

**Rekombinante Antikörper
gegen die NIa-Protease
des *Plum pox virus***

Vom Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zum Erlangen des Grades eines
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

von
Dipl. Biol. Michael Hust
geboren am 22.10.1972
in Oldenburg

2002

Referent : Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Korreferent : Prof. Dr. E. Maiß

Tag der Promotion : 18.06.2002

Abstract

The objective of the present thesis was the production of a recombinant antibody (scFv) against the NIa protease of the *Plum pox virus* (PPV).

The expression of the recombinant antigen NIa was a prerequisite for the screening procedure. The sequence coding for the PPV NIa was cloned into the expression vector pET32a(+). Two plasmids were constructed, one without (pETMHNiA) and one (pETMHNiA2) with the NIa protease recognition site between the NIa (49,5 kDa) and the tags (18 kDa). The construct enabled the analysis of the proteolytic activity of the bacterially expressed NIa. The fusion protein was overexpressed in *E.coli* and the products of the processing by the NIa protease were detected by SDS-PAGE and immunostaining the His tag, indicating an active NIa protease in *E.coli*.

By a „classical“ panning procedure, using purified recombinant NIa protease as an antigen, antibodies were enriched from the “Griffin 1. library” (human, synthetic V_H+ V_L scFv library) after seven rounds of panning. The scFv- α -NIa102 was selected and it was shown that it binds specifically to the NIa protease. This is the first recombinant antibody against a NIa protease of a potyvirus.

For the production of presumably potyvirus resistant *Solanum tuberosum* plants, the scFv- α -NIa102 was cloned into binary pGreenII vectors. Two binary vectors were constructed, one contains a constitutive 35S promoter of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) and the other an inducible *vst*-promoter of *Vitis vinifera*. The KDEL endoplasmic reticulum retention signal was added C-terminally to the scFv to improve the production of this protein in plants.

The scFv- α -NIa102 was also examined for its diagnostic potential to detect potyvirus infections in plants. In dot blots all 19 tested potyviruses infected plants were immunostained with the scFv- α -NIa102. The measured signal intensities were found to be double to tenfold compared to the uninfected control plants, whereas the species of the host plant did not influence the assay. The dot-blot method with the scFv- α -NIa102 allows a practicable detection of potyviruses infected plants.

The self processing of the PPV NIa protease was investigated with the scFv- α -NIa102. It was possible to show *in vivo* the 27,3 kDa NIa protease cleaved itself to a 25,4 kDa protein and in a second processing step to an 23,5 kDa protein. Up to now, the self processing could only be shown for *Tobacco etch virus* and *Turnip mosaic virus*.

Keywords: NIa protease, single chain fragment variable (scFv), potyvirus

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten rekombinante Antikörper (scFvs) gegen die NIa-Protease des *Plum pox virus* (PPV) produziert werden.

Die Expression des rekombinanten Antigens, des NIa, war eine Voraussetzung für die Durchmusterungsmethoden. Der für das NIa codierende Abschnitt des PPV wurde in den Expressionsvektor pET32a (+) kloniert. Es wurden zwei Plasmide konstruiert, ohne (pETMHNiA) und mit (pETMHNiA2) der NIa-Protease Erkennungssequenz zwischen dem NIa (49,5 kDa) und den Tags (18 kDa). Somit konnte auch die Aktivität der NIa-Protease in *E.coli* untersucht werden. Das Fusionsprotein wurde in *E.coli* überexprimiert. Die Prozessierungsprodukte der NIa-Protease wurden mittels SDS-PAGE und Immunfärbung des His-Tags nachgewiesen. Dies zeigte, daß die NIa-Protease in *E.coli* aktiv ist.

In einem „klassischen“ Panningverfahren mit aufgereinigter rekombinanter NIa-Protease als Antigen wurde aus der „Griffin 1. library“ (humane, synthetische V_H + V_L scFv Antikörper-Bibliothek) spezifische Antikörper in sieben Panningrunden angereichert. Der selektierte scFv- α -NIa102 erkannte die NIa-Protease spezifisch. Dies ist der erste rekombinante Antikörper gegen die NIa-Protease eines Potyviruses.

Um potentiell potyvirusresistente *Solanum tuberosum* Pflanzen zu produzieren, wurden der scFv- α -NIa102 in binäre pGreenII-Vektoren umkloniert. Es wurden zwei binäre Vektoren konstruiert, einer enthält einen konstitutiven 35S-Promotor des *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), der andere einen induzierbaren *vst*-Promotor aus *Vitis vinifera*. An das scFv wurde C-terminal das KDEL-Retentionssignal für das endoplasmatische Reticulum angehängt, um die Ausbeute in Pflanzen zu erhöhen.

Der scFv- α -NIa102 wurde hinsichtlich seines diagnostischen Potentials, potyvirusinfizierte Pflanzen zu erkennen, untersucht. Im Dot-Blot konnten alle 19 mit verschiedenen Potyviren infizierten Pflanzen mit dem scFv- α -NIa102 immungefärbt werden. Die gemessenen Signalintensitäten lagen zwei- bis zehnfach über denen der nicht infizierten Tabak-Kontrolle. Die Wirtspflanzen-Art hatte keine Einfluß auf die Erkennung der NIa-Protease. Die Dot-Blot Methode mit dem scFv- α -NIa102 ermöglicht einen einfach durchzuführenden Nachweis potyvirusinfizierter Pflanzen.

Mit dem scFv- α -NIa102 wurde zusätzlich die Selbstprozessierung der NIa-Protease des PPV untersucht. Es konnte *in vivo* gezeigt werden, daß die 27,3 kDa NIa-Protease, sich selbst C-terminal zu einem 25,4 kDa Protein und in einem zweiten Prozessierungsschritt zu einem 23,5 kDa Protein prozessiert. Bisher konnte dies Prozessierungsverhalten nur für *Tobacco etch virus* und *Turnip mosaic virus* gezeigt werden.

Schlagwörter: NIa-Protease, „single chain fragment variable“ scFv, Potyvirus

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	8
1.1. Antikörper	8
1.1.1. Allgemeines	8
1.1.2. poly-, monoklonale und rekombinante Antikörper	9
1.1.3. „single chain fragment variable“ (scFv)	10
1.1.4. Phage Display	10
1.1.5. Die Selektion von rekombinanten Antikörpern (Panning)	13
1.2. Potyviren	15
1.2.1. Allgemeines	15
1.2.2. Plum Pox Virus	16
1.2.3. Organisation des RNA-Genoms und Prozessierung des Polyproteins	17
1.2.4. Transgene virusresistente Pflanzen	18
1.3. Aufgabenstellung	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Material	21
2.1.1. „Griffin 1. library“	21
2.1.2. Bakterienstämme	22
2.1.3. Plasmide	23
2.1.4. Oligonukleotide	23
2.1.5. Molekulargewichtsmarker	28
2.1.6. Antikörper	29
2.1.7. Verwendete „Kits“	29
2.1.8. Chemikalien und Lösungen	29
2.1.9. Pflanzenmaterial	30
2.2. Proteinbiochemische Methoden	30
2.2.1. Überexpression von Proteinen und Proteinextraktion aus Bakterien	30

2.2.2. Proteinisolation aus Pflanzen	31
2.2.3. Methanol-Aceton Fällung	31
2.2.4. Proteinbestimmung	31
2.2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.2.6. Native-PAGE	34
2.2.7. Coomassie-Färbung	34
2.2.8. Aufreinigung von überexprimierten Proteinen	34
2.2.9. Westernblot	35
2.2.10. Ponceaufärbung und Blotabsättigung	35
2.2.11. Dot-Blots	35
2.2.12. Immunfärbungen	36
2.3. Molekularbiologische Methoden	36
2.3.1. Kulturmedien und Anzucht von Bakterien	36
2.3.2. Bestimmung der optischen Dichte (OD) einer Bakterienkultur	37
2.3.3. Anlegen von Glycerinstocks	37
2.3.4. Konstruktion von Plasmiden	37
2.3.5. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	38
2.3.6. Agarose-Gelelektrophorese	39
2.3.7. Plasmidisolation	39
2.3.8. Quantifizierung von DNA-Lösungen	40
2.3.9. Restriktionsverdau	40
2.3.10. Ligation	41
2.3.11. Herstellung kompetenter <i>E.coli</i>	41
2.3.12. Transformation von <i>E.coli</i> mittels Hitzeschock	41
2.3.13. Kolonie-PCR	42
2.3.14. Sequenzierung	42
2.4. Methoden zur Selektion von rekombinanten Antikörpern	43
2.4.1. Amplifikation des Helferphagen	43
2.4.2. Konzentrierung der Phagen mittels PEG-Fällung	43
2.4.3. Titerbestimmung der Helferphagen	44
2.4.4. Amplifikation der scFv-Bank	44
2.4.5. Titerbestimmung der scFv-Phagen	45
2.4.6. Panning in Elisa-Vertiefungen	45

2.4.7. Panning auf Nitrozellulose	46
2.4.8. Produktion von lösliche scFvs und Isolation der periplasmatischen Fraktion aus <i>E.coli</i>	47
2.5. Computerunterstützung Bearbeitung und Auswertung von Nukleotid- und Polypeptidsequenzen	47
3. Ergebnisse	49
3.1. Expression der NIa-Protease in <i>E.coli</i>	49
3.1.1. Konstruktion der Plasmide zur Überexpression des NIa	49
3.1.2. Überexpression und Nachweis der Prozessierungsprodukte der NIa-Protease	51
3.2. <i>in vivo</i> Panning	52
3.2.1. Konstruktion der Plasmide auf der Basis des Vektors pTrueBlue	52
3.2.1.1. Konstruktion der Plasmide pTBMHNIa1 bis pTBMHNIa4	53
3.2.1.2. pTBMHNIa5	55
3.2.2. Auswertung der Plasmide auf Basis des Vektors pTrueBlue	56
3.2.3. Plasmide auf der Basis des Vektors pHNT	57
3.2.3.1. Konstruktion der Plasmide pHNTMHNIa1 bis pHNTMHNIa4	57
3.2.3.2. pHNTMHNIa5	59
3.2.4. Auswertung der Plasmide auf Basis des Vektors pHNT	60
3.2.5. Plasmide auf der Basis des Vektors pHNT mit pelB-Leitsequenz	63
3.2.6. Auswertung der Plasmide auf Basis des Vektors pHNT mit pelB-Leitsequenz	65
3.3. Das „klassische“ Panning	67
3.3.1. Aufreinigung der NIa-Protease	67
3.3.2. Anreicherung von scFvs- α -NIa-Protease mittels Panning auf Nitrozellulose	68
3.3.3. Anreicherung von scFvs- α -NIa-Protease mittels Panning in ELISA-Vertiefungen	69
3.3.4. Nachweis der Anreicherung von scFv-Phagen- α -NIa-Protease	70
3.3.5. Selektion eines monoklonalen scFv- α -NIa-Protease	71
3.3.5.1. Kolonie-PCRs der scFvs- α -NIa-Protease Klone	72
3.3.5.2. Immunfärbung der NIa-Protease mit Klonen von scFvs- α -NIa-Protease	73
3.3.5.3. Sequenzierung von scFvs und Analyse der CDRs	75
3.3.5.4. Kontrolle von scFv- α -NIa102	78

3.4. Anwendung des scFv-Phagen- α -NIa-Protease Klon 102	79
3.4.1. Produktion von löslichen scFvs- α -NIa102	79
3.4.1.1. pETMHscFv- α -NIa102	79
3.4.1.2. Expression des scFv- α -NIa102	80
3.4.1.3. Immunfärbung der NIa-Protease mit löslichen scFv- α -NIa102	82
3.4.2. Integration von scFvs in das Plasmid pHNTMHNia2	83
3.4.2.1. pHNTMHNia2 Δ NcoI	83
3.4.2.2. pHNTMHNia_scFv	84
3.4.2.3. pHNTMHNia_scFv- α -NIa102	85
3.4.3. Konstruktion von binären Vektoren für die Transformation von <i>Solanum Tuberosum</i> mit dem scFv- α -NIa102	86
3.4.3.1. pGIIMH35S	88
3.4.3.2. pGIIMHvst	89
3.4.3.3. pGIIMH35S-scFv- α -NIa102 und pGIIMHvst-scFv- α -NIa102	89
3.4.4. Nachweis der NIa-Protease in potyvirusinfizierten Pflanzen	91
3.4.4.1. PPV- und PVY-infizierte Tabakpflanzen	91
3.4.4.2. Nachweis von potyvirusinfizierten Pflanzen mittels Dot-Blot	94
3.4.5. Untersuchung des Prozessierungsverhalten der PPV NIa-Protease <i>in vivo</i>	99
4. Diskussion	101
4.1. Expression der NIa-Protease in <i>Escherichia coli</i>	101
4.2. Das <i>in vivo</i> Panning	102
4.3. Das „klassische“ Panning	106
4.4. Der rekombinanten Antikörper scFv- α -NIa102	108
4.5. Konstruktion der binären Vektoren	111
4.6. Diagnostik von potyvirusinfizierten Pflanzen	113
4.7. Prozessierung der PPV NIa-Protease	117
4.8. Ausblick	119
5. Literaturverzeichnis	120

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, Toluidinsalz
BCMV	<i>Bean common mosaic virus</i>
bla	β -Lactamase
bp	„base pairs“ (Basenpaare)
BSA	„bovine serum albumin“ (Rinder Serum Albumin)
BYMV	<i>Bean yellow mosaic virus</i>
CDR	„complementary determining region“
cfu	„colony forming units“ (Kolonie bildende Einheiten)
C _H 2	zweite konstante Region der schweren Kette eines IgG
CI	„cylindrical inclusion protein“
DBB	Dot-Blot-Block
DBD	Dot-Blot-Diluent
DMF	N',N'-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	„enzyme linked immuno sorbent assay“
Fab	„fragment antigen binding“
Fc	„fragment cristallizable“
FCS	„fetal calf serum“ (Fetales Kälber Serum)
Fv	„fragment variable“
g	Erdbeschleunigung
GFP	„green fluorescent protein“
h	Stunden

HC-Pro	„helper component-proteinase“
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-Thigalactosid
Kan	Kanamycin
kDa	kilo Dalton
MCS	„multiple cloning site“
min	Minuten
NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid
NI	„nuclear inclusion“ (Kerneinschlußkörper)
NIa	„nuclear inclusion protein a“ oder „nuclear inclusion body a“ (Kerneinschlußkörper a)
NIa-Site	Erkennungssequenz der NIa-Protease
NIb	„nuclear inclusion protein b“ oder „nuclear inclusion body b“ (Kerneinschlußkörper b)
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“ (Offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline (salziger Phosphatpuffer)
PBST	Phosphate buffered saline + Tween20
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
pfu	„plaque forming units“ (Plaque bildende Einheiten)
Phage	Bakteriophage
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPV	<i>Plum pox virus</i> (Scharka)
PVY	<i>Potato virus Y</i>
PVDF	Polyvinyldifluorid
PVP	Polyvinylpyrolidone
Upm	Umdrehungen pro Minute
RBS	Ribosomenbindestelle
RT	Raumtemperatur
scFv	„single chain Fragment variable“

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
TVMV	<i>Tobacco vein mottling virus</i>
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
v/v	Volumenanteile/Volumen
VPg	„virus protein genome-linked“
w/v	Gewichtsanteile/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4Chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid

1. Einleitung

1.1. Antikörper

1.1.1. Allgemeines

In Jahr 1890 wurden von Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato erstmals Antikörper, das Diphtherie-Antitoxin, beschrieben. Antikörper sind Proteine, die als Reaktion auf in den Körper eingedrungene Fremdstoffe vom Immunsystem gebildet werden. Diese Fremdstoffe können z.B. Pathogene wie Bakterien, Viren und Pilze, als auch Bruchstücke dieser sein (Janeway und Travers 1997). In der Evolution trat das Immunsystem mit den Wirbeltieren (Vertebrata) auf. Antikörper können innerhalb der Vertebrata von allen Kiefermäulern (Gnathostomata), sie umfassen alle Wirbeltiere von Placodermen und den Haien bis zu den Säugetieren, und einigen Kieferlosen (Agnatha), gebildet werden (Czihak *et al.* 1990; Remane *et al.* 1989). Antikörper oder Immunglobuline (Ig) bestehen in der Regel aus vier Polypeptidketten, zwei schweren Ketten und zwei leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb. 1.1) (Stryer 1995).

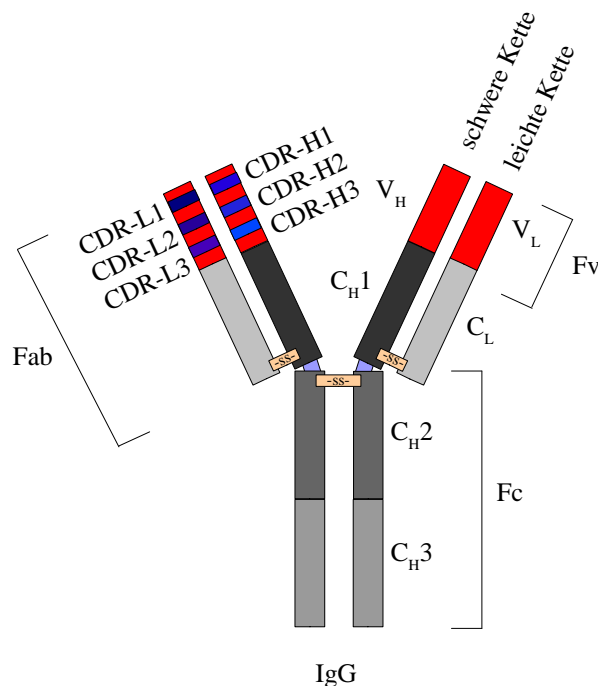


Abb. 1.1. Immunglobulin G (IgG). „fragment antigen binding“ (Fab), „fragment variable“ (Fv), „fragment crystallizable“ (Fc), „complementary determining region“ (CDR), Disulfidbindung (-ss-)

Eine Ausnahme bildet die Familie der Kamele (Camelidae), deren Vertreter auch Immunglobuline ohne leichte Kette besitzen (Hamers-Casterman *et al.* 1993; Harmsen *et al.* 2000). Die variablen Abschnitte V_H und V_L treten in Kontakt mit dem Fremdstoff (Antigen). Die Bindung an das Antigen erfolgt über die hypervariablen Bereiche (CDR, complementary determining region) des variablen Fragments (F_v). Der Bereich, z.B. eine Aminosäuresequenz, an den der Antikörper bindet, wird als Epitop bezeichnet. (Breitling und Dübel 1997). Das Antikörperrepertoire eines Säugetiers umfaßt mindestens 10^{11} unterschiedliche Antikörper. Diese Vielfalt an Antikörpern entsteht durch die somatische Rekombination separater Gensegmente während der Differenzierung der B-Lymphozyten. Die Gene für die leichte Kette werden aus vier Gensegmenten (L, V, J und C) und die Gene der schweren Kette aus acht Gensegmenten (L, V, D, J und 4xC) gebildet. Die Klonierung und Sequenzierung der leichten und schweren Kette eines einzigen Menschen ergab 40 V-Segmente der leichten Kette des κ -Typs und 29 der des λ -Typs, sowie 51 V-Segmente und 27 D-Segmente der schweren Kette (Knippers *et al.* 1990; Janeway und Travers 1997).

1.1.2. poly-, monoklonale und rekombinante Antikörper

Um Antikörper gegen ein gewünschtes Antigen zu gewinnen, werden Säugetiere (hauptsächlich Maus, Kaninchen und Ziege) mit dem Antigen mehrfach immunisiert. Das Blutserum enthält die gesuchten Antikörper als polyklonales Antiserum (Liddell und Weeks 1996). Der Nachteil dieser Antikörperseren liegt darin, daß sie mehr als ein Epitop des gewünschten Antigens erkennen und Kreuzreaktionen zeigen können. Antikörperseren, die aus identischen Antikörpern bestehen, erkennen spezifisch nur ein Epitop. Die Produktion dieser monoklonalen Antikörpern gelang Köhler und Milstein 1975 mit Hilfe der Hybridoma Technik (Köhler und Milstein 1975). Als rekombinante Antikörper bezeichnet man Antikörper, die nicht mehr im tierischen, sondern z.B. im bakteriellen System gentechnologisch produziert werden (Breitling und Dübel 1997).

1.1.3. „single chain fragment variable“ (scFv)

Immunglobuline sind relativ große Biomoleküle, z.B. hat ein IgG1 ein Molekulargewicht von 146 kDa (Liddell und Weeks 1996). Mittels Verdau von IgGs durch die Protease Papain können Fab-Fragmente gewonnen werden (Janeway und Travers 1997). Für zahlreiche Anwendungen, z.B. funktionelle Antikörper in Pflanzen, sogenannten Plantibodies, oder Produktion von Antikörpern in Bakterien, sind kleinere Antikörper von Vorteil (Plückthun 1990; Conrad und Fiedler 1994). Die kleinste antigenbindende Einheit, das Fv-Fragment, ist nicht durch Disulfidbrücken verbunden und somit instabil. Mit der Konstruktion von „single chain Fragment variables“ (scFv) (Abb. 1.2.) gelang die Stabilisierung der variablen Domänen der leichten (V_L) und schweren Kette (V_H) des Fv, in dem beide Domänen über ein Linker-Peptid ($\text{Gly}_4\text{-Ser}$)₃ verbunden wurden (Bird *et al.* 1988; Huston *et al.* 1988). Diese rekombinanten Antikörper bieten die Möglichkeit beliebige V_H und V_L miteinander zu kombinieren (Marks *et al.* 1991; Winter und Milstein 1991).

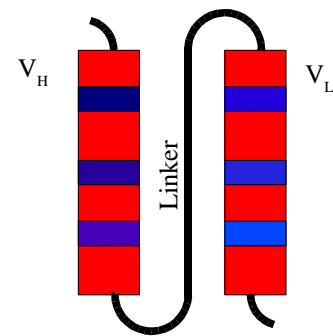


Abb. 1.2. single chain Fragment variable (scFv)

1.1.4. Phage Display

Die Selektion von Antikörpern mittels Hybridomatechnik hat zahlreiche Nachteile und Einschränkungen: es muß mit Tieren gearbeitet werden, es können keine humanen Antikörper gegen humane Antigene produziert werden, es werden nur komplette Immunglobuline produziert und die Vermehrung der Hybridoma Zellen dauert im Vergleich zu der von Bakterien sehr lange (Verdopplungszeit von Hybridomazellen: 18h, Verdopplungszeit von *E.coli*: 20-30 min) (Marks *et al.* 1991; Winter und Milstein 1991; Griffith *et al.* 1993; Sawyer *et al.* 1997).

Smith entwickelte 1985 die Grundlage für eine neuartige Selektion von Antikörpern. Beim Phage Display werden Fabs, Fvs oder scFvs als Fusionsprotein mit einem Hüllprotein eines filamentösen Bakteriophagen (M13, fd, f1) exprimiert, so daß der Antikörper auf der Oberfläche des Phagen präsentiert wird. Das Gen für den Antikörper ist auf dem Phagengenom oder einem Phagemid lokalisiert und wird im Phagen verpackt. Das

Antikörpergen und dessen Genprodukt, der Antikörper, sind somit physisch gekoppelt. Durch die Klonierung von unterschiedlichen Antikörpergenen können Antikörper-Genbibliotheken hergestellt werden. Die Produktion der Phagen-Antikörper erfolgt in *E.coli* und die gewünschten Phagen-Antikörper können dann aus der Antikörper-Genbibliothek selektiert werden (Smith 1985; McCafferty *et al.* 1990; Clackson *et al.* 1991; Winter und Milstein 1991; Barbas III *et al.* 1991; Marks *et al.* 1991; Winter *et al.* 1994; Griffiths *et al.* 1994; Hoogenboom 1997).

M13-Phagen verlangsamen nur das Wachstum von *E.coli* und führen nicht wie z.B. der λ -Phage zur Lyse der Zellen. *E.coli* entläßt in jedem Zellzyklus 100-200 Phagen (Lederberg 1951, zitiert nach Knippers Knippers *et al.* 1990; Rashed und Oberer 1986). M13 besitzt eine zirkuläre circa 6500 bp große DNA, sein Hüllprotein besteht aus etwa 2700 Proteinen pVIII und jeweils fünf pVII, pIX, pVI und pIII (Abb.1.3.) (Webster und Lopez 1985; Breitling und Dübel 1997).

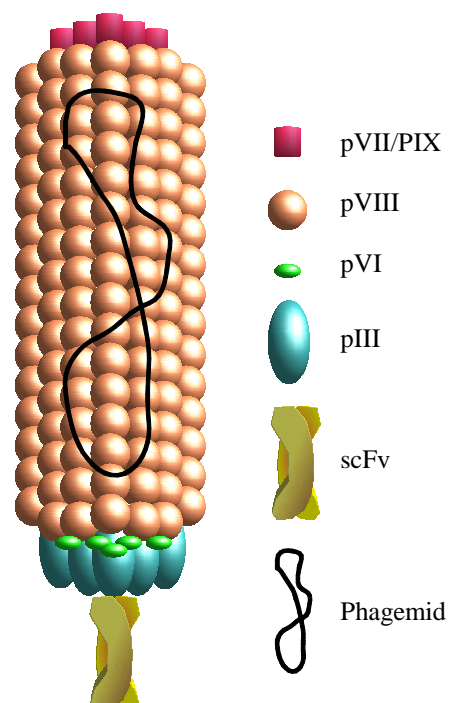


Abb. 1.3. Bakteriophage mit scFv

Es werden durch M13-Phagen Bakterien infiziert, die den F-Faktor tragen. Die Bindung der Phagen an die Bakterien erfolgt über das pIII der Phagen an die F-Pili der Bakterien (Sambrook *et al.* 1989). Das pIII bietet im Vergleich zu pVIII und pVI die besten Möglichkeiten zur Fusion mit einem Antikörper (Smith 1985; Parmley und Smith 1988; Little 1993; Winter *et al.* 1994; Jespers *et al.* 1995).

Die schwere und die leichte Kette der Fabs sind durch eine Disulfidbrücke verbunden (Abb.1.1.) und die β -Faltblätter von V_H und V_L werden durch Disulfidbrücken stabilisiert, dadurch wird die Faltung von Antikörpern in der reduzierenden Umgebung des Cytoplasmas von *E.coli* erschwert (Biocca *et al.* 1995; Proba *et al.* 1995). Der Transport der Antikörperfragmente in das Periplasma führte zu einer höheren Ausbeute an korrekt gefalteten und stabilen Antikörpern (Skerra und Plückthun 1988).

Die Antikörpergene wurden anfangs auf dem zirkulären Wildtyp-Phagen genom in den 5' Bereich vom gIII kloniert und dort konstitutiv exprimiert. Die stetige Expression von Antikörperfragmenten, codiert auf dem Phagen genom, erlaubt nur eine schwache Produktion von Phagenantikörpern. Die Verwendung von Phagemiden, dies sind Plasmide, die ein Signal für die Verpackung in Phagen besitzen, anstelle des Phagen genom erhöht die Ausbeute. Hier wird das Antikörper-pIII-Fusionsprotein unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert. Für die Produktion von Phagenantikörpern ist die Anwesenheit eines Helferphagen, z.B. VCS-M13, notwendig (Breitling *et al.* 1991; Barbas III *et al.* 1991; Hoogenboom *et al.* 1991).

Antikörper-Genbibliotheken können aus unterschiedlichen Ausgangsmaterialien gewonnen werden. Die Antikörpergene können aus den Plasmazellen von immunisierten Spendern gewonnen und in Phagemide kloniert werden. Dies ist von Vorteil, wenn nur ein Antikörper gegen das Antigen, mit dem immunisiert wurde, gesucht wird (Williamson *et al.* 1993). Um Antikörper-Genbibliotheken zu konstruieren, die Antikörper gegen beliebige Antigene enthalten, wird das gesamte V-Gen Repertoire eines Organismus, z.B. Mensch, genutzt. Hierzu werden V_L und V_H mittels PCR amplifiziert und zufällig (random combinatorial gene cloning) in die Phagemide kloniert. Diese Bibliotheken werden auch als universelle oder naive Bibliotheken bezeichnet. (Marks *et al.* 1992; Nissim *et al.* 1994; Hoogenboom 1997). Ein weiterer Schritt, um die Größe einer Bibliothek zu erhöhen, sind synthetische Bibliotheken, hier werden Zufallssequenzen in die CDRs eingesetzt (Hayashi *et al.* 1994; Soderlind *et al.* 1995).

1.1.5. Die Selektion von rekombinanten Antikörpern (Panning)

Die Selektion von Antikörpern aus einer Antikörper-Genbibliothek wird als Panning bezeichnet (Breitling und Dübel 1997). Für das Panning wird das Antigen immobilisiert. Es kann an Nitrozellulose (Hawlich *et al.* 2001), in Immunoröhrchen (Marks *et al.* 1991), an „Magnetic Beads“ (McConnell *et al.* 1999) oder in ELISA-Vertiefungen (Barbas III *et al.* 1991) gebunden werden. Die amplifizierte Phagenantikörper werden mit dem Antigen für einige Stunden inkubiert und anschließend die nicht und oder nur schwach gebundenen Phagenantikörper gewaschen. Die gebundenen Phagen werden eluiert und *E.coli* infiziert. Die infizierten *E.coli* werden, wenn mit Phagemiden gearbeitet wird, mit dem Helferphagen infiziert, und so neue Phagenantikörper produziert. In diesem Gemisch von amplifizierten Phagenantikörpern sind die Antikörper, die das Antigen erkennen, nun angereichert worden. Die Phagenantikörper werden in eine weitere Panningrunde eingesetzt. Mit jeder Panningrunde nimmt der Anteil an den Antikörpern, die das Antigen spezifisch erkennen, zu. Es werden in der Regel 3 bis 6 Panningrunden durchgeführt (Abb. 1.4.) (Harrison *et al.* 1996; Sparks 1996; Breitling und Dübel 1997). In einigen Fällen sind jedoch auch erheblich mehr Panningrunden nötig (Hawkins *et al.* 1993).

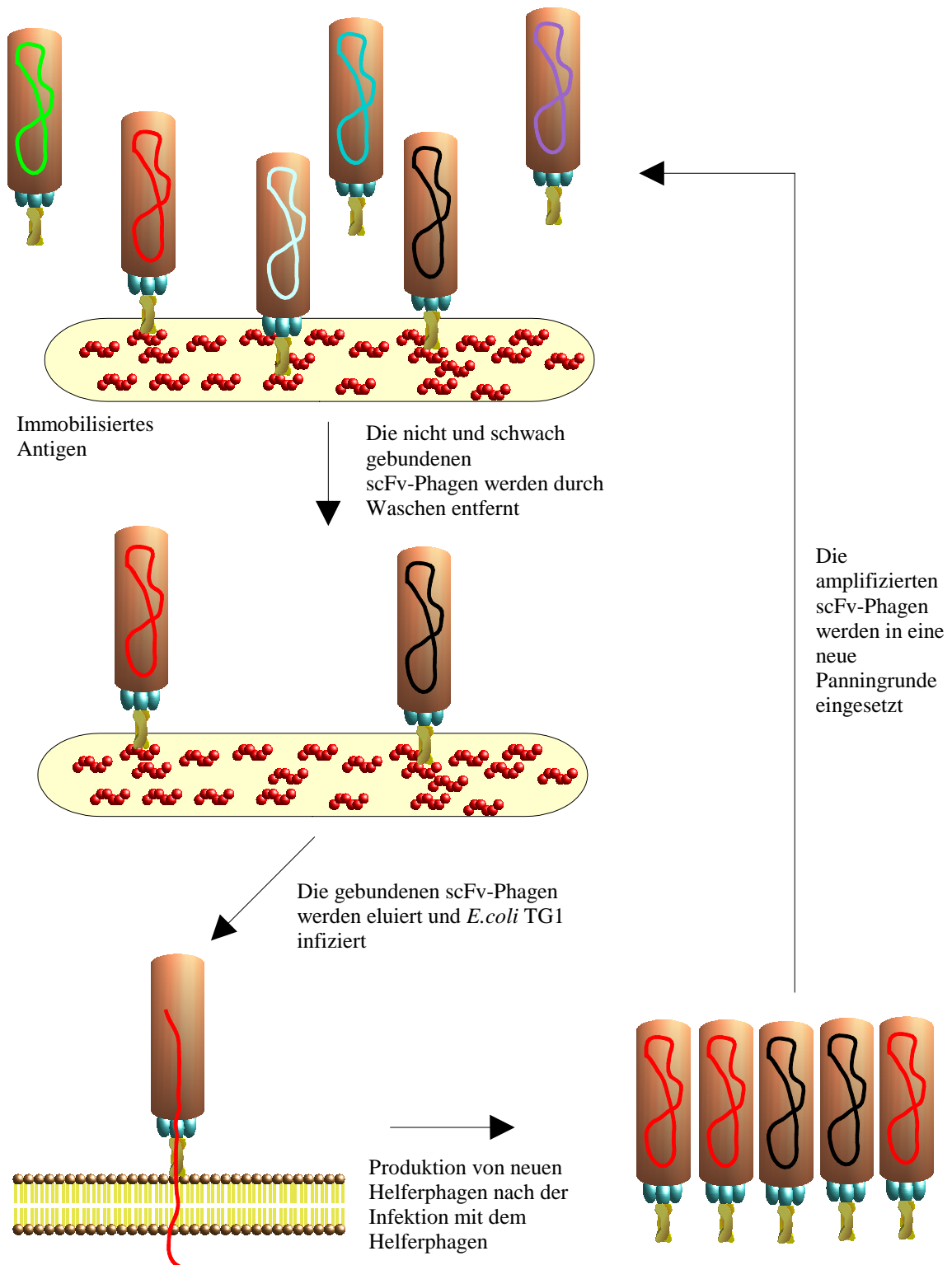


Abb. 1.4. Schematische Darstellung des Pannings

1.2. Potyviren

1.2.1. Allgemeines

Viren sind nichtzelluläre genetische Elemente, die eine Wirtszelle für ihre Replikation benötigen (Brock *et al.* 1994). Sie besitzen lediglich einen Typ von Nukleinsäuren DNA oder RNA (Schlegel 1992; Schlösser 1997). Pflanzenviren können zu wirtschaftlich bedeutenden Ertragsausfällen führen, der Schaden wird auf 15 Milliarden US\$ pro Jahr geschätzt (Hollings und Brunt 1981; Nejdat *et al.* 1991; López-Moya *et al.* 2000; Xiao *et al.* 2000).

Die größte Gruppe der Pflanzenviren ist die der Potyviren, die zur Picornavirus Supergruppe gehören (Ryan und Flint 1997). Zu den Potyviren gehören etwa ein Drittel aller Pflanzenviren (Barnett, 1991). Die Familie *Potyviridae* wird in sechs Untergruppen (*Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*) eingeteilt (van Regenmortel *et al.* 2000). Die Viruspartikel haben eine Länge von 700-900 nm und einen Durchmesser von 12 nm (Abb. 1.5.) (Maiß 1993).

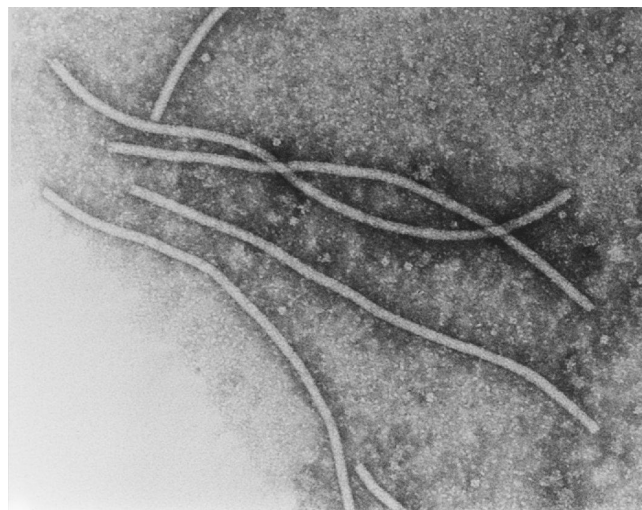


Abb. 1.5. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Potyvirus (PVY)

Partikeln. Quelle: Plant Virus online (<http://image.fs.uidaho.edu/vide/>)

Potyvirusinfektionen führen zu morphologisch unterscheidbaren Einschlusskörpern im Cytoplasma und Kern. Der für diese Arbeit wichtigste Einschlusskörper ist der Kerneinschlusskörper „nuclear inclusion body a“ oder auch „nuclear inclusion protein a“ (NIa) (Riedel *et al.* 1998).

1.2.2. Plum pox virus

Das *Plum pox virus* (PPV) oder Scharka Virus wurde erstmalig um das Jahr 1917 für Pflaume und 1933 für Aprikose in Bulgarien beschrieben (Atanasoff 1932; Atanasoff 1935, zitiert nach López-Moya *et al.* 2000). Das Virus befällt Steinfrüchte wie z.B. *Prunus domestica* (Pflaume), *Prunus persica* (Pfirsich) oder *Prunus avium* (Kirsche). Das Schadensbild sieht so aus, daß chlorotische Flecken auf den Blättern, Flecken auf dem Exo- und Endokarp, sowie die namensgebende Pocken auf dem Exokarp von Pflaumen auftreten (Abb. 1.6.) (Maiß 1993; López-Moya *et al.* 2000). Die Übertragung des PPV erfolgt durch Aphiden (Blattläuse) (Hoffmann *et al.* 1994).



Aprikose



Pfirsich



Pflaume



Pflaume

Abb. 1.6. Durch PPV hervorgerufene Schäden an Steinfrüchten. Quelle: Plum Pox Virus (Sharka) Resources, West Virginia University (http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease_descriptions/ppvresources.html)

1.2.3. Organisation des RNA-Genoms und Prozessierung des Polyproteins

Potyviren besitzen eine ~10 kB (PPV 9741 bp, TEV 9496 bp) plus-Einzelstrang RNA (Allison *et al.* 1986, Maiß *et al.* 1989). Die RNA ist am 5' Ende mit dem „virus protein genome-linked“ (VPg) verbunden und am 3' Ende polyadenyliert. Das VPg dient als Primer für die RNA Synthese (Alvarez *et al.* 1997). Die RNA enthält ein offenes Leseraster, das direkt in ein ~350 kDa (PPV ~360 kDa, TEV ~346 kDa) Polyprotein translatiert wird (Carrington *et al.* 1989; Maiß 1993). Die Prozessierung des Polyproteins durch drei Proteasen (P1, HC-Pro und NIa) setzt die funktionellen Proteine frei. Die Proteasen P1 und die an der Virusübertragung beteiligte „helper component-proteinase“ (HC-Pro) lösen sich aus dem Polyprotein mittels cis-Prozessierung. Die carboxyterminalen Zweidrittel des Polyproteins werden von der NIa-Protease prozessiert (Abb. 1.7.) (Allison *et al.* 1985; Carrington und Dougherty 1987a; Carrington und Dougherty 1988; Carrington *et al.* 1989; Verchot *et al.* 1991; Verchot *et al.* 1992; Flasiński und Cassidy 1998).

