw. AFP-scFv-CWPD2-Fusionsproteinen inkubiert und *via* c-myc-,tag“ durch Maus α c-myc mAk (1:5000) und nachfolgend durch Ziege α Maus IgG Ak Alexa Fluor™ 568 (578/603) (H+L) (1:100) fluoreszenzmarkiert (2.8.). Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen (2.8.4.). Im

Bild A ist das Durchlichtbild einer ausgekeimten *F. graminearum* Spore, im Bild B ist die entsprechende Bindung des scFv CWPD2 anhand der Fluoreszenz des Alexa FlourTM zu sehen. Im Bild C ist das Durchlichtbild einer ausgekeimten *F. graminearum* Spore, im Bild D ist die entsprechende Bindung des AG-scFv-CWPD2-Fusionsproteins anhand der Fluoreszenz des Alexa FlourTM verifiziert. Im Bild E ist das Durchlichtbild einer ausgekeimten *F. graminearum* Spore, im Bild F ist die entsprechende Bindung des RS-scFv-CWPD2-Fusionsproteins anhand der Fluoreszenz des Alexa FlourTM zu sehen. Im Bild G ist das Durchlichtbild von Bruchstücken ausgekeimter *F. graminearum* Sporen und in dem Bild H ist das entsprechende Fluoreszenzbild nach Inkubation mit Chi-scFv CWPD2 dargestellt.

3.8.4. Transiente Expression in Tabak

Anhand der transienten Expression der scFvs und AFP-scFv-Fusionen in Tabak sollte festgestellt werden, ob eine stabile Transformation von Pflanzen überhaupt als sinnvoll einzustufen war. Außerdem sollten bei einer entsprechend hohen Expressionsrate die scFvs, AFPs und AFP-scFv-Fusionen über den His6-„tag“ aufgereinigt (2.3.2.4.) und äquivalent zu den bakteriell exprimierten Proteinen in Inhibitionstests eingesetzt werden.

Die transiente Expression in Tabak erwies sich als äußerst schwierig. Die Expressionsrate der scFvs CWPD2, FPCWPA5 und SGB3 betrug 10 µg/g frischem Blattmaterial und ist vergleichbar mit anderen transienten scFv-Expressionen. Die AFP-scFv-Fusionen konnten nur im ng/g Bereich in frischem Blattmaterial nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt). Bei einer Ni-NTA-Aufreinigung (2.3.2.4.) durch den integrierten His-6-„tag“ gingen sowohl die scFvs, die AFPs als auch die AFP-scFv-Fusionsproteine verloren. Folglich konnten mit den aus Tabakblättern isolierten scFvs, AFPs und AFP-scFv-Fusionsproteinen keine Inhibitionstests durchgeführt werden, da deren Konzentration nicht ausreichend war. Durchgeführte ELISA-Experimente mit direkt nach dem Aufschluss aus Blattzellen eingesetzten, nicht aufkonzentrierten scFvs und AFP-scFv-CWPD2-Fusionsproteinen zeigten, eine signifikante Bindung gegen CWP, was deren Funktionalität in der Pflanze implizierte (Abb. 3.23.). Mit den erhaltenen Ergebnissen konnte eine stabile Transformation von *A. thaliana* als Modellpflanze und Reis und Weizen als vielversprechend eingestuft werden.

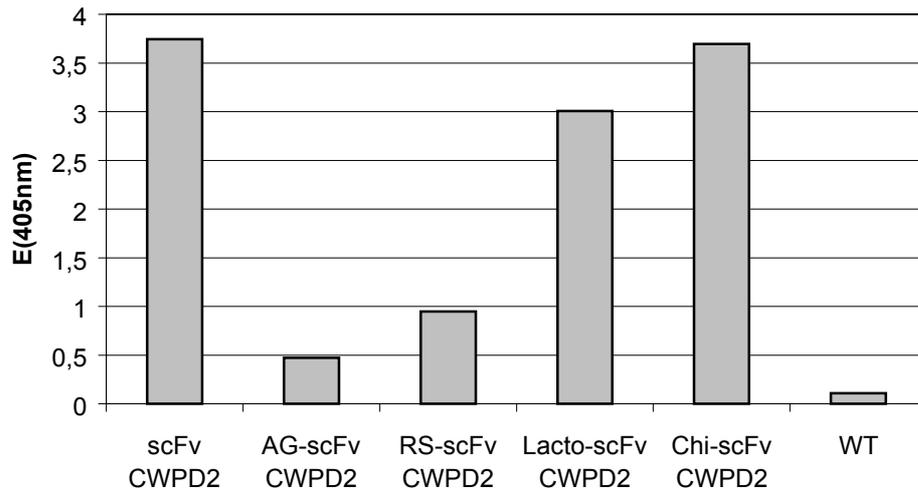


Abb. 3.23.: Reaktivität der in Tabak transient exprimierten CWP-spezifischen scFv CWP2 und der AFP-scFv-CWP2-Fusionen im ELISA. Die ELISA-Platte wurde mit 200 µg/ml CWP beschichtet. Die scFv CWP2 und die AFP-scFv-CWP2-Fusionsproteine wurden direkt nach dem Aufschluss aus Blättern unverdünnt hinzugegeben und anschließend mit einem Maus anti-His6 (1:5000) und ZAM IgG Fc-spezifisch AP-markiert (1:5000) inkubiert. Als Substrat wurde p-Nitrophenyl verwendet. Die Extinktion wurde bei 405nm nach einer Stunde Substratinkubation gemessen.

3.9. Inhibitionstests

Mit Hilfe von Inhibitionstests sollte festgestellt werden, ob die scFvs, AFPs und/oder die AFP-scFv-Fusionsproteine einen inhibitorischen Effekt gegen *F. graminearum* und *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* aufwiesen. Dabei konnten nur scFvs, AFPs und AFP-scFv-Fusionsproteine getestet werden, welche in *E. coli* exprimiert wurden (2.7.), da die Expressionsraten in transienten Tabakpflanzen und stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen zu gering waren, um ausreichende Mengen an AFPs und AFP-scFv-Fusionsproteinen bereit zu stellen (3.8.). Zusätzlich kam erschwerend die Instabilität der scFvs, AFPs und scFv-AFP-Fusionsproteine hinzu, da zu erwarten war, dass die rekombinant hergestellten Proteine unter den Inkubationsbedingungen, welche für das Wachstum des Pilzes optimal waren, schon nach kurzer Zeit degradieren würden und dadurch deren inhibitorischer Effekt verloren gehen würde.

Für den *in vitro* Inhibitionstest wurden folgende Kontrollkonstrukte bakteriell exprimiert: AFPs AG, RS, Chi und die AFPs fusioniert mit einem nicht spezifisch bindenden scFv PIPP (AG-scFv PIPP, RS-scFv PIPP, Chi-scFv PIPP), welcher spezifisch an hCG („Human chorionic gonadotropin“) bindet (Fishal, *et al.*, 1984). Die Konzentration wurde zusammen mit den APF-scFv-CWP2-Fusionsproteinen (AG-scFv CWP2, RS-scFv CWP2, Chi-

scFv CWPD2) durch „Chemiluminescence-Imaging“ bestimmt (2.3.5.) und auf eine Anfangskonzentration von 100ng/ml eingestellt. Die Ergebnisse des Inhibitionstests sind aus Abb. 3.24 zu entnehmen. Dabei wurde festgestellt, dass eine Inhibierung des Pilzwachstums durch die bakteriell exprimierte Proteine AG-scFv CWPD2, RS-scFv CWPD2, Chi-scFv CWPD2 nachvollzogen werden konnte, wobei der inhibitorische Effekt des Chi-scFv CWPD2-Fusionsproteins am stärksten ausfiel. Folglich wurden diese Konstrukte in die engere Wahl genommen, um mit diesen *Arabidopsis*-Pflanzen, Reis und Weizen zu transformieren.

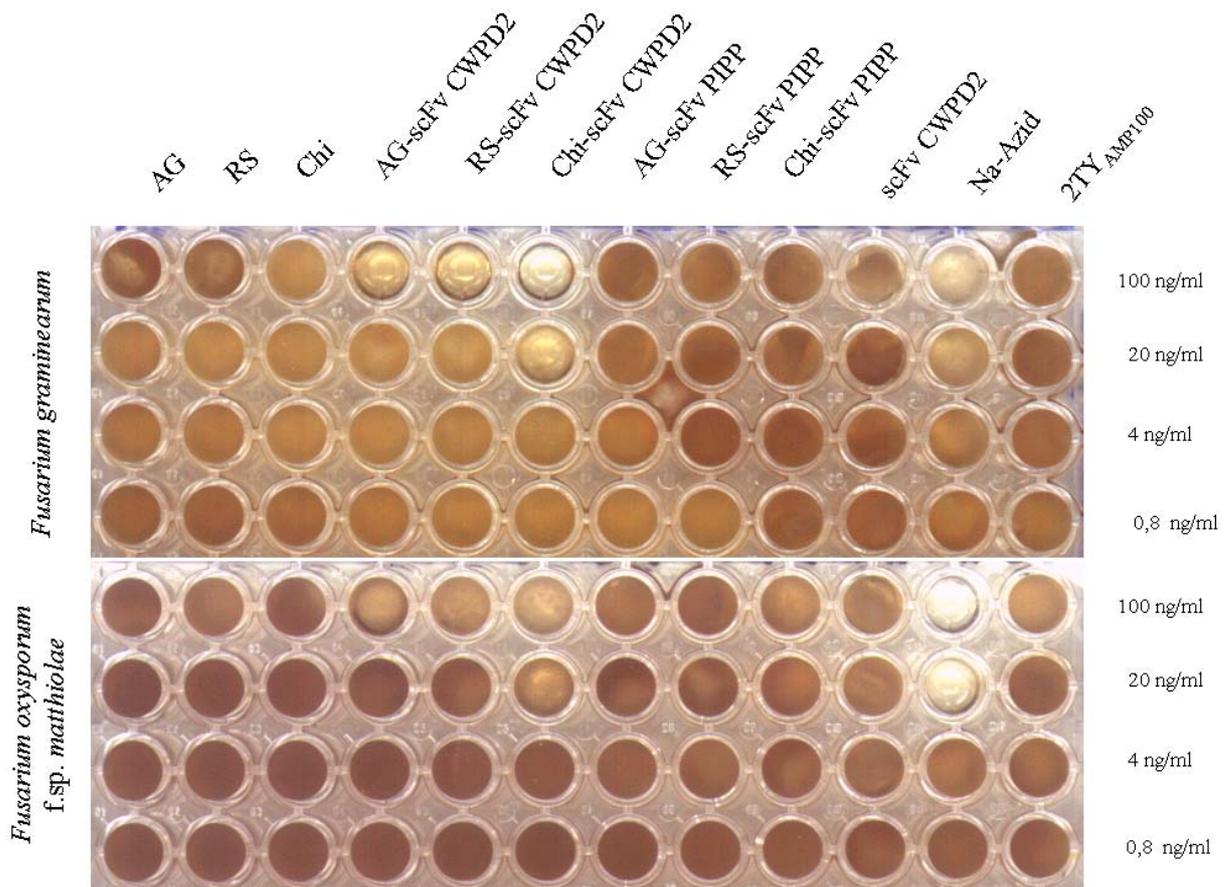


Abb. 3.24: Inhibition des *Fusarium*-Wachstums durch Zugabe von bakteriell exprimierten AFPs, dem scFv CWPD2, AFP-scFv-CWPD2-Fusionsproteinen und AFP-PIPP-Fusionsproteinen. Zu 100 μ l 1×10^5 für 16 h bei 28°C in PDB ausgekeimten *Fusarium*-Sporen pro ml PDB wurden 100 μ l rekombinante Proteine enthaltene Bakterienüberstände mit 200 ng/ml Anfangskonzentration und entsprechenden Verdünnungen (1:5) hinzugegeben. 100 μ l Natrium-Azid wurde mit einer Anfangskonzentration von 0,04 % (w/v) und nachfolgenden 1:5 Verdünnungsschritten als Wachstumsinhibitionskontrolle zugefügt. 2TY_{AMP100}-Medium diente als Kontrolle (2.6.).

3.10. Transformation und Charakterisierung stabil transformierter *Arabidopsis*-Pflanzen

Arabidopsis thaliana cv. Columbia wurde als Modelnpflanze ausgewählt, da sie einfach zu transformieren ist und ihr Generationszyklus nur wenige Wochen beträgt. Zusätzlich stand eine *Fusarium* ssp. (*F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*) zur Verfügung, welche *A. thaliana* cv. Columbia befällt. Die Bindung der generierten scFvs gegen *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* wurde, wie bereits erwähnt, durch ELISA-Test bestätigt (Tab.3.2.).

Folglich konnte *Arabidopsis* als Modelnpflanze verwendet werden, da mit ihr die vielversprechendsten Konstrukte als resistenzinduzierende Faktoren zusammen mit dem Pilz *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* getestet werden konnten. Hier gemachte Erfahrungen sollten später bei der Transformation von Reis und Weizen zur Anwendung kommen (3.11.).

3.10.1. Transformation und Selektion von *Arabidopsis*

Die *Arabidopsis*-Pflanzen wurden durch Eintauchen der Blüten in eine rekombinante Agrobakterien beinhaltende Suspension transformiert (2.7.3.), die Samen geerntet (F₁), sterilisiert, auf Kanamyzin-Platten selektioniert (2.7.4.), in Erde überführt und die Samen geerntet (F₂). Die *Arabidopsis*-F₂-Samen wurden erneut auf Kanamyzin-Platten herangezogen, um nicht stabile Transformanden zu eliminieren, und die kanamyzinresistenten Pflanzen in Erde gepflanzt. Die F₂-Pflanzen wurden dann zur weiteren Untersuchung in PCR-Analysen (3.10.3.1.), ELISA (3.10.3.2.), Immunoblots (3.10.3.3.) und Resistenztests (3.10.3.4.) eingesetzt.

3.10.2. Transformation und Selektion von Reis und Weizen

Die Transformation von Reis (*Oryza sativa*, A19) und Weizen (*Triticum aestivum*) und deren Regeneration ist ein sehr zeitintensiver Prozess. In dieser Dissertation wurden Reis und Weizen mit den vielversprechendsten Konstrukten (AG-scFv CWPD2, RS-scFv CWPD2, Chi-scFv CWPD2) und entsprechenden Kontrollen transformiert und transgene Pflanzen regeneriert (Tab. 3.4.). Deren Charakterisierung durch PCR-Analysen, ELISA, Immunoblots und Resistenztests konnte aus zeitlichen Gründen nicht im Rahmen dieser Doktorarbeit abgeschlossen werden. Eine Übersicht über die transformierten Pflanzen und Konstrukte ist in Tab. 3.4. aufgeführt.

3.10.3. Charakterisierung der transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen

Um Resistenztests durchführen zu können, wurden F₂-Pflanzen bis zu einer Größe von fünf Zentimeter großen Blättern (4-5 Wochen nach der Aussaat) unter Standardbedingungen

herangezogen (2.7.1.). Diese wurden entsprechend vor dem Einsetzen in den Resistenztest durch PCR, ELISA und Immunoblot charakterisiert, um sicherzustellen, dass die Konstrukte stabil in das Pflanzengenom integriert und funktionell exprimiert wurden.

3.10.3.1. PCR-Analyse

Um zu überprüfen, ob die Konstrukte CWPD2, AG, RS, Lacto, Chi, AG-scFv CWPD2, RS-scFv CWPD2, Lacto-scFv CWPD2, Chi-scFv CWPD2, AG-scFv PIPP, RS-scFv PIPP, Lacto-scFv PIPP, Chi-scFv PIPP stabil ins *Arabidopsis*-Genom ausgewählter Kanamycin-resistenter Linien integriert waren, wurde genomische DNS isoliert (2.7.6.). Mit Hilfe der Primer pS-3' und pS-5' (Tab. 7.9) wurden die integrierten Konstrukte amplifiziert (2.2.13.2.), auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.). Wie aus Abb. 3.25. zu entnehmen ist, konnten alle Banden der amplifizierten Inserts mit der erwarteten Größe nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass die Konstrukte scFv CWPD2, AG, RS, Lacto, Chi, AG-scFv CWPD2, RS-scFv CWPD2, Lacto-scFv CWPD2, Chi-scFv CWPD2, AG-scFv PIPP, RS-scFv PIPP, Lacto-scFv PIPP, Chi-scFv PIPP stabil in das *Arabidopsis*-Genom integriert worden waren.

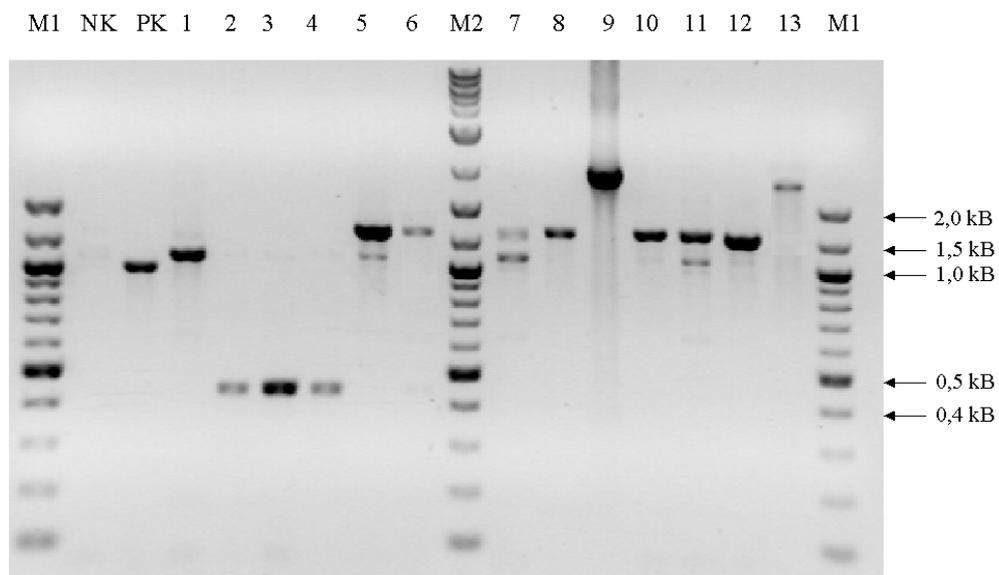


Abb. 3.25.: Inverse Darstellung der Kontroll-PCR-Produkte bei der genomische DNS transgener *A. thaliana* Linien als Template diente. Genomische *A. thaliana* DNS transgener Linien wurde in einer PCR durch die Primer pS3' und pS5' (Tab. 7.9.) amplifiziert (2.2.13.2.), auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.). Als Marker M1 wurden 10 µl des 100 Bp-„ladder“ Markers (NEB) und als Marker M2 wurden 10 µl des 2-Log Markers (NEB) aufgetragen. Die Negativ-

Kontrolle (NK) bestand aus dem Primermix pS3' und pS5' (Tab. 7.9.). Als Positiv-Kontrolle (PK) diente *Arabidopsis* DNS mit einem integrierten GFP-Konstrukt. In die Slots 1 – 13 wurden je 10 µl der PCR-Produkte folgender *A. thaliana* F₂ Linien geladen: 1 = scFv CWPD2 Linie 2; 2 = AG Linie 2; 3 = RS Linie 4; 4 = Lacto Linie 1; 5 = Chi Linie 4; 6 = AG-scFv CWPD2 Linie 15; 7 = RS-scFv CWPD2 Linie 3; 8 = Lacto-scFv CWPD2 Linie 3; 9 = Chi-scFv CWPD2 Linie 5; 10 = AG-scFv PIPP Linie 5; 11 = RS-scFv PIPP Linie 1; 12 = Lacto-scFv PIPP Linie 1; 13 = Chi-scFv PIPP Linie 6.

3.10.3.2. ELISA

Um die Funktionalität der in *A. thaliana* integrierten Konstrukte scFv CWPD2, AG, RS, Lacto, Chi, AG-scFv CWPD2, RS- scFv CWPD2, Lacto-scFv CWPD2, Chi-scFv CWPD2, AG-scFv PIPP, RS-scFv PIPP, Lacto-scFv PIPP, Chi-scFv PIPP zu überprüfen, wurden Gesamt-Proteinextrakte aus den *Arabidopsis*-Blättern (2.7.5.) direkt im ELISA eingesetzt und deren Bindungsspezifität gegen die Antigene CWP und hCG getestet (2.4.1.1.). Wie aus der Abb. 3.26. zu entnehmen ist, weisen die in *A. thaliana* exprimierten Konstrukte scFv CWPD2, AG-scFv CWPD2, RS-scFv CWPD2, Lacto-scFv CWPD2 und Chi-scFv CWPD2 eine signifikante Bindungsaktivität für CWP auf. Die AFP-scFvs-PIPP zeigten ebenfalls eine detektierbare Reaktivität gegen das korrespondierende Antigen hCG (Abb. 3.27.). Diese Ergebnisse zeigten die erfolgreiche Expression der Konstrukte scFv CWPD2, AG-scFv CWPD2, RS- scFv CWPD2, Lacto-scFv CWPD2, Chi-scFv CWPD2, AG-scFv PIPP, RS-scFv PIPP, Lacto-scFv PIPP und Chi-scFv PIPP in *Arabidopsis*, wobei deren Funktionalität ebenfalls verifiziert werden konnte. Die AFP AG, RS, Lacto und Chi konnten selbst in modifizierten ELISA-Ansätzen (direktes immobilisieren der AFP auf die ELISA-Platten) nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was vermutlich an der zu geringen Konzentration der AFP im Gesamt-Proteinextrakt lag.

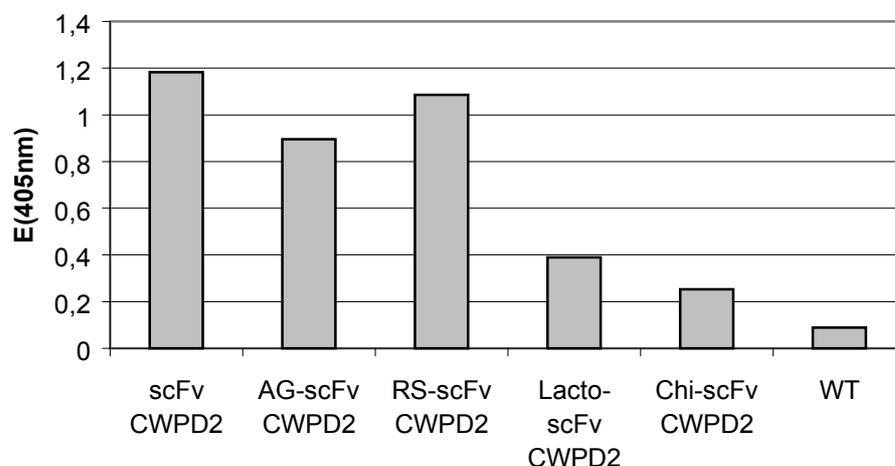


Abb. 3.26.: Reaktivität der in transgen *Arabidopsis* exprimierten CWP-spezifischen scFv CWPD2 und der AFP-scFv-CWPD2-Fusionen. Die ELISA-Platte wurde mit 200 µg/ml CWP beschichtet. Die scFv CWPD2 und die AFP-scFv-CWPD2-Fusionsproteine

wurden direkt nach dem Aufschluss aus Blättern unverdünnt eingesetzt und anschließend mit den Nachweisantikörpern Maus anti His6 (1:5000) und ZAM IgG Fc-spezifisch AP-markiert (1:5000) inkubiert. Als Substrat wurde p-Nitrophenyl verwendet. Die Extinktion wurde nach einer Stunde bei 405nm gemessen. Es wurden folgende transgene Linien der F₂ verwendet: scFv CWPD2 Linie 2; AG-scFv CWPD2 Linie 15; RS-scFv CWPD2 Linie 3; Lacto-scFv CWPD2 Linie 3 und Chi-scFv CWPD2 Linie 5

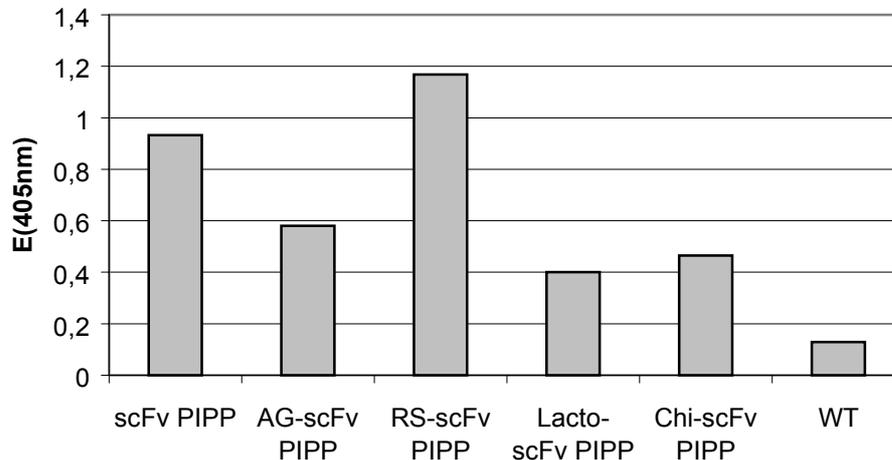


Abb. 3.27.: Reaktivität der in transgenen Arabidopsislinien exprimierten hCG-spezifischen AFP-scFv-PIPP-Fusionen. Die ELISA-Platte wurde mit 10 µg/ml hCG beschichtet. Die AFP-scFv- PIPP-Fusionsproteine wurden direkt nach dem Aufschluss aus Blättern unverdünnt und der aufgereinigte scFv PIPP mit einer Konzentration von 1µg/ml eingesetzt und anschließend mit den Nachweisantikörpern Maus anti His6 (1:5000) und ZAM IgG Fc-spezifisch AP-markiert (1:5000) inkubiert. Als Substrat wurde p-Nitrophenyl verwendet. Die Extinktion wurde nach einer Stunde bei 405nm gemessen. Es wurden folgende transgene Linien der F₂ verwendet: AG-scFv PIPP Linie 5; RS-scFv PIPP Linie 1; Lacto-scFv PIPP Linie 1 und Chi-scFv PIPP Linie 6.