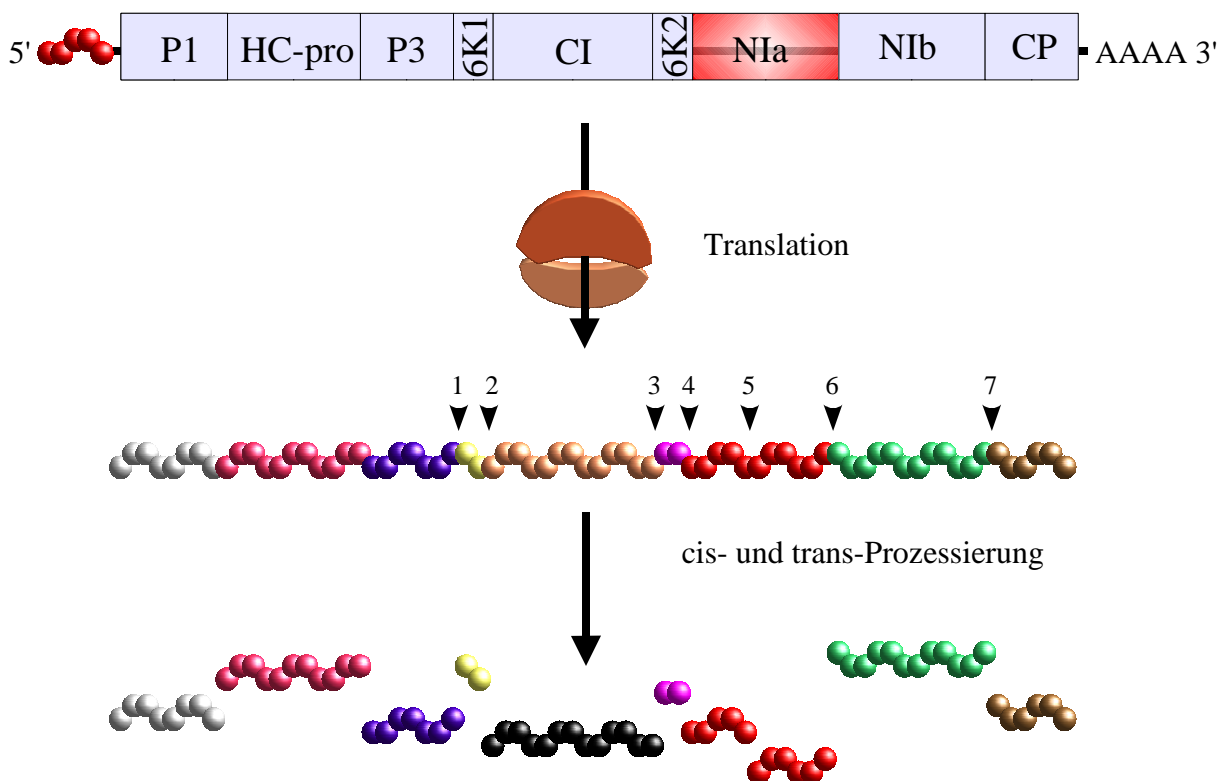


Abb. 1.7. Das RNA-Genom von Potyviren, die Translation und die Prozessierung des Polyproteins. Die Prozessierstellen durch die NIa-Protease sind mit den Zahlen 1-7 markiert.

Der NIa setzt sich selbst aus dem Polyprotein mittels cis-Prozessierung frei. Der NIa besteht C-terminal aus der NIa-Protease und N-terminal aus dem VPg, dieses wird von der NIa-Protease abgespalten. Mittels trans-Prozessierung durch die NIa-Protease werden das P3, das 6K₁, die Helikase und ATPase „cylindrical inclusion protein“ (CI), das 6K₂, die RNA abhängige RNA-Polymerase „nuclear inclusion body b“ (NIb) und das Hüllprotein CP aus dem Polyprotein freigesetzt (Riechmann *et al.* 1992; Rorrer *et al.* 1992; Maiß 1993; Riedel *et al.* 1998; Joseph und Savithri 2000).

Die NIa-Protease ist eine Chymotrypsin ähnliche Serin-Protease mit Cystein anstelle von Serin. Das aktive Zentrum wird durch die Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure und Cystein gebildet (Dougherty *et al.* 1989b; Gorbalenya *et al.* 1989). Bei der Prozessierung erkennt die NIa-Protease ein Heptapeptid. Im Fall des *Tobacco etch virus* (TEV) ist es die Konsensussequenz: EXXYXQ*S/G (die Schnittstelle ist mit * markiert), beim *Turnip mosaic virus* (TuMV) ist es die Konsensussequenz: XXVR/KF/TQ*S/G (Domier *et al.* 1989; Dougherty *et al.* 1989a; Parks und Dougherty 1991). Bei PPV haben die N-terminale NIa-Site zwischen 6K₂ und dem NIa die Aminosäuresequenz EEVIHQ*G (NIa-Site 4 in Abb. 1.7.), die interne NIa-Site zwischen dem VPg und der NIa-Protease die Sequenz EEVDHE*S (NIa-Site 5 in Abb. 1.7.) und die C-terminale NIa-Site die Sequenz EFVYTQ*S (NIa-Site 6 in Abb. 1.7.) (García *et al.* 1992).

Die NIa-Protease vom TuMV und TEV besitzt die Eigenschaft, sich C-terminal, ohne daß eine Konsensussequenz erkennbar ist, in zwei Schritten zu prozessieren und somit partiell zu inaktivieren. Beim *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) hingegen erfolgt keine C-terminale Prozessierung (Kim *et al.* 1995; Parks *et al.* 1995; Kim *et al.* 1996b; Hwang *et al.* 2000).

1.2.4. Transgene virusresistente Pflanzen

1929 entdeckte McKinney, daß Pflanzen, die mit einem schwachpathogenen Stamm eines Virus infiziert waren, resistent gegen andere Stämme des Virus waren. Dies wird als „cross protection“ bezeichnet (McKinney 1929). Eine aus dieser Beobachtung abgeleitete Strategie zur Entwicklung virusresistenter Pflanzen ist die Expression von Hüllproteinen. Dies gelang Powell-Abel *et al.* im Fall des *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Powell-Abel *et al.* 1986). Mit dieser Methode wird zwischen 0,001 % und 0,15 % Fremdprotein exprimiert (Cuozzo *et al.* 1988; Stark und Beachy 1989). Die Expression von Nichtstrukturproteinen, wie z.B. dem NIa,

führt ebenfalls zu virusresistenten Pflanzen (Fellers *et al.* 1998). Ein weitere Form der pathogenvermittelten Resistenz ist die Transkription von nicht translatierbaren Virusgenen, z.B. des Hüllproteins von PVY (van der Vlugt *et al.* 1992; van der Vlugt *et al.* 1993). Bei der Transformation von Pflanzen mit Virusgenen besteht allerdings immer die Gefahr der Rekombination mit verwandten Viren (Varelmann *et al.* 2000). Eine gänzlich andere Strategie ist die Expression von rekombinanten Antikörpern, sogenannten Plantibodies, in Pflanzen (Fischer *et al.* 2001). Vollständige Antikörper, z.B. IgG, wurden erstmalig 1989 und 1990 in Tabak exprimiert (Hiatt *et al.* 1989; Düring *et al.* 1990). Diese Antikörper liegen im tierischen System glykosyliert vor, dies ist essentiell für Stabilität, Faltung und biologische Aktivität. Eine konservierte Glykosylierungsstelle liegt im C_{H2}. Da sich die Glykosylierung in Pflanzen von der in Tieren unterscheidet, sind diese Plantibodies nicht voll funktionsfähig (Rademacher *et al.* 1986; Bardor *et al.* 1999; Cabanes-Macheteau *et al.* 1999). Es folgte der Trend zur „Miniaturisierung“ mit der Expression von Fabs und scFvs (de Neve *et al.* 1993; Tavladoraki *et al.* 1993). Mit der Expression von scFvs können Probleme wie Glykosylierung, Zusammenbau der Untereinheiten und intermolekulare Disulfidbrücken verringert werden. Die Expression von scFvs kann mittels des C-terminalen KDEL-Retentionssignals bis um das hundertfache gesteigert werden (Conrad und Fiedler 1994; Schouten *et al.* 1996; Schouten *et al.* 1997; Conrad und Fiedler 1998; de Jaeger *et al.* 2000). Einige virusresistente Pflanzen, die ein scFv exprimieren, wurden mittlerweile konstruiert. Ziel der Antikörper war ausschließlich das Hüllprotein oder das ganze Virus (Tavlodoraki *et al.* 1993; Fecker *et al.* 1996; Fecker *et al.* 1997; Xiao *et al.* 2000).

1.3. Aufgabenstellung

In Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen rekombinante Antikörper (scFvs) gegen die virale NIa-Protease des PPV gewonnen werden. Die NIa-Protease prozessiert etwa 2/3 des Polyproteins (Carrington und Dougherty 1987a; Carrington und Dougherty 1988). Wäre es möglich, die NIa-Protease zu inhibieren, könnte sich das Potyvirus nicht mehr vermehren. Die Aktivität der viralen NIa-Protease des TEV konnte mittels eines spezifischen Antikörpers unterbunden werden (Slade *et al.* 1989).

Die scFvs gegen die rekombinante PPV NIa-Protease sollen mittels „klassischem“ Panning mit der „Griffin 1. Library“ (humane, synthetische V_H+V_L scFv Bank) gewonnen werden

(Griffiths *et al.* 1994). Hierzu soll der Genabschnitt des PPV-NAT, der für den NIa codiert, in Expressionsvektoren umklont, in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt werden. Die NIa-Protease wird als Antigen für das Panning eingesetzt. Neben der „klassischen“ Methode soll versucht werden, scFvs mittels eines neuartigen *in vivo* Pannings in *E. coli* zu gewinnen. Hierfür soll die Fähigkeit der NIa-Protease genutzt werden, sich selbst aus einem Polyprotein herauszuschneiden (Dougherty *et al.* 1989b, Rorrer *et al.* 1992). Das Gen der NIa-Protease soll als Fusionsprotein mit einem visuellen Marker (β -Galaktosidase, GFP) in *E. coli* exprimiert werden. Die Bakterien, die das scFv-Gen tragen, welches die NIa-Protease inhibiert, sollen mittels des Markers identifiziert werden.

Die NIa-Protease ist essentiell in allen Potyviren, somit besteht die Erwartung, daß die α -NIa-scFvs nicht nur die NIa-Protease des PPV erkennen, sondern auch die von weiteren Potyviren, z.B. *Potato virus Y* (PVY).

Die generierten Antikörpergene sollen zur Diagnostik von potyvirusinfizierten Pflanzen und zur Konstruktion von potentiell potyvirusresistenten Pflanzen (Kartoffel) eingesetzt werden. Hierzu werden Vektoren auf der Basis von pGreenII (Hellens *et al.* 2000a) konstruiert, wobei die scFvs jeweils unter der Kontrolle eines konstitutiven und eines pathogeninduzierten Promotors in den Pflanzen exprimiert werden sollen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. „Griffin 1. library“

Für die Gewinnung von Antikörpern gegen die N1a-Protease des *Plum pox viruses* wurde die synthetische humane $V_H + V_L$ scFv Antikörper-Genbibliothek „Griffin 1. library“ genutzt. Die „Griffin 1. library“ ist ein scFv Phagemid Bank, die vom MRC Centre for Protein Engineering in Cambridge, Großbritannien hergestellt wurde. Sie enthält dieselben synthetischen humanen V-Gene wie die „Fab (4-12) 2lox Antikörper-Bibliothek“ (Griffiths *et al.* 1994), jedoch mit scFvs anstelle der Fabs. Die Abschnitte V_H und V_L wurden in das Phagemid pHEN2 (Abb. 1.5.) kloniert. Die Antikörper-Genbibliothek enthält $1,2 \times 10^9$ unabhängige Klone (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/~phage/>).

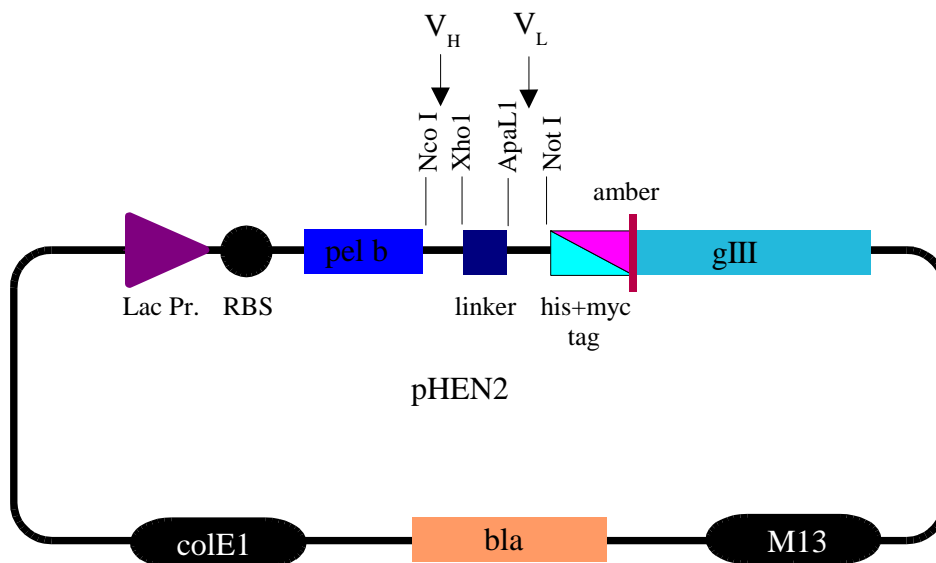


Abb. 2.1. Phagemid pHEN2 mit den Klonierungsstellen für V_H und V_L

Das Phagemid erlaubt die Expression von löslichen scFvs in Bakterien, die das Amber Stopcodon (TGA) erkennen, z.B. *E.coli* HB2151. In Supressormutanten, z.B. *E.coli* TG1, werden Fusionsproteine aus scFv und pIII gebildet. In Anwesenheit eines Helferphagen, z.B.

VCS-M13, werden scFv-Phagen produziert (Griffiths *et al.* 1994). Die Expression erfolgt unter der Kontrolle eines Laktose Promotors (*lac*-Promotor) (Jacob und Monod 1961).

2.1.2. Bakterienstämme

Bakterienstamm (Herkunft)	Genotyp
<i>E.coli</i> NM522 (Stratagene)	<i>supE44 thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rK⁻ mK⁺)</i> F'[<i>proAB lacI^q ZΔM15</i>]
<i>E.coli</i> XL1-Blue (Stratagene)	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB⁺ lacI^q ZΔM15 TN10(tet^r)]</i>
<i>E.coli</i> BLR(DE3) (Novagen)	F ⁻ <i>ompT hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm Δ(srl-recA) 306::TN10 (Tc^R)</i> (DE3)
<i>E.coli</i> TG1 (MRC)	<i>supE44 thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rK⁻ mK⁺)</i> F'[<i>traD36 proAB lacI^q ZΔM15</i>]
<i>E.coli</i> HB2151 (MRC)	<i>ara thi-1 Δ(lac-proAB) F'[proAB⁺ lacI^q ZΔM15]</i>

Tab. 2.1. Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.

2.1.3. Plasmide

Bezeichnung (Herkunft)	Beschreibung
pGEM T (Promega)	Klonierungsvektor, Ampicillin Resistenz
pET32a(+) (Novagen)	Überexpressionsvektor, Ampicillin Resistenz
pET21a(+) (Novagen)	Überexpressionsvektor, Ampicillin Resistenz
pTrueBlue (Genomics One Corporation)	Klonierungsvektor, Ampicillin Resistenz (Slilaty und Lebel 1998)
pEXN1a (E.Maiß)	Das Plasmid enthält die cDNA des <i>Plum pox virus</i> von der Mitte des <i>ci</i> -Gens bis zum Anfang des <i>nib</i> -Gens (Position 5531-7239 des PPV, Accession NC_001445, Maiss <i>et al.</i> 1989)
pHNT (E.Maiß)	Plasmid mit einem <i>gfp</i> -Gen aus dem Plasmid pGFPuv (Kwon <i>et al.</i> 1997) unter der Kontrolle eines <i>lac</i> -Promotors, Ampicillin Resistenz
pE35SL2 (E.Maiß)	Plasmid mit einem 2x35S-Promotor, PPV-Translationsenhancer und 35S-Terminator
pREP419U (E.Maiß)	Klonierungsvektor pREP4, p15A Replikationsursprung, Kanamycin Resistenz, MCS aus pT7T3 194 (Pharmacia)
pGreenII-229 (John Innes Centre)	Binärer Vektor mit Phosphinotricin (BASTA®) Resistenz, Kanamycin Resistenz (Hellens <i>et al.</i> 2000a)
pSoup (John Innes Centre)	Binärer Vektor für die Kotransformation zusammen mit den pGreen Vektoren von Agrobakterien, Tetracyclin Resistenz (Hellens <i>et al.</i> 2000a)
pGEMvst (H. Kiesecker)	Plasmid mit vst-Promotor, Ampicillin Resistenz

Tab. 2.2. Übersicht über die verwendeten Plasmide

2.1.4. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von GeneScan Europe (Freiburg) und von der Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung (Bindungsstelle)
ETMHN1a_f	tcgaacgccagcacatgg	Kontrolle von Inserts in pET32a(+) (5630-5647)
fdSeqMH_r2	ga att ttc tgt atg agg ttt tgc	Amplifikation von scFvs codiert auf pHEN2 (5' des gIII)
HNTMHN1a_r	cgaaggggccgtacggc	Kontrolle von Inserts in pHNT (1187-1204)
LMB3MH_f2	caggaacagctatgaccatgattacc cc	Amplifikation von scFvs codiert auf pHEN2 (vor der RBS)
MHE35SL2_f1	cgagctc ggtacc caacatgg	Amplifikation des 35S-Promotors aus pE35SL2 (203-223), KpnI
MHE35SL2_r1	cggag gagctc gcctgcaggtcactgg	Amplifikation des 35S-Promotors aus pE35SL2 (1332-1347) + SacI
MHET21_f1	gagcggataacaattcccc	Kontrolle von Insert in pET21a(+) (5144-5162)
MHET21_r1	gcagccaactcagcttc	Kontrolle von Insert in pET21a(+) (5334-5351)
MHGFP_f2	ct cca att ggc gat ggc c	Kontrolle von Inserts in pHNT (930-975)
MHGFP_r2	ag ttc ttc tcc ttt act c	Kontrolle von Inserts in pHNT (399-416)
MHGFP_r3	gtg ccc att aac atc acc	Kontrolle von Inserts in pHNT (454-471)
MHGFPΔNcoI_r1	g tgt tgg cca ggg aac agg	Entfernung der NcoI-Schnittstelle aus dem GFP-Gen codiert auf pHNTMHN1a2 (1744-1762), ehemals NcoI, Modifikation
MHGreen_f1	gttggttaacgccaggg	Kontrolle von Inserts in pGreenII-229 (1303-1319)
MHGreen_r1	ccatgattacgccaagctcgg	Kontrolle von Inserts in pGreenII-229 (1528-1548)
MHHEN2_f2	ggt tca ggc gga ggt ggc	Kontrolle von V _L von scFvs (Linkerpeptid)
MHHEN2_f2	ggt tca ggc gga ggt ggc	Amplifikation von V _L (Linkerpeptid)
MHHEN2_f3	ccgac cat atg aaa tac cta ttg cct acg gc	Amplifikation von scFvs codiert of pHEN2 (pelB) + NdeI

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung (Bindungsstelle)
MHHEN2_r3	ggctg a agc ttg att cag atc ctc ttc tga gat gag	Amplifikation von scFvs codiert of pHEN2 (myc-Tag) + <i>HindIII</i>
MHHNT_f	acg cca agc ttg cat gcc tg	Amplifikation eines Abschnitts aus pHNT (229-248), <i>HindIII</i>
MHHNT_f2	ctcattaggcaccccagg	Kontrolle von Inserts in pHNT (124-151)
MHHNT_pelB_f	ggttc gacgtcagg	Amplifikation eines Abschnitts aus pHNT (1500-1517), <i>AatII</i>
MHHNT_pelB_r	gaggc aa gct tgc ggc cat ggc cgg ctg ggc cgc gag taa taa caa tcc agc ggc tgc cgt agg caa tag gta ttt cat agc tgt ttc ctg tgtg	Amplifikation eines Abschnitts aus pHNT (201-220), <i>HindIII</i> + pelB
MHHNT_pelB_r2	c cta ttg cct acg gca gcc	Kontrolle des pelB-Inserts in pHNT_pelB, pHNTMHNia1_pelB und pHNTMHNia2_pelB (224-243)
MHHNT_r	ttt gta gag ctc atc cat gcc atg tgt aat ccc ctg agt gta tac aaa ctc aag aag gac	Amplifikation eines Abschnitts aus pHNT (1051-1110), <i>SacI</i> , Austausch von Basenpaaren zur Generierung der Nia-Site
MHHNT_r2	tgt aat ccc ctg agt gta	Kontrolle der Nia-Site in pHNTMHNia5 (1069-1086)
MHHNT_r3	gggagctgcatgtgtcagagg	Kontrolle von Inserts in pHNT (1235- 1255)
MHLacPromotor	gtgtggaattgtgagcgg	Kontrolle von Inserts in pTrueBlue (2105- 2122) und pHNT (173-190)
MHNa_r8	gaggc actagt tta gta aac aaa ttc ccc atc	Amplifikation des Nia-Gens aus pEXNia (2485-2502) + <i>SacI</i>
MHNia_f12	c act cag tcc aag gta ccg g	Amplifikation eines Abschnitts des GFP- Gens codiert auf pHNTMHNia2 (1557- 1576), <i>KpnI</i>
MHNia_f2	gcctc cc atg ggt ttc aat cgt agg caa a	Amplifikation des Nia-Gens aus pEXNia (1202-1219) + <i>NcoI</i>

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung (Bindungsstelle)
MHNia_f3	<i>gcctc cc atg gaa gaa gtt att cac caa g</i>	Amplifikation des Nla-Gens aus pEXNia (1184-1201) + <i>NcoI</i>
MHNia_f4	<i>gcctc a agc tta gaa gtt att cac ca</i>	Amplifikation des Nla-Gens aus pEXNia (1185-1199) + <i>HindIII</i>
MHNia_f5	<i>gcctc gagctc tac aaa gaa gaa gtt att cac caa</i>	Amplifikation des Nla-Gens aus pEXNia (1183-1200) + <i>SpeI</i> , 6 bp vom GFP 3'
MHNia_f6	<i>gcctc gag ctc tac aaa ggt ttc aat cg tag gca a</i>	Amplifikation des Nla-Gens aus pEXNia (1201-1218) + <i>SpeI</i> , 6 bp vom GFP 3'
MHNia_f7	<i>gcctc gcg cgc gaa gaa gtt att cac caa</i>	Amplifikation des Nla-Gens aus pEXNia (1183-1200) + <i>BssHII</i>
MHNia_f8	<i>gcctc gcg cgc ggt ttc aat cgt agg caa</i>	Amplifikation des Nla-Gens aus pEXNia (1201-1218) + <i>BssHII</i>
MHNia_f9	<i>gcctc gct agc tgg gaa gaa gtt att cac caa ggt cgg aat tcc gaa gag gcg</i>	Amplifikation eines Abschnitts aus pTrueBlue (2305-2322) + <i>NheI</i> + Nla-Site
MHNia_r10	<i>gg tcc tcc gat cgt tgt c</i>	Amplifikation eines Abschnitts aus pTrueBlue (542-559), <i>PvuI</i>
MHNia_r3	<i>gaggc aagc tta aac aaa ttc ccc atc aa</i>	Amplifikation des Nla-Gens aus pEXNia (2483-2500) + <i>HindIII</i>
MHNia_r4	<i>gaggc ggg ccc ttt gga ctg agt gta aac</i>	Amplifikation des Nla-Gens aus pEXNia (2497-2514) + <i>ApaI</i>
MHNia_r5	<i>gaggc ggg ccc gta aac aaa ttc ccc atc</i>	Amplifikation des Nla-Gens aus pEXNia (2485-2502) + <i>ApaI</i>
MHNia_r6	<i>gaggc gg tac c tt gga ctg agt gta aac a</i>	Amplifikation des Nla-Gens aus pEXNia (2496-2513) + <i>KpnI</i>
MHNia_r7	<i>gaggc gg tac ctc ccc atc aag atc cgt t</i>	Amplifikation des Nla-Gens aus pEXNia (2475-2492) + <i>KpnI</i>
MHNia_r9	<i>gaggc aagctt tta gta aac aaa ttc ccc atc</i>	Amplifikation des Nla-Gens aus pEXNia (2485-2502) + <i>HindIII</i>
MHORif1_r	<i>caaatattaacgcttac</i>	Kontrolle von Inserts in pTrueBlue (2462-2479)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung (Bindungsstelle)
MHscFv_f1	ggctg actagt taatacactcactata gctagc aggaggaaaaa a cc atg gcc cag gtg cag ctg	Amplifikation eines Abschnitts von pHEN2 (Beginn des V _H) + SpeI + T7-Promotor aus pET32a(+) + optimierte RBS aus pTrueBlue + NheI, NcoI
MHscFv_f3	ccaactgagcggcgtcgc	Kontrolle von Inserts in pHNT (1120-1138)
MHscFv_f4	gccgg ccatgg cccaggtgc	Amplifikation des <i>scFv-α-Nla102</i> -Gen codiert auf pHEN2 (Am Anfang des scFvs), NcoI
MHscFv_r2	ccgttagaggccccaagggg	Kontrolle von Inserts in pHNTMHNla_scFv (2609-2629)
MHscFv_r3	ccgac gggccc aaaaaacccctcaagaccggttagag gccccagggggttatgctag tta tgc ggc ccc att cag atc ctc	Amplifikation eines Abschnitts von pHEN2 (myc-Tag) + ApaI + T7-Terminator aus pET32a(+)
MHscFv_r6	ggctc tctaga tta aag ttc atc ctt aat atc att cag atc ctc ttc tg	Amplifikation des <i>scFv-α-Nla102</i> -Gen codiert auf pHEN2 (myc-Tag) + XbaI + DIKDEL
MHTerminator_r1	cccttatctgggaactactc	Kontrolle von Inserts in pGIIMH35S (2371-2394)
MHvst_f1	gcctc ggtacc gttaactttatataaaaaacc	Amplifikation des vst-Promotors aus pGEMvst + KpnI
MHvst_r1	c ctc aat tga agc cat gg atcctgagc	Amplifikation des vst-Promotors aus pGEMvst, NcoI
SP6	cactatagaataactcaagc	Kontrolle von Inserts in pGEM T (SP6-Promotor)
T7	cgactcactatagggcg	Kontrolle von Inserts in pGEM T (T7-Promotor)
TBMHNla_f2	a gaa gtt att cac caa g	Kontrolle der Nla-Site in pTBMHNla5 (2307-2323)
TBMHNla_r	ctgcagaacgacggctaa	Kontrolle von Inserts in pTrueBlue (2215-2232)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung (Bindungsstelle)
TBMHNIa_r2	t cac gat ggg taa tcc gc	Kontrolle von NIa-Inserts, z.B. pETMHNIa2 (6737-6754)

Tab. 2.3. Übersicht über die verwendeten Primer. In den Sequenzen sind Schnittstellen in **rot**, Start- und Stopcodons in **fett** und der Teil, der beim Restriktionsverdau des Amplifikates weggeschnitten wird, *kursiv* hervorgehoben. Andere Eigenschaften sind in der Sequenz in den gleichen Farben wie in der Beschreibung angegeben. Die Triplets entsprechen den Codons in den Genen.

2.1.5. Molekulargewichtsmarker

DNA-Marker:

Die DNA-Marker wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon Rot) bezogen

Bezeichnung	Fragmente
100bp Ladder Plus	100-900 bp, 1031 bp, 1200 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp
M2 (Lambda/HindIII)	561 bp, 2027 bp, 2322 bp, 4361 bp, 6557 bp, 9416 bp, 23130 bp
M14 (pBR322/Alw44I/MvaI)	121 bp, 383 bp, 498 bp, 929 bp, 1058 bp, 1246 bp, 1857 bp, 2617 bp

Tab. 2.4. Übersicht über die verwendeten DNA-Marker

Proteinmarker:

Es wurde der Proteinmarker MS-SDS-70L von der Firma Sigma (Deisenhofen) eingesetzt. Der Marker besteht aus den Proteinen α -Lactalbumin (14,2 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (36 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Rinderserum Albumin (BSA) (66 kDa).

2.1.6. Antikörper

Bezeichnung	Herkunft
Kaninchen α -fd Bakteriophage, polyklonal	Sigma (Deisenhofen)
Maus α -M13 (B62-FE2), monoklonal	Progen Immuno-Diagnostika (Heidelberg), (Kneissel <i>et al.</i> 1999)
Maus α -myc-Tag (9B11), monoklonal	Cell Signaling Technology/ New England Biolabs (Frankfurt)
Ziege α -Maus IgG (Gamma-Kette) AP, polyklonal	Sigma (Deisenhofen)
Kaninchen α -Maus IgG AP, polyklonal	Sigma (Deisenhofen)
Ziege α -Kaninchen IgG AP, polyklonal	Sigma (Deisenhofen)
Maus α -His-Tag, monoklonal	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Mouse α -GFP (Klone 7.1 + 13.1), monoklonal	Roche (Mannheim)
Kaninchen α -PPV-CP, polyklonal	E.Maiß (Institut für Pflanzenkrankheiten, Universität Hannover)

Tab. 2.5. Übersicht über die verwendete Antikörper

2.1.7. Verwendete „Kits“

Es wurden „Kits“ der Firma Invitex (Berlin-Buch) eingesetzt. Für die Plasmidisolierung wurde das „Invisorb Spin Plasmid Mini Kit“ eingesetzt. Für die Aufreinigung von PCR-Reaktionen und Verdaus wurde das „Invisorb Spin PCRapid Kit“ eingesetzt.

2.1.8. Chemikalien und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad und wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Applichem (Darmstadt), Calbiochem (Frankfurt), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka/ Sigma-Aldrich (Neu-Ulm), Gibco/Life Technologies (Effenstein), MBI Fermentas (St. Leon Rot), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Riedel-de Haën/ Sigma-Aldrich (Sarstedt), Roche (Mannheim), Roth

(Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen).

Für die molekularbiologischen Arbeiten und den Methoden zur Isolierung von scFv-Fragmenten wurden alle Lösungen autoklaviert oder sterilfiltriert.

2.1.9. Pflanzenmaterial

Mit Potyviren infizierte Pflanzen (Blattmaterial) wurden von Dr. H.J. Vetten, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) Braunschweig zur Verfügung gestellt. Mit dem *Plum pox virus* und dem *Potato virus Y* infizierte Tabakpflanzen, sowie nicht infizierte Tabakpflanzen, wurden von Prof. Dr. E. Maiß, Institut für Pflanzenkrankheiten, Universität Hannover, zur Verfügung gestellt.

2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.1. Überexpression von Proteinen und Proteinextraktion aus Bakterien

Die Überexpression von Proteinen erfolgte mit pET32a(+) oder pET21a(+) Expressionsvektoren im *E.coli* Stamm BLR(DE3). 50 ml LB-Medium (2.3.1.) mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 bei 150 Upm und 37 °C angezogen. Der *lac*-Promotor oder indirekt der T7-Promotor wurde mit final 1 mM IPTG induziert. Die weitere Inkubation im Schüttelinkubator erfolgte bei 30 °C je nach Versuch 3 h bis zu 40 h. Die Kultur wurde bei 6200 xg für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 100 µg/ml Lysozym, 10 µg/ml DNaseI) aufgenommen und für 15 min bei 30 °C inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen mittels Ultraschall-Behandlung (Sonotrode UW 2200, Bandelin Electronic, Berlin) bei 36 % „duty“ für 1 min auf Eis aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde bei 6200 xg für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine, im Pellet befanden sich die unlöslichen Proteine. Für die SDS-PAGE wurde dem Überstand 1 ml 2xSDS-Probenpuffer (2.2.5.) hinzugefügt, bzw. das Pellet in 2 ml SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 3 min gekocht, um die Proteine zu denaturieren.

Wenn mit anderen Kulturvolumina gearbeitet wurde, wurden die Puffermengen entsprechend

angepaßt. Bei der Expression des GFPs in den pHNT Plasmiden erfolgte keine Induktion mit IPTG.

2.2.2. Proteinisolation aus Pflanzen

Um aus virusinfizierten und nicht infizierten Pflanzen Protein zu isolieren, wurde zu 1 g Blattmaterial (frisch oder gefroren) 2 ml Homogenisierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 3 % PVP (Polyklar AT), 20 mM DTT, 1 mM PMSF) gegeben und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert. Die Proben wurden in 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und mittels Ultraschall (Sonotrode UW 2200, Bandelin Electronic, Berlin) bei 36 % „duty“ für 1 min auf Eis behandelt. Es wurde 10 ml 8M Harnstoff in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 hinzugefügt und 90 min auf Eis inkubiert, um Einschlußkörper aufzuschließen. Die Lösungen wurden in SS34-Röhrchen umgefüllt und bei 48.000 xg für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in Dialyseschläuche (Visking dialysis tube 20/32, Serva) umgefüllt und dreimal gegen 1xPBS pH 7,4 (1,85 mM NaH₂PO₄*H₂O, 8,5 mM Na₂HPO₄*2H₂O, 150 mM NaCl) dialysiert. Die Proteinlösungen wurden in 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und die Proteine mittels Methanol-Aceton gefällt (2.2.3.). Die Proteinpellets wurden in SDS-Proben-Puffer (2.2.5.) aufgenommen und 3 min gekocht.

2.2.3. Methanol-Aceton Fällung

Proteinlösungen wurden mit einem fünffachen Volumen eiskalten Methanol-Aceton Gemisches (2:7 (v/v)) über Nacht gefällt (Deutscher 1990). Die gefällten Proteine wurden bei 8900 xg (Reaktionsgefäße) oder bei 6200 xg (50 ml Zentrifugenröhrchen) für 10 min bei 4 °C pelletiert. Das Proteinpellet wurde im gewünschten Puffer aufgenommen.

2.2.4. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Lösungen wurden mittels des Esen-Test (Esen 1978) abgeschätzt. Es wurden jeweils 5 µl BSA-Standards und die Proteinlösungen, meist verdünnt, auf ein

Filterpapier (GB002 Gel-Blotting-Papier, Schleicher&Schuell) gedottet. Das Filterpapier wurde getrocknet und die Proteine für 10 min in Eisenreagenz (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure, 0,1 % Coomassie G250) gefärbt. Anschließend wurde das Filterpapier mit Leitungswasser entfärbt. Die Konzentration der zu untersuchenden Proteinlösungen wurde anhand von BSA-Standards (1-100 µg/ 5 µl) abgeschätzt.

2.2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde mit Modifikationen nach Laemmli (1970), sowie Reinard und Jacobsen (1995) durchgeführt. Für die meisten SDS-Gelelektrophoresen wurde das Minigel-System (Gelgröße 10x9 cm) der Firma Biometra (Göttingen) benutzt. Um die N1a-Protease aufzureinigen, wurde eine präparative SDS-PAGE im Protean-Gelsystem (Gelgröße 18x18 cm) der Firma BioRad (München) durchgeführt. Vor der SDS-PAGE wurden die Proben in der gewünschten Menge SDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 0,02 % Bromphenolblau, 50 mM Dithiothreitol) aufgenommen und für 3 min gekocht, um die Proteine zu denaturieren.

Trenngel (Angaben für ein Minigel (6 ml)):

	8%	10%	12%	15%	18%
dH ₂ O [ml]	2,8	2,4	2,0	1,4	0,8
30 % (w/v) Acrylamid / 0,8%					
Bisacrylamid [ml]	1,6	2,0	2,4	3,0	3,6
1.5 M Tris-HCl pH 8,8 [ml]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
10% (w/v) SDS [µl]	60	60	60	60	60
10% APS (w/v) [µl]	60	60	60	60	60
TEMED [µl]	4	3	3	3	3

Tab. 2.6. Zusammensetzung des Trenngels SDS-PAGE (Minigel)

Sammelgel (Angaben für ein Minigel (1,5 ml)):

dH ₂ O [ml]	1,00
30 % (w/v) Acrylamid /0,8 % Bisacrylamid [ml]	0,26
1 M Tris-HCl pH 6,8 [ml]	0,20
10 % (w/v) SDS [μ l]	15
10 % (w/v) APS [μ l]	15
TEMED [μ l]	2

Tab. 2.7. Zusammensetzung des Sammelgels der SDS-PAGE (Minigel)

Präparative 12% SDS-PAGE (30 ml Trenngel + 6 ml Sammelgel):

	Trenngel	Sammelgel
dH ₂ O [ml]	10	4
30 % (w/v) Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid [ml]	12	1
1 M Tris-HCl pH 6,8 [ml]	7,5	0,8
10 % (w/v) SDS [μ l]	300	60
10 % (w/v) APS [μ l]	300	60
TEMED [μ l]	20	8

Tab. 2.8. Zusammensetzung der präparativen SDS-PAGE (Protean-Gel)

Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit dH₂O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen. Der 1x SDS-Laufpuffer pH 8,3 bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS. Die Auftrennung der Proteine im Minigel erfolgte im Sammelgel bei 10-12 mA und im Trenngel bei 12-15 mA für 2-3 h bis zum Austreten des Bromphenolblaus. Die Auftrennung in Protean-Gelen erfolgte bei 6-8 mA über Nacht und am nächsten Tag bei 30 mA für weitere 3-4 h.

2.2.6. Native-PAGE

Die Zusammensetzung der Acrylamidgele und der Gellauf der Native-PAGE entsprach dem der SDS-PAGE (2.2.5.), jedoch wurde den Gelen und Puffern kein SDS zugesetzt. Die Proben wurden im Native-Puffer (5 mM Tris HCl pH 6,8, 4 % (w/v) Saccharose, 0,02 % Bromphenolblau) aufgenommen und nicht gekocht.

2.2.7. Coomassie-Färbung

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Modifikationen nach Eckert und Kartenbeck (1996) mittels Coomassie (0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Eisessig) für 1 h gefärbt und mit 10 % (v/v) Essigsäure über Nacht entfärbt, wobei ein gefaltetes Papierhandtuch das gelöste Coomassie aufnahm. Die Gele wurden auf einem Leuchttisch ausgewertet, mit einer CCD-Kamera (Compact Imager, Intas) aufgenommen und Photos mit einem Videoprinter (P91E Video Copy Processor, Mitsubishi) ausgedruckt.

2.2.8. Aufreinigung von überexprimierten Proteinen

Die Nla-Protease wurde mittels präparativer SDS-PAGE (2.2.5.) aufgetrennt und Coomassie gefärbt (2.2.7.). Die gewünschte Proteinbande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden in die Glasröhrchen des Elektroeluters (Model 422 Electro-Eluter, Bio-Rad) gegeben. Das Gerät wurde gemäß den Angaben des Herstellers zusammgebaut. Die „Membran Caps“ wurden vor dem Gebrauch für 1 h bei 60 °C in 1xSDS-Laufpuffer (2.2.5.) inkubiert. Die Elektroelution erfolgte über Nacht bei 6-8 mA in 1xSDS-Laufpuffer. Die gewonnene Proteinlösung (600-800 µl) wurde mittels zweifacher Methanol-Aceton Fällung (2.2.3.) eingengt und das Coomassie gewaschen. Das Proteinpellet wurde in 100-200 µl 10 mM NaHCO₃-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.2.9. Westernblot

Proteine, die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden, wurden nach Towbin *et al.* (1979) und Rosidi (2001) mit Modifikationen auf PVDF geblottet. Es wurden „Semi Dry“ Blots mit dem Westernblot Gerät „Trans Blot SD, Semi Dry Transfer Cell“ (BioRad) durchgeführt. Drei 10x14 cm Filterpapiere (GB002 Gel-Blotting-Papier, Schleicher&Schuell) wurden mit Laufpuffer pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM Glycin) angefeuchtet und auf der Elektrodenplatte mit einem Drigalskispatel glattgestrichen. Die 9x7 cm PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) wurde kurz in Methanol aktiviert und auf die Filterpapiere gelegt. Es folgte das Polyacrylamidgel und vier weitere angefeuchtete Filterpapiere. Der Blot erfolgte bei 20 V limitiert auf 5,5 mA pro cm² (770 mA bei 10x14 cm) für 45 min.

Bei Nitrozellulosemembranen (0,45 µm, Gerbermembrane) anstatt PVDF wurde Towbin-Puffer pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) anstatt Laufpuffer (s.o.) eingesetzt, die Nitrozellulose mußte nicht separat mit Methanol aktiviert werden.

2.2.10. Ponceaufärbung und Blotabsättigung

Um den Proteintransfer zu überprüfen, wurden nach Westernblots die PVDF, bzw. Nitrozellulosemembranen, für 15 min mit Ponceau (0,2 % Ponceau S, 3% Trichloressigsäure (TCA)) gefärbt (Reinard *et al.* 1994). Der gefärbte Blot wurde mit dH₂O gewaschen. Der nun sichtbare Marker wurde abgeschnitten und getrocknet. Der andere Teil des Blots wurde weiter mit dH₂O entfärbt. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu unterbinden, wurde die Membran über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei RT mit DBB (1 % BSA, 1 % FCS, 0,02% NaN₃ in 1xPBS (2.2.2.)) oder Blotto (5 % Milchpulver Uelzena fettarm in 1x PBST (1xPBS + 0,05 % Tween + 0,02 % NaN₃)) abgesättigt.

2.2.11. Dot-Blots

Dot-Blots wurden in der Dot-Blot Apparatur Minifold I SRC96D (Schleicher&Schuell) durchgeführt. Die Proteinproben wurden hierzu in 250 µl 1xPBS (2.2.2.) aufgenommen. In

die Apparatur wurden zwei 10x14 cm Filterpapiere (GB002 Gel-Blotting-Papier, Schleicher&Schuell) und eine 9x7 cm Nitrozellulosemembran (0,45 µm, Gerbermembrane) eingespannt. Die Proteinlösungen wurden in die Vertiefungen gefüllt und eine Pumpe (Biometra) wurde an die Dot-Blot Apparatur angeschlossen, um die Flüssigkeit abzusaugen. Die Membran wurde anschließend in Blotto (2.2.10.) über Nacht bei 4 °C abgesättigt.

2.2.12. Immunfärbungen

Die Immunfärbungen wurden nach Hust *et al.* (1999) mit Modifikationen durchgeführt. Die abgesättigten Membranen wurden für 5 min mit 1xPBS (2.2.2.) gewaschen. Die Antikörper wurden in 20 ml 5 % Blotto (5 % Milchpulver in 1xPBS), 1xPBS oder DBD (0,05 % BSA, 0,025 % Tween 20, 0,01 % NaN₃, 0,5 % FCS) gelöst. Bei Immunfärbungen mit dem 1. Antikörper in der Hoeferkammer wurden die Antikörper in nur 1 ml gelöst. Nach jeder Antikörperinkubation (1-2 h) wurde die Membran einmal kurz und einmal für 5 min mit 1xPBS gewaschen, um nicht und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, dieser Vorgang wurde wiederholt. Bei Immunfärbungen in der Hoeferkammer wurde vorher zweimal für 5 min mit 1 ml 1xPBS in der Hoeferkammer gewaschen und anschließend der Blot aus der Kammer genommen und erneut wie oben beschrieben gewaschen. Nach der Inkubation mit dem mit einer alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper wurde die Membran nach dem Waschen (s.o.) kurz in Substratpuffer (100 mM Tris HCl pH 9,5, 0,5 mM MgCl₂) äquilibriert. Die Farbreaktion erfolgte mit 20 ml Färbelösung (0,37 mM NBT, 0,35 mM BCIP in Substratpuffer) bis die gewünschte Färbung erreicht war. Die Färbereaktionen wurde durch Waschen mit Leitungswasser gestoppt.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Kulturmedien und Anzucht von Bakterien

Bakterien wurden in LB-Medium pH 7,5 (1 % Trypton, 0,5 % Hefe Extrakt, 1 % NaCl) oder 2xTY pH 7,5 (1,6 % Trypton, 1 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl) kultiviert (Sambroek *et al.* 1989). Für die Herstellung von Agar-Platten wurde den Medien 1,5 % Agar-Agar hinzugefügt. Alle

Medien wurden autoklaviert. Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin 100 µg/ ml (Stammlösung: 100 mg/ ml), Kanamycin 50 µg/ ml (Stammlösung: 10 mg/ ml) und Tetracyclin 10 µg/ml (Stammlösung: 5 mg/ ml). Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert. Zur Herstellung einer Übernachtskulturen (ÜNK) wurden die Bakterien bei 37 °C und 150-200 Upm über Nacht kultiviert. Die Anzucht von Bakterienkulturen ging immer von einer Einzelkolonie aus.

2.3.2. Bestimmung der optischen Dichte (OD) einer Bakterienkultur

Die optische Dichte einer Bakterienkultur wurde bei 600 nm im Photometer (Ultrospec 3000 UV/Visible Spektrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt.

2.3.3. Anlegen von Glycerinstocks

Um Kulturen dauerhaft aufzubewahren, wurden Glycerinstocks angelegt. Hierzu wurden 850 µl Bakterienkultur mit 150 µl 86 % Glycerin in einem 2 ml Reaktionsgefäß vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.3.4. Konstruktion von Plasmiden

Für die Konstruktion von Plasmiden wurde das gewünschte Gen oder die gewünschte Sequenz zuerst mittels PCR (2.3.5.) amplifiziert. In die Primer wurden direkt Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen integriert. Die PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (2.3.6.). Die Vektoren wurden in *E.coli* vermehrt und isoliert (2.3.8.). Vektoren und PCR-Produkte wurden mit den spezifischen Restriktionsendonukleasen (2.3.9.) geschnitten und mittels Agarose Gelelektrophorese kontrolliert. Für die TA-Klonierung in pGEM war kein Verdau notwendig. Die geschnittenen Vektoren und PCR-Produkte wurden mit dem „Invisorb Spin PCRapid Kit“ aufgereinigt und somit DNA-Fragmente bis 80 bp entfernt. Geschnittene Vektoren und PCR-Produkte wurden mittels Ligase ligiert (2.3.10.) und kompetente *E.coli* (2.3.11.) mittels Hitzeschock mit den ligierten Plasmiden transformiert

(2.3.12.). Die auf LB-Agar (2.3.1.) gewachsenen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (2.3.13.) kontrolliert und die gewünschten Klone sequenziert (2.3.14.).


2.3.5. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Abschnitten nach Mullis *et al.* (1986) wurde die CombiZyme Taq Polymerase der Firma Invitex eingesetzt. Diese Polymerase besitzt eine „Proofreading“ Funktion. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen im TRIO-Thermoblock der Firma Biometra durchgeführt. Ein 50 µl PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

dH ₂ O	40 µl-x µl
10x OptiPerform III Puffer	5 µl
MgCl 50 mM	2,5 µl (2,5 mM)
dNTPs je 10 mM	1 µl (je 200 µM)
Primer vorwärts 100 µM	0,5 µl (1 µM)
Primer zurück 100 µM	0,5 µl (1 µM)
CombiZyme 4 U/ µl	0,5 µl (2 U)
Matrizen DNA	x µl

Tab. 2.9. Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Ansatzes

In der Regel wurden 50-200 ng Plasmid DNA in eine PCR eingesetzt. Die PCR-Zyklen wurden wie folgt gewählt:

95 °C	1 min (Denaturierung der DNA)	 30x
95 °C	1 min (Denaturierung der DNA)	
x °C	1 min (Anlagerung der Primer)	
72 °C	1 min (Synthese)	
72 °C	10 min (Restsynthese)	

Die PCR wurde im Anschluß mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.3.6.) überprüft.

2.3.6. Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR, Kolonie-PCR und Restriktionsverdau wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurden 1 % Agarose Gele gegossen (1 % Agarose, 40 mM Tris-HCl, 0,115 % Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8). Die Proben wurden mit 1/3 Volumen Ladepuffer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas oder 10 % Glycerin, 250 µg/ ml Xylencyanol, 250 µg/ml Bromphenolblau) versetzt. Die DNA wurde im Gel bei 80 - 90 V für etwa 1 h aufgetrennt und anschließend für 10 - 30 min mit Ethidiumbromid auf einem Schüttler gefärbt. Die Gele wurden nach dem Färben auf einem UV-Leuchttisch ausgewertet, mit einer CCD-Kamera aufgenommen und Photos mit einem Videoprinter ausgedruckt.

2.3.7. Plasmidisolaton

Für die Plasmidisolaton wurden 2-10 ml LB-Medium + dem jeweiligen Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37 °C für 150-200 Upm inkubiert. Für die Plasmidisolaton wurde entweder das „Invitex Spin Plasmid Mini Kit“ gemäß den Angaben des Hersteller eingesetzt oder eine klassische Plasmidisolaton (Sambrock *et al.* 1989, mit Modifikationen) durchgeführt. Bei der klassische Plasmidisolaton wurden 2 ml ÜNK in einem 2 ml Reaktionsgefäß bei 8900 xg für 1 min zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden in 300 µl Lösung A (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ ml RNase A) resuspendiert. Für die alkalische Lyse wurden 300 µl Lösung B (0,2 M NaOH, 1 % SDS) hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde mit 300 µl Lösung C (3 M Kaliumacetat, pH 5,5 mit Essigsäure eingestellt) neutralisiert, gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die ausgefällten Proteine und Zelltrümmer inklusive dem Bakterienchromosom wurden bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand mit der Plasmid-DNA wurde 1 ml Isopropanol hinzugefügt und bei 30.000 xg für 15 min und RT zentrifugiert, um die DNA zu fällen. Um die Salze zu entfernen, wurde das Pellet mit 400 µl 70 % Ethanol gewaschen, bei 8900 xg für 10 min und 4 °C zentrifugiert und getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl dH₂O aufgenommen und 50 µl PEG-Lösung (1,6 M NaCl, 30 % Polyethylenglycol 6000) wurden hinzugefügt, um RNA-Fragmente zu entfernen. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 30.000 xg für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol

gewaschen (s.o.), getrocknet und in 100 µl dH₂O aufgenommen. Die DNA-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.3.8. Quantifizierung von DNA-Lösungen

Die Quantität und Qualität der DNA-Lösung wurde bei 260 nm und 280 nm im Photometer (Ultrospec 3000 UV/Visible Spektrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt und wie folgt berechnet:

$$\mu\text{g DNA/ml} = OD_{260} * 50$$

$$\text{Qualität} = \frac{OD_{260}}{OD_{280}}$$

Der Quotient OD_{260}/OD_{280} einer reinen DNA Lösung beträgt 1,8.

2.3.9. Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmiden wurde in 20 µl Ansätzen durchgeführt:

10x Puffer	2 µl
Restriktionsenduklasen 10 U/ µl	1-8 µl (10-80 U)
DNA	ad to 20 µl

Tab. 2.10. Zusammensetzung eines Verdaus

Die Ansätze wurden für 1,5 - 4 h bei 37 °C inkubiert. Die entstandenen Fragmente wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.3.6.) kontrolliert.

2.3.10. Ligation

Für die Ligation wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Das Verhältnis wurde anhand der Agarose-Gelelektrophorese des Verdauung abgeschätzt.

5x Puffer	4 μ l
Gibco Ligase 1 U/ μ l	2 μ l (2 U)
Vektor	ad to 20 μ l im Verhältnis
Insert	1:3

Tab.2.11. Zusammensetzung der Ligationsansätze

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

2.3.11. Herstellung kompetenter *E.coli*

E.coli Bakterien wurden nach Tang *et al.* (1994) und Nakata *et al.* (1997) mit Modifikationen kompetent gemacht. Hierzu wurden 50 ml LB (+Antibiotikum) mit einer 0,5 ml Übernachtskultur der zu transformierenden Bakterien angeimpft und bei 37 °C und 150-200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde in zwei 50 ml Zentrifugationsröhrchen bei 2800 xg für 10 min und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in jeweils 15 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und erneut zentrifugiert (s.o.). Die Pellets wurden in jeweils 2 ml 50 mM CaCl₂ aufgenommen, in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen vereinigt und für 1 h auf Eis inkubiert. Der Bakteriensuspension wurde mit 2 ml eiskaltem 40 % Glycerin in 50 mM CaCl₂ gemischt, zu jeweils 150 μ l aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

2.3.12. Transformation von *E.coli* mittels Hitzeschock

Die Transformation von *E.coli* mittels Hitzeschock erfolgt nach Tang *et al.* (1994) und Nakata *et al.* (1997) mit Modifikationen. Zu 50 μ l kompetente Zellen wurden 1 μ l Ligationsansatz

hinzugefügt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 s bei 42 °C und eine weitere Inkubation auf Eis für 2-3 min. Die transformierten Bakterien wurden in 950 µl SOC-Medium (10 mM NaCl , 0,5 % Hefeextrakt, 2 % Tryptone, 2,5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MgSO₄, 50 mM Glucose) aufgenommen und für 90 min bei 37 °C und 150-200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden danach auf LB-Agar Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Bei der Blau-Weiß Selektion wurden die Bakterien auf LB-Agar Platten ausplattiert, auf denen vorher 100 µl einer IPTG/X-Gal-Mischung (40 µl 2 % (w/v) X-Gal in N,N'-Dimethylformamid + 4 µl 0,833 M IPTG + 56 µl dH₂O) ausplattieren wurden. Die LB-Agar Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.13. Kolonie-PCR

Transformationen wurden mittels Kolonie-PCR nach den gewünschten Klonen untersucht. Die Zusammensetzung des Kolonie-PCR Ansatzes entsprach dem der PCR (2.3.4.), jedoch wurde jedem Reaktionsansatz Bakterien anstatt reiner DNA zugesetzt. Hierzu wurden die gewünschten Kolonien auf der Agar-Platte mit einer Pipettenspitze berührt und so Koloniematerial in den Reaktionsansatz überführt, anschließend wurde mit der Pipettenspitze eine neue LB-Agar Platte angeimpft. Das PCR-Protokoll entsprach der PCR (2.3.5.). Die Kolonie-PCR wurde im Anschluß mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.3.6.) überprüft.

2.3.14. Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten wurde von der Firma Sequence Laboratories (Göttingen) durchgeführt.

2.4. Methoden zur Selektion von rekombinanten Antikörpern

2.4.1. Amplifikation des Helferphagen

Für die Vermehrung der scFv-Phagen werden Helferphagen benötigt, da auf dem Phagemid pHEN2 nur das Hüllprotein pIII codiert ist. Die Amplifikation der Helferphagen erfolgte mit Modifikationen nach den Protokollen des MRC Centre for Protein Engineering in Cambridge (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/~phage/>). 50 ml LB-Medium wurden mit 1 ml ÜNK von *E.coli* TG1 angeimpft und bei 37 °C und 150-200 Upm bis OD₆₀₀ 0,5 (~5x10⁸ Bakterien/ ml) inkubiert. In dieser Wachstumsphase sind die meisten F-Pili vorhanden. 2,5 ml Kultur (~1,25x10⁹ Bakterien) wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit den Helferphagen VCS-M13 (Stratagene) im Verhältnis 1:20 (2,5x10¹⁰ pfu) infiziert und für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Die infizierten Bakterien wurden zu 500 ml LB-Medium + 50 µg/ ml Kanamycin gegeben und über Nacht (mindestens 18h) bei 30 °C und 150-200 Upm inkubiert. Die Bakterien wurden in GS3-Zentrifugenbehälter überführt und bei 10000 xg min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Helferphagen. Im Anschluß wurden die Helferphagen mittels PEG-Fällung gefällt (2.4.2.) und der Phagen-Titer bestimmt (2.4.3.). Die Phagen wurden in 2 ml Schraubgefäßen bei 4 °C gelagert.

2.4.2. Konzentrierung der Phagen mittels PEG-Fällung

Amplifizierte Helferphagen und scFv-Phagen wurden durch die PEG-Fällung konzentriert. Die Phagenpartikel wurden durch Zugabe von 1/5 Volumen PEG/NaCl-Lösung (20 % (w/v) PEG 6000, 2,5 M NaCl) gefällt. Die Phagenlösung wurde für 1 h bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert und anschließend bei 10000 xg für 30 min und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml dH₂O resuspendiert und in ein SS34-Röhrchen überführt. Zur Phagenlösung wurden erneut 1/5 Volumen PEG/NaCl-Lösung gegeben und für 1 h bei 4 °C auf der Wippe inkubiert. Die Phagen wurden durch Zentrifugation bei 10000 xg pelletiert. VCS-M13 Helferphagen wurden in 1 ml SM-Puffer pH7,5 (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 4 mM MgSO₄*7H₂O, 5 % Gelatine), bzw. scFv-Phagen in 1 ml 1xPBS (2.4.6.) aufgenommen.

2.4.3. Titerbestimmung der Helferphagen

Für die Titerbestimmung der VCS-M13 Helferphagen wurden von der Phagensuspension Verdünnungen in SM-Puffer (2.4.2.) hergestellt. 50 ml LB-Medium wurden mit 1 ml ÜNK von *E.coli* TG1 angeimpft und bei 37 °C und 150-200 Upm bis OD₆₀₀ 0,5 (~5x10⁸ Bakterien/ ml) inkubiert. 50 µl TG1 wurde mit den Verdünnungsstufen 10⁻¹⁰ und 10⁻¹² (10 µl Volumen) infiziert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die infizierten Bakterien wurden in jeweils 3 ml flüssigen (~48 °C) LB-Topagar (0,7 % Agar-agar in LB-Medium) aufgenommen und auf eine LB-Agarplatte ohne Antibiotikum gegossen. Die Agarplatten wurden nach dem Erhärten des Topagars über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen konnten die Plaques ausgezählt und die pfu/ ml bestimmt werden. Bei VCS-M13 handelt es sich nicht um einen lytischen Phagen, VCS-M13 mindert aber die Wachstumsgeschwindigkeit der infizierten Bakterien. Es traten keine Plaques auf, in dem die Bakterien vollständig lysiert werden, sondern hellere Kreise mit vermindertem Bakterienwachstum.

2.4.4. Amplifikation der scFv-Bank

Um die „Griffin 1. library“ zu amplifizieren, wurden 500 ml 2xTY-Medium (2.3.1.) + 1 % Glucose + 50 µg/ ml mit 1 ml Glycerinstock der scFv-Bank angeimpft. Die Glucose reprimiert den *lac*-Promotor, so daß kein pIII gebildet werden kann. Die Bakterien wurden bei 150-200 Upm bei 37 °C bis OD₆₀₀ 0,5 angezogen. Für die Lagerung der scFv-Bank wurden 475 ml der Bakterienkultur, aufgeteilt auf zehn 50 ml Zentrifugationsröhrchen, bei 3350 xg zentrifugiert, die Pellets in jeweils 850 µl 2xTY aufgenommen und Glycerinstocks hergestellt (2.3.3.). Die restlichen 25 ml Bakterienkultur (~1,25x10¹⁰ Bakterien) wurden in ein Zentrifugationsröhrchen überführt, mit VCS-M13 im Verhältnis 1:20 (2,5x10¹¹ pfu) infiziert und für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Um die Glucose zu entfernen, wurden die infizierten Bakterien bei 3350 xg für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 1 ml 2xTY resuspendiert, in 500 ml 2xTY-Medium + 100 µg/ ml Ampicillin + 25 µg/ ml Kanamycin aufgenommen und bei 30°C und 150-200 Upm über Nacht inkubiert. Die Bakterien wurden in GS3-Zentrifugenbehälter überführt und bei 10000 xg für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die scFv-Phagen. Im Anschluß wurden die scFv-

Phagen mittels PEG-Fällung gefällt (2.4.2.) und der Phagen-Titer bestimmt (2.4.5.). Die Phagen wurden in 2 ml Schraubgefäßen bei 4 °C gelagert.

2.4.5. Titerbestimmung der scFv-Phagen

Für die Titerbestimmung der scFv-Phagen wurden von der Phagensuspension Verdünnungen in 1xPBS (2.4.6.) hergestellt. 50 ml LB-Medium wurden mit 1 ml ÜNK von *E.coli* TG1 angeimpft und bei 37 °C und 150-200 Upm bis OD₆₀₀ 0,5 (~5x10⁸ Bakterien/ ml) inkubiert. 50 µl TG1 wurde mit den Verdünnungsstufen 10⁻¹⁰ und 10⁻¹² nach der Amplifikation der scFv-Phagen, bzw. mit den Verdünnungsstufen 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶ und 10⁻⁸ nach der Elution der scFv-Phagen (10 µl Volumen) infiziert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die infizierten Bakterien wurden auf LB-Agar + 100 µg/ ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen konnten die Kolonien ausgezählt und cfu/ ml bestimmt werden.

2.4.6. Panning in Elisa-Vertiefungen

Das Panning wurde mit Modifikationen nach Sparks (1996) durchgeführt. Jeweils zwei ELISA-Vertiefungen (8-Well-Maxisorb Streifen, Nunc) wurden mit 25 µg NIa-Protease (20 µg bei humanem Thyroglobulin) beschichtet. Hierzu wurden die Proteine in jeweils zweimal 150 µl 10 mM NaHCO₃ aufgenommen und in die Vertiefungen gefüllt. Es folgte die Inkubation bei 25 Upm über Nacht und RT auf einem Taumeltisch (Biometra WT12). Die Wells wurden viermal mit PBS für Panning pH 7,4 (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄*2H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄, entspricht nicht dem PBS für Immunfärbungen (2.2.10.)) gewaschen. Anschließend wurden die Vertiefungen komplett mit 10 % Blotto (10 % Milchpulver in PBS für Panning) gefüllt und 2 h bei 37 °C inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Die Vertiefungen wurden erneut gewaschen. Jeweils 1x10¹² scFv-Phagen wurden, gelöst in 150 µl PBS je Vertiefung, für 2 h bei RT auf dem Taumeltisch inkubiert. Die nicht und unspezifisch gebundenen scFv-Phagen wurden mittels zehnmalem Waschen mit PBST (PBS für Panning, 0,1 % Tween 20) und zehnmalem Waschen mit PBS entfernt. Die gebundenen scFv-Phagen wurden mit jeweils 150 µl 0,1 M pH 2,2 Glycin + 1 % BSA für

15 min auf einem Taumeltisch eluiert. Zum Neutralisieren wurden jeweils 300 µl Phosphatpuffer pH 7,6 (6 mM NaH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄) hinzugegeben. Die Parallelansätze wurden vereinigt. 50 ml 2xTY-Medium wurden mit 1 ml ÜNK von *E.coli* TG1 angeimpft und bei 37 °C und 150-200 Upm bis OD₆₀₀ 0,5 (~5x10⁸ Bakterien/ ml) inkubiert. 10 µl wurden für eine Titerbestimmung der eluierten scFv-Phagen genutzt (2.4.5.). 10 ml der angezogenen TG1-Kultur wurden mit den restlichen 890 µl infiziert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden die infizierten Bakterien bei 3350 xg für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml 2xTY + 1 % Glucose + 50 µg/ ml Ampicillin resuspendiert und über Nacht bei 37 °C und 150-200 Upm inkubiert. 500 ml 2xTY-Medium + 1 % Glucose + 50 µg/ ml Ampicillin wurden mit 5 ml der ÜNK angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 150-200 Upm bis OD₆₀₀ 0,5 (~5x10⁸ Bakterien/ ml) inkubiert. 25 ml dieser Kultur (~1,25x10¹⁰ Bakterien) wurden mit VCSM13 im Verhältnis 1:20 (2,5x10¹¹ pfu) infiziert und für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Die infizierten Bakterien wurden bei 3350 xg für 10 min zentrifugiert, in 500 ml 2xTY + 100 µg/ ml Ampicillin + 25 µg/ ml Kanamycin aufgenommen und über Nacht bei 30 °C und 150-200 Upm inkubiert. Die Bakterien wurden in GS3-Zentrifugenbehälter überführt und bei 10000 xg für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die scFv-Phagen. Im Anschluß wurden die scFv-Phagen mittels PEG-Fällung gefällt (2.4.2.) und der Phagen-Titer bestimmt (2.4.5.). Die Phagen wurden in 2 ml Schraubgefäßen bei 4 °C gelagert. Die amplifizierten scFv-Phagen wurden in der nächste Panningrunde eingesetzt. Es wurden bis zu sieben Panningrunden durchgeführt.

2.4.7. Panning auf Nitrozellulose

Das Panning auf Nitrozellulose wurde nach Hawlisch *et al.* (2001) und persönlichen Mitteilungen von Dr. Hawlisch mit Modifikationen durchgeführt. Gesamtprotein aus der Überexpression der NIa-Protease codiert auf BLR(DE3)-pETMHNia2 (2.2.1.) wurde mittels 12 % SDS-PAGE (2.2.5.) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet (2.2.9.) und mit Ponceau (2.2.10.) gefärbt. Die NIa-Proteasebande wurde ausgeschnitten und für 2 h bei 37 °C in 2 % Blotto in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen inkubiert. Der weitere Ablauf entsprach 2.4.6. mit Änderungen. Die Elution der scFv-Phagen erfolgte mit 3 ml 0,1 M pH 2,2 Glycin (mit HCl eingestellt) + 1 % BSA für 10 min und die Neutralisation mit 300 µl 1M Tris/HCl

pH 9,1. Es wurden 1,65 ml der eluierten scFv-Phagen in die Amplifikation der scFv-Phagen eingesetzt.

2.4.8. Produktion von lösliche scFvs und Isolation der periplasmatischen Fraktion aus *E.coli*

Mit dem Wirtsbakterium HB2151 ist es möglich, lösliche scFvs zu produzieren. Die löslichen scFvs wurden mit Modifikationen nach Hawlisch et al. (1998) exprimiert und die periplasmatische Fraktion nach Koshland und Botstein (1980) isoliert. Hierzu wurden 50 ml LB-Medium mit HB2151 inokuliert und bei 37°C und 150-200 bis OD₆₀₀ 0,5 gezogen. 2 ml Bakterien (1×10^9 Bakterien) wurden mit 2×10^{10} der gewünschten scFv-Phagen infiziert und 30 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. 500 ml LB-Medium + 100 µg/ ml Ampicillin wurden mit den 2 ml infizierten Bakterien angeimpft, bei 37 °C und 150-200 Upm bis OD₆₀₀ 0,2 gezogen. Es wurde 1 mM IPTG hinzugefügt und bei 30 °C und 150-200 Upm über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde für 5 min auf Eis gestellt und anschließend im GS3-Zentrifugenbehälter bei 4200 xg für 8 min und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 160 ml Waschlösung (10 mM Tris-HCl pH7,8, 40 mM NaCl) resuspendiert und bei 4200 xg für 8 min und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 160 ml (Saccharose-Puffer 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 20 % Saccharose, 2 mM EDTA) aufgenommen, für 10 min bei RT inkubiert und bei erneut bei 4200 xg für 8 min und 4°C zentrifugiert. Die periplasmatische Fraktion wurde mittels osmotischem Schock durch Lösen des Pellets in 20 ml dH₂O und Inkubation für 10 min auf Eis freigesetzt. Die Lösung wurde in ein SS34-Röhrchen umgefüllt und bei 11950 xg für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.5. Computerunterstützung Bearbeitung und Auswertung von Nukleotid- und Polypeptidsequenzen

Plasmidsequenzen wurden mittels der Software VectorNTI der Firma Informax, Inc. (USA) bearbeitet. Vergleiche von homologen Nukleotidsequenzen wurden mit der Software „ClustalW“ (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) online auf den Webseiten des European

Bioinformatics Institute des EMBL durchgeführt (Thompson *et al.* 1997). Sequenzierungen wurden mit der Onlinesoftware „DIALIGN2.1“ der Universität Bielefeld (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign>) mit denen am Computer konstruierten Sequenzen verglichen (Morgenstern 1999). Die Vergleiche der Aminosäuresequenzen der N1a-Protease wurden mit dem Programm „Lasergene 5“ (DNA Star Inc.) durchgeführt. Für die Suche nach homologen Sequenzen wurde „Fasta3“ (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>) des European Bioinformatics Institute des EMBL eingesetzt (Pearson 1990). Die Suche nach Nukleotidsequenzen wurde mit „Entrez“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>) durchgeführt. Die Molekulargewichte von Polypeptiden wurden mittels „SAPS“ (http://www.isrec.isb-sib.ch/software/SAPS_form.html) ermittelt (Brendel *et al.* 1992). Die Kabatnumerierung (Kabat *et al.* 1987) von scFvs wurden mittels der Software „AbCheck-Antibody Sequence Test“ (<http://www.rubic.rdg.ac.uk/~andrew/bioinf.org/abs/seqtest.html>) ermittelt. Die CDRs von Antikörpern wurden mittels Vergleich mit den V_H und V_L Beispielen von „WAMpredict“ der Web Antibody Modelling Homepage der University of Bath (<https://antibody.bath.ac.uk/WAMpredict.html>) bestimmt. Die Signalintensität der Dot-Blots wurde densitometrisch mit der Software Scanpack II (Biometra, Göttingen) gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. Expression der NIa-Protease in *E.coli*

3.1.1. Konstruktion der Plasmide zur Überexpression des NIa

Die Grundlage für das *in vivo* Panning und des „klassischen“ Pannings war die Überexpression des NIa in *E.coli*. Zusätzlich mußte für das *in vivo* Panning die NIa-Protease im bakteriellen System zur Prozessierung fähig sein. Das *nia*-Gen lag codiert auf dem Plasmid pEXNIa (Abb. 3.1.A) vor. Das Plasmid enthielt die cDNA des PPV von der Mitte des zylindrischen Einschlußkörpers (CI) bis zum Kerneinschlußkörper b (NIb) (Position 5531-7239 des PPV). Für die Expression des NIa wurde das *nia*-Gen in pET32a(+) (Abb. 3.1.B) umkloniert. Dieser Vektor besitzt einen T7-Promotor (Chamberlin *et al.* 1970; Dunn und Studier 1983). Die T7-Polymerase, unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors, wird vom Wirtsbakterium BLR(DE3) codiert.

Das *nia*-Gen wurde aus pEXNIa vom VPg ausgehend ohne NIa-Site bis zum Ende der NIa-Protease (ohne die Aminosäuren VYTQS der C-terminalen NIa-Site) mit den Primern MHNiA_f2 und MHNiA_r3 bei einer Anlagerungstemperatur von 52 °C für die Konstruktion von pETMHNiA (Abb. 3.1. C) amplifiziert. Für die Konstruktion des Plasmids pETMHNiA2 (Abb. 3.1. D) wurde das *nia*-Gen aus pEXNIa beginnend mit der N-terminalen NIa-Site vor dem VPg bis zum Ende der NIa-Protease mit den Primern MHNiA_f3 und MHNiA_r3 bei einer Anlagerungstemperatur von 60 °C amplifiziert. Die PCR-Produkte für pETMHNiA (1321 bp) und pETMHNiA2 (1339 bp) wurden zwischen *NcoI* und *HindIII* hinter die Tags von pET32 a(+) ligiert. Die Transformation von XL1-Blue wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern ETMHNiA_f und TBMHNiA_r2 bei einer Anlagerungstemperatur von 60 °C kontrolliert und die Amplifikate von pETMHNiA (1107 bp) und pETMHNiA2 (1125 bp) sequenziert. Die Plasmide wurden anschließend für die Expression der Fusionsproteine in BLR(DE3) umtransformiert.

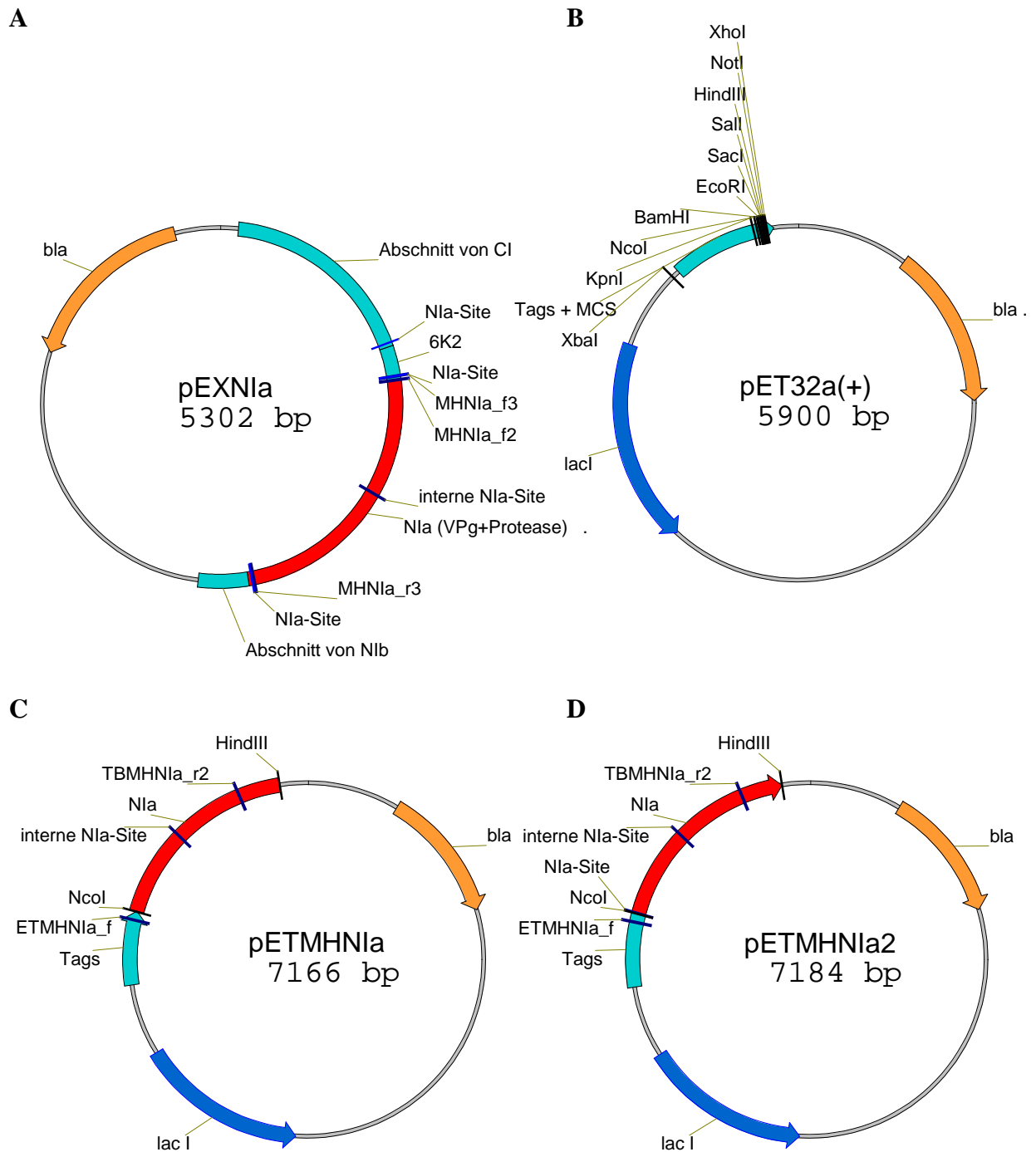


Abb. 3.1. Übersicht über die Plasmide pEXNIa (A), pET32a(+) (B), pETMHNla (C) und pETMHNla2 (D).

A: Das Plasmid pEXNIa mit den Primerbindestellen für die Amplifikation des *nia*-Gens zur Konstruktion der Plasmide pETMHNla und pETMHNla2. B: Der Vektor pET32a(+) mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen. C: Das Plasmid pETMHNla enthält keine NIa-Site zwischen den Tags und dem NIa. D: Das Plasmid pETMHNla2 enthält die N-terminale NIa-Site zwischen den Tags und dem NIa.