3.10.3.3. Immunoblot

Um die Expressionsrate und die korrekte Größe der in *A. thaliana* integrierten Konstrukte scFv CWPD2, AG, RS, Lacto, Chi, AG-scFv CWPD2, RS- scFv CWPD2, Lacto-scFv CWPD2, Chi-scFv CWPD2, AG-scFv PIPP, RS-scFv PIPP, Lacto-scFv PIPP, Chi-scFv PIPP zu verifizieren, wurden 20 µl des Gesamt-Proteinextraktes aus den *Arabidopsis*-Blättern (2.7.5.) auf ein SDS-PAA-Gel geladen (2.3.3.), anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anhand des His6-„tags“ nachgewiesen (2.3.4.). Jedoch reichte nur die Expressionsrate des scFv CWPD2 aus, um diesen im Immunoblot klar anfärben zu können (Daten nicht dargestellt). Da die experimentellen Daten aus den ELISA-Tests (3.10.3.2.) die Funktionalität der integrierten Kontrukte implizierten, wurden nachfolgend Resistenztests mit den transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen durchgeführt (3.10.3.4.).

3.10.3.4. Resistenztests

Durch Resistenztests an transgenen *A. thaliana* F₂-Linien sollte der resistenzinduzierende Effekt der Konstrukte scFv CWPD2, AG, RS, Lacto, Chi, AG-scFv CWPD2, RS-scFv CWPD2, Lacto-scFv CWPD2, Chi-scFv CWPD2, AG-scFv PIPP, RS-scFv PIPP, Lacto-scFv PIPP und Chi-scFv PIPP untersucht werden. Dazu wurden *A. thaliana* Pflanzen mit *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* Sporen besprüht und drei Wochen lang bei 23°C unter zwölfstündiger Belichtung und einer mittleren bis hohen Luftfeuchtigkeit inkubiert (2.7.8.). Es wurden jeweils 10 Pflanzen der F₂ Linien scFv CWPD2 Linie 2, AG Linie 2, RS Linie 4, Lacto Linie 1, Chi Linie 4, AG-scFv CWPD2 Linie 15, RS-scFv CWPD2 Linie 3, Lacto-scFv CWPD2 Linie 3, Chi-scFv CWPD2 Linie 5, AG-scFv PIPP Linie 5, RS-scFv PIPP Linie 1, Lacto-scFv PIPP Linie 1, Chi-scFv PIPP Linie 6 und GFP Linie 1 und 10 Pflanzen des nicht transgenen Wildtyps, welche in der PCR (3.10.3.1.) und den ELISA-Experimenten (3.10.3.2.) positiv getestet wurden, eingesetzt. Die Pflanzen wurden vor sowie nach 1,5, 2 und 3 Wochen nach der Inokulation dokumentiert. Bereits nach ein einhalb Wochen konnten erste Symptome eines Pilzbefalls, wie Verfärbungen von Blättern und von Blattstielen, bei den Wildtyp-Pflanzen und den GFP exprimierenden Pflanzen festgestellt werden. Nach zwei Wochen konnten die gleichen Symptome bei den Pflanzen der Linien scFv CWPD2 Linie 2, AG Linie 2, RS Linie 4, Lacto Linie 1, Chi Linie 4, AG-scFv PIPP Linie 5, RS-scFv PIPP Linie 1, Lacto-scFv PIPP Linie 1 und Chi-scFv PIPP Linie 6 beobachtet werden. Die Pflanzen der transgenen Linien AG-scFv CWPD2 Linie 15, RS-scFv CWPD2 Linie 3, Lacto-scFv CWPD2 Linie 3 und Chi-scFv CWPD2 Linie 5 zeigten auch nach drei Wochen nur vereinzelt Verfärbungen an den Blättern, währenddessen die Pflanzen der Linien scFv CWPD2 Linie 2, AG Linie 2, RS Linie 4, Lacto Linie 1, Chi Linie 4, AG-scFv PIPP Linie 5, RS-scFv PIPP Linie 1, Lacto-scFv PIPP Linie 1, Chi-scFv PIPP Linie 6 und GFP Linie 1 und die Wildtyp-Pflanzen bereits abgestorben waren. Eine Übersicht über den Infektionsverlauf bei den unterschiedlichen transgenen Pflanzenlinien und den Wildtyp-Pflanzen (Tab. 3.5.) zusammen mit der Expression in *E. coli* und den *in vitro* Inhibitionstests sind in der Tab. 3.6. zusammengefaßt. Dieser ist zu entnehmen, dass die Konstrukte scFv-CWPD2-AFP eine höhere Resistenz induzieren als die Konstrukte scFv CWPD2, AFPs und AFP-scFv-PIPPs. Die transgenen AFP-scFv-PIPPs Pflanzen zeigten eine verzögerte Symptomausprägung gegen *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* als die scFv CWPD2- und AFP-Pflanzen. Diese wiederum zeigten später Befallssymptome als der Wildtyp- und die GFP-Pflanzen (Abb. 3.28.; 7.2-7.4.). Anhand dieser Experimente konnte eine signifikante rAk vermittelte Resistenz gegen Fusarien durch die Fusion des *Fusarium*-spezifischen-scFvs mit AFPs erstmals belegt

werden. Abschließend kann festgehalten werden, dass nach Betrachtung der erhaltenen experimentellen Daten aus der Immunfluoreszenzmikroskopie (3.8.3.), den Inhibitionstests (3.9.) und den Resistenztests sich die Konstrukte RS-scFv CWPD2, Lacto-scFv CWPD2 und Chi-scFv CWPD2 als die vielversprechendsten zur Erzeugung von Ak-vermittelter Resistenz gegen Fusarien *in planta* herausstellten.

Tab. 3.5.: Infektionsverlauf bei den unterschiedlichen transgenen *Arabidopsis*-Linien und den Wildtyp-Pflanzen. Transgene *A. thaliana* Pflanzen wurden mit 1×10^5 *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* Sporen/ml besprüht und drei Wochen lang bei 23°C unter zwölfstündiger Belichtung und einer mittleren bis hohen Luftfeuchtigkeit inkubiert (2.7.8.). Es wurden jeweils 10 Pflanzen der F₂ Linien scFv CWPD2 Linie 2, AG Linie 2, RS Linie 4, Lacto Linie 1 (Ausnahme nur 6 Pflanzen standen zur Verfügung), Chi Linie 4, AG-scFv CWPD2 Linie 15, RS-scFv CWPD2 Linie 3, Lacto-scFv CWPD2 Linie 3, Chi-scFv CWPD2 Linie 5, AG-scFv PIPP Linie 5, RS-scFv PIPP Linie 1, Lacto-scFv PIPP Linie 1, Chi-scFv PIPP Linie 6 und GFP Linie 1 und 10 Pflanzen des nicht transgenen Wildtyps eingesetzt. Die Pflanzen wurden vor sowie nach 1,5, 2 und 3 Wochen nach der Inokulation dokumentiert. o.S. = ohne Symptome; S. = Symptome; + = abgestorben.

Genotypen	Wochen								
	1,5			2			3		
	o.S.	S.	+	o.S.	S.	+	o.S.	S.	+
WT	0	8	2	0	0	10	0	0	10
GFP	0	8	2	0	1	9	0	1	9
AG-scFv PIPP	2	8	0	0	3	7	0	1	9
RS-scFv PIPP	4	6	0	0	4	6	0	4	6
Lacto-scFv PIPP	2	8	0	0	7	3	0	4	6
Chi-scFv PIPP	3	7	0	0	5	5	0	3	7
AG-scFv CWPD2	9	1	0	8	2	0	1	9	0
RS-scFv CWPD2	10	0	0	10	0	0	7	3	0
Lacto-scFv CWPD2	8	2	0	8	2	0	8	2	0
Chi-scFv CWPD2	9	1	0	9	1	0	5	2	3
AG	1	9	0	0	10	0	0	1	9
RS	6	4	0	0	8	2	0	5	5
Lacto	2	4	0	0	6	0	0	2	4
Chi	6	4	0	2	5	3	0	5	5
scFv CWPD2	6	4	0	0	9	1	0	3	7

Tab. 3.6.: Zusammenfassung der Ergebnisse der *E. coli* Expression, des *in vitro* Assays, der Akkumulation der rekombinanten Proteine und der Resistenztests mit transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen. Die rekombinanten Proteine scFv CWPD2, die AFP, die AFP-scFv CWPD2- und die AFP-scFv PIPP-Fusionsproteine wurden in *E. coli* exprimiert und durch Immunoblot und/oder ELISA nachgewiesen¹. Die bakteriell exprimierten rekombinanten Proteine wurden in einem *in vitro* Assays zur Analyse der antifungalen Aktivität gegen *F. graminearum* und *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* eingesetzt². Die rekombinanten Proteine wurden in stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen akkumuliert und mittels Immunoblot und/oder ELISA nachgewiesen³. Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen wurden mit *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* infiziert und nach drei Wochen auf eine Resistenz untersucht⁴. S = susceptible Pflanze; r = gering resistente Pflanzen; R= resistente Pflanze.; + = positiv; - = negativ, n.d. = nicht durchgeführt.

	Konstrukte	<i>E. coli</i> Expression ¹	<i>in vitro</i> Assay ²	rekombinante Protein-Akkumulation in <i>A. thaliana</i> ³	Bioassay ⁴
WT	-	-	-	-	s
GFP	GFP	n.d.	n.d.	+	s
scFv	scFv CWPD2	+	-	+	r
AFP	AG	+	-	+	r
	RS	+	-	+	r
	Lactoferricin	-	-	+	r
	Chitinase	+	-	+	r
AFP-scFv Fusionsproteine	AG-scFvCWPD2	+	+	+	R
	RS-scFvCWPD2	+	+	+	R
	Lactoferricin-scFvCWPD2	-	-	+	R
	Chitinase-scFvCWPD2	+	+	+	R
	AG-scFvPIPP	+	-	+	r
	RS-scFvPIPP	+	-	+	r
	Lactoferricin-scFvPIPP	-	-	+	r
	Chitinase-scFvPIPP	+	-	+	r



Abb. 3.28.: Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen drei Wochen nach der Infektion mit *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*. Fünf Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen wurden mit einer Sporensuspension von 1×10^5 Sporen/ml (*F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*) an drei aufeinanderfolgenden Tagen während der Dunkelperiode benetzt. Die Inkubation der *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12h/12h, 23°C, einer mittleren bis hohen Luftfeuchtigkeit und einer Beleuchtung von 10000 Lux. Die Pflanzen wurden 3 Wochen nach der Inokulation photographisch dokumentiert (2.7.8.). Von links nach rechts jeweils 5 Pflanzen einer Linie in einer Reihe von vorne nach hinten. 1. Reihe nicht mit *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* infizierte Pflanzen; 2. Reihe Wildtyp-Pflanzen; 3. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen GFP; 4. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen AG-scFv PIPP; 5. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen RS-scFv PIPP; 6. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Lacto-scFv PIPP; 7. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Chi-scFv PIPP; 8. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen AG-scFv CWPD2; 9. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen RS-scFv CWPD2; 10. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Lacto-scFv CWPD2; 11. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Chi-scFv CWPD2; 12. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen AG; 13. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen RS; 14. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Lacto; 15. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Chi; 16. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen scFv CWPD2.

4. Diskussion

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten dienten dazu, neue innovative molekularbiologische Methoden gegen Fusarien-Krankheiten bei Pflanzen zu entwickeln. Dazu sollten rekombinant hergestellte Proteine exprimiert werden, welche spezifisch mit dem Pathogen in der transgenen Pflanze interagieren, um eine Pilz-Resistenz zu induzieren. Es wurde der Ansatz einer Antikörper-vermittelten Resistenz in Pflanzen verfolgt und zur Bekämpfung von pilzlichen Pathogenen entscheidend weiterentwickelt. Nach Herstellung von scFvs, die an Fusarienoberflächenproteine spezifisch banden und mit antifungalen Peptiden und Proteinen fusioniert wurden, konnte nach deren Expression in *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia erstmals eine Antikörper-vermittelte Resistenz der transgenen Pflanzen gegen *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* nachgewiesen werden.

4.1. Isolierung von Pilz-Antigenen

Ein entscheidender Schritt zum Gelingen dieser Arbeit war die Auswahl und Isolierung erfolgsversprechender pilzlicher Targetmoleküle. Antikörper (Ak), welche spezifisch Oberflächenproteine von Pilzen detektieren können, wurden bereits in der Literatur beschrieben (CHRISTOPHER *et al.*, 1997; THORNTON, *et al.*, 1997). Dabei konnten Ak bislang gegen unbekannte Strukturen auf Konidiosporen, pilzliche sekretierte Proteine, Zellwand-Fragmente und Zelloberflächenstrukturen von Myzel generiert werden (PAIN *et al.*, 1992; ROBERT *et al.*, 1993; GOEBEL *et al.*, 1995; MURDOCH *et al.*, 1998, PESCHEN, 1999). Um ein möglichst effektives Target aus der Vielzahl unbekannter pilzlicher Zielmoleküle auszuwählen, muß der Infektionszyklus von *F. graminearum* berücksichtigt werden. Da der Infektionszyklus von *F. graminearum* in der Literatur nicht genau beschrieben wird, wurden Arbeiten von KANG und BUCHENAUER (1999; 2000) zu Hilfe gezogen. Hier wird die Penetration des Pilzes *F. culmorum* beschrieben, ein mit *F. graminearum* sehr nah verwandter Schadpilz, welcher zusammen mit *F. graminearum* bei Weizen (*Triticum aestivum*) die Taubährigkeit hervorruft. *F. culmorum* keimt auf der Blattoberfläche aus und kann durch Sekretion von Pektinasen, Zellulasen und Xylanasen in die Epidermiszellen eindringen und wächst daraufhin interzellulär weiter (KANG und BUCHENAUER, 2000). Um rekombinante Antikörper (rAk) herzustellen, welche den Pilz sofort nach dem Eindringen in die Pflanze detektieren können, wurden ausgekeimte Sporen (SG) zur Immunisierung der Versuchstiere verwendet (3.3.). Die Keimschläuche und das sich daraus bildende Myzel präsentieren Targets auf ihrer Oberfläche, welche denen beim

Penetrieren und interzellulären Wachstum des Pilzes *in vivo* als äquivalent anzusehen waren. Zusätzlich wurden Zellwandproteine (CWP) verwendet, bei denen das Zytosol entfernt wurde, um nicht Zellwand-spezifische Determinanten zu minimieren. Das dritte pilzliche Antigen, mit dem die Versuchstiere immunisiert wurden, stellte frisch von der Oberfläche von *F. graminearum* abgewachsene lösliche Proteine (FPCWP) dar (3.2.). Diese wurden nicht gefällt bzw. aufkonzentriert, um die Nativität der Proteine beizubehalten. Die Konzentration der Proteine in den Antigenfraktionen SG und FPCWP lag unter der durch SDS-Gel nachzuweisenden Konzentration von 1-10 µg. Diese konnten jedoch durch den scFv SPIII7 im ELISA indirekt nachgewiesen werden (Abb. 3.13.), was deren Funktionalität als Antigen zur Immunisierung der Versuchstiere bestätigte.

4.2. Immunisierung von Hühnern und Mäusen

Die Verwendung von Hühnern zur Immunisierung hat viele Vorteile, so benötigt man im Gegensatz zu Kaninchen und Ziegen eine vergleichsweise geringe Menge an Antigen, die Tierhaltung ist sehr unkompliziert, die polyklonalen IgY-Ak sind schnell, leicht, kostengünstig und mit hohen Ausbeuten aus Eidottern zu isolieren (POLSON *et al.*, 1985; LANDON *et al.*, 1995). Dabei kann zur Konzentrierung der IgY-Ak auf Gelfiltration, Ionenaustausch und thiophile Adsorption verzichtet werden (Monecke 1999). Zudem begünstigt die relativ einfache Organisation der avianen Immunglobulingene die Klonierung der V_H- und V_L-Regionen, da nur ein spezifisches Primer Paar notwendig ist, welches sich an die konservierten Regionen (FR = „frameworks“) der J-Segmente anlagert (MCCORMACK und THOMPSON 1990). Dies ermöglicht eine schnelle und einfache Generierung von avianen scFv-Bibliotheken, welche im „Phage Display“ eingesetzt werden können (DAVIES *et al.*, 1995; YAMANAKA *et al.*, 1996). Das Immunsystem von Mäusen hingegen bietet eine größere Vielfalt an unterschiedlichen Ak und deren Reifung ist ebenfalls divergenter. Durch die mehrfache Immunisierung kommt es zu einem Klassenwechsel von IgM zu IgG. IgG werden in verschiedene Subklassen eingeteilt, wobei vor allem IgG₁ (85%) und IgG_{2a/b} im murinen Blutserum enthalten sind (LEWIN, 1996). Folglich sind die variablen Ak-Domänen nicht so leicht zu klonieren, wenn die hohe Komplexität aufrecht erhalten werden soll, da eine große Anzahl unterschiedlicher Primer eingesetzt werden muss, um die Diversität der Ak in die scFv-Bibliotheken zu garantieren. Dadurch gestaltet sich die Klonierung von murinen scFv-Bibliotheken als zeit- und kostenintensiver.

Um Hühner und Mäuse zur Produktion von antigenspezifischen Ak des IgG- und IgY-Isotyps zu stimulieren, wurden diese mehrmals mit den *F. graminearum* Antigenen CWP, FPCWP

und SG immunisiert (3.3.). Die polyklonalen IgY wurden gereinigt und deren Konzentration zwischen 3,7 und 5,7 mg IgY pro ml Eidotter bestimmt (3.3.), was nach GASSMANN *et al.* (1990) im Rahmen der durchschnittlichen Ausbeuten bei Hühnereigelb liegt. Die murinen polyklonalen IgG-Ak wurden nicht aufgereinigt, da dies auf Grund des geringen Blutvolumens als nicht sinnvoll einzustufen war. Mittels eines indirekten ELISAs wurden die Titer der immunisierten Tiere anhand der sich in den Eidottern und Mäuse-Sera befindlichen spezifischen Ak bestimmt (3.3.). Der Titer gibt diejenige Verdünnung der aus dem Eigelb gereinigten Ak bzw. des Mäuse-Serums an, bei dem eine eindeutige und reproduzierbare Reaktivität mit dem Antigen nachzuweisen ist. Dies war deswegen von hoher Bedeutung, da aus den B-Zellen der Milzen der Versuchstiere deren Ak kodierende mRNA isoliert wurde, welche ein Abbild der sich im Blut bzw. Eigelb befindlichen spezifischen Ak darstellt. Um so spezifischer die Ak gegen die Antigene reagieren, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, aus den Milzzellen der Versuchstiere bereits angereicherte scFv-Bibliotheken zu generieren und nachfolgend hochaffine Antigen-spezifische scFvs zu selektionieren. Nach Monecke (1999) stellen jedoch unlösliche Antigene wie Myzel und Zellwandfragmente ein schlechtes Antigen dar, da die komplexen Strukturen dieser Antigene eine Phagozytose dieser Antigene erschwert, wodurch die Prozessierung dieser durch B-Zellen erschwert wird. Dies stellt jedoch eine Schlüsselfunktion in der humoralen Immunantwort darstellt. Durch die gezielte Auswahl der Antigene konnte diese Schwierigkeit bei den mit CWP, FPCWP und SG immunisierten Hühnern umgangen werden, wohingegen nur die Maus, welche mit CWP immunisiert wurde, einen befriedigenden Titer zeigte. Dies zeigt, dass die Immunantwort von zwei Tierarten gegen das selbe Antigen unterschiedlich ausfallen kann, was auf eine divergente Antigenpräsentations-Maschinerie schließen lässt. Wenn man sich die Titerwerte genau betrachtet, kann eine eindeutige Ak-Spezifität gegenüber den korrespondierenden Antigenen bei allen drei immunisierten Hühnern und der mit CWP immunisierten Maus bis zu einer Verdünnung von 1:100000 festgestellt werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen in der Literatur (FALKENBERG 1998). Hier wurde jedoch nicht ein heterologes Antigen eingesetzt, sondern ein klar definiertes. Dieser Sachverhalt deutet ebenfalls auf eine hohe Affinität des pAk-Gemisches hin, da davon auszugehen ist, dass das erkannte Epitop mit einer relativ geringen Dichte auf der heterogenen Myzeloberfläche präsentiert wird, was die erfolgreiche Immunisierung der Hühner mit den Antigenen CWP, FPCWP und SG und der Maus, welche mit dem Antigen CWP immunisiert wurde, und die richtige Wahl der Antigene untermauerte.

4.3. Herstellung von scFv-Bibliotheken

Um hochspezifische rAk zu regenerieren, welche das Pilzwachstum in Pflanzen inhibieren können, bzw. rAk, welche als Fusion mit antifungalen Peptiden oder Proteinen (AFP) in der Lage waren, eine Resistenz gegen *Fusarium ssp.* bei transgenen Pflanzen hervorzurufen, wurden scFvs verwendet. ScFvs zeigen eine hohe Mobilität beim Passieren von pflanzlichen Zellwänden und werden im Gegensatz zu kompletten Ak zu einem höheren Prozentsatz in den Interzellularraum sekretiert (Fischer *et al.*, 1999b), wo sie mit einem eindringenden Pilz zu einem möglichst frühen Zeitpunkt interagieren können. Die Zellwände wirken wie ein molekulares Sieb mit einer durchschnittlichen Ausschlussgröße von 20-100 kDa (CARPITA *et al.*, 1979). Vollängen Ak sollten mit einer Größe von 150 kDa in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt sein, während scFvs mit einer Größe von ca. 30 kDa problemlos diese Barriere überwinden können.

Zudem kommt die leichte Generierung von scFv durch die Methode des „Phage Displays“ hinzu. Zur Herstellung der scFv-Bibliotheken wurde die mRNA aus den Milzzellen immunsierter Hühner und Mäuse isoliert, weil diese im Gegensatz zur genomischen DNS weder Introns noch Promotorregulationssequenzen aufweisen. Die Ak-kodierenden mRNA konnten durch Ak-spezifische Primer und der Reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben werden. Die cDNS diente als Template für die Amplifikation der variablen Domänen der schweren (V_H) und der leichten Kette (V_L). Die V_H - und V_L -Domänen wurden separat über Restriktionsschnittstellen in das Phagemid pHENHi integriert, welches den durch eine Mutation modifizierten (Tyrosin zu Prolin) 218*-Linker (WHITLOW *et al.*, 1993) beinhaltet. Nachfolgend wurden die V_H -Domänen in die V_L -Bibliotheken und v.v. über die singulären Schnittstellen subkloniert, um sicherzustellen, dass eventuell vorhandene V_H - und V_L -Domänen durch interne Schnittstellen nicht verloren gehen. Der Vektor pHENHI ist in der Lage, durch das *peIB*-Signalpeptid die Proteine in *E. coli* periplasmatisch zu lokalisieren. Durch den angehängten c-myc- und His6-„tag“ konnten diese im Immunoblot und ELISA-Tests nachgewiesen und durch den His6-„tag“ aufgereinigt werden. Das GenIII-Pilotprotein diente zur Oberflächenpräsentation der scFvs. Das Phagemid pHENHi lag im M13-Phagen einzelsträngig und in *E. coli* als doppelsträngige DNS vor (CESARENI, 1987; MEAD und KEMPER, 1987). Es konnte deswegen leichter isoliert, amplifiziert und sequenziert werden. Die Komplexitäten der entstandenen scFv-Bibliotheken konnten anschließend durch „Fingerprinting“ leicht charakterisiert werden. Die avianen Bibliotheken wurden vereinigt, um deren Komplexität zu erhöhen und nachfolgend im „Phage Display“, in dem das Immunsystem in Bakterien simuliert und auf hoch affine scFvs selektioniert werden konnte, eingesetzt.

4.4. „Phage Display“

Im „Phage Display“ (WINTER und MILSTEIN 1991; CLACKSON et al., 1991; BURTON und BARAS, 1993) wurden scFv selektioniert, welche hochaffin gegen Oberflächenstrukturen von *F. graminearum* reagieren (3.6.). Der Erfolg hängt dabei besonders von der Komplexität, der aus immunisierten Tieren stammenden scFv-Bibliotheken, ab. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass Epitope ausgewählt wurden, die durch die Bindung eines scFvs oder eines scFv-AFP-Fusionsproteins das Wachstum des Pilzes inhibieren konnten. Da keinerlei definierte Antigene von *F. graminearum* in der Literatur beschrieben sind, welche durch eine mögliche Ak-vermittelte Blockierung das Wachstum inhibieren könnten, wurden die Antigengemische CWP, FPCWP und SG verwendet. Zusätzlich wurde ein von *F. graminearum* isoliertes Mykotoxin 15-O-Acetyl-4-deoxynivalenol (DON) als Antigen eingesetzt, welches vermutlich für die Infektiosität des Pilzes von besonderer Bedeutung ist (DESJARDINS et al., 1996). Wenn es möglich wäre DON während des Infektionsprozesses zu blockieren, könnte dies zu einer Resistenz der Pflanze gegen *F. graminearum* führen. Eine Immunisierung von Versuchstieren mit DON konnte nicht durchgeführt werden, da das Antigen hochtoxisch für die Versuchstiere ist und eine Immunantwort gegen DON durch die geringe Größe des Antigens nicht zu erwarten war (SYDENHAM et al., 1991; YUAN et al., 1997).

Nach drei Runden des „Phage Displays“ konnten drei spezifische scFvs gegen *F. graminearum* spezifische Targets (CWP, FPCWP und SG) selektiert werden. Eine Anreicherung von Phagen gegen das Antigen DON konnte nicht erreicht werden. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass die Hühner nicht mit DON immunisiert wurden und es dadurch nicht zu einer Immunantwort gegen das Toxin kommen konnte. Dadurch waren die erhaltenen Bibliotheken CWP, FPCWP und SG, im Gegensatz zu den immunisierten Antigenen CWP, FPCWP und SG, nicht mit DON bindenden scFvs angereichert und folglich war die Komplexität der Bibliotheken von ca. 10^7 unterschiedlichen scFv Kombinationen nicht ausreichend, um einen DON spezifischen scFv zu isolieren. Eine spezifische Immunantwort gegen DON hätte jedoch mit der Kopplung des Toxins an ein Trägermolekül hervorgerufen werden können (CHU et al., 1979). Dies war jedoch im zeitlichen Rahmen dieser Dissertation nicht durchzuführen.