3.1.2. Überexpression und Nachweis der Prozessierungsprodukte der NIa-Protease

Um die Prozessierung des Fusionsproteins aus Tags (Trx-Tag, His-Tag, S-Tag) und NIa mittels der NIa-Protease zu untersuchen, wurden die Fusionsproteine, codiert auf BLR(DE3)-pETMHNiA und BLR(DE3)-pETMHNiA2, überexprimiert. Das Wirtsbakterium BLR(DE3) ohne Plasmid diente als Kontrolle. Die Induktion des T7-Promotors erfolgte mit 1 mM IPTG über Nacht bei 30 °C. Die Überexpression wurde mittels 12 % SDS-PAGE und Immunfärbung des His-Tags kontrolliert (Abb.3.2.).

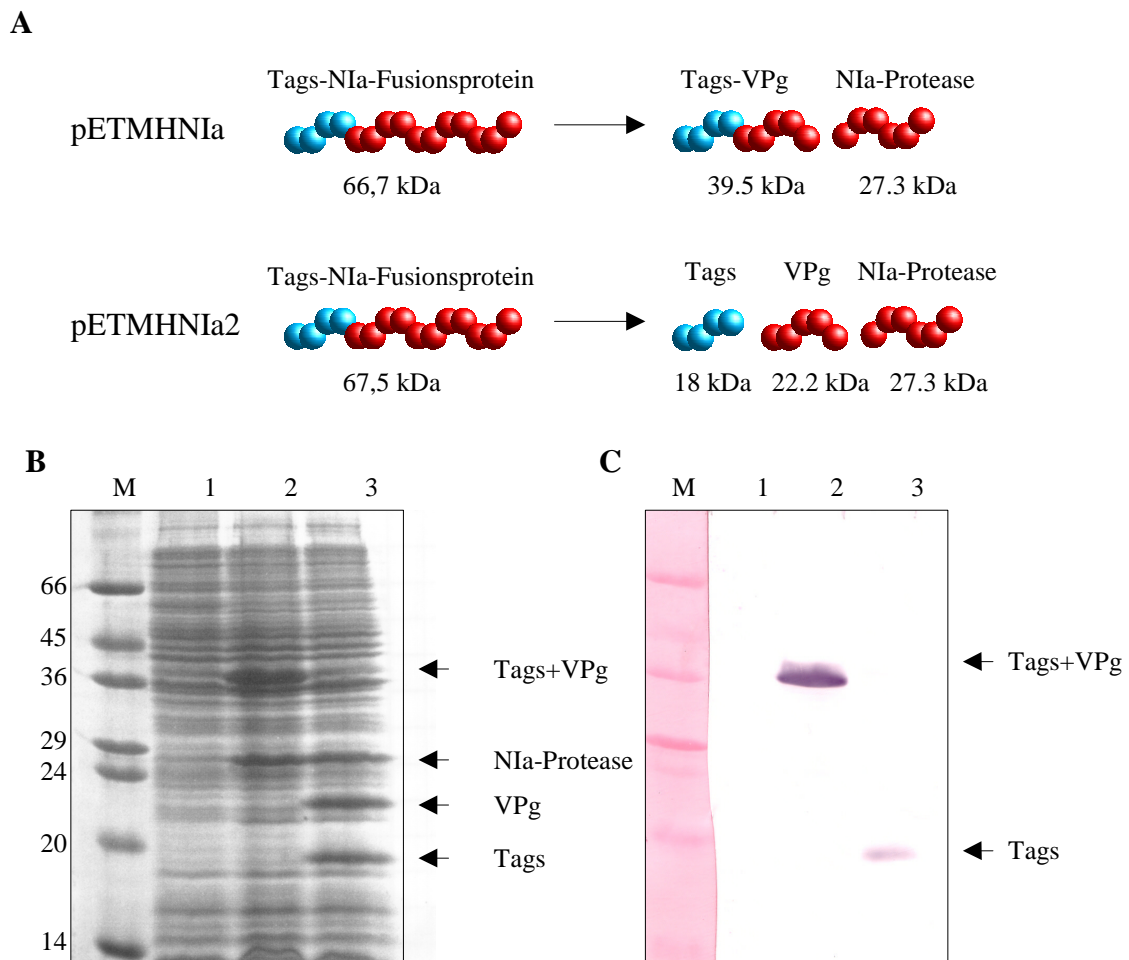


Abb. 3.2. Prozessierung der Fusionsproteine (A), SDS-PAGE der Überexpression von BLR(DE3)-pETMHNiA und BLR(DE3)-pETMHNiA (B) und Immunfärbung des His-Tags (C). Abbildung A zeigt die erwarteten Proteine und Prozessierungsschritte bei der Überexpression von BLR(DE3)-pETMHNiA und BLR(DE3)-pETMHNiA2. Abbildung B zeigt eine Coomassie gefärbte 12 % SDS-PAGE und Abbildung C die Immunfärbung des His-Tags (Maus α -His-Tag 1:2000 in Blotto, Kaninchen α -Maus IgG AP 1:1000 in Blotto). Es wurden jeweils 4 μ l IPTG induzierte Gesamtproteinextrakte auf das Gel aufgetragen. Spur 1: BLR(DE3), Spur 2: BLR(DE3)-pETMHNiA, Spur 3: BLR(DE3)-pETMHNiA2.

Beim Bakterium BLR(DE3)-pETMHNiA waren zwei überexprimierte Proteine in der SDS-PAGE sichtbar, die 27,3 kDa NIa-Protease und das 39,5 kDa Tags-VPg Fusionsprotein. Das Fusionsprotein und seine Prozessierungsprodukte konnten nicht in der löslichen Fraktion (Überstand), sondern nur in der unlöslichen Fraktion (Pellet) in der SDS-PAGE nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt). Durch die Immunfärbung des His-Tags konnte das Tags-VPg Fusionsprotein nachgewiesen werden. Beim Bakterium BLR(DE3)-pETMHNiA2 waren drei überexprimierte Proteine in der SDS-PAGE sichtbar, die 27,3 kDa NIa-Protease, das 22,2 kDa VPg und die 18 kDa Tags. Durch die Immunfärbung des His-Tags konnten die Tags nachgewiesen werden. In der Kontrolle BLR(DE3) war kein überexprimiertes Polypeptid zu sehen, auch in der Immunfärbung konnte kein His-Tag nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen folgt, daß die rekombinante NIa-Protease in *E.coli* aktiv und zur Prozessierung fähig ist.

3.2. *in vivo* Panning

Als eine Alternative zum „klassischen“ Panning wurde versucht, ein *in vivo* Panning-System zu entwickeln. Hierzu war es nötig, das *nia*-Gen mit einem visuellem Marker-Gen (GFP, α -Komplement der β -Galaktosidase) zu koppeln. Es entsteht so ein Fusionsprotein aus dem NIa und dem Marker mit der Erkennungssequenz der NIa-Protease zwischen den beiden Teilen des Fusionsproteins. Wenn die NIa-Protease aktiv ist, soll der Marker mittels der cis-Prozessierung freigesetzt und phänotypisch sichtbar werden. Mit diesen Plasmiden transformierte *E.coli* HB2151 sollen mit den scFv-Phagen der „Griffin1. library“ infiziert werden. Die Bakterien, in denen ein scFv die Aktivität der NIa-Protease inhibiert, sollten anhand ihres Phänotyps (der Marker wird nicht mehr ausgeprägt) identifiziert werden.

3.2.1. Konstruktion der Plasmide auf der Basis des Vektors pTrueBlue

Für das *in vivo* Panning wurden Plasmide auf der Basis des Vektors pTrueBlue (Slilaty und Lebel 1998) konstruiert. Der Vektor pTrueBlue enthielt das α -Komplement der β -Galaktosidase unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors (Langley *et al.* 1975). Die β -

Galaktosidase kann neben dem natürlichen Substrat Laktose auch die Substanz X-Gal spalten. Hierbei entsteht ein blauer Farbstoff. Es wurde untersucht, ob das Fusionsprotein aus NIa und α -Komplement in der Lage war, die Komplementation mit dem α -Akzeptor zur funktionsfähigen β -Galaktosidase durchzuführen. Wenn dies nur dann der Fall war, wenn die NIa-Site vorhanden war und das α -Komplement durch die Aktivität der Protease freigesetzt wurde, konnten die Plasmide für das *in vivo* Panning genutzt werden.

3.2.1.1. Konstruktion der Plasmide pTBMHNIa1 bis pTBMHNIa4

Das *nia*-Gen wurde aus pEXNIa mit den benötigten Schnittstellen amplifiziert (Tab. 3.1.). Die PCR-Produkte wurden in pTrueBlue (Abb. 3.3. A) vor (pTBMHNIa1/ pTBMHNIa2), bzw. hinter (pTBMHNIa3/ pTBMHNIa4) das α -Komplement ligiert. Die Transformation von XL1-Blue wurde mittels Kolonie-PCR kontrolliert und die Amplifikate sequenziert (Tab. 3.2.). Die Plasmide pTBMHNIa1 (Abb. 3.3. B) und pTBMHNIa3 (Abb. 3.4. A) enthalten keine NIa-Site zwischen dem α -Komplement und dem NIa. Sie sind die Kontrollplasmide zu pTBMHNIa2 (Abb. 3.3. C) und pTBMHNIa4 (Abb. 3.4. B), die die NIa-Site enthalten. Das Plasmid pTBMHNIa2 enthält die C-terminale (NIa/NIb) NIa-Site und pTBMHNIa4 die N-terminale (6K2/NIa) NIa-Site.

Plasmid	Primer für Amplifikation des <i>Nla</i> -Gens	Anlagerungs-temperatur	PCR-Produkt [bp]	Schnittstellen für Klonierung
pTBMHNIa1	MHNIa_f3 / MHNIa_r5	58 °C	1341	<i>NcoI, ApaI</i>
pTBMHNIa2	MHNIa_f3 / MHNIa_r4	58 °C	1353	
pTBMHNIa3	MHNIa_f8 / MHNIa_r9	62 °C	1327	<i>BssHIII, HindIII</i>
pTBMHNIa4	MHNIa_f7 / MHNIa_r9	62 °C	1345	

Tab. 3.1. Übersicht über die PCR-Bedingungen und Schnittstellen für die Konstruktion von pTBMHNIa1, pTBMHNIa2, pTBMHNIa3 und pTBMHNIa4

Plasmid	Primer für die Kolonie-PCR	Anlagerungs-temperatur	PCR-Produkt [bp]
pTBMHNIa1	MHLacPromotor / TBMHNIa_r	56 °C	1415
pTBMHNIa2	MHLacPromotor / TBMHNIa_r		1427
pTBMHNIa3	MHLacPromotor / MHORIf1_r	56 °C	1631
pTBMHNIa4	MHLacPromotor / MHORIf1_r		1649

Tab. 3.2. Übersicht über die PCR-Bedingungen der Kolonie-PCR/ Sequenzierung von pTBMHNIa1, pTBMHNIa2, pTBMHNIa3 und pTBMHNIa4

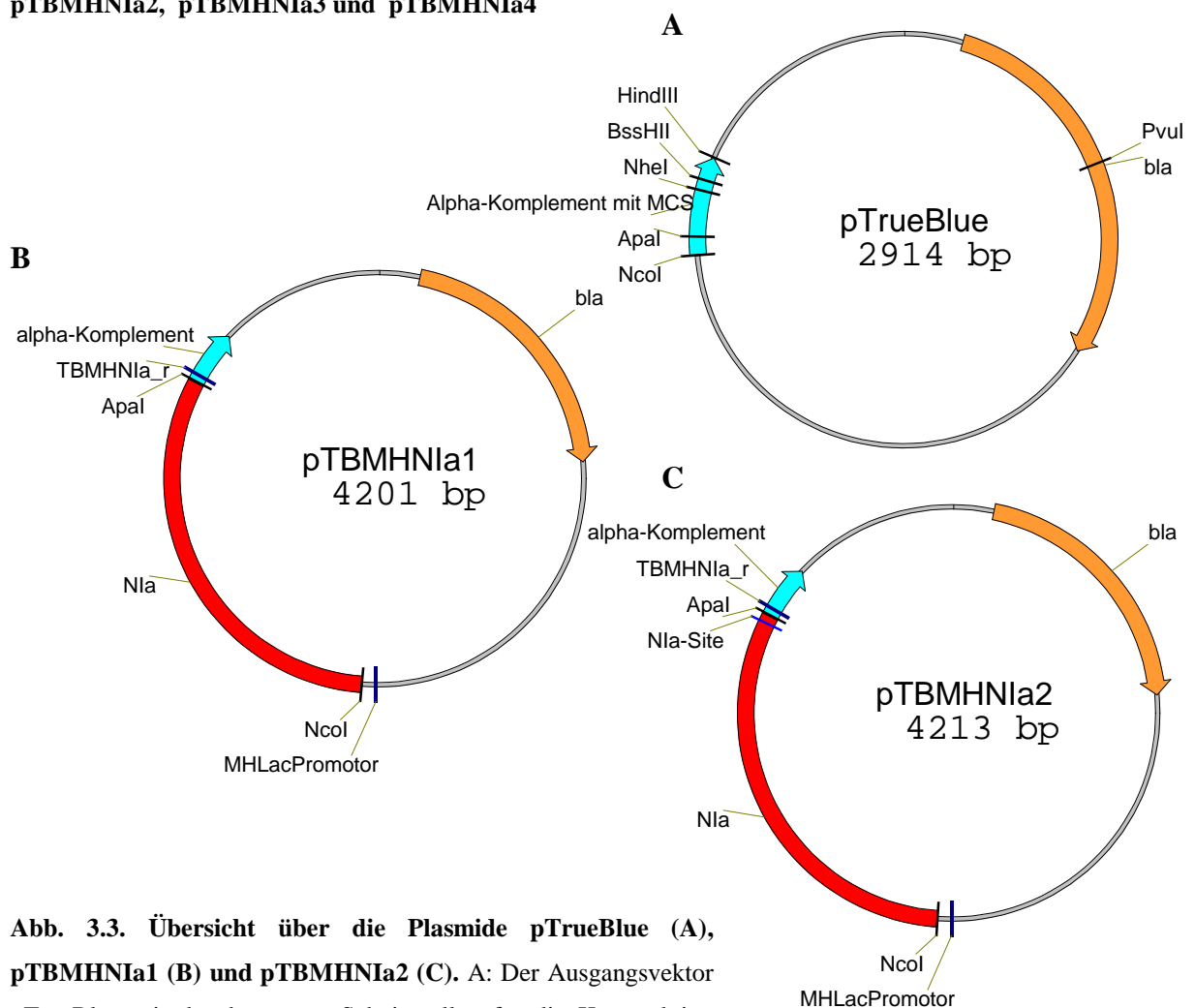


Abb. 3.3. Übersicht über die Plasmide pTrueBlue (A), pTBMHNIa1 (B) und pTBMHNIa2 (C). A: Der Ausgangsvektor pTrueBlue mit den benutzten Schnittstellen für die Konstruktion von pTBMHNIa1. B: Das Plasmid pTBMHNIa1 enthält das *nia*-Gen ohne Nla-Site vor dem α -Komplement. pTBMHNIa1 ist das Kontrollplasmid zu pTBMHNIa2. C: Das Plasmid pTBMHNIa2 enthält das *nia*-Gen mit der C-terminalen Nla-Site vor dem α -Komplement.

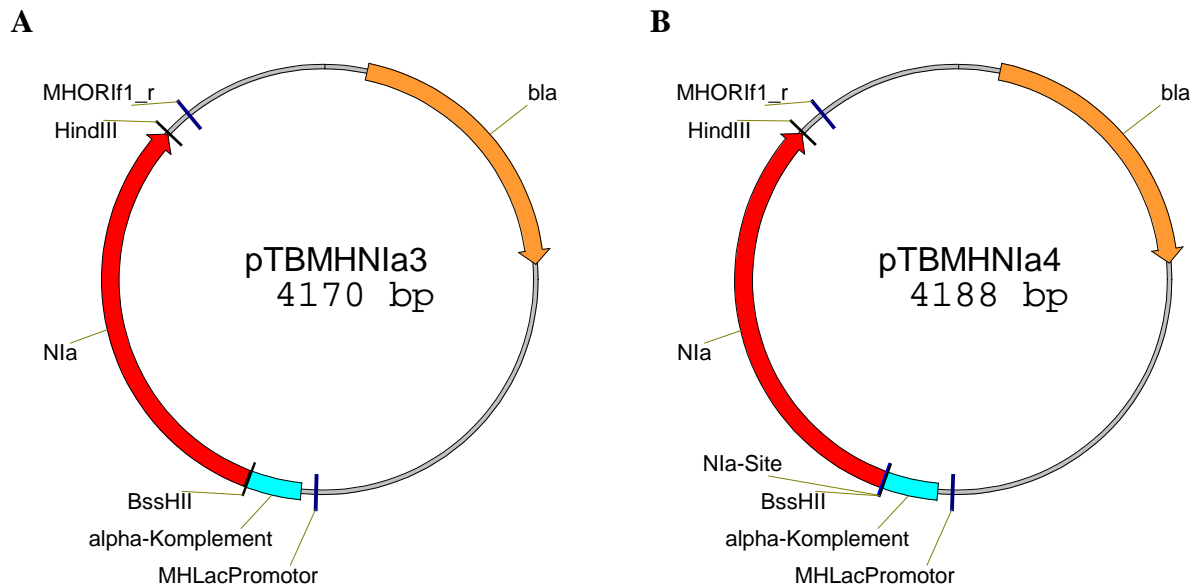


Abb. 3.4. Übersicht über die Plasmide pTBMHNIa3 (A) und pTBMHNIa4 (B). A: Das Plasmid pTBMHNIa3 enthält das *nia*-Gen ohne Nla-Site hinter dem α -Komplement. pTBMHNIa3 ist das Kontrollplasmid zu pTBMHNIa4. B: Das Plasmid pTBMHNIa4 enthält das *nia*-Gen mit der N-terminalen Nla-Site hinter dem α -Komplement.

3.2.1.2. pTBMHNIa5

Mit diesem Plasmid wurde überprüft, ob es möglich ist, die Nla-Site direkt in das α -Komplement zu integrieren. Hierzu wurde beginnend mit der Restriktionsschnittstelle *NheI* ein Abschnitt des Vektors pTrueBlue mit den Primern MHNla_f9 und MHNla_r10 bei einer Anlagerungstemperatur von 53 °C amplifiziert, wobei im Primer MHNla_f9 die N-terminale (6K2/Nla) Nla-Site integriert war. Das PCR-Produkt (1204 bp) wurde in pTrueBlue zwischen *NheI* und *PvuI* in das α -Komplement, direkt hinter die „100% accuracy position“ (Integrationen in diesem Bereich führen zu 100 % zu einer Inaktivierung des α -Komplements (Slilaty und Lebel 1998)), ligiert. Die Transformation von XL1-Blue wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern TBMHNIa_f2 und MHNla_r10 bei einer Anlagerungstemperatur von 50 °C kontrolliert (1188 bp). Mit den Primer MHLacPromotor und MHNla_r10 wurde ein Abschnitt von pTBMHNIa5 (Abb. 3.6.) bei einer Anlagerungstemperatur von 56 °C amplifiziert und das PCR-Produkt (1390 bp) sequenziert.

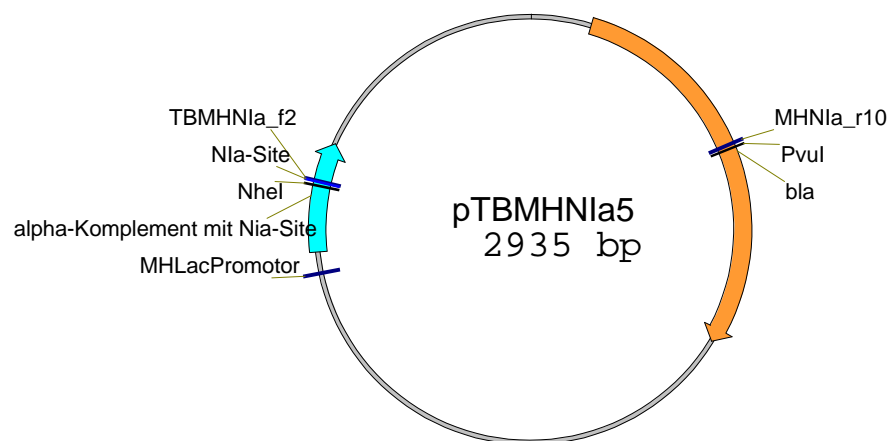


Abb. 3.6. pTBMHNIa5. In das Plasmid wurde die Nla-Site in das α -Komplement integriert.

3.2.2. Auswertung der Plasmide auf Basis des Vektors pTrueBlue

Die Bakterien XL1-Blue-pTBMHNIa1, XL1-Blue-pTBMHNIa2, XL1-Blue-pTBMHNIa3, XL1-Blue-pTBMHNIa4 und XL1-Blue-pTBMHNIa5 wurden auf LB + Amp + IPTG + X-Gal ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle dargestellt:

Bakterien	erwartete Koloniefarbe	beobachtete Koloniefarbe
XL1-Blue-pTBMHNIa1	weiß	weiß/blau
XL1-Blue-pTBMHNIa2	blau	weiß/blau
XL1-Blue-pTBMHNIa3	weiß	weiß/blau
XL1-Blue-pTBMHNIa4	blau	weiß/blau
XL1-Blue-pTBMHNIa5	blau	weiß

Tab. 3.3. Auswertung der Plasmide auf Basis des Vektors pTrueBlue.

Es waren jeweils mehr als 100 Kolonien auf den Agarplatten. Die Kolonien waren weder eindeutig weiß noch eindeutig blau gefärbt. Die Farbe der Bakterienkolonien ermöglichte keine Unterscheidung zwischen den Kontrollplasmiden und den gegebenenfalls für das *in vivo* Panning nutzbaren Plasmiden. Bei XL1-Blue-pTBMHNIa5 wurde durch die Integration der Nla-Site das α -Komplement inaktiviert.

Die Plasmide auf der Basis von pTrueBlue konnten somit nicht für ein *in vivo* Panning genutzt werden.

3.2.3. Plasmide auf der Basis des Vektors pHNT

Für das *in vivo* Panning wurden neben den Plasmiden auf der Basis des Vektors pTrueBlue Plasmide auf Basis des Vektors pHNT konstruiert. Der Vektor pHNT enthält ein für das bakterielle System optimiertes *gfp*-Gen (Kwon *et al.* 1997) unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors. Das *gfp*-Gen codiert für das „green fluorescent protein“ (GFP) von *Aequorea victoria* (Heim *et al.* 1995). Der 5' Abschnitt des ORFs bis *KpnI* enthielt eine unbekannte Nukleotid Sequenz, die zu keiner in EMBL eingetragenen Sequenz homolog war. Das eigentliche *gfp*-Gen begann hinter *KpnI* mit ATG. Es wurde untersucht, ob die Fluoreszenz nur dann auftritt, wenn das GFP aus dem Nla-GFP Fusionsprotein freigesetzt wird.

3.2.3.1. Konstruktion der Plasmide pHNTMHNla1 bis pHNTMHNla4

Das *nia*-Gen wurde aus pEXNla mit den benötigten Schnittstellen amplifiziert (Tab. 3.4.). Die PCR-Produkte wurden in pHNT (Abb. 3.7. A) vor (pHNTMHNla1/ pHNTMHNla2), bzw. hinter (pHNTMHNla3/ pHNTMHNla4) das GFP ligiert. Die Transformation von XL1-Blue wurde mittels Kolonie-PCR kontrolliert und die Amplifikate sequenziert (Tab. 3.5.). Die Plasmide pHNTMHNla1 (Abb. 3.7. B) und pHNTMHNla3 (Abb. 3.8. A) enthalten keine Nla-Site zwischen dem GFP und dem Nla. Sie sind die Kontrollplasmide für pHNTMHNla2 (Abb. 3.7. C) und pHNTMHNla4 (Abb. 3.8. B), die die C-terminale, bzw. N-terminale Nla-Site enthalten.

Plasmid	Primer für Amplifikation des <i>Nla</i> -Gens	Anlagerungs-temperatur	PCR-Produkt [bp]	Schnittstellen für Klonierung
pHNTMHNla1	MHNla_f4 / MHNla_r7	58 °C	1330	<i>HindIII, KpnI</i>
pHNTMHNla2	MHNla_f4 / MHNla_r6	58 °C	1351	
pHNTMHNla3	MHNla_f6 / MHNla_r8	62 °C	1333	<i>SacI, SpeI</i>
pHNTMHNla4	MHNla_f5 / MHNla_r8	62 °C	1351	

Tab. 3.4. Übersicht über die PCR-Bedingungen und Schnittstellen für die Konstruktion von pHNTMHNla1, pHNTMHNla2, pHNTMHNla3 und pHNTMHNla4

Plasmid	Primer für die Kolonie-PCR	Anlagerungs-temperatur	PCR-Produkt [bp]
pHNTMHNIa1	MHLacPromotor / MHGFP_r2	52 °C	1411
pHNTMHNIa2	MHLacPromotor / MHGFP_r2		1432
pHNTMHNIa3	MHGFP_f2 / HNTMHNIa_r	64 °C	1489
pHNTMHNIa4	MHGFP_f2 / HNTMHNIa_r		1507

Tab. 3.5. Übersicht über die PCR-Bedingungen der Kolonie-PCR/ Sequenzierung von pHNTMHNIa1, pHNTMHNIa2, pHNTMHNIa3 und pHNTMHNIa4

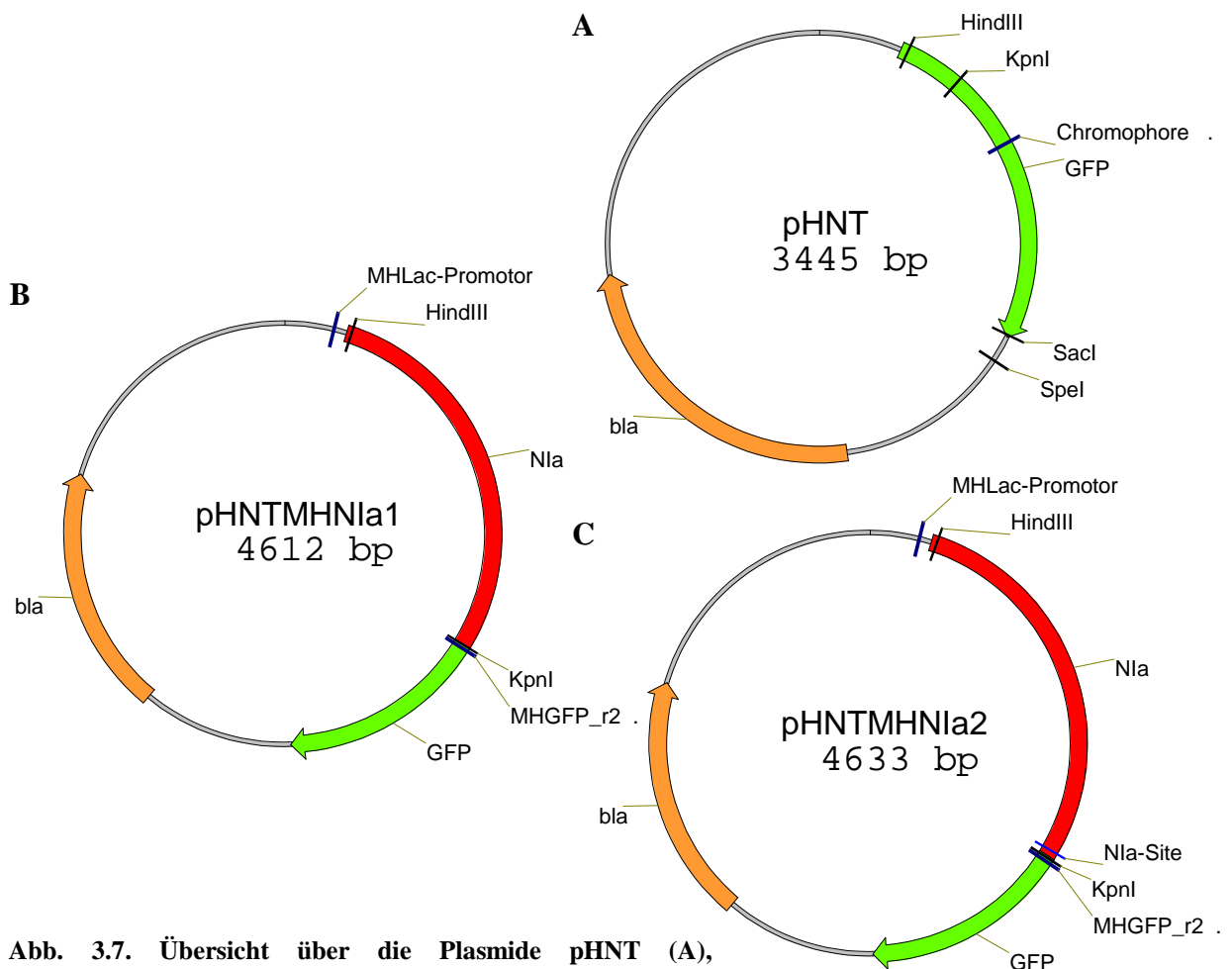


Abb. 3.7. Übersicht über die Plasmide pHNT (A), pHNTMHNIa1 (B) und pHNTMHNIa2 (C). A: Der

baugrunder Schritt ist die Konstruktion von pHNTMHNIa1 bis pHNTMHNIa5. B: Das Plasmid pHNTMHNIa1 enthält das *nia*-Gen ohne Nla-Site vor dem GFP. pHNTMHNIa1 ist das Kontrollplasmid zu pHNTMHNIa2. C: Das Plasmid pHNTMHNIa2 enthält das *nia*-Gen mit der C-terminalen Nla-Site vor dem GFP.

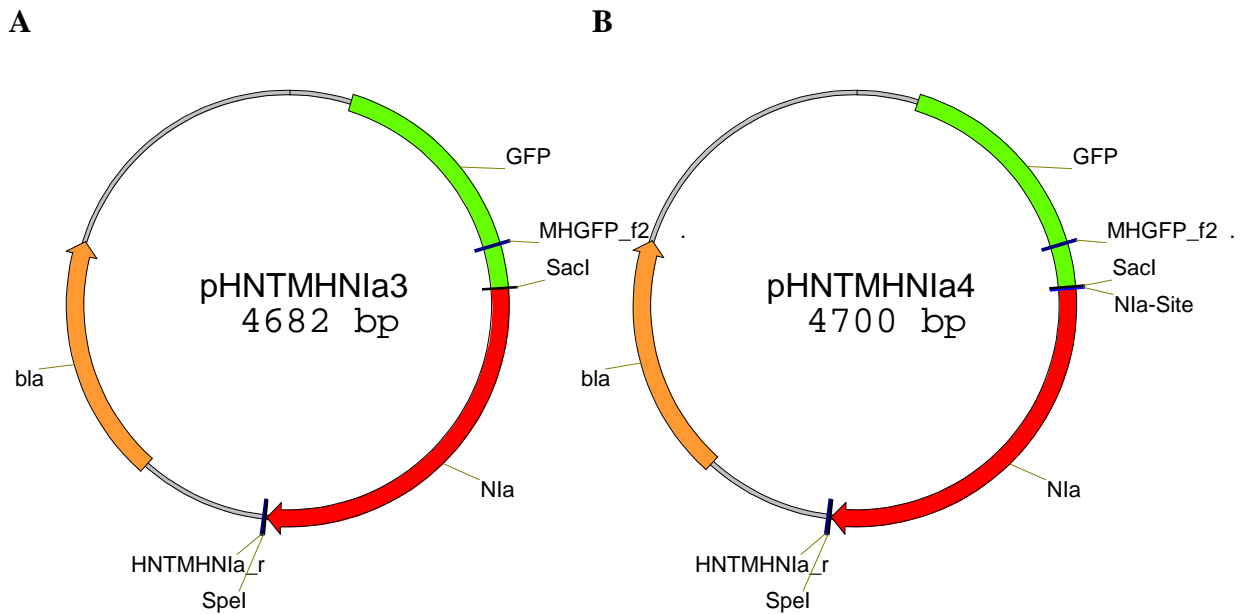


Abb. 3.8. Übersicht über die Plasmide pHNTMHNia3 (A) und pHNTMHNia4 (B). A: Das Plasmid pHNTMHNia3 enthält das *nia*-Gen ohne Nla-Site hinter dem GFP. pHNTMHNia3 ist das Kontrollplasmid zu pHNTMHNia4. B: Das Plasmid pHNTMHNia4 enthält das *nia*-Gen mit der N-terminalen Nla-Site hinter dem GFP.

3.2.3.2. pHNTMHNia5

Mit diesem Plasmid wurde überprüft, ob es möglich ist, die Nla-Site direkt in das GFP zu integrieren. Um die Nla-Site zu generieren, wurden vier Basenpaare an den Positionen 1069-1072 und drei Basenpaare an den Positionen 1075-1077 des Plasmids pHNT ausgetauscht. Dies führte zur Änderung der Aminosäuren 225-227 von TAA zu YTQ, so daß aus der Aminosäuresequenz EFVTAAG die Nla-Site EFVYTQ*G wurde. Dies ist eine künstliche Nla-Site, die ersten 6 Aminosäuren entsprechen der C-terminalen Nla-Site EFVYTQ*S, die letzte Aminosäure der C-terminalen Nla-Site EEVIHQ*G. Hierzu wurde, beginnend mit der Restriktionsschnittstelle *HindIII*, ein Abschnitt des Vektors pHNT mit den Primern MHHNT_f und MHHNT_r bei einer Anlagerungstemperatur von 56 °C amplifiziert, wobei im Primer MHHNT_r die Sequenzänderungen integriert waren. Das PCR-Produkt (882 bp) wurde in pHNT zwischen *HindIII* und *SacI* ligiert. Die Transformation von XL1-Blue wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern MHHNT_f und MHHNT_r2 bei einer Anlagerungstemperatur von 50 °C kontrolliert (858 bp). Mit den Primern MHLacPromotor

und HNTMHNIa_r wurde ein Abschnitt von pHNTMHNIa5 (Abb. 3.9.) bei einer Anlagerungstemperatur von 56 °C amplifiziert und das PCR-Produkt (1022 bp) sequenziert.

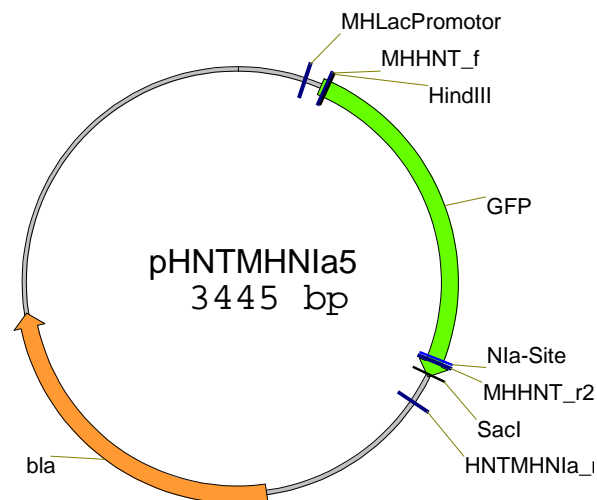


Abb. 3.9. pHNTMHNIa5. Die Aminosäuresequenz des GFPs wurde C-terminal so verändert, daß die Nla-Site entstand.

3.2.4. Auswertung der Plasmide auf Basis des Vektors pHNT

Die Plasmide pHNTMHNIa1 bis pHNTMHNIa5 wurden in NM522 umtransformiert. Die Bakterien wurden auf LB + Amp ausgestrichen und für mindestens 24 h bei 30 °C inkubiert.

Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle dargestellt:

Bakterien	erwartete Fluoreszenz	beobachtete Fluoreszenz
NM522-pHNT	grün	grün
NM522-pHNTMHNIa1	keine	keine
NM522-pHNTMHNIa2	grün	grün
NM522-pHNTMHNIa3	keine	keine
NM522-pHNTMHNIa4	grün	sehr schwach grün
NM522-pHNTMHNIa5	grün	keine

Tab. 3.6. Auswertung der Plasmide auf Basis des Vektors pHNT

Im Bakterium NM522-pHNTMHNIa2 wurde das GFP aus dem Fusionsprotein freigesetzt und eine starke Fluoreszenz sichtbar, die Kontrolle NM522-pHNTMHNIa1 zeigte keine Fluoreszenz (Abb. 3.10.). Bei NM522-pHNTMHNIa4 kam es nur zu einer schwach sichtbaren

Fluoreszenz. Das Plasmid war somit für ein *in vivo* Panning ungeeignet. Es gelang nicht, die NIa-Site in das GFP zu integrieren, ohne daß das GFP inaktiviert wurde (pHNTMHNIa5).

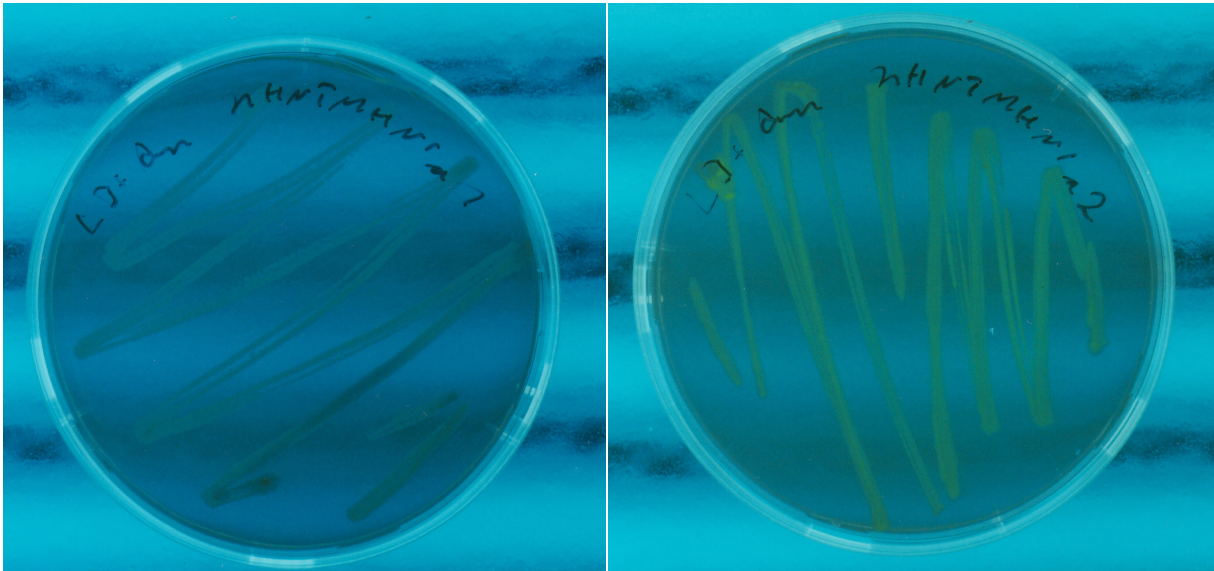
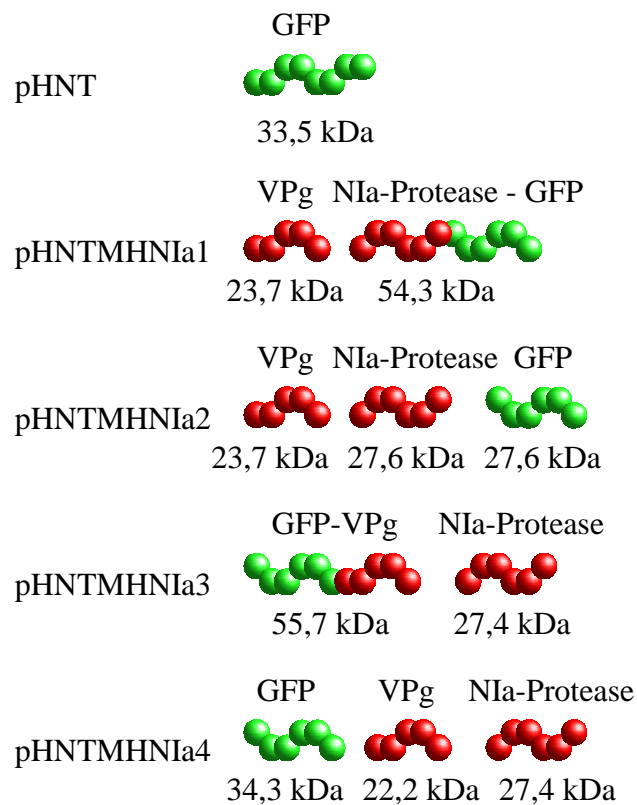


Abb. 3.10. Fluoreszenz des GFPs codiert auf pHNTMHNIa1 und pHNTMHNIa2. NM522-pHNTMHNIa1 und NM522-pHNTMHNIa2 wurden auf LB + Ampicillin (100 µg/ml) Agar ausplattiert und für 24 h bei 30 °C inkubiert.

Wurde die Inkubation bei 37 °C durchgeführt, war die Fluoreszenz bei NM522-pHNTMHNIa2 fast nicht mehr vorhanden. Bei 30° C hingegen war die Fluoreszenz bei NM522-pHNT gering als bei 37 °C.

Es wurde untersucht, ob die beobachtete Fluoreszenz bei den GFP-Konstrukten mit den Ergebnissen der Immunfärbung des GFPs übereinstimmt. Hierzu wurden die Bakterien in LB + Amp Medium für 29 h bei 30 °C inkubiert und das Gesamtprotein aus 2 ml Kultur extrahiert. Die Expression des GFPs. bzw. der Fusionsproteine, wurde mittels 12 % SDS-PAGE des Gesamtproteins und Immunfärbung des GFPs untersucht (Abb. 3.11.). In der SDS-PAGE der Gesamtproteinextrakte der GFP exprimierenden Bakterien sind keine Unterschiede sichtbar, da es sich nicht um eine Überexpression handelt (SDS-PAGE hier nicht gezeigt).

A



B

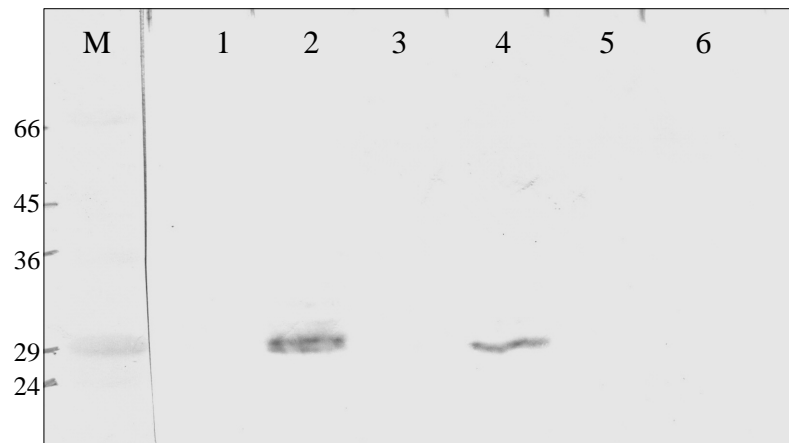


Abb. 3. 11. Prozessierung des Fusionsproteins (A) und Nachweis der Expression des GFPs in den pHNT Konstrukten mittels Immunfärbung (B). Abbildung A zeigt die erwarteten Proteine und Prozessierungsschritte bei der Expression des GFPs in den Bakterien NM522-pHNT und NM522-pHNTMHNIa1 bis NM522-pHNTMHNIa4. Abbildung B zeigt die Immunfärbung des GFPs (Maus α -GFP 1:1000 in Blotto, Kaninchen α -Maus IgG AP 1:2000 in 1xPBS). Es wurden jeweils 25 μ l Gesamtprotein mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF geblotet. Spur 1: NM522, Spur 2: NM522-pHNT, Spur 3: NM522-pHNTMHNIa1, Spur 4: NM522-pHNTMHNIa2, Spur 5: NM522-pHNTMHNIa3, Spur 6: NM522-pHNTMHNIa4

Bei den Bakterien NM522-pHNT und NM522-pHNTMHNiA2 wurde jeweils ein Polypeptid bei 29-30 kDa angefärbt. Beide Bakterien wiesen auch eine starke Fluoreszenz auf. Die Kontrollen NM522, NM522-pHNTMHNiA1 und NM522-pHNTMHNiA3 lieferten kein Signal. Passend zur visuell sehr schwachen Fluoreszenz konnte bei NM522-pHNTMHNiA4 kein exprimiertes GFP nachgewiesen werden. Das GFP auf pHNT sollte größer sein als das aus dem Fusionsprotein freigesetzte GFP von pHNTMHNiA2, dies war in der Immunfärbung aber nicht ersichtlich.

Aus den Ergebnissen folgt, daß das Plasmid pHNTMHNiA2 grundsätzlich für ein *in vivo* Panning geeignet ist.

3.2.5. Plasmide auf der Basis des Vektors pHNT mit pelB-Leitsequenz

Die auf pHEN2 codierten scFvs werden in das Periplasma transportiert. Damit der gesuchte scFv mit der NiA-Protease interagieren kann, muß das Fusionsprotein aus GFP und NiA in das Periplasma transportiert werden. Hierzu wurde die pelB Leitsequenz (Lei *et al.* 1987) vor das GFP von pHNT, bzw. Fusionsprotein von pHNTMHNiA1 und pHNTMHNiA2, kloniert.

Es wurde beginnend mit der Restriktionsschnittstelle *AatII* ein Abschnitt des Vektors pHNT mit den Primern MHHNT_pelB_f und MHHNT_pelB_r bei einer Anlagerungstemperatur von 64 °C amplifiziert, wobei im Primer MHHNT_pelB_r die pelB-Sequenz integriert war. Das PCR-Produkt (1791 bp) wurde in pHNT zwischen *AatII* und *HindIII* vor das GFP von pHNT, pHNTMHNiA1 und pHNTMHNiA2 ligiert. Die Transformation von NM522 wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern MHHNT_pelB_f2 und MHGFP_r2 bei einer Anlagerungstemperatur von 52 °C kontrolliert (243 bp bei pHNT_pelB, 1410 bp bei pHNTMHNiA1_pelB und 1431 bp bei pHNTMHNiA2_pelB). Mit den Primer MHHNT_f2 und MHGFP_r3 wurde ein Abschnitt von pHNT_pelB (Abb. 3.12. A), pHNTMHNiA1_pelB (Abb. 3.12. B) und pHNTMHNiA2_pelB (Abb. 3.12. C) bei einer Anlagerungstemperatur von 64 °C amplifiziert und die PCR-Produkte (399 bp bei pHNT_pelB, 1566 bp bei pHNTMHNiA1_pelB und 1587 bp bei pHNTMHNiA2_pelB) sequenziert.

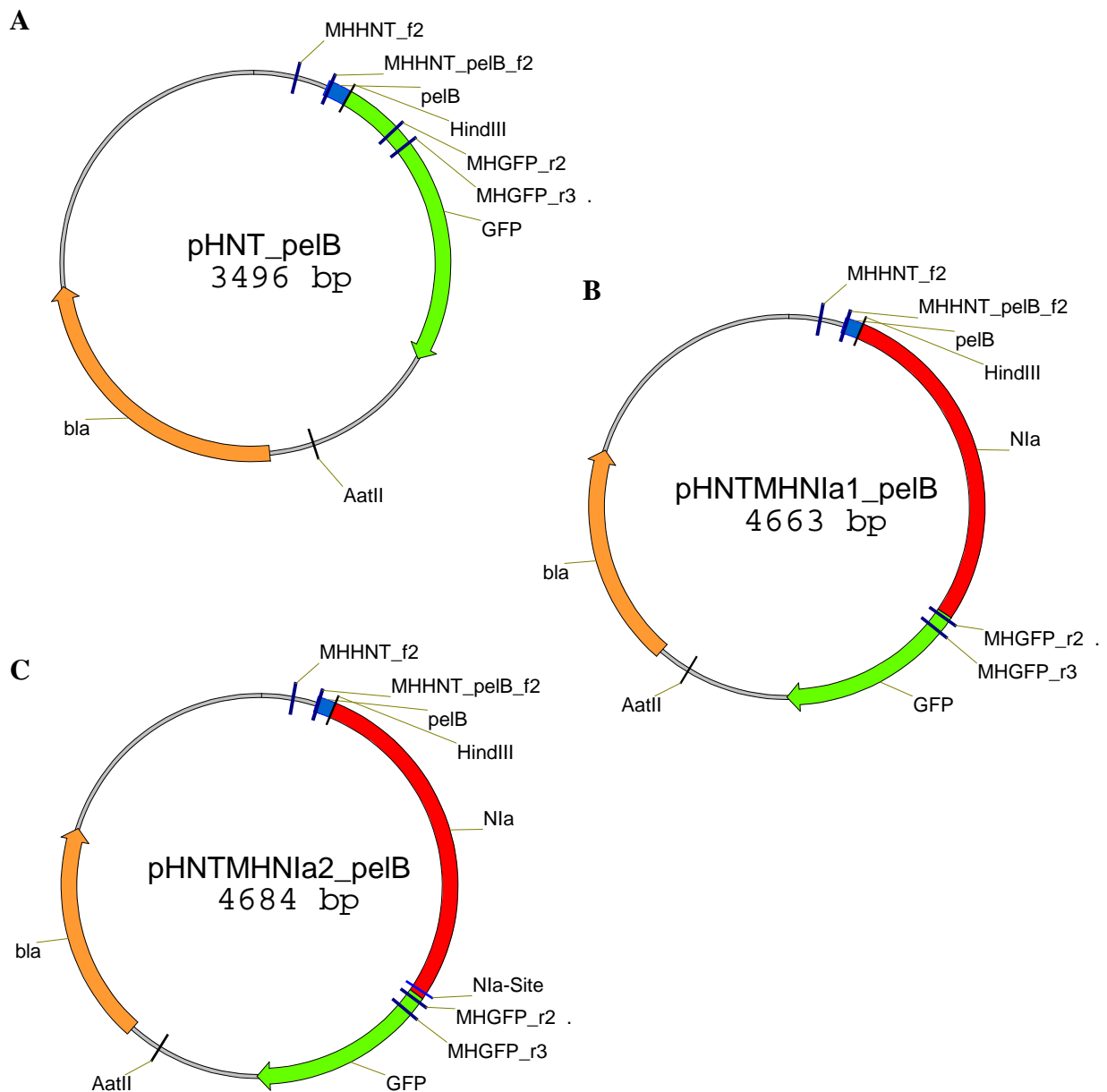


Abb. 3.12. Übersicht über die Plasmide pHNT_pelB (A), pHNTMHNia1_pelB (B) und pHNTMHNia2_pelB (C). A: Der Ausgangsvektor pHNT mit der pelB-Leitsequenz. B: Das Plasmid pHNTMHNia1_pelB enthält das *nia*-Gen ohne Nla-Site vor dem GFP mit pelB-Leitsequenz. pHNTMHNia1_pelB ist das Kontrollplasmid zu pHNTMHNia2_pelB. C: Das Plasmid pHNTMHNia2_pelB enthält das *nia*-Gen mit C-terminaler Nla-Site vor dem GFP mit pelB-Leitsequenz.

3.2.6. Auswertung der Plasmide auf Basis des Vektors pHNT mit pelB-Leitsequenz

Die Bakterien wurden auf LB+Amp ausgestrichen und für mindestens 24 h bei 30 °C inkubiert. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle dargestellt:

Bakterien	erwartete Fluoreszenz	beobachtete Fluoreszenz
NM522-pHNT_pelB	grün	keine
NM522-pHNTMHNIa1_pelB	keine	keine
NM522-pHNTMHNIa2_pelB	grün	schwach grün

Tab. 3.7. Auswertung der Plasmide auf Basis des Vektors pHNT mit pelB-Leitsequenz

Der Transport des GFPs in das Periplasma führte offensichtlich zu einer Inaktivierung des GFPs, mit der Ausnahme NM522-pHNTMHNIa2_pelB, wo eine leichte Fluoreszenz zu beobachten war. Es wurde untersucht, ob die beobachtete Fluoreszenz bei den GFP-Konstrukten mit den Ergebnissen der Immunfärbung des GFPs übereinstimmt. Hierzu wurden die Bakterien in LB + Amp Medium für 29 h bei 30 °C inkubiert und das Gesamtprotein aus 4 ml Kultur extrahiert. Die Expression des GFPs bzw. der Fusionsproteine wurde mittels 12 % SDS-PAGE des Gesamtproteins und Immunfärbung des GFPs untersucht (Abb. 3.13.).

Wie auch in Abb. 3.11. konnte bei den Bakterien NM522-pHNT und NM522-pHNTMHNIa2 das GFP nachgewiesen werden. Obwohl die Fluoreszenz bei NM522-pHNTMHNIa2_pelB schwach war, konnte das GFP immungefärbt werden. Es ist in der Immunfärbung kein GFP bei NM522-pHNT_pelB nachweisbar, dies ist Indiz dafür, daß das GFP im Periplasma inaktiv ist.

Ein *in vivo* Panning mit GFP als Marker kann somit nicht funktionieren, wenn die Interaktion zwischen dem scFv und dem GFP im Periplasma vonstatten gehen soll.

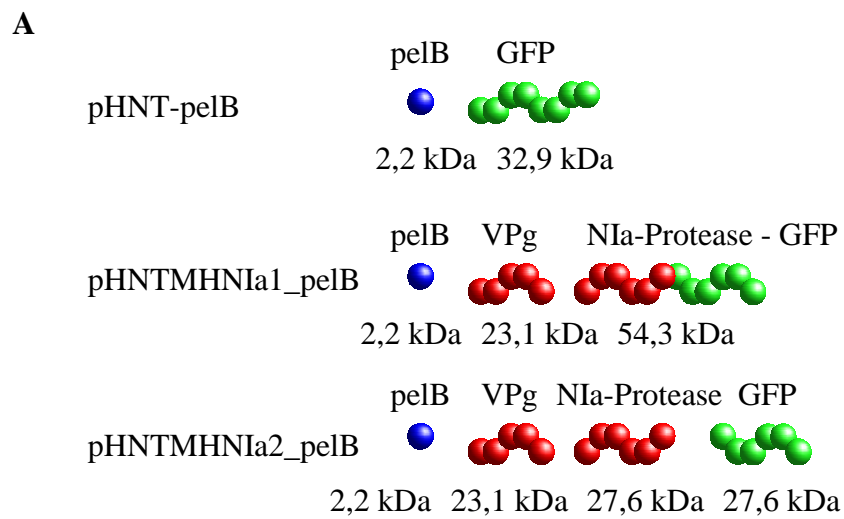
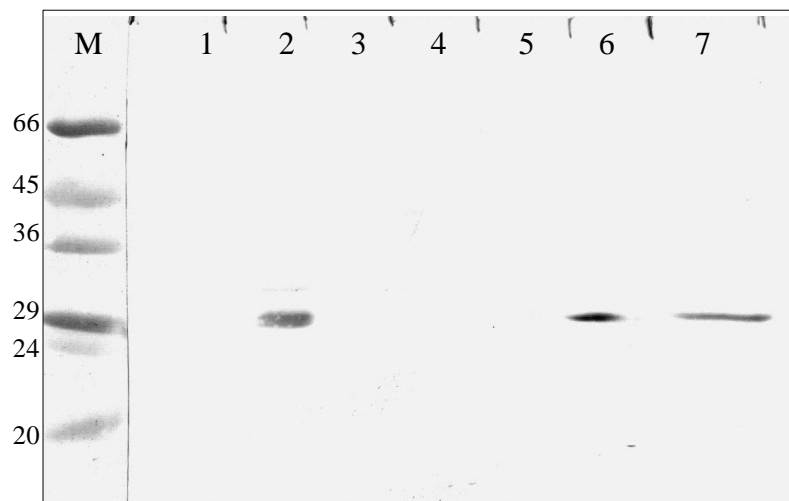
**B**

Abb. 3. 13. Prozessierung der Fusionsproteine (A) und Nachweis der Expression des GFPs in den pHNT-pelB Konstrukten mittels Immunfärbung. Abbildung A zeigt die erwarteten Proteine und Prozessierungsschritte bei der Expression des GFPs der Bakterien NM522-pHNT_pelB, NM522-pHNTMHNIa1_pelB und NM522-pHNTMHNIa2_pelB. Abbildung B zeigt die Immunfärbung des GFPs (Maus α -GFP 1:1000 in Blotto, Kaninchen α -Maus IgG AP 1:2000 in 1xPBS). Es wurden jeweils 30 μ l Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF geblottet. Spur 1: NM522, Spur 2: NM522-pHNT, Spur 3: NM522-pHNT_pelB, Spur 4: NM522-pHNTMHNIa1, Spur 5: NM522-pHNTMHNIa1_pelB, Spur 6: NM522-pHNTMHNIa2, Spur 7: NM522-pHNTMHNIa2_pelB

3.3. Das „klassische“ Panning

3.3.1. Aufreinigung der NIa-Protease

Die NIa-Protease, codiert auf BLR(DE3)-pETMHNiA2 (3.1.1.) unter der Kontrolle eines T7-Promotors, wurde mit 1 mM IPTG über Nacht bei 30 °C induziert und das Gesamtprotein aus einer 50 ml Kultur isoliert.

Für das Panning auf Nitrozellulose wurden 100 µl Gesamtprotein mittels einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit Ponceau gefärbt. Die Ponceau gefärbte NIa-Protease Bande wurde ausgeschnitten und in Blotto inkubiert.

Für das Panning in ELISA-Vertiefungen wurden 500 µl Gesamtprotein mittels einer präparativen 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die prozessierten Produkte (27,3 kDa NIa-Protease, 22 kDa VPg und 18 kDa Tags) des Fusionsproteins sind im Polyacrylamidgel als deutliche Banden zu erkennen (Abb. 3.14.). Die NIa-Protease Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, im Elektroeluter eluiert und mit Methanol/Aceton gefällt.

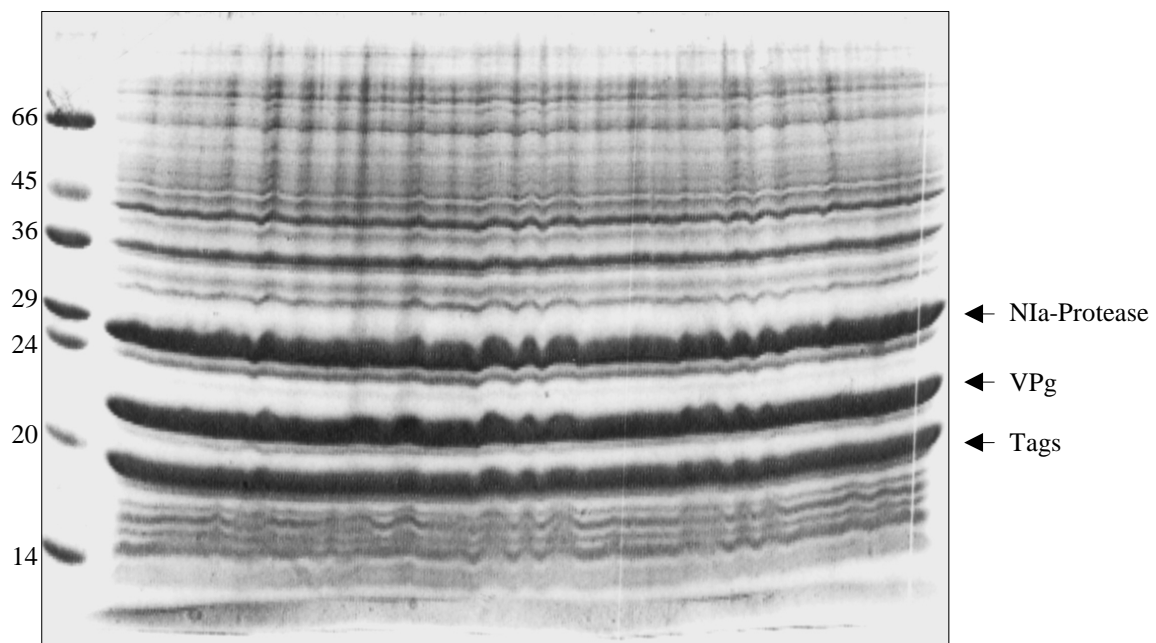


Abb. 3.14. Präparative 12% SDS-PAGE der Überexpression der NIa-Protease. Coomassie gefärbte SDS-PAGE des Gesamtproteins der Überexpression von BLR(DE3)-pETMHNiA2

Die aufgereinigte NIa-Protease wurde mittels 12 % SDS-PAGE kontrolliert. Die Abbildung 3.15. zeigt, daß nur noch die 27 kDa NIa-Protease vorhanden, ohne sichtbare Verunreinigung.

Anhand der SDS-PAGE konnte auch die Gesamtmenge des aufgereinigten Proteins abgeschätzt werden, in Abbildung 3.15 entsprach die NIa-Protease Bande $\sim 2 \mu\text{g}$ BSA.

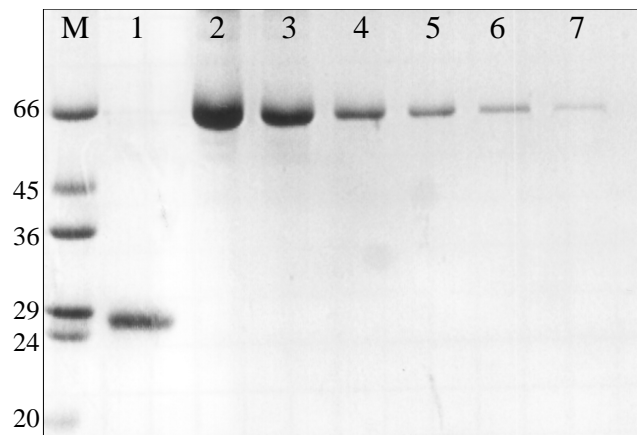


Abb. 3.15. 12% SDS-PAGE der eluierten NIa-Protease.

Spur 1: NIa-Protease, Spur 2: 5 μg BSA, Spur 3: 2 μg BSA, Spur 4: 1 μg BSA, Spur 5: 0,5 μg BSA, Spur 6: 0,2 μg BSA, Spur 7: 0,1 μg BSA

3.3.2. Anreicherung von scFvs- α -NIa-Protease mittels Panning auf Nitrozellulose

Das Panning auf Nitrozellulose sollte eine Selektion der gewünschten scFvs ohne komplizierte Aufreinigung des Antigens ermöglichen. Es wurden 5 Panningrunden durchgeführt (Abb. 3.16.).

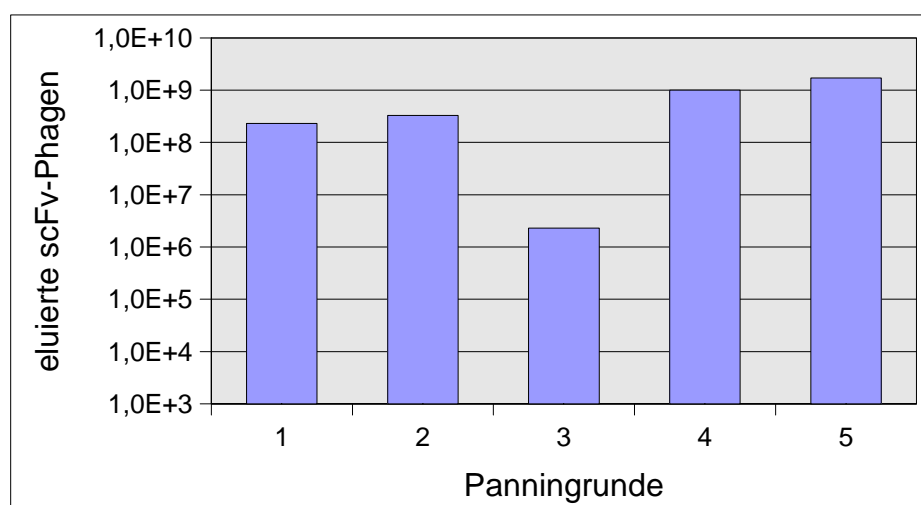


Abb. 3.16. Panning auf Nitrocellulose. Anzahl der eluierten scFv-Phagen der fünf Panningrunden

In der ersten Panningrunde wurden $2,3 \times 10^8$ scFv-Phagen eluiert. Die Anzahl der eluierten scFv-Phagen stieg von der ersten zur fünften Panningrunde ($1,7 \times 10^9$) um den Faktor 7 an. Mit den scFv-Phagen der 5. Panningrunde konnte die NIa-Protease nicht nachgewiesen werden (Immunfärbung hier nicht gezeigt).

Folglich ist das Panning auf Nitrozellulose nicht geeignet für die Anreicherung von scFvs aus einer synthetischen Antikörper Bibliothek gegen die NIa-Protease.

3.3.3. Anreicherung von scFvs- α -NIa-Protease mittels Panning in ELISA-Vertiefungen

Das Panning in ELISA-Vertiefungen wurde mit der NIa-Protease und humanem Thyroglobulin (Scipac, UK) als Antigen durchgeführt. Humanes Thyroglobulin diente als Kontrolle für die Anreicherung von spezifischen scFvs (Nissim *et al.* 1994). Das Panning zur Anreicherung von scFvs gegen die NIa-Protease und Thyroglobulin wurden parallel mit einer Charge der Griffin.1 library von 1997 (1. Amplifikation von Dr. T. Reinard 1997) durchgeführt (Abb. 3.18.). Mit einer neuen Charge von 2001 wurde nur ein Panning zur Anreicherung von scFvs gegen die NIa-Protease durchgeführt (Abb. 3.17.).

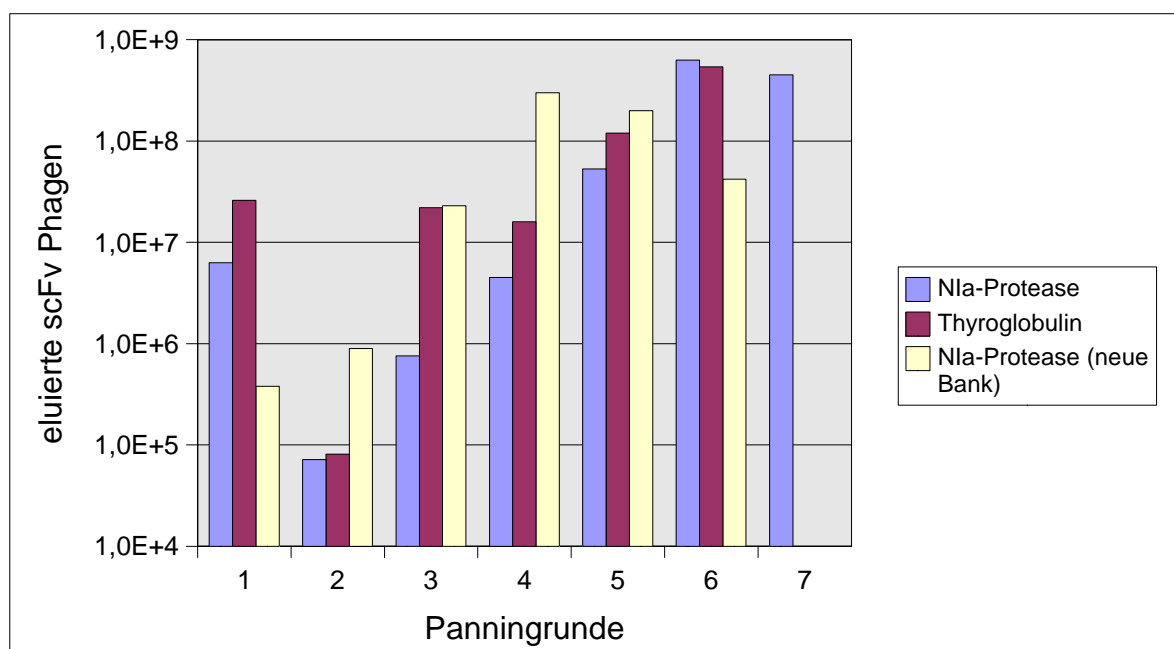


Abb. 3.17. Panning in ELISA-Vertiefungen. Anzahl der eluierten scFv-Phagen aller Panningrunden

Nach der ersten Panningrunde wurden bei dem Panning mit der alten Bank $6,3 \times 10^6$ (NIa-

Protease) und $2,6 \times 10^7$ (Thyroglobulin) scFv-Phagen eluiert. Nach der zweiten Panningrunde sank die Anzahl der eluierten scFv-Phagen auf $7,2 \times 10^4$ (NIa-Protease) und $8,2 \times 10^4$ (Thyroglobulin). Die Anzahl der eluierten scFv-Phagen stieg von der zweiten zur sechsten Panningrunde ($6,3 \times 10^8$ bei der NIa-Protease, $5,4 \times 10^8$ bei dem Thyroglobulin) um den Faktor 8750 bei der NIa-Protease und um den Faktor 6585 bei Thyroglobulin an. Bei der NIa-Protease wurde eine 7. Panningrunde durchgeführt, da nach sechs Panningrunden kein geeigneter Antikörper ausreichend angereichert wurde (siehe auch 3.3.5.). Beim Panning mit der neuen Bank war ebenfalls ein Anstieg in der Anreicherung der scFv-Phagen- α -NIa-Protease, von $3,8 \times 10^5$ eluierten scFv-Phagen nach der ersten Panningrunde bis zu 3×10^8 nach der vierten Panningrunde zu sehen, dies entspricht einer Anreicherung um den Faktor 789. Danach fiel die Anzahl der eluierten scFv-Phagen leicht ab.

Das Panning in ELISA-Vertiefungen ist somit geeignet für die Anreicherung von scFvs gerichtet gegen die NIa-Protease.

3.3.4. Nachweis der Anreicherung von scFv-Phagen- α -NIa-Protease

Die Anreicherung der scFvs gegen die NIa-Protease wurde mittels Immunfärbung mit den amplifizierten scFv-Phagen von sechs Panningrunden überprüft. Nach den Amplifikationen erhielt man zwischen 4×10^{12} und 8×10^{13} scFv-Phagen. Die aufgereinigte NIa-Protease wurde auf eine 12 % SDS-PAGE aufgetragen (Abb 3.18.).

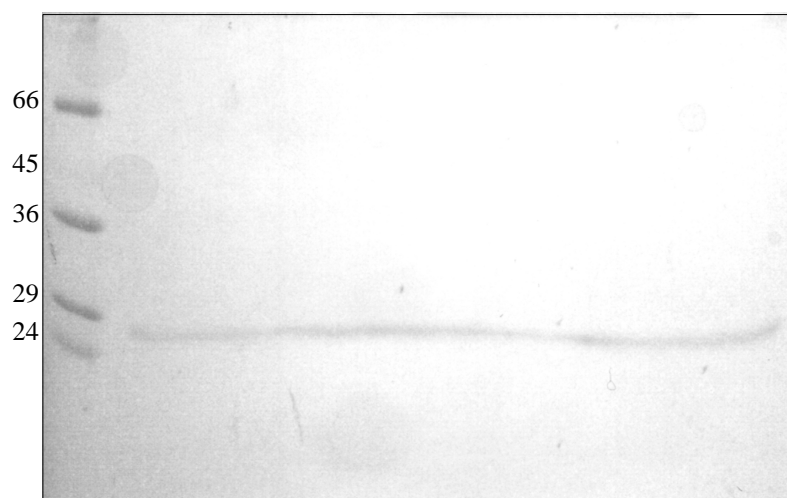


Abb. 3.18. SDS-PAGE der NIa-Protease. Coomassie gefärbte 12 % SDS-Page nach dem Blotten. Es wurden 15 μ g NIa-Protease aufgetragen.

Die aufgereinigte NIa-Protease ist als durchgehende Bande zu erkennen. Die SDS-PAGE der NIa-Protease wurde auf PVDF geblottet und mit den scFv-Phagen als primären Antikörper immungefärbt (Abb. 3.19.).

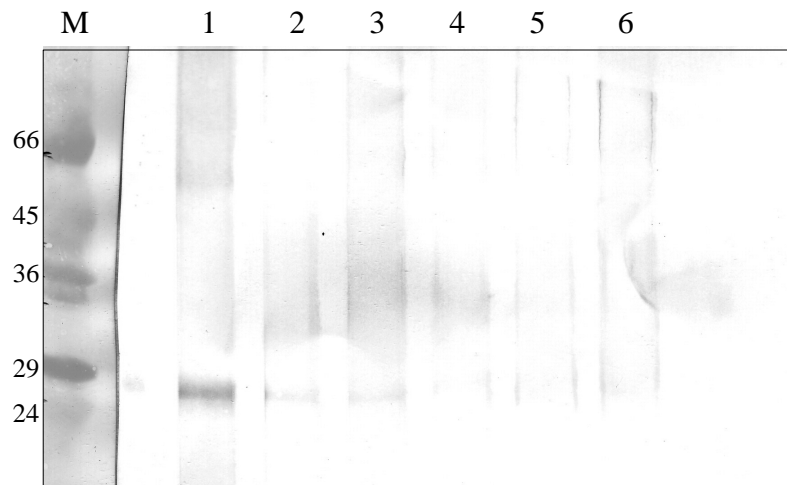


Abb. 3.19. Immunfärbung der NIa-Protease mit scFv-Phagen von sechs Panningrunden. Immunfärbung der NIa-Protease (1. Antikörper scFv-Phagen 1:100 in DBD in der Hoeferkammer, 2. Antikörper Kaninchen α -fd-Bakteriophage 1:1000 in DBD, Ziege α -Kaninchen IgG AP 1:2000 in DBD), Spur 1: 6. Panningrunde, Spur 2: 5. Panningrunde, Spur 3: 4. Panningrunde, Spur 4: 3. Panningrunde, Spur 5: 2. Panningrunde, Spur 6: 1. Panningrunde

Das scFv-Phagen Gemisch der 1., 2. und 3. Panningrunde erkannte die NIa-Protease noch nicht. Ab der 4. Panningrunde waren ausreichend Antikörper angereichert worden, die das Antigen erkannten und nach der 6. Panningrunde führte das Antikörpergemisch zu einem sehr starkem Signal bei der Erkennung der NIa-Protease. In Immunfärbungen des Thyroglobulin, wurde das Thyroglobulin, das mittels Native-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet von den scFv-Phagen ab der dritten Panningrunde erkannt (Immunfärbungen nicht gezeigt).

3.3.5. Selektion eines monoklonalen scFv- α -NIa-Protease

Aus dem Gemisch von scFv-Phagen- α -NIa-Protease nach der 6. Panningrunde, mußten die Antikörper selektiert werden, die die NIa-Protease erkennen. Es wurden scFv-Phagen von sechs zufällig ausgewählten Klonen der 6. Panningrunde hergestellt und diese, analog 3.3.4., als primäre Antikörper in einer Immunfärbung der NIa-Protease eingesetzt. Kein Einzelklon erkannte die NIa-Protease (Abbildung nicht gezeigt).

3.3.5.1. Kolonie-PCRs der scFvs- α -N1a-Protease Klone

Es wurden insgesamt 161 Kolonie-PCRs von Klonen der 6. Panningrunde (98 Klone) und 7. Panningrunde (63 Klone) durchgeführt. Hierzu wurden die Kolonien auf den Agar-Platten der Titerbestimmung der eluierten scFv-Phagen genutzt. Das scFv-Gen wurde aus pHEN2 mit den Primern LMB3MH_f2 und fdSeqMH_r2 bei einer Anlagerungstemperatur von 64 °C amplifiziert (Abb. 3.20.). Die Amplifikation eines scFvs sollte zu einem PCR-Produkt von ~950 bp führen.

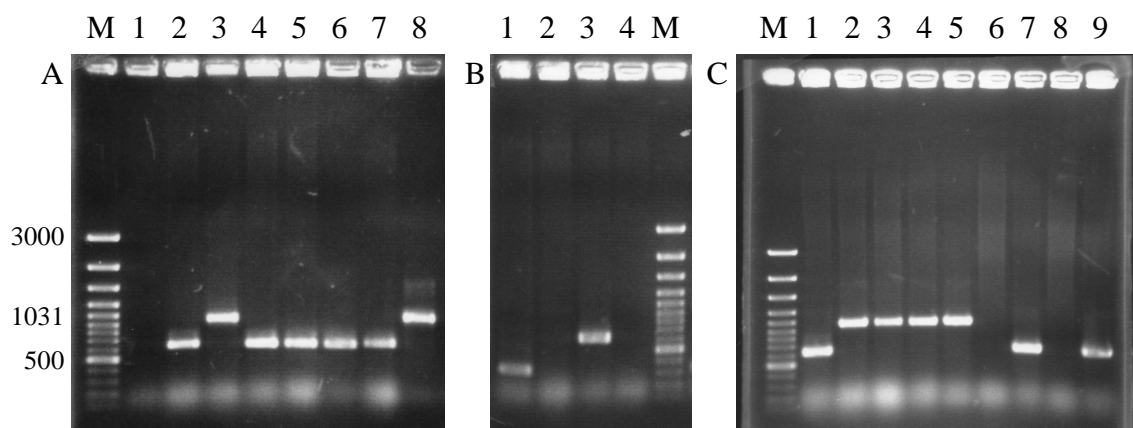


Abb. 3.20. Kolonie PCR von scFv- α -N1a-Protease Klonen. Abbildung A: Die Spuren 1-8 zeigen die Amplifikate der Klone 13-20. Abbildung B: Die Spuren 1-4 zeigen die Klone 31-34. Abbildung C: Die Spuren 1-9 zeigen die Klone 99-107.