Die Integration eines His6-„tags“ in das Phagemid pHEN4II brachte diverse Vorteile. So konnte durch das Screenen der scFv-Bibliotheken mit C-terminal fusionierten c-myc- und His6-„tags“ ein unüberwindbarer inhibitorischer Effekt auf die Faltung und dadurch auf die Bindung der selektionierten scFvs durch die integrierten „tags“ ausgeschlossen werden, da

nicht korrekt gefaltene scFvs herausselektioniert werden. Durch den c-myc-„tag“ war eine Identifizierung der löslichen scFvs schon bei sehr geringen Konzentrationen möglich, und durch den His6-„tag“ konnten die rekombinanten Proteine durch Affinitäts-Chromatographie auf Ni-NTA Säulen durch das Prinzip der Metallionen-Chelat-Komplexbildung (IMAC = immobilisierte Metall Chelat Affinitäts-Chromatographie) gereinigt werden. Weder der c-myc- noch der His6-„tag“ hatten einen Einfluss auf die Funktionalität der selektionierten scFvs und auch der Membrandurchtritt wurde nicht verhindert, da die scFvs im Bakterienüberstand zu finden waren.

4.5. Charakterisierung der Pilz-spezifischen scFv

Durch die Sequenzierung der scFvs CWP2, FPCWP2 und SGB3 und anschließendem „Alignment“ konnten durch die Regeln von KABAT (1990) die scFvs als solche anhand der eindeutig zuzuordnenden hypervariablen Bereiche (CDRs = „complementarity determining regions“) und FR-Regionen identifiziert werden (3.7.1.). Dabei fiel auf, dass in der CDR-H3 Region der scFvs CWP2 und FPCWPA5 zwei Cysteine vorhanden waren. Diese Cysteine sind in der Lage Disulfid-Brücken untereinander auszubilden, welche besonders bei langen CDR-H3 Regionen als stabilisierender Faktor und zur korrekten Faltung der Ak-Bindungsstelle angesehen wird (MUYLDERMANS *et al.*, 1994).

Als Expressionssystem für die scFvs wurde *E. coli* System verwendet. Dabei ist es möglich, die scFvs zytoplasmatisch oder periplasmatisch zu lokalisieren. Die zytoplasmatische Antikörper-Produktion führt oftmals dazu, dass die Proteine in unlöslicher und inaktiver Form in der Zelle als Einschlusskörper („inclusion bodies“) ausfallen. Das N-terminal fusionierte Signalpeptid *pelB* lokalisierte die Antikörper-Fragmente in den periplasmatischen Raum, wo diese mit relativ wenigen bakteriellen Wirtsproteinen kontaminiert werden. Durch die spontane Porosität der äußeren Membran wurden die scFvs auch teilweise in das Medium sekretiert. Die sekretierten periplasmatischen Proteine konnten dadurch vor den vorwiegend im Zytoplasma lokalisierten Proteasen geschützt werden (SWAMY *et al.*, 1982). Der Membrandurchtritt und das oxidative Milieu des periplasmatischen Raumes begünstigte die verbesserte Faltung. Obwohl die Expression in *E. coli* mittlerweile eine gängige molekularbiologische Technik ist, ist sie nicht trivial und bedarf unter Umständen einer Optimierung je nach exprimiertem Protein. Zur Detektion und Reinigung wurden c-myc- und His6-„tags“ integriert. Die rekombinanten Proteine konnten sowohl im Periplasma als auch im Überstand nachgewiesen werden (3.7.2.), was auf eine gesteigerte Porosität der Membran zurückzuführen war, welche von bestimmten Kultivierungsbedingungen abhängig war, wie

z.B. der Inkubationstemperatur und der Induktionszeit (PLÜCKTHUN, 1991). So befanden sich die rekombinanten Proteine bevorzugt im Periplasma, wenn die Temperatur nach der IPTG Induktion 37°C betrug und diese nach 3-4 Stunden aus den *E. coli* Zellen isoliert wurden. Wurde die Temperatur auf 28°C erniedrigt und die *E. coli* Zellen über Nacht inkubiert, wurde hingegen vermehrt rekombinantes Protein bis zu 50 µg/ml im Überstand nachgewiesen (3.7.2.). Wie KIPRIYANOV *et al.* (1997) dokumentierten, beeinflusst auch die Sequenz des exprimierten rekombinanten Proteins das Ausmaß der Sekretion. Eine Steigerung der Expressionsraten konnte nicht durch Modifikation des Standardprotokolls, z.B. durch die Veränderung der IPTG-Konzentrationen, der Temperatur und der Inkubationszeiten erreicht werden. Die scFvs konnten zwar aus dem Periplasma *via* Ni-NTA aufgereinigt werden, jedoch war deren Reinigung mit 50 µg aus einem halben Liter Medium relativ gering (3.7.2.). Dies konnte ebenfalls nicht durch Modifikationen des Standardprotokolls gesteigert werden. Die sich nach der Elution in PBS befindlichen scFvs waren nicht bei 4°C stabil, und ihre Reaktivität gegen entsprechende Pilzantigene ging beim mehrmaligen Auftauen aus -20°C rapide zurück. Dies konnte nur durch eine entsprechende Aliquotierung reduziert werden. Die exprimierten scFvs konnten jedoch im Bakterienüberstand stabil bei 4°C aufbewahrt werden. Die Stabilität der scFvs im Bakterienüberstand könnte daraus resultieren, dass während des „Phage Displays“ auf diese scFv-Eigenschaft selektioniert wurde. Nach der zweiten und dritten Runde des Displays wurde der Bakterienüberstand auf antigenbindende scFvs untersucht (3.6.). So können periplasmatisch exprimierte hoch antigenspezifische, stabile scFvs, welche sich ausschließlich im Periplasma befinden, nicht erfasst werden. Die Aufreinigung von 100 verschiedenen scFv Klonen beim Screenen aus dem Periplasma ist nur mit großem personellen Aufwand durchzuführen. Dieses Problem könnte durch die Verwendung von Phagen ELISAs weiter reduziert werden. Dabei wird der scFv als gIII-Fusionsprotein des M13 Phagen präsentiert, dem Targetmolekül für Protein-Protein-Wechselwirkungen dargeboten und die Bindung durch Nachweisantikörper detektiert. Jedoch besteht die Gefahr der Kontamination durch die streng infektiösen Phagen und man kann nicht ausschließen, dass die scFvs ohne Phagen nicht stabil oder in inaktiver Form im Periplasma vorliegen.

Die zeit- und kostengünstigste Methode, um scFvs mit optimalen Eigenschaften zu generieren, liegt in der gezielten Optimierung des „Phage Displays“. Wenn man sicher ist, dass man eine scFv-Bibliothek besitzt, welche hochspezifische Binder enthält, kann der Selektionsdruck erhöht werden und eine Erhöhung der Mutationsrate in den hypervariablen Regionen der scFvs durch Bakterienstämme mit hoher Mutationsrate begünstigt werden.

Dadurch sollte es möglich sein, scFvs zu generieren, welche hoch spezifisch, stabil und leicht aufzureinigen sind.

In dieser Arbeit war die Reinigung *via* Ni-NTA aus dem Bakterienüberstand nur beschränkt möglich. So konnte aus 50 ml Bakteriensuspensionsüberstand mit einer Konzentration von 50 µg/ml nur 50 µg aufgereinigt werden (3.7.2.). Die beschriebenen Expressionsraten sind im Vergleich mit Werten aus der Literatur relativ gering. In einigen Fällen wurden Expressionsraten von scFv-Fragmenten von bis 1-2 g/l erreicht (CARTER *et al.*, 1992). Meistens liegt aber die erreichbare produzierte Menge zwischen 1 und 10 mg/l Expressionskultur (GAVILONDO *et al.*, 2000).

Eine Erhöhung der Menge löslicher scFvs in bakteriellen Expressionssystemen könnte in weiterführenden Experimenten entweder durch Mutagenese bestimmter AS in den CDRs oder FRs (BENHAR *et al.*, 1995; KIPRIYANOV *et al.*, 1997) oder durch die Wahl von Expressionsvektoren mit stärkeren Promotoren erreicht werden. Weiterhin könnte eine Koexpression von Chaperonen (DUEANS *et al.*, 1994) oder der periplasmatischen Peptidylprolyl-cis, trans-Isomerase FkpA (BOTHMANN *et al.*, 2000) zu einer Steigerung der Expressionsrate führen. Die Stabilität der scFvs hätte eventuell ebenso durch eine Expression unter osmotischem Stress und Anwesenheit von kompatiblen Soluten gefördert werden können (BARTH *et al.*, 2000).

Den Immunoblots aus Abb. 3.19. und Abb. 3.14. ist zu entnehmen, dass eine Reihe von Banden angefärbt sind, obwohl nach der Reinigung der scFvs CWPD2, FPCWPA5, SGB3 und SPIII7 nur jeweils eine Bande mit einem Molekulargewicht zwischen 28-33 kDa zu erwarten gewesen wäre. Banden bei größeren Molekulargewichten können dadurch erklärt werden, dass das GenIII noch an den scFvs fusioniert ist, dabei wird das Amber-Stopcodon überlesen (HOOGENBOOM *et al.*, 1998) bzw. *pelB*-Signalpeptide nicht abgespalten (AYALA *et al.*, 1995; RAVEN, 1998; SCHMIEDL *et al.*, 2000). Kleinere Banden könnten C-terminalen Bruchstücken von scFv-Fragmenten entsprechen. Zudem ist es möglich, dass periplasmatische Peptidasen N-terminale Sequenzen abtrennen und es dadurch zu verkürzten scFv-Fragmenten kommt, welche jedoch noch durch die angehängten „tags“ detektiert werden können (SCHMITT *et al.*, 1993). Alle diese Vermutungen könnten nur durch eine N-terminale AS-Sequenzierung verifiziert werden.

Zusätzlich konnten bei der Charakterisierung der scFvs im ELISA, Immunoblot und durch die Immunofluoreszenz nachgewiesen werden, dass die scFvs CWPD2, FPCWPA5 und SGB3 aus einem heterogenen pilzlichen Antigen spezifische Epitope erkennen können, welche auf verschiedenen *Fusarium ssp.* vorhanden sind. Dabei können durch die scFvs CWPD2 und

SGB3 ähnliche Bandenmuster im Immunoblot (Abb. 3.17.) gegen das gleiche Antigengemisch angefärbt werden. Dies impliziert, dass beide scFvs mit dem selben Target reagieren. Zusätzlich ist diesen Ergebnissen zu entnehmen, dass es sich um ein Antigen mit einem anti-metatopen Epitop handeln muss, da es sowohl nach der Denaturierung im SDS-Gel als auch in der nativen Immunofluoreszenzuntersuchung detektiert werden kann. Wenn man die Aminosäuresequenzen der scFvs CWPD2 und SGB3 miteinander vergleicht, ist jedoch eine Diversität in den hypervariablen Regionen zu beobachten (3.7.1.), was auf eine Bindung an unterschiedliche Epitope auf dem gleichen Antigen schließen lässt. Eine Charakterisierung der scFvs anhand der BIAcore (MALMBORG und BORREBAECK, 1995) war nicht möglich, da das Antigen nicht in gereingter Form sondern nur in einem komplexen Antigengemisch vorlag. Folglich konnte die Dissoziationskonstante (K_d), welche bei schwach affinen Ak bei 10^{-5} M und bei hoch affinen Ak bei 10^{-9} M liegt, nicht genau bestimmt werden. Die erfolgreiche Verwendung der „Phage Display“ Methode gegen heterogene pilzliche Antigene konnte in dieser Arbeit erfolgreich gezeigt werden. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass auch auf der heterogenen Oberfläche von Pilzhyphen Epitope vorhanden sein müssen, welche mit einer höheren Häufigkeit auf dieser lokalisiert sind und folglich eine Anreicherung von spezifisch bindenden scFvs gegen diese Antigene möglich ist. Dieses Phänomen wurde ebenfalls vor kurzem von LINDQUIST *et al.* (2002) beschrieben. Es konnten scFvs isoliert werden, welche spezifisch mit *Chlamydia trachomatis* assoziierten Oberflächen-Antigene reagieren. Dabei wurde gegen „elementary bodies“ des Bakterium selektioniert. Dies bestätigt die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, dass die Selektion von scFvs durch „Phage Display“ gegen heterogene Oberflächenstrukturen erfolgreich umgesetzt werden kann.

4.6. Die Herstellung von AFP-scFv-Fusionen und deren Charakterisierung

Da davon auszugehen war, dass die generierten scFvs nur in Verbindung mit fusionierten antifungalen Peptiden oder Proteinen (AFP), einen inhibitorischen Effekt auf das Pilzwachstum zeigen würden, wurden N-terminal durch einen flexiblen $(G_4S)_2$ -Linker getrennt die AFPs AG, RS, Lactoferricin und Chitinase fusioniert. Durch die Affinität der scFv zu der Pilzoberfläche sollte es zu einer Aufkonzentrierung der AFP an deren Wirkungsort kommen. So sollten auch geringe Konzentrationen an AFP-scFv-Fusionen bereits einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von Fusarien zeigen. Zusätzlich sollte die C-terminale Fusion der scFvs die Stabilität der AFP in *E. coli* erhöhen (GUO *et al.*, 2000). Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ausgekeimter Sporen, welche mit den

generierten scFvs und AFP-scFv-Fusionen inkubiert wurden, zeigten, dass die scFvs CWP2, FPCWPA5, SGB3 und SPIII7 und die AFP-scFv-CWP2-Fusionsproteine (AG-scFv CWP2; RS-scFv CWP2) spezifisch an den Keimschlauch von *F. graminearum* binden (3.8.3.). Zusätzlich konnten morphologische Veränderungen an den Keimschläuchen beobachtet werden, wenn diese mit RS-scFv-CWP2-Fusionsproteinen inkubiert wurden. Die detektierten RS-scFv-CWP2-Fusionsproteine waren nicht auf der ganzen Oberfläche präsent. Es konnten einzelne Bereiche nicht detektiert werden, was auf eine zerstörte Oberflächenstruktur der Pilze hindeutete, welche durch das entsprechende Durchlichtbild ebenfalls bestätigt wurde (Abb. 3.25.), bei dem die Oberfläche des Keimschlauches Verletzungen aufwies. Wurde *F. graminearum* Myzel mit Chi-scFv-CWP2-Fusionsproteinen inkubiert, waren keine ausgekeimten Sporen oder Myzel zu erkennen. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Chitinase das Myzel des Pilzes restlos zerstören konnte, und folglich nur noch kleine Myzel-Fragmente im Durchlichtbild beobachtet werden konnten (Abb. 3.25.). Dies korreliert auch mit den ELISA-Ergebnissen. Hier lagen die Extinktionswerte des Chitinase-scFv-Fusionsproteins gegenüber den scFv und den anderen AFP-scFv-Fusionen um den Wert 2,4 niedriger (Abb.3.24.). Dies kann daran liegen, dass das Antigen von der Chitinase aus dem Chitin enzymatisch abgebaut wird und dadurch beim nächsten Waschschrift der gesamte Antigen-Chitinase-scFv-Fusionsprotein-Komplex entfernt wird. Diese Vermutung wird auch dadurch untermauert, dass die ELISA-Werte nach entsprechender Verdünnung der Chitinase-scFv Fusionsproteine kurzfristig ansteigen (Daten nicht gezeigt).

Sporen konnten weder mit den scFvs noch mit den AFP-scFv-Fusionsproteinen detektiert werden. Dies zeigt, dass die durch die avianen scFvs detektierten Antigene, welche sich auf der Myzeloberfläche befinden, nicht auf den Sporen vorhanden sind. Die Diversität der Oberflächenstruktur von Sporen und Myzel wird seit langem diskutiert, jedoch steht die Erforschung von Pilzoberflächenstrukturen immer noch am Anfang, was zum Teil durch die Komplexität von Pilzoberflächen bedingt ist (BARTNICKI-GARCIA 1973; WASYLKA *et al.*, 2001; KOLATTUKUDY *et al.*, 1995). Die antifungalen Peptide AG und RS wurden N-terminal an die scFvs fusioniert, da dies deren Funktionalität nicht beeinflussen sollte (WNENDT, 1990, TERRAS *et al.*, 1995). Die AFPs Lactoferricin und Chitinase hingegen hätten auch ohne Reaktivitätsverlust C-terminal fusioniert werden können (YU-CAI LIAO *et al.*, 1994; CHAPPLE *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 1999; AGUILERA *et al.*, 1999 und HAUKLAND und VORLAND, 2001). Dies wurde jedoch aus klonierungstechnischen Gründen nicht durchgeführt. Es wurde auch festgestellt, dass das Lactoferricin für sich und als

Fusion mit dem scFv CWPD2 und mit dem scFv PIPP nicht in *E. coli* zu exprimieren war. Dies war vorauszusehen, da Lactoferricin nicht nur antifungal sondern auch antimikrobiell wirkt und dadurch für *E. coli* hochtoxisch ist.

Die AFP-scFv-Fusionen waren nur bei 4°C im Bakterienüberstand stabil. Dies korrelierte mit den Erfahrungen, die mit den scFvs ohne Fusionspartner gemacht wurden (3.7.2.). Wurden die AFP-scFv-Fusionsproteine über Ni-NTA-aufgereinigt und gegen PBS dialysiert, waren sowohl der Aufkonzentrierungsgrad als auch die Stabilität und die Reaktivität gegen die korrespondierenden Antigene relativ gering. Dies liegt vermutlich mit den AFP zusammen, deren Expressionsrate bei alleiniger Expression ebenfalls sehr gering war. Es konnte nur eine geringe Stabilisierung durch die scFv-Fusion erreicht werden. Eine fehlende oder mangelnde Expression kann diverse Ursachen haben. Zum einen kann das exprimierte Protein toxisch für *E. coli* sein. Durch den hohen Selektionsdruck können nur solche Bakterienzellen überleben, welche durch eine Mutation auf dem Expressionsvektor die Toxizität des Genprodukts herabsetzen können. Dies kann z.B. durch eine Mutation in der Promotorregion, in der Shine Dalgarno Sequenz oder durch die Integration eines Stopcodons verursacht werden. Wenn keine solchen Mutationen auftreten, stirbt die Population aus. Auch die verlangsamte Expression des toxischen Proteins durch eine geringe IPTG-Konzentration oder durch die Zugabe von Glucose bei der Verwendung eines Lac-Promotors stellt keine Lösung dar. Es entstehen bevorzugt „inclusion bodies“, in denen die Proteine nicht korrekt gefaltet vorliegen und damit inaktiv sind. Durch die geringe Expressionsrate von AFP-scFv-Fusionsproteinen in *E. coli* war anzunehmen, dass die Expression in Pflanzen ebenfalls gering ausfallen würde. Um die Expression der AFP in *E. coli* und in Pflanzen zu erhöhen, wurde als Kontrolle ein Fusionspartner ausgewählt, welcher einen nicht spezifisch an Pilzoberflächen bindender scFv darstellte, welcher jedoch leicht und mit hohen Ausbeuten in *E. coli* und Pflanzen exprimiert werden konnte. Die Wahl fiel auf den scFv PIPP, der spezifisch gegen das Antigen hCG („Human chorionic gonadotropin“) (Fishel, *et al.*, 1984) bindet.

Eine Charakterisierung der Chitinaseaktivität der Chitinase-scFv-Fusionen war nicht möglich, da die zur Verfügung gestandenen Konzentrationen für die kommerziell erwerbbaaren Tests zu gering waren (WIRTH und WOLF, 1990).

4.7. *In vitro* Inhibitionstest

Die *in vitro* Inhibitionstests, bei denen der scFv CWPD2 und die Fusionsproteine AG-scFv CWPD2, RS-scFv CWPD2 und Chi-scFv CWPD2 nach der Expression in *E. coli* eingesetzt wurden, zeigten sowohl im ELISA-Maßstab (3.9.) als auch mikroskopisch (3.8.3.) eine

Wachstumshemmung von *F. graminearum* und *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*. Das Fusionsprotein Lacto-scFv-CWPD2 konnte aufgrund der starken antimikrobiellen Wirkung von Lactoferricin nicht in *E. coli* exprimiert werden (HWANG *et al.*, 1998, HAUGLAND und VORLAND, 2001, HAUGLAND *et al.*, 2001). Die Konzentration der AFPs und AFP-scFv-PIPP-Fusionen war mit 100 ng/ml zu gering, um einen messbaren inhibitorischen Effekt zu verursachen. Dies korreliert mit den Ergebnissen aus der Literatur, in dem die AFPs beschrieben werden, hier konnte deren inhibitorische Wirkung nur bei höheren Konzentrationen festgestellt werden (WNENDT, 1990; TERRAS *et al.*, 1995). Höhere Konzentrationen konnten jedoch nicht eingesetzt werden, da diese nicht stabil in Bakterien hergestellt werden konnten. Anhand der *in vitro* Inhibitionstests im ELISA-Maßstab, konnte der inhibitorische Effekt der bakteriell exprimierten der AG-scFv CWPD2, RS-scFv CWPD2 und der Chi-scFv CWPD2 bei einer Konzentration von 100ng/ml gezeigt werden (3.9.). Das Chi-scFv-CWPD2-Fusionsprotein zeigte auch bei einer Konzentration von 20 ng/ml eine Inhibition des Pilzwachstums. Sowohl die AFP-scFv PIPP und die AFP Kontrollen als auch der scFv CWPD2 ohne Fusion zeigten bei diesen Konzentrationen keinen inhibitorischen Effekt auf das Pilzwachstum. Dies zeigt, dass die Fusion des scFv CWPD2 an die AFP die Inhibition des Pilzwachstums verursacht. Eine naheliegende Erklärung ist, dass es, bedingt durch die Affinität des scFvs CWPD2 zu Fusarienoberflächenstrukturen, zu einer Anreicherung der AFP-scFv-CWPD2-Fusionsproteine am Wirkort der AFP kommt und dadurch geringere Konzentrationen ausreichend sind, um das Wachstum von Fusarien zu inhibieren.

4.8. Transformation von Pflanzen

Die erfolgreiche Lokalisierung von scFvs in der Zelle in unterschiedliche Gewebe oder Kompartimente ist in Pflanzen möglich. Pflanzenzellen bestehen aus vielen verschiedenen Kompartimenten. Dabei kommen zu den Kompartimenten einer tierischen Zelle die Vakuolen und die Chloroplasten hinzu. Das sogenannte „targeting“ von Proteinen bestimmt, wohin welche Proteine nach ihrer Synthese transportiert werden. Der Transport erfolgt in fast allen Fällen über sogenannte Leaderpeptide oder Leitsequenzen, die von der Transportmaschinerie erkannt werden und zur korrekten Lokalisation führen. In dieser Arbeit wurde das für dikotyledone Pflanzen codonoptimierte Maus „leader“-Peptid (LP) der rAb24 leichten Kette zur Lokalisation der rekombinanten Proteine in den Apoplasten (VOSS *et al.*, 1995) verwendet. Die Leitsequenzen werden meistens, aber nicht immer nach erfolgreichem Transport durch die Membransysteme abgespalten. Da die korrekte Lokalisation und auch

Prozessierung der „leader“-Peptide in fremden Zellen nicht immer gewährleistet ist, kann dies ebenfalls zu großen Problemen führen. Die Expression von Zielproteinen kann meistens nicht dadurch gesteigert werden, dass mehrere Genkopien in die Pflanze eingebracht werden, selbst wenn unterschiedliche Promotoren verwendet werden (MANNERLÖF und TENNING, 1997). Die in der Literatur beschriebenen Expressionsraten von scFvs in Pflanzenblättern liegt zwischen 0,1 % (BRURYNS *et al.*, 1996) und 6,8 % (FIEDLER *et al.*, 1997) total löslichem Protein. Die Expression erfolgte in verschiedenen Zellkompartimenten z.B. im Zytoplasma (OWEN *et al.*, 1992; BRUYNS *et al.*, 1996), die Sekretion in den Apoplasten (VOSS *et al.*, 1995), die Akkumulation im ER (ARTSAENKO *et al.*, 1995; SCHOUTEN *et al.*, 1996) oder eine membranständige Lokalisation (SCHILLBERG *et al.*, 2000). Es ist auch eine Organ- oder Gewebe-spezifische Expression möglich. So konnten PHILLIPS *et al.* (1997) erstmals scFvs gerichtet in Samen exprimieren, ROSSO *et al.* (1996) in der Wurzel, OWEN *et al.* (1992) und SCHOUTON *et al.* (1997) im Blatt und DE JAEGER *et al.* (1997) in der Blüte. Bei der Prozessierung des „leader“-Peptides sind keine zusätzlichen Aminosäuren am 5'-Ende des rekombinanten Proteins (wie z.B. N-Formyl-Methionin) vorhanden. Der in dieser Arbeit verwendete 35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) wird zur Expression in Dikotyledonen verwendet. Er ist konstitutiv, gewebeunspezifisch und kann durch Vervielfachung der Enhancer-Sequenz verstärkt werden. Aber auch bei Pflanzen treten gehäuft Probleme auf. So kann der molekulare Siebeffekt von Zellwänden z.B. bei der Sekretion von Proteinen, deren Molekülgröße über 100kDa (CARPITA *et al.*, 1979) liegen, ein Problem darstellen, da größere Proteine nicht in den apoplasmatischen Raum diffundieren können, dadurch können zu große AFP-scFv-Fusionsproteine nicht ungehindert an die Pilzoberfläche und damit an ihren Wirkungsort gelangen. Ebenso behindert der z.T. sehr niedrige pH-Wert in einzelnen Kompartimenten z.B. im Cytoplasma die Stabilität und Funktionalität von Proteinen. Der Mechanismen von Protein-Lokalisation, Prozessierung und Glykosylierung sind ebenfalls nicht genau bekannt.