Bei der Amplifikation der scFvs traten drei verschieden große Fragmente auf: ~950 bp, ~650 bp und ~350 bp. Bei einem kompletten scFv sollten es ~950 bp sein, wenn nur eine Kette vorliegt ~650 und wenn kein scFv vorhanden ist, sollte das Amplifikat 359 bp lang sein. Tabelle 3.8. zeigt die Auswertung der Amplifikation der scFvs aller 161 Klone.

Amplifikat	absolute Häufigkeit (relative**)
~950 bp	22 (17 %)
~650 bp	89 (70 %)
359 bp	17 (13 %)
Keine Amplifikation*	33

Tab. 3.8. Auswertung der Amplifikation der scFvs aller 161 Klone. * Es erfolgte keine Amplifikation. ** die relative Häufigkeit bezieht sich nur auf die 128 erfolgreichen PCRs.

Am häufigsten trat das 650 bp Fragment auf. Die „Griffin 1. library“ ist offensichtlich defekt, da sie zum größten Teil unvollständige Antikörper enthält.

3.3.5.2. Immunfärbung der NIa-Protease mit Klonen von scFvs- α -NIa-Protease

Von insgesamt 34 Klonen (22 Klone mit einem kompletten scFv, 12 Klone mit einem partiellem scFv) wurden scFv-Phagen hergestellt und in die Immunfärbung der NIa-Protease als primäre Antikörper eingesetzt. Hierzu wurde die aufgereinigte NIa-Protease auf eine 12 % SDS-PAGE aufgetragen (Abb 3.18.) und auf PVDF geblottet. Von den scFv-Phagen die nach der 6. Panningrunde gewonnen wurden, zeigte nur Klon 20 ein Reaktion mit der NIa-Protease (Abb. 3.21.).

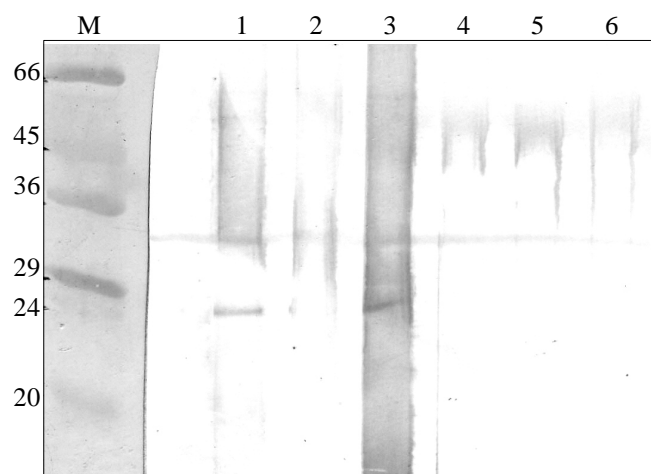


Abb. 3.21. Immunfärbung der NIa-Protease mit scFv-Phagen- α -NIa Protease. Immunfärbung der NIa-Protease (1. Antikörper scFv-Phagen 1:100 in 5 % M-PBS in der Hoeferkammer, 2. Antikörper Kaninchen α -fd-Bakteriophage 1:1000 in 5 % M-PBS, Ziege α -Kaninchen IgG AP 1:2000 in 5 % M-PBS), Spur 1: 6. Panningrunde, Spur 2: Klon 15, Spur 3: Klon 20, Spur 4: Klon 26, Spur 5: Klon 35, Spur 6: Klon 46

Von den scFv-Phagen die nach der 7. Panningrunde gewonnen wurden, reagierten die scFv-Phagen der Klone 100, 101, 102 und 113 mit der NIa-Protease (Abb.3.22.). Hierzu wurde Gesamtprotein der Überexpression der NIa-Protease codiert auf BLR(DE3)-pETMHNiA2 (Abb. 3.2.) mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.14.) und auf PVDF geblottet.

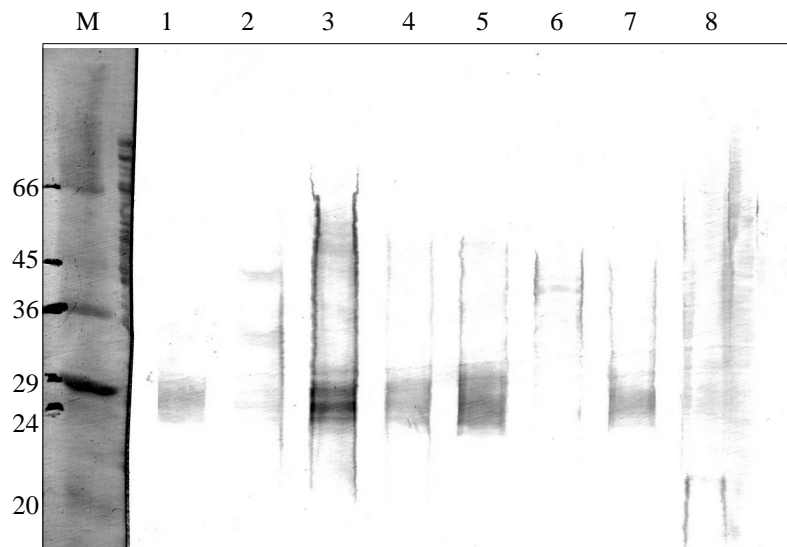


Abb. 3.22. Immunfärbung der N1a-Protease mit scFv-Phagen- α -N1a Protease. Immunfärbung der N1a-Protease (1. Antikörper jeweils 1×10^{10} scFv-Phagen in Blotto in der Hoeferkammer, 2. Antikörper Maus α -M13 1:1000 in Blotto, Kaninchen α -Maus IgG AP 1:2000 in Blotto). Auf die SDS-PAGE wurden $100 \mu\text{l}$ Gesamtprotein aus der Überexpression von BLR(DE3)-pETMHN1a2 aufgetragen und auf PVDF geblottet. Spur 1: 7. Panningrunde, Spur 2: Klon 20, Spur 3: Klon 100, Spur 4: Klon 101, Spur 5: Klon 102, Spur 6: Klon 103, Spur 7: Klon 113, Spur 8: Klon 124

In der Immunfärbung zeigt Klon 20 im Vergleich zu Klon 100, 101, 102 und 113 eine geringere Bindung an die N1a-Protease. Für diese Immunfärbung wurde der monoklonale Antikörper Mause α -M13 (Kneissel *et al.* 1999) eingesetzt. Der polyklonale Antikörper Kaninchen α -fd-Bakteriophage weist zahlreiche Kreuzreaktionen mit bakteriellen Proteinen auf und führt zu einem starken Hintergrund (Immunfärbungen hier nicht gezeigt). Dieser polyklonale Antikörper kann nur eingesetzt werden, wenn aufgereinigte N1a-Protease geblottet wird. Der monoklonale Antikörper erkennt keine bakteriellen Proteine und führt zu einem geringeren Hintergrund. Der restliche Hintergrund, z.B. die vertikalen Streifen, bei der Nutzung des monoklonale Antikörpers Mause α -M13 basiert auf der Verwendung der Hoeferkammer.

Aus der neuen Charge der „Griffin 1. library“ konnte aus 68 Klonen kein scFv aus dem Antikörpergemisch nach der 6. Panningrunde, der die N1a-Protease erkannte, selektiert werden (Immunfärbungen hier nicht gezeigt).

Mittels des Pannings in ELISA-Vertiefungen konnten fünf Antikörperklone gewonnen werden, die die NIa-Protease erkannten.

3.3.5.3. Sequenzierung von scFvs und Analyse der CDRs

Die scFv- α -NIa-Protease Klone 20, 100, 101, 102 und 113, die an die NIa-Protease binden, wurden mit den Primern LMB3MH_f2 und MHHEN2_f2 sequenziert. pHEN2- α -NIa-Protease Klon 20 hatte ein offenes Leseraster von 873 bp (siehe Seite 76). Der scFv- α -NIa-Protease Klon 20 (kurz: scFv- α -NIa20) hatte eine Länge von 729 bp. Die Klone 100, 101, 102 und 113 waren genetisch identisch (im folgenden Text nur noch als Klon 102 bezeichnet). pHEN2- α -NIa-102 hatte ein offenes Leseraster von 861 bp (siehe Seite 77). Der scFv- α -NIa-102 hatte eine Länge von 717 bp und war damit um 12 bp kürzer als scFv- α -NIa-20. Tabelle 3.9. zeigt eine Übersicht der CDRs beider Klone.

CDR	scFv- α -NIa20	scFv- α -NIa102
CDR H1	GYTFTYRYLH	GYTFTGYMH
CDR H2	WITPFNGNTN	IINPSGGSTS
CDR H3	CKRANGFRGCS	SENT
CDR L1	GDLSRSYYAS	TGTSSDVGGYNYVS
CDR L2	GKNNRPS	VSNRPS
CDR L3	NSRDSSGNHV	SSYTSSSTLV

Tab. 3.9. Übersicht über die CDRs von scFv- α -NIa-20 und scFv- α -NIa-102. Die CDRs wurden mittels „WAMpredict“ bestimmt.

scFv- α -NIa20:

```

      M K Y L L P T A A A G L L L L A A
1  ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC
      NcoI
      ~~~~~~
      Q P A M A Q V Q L V Q S G A E V K
51  CCAGCCGGCC ATGGCCCAGG TGCAGCTGGT GCAGTCTGGG GCTGAGGTGA
      K T G S S V K V S C K A S G Y T
101  AGAAGACTGG GTCCTCAGTG AAGGTTTCCT GCAAGGCTTC CGGATACACC
      F T Y R Y L H W V R Q A P G Q A L
151  TTCACCTACC GCTACCTGCA CTGGGTGCGA CAGGCCCCCG GACAAGCGCT
      E W M G W I T P F N G N T N Y A Q
201  TGAGTGGATG GGATGGATCA CACCTTTCAA TGGTAACACC AACTACGCAC
      K F Q D R V T I T R D R S M S T
251  AGAAATTCCA GGACAGAGTC ACCATTACCA GGGACAGGTC TATGAGCACA
      A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y
301  GCCTACATGG AGCTGAGCAG CCTGAGATCT GAGGACACGG CCGTGTATTA
      C A R C K R A N G F R G C S W G Q
351  CTGTGCAAGA TGTAAGCGGG CTAATGGTTT TAGGGGTTGT TCGTGGGGCC
      XhoI
      ~~~~~~
      G T L V T V S S G G G G S G G G
401  AAGGTACCCT GGTCACCGTC TCGAGTGGTG GAGGCGGTTT AGGCGGAGGT
      ApaI
      ~~~~~~
      G S G G S A L S S E L T Q D P A V
451  GGCTCTGGCG GTAGTGCACT TTCTTCTGAG CTGACTCAGG ACCCTGCTGT
      S V A L G Q T V R I T C Q G D S L
501  GTCTGTGGCC TTGGGACAGA CAGTCAGGAT CACATGCCAA GGAGACAGCC
      R S Y Y A S W Y Q Q K P G Q A P
551  TCAGAAGCTA TTATGCAAGC TGGTACCAGC AGAAGCCAGG ACAGGCCCCCT
      V L V I Y G K N N R P S G I P D R
601  GTACTTGTCA TCTATGGTAA AAACAACCGG CCCTCAGGGA TCCCAGACCG
      F S G S S S G N T A S L T I T G A
651  ATTCTCTGGC TCCAGCTCAG GAAACACAGC TTCCTTGACC ATCACTGGGG
      Q A E D E A D Y Y C N S R D S S
701  CTCAGGCGGA AGATGAGGCT GACTATTACT GTAAC TCCCG GGACAGCAGT
      NotI
      ~~~~~~
      G N H V F G G G T K L T V L G A A
751  GGTAACCATG TATTCGGCGG AGGGACCAAG CTGACCGTCC TAGGTGCGGC
      NotI
      ~~~~
      A H H H H H G A A E Q K L I S E
801  CGCACATCAT CATCACCATC ACGGGGCCGC AGAACAAAAA CTCATCTCAG
      E D L N G A A *
851  AAGAGGATCT GAATGGGGCC GCATAG

```


scFv- α -NIa102:

```

      M K Y L L P T A A A G L L L L A A
1  ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC
      NcoI
      ~~~~~~
      Q P A M A Q V Q L V Q S G A E V K
51  CCAGCCGGCC ATGGCCCAGG TGCAGCTGGT GCAGTCTGGG GCTGAGGTGA
      K P G A S V K V S C K A S G Y T
101  AGAAGCCTGG GGCCTCAGTG AAGGTCTCCT GCAAGGCTTC TGGATACACC
      F T G Y Y M H W V R Q A P G Q G L
151  TTCACCGGCT ACTATATGCA CTGGGTGCGA CAGGCCCTTG GACAAGGGCT
      E W M G I I N P S G G S T S Y A Q
201  TGAGTGGATG GGAATAATCA ACCCTAGTGG TGGTAGCACA AGCTACGCAC
      K F Q G R V T M T R D T S T S T
251  AGAAGTTCCA GGCAGAGTC ACCATGACCA GGGACACGTC CACGAGCACA
      V Y M E L S S L R S E D T A V Y Y
301  GTCTACATGG AGCTGAGCAG CCTGAGATCT GAGGACACGG CCGTGTATTA
                                          XhoI
                                          ~~~
      C A R S E N T* W G Q G T L V T V S
351  CTGTGCAAGA AGTGAGAATA CTTGGGGCCA AGGTACCCTG GTCACCGTCT
      XhoI                                     ApaLI
      ~~~~~~
      S G G G G S G G G G S G G S A L
401  CGAGTGGTGG AGGCGGTTCA GGCAGAGGTG GCTCTGGCGG TAGTGCACCTT
      Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S
451  CAGTCTGCCC TGA CT CAGCC TGCCTCCGTG TCTGGGTCTC CTGGACAGTC
      I T I S C T G T S S D V G G Y N Y
501  GATCACCATC TCCTGCACTG GAACCAGCAG TGACGTTGGT GGTTATAACT
      V S W Y Q Q H P G K A P K L M I
551  ATGTCTCCTG GTACCAACAG CACCCAGGCA AAGCCCCCAA ACTCATGATT
      Y E V S N R P S G V S N R F S G S
601  TATGAGGTCA GTAATCGGCC CTCAGGGGTT TCTAATCGCT TCTCTGGCTC
      K S G N T A S L T I S G L Q A E D
651  CAAGTCTGGC AACACGGCCT CCCTGACCAT CTCTGGGCTC CAGGCTGAGG
      E A D Y Y C S S Y T S S S T L V
701  ACGAGGCTGA TTATTACTGC AGCTCATATA CAAGCAGCAG CACTCTTGTA
                                          NotI
                                          ~~~~~~
      F G G G T K L T V L G A A A H H H
751  TTCGGCGGAG GGACCAAGCT GACCGTCCTA GGTGCGGCCG CACATCATCA
      H H H G A A E Q K L I S E E D L N
801  TCACCATCAC GGGGCCG CAG AACAAAACT CATCTCAGAA GAGGATCTGA
      G A A *
851  ATGGGGCCGC ATAG

```

Legende: pelB, V_H, Linker, V_L, his-Tag, myc-Tag, CDRs, *H102

Die Sequenzierung eines unvollständigen „~650 bp“ scFvs (Sequenz hier nicht gezeigt) zeigte, daß die schwere Kette, beginnend mit der Schnittstelle *NcoI* und endend mit dem ersten Basenpaar von *XhoI*, fehlte. Durch das Fehlen der schweren Kette entstand ein Leserrasterwechsel, es wurde folglich keine leichte Kette exprimiert.

3.3.5.4. Kontrolle von scFv- α -N1a102

Um auszuschließen, daß der scFv- α -N1a-102 ein bakterielles 27 kDa Protein erkennt, wurden die Fusionsproteine, codiert auf BLR(DE3)-pETMHN1a und BLR(DE3)-pETMHN1a2, überexprimiert. BLR(DE3) ohne Plasmid diente als Kontrolle. Die Induktion des T7-Promotors erfolgte mit 1 mM IPTG über Nacht bei 30 °C. Die Überexpression wurde mittels 12 % SDS-PAGE und Immunfärbung der N1a-Protease mit scFv- α -N1a102 untersucht (Abb. 3.23., vergleiche auch Abb. 3.2.).

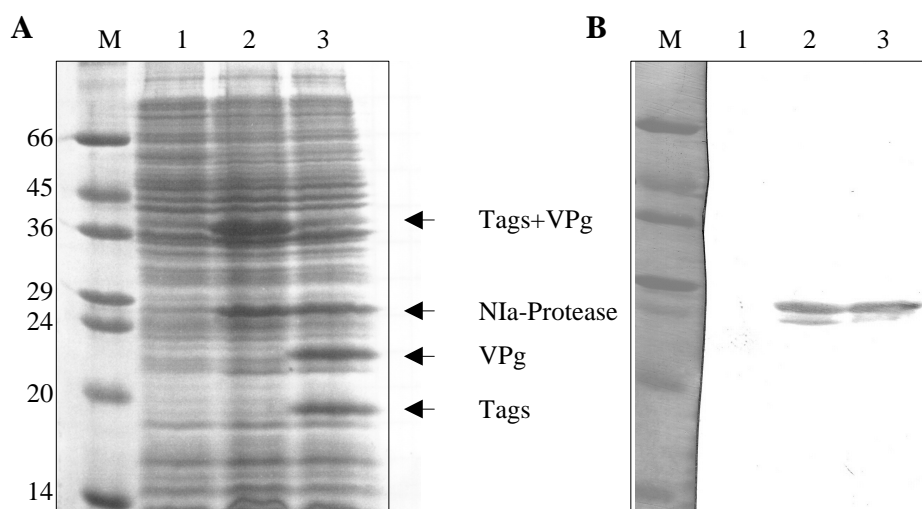


Abb. 3.23. SDS-PAGE der Überexpression von BLR(DE3), BLR(DE3)-pETMHN1a und BLR(DE3)-pETMHN1a2 (A) und Immunfärbung der N1a-Protease (B). Abbildung A zeigt eine Coomassie gefärbte 12 % SDS-PAGE von jeweils 4 μ l Gesamtprotein (vergleiche auch Abb. 3.2.) und Abbildung B die Immunfärbung der N1a-Protease (scFv-Phagen- α -N1a102 1:1000 ($\rightarrow 2 \times 10^9$ cfu gesamt) in Blotto, Maus α -M13 in Blotto, Kaninchen α -Maus IgG AP 1:1000 in Blotto). Spur 1 BLR(DE3), Spur 2 BLR(DE3)-pETMHN1a und Spur 3 BLR(DE3)-pETMHN1a2.

Der scFv- α -Nia102 erkannte nur die überexprimierte, prozessierte Nia-Protease codiert auf pETMHNia und pETMHNia2. In der Kontrolle BLR(DE3), die gleichfalls mit IPTG behandelt wurde, wurde kein Protein erkannt. Der scFv- α -Nia102 erkannte folglich nur die rekombinante Nia-Protease. Der Antikörper färbte zwei Proteine an, die 27,3 kDa Nia-Protease und ein 23-24 kDa Protein (siehe auch 3.4.6.).

3.4. Anwendung des scFv-Phagen- α -Nia-Protease Klon 102

Der scFv- α -Nia102 war der Ausgangspunkt für die weitere Untersuchungen. Es wurden lösliche Antikörper produziert (3.4.1.) und es wurde versucht die Inhibition der Nia-Protease *in vivo* nachzuweisen (3.4.2.). Weiterhin wurden binären Vektoren konstruiert, um Kartoffeln zu transformieren (3.4.3). Der Antikörper wurde auch auf sein diagnostisches Potential in der Erkennung von potyvirusinfizierten Pflanzen überprüft (3.4.4.) und er bot die Möglichkeit die Prozessierung der Nia-Protease *in vivo* zu untersuchen (3.4.5.).

3.4.1. Produktion von löslichen scFvs- α -Nia102

Immunfärbungen mit scFv-Phagen haben den Nachteil, daß mit infektiösen Partikeln und dementsprechend vorsichtig gearbeitet werden muß. Lösliche scFvs haben den Vorteil, daß sie in großem Maßstab produziert werden können. Die Infektion des Wirtsbakteriums HB2151 mit scFv-Phagen- α -Nia102 und Induktion des *lac*-Promotors, führte nicht zu einer Produktion von löslichen scFvs im Periplasma (hier nicht gezeigt). Somit war eine Umklonierung des scFv- α -Nia102 in einen Expressionsvektor und eine Überexpression des Antikörpers nötig.

3.4.1.1. pETMHscFv- α -Nia102

Der Antikörper wurde mit der *pelB*-Leitsequenz, His-Tag und myc-Tag aus pHEN2- α -Nia102 mit den Primern MHHEN2_f3 und MHHEN2_r3 bei einer Anlagerungstemperatur von 64 °C amplifiziert. Das PCR-Produkt (872 bp) wurde in pET21a(+) zwischen *NdeI* und *HindIII*

ligiert. Die Transformation von NM522 wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern MHET21_f1 und MHET21_r1 bei einer Anlagerungstemperatur von 64 °C kontrolliert und das Amplifikat (1000 bp) sequenziert. Das Plasmid pETMHscFv- α -N1a102 (Abb. 3.24.) wurde anschließend in BLR(DE3) umtransformiert.

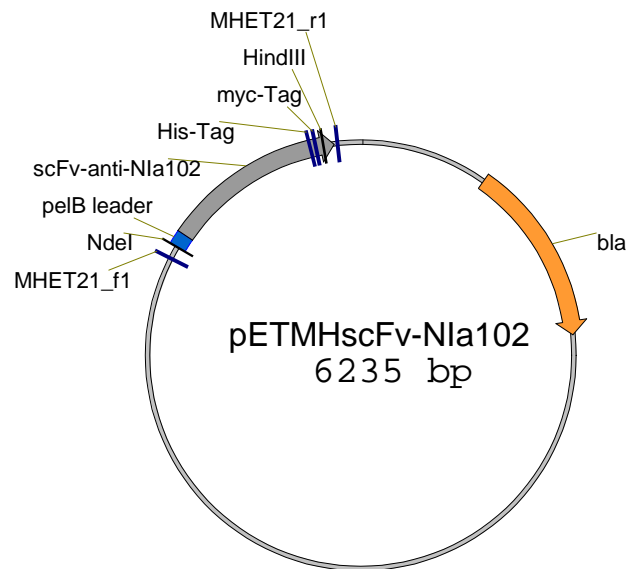


Abb. 3.24. pETMHscFv-anti-N1a102. Das Plasmid enthält den scFv- α -N1a102 mit pelB-Leitsequenz unter der Kontrolle eines T7-Promotors

3.4.1.2. Expression der scFv- α -N1a102

Der scFv, codiert auf BLR(DE3)-pETMHscFv- α -N1a102, wurde überexprimiert. Die Induktion des T7-Promotors (Chamberlin *et al.* 1970; Dunn und Studier 1983) in einer 500 ml Kultur erfolgte mit 1 mM IPTG für 4 h. Es wurde aus 450 ml Kultur die periplasmatische Fraktion, sowie aus 50 ml Kultur Gesamtprotein (Pellet/ Überstand) isoliert. Die Überexpression wurde mittels 12 % SDS-PAGE der Gesamtproteinisolation (Pellet) (Abb 3.25.) überprüft.

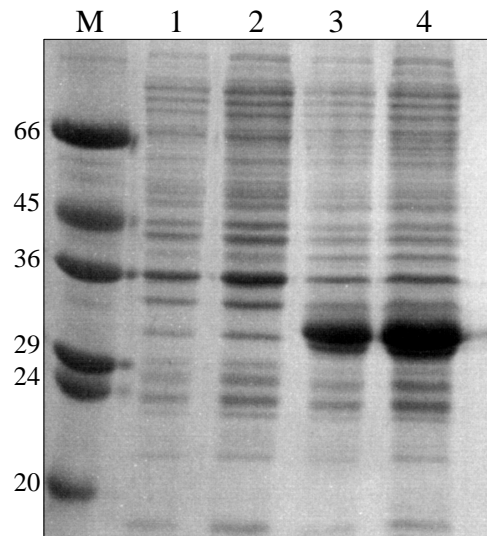


Abb. 3.25. SDS-PAGE der Überexpression von BLR(DE3)-pETMHscFv- α -NIa102. Coomassie gefärbte 12 % SDS-PAGE. Spur 1 und 2 BLR(DE3), Spur 3 und 4 BLR(DE3)-pETMHscFv- α -NIa102. Es wurden jeweils 5 μ l und 10 μ l Gesamtprotein aufgetragen.

Der scFv- α -NIa102 wurde stark exprimiert. Es wurde erwartet, daß der rekombinante Antikörper ein M_w von 31,4 kDa inklusive, bzw. 29,4 kDa ohne pelB-Leitsequenz, aufweist. Für den immunbiochemischen Nachweis des myc-Tags wurden die periplasmatische Fraktion, die löslichen Proteine (Überstand) und die unlöslichen Proteine (Pellet) mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF geblottet (Abb. 3.26.).

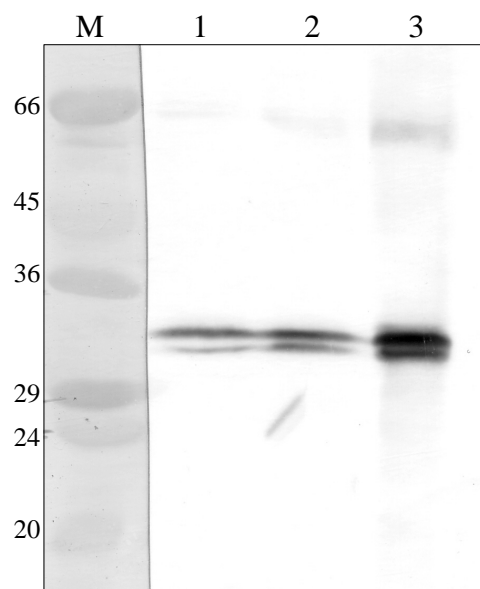


Abb. 3.26. Immunfärbung der Überexpression von scFv- α -NIa102. Immunfärbung des myc-Tags von scFv- α -NIa102 codiert auf pETMHscFv- α -NIa102 (Maus α -myc 1:1000 in Blotto, Kaninchen α -Maus IgG AP 1:1000 in Blotto). Spur 1: 15 μ l periplasmatische Fraktion, Spur 2: 15 μ l löslicher Überstand und Spur 3: 2,5 μ l Bakterienpellet

Der scFv war trotz der pelB-Leitsequenz nicht nur im Periplasma lokalisiert, sondern befand sich auch als lösliches und unlösliches Protein im Cytoplasma. Erwartet wurde ein 29,4 kDa Protein im Periplasma und ein 31,4 kDa Protein im Cytoplasma. Es wurden jeweils zwei Proteine angefärbt, beide sind etwa 1-2 kDa größer als erwartet. Der Nachweis des scFvs mittels Immunfärbung des His-Tags zeigte das gleiche Resultat (Immunfärbung hier nicht gezeigt).

3.4.1.3. Immunfärbung der Nia-Protease mit löslichen scFv- α -Nia102

Die überexprimierten Antikörper aus Periplasma, Pellet und Überstand wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Nia-Protease zu erkennen, untersucht. Hierzu wurde Gesamtprotein der Überexpression von BLR(DE3)-pETMHNia2 mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF geblottet und die Nia-Protease mit dem scFv- α -Nia102 immungefärbt (Abb. 3.27.).

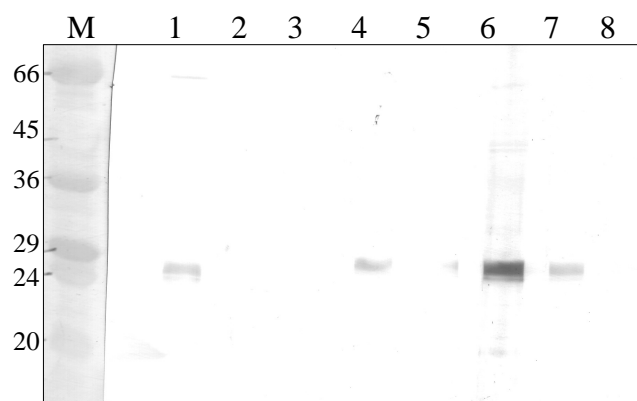


Abb. 3.27. Immunfärbung der Nia-Protease mit scFv- α -Nia102. Immunfärbung der Nia-Protease (1. Antikörper scFv- α -Nia102 in 5 % M-PBS in der Hoeferkammer, 2. Antikörper Maus α -M13 1:1000 in Blotto, 3. Antikörper Kaninchen α -Maus IgG AP 1:2000 in 5 % M-PBS), Mittels 12 % SDS-PAGE wurden 75 μ l Gesamtprotein aus der Überexpression von BLR(DE3)-pETMHNia2 aufgetrennt und auf PVDF geblottet. Spur 1: Periplasma 10^0 Verdünnung, Spur 2: Periplasma 10^{-1} , Spur 3: Periplasma 10^{-2} , Spur 4: Überstand 10^{-1} , Spur 5: Überstand 10^{-2} , Spur 6: Pellet 10^{-1} , Spur 7: Pellet 10^{-2} , Spur 8: Pellet 10^{-3}

Die scFvs- α -Nia102 aus allen drei Fraktionen erkannten die Nia-Protease. Die Immunfärbung war mit dem Pellet am stärksten. Die periplasmatische Fraktion mußte unverdünnt eingesetzt werden, um die Nia-Protease zu erkennen. Der lösliche scFv- α -Nia102 kann ohne Aufreinigung für Immunfärbungen der Nia-Protease eingesetzt werden.

3.4.2. Integration von scFvs in das Plasmid pHNTMHNiA2

Das GFP-Plasmid pHNTMHNiA2 (siehe 3.2.3.) wurden genutzt, um zu untersuchen, ob der scFv- α -NiA102 die Fähigkeit besitzt, die NiA-Protease *in vivo* zu inhibieren. Hierzu wurde das Plasmid so modifiziert, daß ein T7-Promotor (Chamberlin *et al.* 1970; Dunn und Studier 1983) mit einer Klonierungsstelle für beliebige scFvs in das Plasmid eingefügt wurde. Um eine mögliche Hemmung zu untersuchen, muß sichergestellt werden, daß jede NiA-Protease durch einen scFv inhibiert wird. Dies setzt voraus, daß der Antikörper im Vergleich zum GFP-NiA Fusionsprotein im Überschuß vorliegt. Das NiA-GFP Fusionsprotein wird unter der Kontrolle eine *lac*-Promotors exprimiert, deshalb wurde für die Expression des Antikörpers ein T7-Promotor gewählt.

3.4.2.1. pHNTMHNiA2 Δ NcoI

Um beliebige scFvs aus pHEN2 in pHNTMHNiA2 klonieren zu können, mußte die *NcoI*-Schnittstelle im *gfp*-Gen entfernt werden. Ein Abschnitt des *gfp*-Gens wurde mit den Primern MHNiA_f12 und MHGFP Δ NcoI_r1 bei einer Anlagerungstemperatur von 64 °C amplifiziert. Mit dem Primer MHGFP Δ NcoI_r1 wurde in der *NcoI*-Schnittstelle **ccatgg** das Adenin durch ein Cytosin ersetzt. Dies geschah in der dritten Position des Codons **cca** für Prolin, **ccc** codiert gleichfalls für Prolin. Das PCR-Produkt (206 bp) wurde als Primer für eine zweite PCR mit dem Primer HNTMHNiA_r bei einer Anlagerungstemperatur von 66 °C eingesetzt. Das PCR-Produkt (836 bp) wurde in pHNTMHNiA2 zwischen *KpnI* und *SpeI* ligiert. Die Transformation von HB2151 wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern MHNiA_f12 und HNTMHNiA_r bei einer Annealing Temperatur von 64 °C kontrolliert, indem das Amplifikat mittels Verdau mit *NcoI* überprüft und anschließend sequenziert wurde. Das GFP des HB2151-pHNTMHNiA2 Δ NcoI (Abb. 3.28.) Ausstrichs auf LB + Amp leuchtete auf dem UV-Tisch nach Inkubation für mindestens 24 h bei 30 °C.

Dies Ergebnis zeigt, daß das GFP nach dem Basenaustausch noch intakt ist.

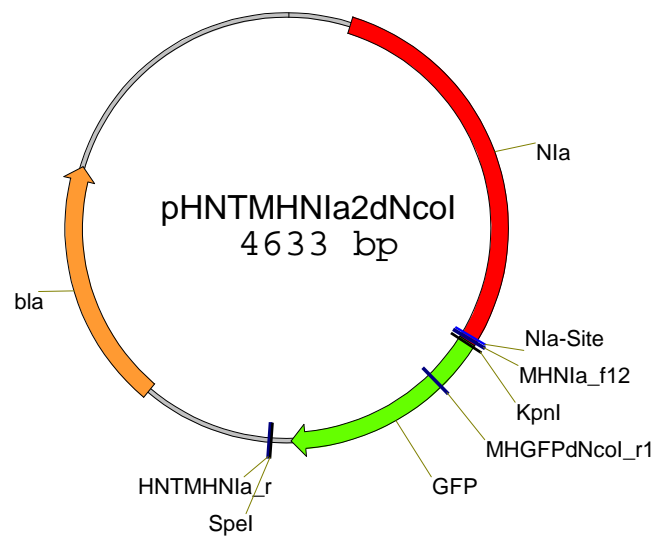


Abb. 3.28. pHNTMHNla2ΔNcoI. Aus dem Plasmid pHNTMHNla2 wurde die NcoI Schnittstelle entfernt.

3.4.2.2. pHNTMHNla_scFv

Mit den Primern MHscFv_f1 und MHscFv_r3 wurde der Abschnitt von pHEN2, in dem die scFvs inkloniert werden können, bei einer Anlagerungstemperatur von 64 °C amplifiziert. Der Primer MHscFv_f1 enthielt den T7-Promotor aus pET32a(+) und eine optimierte RBS aus pTrueBlue, der Primer MHscFv_r3 enthielt den T7-Terminator aus pET32a(+). Das PCR-Produkt (296 bp) wurde in pHNTMHNla2ΔNcoI zwischen *SpeI* und *ApaI* ligiert. Die Transformation von HB2151 wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern MHNla_f12 und MHHNT_r3 bei einer Annealing Temperatur von 64 °C kontrolliert und das Amplifikat (1152) sequenziert. Das GFP des HB2151-pHNTMHNla_scFv (Abb. 3.29.) Ausstrichs auf LB + Amp leuchtete auf dem UV-Tisch nach Inkubation für mindestens 24 h bei 30 °C. Daraus folgt, daß die Expression und Prozessierung des Nla-GFP Fusionsprotein durch Integration des T7-Promotor nicht gestört wird.

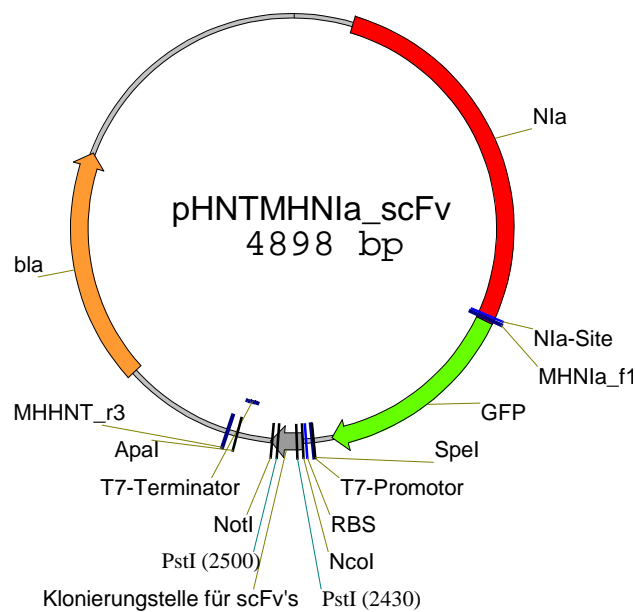


Abb. 3.29. pHNTMHNla_scFv. Das Plasmid enthält den Nla und das GFP, sowie eine MCS für die Integration von scFvs. Die scFvs können unter der Kontrolle eines T7-Promotors exprimiert werden.

3.4.2.3. pHNTMHNla_scFv- α -Nla102

Mit den Primern LMB3MH_f2 und fdSeqMH_r2 wurde das *scFv- α -Nla102*-Gen aus den scFv-Phagen- α -Nla-Protease Klon 102 bei einer Anlagerungstemperatur von 66 °C amplifiziert. Das PCR-Produkt (973 bp) wurde zwischen *NcoI* und *NotI* in pHNTMHNla_scFv ligiert. Der Verdau von pHNTMHNla_scFv erfolgte mit *NcoI*, *NotI* und *PstI*, somit konnten das *NcoI/PstI* und das *PstI/NotI* Fragment mit dem „Invitex PCRapid Purification Kit“ entfernt werden. Die Transformation von HB2151 wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern MHscFv_f3 und MHscFv_r2 kontrolliert und das Amplifikat (936 bp) mit den Primern MHscFv_f3 und MHHEN2_f2 sequenziert. Das Plasmid wurde in BLR(DE3) umtransformiert und auf LB + Amp + IPTG Agarplatten ausgestrichen. Das GFP des BLR(DE3)-pHNTMHNla_scFv- α -Nla102 (Abb. 3.30.) Ausstrichs auf LB + Amp leuchtete auf dem UV-Tisch nach Inkubation für mindestens 24 h bei 30 °C.

Dies zeigt, daß die Expression und Prozessierung des NIa-GFP Fusionsprotein durch Integration des scFvs nicht gestört wird.