4.8.1. Transiente Transformation

Der Vorteil der transienten Transformation liegt darin begründet, dass die Expression von Proteinen in Pflanzen möglichst schnell nachvollzogen werden kann. Die Pflanzen müssen nicht regeneriert werden, und es kann bereits nach Tagen das rekombinante Protein aus den Blättern isoliert werden. ScFvs werden bevorzugt im Apoplasten und im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, da diese Kompartimente die Stabilität und Funktionalität der scFvs positiv beeinflussen. ScFvs, welche im Zytosol akkumuliert werden, sind durch das vorherrschende reduzierende Milieu relativ instabil (BIOCCA *et al.*, 1995), da dieses die

Ausbildung von Disulfidbrücken erschwert, welche essentiell für deren Stabilität und Funktionalität sind (GLOCKSHUBER *et al.*, 1992). Zusätzlich fehlen Chaperone und diverse Cofaktoren, welche eine entscheidende Rolle bei der korrekten Faltung der exprimierten Proteine spielen. In dieser Arbeit sollten die scFvs und AFP-scFv-Fusionsproteine bei der transienten Transformation von Tabak genauso wie später bei der stabilen Transformation von *Arabidopsis thaliana* sowie bei den Zielpflanzen apoplastisch exprimiert werden. Die transiente Transformation von Tabakblättern wurde durchgeführt, um abschätzen zu können, ob es als sinnvoll einzustufen war, bei der zeitaufwendigeren stabilen Transformation die scFvs und scFv-AFP-Fusionsproteine in den Apoplasten zu sezernieren. Die Expressionsraten der scFvs CWP2, FPCWPA5 und SGB3 lagen bei 10 µg/g frischem Blattmaterial. Die AFP-scFv-Fusionen konnten nur im ng/g frischen Blattmaterial nachgewiesen werden. Die Aufreinigung war nicht erfolgreich, *in vitro* Inhibitionstests konnten aus Gründen der zu geringen Konzentration der exprimierten Zielproteine nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die Funktionalität der scFvs und AFP-scFv-Fusionen konnte jedoch im ELISA nachgewiesen werden (3.8.2.). Dies deutet auf die korrekte Faltung der scFvs und AFP-scFv-Fusionsproteine hin. Im Hinblick auf die stabile Transformation von *A. thaliana* waren diese Ergebnisse sehr vielversprechend, da eine zu hohe Akkumulation der scFv-AFP in der Pflanze nicht angestrebt wurde. Relativ geringe Konzentrationen der AFP sollten ausreichend sein, um in Verbindung mit der scFv vermittelten Bindungsspezifität für Pilzoberflächen eine Resistenz von transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen gegen *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* zu erzielen. Ebenso konnte die erfolgreiche, angestrebte, apoplastische Lokalisation der exprimierten Proteine verifiziert werden. Dies ist von immenser Bedeutung, wenn man sich den Infektionsverlauf von *Fusarien* ssp. vor Augen führt. Die Zielpilze wachsen nach dem Eindringen in das Blatt apoplastisch weiter, bevor sie die Pflanzenzellen als Nahrungsquelle erschließen. Zu diesem Zeitpunkt ist der Pilz gegen Abwehrreaktionen der Pflanze besonders anfällig, da er zum bald möglichen Zeitpunkt eine neue Nahrungsquelle erschließen muss, da die Nahrungsreserven aus der Pilzspore langsam zur Neige gehen (KANG und BUCHENAUER 2000a). Folglich war die Inaktivierung des Pilzes im Apoplasten durch die scFvs und AFP-scFvs als besonders vielversprechend einzustufen.

4.8.2. Stabile Transformation

Während es bei *E. coli* mit Hilfe von extrachromosomaler DNS möglich ist Proteine zu exprimieren, ist extrachromosomale DNS bei Pflanzen (außer bei Plastid-DNS, mitochondrialer DNS) bisher nicht bekannt. Zur stabilen Transformation muss deshalb die

Fremd-DNS stabil in das Chromosom integriert werden. Dazu wird die DNS in der Regel durch Kopplung an Goldpartikel oder durch *Agrobacterium tumefaciens* mit Hilfe eines Ti-Plasmids stabil in die Pflanze integriert. Dabei ist der Integrationsort nicht bekannt. Um eine transgene Pflanze zu generieren, müssen entweder alle Zellen des vielzelligen Organismus transformiert oder diese aus einer einzelnen transformierten Zelle regeneriert werden. Letzteres ist aufgrund der Totipotenz von Kallus-Gewebe leicht möglich. Die Regeneration der transgenen Pflanzen hingegen kann bis zu 6 Monate dauern und weitere 6 Monate bis zur Samenreife in Anspruch nehmen. In dieser Arbeit kam sowohl die *A. tumefaciens* als auch die durch „particle bombardment“ vermittelte Transformation zum Einsatz. Dabei wurden *A. thaliana* cv. Columbia durch die einfach durchzuführende „floral dipping“-Methode transformiert (CLOUGH und BENT 1998; DESFUEX et al., 2000). Die Blüten der Pflanze werden dann für wenige Sekunden in eine Agrobakteriensuspension eingetaucht. Die Agrobakterien transformieren den Fruchtknoten mit dem zu exprimierenden Transgen und durch die Selbstbefruchtung der Blüten wurde dies in der Regel heterozygot an die F₁ weitergegeben. Transgene Pflanzen konnten anschließend auf Kanamycin-Platten selektioniert werden. Die Pflanzen wurden geselbstet und die F₂-Pflanzen erneut auf Kanamycin-Platten herangezogen, um nur transgene Pflanzen weiter zu untersuchen. Mit den Pflanzenlinien scFv CWPD2 Linie 2, AG Linie 2, RS Linie 4, Lacto Linie 1, Chi Linie 4, AG-scFv CWPD2 Linie 15, RS-scFv CWPD2 Linie 3, Lacto-scFv CWPD2 Linie 3, Chi-scFv CWPD2 Linie 5, AG-scFv PIPP Linie 5, RS-scFv PIPP Linie 1, Lacto-scFv PIPP Linie 1, Chi-scFv PIPP Linie 6 und GFP Linie 1 wurde weitergearbeitet, da alle diese Linien ein stabil integriertes Insert aufwiesen, was durch eine PCR verifiziert wurde (3.10.3.1.). Die Expressionrate des scFv CWPD2 lag im µg-Bereich pro g frischem Blattmaterial und konnte eindeutig im Immunoblot nachgewiesen werden. Die AFPs, AFP-scFv CWPD2- und AFP-scFv PIPP-Fusionsproteine waren nicht im Immunoblot detektierbar. Die AFP-scFv CWPD2- und AFP-scFv PIPP-Fusionsproteine zeigten jedoch im ELISA signifikante Extinktionswerte. Die AFPs konnten nicht im ELISA selbst bei direkter Immobilisierung auf der ELISA-Platte nachgewiesen werden, dazu waren deren Expressionsraten zu gering. Um die Sensitivität des ELISAs zu erhöhen, hätten mAk gegen die AFPs eingesetzt werden müssen. Diese hätten direkt auf der ELISA-Oberfläche immobilisiert werden müssen, um im nächsten Schritt die AFPs zu binden und diese nachfolgend anhand der freizugänglichen „tags“ nachzuweisen. AFP-spezifischen mAk standen jedoch nicht im Rahmen dieser Dissertation zur Verfügung. Diese Ergebnisse bestätigten die durch die transiente Transformation von Tabak erhaltenen Ergebnisse insofern, dass die Expressionsraten für AFP-scFv CWPD2-Fusionsproteine

niedrig waren, jedoch die Funktionalität der scFvs in den Fusionen ebenfalls gewährleistet war.

4.9. Resistenztests

Die durchgeführten Resistenztests an stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen implizieren eine durch rAk-induzierte Resistenz bei *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia gegen den Schadpilz *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* (3.10.3.4.). Dabei zeigte der Wildtyp- und die GFP-Kontrolle bereits nach ein einhalb Wochen Symptome, welche auf einen Befall mit dem Schadpilz *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* zurückzuführen waren. Die transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen mit intergegierten scFv CWPD2, AG, RS, Lacto, Chi, AG-scFv PIPP, RS-scFv PIPP, Lacto-scFv PIPP und Chi-scFv PIPP Konstrukten zeigten nach zwei Wochen erste Symptome eines *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* Befalls. Nach drei Wochen waren bis auf die mit AG-scFv CWPD2, RS-scFv CWPD2, Lacto-scFv CWPD2 und Chi-scFv CWPD2 transformierten Pflanzen alle anderen *Arabidopsis*-Pflanzen abgestorben. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der in dieser Arbeit durch „Phage Display“ isolierte scFv CWPD2, welcher an ein *Fusarium*-Oberflächentarget bindet, genau so wie AFP oder AFP fusioniert mit einem nicht spezifisch an *Fusarium* bindenden scFv PIPP eine geringe Resistenz gegen Fusarien vermitteln kann. Die Fusion des scFvs CWPD2 mit antifungalen Peptiden oder Proteinen und deren Expression in der Pflanze führt jedoch zu einer verstärkten Resistenz gegen Fusarien. Bei den AFPs wurden diejenigen ausgewählt, die die Oberflächen des Pilzes so modifizieren, dass dies zu einem Absterben des Pilzes bei dem Versuch die Pflanze als Wirt zu nutzen, führt. Durch die Fusion der AFP mit den an die Pilzoberfläche bindenden scFvs kam es zu einer Akkumulation der AFP an der Pilzoberfläche, dadurch konnte selbst bei einer geringen Expressionsrate eine Resistenz induziert werden. Dies bestätigt die Ergebnisse der Immunofluoreszenzaufnahmen (3.8.3.), in denen morphologische Veränderungen der Hyphen bei der Inkubation der RS-scFv CWPD2- und Chi-scFv CWPD2-Fusionsproteine zu beobachten waren. Auch die AG-scFv CWPD2- und die Lacto-scFv CWPD2-Fusionsproteine induzierten eine erhöhte Resistenz der transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen.

Anhand dieser Versuche konnte das Potential von heterolog exprimierten rAk und rAk-Fusionsproteinen in Pflanzen zum Schutz gegen pathogene Pilze erstmals demonstriert werden. In Tieren konnte Ak basierende Protektion gegen pilzliche Pathogene bereits demonstriert werden (Yuan *et al.*, 1998). Ebenso konnten Symptome bei Avocado, Mango und Bananen, welche durch *Colletotrichum gloeosporioide* infiziert waren, durch polyklonale

Ak, welche an eine Pilz-Pektatlyase binden, unterdrückt werden (Wattad *et al.*, 1997). Bis heute gab es jedoch keinen Beweis, dass transgene Pflanzen, welche rAk-Fusionen exprimieren, eine verstärkte Resistenz gegen Pilzinfektionen aufweisen. Die hier präsentierten Daten belegen eindeutig und erstmalig, dass die rAk-Fusionsproteine (AG-scFv CWPD2, RS-scFv CWPD2, Lacto-scFv CWPD2 und Chi-scFv CWPD2) zu einer Resistenz in transgenen *A. thaliana* cv. Columbia Linien gegen *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* führten.

4.10. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode der AFP-scFv vermittelten Resistenz gegen Fusarien könnte nun im Zierpflanzenbau und in der Landwirtschaft angewendet werden. Neue Resistenzen gegen alle erdenklichen pilzlichen Pathogene könnten nachfolgend durch Austausch der scFv-Bindungsaffinität verwirklicht werden. Dadurch könnte der Einsatz von Fungiziden auf ein Minimum reduziert werden. So können z.B. die in dieser Arbeit entwickelten Konstrukte im Zierpflanzenbau bei Cyclamen, bei denen es in warmen Sommern durch *Fusarium* zu Ausfällen von bis zu 90 % kommen kann (ORLICZ-LUTHARDT, 1999), zur direkten Anwendung kommen. Der Erreger *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* kann momentan nicht mit Spritzmittel bekämpft werden. Cyclamen können mit den vielversprechensten Konstrukten durch *A. tumefaciens* transformiert werden (AIDA *et al.*, 1999). Durch die stabile Integration der AFP-scFv-Fusionsgene in das Cyclamengenom sollte in Analogie zu *Arabidopsis* eine Resistenz gegen *F. oxysporum* f.sp. *cyclaminis* bei Cyclamen induziert werden können.

Die in dieser Arbeit bereits transformierten Weizen- und Reispflanzen müssen durch PCR, Immunoblot und Inhibitionstests weiter charakterisiert werden. So kann die genomische DNS aus den unterschiedlichen Linien isoliert werden und durch eine PCR mit Insert spezifischen Primern überprüft werden, ob die AFP-scFv-Gene stabil in das Genom der Reis- und Weizenpflanzen integriert wurden. Das Gesamtprotein der Blätter von durch PCR positiv getesteten Pflanzenlinien kann nachfolgend auf die Anwesenheit von AFP-scFv-Proteinen im Immunoblot untersucht werden. Durch ELISA und Immunofluoreszenzmikroskopie kann deren Bindungsaktivität an *Fusarium*-Oberflächenstrukturen verifiziert werden. Resistenztests können mit den Blättern positiv getesteter Pflanzenlinien durchgeführt werden. Bei einer durch die AFP-scFv-Fusionsproteinen induzierten Resistenz können die Markergene eliminiert und das Fremdgen in Hochleistungssorten eingekreuzt werden. Durch die Ak-vermittelte Resistenz gegen pathogene Pilze können diese Pflanzen nicht mehr befallen

werden, ein Fungizideinsatz wird vermieden und Mykotoxine werden nicht mehr im Samen angereichert.

Die Charakterisierung der Targetmoleküle und deren Epitope, die von den scFvs CWPD2, FPCWPA5 und SGB3 erkannt werden, ist ebenfalls von großem Interesse. Der durchgeführte Immunoblot impliziert, dass die scFvs an ein definiertes Protein oder Glykoprotein binden. Die scFvs könnten dazu verwendet werden, das Targetmolekül zu reinigen, detailliert zu charakterisieren und zu klonieren. So könnten die scFvs mit dem Antigen inkubiert werden und anschließend der Antigen-scFv-Komplex mittels His6-„tag“ durch eine Ni-NTA-Matrix gereinigt werden. Der Komplex kann dann durch ein reduzierendes SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und das Targetmolekül über N-terminale AS-Sequenzierung oder „Peptide-Fingerprinting“ mit Hilfe der Massenspektroskopie identifiziert werden. Aus der AS-Sequenz können Primer entwickelt werden, um das korrespondierende Gen zu klonieren und zu charakterisieren. Auch die Durchsichtung einer *Fusarium*-Bibliothek verspricht sinnvolle Ansatzmöglichkeiten zur Identifizierung des Targetmoleküls. Eine *Fusarium*-Bibliothek kann auf der Oberfläche eines Phagen z.B. als Gen VII Fusion exprimiert werden und dann das Targetmolekül durch eine Selektion gegen den entsprechenden scFv eluiert werden. Durch mehrere Selektionsrunden sollte es dann zu einer Anreicherung der Antigen-präsentierenden Phagen kommen, und anschließend kann das Targetmolekül durch Sequenzierung oder Massenspektroskopieanalyse charakterisiert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der direkten oder indirekten Immobilisierung der scFvs (durch einen „tag“-spezifischen Ak) auf einem Bio-Chip. Diesen könnte dann mit einer *Fusarium*-Bibliothek präsentierenden Phagenbank inkubiert werden und über mehrere Selektionsrunden die Antigen-präsentierenden Phagen angereichert und nachfolgend charakterisiert werden. Das Epitop könnte auch durch die Methode des Peptide Displays (FELICO et al., 1991, HOLZEM, 1998) bestimmt werden, was die Klonierung des Proteins weiter erleichtern sollte. Dazu werden große Zufallspeptid-Bibliotheken verwendet (CWIRLA et al., 1990; BONNYCASTLE et al., 1996), welche auf der Oberfläche eines Phagen präsentiert werden. Durch die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen dem Paratop des scFvs und den Peptiden können Phagen angereichert werden, welche auf der Oberfläche das zugehörige Epitop oder eine Epitop ähnliche Struktur präsentieren. Nach mehreren Selektionsrunden kann die Basenpaarsequenz spezifisch bindender Peptide durch Sequenzierung bestimmt und daraus die Aminosäuresequenz des Bindungspeptides abgeleitet werden. Falls es sich um ein neues pilzspezifisches Targetmolekül handeln sollte, könnte dieses eventuell in einem HTS-Assay zur Entwicklung eines neuen Fungizids eingesetzt werden.

Antikörper sind in der Lage, Mykotoxine, welche toxisch für Mensch, Tier und Pflanze sind (DESJARDINS und HOHN, 1997; CHRISTOPHER *et al.*, 1997), *in vitro* zu neutralisieren (HAITT, *et al.*, 2001). Toxin-spezifische scFvs könnten in der Pflanze exprimiert werden. Dies könnte auch zu einer Erhöhung der Resistenz der Pflanze gegen den pathogenen Pilz führen, da Mykotoxine als wichtige Pathogenitätsfaktoren gelten (DESJARDINS *et al.*, 1996; KANG und BUCHENAUER, 1999). Zur Generierung eines solchen scFvs müßten die Toxine zur Immunisierung eingesetzt werden, um aus den Milzen von Versuchstieren immunkompetente scFv-Bibliotheken zu gewinnen. Dies ist oft tödlich für die Versuchstiere. Zusätzlich induzieren die Toxine, bedingt durch deren geringe Größe, keine oder nur eine unzureichende Immunantwort. Der Einsatz von hochkomplexen naiven scFv-Bibliotheken im „Phage Display“ gegen ein Toxin ist weitaus unbedenklicher und vielversprechender. So kann das Toxin direkt auf einen Träger immobilisiert werden und die naive scFv-Bibliothek in mehreren Runden gegen das Toxin selektioniert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten scFvs CWPD2 und SGB3 können zum diagnostischen Nachweis einer *Fusarium*-Infektion von Nutz- und Zierpflanzen eingesetzt werden. Basierend auf diesen scFvs könnten Kits entwickelt werden, mit deren Hilfe eine Pilzinfektion von Getreidekörnern rechtzeitig diagnostiziert werden kann. Schwellenwerte für Mykotoxine könnten indirekt definiert und somit die potentielle Gefahr von Toxinen in pflanzlichen Nahrungsmitteln für den Verbraucher stark eingedämmt und somit ein wertvoller Beitrag zur Herstellung sicherer Lebensmittel geleistet werden.

5. Zusammenfassung

Eine der größten Probleme in der Landwirtschaft und im Zierpflanzenbau wird durch pathogene Pilze verursacht. Pilze befallen sowohl die Pflanze als auch den Samen und kontaminieren diese durch Mykotoxine und andere Stoffwechselprodukte. Resistente Wildarten stehen der klassischen Züchtung oftmals nicht zur Verfügung, so dass die einzige Bekämpfung darin besteht, Fungizide einzusetzen, die zusätzliche Gefahren für die Umwelt und den Verbraucher sowie Kosten beinhalten. Die Verwendung von rekombinanten Antikörpern (rAk) in transgenen Pflanzen ist eine vielversprechende Alternative, um diesen Problemen in einer verbraucherfreundlichen Art und Weise entgegenzuwirken.

Das Ziel dieser Dissertation war es deshalb, scFvs gegen Oberflächenstrukturen (Targetmoleküle) von Fusarien (*Fusarium graminearum*) zu generieren, diese mit antifungalen Peptiden und Proteinen (AFP) zu fusionieren, in der Pflanze zu exprimieren und dadurch eine Resistenz gegen den Schadpilz zu vermitteln.

Die richtige Wahl des pilzlichen Antigens stand dabei unter besonderem Interesse. Bei Fusarien sind momentan keine Targetmoleküle bekannt, welche für die Pathogenität des Pilzes verantwortlich sind. Daher wurden Zellwandproteine (CWP) aus dem Myzel einer *Fusarium ssp.* (*F. graminearum*) isoliert, da diese Präparation die größtmögliche Pilzoberfläche garantierte. Zusätzlich wurden ausgekeimte Sporen (SG) als Antigen verwendet, da auf jungem Myzel die Oberflächenstrukturen den Pilzstrukturen beim Penetrieren einer Pflanze als besonders äquivalent erschienen. „Fresh plate culture proteins“ (FPCWP) wurden zudem verwendet, da diese Proteine, welche auf der Pilzoberfläche durch waschen leicht abgelöst werden konnten, darstellen.

Sowohl Mäuse als auch Hühner wurden mit den diversen Antigenpräparationen immunisiert. Aus den Eiern der Hühner wurden polyklonale Antikörper gewonnen und deren Titer zusammen mit dem Antikörpertiter aus den Mäuse-Seren bestimmt. Aus den Milzzellen wurden die Gesamt-RNS und mRNS isoliert, cDNS synthetisiert, die V_H - und V_L -Domänen amplifiziert und über die eingefügten Restriktionschnittstellen zu scFv Bibliotheken zusammengefügt. Dabei wurde der neu konstruierte pHENHi-Phagemidvektor verwendet. Mit diesem Vektor war es möglich, das „Phage Display“ und die Expression des scFv durch Sekretion in den Bakterienüberstand als auch die Reinigung mit Ni-NTA über den integrierten, C-terminalen His6-„tag“ durchzuführen.

Die Diversität der Bibliotheken wurde überprüft und die vielversprechensten Bibliotheken zusammengefügt und gegen die verschiedenen Antigene CWP, SG, FPCWP und einem *F. graminearum* spezifischen Toxin gepannt. Nach der zweiten und der dritten Runde des

„Phage Displays“ wurden die sich im Bakterienüberstand befindlichen scFvs auf ihre Antigenbindungsspezifität überprüft und die stärksten Antigen bindenden scFvs exprimiert und gereinigt. Die Charakterisierung der gereinigten scFvs CWPD2, FPCWPA5 und SGB3 erfolgte durch ELISA, Immunoblot und Immunofluoreszenz. Die identifizierten scFvs wurden mit unterschiedlichen AFP fusioniert und sowohl die scFvs als auch die scFv-AFP Fusionen in verschiedene Vektor- und Expressionssysteme umklontiert.

Der Vektor pHENHi diente als bakterielles Expressionssystem für die scFvs als auch die scFv-AFP und die entsprechenden Kontrollen (AFP, AFP-scFv PIPP).

Durch die Integration der scFvs und scFv-AFP in einen Pflanzenexpressionsvektor konnten diese sowohl transient in Tabak als auch stabil in *A. thaliana* exprimiert werden. Da während der Charakterisierung der scFvs in ELISA festgestellt wurde, dass die scFvs als auch die scFv-AFP gegen alle getesteten Fusarien wie z.B. *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*, welcher ein Pathogen von *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia darstellt, reagierten, wurde diese *Arabidopsis*-Unterart als Modelnpflanze verwendet.

Bei Weizen und Reis, welche von *F. graminearum* befallen werden, der ein großes Problem beim Anbau von Weizen und Reis in Nordamerika und Asien darstellt, wurde die Methode des „particle bombardment“ angewandt. Die verschiedenen Konstrukte mit den jeweiligen Kontrollen wurden in den pAHC25-Vektor kloniert und in Weizen und Reis transformiert.

Die scFvs und scFv-AFP-Fusionen zusammen mit den entsprechenden Kontrollen wurden in *E. coli* exprimiert, charakterisiert und deren pilzhemmende Aktivität *in vitro* überprüft. Dabei zeigten die Konstrukte AG-scFv CWPD2, RS-scFv CWPD2 und Chi-scFv CWPD2 einen wachstumshemmenden Effekt auf *F. graminearum* und *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*. Die vielversprechensten Konstrukte wurden zusammen mit diversen Kontrollen in Tabak transient exprimiert und charakterisiert.

Mit den Pilz-bindenden AFP-scFv-Fusionsproteinen wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, um deren spezifische Bindung an pilzliche Strukturen und deren biologische Aktivität genauer zu untersuchen.

In den stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden die integrierten DNS-Konstrukte mittels PCR-Analyse und die Expression anhand eines Immunoblots und eines ELISAs überprüft. Abschließend wurden Resistenztests von stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen der F2-Generation durchgeführt. Bei diesen Versuchen konnte demonstriert werden, dass die Konstrukte AG-scFv CWPD2, RS-scFv CWPD2, Lacto-scFv CWPD2 und Chi-scFv CWPD2 zu einer rAk-vermittelten Resistenz von *A. thaliana* cv. Columbia gegen *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* gegenüber den Kontrollen führten.

6. Literatur

- AGUILERA, O., OSTOLAZA, H., QUIROS, L.M., FIERRO, J.F. (1999): Permeabilizing action of an antimicrobial lactoferricin-derived peptide on bacterial and artificial membranes, *FEBS Letters*, **462**, 273-277.
- AIDA, R., HIROSE, Y., KISHIMOTO, S. and SHIBATA, M. (1999): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Science*, **148**, 1-7.
- AKUTSU, K. (1995): Style of disease development by grey mould. *Journal of Pesticide Science*, **20**, 187-192.
- ALTPETER, F., VASIL, V., SRIVASTAV, V., STOGER, E. and VASIL, I. K. (1996): Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Reports*, **16**, 12-17.
- ARTSAENKO, O., PEISKER, M., ZUR NIEDEN, U. FIEDLER, U., WEILER, E.W., MÜNTZ, K. and CONRAD, U. (1995): Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *Plant Journal*, **8**, 745-750.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., and KINGSTONE, R.E. (1995): Current Protocols in Molecular Biology. *Wiley Interscience*, New York.
- AYALA, M., BALINT, R.F., FERNANDEZ-DE-COSSIO, L., CANAAN-HADEN, J.W., LARRICK, J.W. and GAVILONDO, J.V. (1995): Variable region sequence modulates periplasmic export of a single-chain Fv antibody fragment in *E. coli*. *BioTechniques*, **18**, 835-838.
- BARTH, S., HUHN, M., MATTHEY, B., KLIMKA, A., GALINSKI, E.A. and ENGERT, A. (2000): Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 1572-1579.
- BARTNICKI-GARCIA, S. (1973): Fungal cell wall composition. *Handbook of Microbiology*, **II**, 201-214.
- BAULCOMBE, D. (1996). RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, **32**, 79-88.
- BAUM, T.J., HIATT, A., PARROTT, W.A., PRATT, L.H. and HUSSEY, R.S. (1996): Expression in tobacco of a functional monoclonal antibody specific to stylet secretions of the root-knot nematode. *Molecular Plant Microbe Interaction*, **9**, 382-387.
- BECKER, I. (1990): Konstruktion chimärer Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Gene und ihre Expression in *Solanum tuberosum*. *Dissertation*. RWTH Aachen.
- BEGENT, R.H. (1996): Lettsomian Lecture. Selective cancer therapy: is it attainable with engineered antibodies and gene therapy? *Transaction of the Medical Society of London* **113**, 51-56.
- BENHAMOU, N. (1996): Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science* **1**, 233-240.
- BENHAR, I. and PASTAN, I. (1995): Identification of residues that stabilizes the single-chain Fv of monoclonal antibodies B3. *Journal of Biological Chemistry*, **40**, 23373-23380.
- BLIFFELD, M., MUNDY, J., POTRYKUS, I. and FUTTERER, J. (1999): Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**, 1079-1086.
- BIRD, R.E., HARDMAN, K.D., JACOBSON, J.W., JOHNSON, S., KAUFMAN, B.M., LEE, S.M., LEE, T., POPE, S.H., RIORDAN, G.S. and WHITLOW, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423-426.

- BIOCCA, S., RUBERTI, F., TAFANI, M., PIERANDREI-AMALDI, P. and CATTANEO, A. (1995): Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmatic reticulum, cytosol and mitochondria. *Bio/Technology*, **13**, 1110-1115.
- BONNYCASTLE, L.L.C., MEKROKE, J.S., RASHED, M., GONG, X. and SCOTT, J.K. (1996): Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *Journal of Molecular Biology*, **258**, 747-762.
- BOTHMANN, H. and PLÜCKTHUN, A. (2000): The periplasmic *E. coli* peptidylprolyl cis, trans-isomerase FkpA. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 17100-17105.
- BRUYNS, A.M., DE JAEGER, G., DE NEVE, M., DE WILDE, C., VAN MONTAGU, M., DEPICKER, A. (1996): Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties. *FEBS Lett.*, **386**, 5-10.
- BAUM, T.J., HAITT, A., PARROTT, W.A., PRATT, L.H. and HUSSEY, R.S. (1996): Expression in tobacco of a functional monoclonal antibody specific to stylet secretions of the root-knot nematode. *MPMI*, **9**, 382-387.
- BREGEGERE, F., ENGLAND, P., DJAVADI-OHANIANCE, L. and BEDOUELLE, H. (1997): Recognition of *E.coli* by single-chain Fv fragments: Comparison of PCR cloning variants with the parental antibodies. *Journal of Molecular Recognition* **10**, 169-181.
- BROGLIE, K., CHET, I., HOLLIDAY, M., CRESSMAN, R., BIDDLE, P., KNOWLTON, S., MAUSVAIS, C.J. and BROGLIE, R. (1991): Transgenic plants with enhanced resistance to fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*, **254**, 1194-1197.
- BURTON, D.R. (1987). Structure and function of antibodies. In: Molecular genetics of immunoglobulins. *Elsevier*, Amsterdam, 1-50.
- BURTON, D.R. and BARBAS, C.F. (1993): Human antibodies to HIV-1 by recombinant DNA methods. *Chemical Immunology*, **56**, 112-126.
- CASARENI, G. (1987): Phage-plasmid hybrid vectors. *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and their Uses* ed. By Rodriguez, R.I., Denhardt, D.T., Boston: Butterworth 1987, 103-111.
- CAMMUE, B.P.A., THEVISSSEN, K., HENRIKS, M., EGGERMOUNT, K., GODERIS, I.J., PROOST, P., VAN DAMME, J., OSBORN, R.W., GUERBETTE, F., KADER, J.-C. and BROEKAERT, W.F. (1995): A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiology*, **109**, 445-455.
- CARPITA, N., SABULARSE, D., MONTEZINOS, D., DELMER, D.P. (1979). Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science*, **205**, 1144-1147.
- CHAMPION, R. (1997): Identifier les champignons transmis par les semences. *INRA*, Paris.
- CHAPPLE, D.S., MASON, J.M., JOANNOU, C.L., ODELL, E. W., GANT, V. and EVANS, R.W. (1998): Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. *American Society for Microbiology*, **66**, 2434-2440.
- CHRISTOU, P., MCCABE, DE and SWAIN, WF (1988): Stable transformation of soybean callus by DNS coated particles. *Plant Physiology*, **87**, 671-674.
- CHRISTOU, P., FORD, T. and KOFRON, M. (1991): Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically-important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology*, **9**, 957-62.
- CHRISTOPHER, R.T., FRENCES, M.D. and CHRISTOPHER A.G. (1997): Production and characterization of a monoclonal antibody raised against surface antigens from mycelium of

- Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*: Evidence for an extracellular polyphenol oxidase. *The American Phytopathological Society*, **87**, 123-131.
- CHU, F.S., GROSSMAN, S., WEI R.-D. and MIROCHA, C.J. (1979). Production of antibody against T-2 Toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, **37**, 104-108.
- CLACKSON, T., HOOGENBOOM, H.R., GRIFFITHS, A.D. and WINTER, G. (1991): Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, **352**, 624-628.
- CLARK, M.F. and ADAMS, A.N. (1977): Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, **34**, 475-483.
- CLOUGH, S.J. and BENT, A.F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **16**, 735-743.
- COLIGAN, J.E., KRUISBEEK, A.M., MARGULIES, D.H., SHEVACH, E.M. and STROBER, W. (1995): Current Protocols in Immunology. *Wiley Interscience*, New York.
- COLOMA, M.J. and MORRISON, S.L. (1997). Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. *Nature Biotechnology* **15**, 159-163.
- CWIRLA, S.E., PETERS, E.A., BARRET, R.W. and DOWER, W.J. (1990): Peptides on phage: A vast library for identifying ligands. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)*, **87**, 6378-6382.
- DALCERO, A., TORRES, A., ETCHEVERRY, M., CHULZE, S. and VARSAVSKY, E. (1997). Occurrence of deoxynivalenol and *F. graminearum* in Argentina wheat. *Food Additives and Contaminants*, **14**, 11-14.
- DAVIES, E.L., SMITH, J.S., BIRKETT, C.R., MANSER, J.M., ANDERSON-DEAR, D.V. and YOUNG, J.R. (1995): Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes. *Journal of Molecular Methodes*, **186**,125-135.
- DÄNICKE, S. and VALENTA, H. (1999): Mykotoxine: Mykotoxine im Futter - Gefahr für landwirtschaftliche Nutztiere. *Ernährung – Landwirtschaft – Forsten 2/1999*, Heft **20**.
- DE JAEGER, G., BUYS, E., EECKHOUT, D., BRUYNS, A.M., DE NEVE, M., DE WILDE, C., GERATS, T., VAN MONTAGU, M., FISCHER, R. and DEPICKER, A. (1997): Use of phage display for isolation and characterization of single-chain variable fragments against dihydroflavonol 4-reductase from *Petunia hybrida*. *FEBS Letters*, **403**, 116-122.
- DE NEVE, M., DE LOOSE, M., JACOBS, A., VAN HOUT, H., KALUZA, B., WEIDLE, U., VAN MONTAGU, M. and DEPICKER, A. (1993): Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Research*, **2**, 227-237.
- DE WILDE, C., DE NEVE, M., DE RYCKE, R., BRUYNS, A.M., DE JAEGER, G., VAN MONTAGU, M., DEPICKER, A. and ENGLER, G (1996): Intact antigen binding MAK33 antibody and Fab fragment accumulate in intercellular spaces of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, **114**, 233-241.
- DESFEUX, C., STEVEN, J.C. and BENT, A.F. (2000): Female reproductive are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* Floral-Dip Method. *Plant Physiology*, **123**, 895-904.
- DESJARDINS, A.E., PROCTOR, R.H., BAI, G., MCCORMICK, S.P., SHANER, G., BUECHLEY, G. and HOHN, T.M. (1996): Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **9**, 775-781.
- DESJARDINS, A.E. and HOHN, T.M. (1997): Mycotoxins in Plant Pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **10**, 147-152.

- DUENAS, M., VAZQUEZ, J., AYALA, M., SÖDERLIND, E., OHLIN, M., PEREZ, L., BORREBAECK, C.A.K. and GAVILONDO, J.V. (1994): Intra- and extracellular expression of an scFv antibody fragment in *E. coli*: Effect of bacterial strains and pathway engineering using GroES/L chaperonins. *BioTechniques*, **16**, 476-483.
- DÜRING, K., HIPPE, S., KREUZALER, F. and SCHELL, J. (1990): Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, **15**, 281-293.
- DUVICK, J.P., ROOD, T., RAO, A.G. and MARSHAK (1992): Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**, 18814-18820.
- EVAN, G.I., LEWIS, G.K., RAMSAY, G. and BISHOP, M. (1985): Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene produkt. *Molecular and Cellular Biology*, **12**: 3610-3616.
- FALKENBERG, F.W. (1998): Monoclonal antibody production: problems and solutions. *Research in Immunology*, **149**, 542-547.
- FECKER, L.F., KAUFMANN, A., COMMANDEUR, U., COMMANDEUR, J., KOENIG, R. and BURGERMEISTER, W. (1996): Expression of single-chain antibody fragments (scFv) specific for beet yellow vein virus coat protein or 25 kDa protein in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology*, **32**, 979-986.
- FEHLBAUM, P., BULET, P., MICHAUT, L., LAGUEUX, M., BROEKART, W.F., HETRU, C. and HOFFMANN, J.A. (1994): Insect immunity: septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**, 33159-33163.
- FELICI, F., CASTAGNOLI, L., MUSACCHIO, A., JAPELLI, R. and CESARENI, G. (1991): Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *Journal of Molecular Biology*, **222**, 301-310.
- FIEDLER, U. and CONRAD, U. (1995): High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Bio/technology*, **13**, 1090-1093.
- FIEDLER, U., PHILLIPS, J., ARTSAENKO, O. and CONRAD, U. (1997): Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology*, **3**, 205-216.
- FIREK, S., DRAPER J., OWEN, M.R.L., GANDECHA, A., COCKBURN, B. and WHITELAM G.C. (1993): Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures. *Plant Molecular Biology*, **23**, 861-870.
- FISCHER; R. (1990): Herstellung, Charakterisierung und Klonierung der Immunglobulingene von TMV-neutralisierenden Antikörpern. *Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Dissertation*.
- FISCHER, R., SCHUMANN, D., ZIMMERMANN, S., DROSSARD, J., SACK, M. and SCHILLBERG, S. (1999a): Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *European Journal of Biochemistry*, **262**, 810-816.
- FISCHER, R., LIAO, Y.-C. and DROSSARD, J. (1999b): Affinity-purification of a TMV-specific recombinant full-size antibody form transgenic tobacco suspension culture. *Journal of Immunological Methods*, **226**, 1-10.
- FISCHEL, S. B., EDWARDS, R. G. and EVANS, C. J. (1984): Human chorionic gonadotropin secreted by preimplantation embryos cultured in vitro; *Science*, **223**, 816-818.
- GASSMANN, M., WEISEER, T., THÖMMES, P. and HÜBSCHER, U. (1990): The chicken egg as a supply of polyclonal antibodies. *Schweizer Tierheilkunde*, **132**, 289-294.

- GLASER, V. (1995): Adjuvants boost safety, efficacy while lowering costs of new vaccines. *Genetic Engineering News*, **6**, 6-7.
- GLOCKSHUBER, R., SCHMIDT, T. and PLÜCKTHUN, A. (1992): The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding *in vitro*, and functional expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **31**, 1270-1279.
- GLUCKSMAN, M.J., BHATTACHARJEE, S. and MAKOWSKI, L. (1992): Three-dimensional structure of a cloning vector. X-ray diffraction studies of filamentous bacteriophage M13 at 7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **226**, 455-470.
- GOEBEL, C., HAHN, A. and HOCK, B. (1995). Production of polyclonal and monoclonal antibodies against hyphae from arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, **15**, 293-304.
- GUO, L., WANG, J., YAN, X., CHEN, R., QIAN, S. and MENG, G. (2000): Characterization of L-asparaginase fused with a protective scFv and the protection mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **276**, 197-203.
- HANAHAH, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **166**, 557.
- HAUKLAND, H.H. and VORLAND, L.H. (2001): Post-antibiotic effect of the antimicrobial peptide lactoferricin on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **48**, 569-571.
- HAUKLAND, H.H., ULVTNE, H., SANDVIK, K. and VORLAND, L.H. (2001): The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm. *FEBS*, **508**, 389-393.
- HEATH, M.C. (1980): Reactions of non-susceptible to fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **18**, 211-236.
- HIATT, A., CAFFERKEY, R. and BOWDISH, K. (1989): Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, **342**, 76-78.
- HIATT, E.E., HIKK, N.S. BOUTON, J.H. and MIMS, C.W. (1997): Monoclonal antibodies for detection of *Neotyphodium coenophialum*. *Crop Science*, **37**, 1265-1269.
- HIATT, E.E. HILL, N.S. and HIATT, E.N. (2001): Monoclonal antibodies incorporated into *Neotyphodium coenophialum* fungal cultures: Inhibition of fungal growth and stability of antibodies. *Fungal Genetics and Biology*, **33**, 107-114.
- HIDY, P.H., BALDWIN, R.S., GREASHAM, R.L., KEITH, C.L. and MCMULLEN, J.R. (1977): Zearaleone and some derivatives: production and biological activities. *Advances in Applied Microbiology*, **22**, 59-82.
- HOLZEM, A. (1998): Epitopbestimmung rekombinanter Antikörper. *Diplomarbeit RWTH-Aachen*.
- HOOGENBOOM, H.R., GRIFFITHS, A.D., JOHNSON, K.S., CHISWELL, D.J., HUDSON, P. and 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**, 4133-4137.
- HOOGENBOOM, H.R., BRUINE, A.P., HUFTON, S.E., HOET, R.M.H., ARDENS, J.-W. and ROOVERS, R.C. (1998): Antibody phage display and its applications. *Immunotechnology*, **4**, 1-20.
- HUNTER, G.J., POWITCH, D.H. and PERHAM, R.N. (1987): Interactions between DNA and coat protein in the structure and assembly of bacteriophage fd. *Nature*, **327**, 252-254.

- HUNTER, K., BRIMFIELD, A., KNOWER, A., POWELL, J. and FEUERSTEIN, G. (1990): Reversal of intracellular toxicity of the trichothecene mycotoxin T-2 with monoclonal antibody. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **255**, 1183-1187.
- HUSTON, J.S., LEVINSON, D., MUDGET-HUNTER, M., TAI, M.-S., NOVOTNY, J., MARGOLIES, M.N., RIDGE, R.J., BRUCCOLERI, R.E., HABER, E., CREA, R. and OPPERMANN, H. (1988): Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-dioxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **85**, 5879-5883.
- HWANG, P.M., ZHOU N., SHAN X., ARROWSMITH, C.H., and VOGEL H.J. (1998): Three-dimensional solution structure of Lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. *Biochemistry*, **37**, 4288-4298.
- INBAR, D., HOCHMAN, J. and GIVOL, D. (1972): Localization of the antibody combining site within the variable portions of heavy and light chains. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **69**, 2659-2662.
- JESNOWSKI, R., NÄHRING, J., WOLF, K. (1995): A rapid and reliable method for PCR-based amplification of chromosomal and mitochondrial DNA from intact yeast cells. *Current Genetics*, **27**, 318-319.
- KABAT, E.A., WU, T.T., REID-MILLER, M., PERRY, H.M. and GOTTESMAN, K.S. (1991): Sequences of proteins of immunological interest. *U.S. Department of Health. Fifth Edition*.
- KALLELA, K. and SAASTAMOINEN, I. (1981): Decomposition of the *Fusarium graminearum* toxin zearalenone in storage conditions. *Nordisk Veterinärmedicin*, **33**, 454-460.
- KANG, Z. and BUCHAUER, H. (2000a): Cytology and ultrastructure of the infection of wheat spikes by *Fusarium culmorum*: *Mycological Research*, **104**, 1083-1093.
- KANG, Z. and BUCHAUER, H. (2000b): Ultrastructural and cytochemical studies on cellulose, xylan and pectin degradation in wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Journal of Phytopathology*, **148**, 263-275.
- KANG, Z. and BUCHAUER, H. (1999): Immunocytochemical localization of *Fusarium* toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**, 275-288.
- KAPILA, J., DE RYCKE, R., VAN MONTAGU, M. and ANGENON, G. (1997): An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, **122**, 101-108.
- KAY, R., CHAN, A., DALY, M. and McPHERSON, J. (1987): Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*, **236**, 1299-1302.
- KIPRIYANOV, S.M., MOLDENHAUER, G. and LITTLE, M. (1997). High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *E. coli* cultures. *Journal of Immunological Methods*, **200**, 69-77.
- KLEIN, T.M., HARPER, E.C. SVAB, Z., SANFORD, J.C., FROMM, M.E. and MALIGA, P. (1988): Stable genetic transformation of intact *Nicotinia* cells by the particle bombardment process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8502-8505.
- KOLATTUKUDY P.E., ROGERS L.M., LI D., HWANG C.S. and FLAISHMAN, M.A. (1995): Surface signaling in pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **92**, 4080-4087.
- KOMBRINK, E., SCHROEDER, M. and HAHLBROCK, K. (1988): Several „pathogenesis-related“ proteins in potato are 1,3 β -glucanases and chitinases. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **85**, 782-786.

- KONCZ, C., 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 & General Genetics*, **204**, 383-396.
- KRYSIAK, C., MAZUS, B. and BUCHOWICZ, J. (1999): Relaxation, linearization and fragmentation of supercoiled circular DNA by tungsten microprojectiles. *Transgenic Research*, **8**, 303-306.
- LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LANDON, J., WOOLEY, J.A. and MCLEAN, C. (1995): Antibody production in the hen. *Therapeutic Antibodies*, 47-62.
- LEGRAND, M., KAUFFMAN, S., GEOFFROY, P. and FRITIG, B. (1987): Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis related proteins are chitinase. . *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **84**, 6750-6754.
- LEWIN, B. (1996): Rearrangement and the generation of immune diversity. *Genes*, 6th edition (J. Wiley and sons), Kapitel 37.
- LIAO, Y.C., KREUZALER, F., FISCHER, R. REISENER H.-J. and TIBURZY, R. (1994): Characterization of a wheat class Ib chitinase gene differentially induced in isogenic lines by infection with *Puccinia graminis*. *Plant Science*, **103**, 177-187.
- LIN, W. ANURATHA, C.S., DATTA, K., POTRYKUS, I. , MUTHUKTISHNAN, S. and DATTA, S.K. (1995): Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Bio/Technologie*, **13**, 686-691.
- LINDQUIST, E.A., JAMES, D.M., KLEBA, B.J. and STEPHENS, R.S. (2002): Phage-display antibody detection of *Chlamydia trachomatis*-associated antigens. *Microbiology*, **148**, 443-451.
- LORIMER, I. A., KEPPLER-HAFKEMEYER, A., BEERS, R.A., PEGRAM C.N., BIGNER, D.D. and PASTAN, I. (1996): Recombinant immunotoxins specific for a mutant epidermal growth factor receptor: targeting with a single chain antibody variable domain isolated by phage display. *PNAS*, **93**, 14815-14820.
- MALMBORG, A.C. and BORREBAECK, C.A.K. (1995): BIAcore as a tool in antibody engineering. *Journal of Immunological Methods*, **183**, 7-13.
- MANNERLÖF, M. and TENNING, P. (1997). Variability of gene expression in transgenic tobacco. *Euphytica*, **98**, 133-139.
- MARASCO, W.A. (1995): Intracellular antibodies (intrabodies) as research reagents and therapeutic molecules for gene therapy. *Immunotechnology*, **1**, 1-19.
- McCAFFERY J., GRIFFITHS A. D., WINTER G. and CHRISWELL D.J. (1990): Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, **348**, 552-554.
- McCORMACK, W.T. and THOMPSON C.B. (1990): Chicken IgL variable region gene conversions display pseudogene donor preference and 5' to 3' polarity. *Genes & Development*, **4**, 548.
- MEAD, D.A. and KEMPER, B. (1987): Phage-plasmid hybrid vectors. *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and their Uses* ed. By Rodriguez, R.I., Denhardt, D.T., Boston: Butterworth 1987, 85-102.
- MEGALLA, S.E., BENNETT, G.A., ELLIS, J.J. and SHOTTWELL, O.I. (1986): Production of deoxynivalenol and zearalenone by isolates of *Fusarium graminearum* Schw.. *Journal of Basic Microbiology*, **26**, 415-419.

- MONECKE, M. (1999): Immunologische Untersuchungen zur Expression von Nicht-Strukturproteinen aus Kartoffel Blattrollvirus (PLRV) mit spezifischen Antikörpern. *RWTH-Aachen, Biologie I, Dissertation*.
- MULLINS, E.D. and KANG, S. (2001): Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**, 2043-2052.
- MUNRO, S. and PELHAM, H.R.B. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER-proteins. *Cell*, **48**, 988-997.
- MÜLLER, B. and BÖRGER, A. (1940): In: *Arbeitsbericht der Biologischen Reichsanstalt für Landwirtschaft und Forstwirtschaft*, **23**, 189.
- MURDOCH, L.J., KOBAYASHI, I. and HARDHAM, A.R. (1998): Production and characterisation of monoclonal antibodies to cell wall components of the flax rust fungus. *European Journal of Plant Pathology*, **104**, 331-346.
- MUYLDERMANS, S., ATARHOCH, T., SALDANHA, J, BARBOSA, J.A.,R.G. and HAMERS, R. (1994): Sequence and structure of V_H domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Engineering*, **7**, 1129-1135.
- NIERSBACH, M. (1994): Erhöhte Resistenz gegen Tabak-Mosaik-Virus-Infektion durch die Expression eines neotop-spezifischen monoklonalen Antikörpers in Tabakpflanzen. *Dissertation*. RWTH Aachen.
- NISHIZAWA, Y. and HIBI, T. (1991): Rice chitinase gen: cDNA cloning and stress-induced expression. *Plant Science*, **76**, 211-218.
- NISHIZAWA, Y., KIHIMOTO, N., SAITO, A. and HIBI, T. (1993): Sequence variation differential expression and chromosomal location of rice chitinase genes. *Molecular Genetics and Genomics*, **241**, 1-10.
- OERKE, E.C., DEHNE, H.W., SCHÖNBERG, F. and WEBER, A. (1994): Crop production and crop protection. *Elsevier Amsterdam*, **72**.
- OPELLA, S.J., STEWART, P.L. and VALENTINE, K.G. (1987): Protein structure by solid-state NMR spectroscopy. *Review Biophysics*, **19**, 7-49.
- OPLICZ-LUTHARDT, A. (1999): Welkekrankheit bei Cyclamen: Nach wie vor ein ungelöstes Problem, *Ernährung – Landwirtschaft – Forsten 2/1999*, Heft **20**.
- OWEN, M., CANDECHA, A., COCKBURN, B. and WHITELAM, G. (1992): Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco. *BioTechnology*, **10**, 790-794.
- PAIN, N., O'CONNELL, R., BAILEY, J. and GREEN, J. (1992): Monoclonal antibodies which show restricted binding to four *Colletotrichum* species: *C. lindemuthianum*, *C. malvarum*, *C. orbiculare* and *C. trifolii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **41**, 111–126.
- PARHAM, P. (1986): Handbook of Experimental Immunology Vol. I: Immunochemistry. Chapter, 14, 1-23. *Blackwell Scientific Publications*.
- PATOLIANO, M.W., BIRD, R.E., JOHNSON, S., ASELE, E.D., DODD, S.W., WOOD, J.F. and HARDMAN, K.D. (1991). Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **30**, 10117-10125.
- PESCHEN, D. (1999): Herstellung, Isolation und Charakterisierung von Einzelketten-Antikörpern gegen pilzliche Antigene. *RWTH-Aachen, Biologie I, Diplomarbeit*.
- PHILLIPS, J., ARTSAEKO, O., FIEDLER, U., HORSTMANN, C., MOCK, H.P., MUNTZ, K. and CONRAD, U. (1997): Seed-specific immunomodulation for abscisic acid activity induces a developmental switch. *Journal of EMBO*, **16**, 4489-4496.

- PLÜCKTHUN, A. (1991): Strategies for the expression of antibody fragments in *Escherichia coli*. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, **2**, 88-96.
- POLSON T.A., COETZER T., KRUGER J., VON MALTZAHN, E. and VAN DER MERWE, K.J. (1985): Improvements in the isolation of IgY from yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunological Investigation*, **14**, 323-327.
- PORTER, R.R. (1959): The hydrolysis of rabbit gamma-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochemical Journal*, **73**, 119-126.
- RANGASWAMI, G. (1983): Principal diseases of food crops. *Pergamon Press*.
- RAVEN, N. (1998): Vergleichende Expression rekombinanter Einzelketten-Antikörper (scFv) in *E. coli*, *P. pastoris* und Pflanzen. *Diplomarbeit RWTH-Aachen*.
- ROBERT, A., MACKIE, A., HATHAWAY, V., CALLOW, J. and GREEN, J. (1993): Molecular differentiation in the extrahaustorial membrane of pea powdery mildew haustoria at early and late stages of development. *PMPP*, **43**, 147-160.
- RODEMANN, B. (1999): Mykotoxine: Mykotoxine in Getreide. *Ernährung – Landwirtschaft – Forsten 2/1999*, Heft **20**.
- ROSSO, M.N., SCHOUTEN, A., ROOSIEN, J., BORST-VRENSSEN, T., HUSSEY, R.S., GOMMERS, F.J., BAKKER, J., SCHOTS, A. and ABAD, P. (1996): Expression and functional characterization of a single chain Fv antibody directed against secretions involved in plant nematode infection process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **220**, 255-263.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. (1996): Molecular Cloning-A Laboratory Manual 3rd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York.
- SANFORD, J.C., KLEIN, T.M., WOLF, E.D. and ALLEN, N. (1987): Delivery of substances into cells using a particle bombardment progress. *Journal of Parenteral Science and Technology*, **5**, 27-37.
- SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSEN, A.R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **74**, 5463-5467.
- SCHILLBERG, S., ZIMMERMANN, S., VOSS, A. and FISCHER, R. (1999): Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic Research*, **8**, 255-263.
- SCHILLBERG, S., ZIMMERMANN, S., FINDLAY K. and FISCHER, R. (2000): Plasma membrane display of anti-viral single chain Fv fragments confers resistance to tobacco mosaic virus. *Molecular Breeding*, **6**, 317-326.
- SCHILLBERG, S., ZIMMERMANN, S., ZHANG, M.-Y. and FISCHER, R. (2001): Antibody-based resistance to plant pathogens. *Transgenic Research*, **10**, 1-12.
- SCHMIEDL, A., BREITLING, F., WINTER, C.H., QUEITSCH, I and DÜBEL, S. (2000): Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in *E. coli*. *Journal of Immunological Methods*, **242**, 101-114.
- SCHMITT, J., HESS, H. and STUNNENBERG, G.H. (1993): Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Molecular Biology Reports*, **18**, 223-230.
- SCHOTS, A., DE BOER, J., SCHOUTEN, A., ROOSIEN, J., ZILVERENTANT, J.F. POMP, H., BOUWMAN-SMITHS, L., OVERMARS, H. GOMMERS, F.J., VISSER, B., STIEKEMA, W.J. and BAKKER, J. (1992): Plantibodies: A flexible approach to design resistance against pathogens. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, **98**, 183-191.