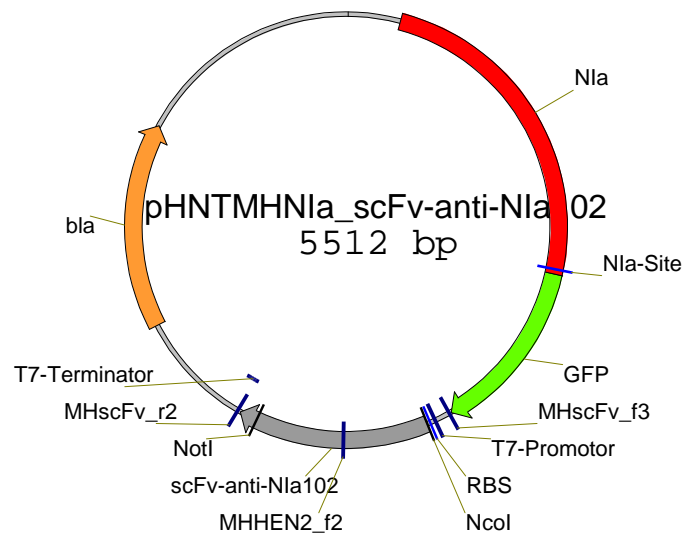


Abb. 3.30. pHNTMHNla_scFv- α -NIa102. Das Plasmid enthält den scFv- α -NIa102 unter der Kontrolle eines T7-Promotors.

Eine Induktion des T7-Promotors zeigte, daß kein scFv exprimiert wurde. In der SDS-PAGE konnte keine überexprimiertes Protein gefunden werden und der His-Tag konnte mittels Immunfärbung nicht nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt).

Der Nachweis der Inhibition der NIa-Protease durch den scFv- α -NIa102 *in vivo* gelang nicht, da der Antikörper nicht exprimiert werden konnte.

3.4.3. Konstruktion von binären Vektoren für die Transformation von *Solanum*

Tuberosum mit dem scFv- α -NIa102

Für Transformation von Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) mußte das Gen für den scFv- α -NIa102 in binäre Vektoren umkloniert werden. Als binärer Vektor wurde pGreenII-229 aus der pGreenII Vektorserie gewählt (Hellens *et al.* 2000a, www.pgreen.ac.uk) (Abb.3.31.).

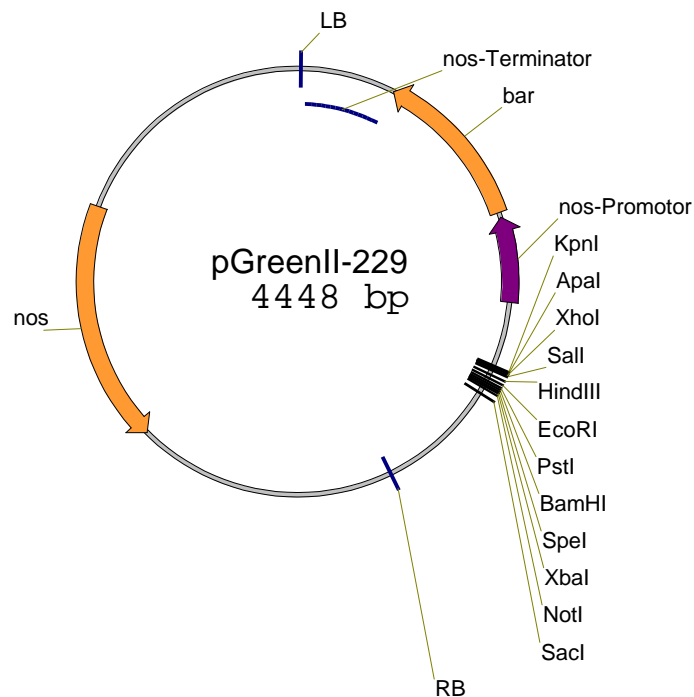


Abb. 3.31. pGreenII-229. Der binäre Vektor ist die Grundlage für die Konstruktion von pGIIMH35S und pGIIMHvst.

Der Antikörper sollte in zwei Plasmiden unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors und unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert werden. Als konstitutiver Promotor wurde der 35S-Promotor des Cauliflower mosaic virus (CaMV) gewählt (Töpfer *et al.* 1988). Zusätzlich zum 35S-Promotor wurde der Potyvirus-Translationsverstärker, dies ist der 5' nicht translatierte Abschnitt der Potyvirus-RNA, genutzt (Carrington und Freed 1990; Nicolaisen *et al.* 1992). Als induzierbarer Promotor wurde der *vst*-Promotor des Stilbensynthase-Gens (*vst1*-Gen) von *Vitis vinifera* gewählt (Fischer 1994). Um die Expressionsrate von funktionsfähigen Antikörpern in Pflanzen zu steigern, wurde die genetische Information für das KDEL-Retentionssignal (Schouten *et al.* 1997) an das scFv-Gen fusioniert.

3.4.3.1. pGIIMH35S

Der 35S-Promotor und der Translationsverstärker wurden aus pE35SL2 mit den Primern MHE35SL2_f1 und MHE35SL2_r bei einer Anlagerungstemperatur von 64 °C amplifiziert. Das PCR-Produkt (1156 bp) wurde mittels TA-Klonierung in pGEM T ligiert, da die direkte Ligation in pGreenII-229 nicht möglich war. Die Transformation von XL1-Blue wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern T7 und SP6 bei einer Annealing Temperatur von 60 °C kontrolliert und das Amplifikat (~1350 bp) sequenziert. Der 35S-Promotor wurde mit den Primer T7 und SP6 wieder aus pGEMMH35S reamplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in pGreenII-229 zwischen *KpnI* und *SacI* ligiert. Für den Verdau wurde zusätzlich *SpeI* eingesetzt, da das *KpnI/ SacI* Fragment eine Länge von 102 bp hat, damit nicht mit dem „Invisorb Spin PCRapid Kit“ entfernt werden konnte und somit wieder zu pGreenII-229 religieren kann. Das *KpnI/ SpeI* Fragment (72 bp) und das *SpeI/ SacI* Fragment (30 bp) konnte mit dem Kit entfernt werden. Die Transformation von NM522 mit dem Plasmid pGIIMH35S (Abb. 3.32.) wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern MHGreen_f1 und MHGreen_r1 bei einer Anlagerungstemperatur von 58 °C kontrolliert und das Amplifikat (1282 bp) sequenziert.

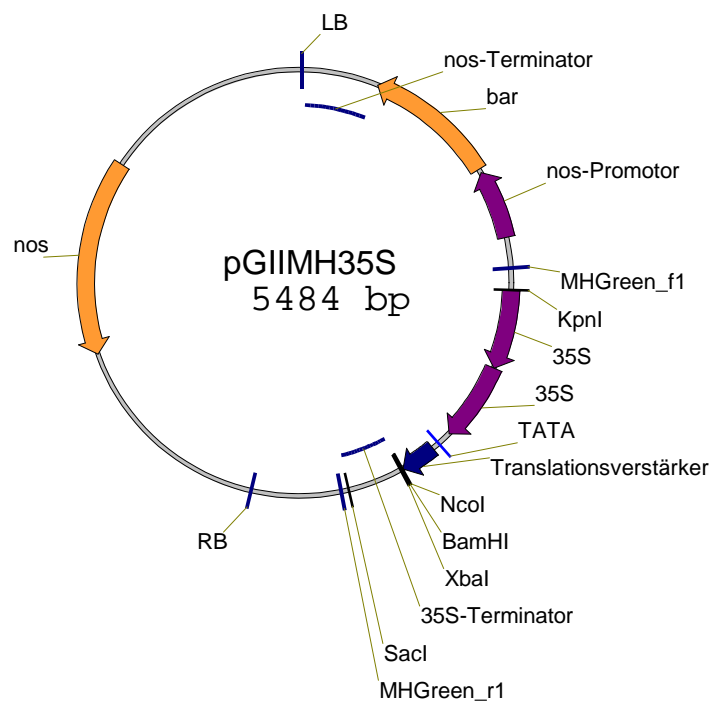


Abb. 3.32. pGIIMH35S. Der binäre Vektor enthält einen 35S-Promotor und eine Klonierungsstelle für scFvs

3.4.3.2. pGIIMHvst

Der *vst*-Promotor wurde aus pGEMvst mit den Primern MHvst_f1 und MHvst_r1 bei einer Anlagerungstemperatur von 64 °C amplifiziert. Das PCR-Produkt (1029 bp) wurde in pGIIMH35S zwischen *KpnI* und *SacI* ligiert. Die Transformation von NM522 mit dem Plasmid pGIIMHvst (Abb. 3.33.) wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern MHGreen_f1 und MHGreen_r1 bei einer Anlagerungstemperatur von 58 °C kontrolliert und das Amplifikat (1385 bp) sequenziert.

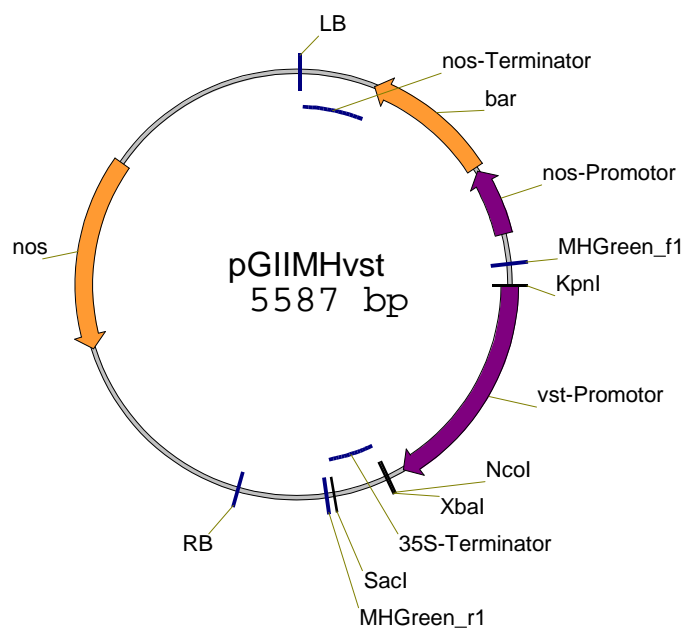


Abb. 3.33. pGIIMHvst. Der binäre Vektor enthält ein *vst*-Promotor und eine Klonierungstelle für scFvs.

3.4.3.3. pGIIMH35S-scFv- α -N1a102 und pGIIMHvst-scFv- α -N1a102

Das *scFv- α -N1a102*-Gen wurde aus pHEN2- α -N1a102 mit den Primern MHscFv_f4 und MHscFv_r6 bei einer Anlagerungstemperatur von 64 °C amplifiziert. Der Primer MHscFv_r6 enthielt die Sequenz für das KDEL-Retentionssignal. Das PCR-Produkt (831 bp) wurde in pGIIMH35S und pGIIMHvst zwischen *NcoI* und *XbaI* ligiert. Die Transformation von NM522 mit den Plasmiden pGIIMH35S-scFv- α -N1a102 (Abb. 3.34. A), bzw. pGIIMHvst-scFv- α -N1a102 (Abb. 3.34. B) wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primern MHGreen_f1 und

MHTerminator_r1 bei einer Anlagerungstemperatur von 64 °C kontrolliert und das Amplifikat (1897 bp bei pGIIMH35S-scFv- α -Nla102 und 2000 bp bei pGIIMHvst-scFv- α -Nla102) sequenziert.

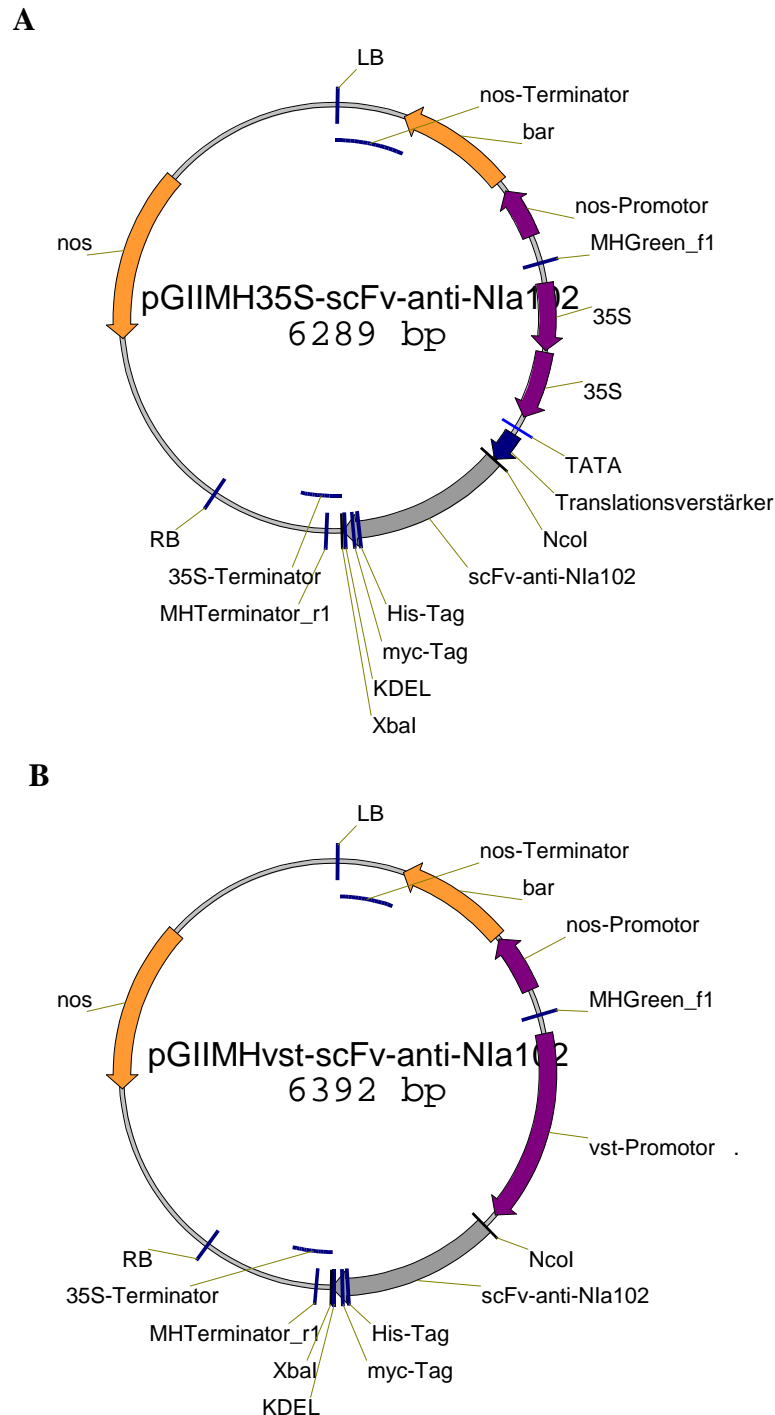


Abb. 3.34. pGIIMH35S-scFv- α -Nla102 (A) und pGIIMHvst-scFv- α -Nla102 (B). Die binären Vektoren enthalten den Antikörper scFv- α -Nla102 für die Expression in Pflanzen unter der Kontrolle eines konstitutiven 35S- (A) und eines induzierbaren *vst*-Promotors (B)

3.4.4. Nachweis der NIa-Protease in potyvirusinfizierten Pflanzen

Es wurde untersucht, ob der scFv- α -NIa102 neben der rekombinanten NIa-Protease des PPV auch die NIa-Protease in PPV-infizierten Pflanzen erkennt. Des weiteren wurde untersucht, ob der Antikörper neben der PPV NIa-Protease die NIa-Protease weiterer Potyviren erkennt.

3.4.4.1. PPV- und PVY-infizierte Tabakpflanzen

Junge Blätter von mit PPV- und PVY-infizierten Tabakpflanzen sowie nicht infizierten Tabakpflanzen wurden 10 Tage nach der Infektion abgeerntet und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Blätter von PPV-infizierten Tabakpflanzen waren leicht eingerollt. Bei PVY-infizierten Tabakpflanzen waren die Blätter gelblich und z.T. eingerollt (Abb. 3.35.).

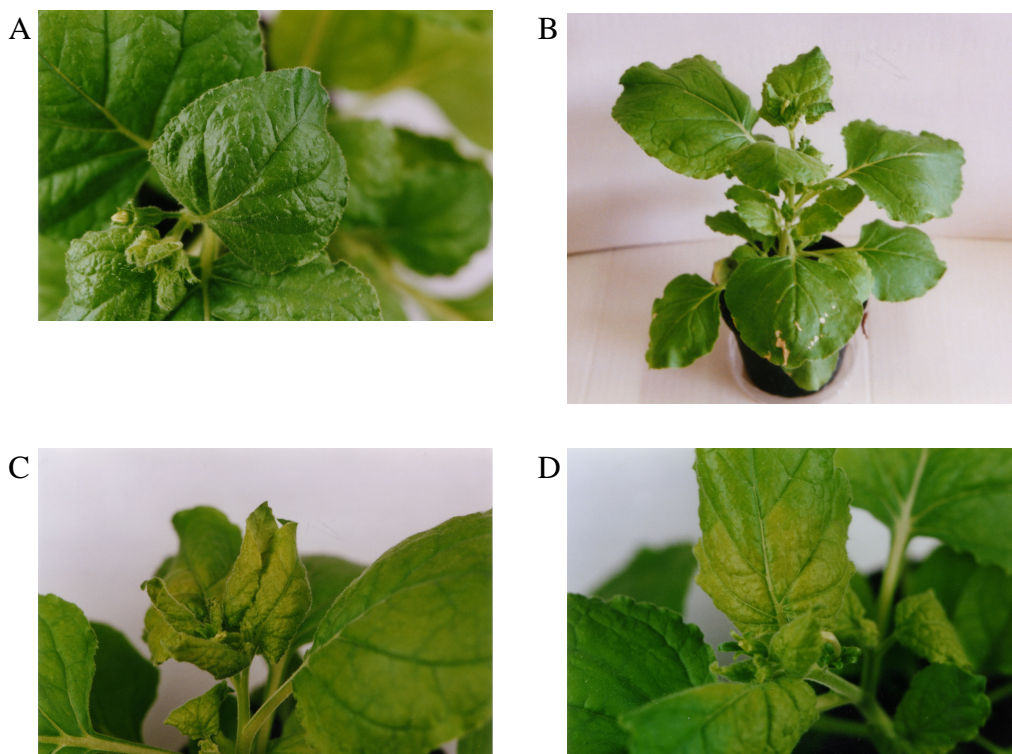


Abb. 3.35. Tabakpflanzen. A: Blätter nicht infizierter Tabakpflanzen, B: PPV infizierte Tabakpflanze, C und D: Blätter PVY infizierter Tabakpflanzen

Aus den Pflanzen wurde Gesamtprotein isoliert und dieses mittels 15 % SDS-PAGE (Abb. 3.36) aufgetrennt.

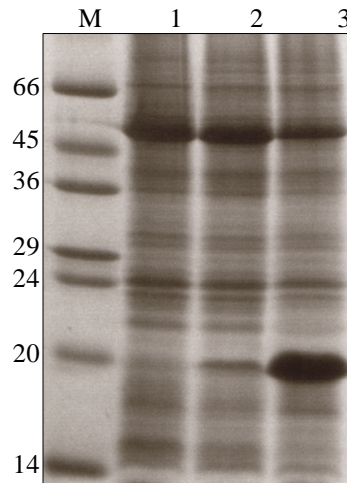


Abb. 3.36. SDS-PAGE von Gesamtprotein aus Tabak, sowie PPV- und PVY-infiziertem Tabak. Es wurden jeweils 160 µg Gesamtprotein, die nicht Harnstoff behandelt wurden, mittels 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Spur 1: Tabak, nicht infiziert, Spur 2: Tabak, PPV-infiziert, Spur 3: Tabak, PVY-infiziert.

In der SDS-PAGE sind die großen ~56 kDa Untereinheiten der Rubisco (Voet und Voet, 1994) zu sehen. Bei PVY-infiziertem Tabak ist eine ~20 kDa Bande zu sehen, diese ist auch noch bei PPV-infiziertem Tabak zu sehen, nicht jedoch bei den nicht infizierten Pflanzen. Kein Potyvirus Protein hat ein Molekulargewicht von ~20 kDa.

Das Hüllprotein des PPV wurde mittels Immunfärbung nachgewiesen (Abb. 3.37), hier wurden mit Harnstoff behandelte Proben mittels 15 % SDS-Page aufgetrennt.

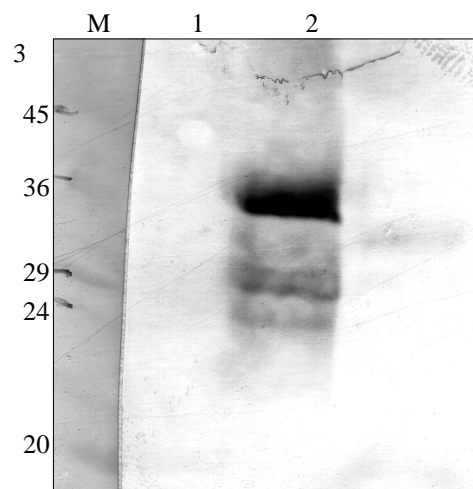


Abb. 3.37. Immunfärbung des PPV Hüllproteins. Harnstoff behandelte Gesamtproteinproben wurden mittels 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF geblotet. Immunfärbung des PPV Hüllprotein (Kaninchen α -PPV-CP 1:400 in Blotto, Ziege α -Kaninchen IgG AP 1:1000 in Blotto). Spur 1: Tabak, nicht infiziert, Spur 2: Tabak, PPV-infiziert, Spur 3: Tabak, PVY-infiziert.

Bei PPV wurde in der Immunfärbung das 36 kDa Hüllprotein erkannt. Es gab jedoch schwache Kreuzreaktionen des polyklonalen Antikörpers, denn bei PVY-infizierten Pflanzen wurde ein ~33 kDa Protein erkannt. Bei nicht infiziertem Tabak wurde kein Protein erkannt, es gab auch keine Kreuzreaktionen.

Der Nachweis der 27 kDa NIa-Protease, des 49 kDa NIa oder eines Vorläuferproteins in den PPV-infizierten Tabakpflanzen mit dem scFv- α -NIa102 im Westernblot war nicht möglich (Immunfärbung hier nicht gezeigt). Eine Immunfärbung von Gesamtprotein aus PPV- und PVY-infizierten Pflanzen mittels Dot-Blot war möglich (siehe 3.4.4.2.), wobei die Behandlung der Proben mit 8 M Harnstoff zu stärkeren Signalen bei der Immunfärbung der Dot-Blots führte (hier nicht gezeigt).

3.4.4.2. Nachweis von potyvirusinfizierten Pflanzen mittels Dot-Blot

Es wurde untersucht, ob der scFv- α -N1a102 neben Tabak, infiziert mit den Potyviren PPV und PVY, weitere potyvirusinfizierten Pflanzen erkennt. Hierzu wurde Gesamtprotein aus folgenden virusinfizierten Pflanzen isoliert:

Virus	Stamm	Wirtspflanze
<i>Bean common mosaic virus</i> (BCMV)	PSTV	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>Bean common mosaic virus</i> (BCMV)	AzMV	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>Bean yellow mosaic virus</i> (BYMV)	Bohnenhülsen	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Carrot thin leaf virus</i> (CRTLTV)	Pastinak Isolat	<i>Chenopodium quinoa</i>
<i>Celery mosaic virus</i> (CeMV)	Bos	<i>Ammi majus</i>
<i>Celery mosaic virus</i> (CeMV)	GreeceI	<i>Apium graveolens</i>
<i>Endive necrotic mosaic virus</i> (ENMV)	Eissalat	<i>Chenopodium quinoa</i>
<i>Leak yellow stripe virus</i> (LYSV)	Aa22	<i>Allium porrum</i>
<i>Leek yellow stripe virus</i> (LYSV)	Madagascar	<i>Chenopodium quinoa</i>
<i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV)	Ve	<i>Chenopodium quinoa</i>
<i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV)	Greek endive	<i>Chenopodium quinoa</i>
<i>Onion yellow dwarf virus</i> (OYDV)		<i>Allium cepa</i>
<i>Plum pox virus</i> (PPV)		<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>Potato virus Y</i> (PVY)		<i>Nicotiana benthamiana</i>
„Salatpotyvirus“	Hehn2	<i>Chenopodium quinoa</i>
„Salatpotyvirus“	Weser Ems	<i>Chenopodium quinoa</i>
<i>Sweet potato chlorotic fleck virus</i> (SPCFV)	TN340	<i>Chenopodium quinoa</i>
<i>Sweet potato feathery mottle virus</i> (SPFMV)	46b	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>Sweet potato latent virus</i> (SPLV)	Taiwan	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>Sweet potato mild mottle virus</i> (SPMMV)	DDR	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>Turnip mosaic virus</i> (TuMV)	2950	<i>Nicotiana benthamiana</i>

Tab. 3.10. Übersicht über alle virusinfizierten Pflanzen. Die beiden „Salatpotyviren sind noch nicht charakterisiert worden und haben noch keinen wissenschaftlichen Namen. SPMMV gehört nicht zu der Gattung *Potyvirus*, sondern zur Gattung *Ipomovirus* der Familie *Potyviridae*.

Es wurden Dot-Blots mit jeweils 100 µg Gesamtprotein, bzw. 5 µg bei der rekombinanten NIa-Protease je Dot hergestellt. Abbildung 3.38. zeigt den Dot-Blot II (vergl. Tab. 3.11.) und die dazugehörige Kontrolle.

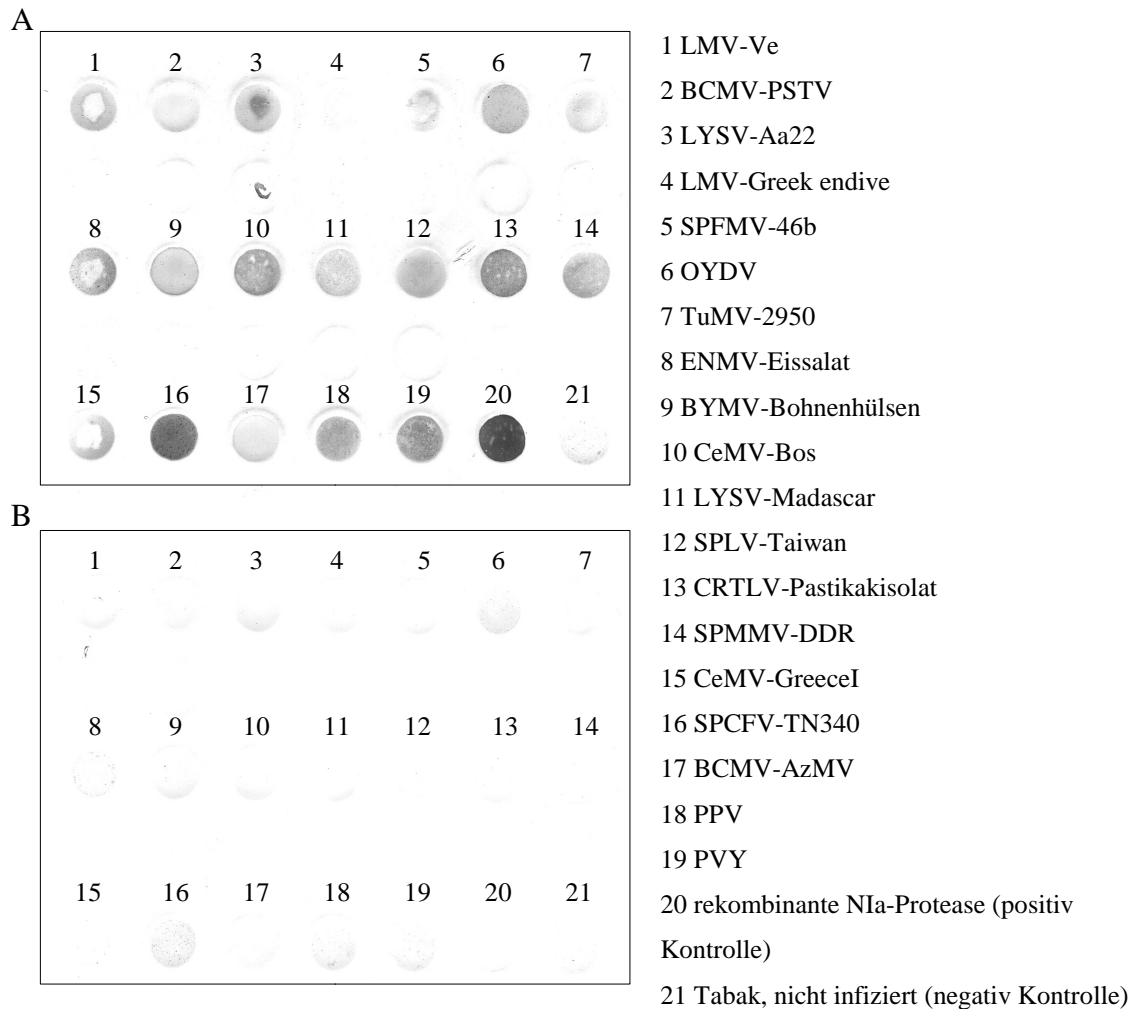


Abb. 3.38. Dot-Blot von 19 potyvirusinfizierten Pflanzen. Auf die Dot-Blots wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein aus den virusinfizierten Pflanzen, bzw. 5 µg der rekombinanten NIa-Protease aufgetragen. Blot A wurde mit dem scFv-Phagen- α -NIa102 angefärbt, Blot B nur mit dem sekundären und tertiären Antikörper. Immunfärbung der NIa-Protease (scFv-Phagen- α -NIa102 1:250 ($1,6 \times 10^{11}$ pfu) in Blotto, Maus α -M13 1:1000 in Blotto, Ziege α -Maus IgG AP 1:1000 in Blotto)

Am besten wurden in diesem Dot-Blot die Gesamtproteinextrakte aus PPV-, PVY-, SPCFV- und CRTLV-infiziertem Tabak mit dem scFv- α -NIa102 angefärbt. Eine Kontrolle, die nur mit dem sekundären und dem tertiären Antikörper angefärbt wurde, war nötig, da bei zu langer Inkubation (>30 min) der polyklonale α -Maus IgG AP Antikörper eine Färbung der Dots hervorruft. Es wurden Kaninchen α -Maus IgG AP und Ziege α -Maus IgG AP als jeweils

einzigster Antikörper getestet (Immunfärbung hier nicht gezeigt). Beide α -Maus IgG AP Antikörper führten zu einer unspezifischen Färbung bei sehr langer Inkubation (>30 min). Bei den beiden „Salatpotyviren“ (bisher nicht charakterisierte Potyviren, die aus *Lactuca sativa* isoliert wurden, persönliche Mitteilung Dr. H. J. Vetten), kam es zu einer intensiven Färbung der Dots durch den tertiären Antikörper (Abb. 3.39.).

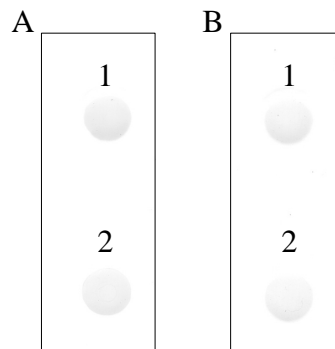


Abb. 3.39. Dot-Blot der Gesamtproteinextrakte aus „Salatpotyviren“-infizierten Pflanzen. Auf die Dot-Blots wurden jeweils 100 μ g Gesamtprotein aus den virusinfizierten Pflanzen aufgetragen. Blot A wurde mit dem scFv-Phagen- α -Nla102 angefärbt, Blot B nur mit dem sekundären und tertiären Antikörper. Immunfärbung der Nla-Protease (scFv-Phagen- α -Nla102 1:200 ($1,28 \times 10^{11}$ pfu) in Blotto, Maus α -M13 1:1000 in Blotto, Ziege α -Maus IgG AP 1:1000 in Blotto)

Die Intensität der angefärbten Dots von drei Dot-Blots wurden densitometrisch mittels der Software Scanpack II gemessen und in Relation zu dem gemessenen Wert der Tabak-Kontrolle gesetzt. (Tab. 3.11.).

Potyvirus	Signal- intensität* Blot I	Signal- intensität* Blot II	Signal- intensität* Blot III	Ø Signal- intensität	Standard- abweichung
LMV-Ve	0,65	4,90	1,51	2,35	2,24
BCMV-PSTV	1,58	2,74	2,62	2,31	0,64
LYSV-Aa22	2,49	7,86	8,09	6,15	3,17
LMV-Greek endive	0,89	0,28	5,46	2,21	2,83
SPFMV-46b	0,67	2,20	3,49	2,12	1,41
OYDV	2,63	7,92	7,34	5,96	2,90
TuMV-2950	2,18	2,17	2,53	2,29	0,20
ENMV-Eissalat	1,96	7,03	2,83	3,94	2,71
BYMV	1,61	6,05	2,49	3,38	2,35
CeMV-Bos	1,88	10,39	5,06	5,78	4,30
LYSV-Madascar	0,47	4,76	1,72	2,32	2,20
SPLV	2,00	8,84	9,76	6,87	4,24
CRTL V	4,25	12,95	5,11	7,44	4,79
SPMMV-DDR	1,24	7,17	4,58	4,33	2,98
CeMV-Greecel	1,62	3,70	6,16	3,82	2,27
SPCFV-TN340	4,28	18,08	6,35	9,57	7,45
BCMV-AzMV	1,45	3,59	2,45	2,49	1,07
PPV	4,13	8,95	6,21	6,43	2,42
PVY	3,78	12,48	6,48	7,58	4,45
PPV-NIa	12,75	24,33	- ⁺	18,54	8,19
Tabak-Kontrolle	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00

Tab. 3.11. Auswertung von drei Dot-Blots (Immunfärbung der NIa-Protease von 19 potyvirusinfizierten Pflanzen). * Die gemessenen Werte wurde in Relation zur Tabak-Kontrolle gesetzt. + Hier wurde anstatt aufgereinigter, rekombinanter PPV NIa-Protease Gesamtprotein aus der Überexpression von BLR(DE3)-pETMHNiA eingesetzt.

Zur besseren Darstellung wurden die durchschnittlichen relativen Signalintensitäten in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 3.40.).

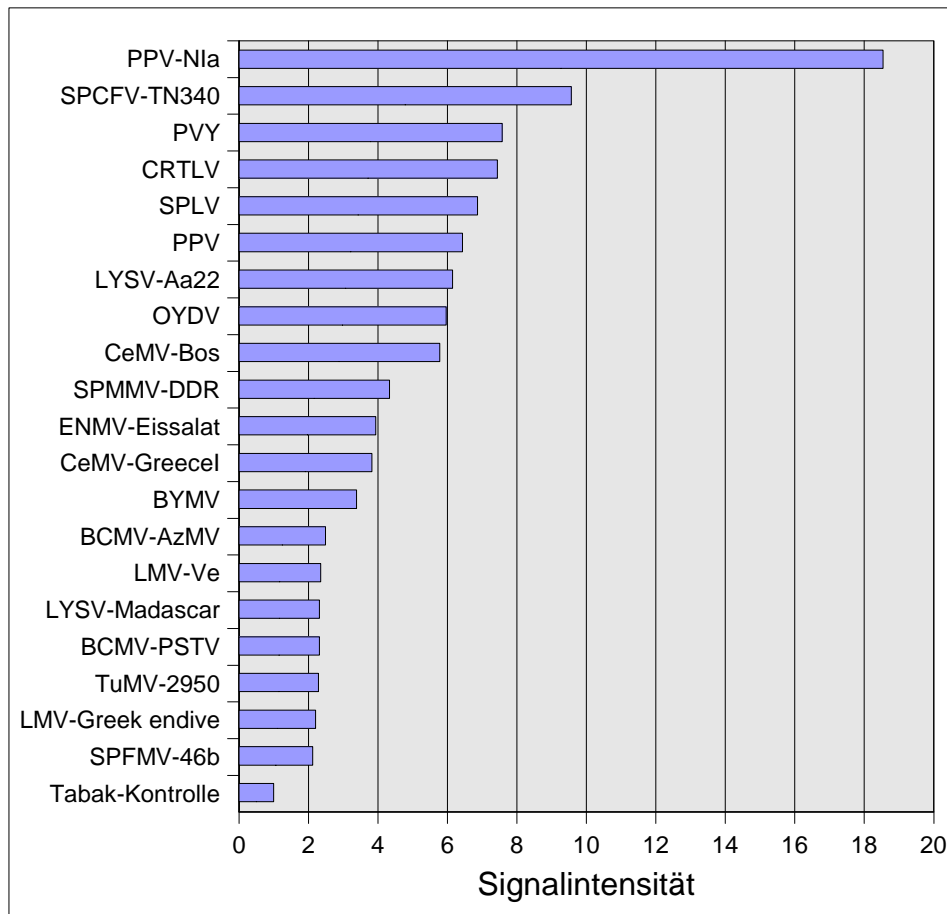


Abb. 3.40. Auswertung der Dot-Blots von 19 potyvirusinfizierten Pflanzen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der gemessenen Intensitäten der Dots. Die gemessenen Werte wurden in Relation zur Tabak-Kontrolle angegeben.

Die Gesamtproteinextrakte aller potyvirusinfizierten Pflanzen wurden im Durchschnitt mindestens doppelt so intensiv angefärbt wie die Tabak-Kontrolle. Die gemessenen Signalintensitäten schwankten z.T. jedoch beträchtlich. Sehr gut erkannt wurden die Gesamtproteinextrakte aus SPCFV-, PVY, CRTLv-, SPLV-, PPV-, LYSV-Aa22-, OYDV- und CeMV-Bos-infizierten Pflanzen. Hier lagen die gemessenen durchschnittlichen Signalintensitäten mindestens fünfmal über denen der Tabak-Kontrolle. Schwächere Signale gab es bei BCMV-AzMV, LMV-Ve, LYSV-Madagascar, BCMV-PSTV, TuMV-2950, LMV-Greek endive und SPFMV-46b. Hier lagen die gemessenen durchschnittlichen Signalintensitäten mindestens doppelt über denen der Tabak-Kontrolle.

Der scFv- α -NIa102 erkennt die NIa-Protease im Gesamtproteinextrakt aller untersuchten potyvirusinfizierten Pflanzen.