- SCHOUTEN, A., ROOSIEN, J., VAN ENGELEN, F.A., DE JONG G.A.M., BORST-VRENSSEN, A.W.M., ZILVERENTANT, J.F., BOSCH, D., STIEKEMA, W.J., GOMMERS, F.J., SCHOTS, A. and BAKKER, J. (1996): The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*, **30**, 781-793.
- SCHOUTEN A., ROOSIEN, J., DE BOER, J.M., WILMINK, A., ROSSO, M.N., BOSCH, D., STIEKEMA, W.J., GOMMERS F.J., BAKKER, J. and SCHOTS, A. (1997): Improving scFv antibody expression levels in the plant cytosol. *FEBS Letters*, **415**, 235-41.
- SHERWOOD, R.F. and PEBERDY, J. F. (1974): Production of the mycotoxin, zearalenone, by *Fusarium graminearum* growing on stored grain. II. Treatment of wheat grain with organic acids. *Journal of the Science of Food Agriculture*, **25**, 1089-93.
- SKERRA, A. (1993): Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Current Opinion in Immunology*, **5**, 256-262.
- SMITH, G.P. (1985): Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the surface of the virion. *Science*, **228**, 1315-1317.
- SPIEGEL, H., SCHILLBERG, S., SACK, M., HOLZEM, A., NÄHRING, J., MONECKE, M., YU-CAI, L. and FISCHER, R. (1999): Accumulation of antibody fusion proteins in the cytoplasm and ER of plant cells. *Plant Science*, **149**, 63-71.
- STOGER, E., WILLIAMS, S., KEEN, D. and CHRISTOU, P. (1998): Molecular characteristics of transgenic wheat and the effect on transgene expression. *Transgenic Research*, **7**, 463-471.
- STÖGER, E., VAQUERO, C., TORRES, E., SACK, M., NICHOLSON, L., DROSSARD, J., WILLIAMS, S., KEEN, D., PERRIN, Y., CHRISTOU, P. and FISCHER, R. (2000): Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology*, **42**: 583-590.
- SUDHAKAR, D., DUC, L.T., BONG, B.B., TINJUANGJUN, P., MAQBOOL, S.B., VALDEZ, M., JEFFERSON, R. and CHRISTOU, P. (1998): An efficient rice transformation system utilizing mature seed-derived explants and a portable, inexpensive particle bombardment device *Transgenic Research*, **7**, 289-294.
- SWAMY, K.H.S. and GOLDBERG, A.L. (1982): Subcellular distribution of various proteases in *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, **149**, 1027-1033.
- SYDENHAM, E.W., MARASAS, W.F., THIEL, P.G., SHEPHARD, G.S. and NIEUWENHUIS, J.J. (1991): Production of mycotoxins by selected *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense* isolates. *Food Additives and Contaminations*, **8**, 31-41.
- TANG, Y.,JIANG, N. ,PARAKH, C. and HILVERT, D. (1996): Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. *Journal of Biological Chemistry* **271**:15682-6.
- TAVLADORAKI, P., BENVENUTO, E., TRINCA, S., DE MARTINS, D. and GALEFFI, P. (1993): Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are protected from virus attack. *Nature*, **366**, 469-472.
- TERRAS, F.R.G., EGGERMONT, K., KOVALEVA, V., RAIKHEL, N.V., OSBORN, R.W., KESTER, A., REES, S.B., TORREKENS, S., VAN LEUVEN, F., VANDERLEYDEN, J., CAMMUE, B.P.A. and BROEKAERT W.F. (1995): Small cystein-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defense. *The Plant Cell*, **7**, 573-588.
- THORNTON, C.R., DEWEY, F.M., GILLIGAN, C.A. (1997): Production and characterization of monoclonal antibody raised against surface antigens from mycelium *Gaeumannomyces graminis* var. tritici: Evidence for an extracellular polyphenol oxidase. *The American Phytopathological Society*, **87**, 123-131.

- TÖPFER, R., PRÖLS, M., SCHELL, J., STEINBIß, H-H. (1988): Transient gene expression in tobacco protoplasts: II. Comparison of the reporter gene systems for CAT, NPTII and GUS. *Plant Cell Reports*, **7**, 225-228.
- TORRES, E., VAQUERO, C., NICHOLSON, L., SACK, M., STÖGER, E., DROSSARD, J., CHRISTOU, P., FISCHER, R. and PERRIN, Y. (2000). Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies. *Transgenic Research*, **2195**, 1-9.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. and GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **76**, 4350-4354.
- TURNER, D.J., RITTER, M.A. and GEARGE, A.J. (1997): Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments: optimisation of peptide sequence using phage display technology. *Journal of Immunology Methods*, **205**, 43-54.
- UMWELTBUNDESAMT (1994): Daten zur Umwelt 1992/93. *E. Schmidt-Verlag*, Berlin, Deutschland.
- VAIN, P., MC MULLEN, M.D. and FINER, J.J. (1993): Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports*, **12**, 84-88.
- VALDEZ, M., CABERA-PONCE, J.L., SUDHAKAR, D., HERRERA-ESTRELLA, L. and CHRISTOU, P. (1998): Transgenic Central American, West African and Asian elite rice varieties resulting from particle bombardment of foreign DNA into mature seed-derived explants utilizing three different bombardment devices. *Annals Botany*, **82**, 795-801.
- VAQUERO, C., SACK, M., CHANDLER, J., DROSSARD, J., SCHUSTER, F., MONECKE, M., SCHILLBERG, S. and 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 Science of the United States of America SA*, **96**: 11128-11133.
- VIEIRA, J. and MESSING, J. (1987): Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, **153**, 3-11.
- VOSS, A., NIERSBACH, M., HAIN R., HIRSCH, H.J., LIAO, Y.C., KREUZALER, F. and FISCHER, R. (1995): Reduced virus infectivity in *Nicotiana tabacum* secreting a TMV-specific full-size antibody. *Molecular Breeding*, **1**, 39-50.
- WANG-JOHANNING, F., GILLESPIE, G.Y., GRIM, J., RABCOURT, C., ALVAREZ, R.D., SIEGAL, G.P., CURIEL, D.T. (1998): Intracellular expression of a single-chain antibody directed against human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein achieves targeted antineoplastic effects. *Cancer Research*, **58**, 1893-1900.
- WASYLNKA, J.A. , SIMMER, M.I. and MOORE M.M. (2001): Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species. *Microbiology*, **147**, 869-77.
- WATTAD, C., KOBOLER, D., DINOOR, A. and PRUSKY, D. (1997): Pectate lyase of *Colletotrichum gloeosporioides* attacking avocado fruits - cDNA cloning and involvement in pathogenicity. *Physiological & Molecular Plant Pathology*, **50**, 197-212.
- WNENDT, S., ULBRICH, N. and 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**, 3987.
- WHITLOW, M., BELL, B.A., FENG, S.L., FILPULA, D., HARDMAN, K.D., HUBERT, S.L., ROLLENGE, M.L., WOOD, J.F., SCHOTT, M.E., MILENIC, D.E., YOKOTA, T. and

- SCHLOM, J. (1993): An improved linker for single chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Engineering*, **6**, 989-995.
- WHITTINGTON, H.A., ASHWORTH, L.J. and HAWKINS, R.E. (1998): Recombinant adenoviral delivery for in vivo expression of scFv antibody fusion proteins. *Gene Therapy*, **5**, 770-777.
- WILLIAMS, K.A., GLIBOWICKA, M., LI, H., KHAN, A.R., CHEN, Y.M.Y., WANG, J., MARVIN, D.A. and DEBER, C.M. (1995): Packaging of coat protein amphipathic and transmembrane helices in filamentous bacteriophage M13: Role of small residues in protein oligomerisation. *Journal of Molecular Biology*, **252**, 6-14.
- WINTER, G. and MILSTEIN, C. (1991): Man-made antibodies. *Nature*, **349**, 293-299.
- WIRTH, S.J. and WOLF, G.A. (1990): Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *Journal of Microbiological Methods*, **12**, 197-205.
- WÖPPEL, H.-J. (1995): Ist der Einsatz von Fungiziden in Weizen noch wirtschaftlich? *Weizen*, **2**, 62-63.
- WU, D.Y., UGOZZOLI, L., PAL, B.K. and WALLACE, R.B. (1991): The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biology*, **10**, 233-238.
- YAN, L. and ADAMS, M.E. (1998): Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 2059-2066.
- YAMANAKA, H.I., INOUE T., IKEDA-TANAKA O. (1996): Chicken monoclonal antibody isolated by a phage display system. *Journal Immunology*, **157**, 1156-1162.
- YUAN, Q., CLARKE, J.R., ZHOU, H.R., LINZ, J.E., PESTKA, J.J. and HART, L.P. (1997): Molecular cloning, expression and characterization of a functional single-chain Fv antibody to the mycotoxin zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 263-269.
- YUAN, R., CLYNES, R., OH, J., RAVETH, J.V. and SCHARFF, M.D. (1998) Antibody-mediated modulation of *Cryptococcus neoformans* infection is dependent on distinct Fc receptor functions and IgG subclasses. *Journal of Experimental Medicine*, **187**, 641-648.
- YUAN, Q., WENQI, H., PESTKA, J.J., HE, S.Y. and HART, L.P. (2000): Expression of a functional antizearalenone single-chain Fv antibody in transgenic *Arabidopsis* plants. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 3499-505.
- ZHANG, G.-H., MANN, D.M. and TSAI, C.M. (1999): Neutralization of Endotoxin *in vitro* and *in vivo* by a human lactoferrin-derived peptide. *American Society for Microbiology*, **67**, 1353-1358.
- ZIMMERMANN, S., SCHILLBERG, S., LIAO, Y.C. and FISCHER, R. (1998): Intracellular expression of TMV specific single chain fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum*. *Molecular Breeding*, **1**, 45-50.

7. Anhang

7.1. Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1.:	IgG-Ak und Ak-Fragmente.	8
Abb. 1.2.:	Übersicht zum Versuchsablauf der vorliegenden Doktorarbeit.	13
Abb. 2.1.:	Karte des Phagemids pHENHi.	17
Abb. 3.1.:	Makro- und Mikroskopische Darstellung von <i>F. graminearum</i> Antigenen.	55
Abb. 3.2.:	Elektrophoretische Auftrennung von FPCWP und CWP im SDS-PAA-Gel.	56
Abb. 3.3.:	Reaktivität polyklonaler Ak aus Hühnereigelb und Mäuseseren gegen verschiedene pilzliche Antigene im ELISA.	58
Abb. 3.4.:	Inverse Darstellung der avianen Gesamt-RNS-Isolierung nach Auftrennung im Agarosegel.	60
Abb. 3.5.:	Inverse Darstellung der murinen Gesamt-RNS-Isolierung nach Auftrennung im Agarosegel.	61
Abb. 3.6.:	Inverse Darstellung der Agarosegelelektrophorese der amplifizierten V _H - und V _L -Domänen aus den mit CWP, FPCWP und SG immunisierten Hühnern.	62
Abb. 3.7.:	Inverse Darstellung der Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte der Kolonie-PCR und deren Verdau mit <i>Bst</i> NI.	65
Abb. 3.8.:	Klonierungsschema zur Herstellung des Vektors pHENHi.	68
Abb. 3.9.:	SDS-PAGE- und Immunoblot-Analyse von Ni-NTA-gereinigten scFv SPIII7 aus pHENHi.	68
Abb. 3.10.:	Funktionalitätstest des murinen, IMAC gereinigten, in pHENHi integrierten scFv SPIII7 gegen verschiedene pilzliche Antigene.	68
Abb. 3.11.:	Inverse Darstellung des Agarosegels nach <i>Bst</i> NI-Verdau der Kolonie-PCR-Produkte der stärksten Binder aus der dritten Runde des „Phage Displays“.	70
Abb. 3.12.:	DNS-Sequenz von neun selektionierten avianen <i>F. graminearum</i> spezifischen scFv-Klone.	76
Abb. 3.13.:	Aminosäuresequenz von neun selektionierten avianen <i>F. graminearum</i> spezifischen scFv-Klone.	78
Abb. 3.14.:	SDS-PAGE- und Immunoblot Ni-NTA-gereinigter scFvs.	79
Abb. 3.15.:	Reaktivität verschiedener scFv gegen diverse <i>F. graminearum</i> Antigene im ELISA.	81
Abb. 3.16.:	Reaktivität verschiedener scFv mit diversen <i>Fusarium ssp.</i> im ELISA.	82
Abb. 3.17.:	Immunoblot-Analyse Ni-NTA-gereinigter scFvs gegen das Antigen CWP.	85
Abb. 3.18.:	Immunofluoreszenz-, Durchlicht- und „Overlay“-Analyse von ausgekeimten Sporen und jungem Myzel von <i>F. graminearum</i> inkubiert.	86
Abb. 3.19.:	Expressionskassetten der scFvs, AFP und AFP-scFv Fusionsproteine für die Vektorsysteme pET-22b, pHENHi, pSS ^{HI} , pTRAc und pAHC25.	90
Abb. 3.20.:	Immunoblot von <i>E. coli</i> Überständen mit AFP-scFv und scFv.	92
Abb. 3.21.:	Reaktivität der bakteriell exprimierten CWP-spezifischen scFv CWP2 und der AFP-scFv CWP2-Fusionen im ELISA.	92
Abb. 3.22.:	Immunofluoreszenzanalyse von ausgekeimten <i>F. graminearum</i> Sporen inkubiert mit dem scFv CWP2 und AFP-scFv-CWP2-Fusionsproteinen.	94
Abb. 3.23.:	Reaktivität der in Tabak transient exprimierten CWP-spezifischen scFv CWP2 und der AFP-scFv-CWP2-Fusionen im ELISA.	96
Abb. 3.24.:	Inhibition des <i>Fusarium</i> -Wachstums durch Zugabe von bakteriell exprimierten AFPs, dem scFv CWP2, AFP-scFv-CWP2-Fusionsproteinen und AFP-PIPP-Fusionsproteinen.	97
Abb. 3.25.:	Inverse Darstellung der Kontroll-PCR-Produkte bei der genomische DNS transgener <i>A. thaliana</i> Linien als Template diente.	99
Abb. 3.26.:	Reaktivität der in transgen <i>Arabidopsis</i> exprimierten CWP-spezifischen	

scFv CWPD2 und der AFP-scFv-CWPD2-Fusionen.	100
Abb. 3.27.: Reaktivität der in transgenen Arabidopsislinien exprimierten hCG-spezifischen AFP-scFv-PIPP-Fusionen.	101
Abb. 3.28.: Transgene <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen drei Wochen nach der Infektion mit <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>matthiolae</i> .	105
Abb. 7.1.: Immunofluoreszenzbild und 3D-Strukturen des Keimschlauches von ausgekeimten <i>F. graminearum</i> Sporen inkubiert mit dem CWP-spezifischen scFv CWPD2.	157
Abb. 7.2.: Transgene <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen drei Wochen nach der Infektion mit <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>matthiolae</i> .	158
Abb. 7.3.: Transgene <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen unterschiedlicher Linien drei Wochen nach der Infektion mit <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>matthiolae</i> .	159
Abb. 7.4.: Transgene <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen unterschiedlicher Linien drei Wochen nach der Infektion mit <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>matthiolae</i> .	161

7.2. Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1.1.: Übersicht über die Molekularen Massen und die <i>in vitro</i> inhibitorischen Eigenschaften einiger antifungaler Peptide und Proteine (AFPs) gegen Pilze und Bakterien.	6
Tab. 2.1.: Verwendete <i>E. coli</i>-Stämme.	19
Tab. 2.2.: Identifizierung von Antigen-spezifischen Fg-scFv mit C-terminalen c-myc-„tag“ und His-6-„tag“.	39
Tab. 2.3.: Parameter des indirekten ELISAs zur Bestimmung des Ak-Titers im Serum immunisierter Mäuse bzw. im Eigelb immunisierter Hühner.	42
Tab. 2.4.: Medien zur Transformation, Selektion und Anzucht der transformierten Reispflanzen.	49
Tab. 3.1.: Größen und Komplexität der hergestellten avianen und murinen scFv-Bibliotheken.	64
Tab. 3.2.: Selektion und Anreicherung CWP-, FPCWP-, SG- und DON-bindender Phagen aus der Bibliothek der vereinigten avianen scFv-Bibliotheken CWP, FPCWP und SG.	69
Tab. 3.3.: Spezifität und Kreuzreaktivität avianer und muriner scFvs mit diversen Pilzantigenen.	83
Tab. 3.4.: Auflistung aller 56 klonierten Konstrukte in den jeweiligen Vektoren und deren Charakterisierung in Bakterien und Pflanzen.	88
Tab. 3.5.: Infektionsverlauf bei den unterschiedlichen transgenen <i>Arabidopsis</i>-Linien und den Wildtyp-Pflanzen.	103
Tab. 3.6.: Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>E. coli</i> Expression, des <i>in vitro</i> Assays, der Akkumulation der rekombinaten Proteine und der Resistenztests mit transgenen <i>Arabidopsis</i>-Pflanzen.	104
Tab. 7.1.: Primer für die Integration eines His6-„tag“s in den Vektor pHEN4II.	147
Tab. 7.2.: Primer-Sequenzen zur cDNS-Synthese aus muriner mRNS.	147
Tab. 7.3.: Primer-Sequenzen zur cDNS-Synthese aus avianer mRNS.	147
Tab. 7.4.: Maus 5´-Primer Sequenzen (V_H) für die PCR-Amplifikation nach der cDNS Synthese (MPDVHF1 - MPDVHF16).	147
Tab. 7.5.: Maus 3´-Primer Sequenzen (V_H) für die PCR-Amplifikation nach der cDNS Synthese (MPDVHBII-1 - MPDVHBII-5).	148
Tab. 7.6.: Maus 5´-Primer Sequenzen (V_L)-kappa für die PCR-Amplifikation nach der cDNS Synthese (MPDVLF1 - MPDVLF13).	148
Tab. 7.7.: Maus 3´-Primer Sequenzen (V_L)-kappa für die PCR nach der cDNS Synthese (MPDVLB1-MPDVLB4).	149
Tab. 7.8.: Huhn 5´- und 3´-Primer Sequenzen V_H und V_L für die PCR nach der cDNS Synthese.	149
Tab. 7.9.: Kontroll PCR Primer	150
Tab. 7.10.: LiCor IR₂ 4000 Oligos zur Sequenzierung.	150

7.3. Verzeichnis der Abkürzungen

α	anti (in Verbindung mit Antikörpern)
A	Adenin (in Verbindung mit DNA)
A	Alanin (in Verbindung mit Aminosäuren)
A	Ampère (in Verbindung mit Stromstärke)
Å	Angström
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AMP	Ampizillin
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
BCIP	Bromochloroindolylphosphat
Bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein (in Verbindung mit Aminosäuren)
C	Cytosin (in Verbindung mit DNA)
C	Quervernetzungsgrad (in Verbindung mit PAA-Gelen)
ca.	circa
Cb	Carbenizillin
cDNS	komplementäre DNS
C-Domäne	konstante Domäne
CDR	„complementarity determining region“
cfu	„colony forming units“
CI	Chloroform/Isoamylalkohol [24:1 (v/v)]
cm	Zentimeter
CWP	„cell wall proteins“
CWPWCBP	„cell wall proteins with covalent bound proteins“
D	Asparaginsäure
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DON	15-O-Acetyl-4-deoxynivalenol
ds	„double strand“ (Doppelstrang)
E	Extinktion
E	Glutaminsäure (in Verbindung mit Aminosäuren)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme linked immuno sorbent assay“
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin (in Verbindung mit Aminosäuren)
F(ab') ₂	zwei, über eine Disulfidbrücke verbundene, Fab
Fab	„fragment antigen binding“
Fg	<i>Fusarium graminearum</i>
F-Pilus	Fertilitäts-Pilus
Fv	Ak-Fragment, das nur aus den variablen Regionen der L- und H-Kette besteht
g	Erdbeschleunigung

7. Anhang

G	Glycin (in Verbindung mit Aminosäuren)
°C	Grad Celsius
g	Gramm (in Verbindung mit Gewicht)
G	Guanin (in Verbindung mit DNA)
H	Histidin (in Verbindung mit Aminosäuren)
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
H-Kette	schwere Kette
HR	hypersensitive Reaktion
I	Isoleucin (in Verbindung mit Aminosäuren)
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K	Lysin (in Verbindung mit Aminosäuren)
kD	Kilodalton
Km	Kanamycin
kV	Kilovolt
L	Leucin (in Verbindung mit Aminosäuren)
λ	Lambda
LBA	Luria Broth mit 100µg/ml Ampizillin
LBGA	LBA mit 1% (w/v) Glucose
L-Kette	leichte Kette
Lsg.	Lösung
M	Methionin (in Verbindung mit Aminosäuren)
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mol	Mol
N	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazolium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Ω	Ohm
Oligo	Oligonukleotid
ORF	„open reading frame“
ori	Replikationsursprung
P	Prolin (in Verbindung mit Aminosäuren)
<i>p.a.</i>	zur Analyse
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
PBST	PBS mit 0,05% (v/v) Tween20
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol [25:24:1 (v/v/v)]
PCWP	Plate Culture Washing Proteins
PD	„Phage Display“
PDA	„potato dextrose agar“

7. Anhang

PCR	„polymerase chain reaction“
PE	Proteinexpression
PEG	Polyethylenglycol
pfu	„plaque forming units“
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Phage	Bakteriophage
PI	<i>Phoma lingam</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PPP	Periplasmatischer Puffer
PP	Polypropylen
PPT	Phosphinothricin
Q	Glutamin
R	Arginin (in Verbindung mit Aminosäuren)
rAk	rekombinanter Ak
®	registriertes Warenzeichen
RF	replikative Form
Rif	Rifampizin
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
S	Serin (in Verbindung mit Aminosäuren)
scFv	„single chain fragment of the variable region“ (Einzelketten-Ak)
SDS	„sodiumdodecylsulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde(n)
SP	„Secreted Proteins“
ss	„single strand“ (Einzelstrang)
SS	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
T	Threonin (in Verbindung mit Aminosäuren)
T	Thymidin (in Verbindung mit DNA)
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA
™	„trade mark“
TR	Transformanten für rekombinante DNS
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TY-Medium	Bactotrypton-Hefeextrakt-Medium
TYG-Medium	TY-Medium mit 1% (w/v) Glucose
TYGA-Medium	TYG-Medium mit 100µg/ml Ampizillin
TYAK-Medium	TY-Medium mit 100 µg/ml Ampizillin und 25 µg/ml Kanamycin
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultra-Violett
V	Valin (in Verbindung mit Aminosäuren)
v/v	Volumen pro Volumen
v.v.	<i>vice versa</i>
V-Domäne	variable Domäne
VD	<i>Verticillium daliae</i>
Vol.	Volumen
W	Tryptophan (in Verbindung mit Aminosäuren)
W	Watt (in Verbindung mit Leistung)
w/v	Gewicht pro Volumen
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

7.3.1. Buchstaben-Kode für variable Basenpaare in Primern:

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

7.4. Verzeichnis verwendeter Computerprogramme

Adobe Photoshop 6.0
Copyright © 1989-1998
Adobe Systems Inc.

AIDA 2.31
Raytest GmbH (Straubenhardt)

Amira 2.3 (Demo-Version)
Visual Concepts GmbH, Berlin

Clone Manager 5.03
Copyright © 1995-1998
Scientific & Educational Software

Chromas 1.51
Copyright © 1998 Technelyrium Pty Ltd
Queensland, 4122 Australia

DNASIS for Windows Ver. 2.5
Copyright © 1994-1997
Hitachi Software Engineering Co. Ltd

Microsoft Word 2000
Copyright © 1997 Microsoft Corporation

Microsoft Exel 2000
Copyright © 1985-1997 Microsoft Corporation

Microsoft PowerPoint 2000
Copyright © 1987-1997 Microsoft Corporation

MircrocalTM OriginTM 5
Copyright © 1991-1997 Microcal Software, Inc.

Plasmid and Map Enhancer for Windows 95 3.01
Copyright © 1996-1998
Scientific & Educational Software

Vector NTI Suite 5.5
Copyright © 1998-1999
InforMax, Inc.

7.5. Primer-Sequenzen

Tab. 7.1. Primer für die Integration eines His6-,tag“s in den Vektor pHEN4II.

	Spezifität	Sequenz 5'→3'
pHENHiP1	Bindung an den c-myc-,tag“ („forward“)	C CCA GTC GAC GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT
pHENHiP2	Bindung an das <i>Amber</i> -Stop-Codon und das 5'-Ende des gIII („forward“)	TC TCA GAA GAG GAT CTG AAT CAC CAT CAC CAT CAC GGG GCC GCA TAG ACT GTT GAA
GenIII-int	Anlagerung im gIII bei der <i>Bam</i> HI-Schnittstelle („backward“)	C ACA AAC GAA TGG ATC CTC ATT AAA GCC

Tab. 7.2.: Primer-Sequenzen zur cDNS-Synthese aus muriner mRNA.

	Spezifität	Sequenz 5'→3'
COH30	cDNS-Synthese C _{H1} IgG ₁ spezifisch	GCG CAG TGG ATA GAC AGA
COH32	cDNS-Synthese C _{H1} IgG _{2a(b)} spezifisch	TAA CCC TWG ACC AGG CAT CC
MuPD31	cDNS-Synthese Ig κ spezifisch	GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC GTC GAC GCG GCC GCG ACT AGT

Tab. 7.3.: Primer-Sequenzen zur cDNS-Synthese aus avianer mRNA.

	Spezifität	Sequenz 5'→3'
ChicVHM	cDNS-Synthese ~250 Bp „downstream“ vom D-J-Element	CGG TGG GGG ACA TCT GAG TGG G
ChicVLM	cDNS-Synthese ~330 Bp „downstream“ vom J-Element	AGG GGT GGA GGA CCT GCA CCT C

Tab. 7.4.: Maus 5'-Primer Sequenzen (V_H) für die PCR-Amplifikation nach der cDNS Synthese (MPDVHF1 - MPDVHF16).

	Spezifität nach KABAT (1991)	Überhangregion	Restriktionsenzym-schnittstellen (<i>Sfi</i> I/ <i>Nco</i> I)	Bindungsregion
MPDVHF1	Mu V _H IA Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	GAK GTR CAG CTT CAG GAG TCR GGA
MPDVHF2	Mu V _H IB Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	GAG GTT MAG CTG AWG GAR TCT GG
MPDVHF3	Mu V _H IIA Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	GAG GTC CAG CTR CAR TCT GGA CC
MPDVHF4	Mu V _H IIA Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	CAG GTW CAG CTS CAG CAG TCT G
MPDVHF5	Mu V _H IIB Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	SAG GTC CAR CTG CAG SAR YCT GGR

MPDVHF6	Mu V _H IIC Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	GAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGG
MPDVHF7	Mu V _H IIIA Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	GAR GTG AAG CTG GTG GAR TCT GGR
MPDVHF8	Mu V _H IIIB Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	GAG GTG AAG STY MTC GAG TCT GGA
MPDVHF9	Mu V _H IIIC Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	GAR GTG AAG CTK GAK GAG WCT GR
MPDVHF10	Mu V _H IIID Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	GAV GTG MWG CTK GTG GAG TCT G GK
MPDVHF11	Mu V _H IIID Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	GAG GTG CAR CTK GTT GAG TCT GGT G
MPDVHF12	Mu V _H VA Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	SAG GTY CAG CTK CAG CAG TCT GGA
MPDVHF13	Mu V _H 1 Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	CAG ATC CAG TTG GTG GAG TCT GGA
MPDVHF14	Mu V _H 2 Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	CAG GTS CAC STG RWG SAG TCT GGG
MPDVHF15	Mu V _H 3 Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	CAG GTT ACT CTR AAA GWG TST GGC C
MPDVHF16	Mu V _H 4 Front	C ATG CCA TGA CTC GC	G GCC CAG CCG GCC ATG GCC	GAT GTG AAC TTG GAA GTG TCT GG

Tab. 7.5.: Maus 3'- Primer Sequenzen (V_H) für die PCR-Amplifikation nach der cDNS Synthese (MPDVHBII-1 - MPDVHBII-5).

	Spezifität nach KABAT (1991)	Überhangregion	Restriktionsenzym- schnittstelle (<i>BstEII</i>)	Bindungsregion
MPDVHBII-1	Mu V _H J _H 1 Back	TGM RGA GAC	GGT GAC C	GT RGT C
MPDVHBII-2	Mu V _H J _H 2 Back	TGM RGA GAC	GGT GAC C	GT RGT G
MPDVHBII-3	Mu V _H J _H 3 Back	TGM RGA GAC	GGT GAC C	AG RGT C
MPDVHBII-4	Mu V _H J _H 4 Back	TGM RGA GAC	GGT GAC C	GA GGT T
MPDVHBII-5	Mu V _H J _H 4 Back	TGM RGA GAC	GGT GAC C	GA RAT T

Tab. 7.6.: Maus 5'-Primer Sequenzen (V_L) -kappa für die PCR-Amplifikation nach der cDNS Synthese (MPDVLF1 - MPDVLF13).

	Spezifität nach KABAT (1991)	Überhangregion	Restriktionsen- zymschnitt- stelle (<i>AscI</i>)	Bindungsregion
MPDVLF1	Mu kappa V _L I Front	CAT GCC ATG ACT CGC	GGC GCG CCT	GAC ATT GTG MTG WCH CAG TCT CCA
MPDVLF2	Mu kappa V _L I Front	CAT GCC ATG ACT CGC	GGC GCG CCT	GAC ATT CAG ATG ATT CAG TCT CC
MPDVLF3	Mu kappa V _L I Front	CAT GCC ATG ACT CGC	GGC GCG CCT	GAC ATT GTT CTC WHC CAG TCT CC
MPDVLF4	Mu kappa V _L I Front	CAT GCC ATG ACT CGC	GGC GCG CCT	GAC ATT GTG MTG WCH CAG TCT CAA
MPDVLF5	Mu kappa V _L II Front	CAT GCC ATG ACT CGC	GGC GCG CCT	GAT RTT KTG ATG ACC CAR RCK GCA
MPDVLF6	Mu kappa V _L II Front	CAT GCC ATG ACT CGC	GGC GCG CCT	GAT RTT KWG ATG ACY CAR RCK CCA
MPDVLF7	Mu kappa V _L II Front	CAT GCC ATG ACT CGC	GGC GCG CCT	GAC ATT GTG ATG ACC CAR BHT G
MPDVLF8	Mu kappa V _L II	CAT GCC ATG ACT	GGC GCG CCT	GAT ATT KTG ATG ACC

MPDVLF9	Front	CGC		CAR AYT CC
	Mu kappa V _L III	CAT GCC ATG ACT	GGC GCG CCT	RAM ATT GTG MTG
MPDVLF10	Front	CGC		ACC CAA TYT CCW
	Mu kappa V _L IV	CAT GCC ATG ACT	GGC GCG CCT	SAA AWT GTK CTS ACC
MPDVLF11	Front	CGC		CAG TCT CCA
	Mu kappa V _L V/VI	CAT GCC ATG ACT	GGC GCG CCT	GAY ATY CAG ATG
MPDVLF12	Front	CGC		ACM CAG WCT AC
	Mu kappa V _L V/VI	CAT GCC ATG ACT	GGC GCG CCT	GAY ATY CAG ATG ACH
MPDVLF13	Front	CGC		CAG WCT CC
	Mu kappa V _L V/VI	CAT GCC ATG ACT	GGC GCG CCT	GAC ATT GTG ATG ACT
	Front	CGC		CAG GCT AC

Tab. 7.7.: Maus 3'-Primer Sequenzen (V_L)-kappa für die PCR nach der cDNS Synthese (MPDVLB1-MPDVLB4).

	Spezifität nach KABAT (1991)	Überhangregion	Restriktionsenzym-Schnittstellen (<i>NotI</i>, <i>SalI</i>)	Bindungsregion
MPDVLB1	Mu kappa V _L /I/II/IV	CT AGT GGT ACT CCA C	GC GGC CGC GTC GAC	AGC MCG TTT CAG YTC CAR YTT
MPDVLB2	Mu kappa V _L /I/II/V	CT AGT GGT ACT CCA C	GC GGC CGC GTC GAC	AGC MCG TTT KAT YTC CAR YTT
MPDVLB3	Mu kappa V _L IV	CT AGT GGT ACT CCA C	GC GGC CGC GTC GAC	AGC MCG TTT BAK YTC TAT CTT TGT
MPDVLB4	Mu kappa V _L /I/II/IV	CT AGT GGT ACT CCA C	GC GGC CGC GTC GAC	AGC MCG AGC MCG TTT TAT TTC CAA MKT

Tab. 7.8.: Huhn 5'- und 3'-Primer Sequenzen V_H und V_L für die PCR nach der cDNS Synthese.

	Überhangregion	Restriktionsenzym-Schnittstellen (<i>SfiI</i>, <i>NcoI</i>, <i>BstEII</i>, <i>AseI</i> <i>NotI</i>, <i>SalI</i>)	Bindungsregion
CDPVHF	A TCT AGG CAT CCC TT	G GCC CAG CCG GCC ATG G	CT GCC GTG ACG TTG GAC GAG TCC
CDPVHB	CTA GTG CAT GCT GGA	GGT GAC C	TC GGT CCC GTG GCC CCA TGC GTC
CDPVLF	TCC ACA CAT GCT CCA	GGC GCG CC	T GCG CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG
CDPVHB	TGA CCT TCG AGG ATG C	GC GGC CGC GTC GAC	GGG CTG GCC TAG GAC GGT CAG

Tab. 7.9.: Kontroll PCR Primer.

Name	Spezifität	Sequenz (5' -> 3')
LMB3	5' Primer für pHEN Bindung 5' upstream <i>peI</i> B	CAG GAA ACA GCT ATG AC
fdseq1	3' Primer für pHEN Bindung im gIII	GAA TTT TCT GTA TGA GG
pS-5' PCR-Primer'	5' Primer für pTRAKC und pSS	GAC CCT TCC TCT ATA TAA GG
pS-3' PCR-Primer	3' Primer für pTRAKC und pSS	CAC ACA TTA TTC TGG AGA AA

Tab. 7.10.:LiCor IR₂ 4000 Oligos zur Sequenzierung.

Name	Spezifität	Sequenz (5' -> 3')
pHEN5' forward (IRD700)	5'-Primervektorregion 5'- upstream von scFv-VH Beginn	GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GC
pHEN3' backward (IRD800)	3'-Primervektorregion 3'- downstream von scFv-VL	GAC GTT AGT AAA TGA ATT TTC
pSS-5' forward (IRD700)	5' Primer für pTRAKc und pSS	ATC CTT CGC AAGACC CTT CCT CT
pSS-3' backward (IRS800)	3' Primer für pTRAKc und pSS	AGA GAG AGA TAG ATT TGT AGA GA
Universe 1 forward (IRD700)	Bindet an die M13 universe Bindungsstelle	GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT
Universe 2 backward (IRD800)	Bindet an die M13 universe Bindungsstelle	GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT
Reverse 3 forward (IRD700)	Bindet an die M13 reverse Bindungsstelle	ACA CAG GAA ACA GCT ATG AC
Reverse 4 backward (IRD800)	Bindet an die M13 reverse Bindungsstelle	ACA CAG GAA ACA GCT ATG AC

7.6. Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen

Im nachfolgenden sind alle in dieser Arbeit klonierten cDNS-Sequenzen und deren Proteinsequenzen wiedergegeben.

7.6.1. Nukleotidsequenzen

Erklärungen zu der Symbolik: Restriktionsschnittstellen ; 218* Linker (WHITLOW *et al.*, 1993), mit dem Austausch eines Tyrosins zu Prolin; c-myc-„tag“; His6-„tag“

Der scFv CWPDP2 ist ein rAk, welcher mit Hilfe des „Phage Displays“ aus einer immunokompetenten avianen scFv-Bibliothek bei der Selektion gegen CWP generiert wurde (3.6.).

Nukleotidsequenz vom scFv CWPDP2:

GCGGCCAGCCGGCCATGGCTGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGG
 AGGAGGGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGGCTCCGGGTTGACTTCAGCAGTGACACCATGATGTGGGT
 GCGCCAGGCGCCCGGCAAGGGGTTGGAATTCGTCGCTGGTATTAGTGGTGTGGTAGTGACACAA
 ACTACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGG
 CTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCCACCTACTACTGCACCAGAGGTCTTGTAGT
 CCTACGAAGAATTGTGCTGCTGATCGTATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAGGTCACCGTCTCC
TCAGGCTCCACCTCAGGCTCCGGTAAACCTGGCCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGCGCGCCTGC
 GCTGACTCAGCCGTCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCGAGATCACCTGCTCCGGGGG
 TGGTATAGGTATGGCTGGTTCAGCAGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCCTGTCACAGTGATCTACTG
 GGATGATGACAGCGCCAACAGACCCTCGAACATCCCTTCACGATTCTCCGTTCCACATCTGGCTC
 CACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGACGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGCTA
 TGACAGGAGTAGTGTTATGTTTCTATATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCTAGGCCAGCC
CGTCGACGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATCACCATCACCATC
ACGGGGCCGCATAG

Der scFv FPCWPA5 ist ein rAk, welcher mit Hilfe des „Phage Displays“ aus einer immunokompetenten avianen scFv-Bibliothek bei der Selektion gegen FPCWP generiert wurde (3.6.).

Nukleotidsequenz vom scFv FPCWPA5:

GCGGCCAGCCGGCCATGGCTGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGG
 AAGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTACCTTCAGCAGTTATGCCATGGTGTGGGT
 GCGACAGGCGCCCGGCAAGGGATGGAGTGGGTGCTGGTATTGGCAAGGATGGTGGTGGCACAA
 ACTACGGGTCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGG
 CTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCGGCAAACTAGTTGTACT
 ACCTCATCTTGGTGTGCTAGTCACATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAGGTCACCGTCTCCTCA
GGCTCCACCTCAGGCTCCGGTAAACCTGGCCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGCGCGCCTGCGCT
 GACTCAGCCGTCTCGGTGTCAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGGTCACCTGTTCCGGGGGTAG
 TGGCAGCTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCACCTGGCAGTGCCCCTGTCACCTCTGATCTATAGCAA
 CGACAAGAGACCCTCGAACATCCCTTCACGATTCTCCGTTCCAAATCCGGCTCTGCAAACACATT
 AACCATCACTGGGGTCCAAGTCGAGGACGAGGCTGTCTATTAAGTGTGGGAGTGCAGACAGTAACA
 CTAATGCTATATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCTAGGCCAGCCCGTCGACGCGGCCGAG
AACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATCACCATCACCATCACGGGGCCGCATAG

Der scFv SGB3 ist ein rAk, welcher mit Hilfe des „Phage Displays“ aus einer immunokompetenten avianen scFv-Bibliothek bei der Selektion gegen SG generiert wurde (3.6.).

Nukleotidsequenz vom SGB3:

GCGGCCAGCCGGCCATGGCTGCCGTGACGTTGGACGAGTCCGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGG
 AGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTACCTTCAGCAGTAATGGCATGGCCTGGGT
 GCGACAGGCGCTGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTTCGCGGTATTGATGATGGTGGTAGTTTCACAG
 GATATGGGCGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCACAGTGAGG
 CTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCCACCTACTATTGCGCCAGAGGTTACTGGTGGT
 TTTGGTGGTGATCGTATCGACGCATGGGGCCACGGGACCGAGGTCACCGTCTCCTCAGGCTCCACC
TCAGGCTCCGGTAAACCTGGCCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGCGCGCCTGCGCTGACTCAGCC
GTCCTCGGTGTCAGCGAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCACCTGCTCCGGGAGTACTGCTCACTA
 TAGCTGGCACCAGCAGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCCTGTACTCTGATCTCTTTCAACAACCAGAG
 ACCCTCGACATCCCTCACGATTCTCCGGTTCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACT
 GGGTCCGAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTACTGTGGTGGCTGGGACAGGAGCATTACTGCTGGT
 TTATTTGGGCGGGACAACCTGACCGTCTAGGCCAACCCGTCGACGCGGCCGCAGAAACAAA
AATCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATCACCATCACCATCACGGGGCCGCATAG

Der scFv SPIII7 ist ein rAk, welcher aus murinen Hybridomazellen generiert wurde (PESCHEN, 1999).

Nukleotidsequenz vom scFv SPIII7:

GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTTGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTGAGGCCTGG
 AAATTCTCTGAAACTCTCCTGTGTTACCTCGGGATTCACTTTCAGTAACTACCGGATGCACTGGCTT
 CGCCAGCCTCCAGGGAAGAGGCTGGAGTGGATTGCTGTAATTAAGTCAAATCTGAAAATTTTGGT
 GCAGATTATGCAGAGTCTGTGAAAGGCAGATTCACTATTTCAAGAGATGATTCAGAAAGAAGTGTC
 TACCTGCAGATGAACAGATTAAGAGAAGAAGACACTGCCACTTATTATTGTAGTAGGGGTAGCTCC
 GAGGGTTTCTTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGCTCCACCTCAGGCTCC
GGTAAACCTGGCCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGCGCGCCTGATATTCAGATGACTCAGTCTCC
ATCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTCTGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTT
 AAACAGTGGAAATCAAAGAACTTCTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAAC
 TGTTGATCTACGGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGCTCGCTTACAGGCAGTGGATCTG
 GAACCGATTTCACTTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCAGGCAGTTTATTACTGTCAGA
 ATGATCATAGTTATCCATTCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAACGGGCTGATGCTG
 CACCAACTGTATCCGTCGACGCGGCCGCAGAAACAAAACCTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATC
ACCATCACCATCACGGGGCCGCATAG

Der scFv PIPP stellt einen Kontroll-scFv dar, welcher spezifisch an hCG („Human chorionic gonadotropin“) bindet (Fishal, *et al.*, 1984).

Nukleotidsequenz vom scFv PIPP:

GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTTGAGTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGGTTGTGAAGCCTGG
 GGCTTCAGTGAAGAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTCACCTTCACCAACTACTGGATAATCTGGGTG
 AGGCAGAGGCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTGGTTTTGATACTACTAAC
 TACAGTGAGAAGTTCAAGACCAAGGCCACACTGACTGTTGACACATCCTCCACCACAGCCTACATG
 CAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTTTGTGCAAGATATGATTACGACGGA
 AACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGCTCCACCTCAGGC
TCCGGTAAACCTGGCCCAGGGGAGGGATCAACTAAGGGCGCGCCTGAAATTGTGCTGACCCAGTCT
CCAGCAATCATGTCTGCATCTCTGGGGGAACGGGTCACCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTG
 ACTTCCAGTACTTGCAGTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACTCTGGATTTATAGC
 ACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTC
 TCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCATCGTTCCC
 CGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAACCTGAAACGGGCTGTCGACGCGGCCGCAGAAACAA
AAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATCATCACCATCACCATCACGGGGCCGCATAG

AG ist ein AFP, welches aus *Aspergillus giganteus* isoliert, wurde. Es ist ein 5,8 kDa großes Peptid, welches das Wachstum einer Reihe von Pilzen inhibiert (WNENDT, 1990).

Nukleotidsequenz von AG:

TCCATGGCCACCTACAACGGCAAGTGCTACAAGAAGGACAACATCTGCAAGTACAAGGCCAGAG
CGGCAAGACCGCTATCTGCAAGTGCTACGTCAAGAAGTGCCCAAGGGACGGAGCCAAGTGCAGT
TCGACAGCTACAAGGGCAAGTGCTACTGCGTTCGAC

RS ist ein AFP, welches aus Radieschen-Samen (*Raphanus sativus*) isoliert wurde. Es ist ein 5 kDa großes cysteinreiches, hitzesensitives Peptid, welches *in vitro* eine antifungale Aktivität zeigt (TERRAS *et al.*, 1995).

Nukleotidsequenz von RS:

TCCATGGCTCAGAAGTTGTGTCAGAGGCCAAGTGGGACATGGTCAGGAGTCTGTGGAAATAATAA
CGCGTGCAAGAATCAGTGCATTCGACTTGAGAAAGCACGACATGGGTCTTGAACATATGTCTTCCC
AGCTCACAAAGTGTATCTGTTATTTCCCTTGTGTCGAC

Lactoferricin (Lacto) ist ein AFP aus der N-terminalen Region des humanen Lactoferrins (hLF).

Nukleotidsequenz von Lacto:

TCCATGGGCCGTAGGAGAAGGAGTGTTCAAGTGGTGCGCCGTATCCCAACCCGAGGCCACAAAATG
CTTCCAATGGCAAAGGAATATGAGAAAAGTGCGTGGCCCTCCTGTCAGCTGCATAAAGAGAGACT
CCCCATCCAGTGTATCCAGGCCATTGCGGTCGAC

Chitinase (Chi) ist ein AFP, welches von LIAO *et al.* (1994) aus Weizen (*Triticum aestivum*) isoliert wurde.

Nukleotidsequenz von Chi:

TCCATGGAGCAGTGCGGCTCGCAGGCCGGCGGGGCGACGTGCCCAACTGCCTCTGCTGCAGCAA
GTTCGGCTTCTGCGGCTCCACCTCCGACTACTGCGGCAACGGCTGCCAGAGCCAGTGAACGGCTG
CAGCGGCGGCGGCACCCCGGTACCGGTACCGACCCCAACCGGCGGCGGCGTGCCTCCATTATCTC
GCAGTCGCTCTTCGACCAGATGCTGCTGCACCGCAACGATGCGGCGTGCCAGGCCAAGGGGTTCTA
CAACTACGGCGCCTTTGTAGCCGCCCAACTCGTTCTCGGGCTTCGCGACCACGGGTGGCGCCGA
CGTCAGGAAGCGGAGGTGGCCGCGTTCCTCGCTCAGACCTCCCACGAGACCACGGGCGGGTGGC
CAACGGCGCCCGACGGCCCTACTCGTGGGGTACTGCTTCAACCAGGAGCGCGGCGCCGCTCCG
ACTACTGCTCGCCGAACCTCACAGTGGCCGTGCGCGCCGGGCAAGAAGTACTTCGGGCGCGGGCCC
ATCCAGATCTCATACTACAACCTACGGGCGGGCTGGGCGGGCCATCGGGACCGACCTGCTCAAC
AACCCGGACCTCGTGGCGACGGATGCGACCGTGTCTGTTAAGACGGCGTGTGGTTCTGGATGACG
CCGACGTCACCTAACCTTCGAGCCACGACGTGATTACGGGCGGTGGAGCCCTCGGGCGCCGAC
CAGGCGGCGGGGAGGGTGCCTGGGTACGGTGTGATCACTAACATCATCAACGGTGGGCTCGAGTG
CGGGCGCGGGCAGGACGGCCGTGTTGCCGACCGGATCGGGTTCTACAAGCGCTACTGCGACCTACT
CGGCGTCAGCTACGGCGACAACCTGGACTGCTACAACCAGAGGCCGTTTCGCCGTCGAC

ACE ist 10 kDa großes AFP, welches aus Zwiebelsamen (*Allium cepa*) isoliert wurde (CAMMUE *et al.*, 1995).

Nukleotidsequenz von ACE:

TCCATGGCACAGAACATATGCCCAAGGGTTAATCGAATTGTGACACCCTGTGTGGCCTACGGACTC
GGAAGGGCACCAATCGCCCCATGCTGCAGAGCCCTGAACGATCTACGGTTTGTGAATACTAGAAAC
CTACGACGTGCTGCATGCCGCTGCCTCGTAGGGGTAGTGAACCGGAACCCCGGTCTGAGACGAAAC
CCTAGATTTTCAGAACATTCCTCGTGATTGTCGCAACACCTTTGTTTCGTCCCTTCTGGTGGCGTCAA
GAATTCAATGCGGCAGGATTAACGTTCGAC

MBP ist ein 4,1 kDa großes AFP, welches aus Mais (*Zea mays*) isoliert wurde (DUVICK *et al.*, 1992).

Nukleotidsequenz von MBP:

TCCATGGGCAGGAGCGGCAGGGGAGAGTGCAGGAGGCAATGCCTCAGGAGGCACGAAGGCCAGC
CTTGGGAGACCCAGGAGTGCATGAGGAGGTGCAGGAGGAGGGGAGTCGAC

Nukleotidsequenz vom Linker (G₄S)₂:

GTCGACGGTGGAGGCGGATCTGGTGGCGGTGGAAGCGCGGCCCCAGCCGGCCATGGCT

7.6.2. Aminosäuresequenzen

Erklärungen zu der Symbolik: c-myc-,tag; His6-,tag; * = Stopcodon

Der scFv CWPD2 ist ein rAk, welcher mit Hilfe des „Phage Displays“ aus einer immunokompetenten avianen scFv-Bibliothek bei der Selektion gegen CWP generiert wurde (3.6.).

Aminosäuresequenz vom scFv CWPD2:

AAQPAMAAVTLDES~~GGGLQTPGGGLSLVCKGSGFDFSSDTMMWVRQAPGKGLEFVAGISGDGSDTNY~~
GSAVKGRATISRDNQSTVRLQLNNLRAEDTATYYCTRGPSPCKNCAADRIDA~~WGHGTEVTVSSGST~~
SGSGKPGPEGSTKGAPAL~~TQPSSVSANLGGTVEITCSGGGYRYGWFQKSPGSAPVTVIYWDDDSAN~~
RPSNIPSRFSGSTSGSTATL~~TITGVQADDEAVYFCGSYDRSSGYVSIFGAGTTLTVLGQPVDAAAEQKLIS~~
~~EEDLNHHHHHHGAA*~~

Der scFv FPCWPA5 ist ein rAk, welcher mit Hilfe des „Phage Displays“ aus einer immunokompetenten avianen scFv-Bibliothek bei der Selektion gegen FPCWP generiert wurde (3.6.).

Aminosäuresequenz vom scFv FPCWPA5:

AAQPAMAAVTLDES~~GGGLQTPGRALSLVCKASGFTFSSYAMVWVRQAPGKGMWVAGIGKDGGGTN~~
YSAVKGRATISRDNQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCGKTSCTTSSWCASHIDA~~WGHGTEVTVSSGST~~
SGSGKPGPEGSTKGAPAL~~TQPSSVSANPGETVKVTCSSGSGSYGWYQKSPGSAPVTLIYSNDKRPNS~~
IPSRFSGSKSGSANTL~~TITGVQVEDEAVYYCGSADSNTNAIFGAGTTLTVLGQPVDAAAEQKLISEEDLN~~
~~HHHHHHGAA*~~

Der scFv SGB3 ist ein rAk, welcher mit Hilfe des „Phage Displays“ aus einer immunokompetenten avianen scFv-Bibliothek bei der Selektion gegen SG generiert wurde (3.6.).

Aminosäuresequenz vom SGB3:

AAQPAMAAVTLDES~~GGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSNGMAWVRQAPGKGLEWVAGIDDGGSFTG~~
YGA~~AVKGRATISRDNQSTVRLQLNNLRAEDTATYYCARGTGGFGGDRIDA~~WGHGTEVTVSSGSTSG
SGKPGPEGSTKGAPAL~~TQPSSVSANLGGTVKITCSGSTAHYSWHQKSPGSAPVTLISFNNQRPSDIPS~~
RFSGSKSGSTGTL~~TITGVRAEDEAVYYCGGWDRSITAGLFGAGTTLTVLGQPVDAAAEQKLISEEDLNH~~
~~HHHHHHGAA*~~

Der scFv SPIII7 ist ein rAk, welcher aus murinen Hybridomazellen generiert wurde (PESCHEN, 1999).

Aminosäuresequenz vom scFv SPIII7:

AAQPAMAEVQLVESGGGLVVRPGNSLKLSCVTSFGFTFSNYRMHWLRQPPGKRLEWIAVIKVKSENFAD
YAESVKGRFTISRDDSEERSVYLQMNRLREEDTATYYCSRGSSEGFYWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGP
GEGSTKGAPDIQMTQSPSSLSVSAGEKVTLSCKSSQSLNLSGNQKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR
ESGVPARFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDQAVYYCQNDHSYPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSVDAAAEQ
KLISEEDLNHHHHHHGAA*

Der scFv PIPP stellt einen Kontroll-scFv dar, welcher spezifisch an hCG („Human chorionic gonadotropin“) bindet (Fishal, *et al.*, 1984).

Aminosäuresequenz vom scFv PIPP:

AAQPAMAEVQLQQSGAEVVKPGASVKMSCKASGFTFTNYWIIWVRQRPGGLEWIGEINPGFDTTNYS
EKFKTKATLTVDTSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARYDYDGNWFFDVWGAGTTVTVSSGSTSGSGK
GPGEGSTKGAPEIVLTQSPAISASLGERVTMTCTASSSVTSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASG
PARFTGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPYTFGGGKLELKRADVAAAEOKLISEEDLNHH
HHHHGAA*

AG ist ein AFP, welches aus *Aspergillus giganteus* isoliert, wurde. Es ist ein 5,8 kDa großes Peptid, welches das Wachstum einer Reihe von Pilzen inhibiert (WNENDT, 1990).

Aminosäuresequenz von AG:

SMATYNGKCYKKDNICKYKAQSGKTAICKCYVKKCPRDGAKCEFDSYKGGKCYCVD

RS ist ein AFP, welches aus Radieschen-Samen (*Raphanus sativus*) isoliert wurde. Es ist ein 5 kDa großes cysteinreiches, hitzesensitives Peptid, welches *in vitro* eine antifungale Aktivität zeigt (TERRAS *et al.*, 1995).

Aminosäuresequenz von RS:

SMAQKLCQRPSGTWSGVCGNNACKNQCIRLEKARHGSCNYVFAHKCICYFPCVD

Lactoferricin (Lacto) ist ein AFP aus der N-terminalen Region des humanen Lactoferrins (hLF).

Aminosäuresequenz von Lacto:

SMGRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQAIAMD

Chitinase (Chi) ist ein AFP, welches von LIAO *et al.* (1994) aus Weizen (*Triticum aestivum*) isoliert wurde.

Aminosäuresequenz von Chi:

SMEQCGSQAGGATCPNCLCCSKFGFCGSTSDYCGNGCQSQCNCGSGGGTPVPVPTPTGGGVSSIIQSFLF
DQMLLHRNDAACQAKGFYNYGAFVAAANSFSGFATTGGADVVRKREVAFLAQTSHETTGGWPTAPD
GPYSWGYCFNQERGAASDYCSPNSQWPCAPGKKYFGRGPIQISYNYNYGPAGRAIGTDLLNNPDLVAT
DATVSFKTALWFWMTQSPKPSHDVITGRWSPSGADQAAGRVPYGVITNIINGGLECGRQDGRVA
DRIGFYKRYCDLLGVSYGDNLDCYNQRPFAVD

ACE ist 10 kDa großes AFP, welches aus Zwiebelsamen (*Allium cepa*) isoliert wurde (CAMMUE *et al.*, 1995).

Aminosäuresequenz von ACE:

SMAQNICPRVNRIVTPCVAYGLGRAPIAPCCRALNDRFVNTRNLRRACRCLVGVVNRNPGLRRNPR
FQNIQRDCRNTFVRPFWWRPFIQCGRINVD

MBP ist ein 4,1 kDa großes AFP, welches aus Mais (*Zea mays*) isoliert wurde (DUVICK *et al.*, 1992).

Aminosäuresequenz von MBP:

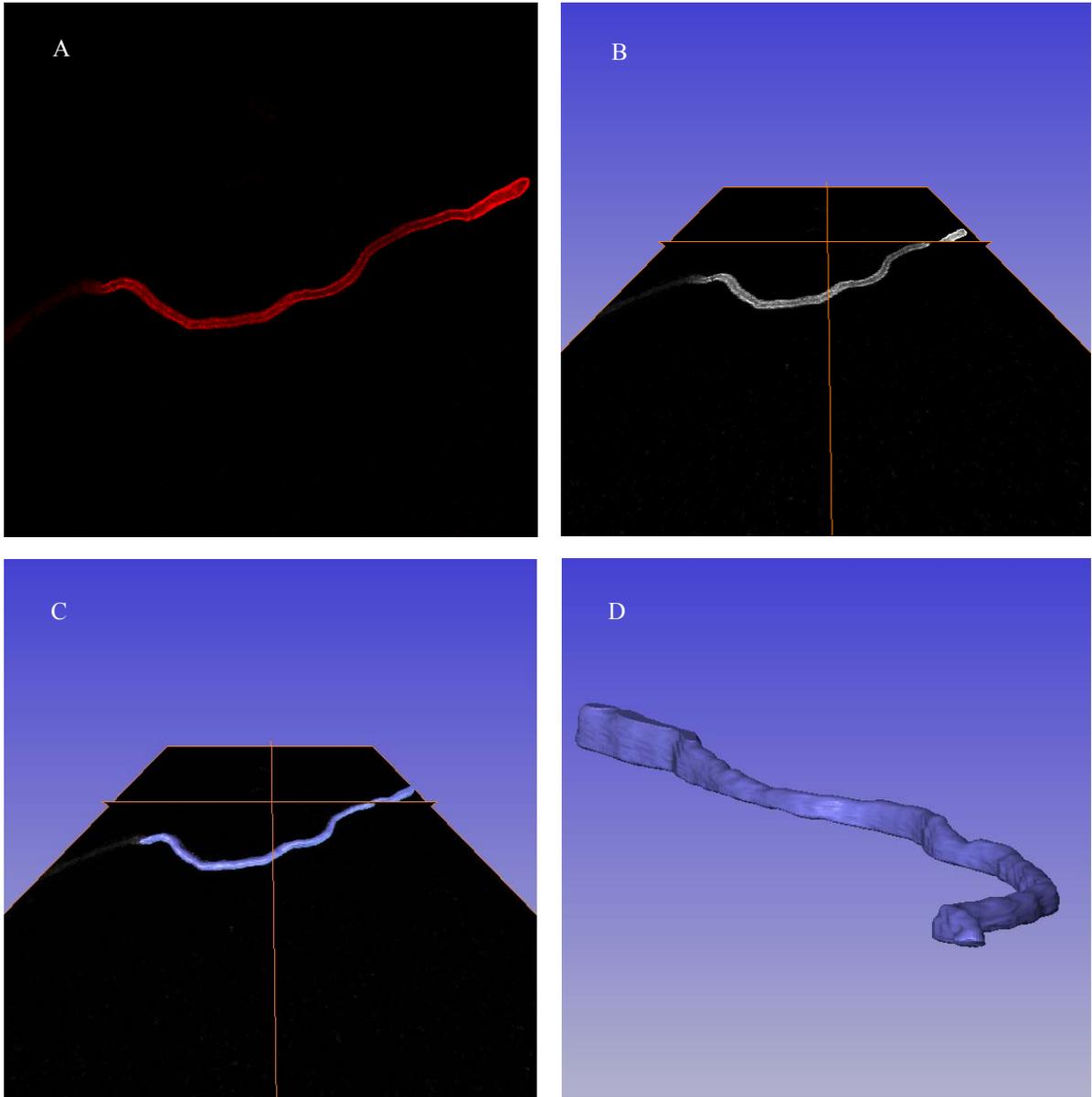
SMGRSGRGECRRQCLRRHEGQPWETQECMRRRCRRRGVD

Aminosäuresequenz von Linker (G₄S)₂:

VDGGGGSGGGGSAAQPAMA

7.7. 3D-Struktur eines *Fusarium graminearum* Keimschlauches

Aus den erhaltenen Daten der konfokalen Lasermikroskopie (2.8.5.) konnten 3D Strukturen des Keimschlauches einer *F. graminearum* Spore ermittelt werden, welche in der Abb. 7.1. dargestellt sind.



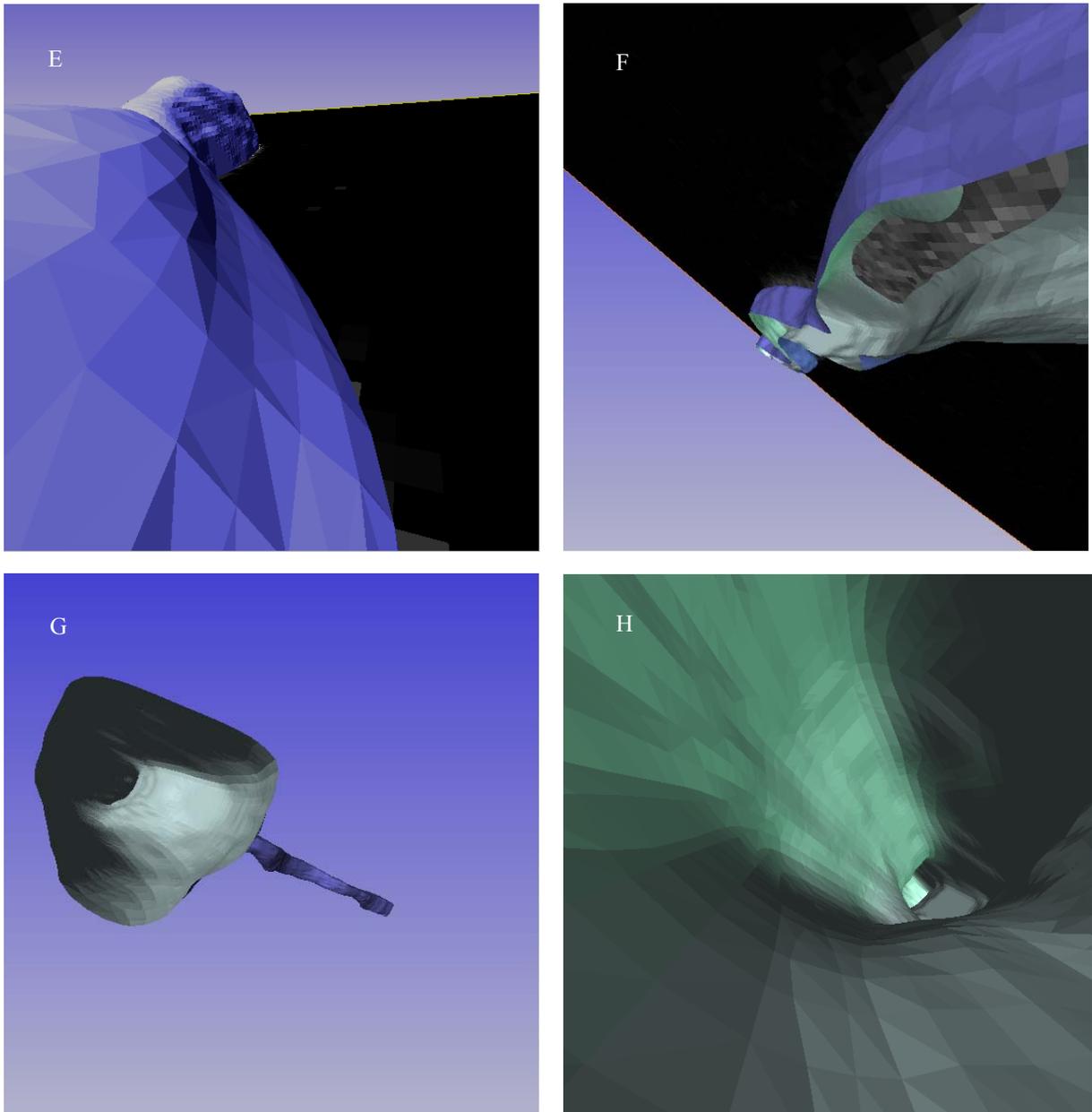


Abb. 7.1.: Immunfluoreszenzbild und 3D-Strukturen des Keimschlauches von ausgekeimten *F. graminearum* Sporen inkubiert mit dem CWP-spezifischen scFv CWP2. Um die dreidimensionale Struktur von ausgekeimten Keimschläuchen von *F. graminearum* zu dokumentieren wurden die 3D-Informationen aus der konfokalen Lasermikroskopie (2.8.5.) mit dem Programm Amira 2.3 (Demoversion) weiterverarbeitet. Dadurch war es möglich, im 3D-Film an der Oberfläche und im Myzel die Strukturen nachzuvollziehen. Folgendes Nachweissystem wurde verwendet: 500µg/ml scFv CWP2; Maus α c-myc mAk (1:5000); Ziege α Maus IgG AB Alexa Fluor™ 568 (578/603) (H+L) (1:100) fluoreszenzmarkiert (2.8.). Das Bild A, welches den fluoreszenzmarkierten Keimschlauch einer *F. graminearum* Spore darstellt, wurde mit einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Im Bild B s die indin Amira 2.3 importierten 3D-Informationen dargestellt. Im Bild C ist die in die dritte Dimension umgewandelte Keimschlauchinformation zu sehen. Die Bilder D-H stellen Aufnahmen vom gesamten Keimschlauch (Bild D), von der Oberfläche (Bild E), von einem Querschnitt (Bild F), von einem Längsschnitt (Bild G) und dem Inneren des Keimschlauches (Bild H) dar.

7.8. *Arabidopsis*-Pflanzen drei Wochen nach Infektion mit *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*



Abb. 7.2.: Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen drei Wochen nach der Infektion mit *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*. Fünf Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen wurden mit einer Sporensuspension von 1×10^5 Sporen/ml (*F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*) an drei aufeinanderfolgenden Tagen während der Dunkelperiode benetzt. Die Inkubation der *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12h/12h, 23°C, einer mittleren bis hohen Luftfeuchtigkeit und einer Beleuchtung von 10000 Lux. Die Pflanzen wurden 3 Wochen nach der Inokulation photographisch dokumentiert (2.7.8.). Von links nach rechts jeweils 5 Pflanzen einer Linie in einer Reihe von vorne nach hinten. 1. Reihe nicht mit *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* infizierte Pflanzen; 2. Reihe Wildtyp-Pflanzen; 3. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen AG-scFv CWPD2; 4. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen RS-scFv CWPD2, 5. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Lacto-scFv CWPD2; 6. Reihe transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Chi-scFv CWPD2.

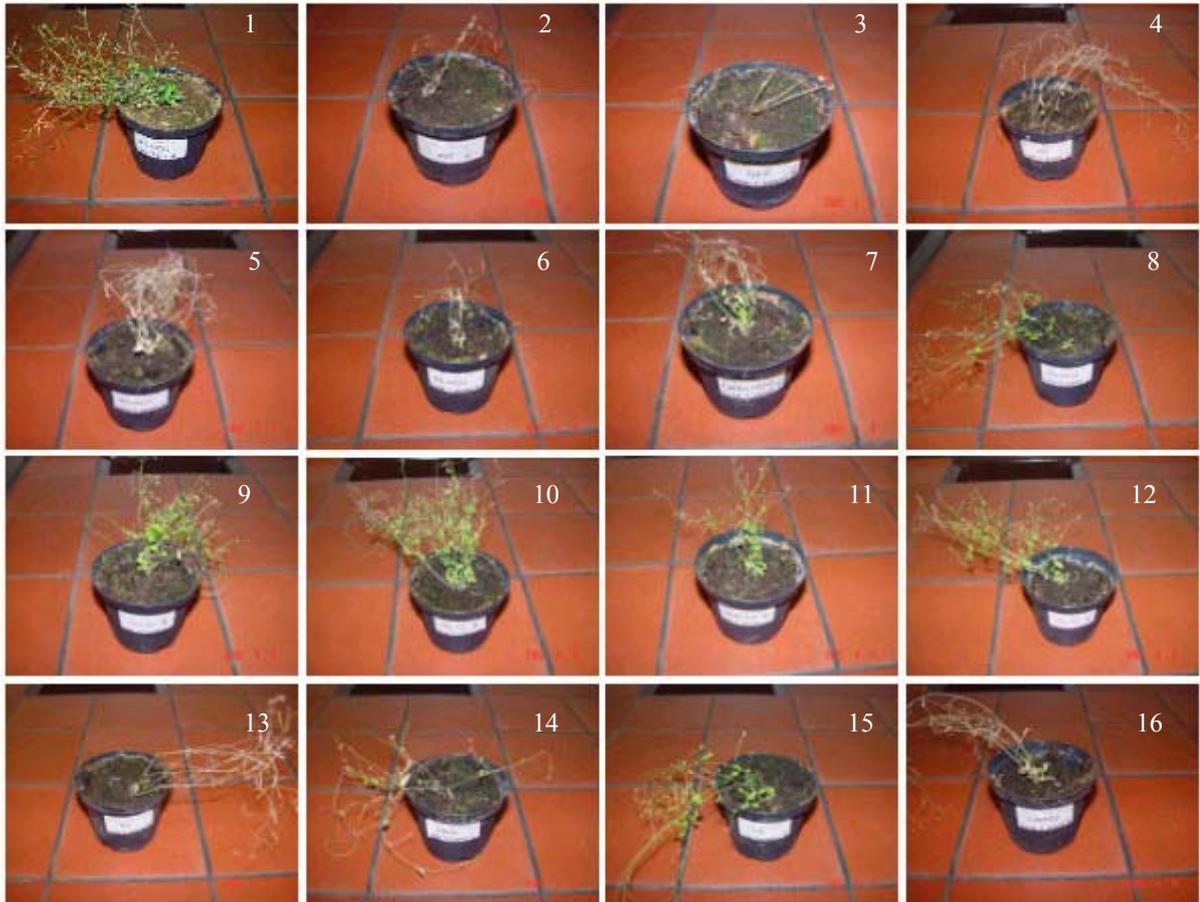
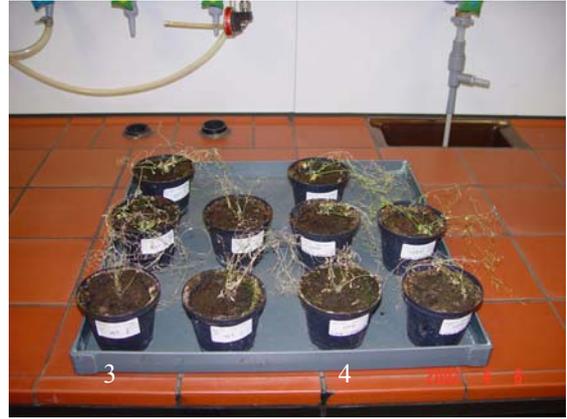


Abb. 7.3.: Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen unterschiedlicher Linien drei Wochen nach der Infektion mit *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*. Fünf Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen wurden mit einer Sporensuspension von 1×10^5 Sporen/ml (*F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*) an drei aufeinanderfolgenden Tagen während der Dunkelperiode benetzt. Die Inkubation der *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12h/12h, 23°C, einer mittleren bis hohen Luftfeuchtigkeit und einer Beleuchtung von 10000 Lux. Die Pflanzen wurden 3 Wochen nach der Inokulation photographisch dokumentiert (2.7.8.). Dargestellt sind jeweils die erste von zehn transgenen Pflanzen einer Linie. 1 = nicht mit *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* infizierte Pflanze; 2 = Wildtyp-Pflanze; 3 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze GFP; 4 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen scFv CWPD2; 5 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze AG-scFv PIPP; 6 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze RS-scFv PIPP; 7 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze Lacto-scFv PIPP; 8 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze Chi-scFv PIPP; 9 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze AG-scFv CWPD2; 10 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze RS-scFv CWPD2; 11 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze Lacto-scFv CWPD2; 12 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze Chi-scFv CWPD2; 13 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze AG; 14 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze RS; 15 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze Lacto; 16 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze Chi.



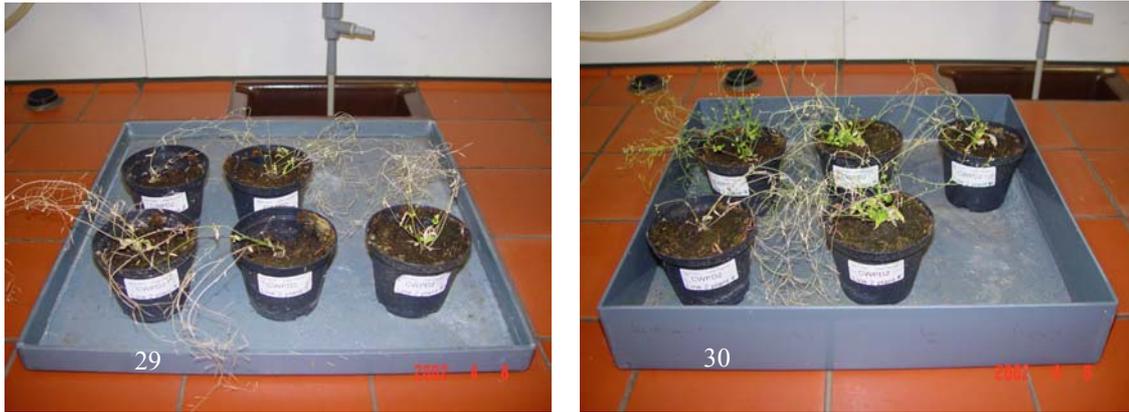


Abb. 7.4.: Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen unterschiedlicher Linien drei Wochen nach der Infektion mit *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae*. Dargestellt sind jeweils 5 Pflanzen einer Linie in einer Reihe oder einem Bereich von vorne nach hinten. 1 = Wildtyp-Pflanzen 1-5 ; 2 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen GFP Linie 1 Pflanzen 1-5; 3 = Wildtyp-Pflanzen 6-10 ; 4 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen GFP Linie 1 Pflanzen 6-10; 5 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen AG-scFv PIPP Linie 5 Pflanzen 1-5; 6 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen RS-scFv PIPP Linie 1 Pflanzen 1-5; 7 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Lacto-scFv PIPP Linie 1 Pflanze 1-5; 8 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Chi-scFv PIPP Linie 6 Pflanzen 1-5; 9 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen AG-scFv PIPP Linie 5 Pflanzen 6-10; 10 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen RS-scFv PIPP Linie 1 Pflanzen 6-10; 11 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Lacto-scFv PIPP Linie 1 Pflanze 6-10; 12 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Chi-scFv PIPP Linie 6 Pflanzen 6-10; 13 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen AG-scFv CWPD2 Linie 15 Pflanzen 1-5; 14 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen RS-scFv CWPD2 Linie 3 Pflanzen 1-5; 15 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Lacto-scFv CWPD2 Linie 3 Pflanzen 1-5; 16 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Chi-scFv CWPD2 Linie 5 Pflanzen 1-5; 17 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen AG-scFv CWPD2 Linie 15 Pflanzen 6-10; 18 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen RS-scFv CWPD2 Linie 3 Pflanzen 6-10; 19 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Lacto-scFv CWPD2 Linie 3 Pflanzen 6-10; 20 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Chi-scFv CWPD2 Linie 5 Pflanzen 6-10; 21 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen AG Linie 2 Pflanzen 1-5; 22 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen RS Linie 4 Pflanzen 1-5; 23 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Lacto Linie 1 Pflanzen 1-5; 24 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Chi Linie 4 Pflanzen 1-5; 25 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen AG Linie 2 Pflanzen 6-10; 26 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen RS Linie 4 Pflanzen 6-10; 27 = transgene *Arabidopsis*-Pflanze Lacto Linie 1 Pflanze 6; 28 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen Chi Linie 4 Pflanzen 6-10; 29 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen scFv CWPD2 Linie 2 Pflanzen 1-5; 30 = transgene *Arabidopsis*-Pflanzen scFv CWPD2 Linie 2 Pflanzen 6-10.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Dieter Peschen
Geburtsdatum: 14.02.1974
Geburtsort: Geilenkirchen
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1980-1984 katholische Grundschule Beeck
1984-1993 Bischöfliches Gymnasium St. Ursula Geilenkirchen

Wehrdienst:

1993-1994 Zentrum für Verifikationsaufgaben der Bundeswehr

Ausbildung:

1994-1999 Studium der Biologie an der Rheinischen-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
Diplomprüfung: 17.11.1999
Prüfungsfächer: Molekularbiologie (Hauptfach), Pflanzenphysiologie (1. Nebenfach), Phytopathologie (2. Nebenfach), Organische Chemie (3. Nebenfach)
Diplom am Institut für Biologie I der RWTH-Aachen (Botanik, Abteilung Molekularbiologie) unter Leitung von Prof. Dr. F. Kreuzaler in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Fischer: „Herstellung, Isolierung und Charakterisierung von Einzelketten-Antikörpern gegen pilzliche Antigene“
2000-2002 Bearbeitung des Dissertationsthemas am Institut für Biologie VII (Molekulare Biotechnologie) unter Leitung von Prof. Dr. R. Fischer

Berufstätigkeit:

1998-1999 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Biologie I der RWTH Aachen (Molekularbiologie)
seit 2000 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Biologie VII der RWTH Aachen (Molekulare Biotechnologie)