3.4.5. Untersuchung des Prozessierungsverhalten der PPV NIa-Protease *in vivo*

Immunfärbungen der NIa-Protease mit dem scFv- α -Nia102 zeigten, daß nicht nur die 27,3 kDa NIa-Protease erkannt wurde, sondern auch ein kleineres Protein (Abb. 3.23.). Kim *et al.* (1996b) postulierten für PPV eine C-terminale Prozessierung in zwei Schritten. Die Schnittstellen in der PPV NIa-Protease sollen an folgenden Positionen am C-Terminus (* Schnittstelle zum NIb, die 7 AS **Erkennungssequenz** ist rot markiert, ¹ 1. Prozessierung, ² 2. Prozessierung) liegen:

QWRYNP²DEVCWGS¹LQLKRDIPQ¹SPFTICKLLTDL²DGEFVYTQ*S

Um die Prozessierung des PPV *in vivo* in *E.coli* zu untersuchen, wurde die NIa-Protease, codiert auf pETMHNia, überexprimiert. 200 ml Kultur von Kultur von BLR(DE3)-pETMHNia wurden bei OD₆₀₀ 0,5 mit 1 mM IPTG induziert. Es wurden 10 ml Kultur nach 0 h (vor IPTG-Zugabe), 1 h (nach IPTG-Zugabe), 2 h, 3 h, 4 h, 20 h, 28 h und 40 h genommen und Gesamtprotein isoliert. Jeweils 100 μ g Gesamtprotein wurden mittels 18 % SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF geblottet und die NIa-Protease mit dem scFv-Phagen- α -Nia102 immungefärbt (Abb. 3.41.).

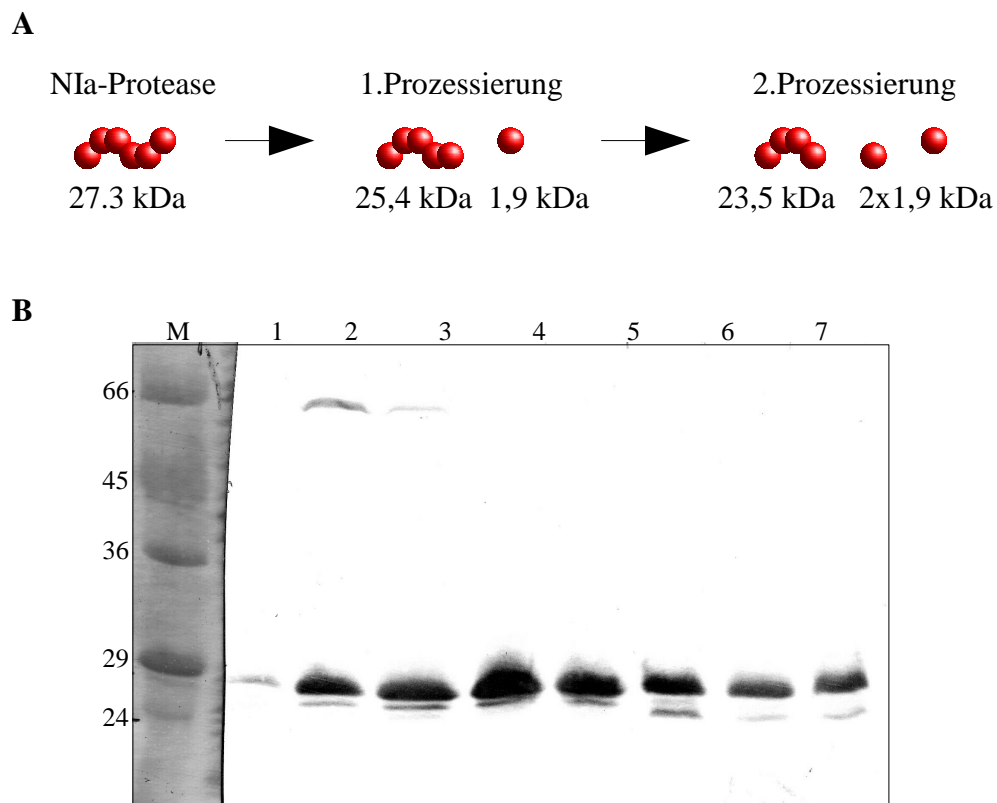


Abb. 3.41. Prozessierung der NiA-Protease *in vivo*. A: Erwartete Prozessierungsprodukte. B: Immunfärbung der NiA-Protease (scFv-Phagen- α -Nia102 1:1000 ($\rightarrow 2 \times 10^9$ cfu gesamt) in Blotto, Maus α -M13 in Blotto, Kaninchen α -Maus IgG AP 1:1000 in Blotto). Auf die 18 % SDS-Page wurden jeweils 100 μ g Gesamtprotein von BLR(DE3)-pETMHNiA aufgetragen und auf PVDF geblottet. Spur 1: 0 h, Spur 2: 1 h, Spur 3: 2 h, Spur 4: 3 h, Spur 5: 4 h, Spur 6: 20 h, Spur 7: 28 h, Spur 8: 40 h

Nach 1 h Induktion konnten drei Proteine immungefärbt werden, die 27,3 kDa NiA-Protease und die 25,4 kDa Protease nach der 1. Prozessierung, sowie das 67,5 kDa Fusionsprotein. Nach 20 h Induktion war die 27,3 kDa und 23,5 kDa NiA-Protease nachweisbar, die 25,4 kDa Protease war fast verschwunden. Nach 28 h Induktion war nur noch die 27,3 kDa NiA-Protease und die 23,5 kDa NiA-Protease des 2. Prozessierungsschritts vorhanden. Da in den Plasmiden pETMHNiA und pETMHNiA der NiA-Protease am C-Terminus die Aminosäuren VYTQ fehlte, beträgt das Molekulargewicht der NiA-Protease *in natura* 27,6 kDa und das des abgetrennten Fragments nach der ersten Prozessierung 2,2 kDa.

Das von Kim *et al.* (1996b) postulierte Prozessierungsverhalten für die NiA-Protease des PPV konnte *in vivo* mittels des rekombinanten Antikörpers scFv- α -Nia102 bestätigt werden.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeiten war die Herstellung eines rekombinanten Antikörpers (scFvs) gegen die NIa-Protease des *Plum pox virus* (PPV). Ein rekombinanter Antikörper gegen die NIa-Protease ist für zahlreiche Anwendungsgebiete nützlich:

- potyvirusresistente Pflanzen
- Diagnostik von potyvirusinfizierten Pflanzen
- Grundlagenforschung an der NIa-Protease

4.1. Expression der NIa-Protease in *Escherichia coli*

Die Expression der NIa-Protease war die Grundlage für das Panning auf Nitrozellulose, das Panning in ELISA-Vertiefungen und das *in vivo* Panning. Für das Panning auf Nitrozellulose war die Expression der NIa-Protease in *E.coli* ausreichend, eine weitere Aufreinigung des Antigens war nicht nötig. Für das Panning in ELISA-Vertiefungen hingegen wurde aufgereinigte NIa-Protease als Antigen benötigt. Für das *in vivo* Panning war der Nachweis nötig, daß die NIa-Protease in *E.coli* aktiv, das heißt zur Prozessierung fähig ist.

Das *nia*-Gen des PPV, codiert auf pEXN_{ia}, wurde hinter die Tags (Trx-Tag, S-Tag, His-Tag) von pET32a(+) kloniert. Der Vektor pET32a(+) ermöglicht die Expression von Proteinen unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Die nötige T7-Polymerase ist auf dem Wirtsbakterium, z.B. BLR(DE3), codiert, steht unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors und kann mit IPTG induziert werden (Baneyx 1999). Es wurden zwei Plasmide hergestellt: das Plasmid pETMHN_{ia}2 enthielt die N-terminale NIa-Site zwischen dem 49,5 kDa NIa und den 18 kDa Tags. Das Plasmid pETMHN_{ia} hingegen enthielt diese NIa-Site nicht, sondern nur die interne NIa-Site zwischen dem 22 kDa VPg und der 27,3 kDa NIa-Protease.

Die Fusionsproteine, codiert auf pETMHN_{ia} und pETMHN_{ia}2, konnten in *E.coli* BLR(DE3) überexprimiert werden. In der SDS-PAGE waren die erwarteten Prozessierungsprodukte der Fusionsproteine als deutliche Banden zu erkennen. Erwartet wurden bei pETMHN_{ia} die 27,3 kDa NIa-Protease und ein 39,5 kDa Fusionsprotein aus Tags und VPg, bei pETMHN_{ia}2 wurden gleichfalls die 27,3 kDa NIa-Protease erwartet, sowie die 18 kDa Tags und das

22,2 kDa VPg einzeln. Die freigesetzten Tags, das 39 kDa Fusionsprotein bei pETMHNiA und die freien 18 kDa Tags bei pETMHNiA2, konnten mittels Immunfärbung des His-Tags nachgewiesen werden. Die interne NIa-Site von TEV stellt verglichen mit der C-terminalen und der N-terminalen NIa-Site ein schwach prozessiertes Substrat dar, da die Aminosäuresequenz von der Konsensussequenz EXXYXQ*G/S abweicht (Schaad *et al.* 1996). Die C-terminale und auch die interne NIa-Site von PPV wurden jedoch in *E.coli* erkannt und prozessiert. Die PPV NIa-Protease war folglich in *E.coli* aktiv. Sie befand sich jedoch ausschließlich im Pellet. Der NIa und die NIa-Protease von PPV konnte auch von García *et al.* (1989a; 1989b; 1990) und Pérez-Martin (1997) in *E.coli* exprimiert werden. Die Expression des NIa (Laliberte *et al.* 1992), bzw. der NIa-Protease (Kim *et al.* 1995) in *E.coli* gelang auch bei TuMV und dem Pepper vein banding potyvirus (PVBV) (Joseph und Savithri). Parks *et al.* (1995) hingegen waren nicht in der Lage, den 49 kDa NIa des TEV in *E.coli* zu überexprimieren, sie konnten nur die 27 kDa NIa-Protease exprimieren. Diese befand sich jedoch im Bakterienpellet und im lösliche Überstand. Eine Alternative zur Expression in *E.coli* ist die *in vivo* Transkription und Translation (Melton *et al.* 1984). Der NIa von PPV (García *et al.* 1992), TEV (z.B. Carrington und Dougherty 1987b; Dougherty *et al.* 1989a; Parks und Dougherty 1991; Restrepo-Hartwig und Carrington 1992; Rorrer *et al.* 1992), *Soybean mosaic virus* (SMV) (Ghabrial *et al.* 1990), TuMV (Kim *et al.* 1998) und TVMV (Parks und Dougherty 1991; Hwang *et al.* 2000) konnte mittels *in vivo* Transkription und Translation synthetisiert werden.

Mit der Expression des NIa in *E.coli* und dem Nachweis der Prozessierung durch die NIa-Protease waren die Voraussetzungen für das Panning auf Nitrozellulose, das Panning in ELISA-Vertiefungen, sowie für das *in vivo* Panning gegeben.

4.2. Das *in vivo* Panning

Mit dem *in vivo* Panning sollte eine neue Methode in der Selektion von Antikörpern entwickelt werden. Die NIa-Protease besitzt die Fähigkeit, sich selbst aus einem Polyprotein zu prozessieren (Dougherty *et al.* 1989b, Rorrer *et al.* 1992). Diese Fähigkeit sollte genutzt werden, um Antikörper aus einer Antikörper Bibliothek gegen die NIa-Protease zu selektieren. Hierzu wurde das Gen für den NIa mit einem Marker-Gen fusioniert. Als visueller Marker

wurden das α -Komplement der β -Galaktosidase (Langley *et al.* 1975) und das „green fluorescent protein“ (GFP) der Qualle *Aequorea victoria* (Helm *et al.* 1995) gewählt. Es entstand so ein Fusionsprotein aus dem NIa und dem Marker mit der Erkennungssequenz der NIa-Protease zwischen den beiden Teilen des Fusionsproteins. Wenn die NIa-Protease aktiv ist, sollte der Marker mittels der cis-Prozessierung freigesetzt und phänotypisch sichtbar werden. Die Bakterien sollten mit den scFv-Phagen der „Griffin 1.library“, einer synthetischen Antikörperbibliothek (Griffiths *et al.* 1994), infiziert werden. Die Bakterienzellen, die den Antikörper exprimieren, der die NIa-Protease inhibiert, sollten anhand ihres Phänotyps, bei dem der Marker nicht mehr freigesetzt wird, identifiziert werden.

Für das *in vivo* Panning wurden jeweils fünf Plasmide mit dem Gen für das α -Komplement der β -Galaktosidase und dem *gfp*-Gen konstruiert. Die Plasmide pTBMHNIa1 bis pTBMMNIa4 auf der Basis von pTrueBlue (Slilaty und Lebel 1998) für die Blau-Weiß Selektion erlaubten keine eindeutige Unterscheidung zwischen den Bakterien, in denen das α -Komplement freigesetzt werden sollte (pTBMHNIa2 und pTBMHNIa4) und denen mit den Kontrollplasmiden (pTBMHNIa1 und pTBMHNIa3), in denen das α -Komplement nicht freigesetzt werden sollte. Die Bakterienkolonien waren weder eindeutig blau, noch eindeutig weiß. Die α -Komplementation fand offensichtlich trotz der Fusion mit dem NIa statt. Durch die Integration der N-terminalen NIa-Site in das α -Komplement (pTBMHNIa5) wurde dieses zerstört, obwohl die Integrationsstelle außerhalb der „100% accuracy position“ (Integrationen in diesem Bereich führen zu 100 % zu einer Inaktivierung des α -Komplements (Slilaty und Lebel 1998)) lag. Ein Nachweis der Aktivität der NIa-Protease in *E.coli* durch eine Spaltung des α -Komplements war somit nicht möglich. Die Plasmide auf der Basis von pTrueBlue konnten folglich nicht für ein *in vivo* Panning genutzt werden.

Wenn der NIa vor das GFP kloniert wurde, leuchteten die Bakterien mit dem Plasmid pHNTMHNIa2, das die C-terminale NIa-Site zwischen dem NIa und dem GFP besitzt. Die mit dem Kontrollplasmid pHNTMHNIa1, das keine NIa-Site zwischen dem NIa und dem GFP besitzt, transformierten Bakterien leuchteten nicht auf dem UV-Tisch. Wurde die Inkubation bei 37 °C durchgeführt, war die Fluoreszenz bei NM522-pHNTMHNIa2 fast nicht mehr vorhanden. Dies ist naheliegend, da die NIa-Protease ein Temperaturoptimum von 15 °C hat (Kim *et al.* 1996a). Bei hohen Temperaturen nimmt die Aktivität der NIa-Protease ab. Dies führt bei NM522-pHNTMHNIa2 zu einer verminderten Freisetzung des GFPs. Wenn der NIa hinter das GFP kloniert wurde, leuchteten die Bakterien NM522-pHNTMHNIa4 mit der

N-terminale NIa-Site nur sehr schwach, die Kontrolle NM522-pHNTMHNiA3 hingegen nicht. Ein Ursache für die verschieden starke Fluoreszenz bei pHNTMHNiA2 (C-terminale NIa-Site NIa/NIb) und pHNTMHNiA4 (C-terminale NIa-Site 6K2/NIa) kann eine unterschiedlich schnelle Prozessierung der NIa-Sites sein, denn Dougherty und Parks (1989) stellten *in vitro* für TEV fest, daß die NIa-Site zwischen dem HC-Pro und P3 ($T_{1/2} \sim 27$ min, bei 30 °C) langsamer prozessiert wird als die NIa-Site zwischen NIb und CP ($T_{1/2} \sim 5$ min). Diese Halbwertszeiten sind jedoch nicht direkt übertragbar auf die Expression und die Prozessierung der GFP-NIa Fusionsproteine, denn es handelt sich um unterschiedliche Systeme (*in vitro/ in vivo*), unterschiedliche Potyviren (TEV/ NIa) und unterschiedliche NIa-Sites (HC-Pro/P3, NIb/CP/ 6K2/NIa, NIa/NIb). Die interne NIa-Site zwischen dem VPg und der NIa-Protease wird verglichen mit der N-terminalen und C-terminalen nur schwach prozessiert (Schaad *et al.* 1996). Die Aminosäuresequenz außerhalb der NIa-Site bei PPV hat auch ein Einfluß auf die Prozessierungsrate durch die NIa-Protease (Garcia *et al.* 1989c; Garcia *et al.* 1992). Dies kann eine weitere Ursache für die unterschiedlich starke Fluoreszenz sein.

In der Immunfärbung des GFPs mit dem Antikörper Maus α -GFP konnte nur in den Gesamtproteinextrakten aus NM522-pHNT und NM522-pHNTMHNiA2 das GFP nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Immunfärbung bestätigten die Fluoreszenzdaten. Die beiden monoklonalen Antikörper Maus α -GFP binden offensichtlich im Bereich des Chromophors oder erkennen nur ein korrekt gefaltetes, das heißt fluoreszierendes GFP, andernfalls müßten sie das Fusionsprotein aus NIa und GFP auch erkennen. Das Chromophor des GFPs wird durch Zyklisierung der Aminosäuren Serin65, Tyrosin66 und Glycin67 in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff gebildet (Heim *et al.* 1994). Das NIa behindert folglich die Bildung eines fluoreszierenden GFPs. Erst durch die Prozessierung des Fusionsproteins und damit der Abspaltung des GFPs durch die NIa-Protease kann sich das Chromophor bilden. Als Fusion mit einigen anderen Proteinen, z.B. β -Glucuronidase (Quaedvlieg *et al.* 1998) oder sogar scFvs (Schwalbach *et al.* 2000), kann das GFP als Fusionsprotein einen funktionsfähigen Chromophor bilden, wenn auch z.T. nur in Anwesenheit eines Linkerpeptids (Cubitt *et al.* 1995). Die Integration der künstlichen NIa-Site im Plasmid pHNTMHNiA5 führte zur Zerstörung des GFPs. Somit war die Überprüfung der Arbeitshypothese, die Aktivität der NIa-Protease in *E.coli* kann durch eine Spaltung des GFPs nachgewiesen werden, nicht möglich.

Die scFvs der „Griffin 1. library“ werden mittels der pelB-Leitsequenz (Lei *et al.* 1987) in das

Periplasma transportiert (Griffiths *et al.* 1994). Somit war es nötig, das NIa-GFP Fusionsprotein gleichfalls in das Periplasma zu transportieren. Hierzu wurde vor das GFP, codiert auf den Plasmiden pHNT, pHNTMHN1a1 und pHNTMHN1a2, die pelB-Leitsequenz kloniert. Die Auswertung der GFP-Aktivität erfolgte visuell. Nur die Ausstriche der Bakterien NM522-pHNTMHN1a2_pelB leuchteten schwach auf dem UV-Tisch. Auch in der Immunfärbung konnte nur bei diesen Bakterien das GFP nachgewiesen werden. Die nicht vorhandene Fluoreszenz bei NM522-pHNT_pelB zeigt, daß das GFP im Periplasma nicht aktiv ist. Die nicht erfolgte Immunfärbung des GFPs im Gesamtproteinextrakt von NM522_pelB ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die beiden monoklonalen Maus α -GFP Antikörper nur korrekt gefaltetes GFP erkennen. Wenige Monate nach dem diese Experimente durchgeführt wurden, konnten Feilmeier *et al.* (2000) ebenfalls zeigen, daß das GFP im Periplasma nicht fluoresziert. Sie transportierten das GFP mittels der Maltosebindeprotein (MBP)-Signalsequenz in das Periplasma, isolierten das nicht fluoreszierende GFP, denaturierten es und waren in der Lage dies so zu renaturieren, daß es wieder eine Fluoreszenz zeigte. Feilmeier *et al.* schlossen daraus, daß das GFP im Periplasma nicht korrekt gefaltet vorliegt.

Die, wenn auch geringe, Fluoreszenz von NM522-pHNTMHN1a2_pelB weist daraufhin, daß die Prozessierung des NIa-GFP-Fusionsproteins schneller erfolgt, als der Transport in das Periplasma.

Ein *in vivo* Panning mit GFP als Marker kann nicht funktionieren, wenn das GFP und der scFv im Periplasma vorliegen. Ein *in vivo* Panning mit GFP wäre nur im Cytoplasma möglich. Hierfür müßte jedoch die komplette „Griffin 1. library“ in ein Expressionsvektor umklont werden, in dem die pelB-Leitsequenz fehlt. Eine Alternative hierzu wäre der Transport des GFPs mittels des „twin arginine translocationen“ (Tat) Weges in das Periplasma. Mit dieser Methode gelang es Santini *et al.* (2001), das GFP so in das Periplasma zu transportieren, daß es fluoreszierte.

4.3. Das „klassische“ Panning

Beim „klassischen“ Panning wurden zwei Methoden gewählt, das Panning auf Nitrozellulose (Hawlich *et al.* 2001) und das Panning in ELISA-Vertiefungen (Sparks *et al.* 1996).

Das Panning auf Nitrozellulose bietet die Möglichkeit Antikörper zu selektieren, ohne das Antigen vorher aufzureinigen. Hierfür wurde Gesamtprotein der Überexpression der N1a-Protease, codiert auf pETMHN1a2, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose gebロットet. Die Nitrozellulose wurde mit Ponceau gefärbt, die N1a-Protease ausgeschnitten und in Blotto abgesättigt. Die N1a-Protease Nitrozellulosestreifen wurden als Antigen für das Panning eingesetzt. Die Anzahl der eluierten scFv-Phagen ist sehr hoch verglichen mit denen im Panning in ELISA-Vertiefungen, auch ist kein nennenswerter Anstieg in der Anzahl der eluierten scFv-Phagen vorhanden. Nach Breitling und Dübel (1997) sollte der Phagentiter innerhalb von 6 Panningrunden von $\sim 10^4$ eluierten scFv-Phagen auf bis zu $\sim 10^8$ ansteigen, dies war beim Panning auf Nitrozellulose nicht der Fall. Eine Anreicherung von Antikörpern gegen die N1a-Protease hat nicht stattgefunden, denn mit den amplifizierten scFv-Phagen der 5. Panningrunde konnte das Antigen nicht immungefärbt werden. Hawlich *et al.* (2001) haben diese Methode für ein Panning mit scFv-Phagen einer Bibliothek, die aus mit dem Antigen C3a immunisierten Mäusen stammt, genutzt. Diese Methode wurde von ihnen noch nicht mit einer naiven oder synthetischen Antikörperbibliothek angewendet (persönliche Mitteilung Dr. Hawlich). Beim Panning auf Nitrozellulose kann es verglichen mit dem Panning in ELISA-Vertiefungen zu mehr unspezifischen Bindungen kommen (persönliche Mitteilung Dr. Hawlich), dies erklärt auch die hohen Titer der eluierten scFv-Phagen beim Panning auf Nitrozellulose verglichen mit dem Panning in ELISA-Vertiefungen. Das Panning auf Nitrozellulose war im vorliegenden Fall nicht geeignet für die Selektion von scFvs gegen die N1a-Protease aus einer synthetischen Antikörper-Bibliothek.

Für das Panning in ELISA-Vertiefungen war es nötig, daß Antigen aufzureinigen. Die N1a-Protease, codiert auf pETMHN1a2, wurde überexprimiert und das Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden der drei Prozessierungsprodukte Tags, VPg und N1a-Protease waren eindeutig im Polyacrylamidgel zu identifizieren. Die Bande der 27,3 kDa N1a-Protease wurde aus dem Gel ausgeschnitten, das Protein eluiert und gefällt. Die so aufgereinigte N1a-Protease enthält immer noch Spuren von bakteriellen Proteinen. Als Positiv-Kontrolle für das Panning wurde humanes Thyroglobulin gewählt, da Griffiths *et al.* (1994) aus ihrer Antikörper-Bibliothek, die die Grundlage für die „Griffin 1. library“ ist,

Antikörper gegen dieses Antigen selektieren konnten.

Der Titer der eluierten scFv-Phagen stieg im Laufe des Pannings stark an. Abgesehen von der ersten Panningrunde entsprach der Anstieg des Phagentiters den Angaben von Breitling und Dübel (1997). Die Anzahl der eluierten scFv-Phagen stieg von der zweiten zur sechsten Panningrunde um den Faktor 8750 bei der NIa-Protease und bei humanen Thyroglobulin um den Faktor 6585 an. Bei der neuen Charge der „Griffin 1. library“ war der Anstieg des Phagentiters um den Faktor 10 geringer. Mehr als $\sim 5 \times 10^8$ scFv-Phagen konnten aus zwei ELISA-Vertiefungen nicht isoliert werden. Dieses Limit wurde schon vor der jeweils letzten Panningrunde erreicht, folglich ist dies offenbar die maximale Anzahl an scFv-Phagen, die in den ELISA-Vertiefungen an das Antigen binden können.

Die Immunfärbungen mit den amplifizierten scFv-Phagen nach den einzelnen Panningrunden zeigten, daß das Gemisch der scFv-Phagen- α -NIa-Protease ab der 4. Panningrunde die NIa-Protease erkannte. Im Fall der scFv-Phagen- α -Thyroglobulin fand die Erkennung schon nach drei Panningrunden statt. Drei bis sechs Panningrunden sollten ausreichen um einen Antikörper mit ausreichender Spezifität und Affinität zu erhalten (Marks *et al.* 1991; Sparks 1996; Breitling und Dübel 1997), in einigen Fällen waren jedoch bis zu dreizehn Panningrunden nötig (Hawkins *et al.* 1993). Eine Verbesserung könnte durch die Anwendung von „magnetic beads“ erreicht werden, hierbei wird das Antigen an paramagnetische Kugeln anstatt an eine Kunststoffoberfläche gebunden. Die Anwendung von „magnetic beads“ ermöglicht auch eine spezifische kovalente Kopplung des Antigens an die „magnetic beads“, was eine Ausrichtung des Antigens ermöglicht und somit den Antikörpern das gewünschte Epitop präsentiert wird (Wilkinson *et al.* 2000). Beim Panning in ELISA-Vertiefungen hingegen erfolgt die Bindung hauptsächlich über eine passive Adsorption an die Kunststoffoberfläche. Die Bindung an „magnetic beads“ bietet auch verglichen mit der Bindung in ELISA-Vertiefungen ein höheres Oberflächen/Volumen Verhältnis. Dies führt dazu, daß der Anteil an positiven Klonen zwei- bis dreimal so hoch ist, verglichen mit einem Panning in ELISA-Vertiefungen, somit werden weniger Panningrunden benötigt (McConnell *et al.* 1999).

Die Selektion eines einzelnen Antikörpers, der die NIa-Protease erkennt, entwickelte sich schwieriger als erwartet. Sechs zufällig gewählte scFv-Phagen- α -NIa-Protease Klone nach der 6. Panningrunde erkannten die NIa-Protease in der Immunfärbung nicht. Bei der Amplifikation der scFvs traten drei verschieden große Fragmente auf: ~ 950 bp, ~ 650 bp und

~350 bp. Bei einem kompletten scFv sollten es ~950 bp sein, wenn nur eine Kette vorliegt ~650 bp und wenn kein scFv vorhanden ist, sollte das Amplifikat 359 bp lang sein. 70 % der untersuchten scFv-Phagen- α -Nia-Protease Klone enthielten nur die genetische Information für eine Kette, 17 % enthielten einen kompletten scFv und 13 % gar keinen. Die Sequenzierung eines ~650 bp Amplifikates ergab, daß V_H fehlte. Zusätzlich enthielt der Klon einen Leserasterwechsel, er konnte folglich keinen funktionsfähiger Antikörper exprimieren. Würde nur ein V_H exprimiert werden, könnte dies für eine Antigenbindung ausreichen (Ward *et al.* 1989). Das Fehlen des kompletten scFvs wurde mehrfach beschrieben (Seehaus *et al.* 1992; Courtney *et al.* 1995; Dziegiel *et al.* 1995; Krebber *et al.* 1997; Berdichevsky *et al.* 1999). Die Ursache hierfür kann ein nicht kompletter Verdau oder eine Selbstligation des Phagemids bei der Herstellung der Bibliothek sein. Diese Phagen, die kein scFv auf der Oberfläche tragen, werden stärker amplifiziert (Tur *et al.* 2001). Das alleinige Vorhandensein von V_L in einem Phagemidvektor nach einem Panning wurde bisher noch nicht beschrieben.

Aus den amplifizierten scFv-Phagen nach der 6. Panningrunde konnte ein Klon, scFv- α -Nia20, gewonnen werden, der die Nia-Protease schwach erkannte. Nach Durchführung einer weiteren, einer 7. Panningrunde, konnten vier Klone (scFv- α -Nia100, -101, -102, 113) isoliert werden, die die Nia-Protease erkannten. Die Sequenzierung der Klone ergab, daß alle vier genetisch identisch waren (im weiteren Text als scFv- α -Nia102 bezeichnet).

4.4. Der rekombinanten Antikörper scFv- α -Nia102

Es wurde mittels Immunfärbung untersucht, ob der scFv- α -Nia102 die 27 kDa Nia-Protease oder ein bakterielles 27 kDa Protein erkennt, denn die aufgereinigte Nia-Protease enthält immer noch Spuren bakteriellen Proteins. Hierzu wurde Gesamtprotein aus der Überexpression von BLR(DE3), BLR(DE3)-pETMHNia und BLR(DE3)-pETMHNia2 mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDV geblottet. Der scFv- α -Nia102 erkannte in der Immunfärbung nur die überexprimierte, prozessierte Nia-Protease codiert auf pETMHNia und pETMHNia2. In der Kontrolle BLR(DE3) wurde kein Protein erkannt. Der Antikörper färbte zwei Proteine an, die 27,3 kDa Nia-Protease und interessanterweise ein 23-24 kDa Protein (siehe auch 4.6.). Daraus folgt, daß der Antikörper spezifisch die rekombinante Nia-Protease erkennt und kein 27 kDa bakterielles Protein.

Der scFv- α -Nia102 ist der erste rekombinante Antikörper, der gegen die N1a-Protease eines Potyvirus gerichtet ist. Monoklonale Antikörper gegen den N1a oder die N1a-Protease hingegen sind bei Slade et al. (1989), Riedel et al. (1998) und Rouis (2001) beschrieben.

Die Analyse der Aminosäuresequenz des Antikörpers scFv- α -N1a102 mittels „AbCheck-Antibody Sequence Test“ ergab eine ungewöhnliche Aminosäure für H102 nach Kabatnummerierung (Kabat et al. 1987) im CDR-H3. Die Aminosäure Tyrosin steht an dieser Stelle nur bei 0,451 % aller schweren Ketten. Der CDR-H3 ist der variabelste der sechs hypervariablen Bereiche, er hat eine Länge von 3 bis 25 Aminosäuren (Wu et al 1993; Shirai et al. 1996; Shirai et al. 1999). Mit nur vier Aminosäuren ist der CDR-H3 des scFv- α -N1a102 sehr kurz. Griffiths et al. (1994) konnten zeigen, daß die CDR-H3s in synthetischen Antikörpern im Durchschnitt erheblich kürzer sind als die in natürliche Antikörpern. Dies ist verständlich, da kurze Fragmente bei der PCR bevorzugt amplifiziert werden. In natürlichen Antikörpern ist der CDR-H3 meist 10 bis 14 Aminosäuren lang. In der von Griffiths et al. (1994) benutzten synthetischen Antikörper-Bibliothek (diese ist die Grundlage für die in dieser Arbeit genutzte „Griffin 1. library“) hingegen fanden sich nur CDR-H3s mit einer Länge von 4 bis 12 Aminosäureresten. Es dominierten die CDR-H3s mit vier, wie auch der scFv- α -N1a102, fünf und acht Aminosäureresten.

Immunfärbungen mit scFv-Phagen haben den Nachteil, daß mit infektiösen Partikeln gearbeitet werden muß, die die genetische Information für ihren scFv in sich tragen. Lösliche scFvs haben den Vorteil, daß sie in großem Maßstab produziert werden können. Das Phagemid pHEN2 erlaubt die Expression und den Transport in das Periplasma von löslichen scFvs in Bakterien, die das Amber Stopcodon (TGA) erkennen, z.B. *E.coli* HB2151. Die Aminosäuresequenz der pelB-Leitsequenz in pHEN2 ist identisch mit der Pectate Lyase (Lei et al. 1987). Die Infektion des Wirtsbakteriums HB2151 mit scFv-Phagen- α -N1a102 und Induktion des *lac*-Promotors, führte jedoch nicht wie erwartet zu einer nachweisbaren Produktion von löslichen scFvs im Periplasma. Somit war eine Umklonierung des scFv- α -N1a102 in einen Expressionsvektor und eine Überexpression des Antikörpers nötig. Der scFv- α -N1a102 wurde hierzu in pET21a(+) umkloniert und überexprimiert. pET21a(+) besitzt im Gegensatz zu pET32a(+) keine 18 kDa Tag-Kassette. Die periplasmatische Fraktion, die löslichen Proteine (Überstand) und die unlöslichen Proteine (Pellet) wurden isoliert und mittels Immunfärbung des myc-Tags nachgewiesen. In jeder Fraktion konnte der scFv- α -N1a102 immungefärbt werden. Dies impliziert, daß nur ein Teil der Antikörper in das Periplasma

transportiert wurde. Bei der Immunfärbung wurden zwei Banden in jeder Fraktion angefärbt. Erwartet wurde ein 29,4 kDa Protein im Periplasma, denn beim Transport durch die Cytoplasmamembran wird die Leitsequenz (Lei *et al.* 1987) abgetrennt, und ein 31,4 kDa Protein im Cytoplasma. Das Ergebnis kann auch als Indiz gewertet werden, daß die Fraktionen nicht sauber von einander getrennt werden konnten. Ein weitere Erklärung liefern Martineau *et al.* (1998). Sie wiesen in einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE von *in vivo* exprimierten scFvs diese Antikörper in zwei Banden nach. Die scFvs liegen einmal reduziert und einmal oxidiert vor. Das Laufverhalten beider Redoxzustände unterschied sich dahingehend, daß die oxidierte Form etwas schneller lief als die reduzierte. Gegen diese Hypothese für die zwei scFv Banden in dieser Arbeit spricht, daß keine nicht-reduzierende SDS-PAGE genutzt und folglich nur reduzierte scFvs vorhanden sein sollten. Beide Redoxzustände der scFvs sind jedoch stabil und in der Lage, an das Antigen zu binden (Martineau und Betton 1999). Die Antikörper aus allen drei Fraktionen konnten für die Immunfärbung der NIa-Protease genutzt werden. Eine Aufreinigung der Antikörper, z.B. über den His-Tag, ist nicht nötig. Der Gesamtproteinextrakt kann direkt als Antikörperlösung genutzt werden, ohne daß es zu Kreuzreaktionen kommt.

Um zu untersuchen, ob der scFv- α -NIa102 die NIa-Protease *in vivo* inhibieren kann, wurde das Plasmid pHNTMHNIa2 dahingehend modifiziert, daß beliebige scFvs inkloniert und unter der Kontrolle eines T7-Promotors (Chamberlin *et al.* 1970; Dunn und Studier 1983) exprimiert werden konnten. Es erfolgte jedoch keine Expression des scFvs in BLR(DE3)-pHNTMHNIa_scFv- α -Nia102. Eine Ursache hierfür kann der geringe Abstand (6 Nukleotide) zwischen dem Transkriptionsstartpunkt direkt hinter dem T7-Promotor und der RBS sein. Bei pET32a(+) und pET21a(+) liegt zwischen dem Transkriptionsstartpunkt und der RBS noch die Nukleotidsequenz für den Lac-Operator und eine weitere Sequenz, die eine Haarnadelschleife bilden kann. Bei Vektoren wie z.B. pET-4 befindet sich zwischen dem Transkriptionsstartpunkt und der RBS nur eine 29 Nukleotide lange Sequenz, die eine Haarnadelschleife bilden kann. Die Haarnadelschleife kann zu einer erhöhten Stabilität der mRNA führen. Die Vektoren pET-6 und pET-7 besitzen diese Sequenz nicht. Der Abstand zwischen dem Transkriptionsstart und der RBS beträgt hier nur 2 Nukleotide, dies könnte die Promotorstärke verringern. Eine Transkription und Translation des inklonierten Gens erfolgt jedoch (Studier *et al.* 1990). Eine weitere mögliche Ursache für die nicht erfolgte Expression des scFvs, ist die Verwendung der optimierten RBS aus pTrueBlue, die jedoch zu einer verstärkteren Expression führen sollte.

(Slilaty und Lebel 1998).

Neben dem Plasmid pHNTMHNIa_scFv mit T7-Promotor, wurde auch ein Plasmid (pHNTMHNIa_scFv2, bzw. pHNTMHNIa_scFv2- α -NIa102, in der Arbeit nicht gezeigt) mit einem *lac*-Promotor konstruiert. Mit diesem Plasmid konnte das scFv jedoch auch nicht exprimiert werden. Die Umklonierung der Promotor-scFv-Kassetten in pREP419U führte ebenfalls zu keiner Expression (Ergebnisse in der Arbeit nicht gezeigt). pREP419U besitzt keinen *colE1* Replikationsursprung, sondern einen p15A Ori und kann somit zusammen mit dem Plasmid pHNTMHNIa2 in *E.coli* coexistieren (Baneyx 1999). Die Frage, ob die NIa-Protease durch den scFv- α -NIa102 *in vivo* inhibiert wird, muß im Rahmen dieser Arbeit offen bleiben. Eine Alternative wären *in vitro* Versuche, deren Aussagekraft jedoch begrenzt ist. Slade *et al.* (1989) exprimierten mittels *in vitro* Translation ein Vorläuferprotein des NIa und setzten vor Zugabe des Transkripts einen monoklonalen Antikörper gegen den NIa zu. Der Antikörper verhinderte die Prozessierung des Vorläuferproteins. Dieser Antikörper existiert jedoch nicht mehr (persönliche Mitteilung Prof. Dr. E. Maiß). Einen anderen Weg wählten Rouis *et al.* (2001). Sie reinigten die NI Fraktion aus PVY-infizierten Kartoffeln auf. Der NI Fraktion wurde ein Antikörper gegen NIa zugesetzt und für 24 h Inkubation bei 30 °C inkubiert. Ein 71 kDa Vorläuferprotein wurde nicht prozessiert und in der Kontrolle ohne Antikörper größtenteils prozessiert.

4.5. Konstruktion der binären Vektoren

Für die Konstruktion von potentiell potyvirusresistenten Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) wurde das *scFv- α -NIa102*-Gen in binäre Vektoren umkloniert. Als binärer Vektor wurde pGreenII-229 aus der pGreenII Vektorserie gewählt. pGreenII-229 besitzt eine Kanamycin Resistenz für die Selektion in Bakterien und eine Phosphinotricin Resistenz für die Selektion der Pflanzen. Diese Resistenz wird durch die Phosphinothricin Acetyltransferase, codiert vom *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopius*, vermittelt. Beim *bar*-Gen auf pGreenII-299 handelt es sich jedoch tatsächlich um das *pat*-Gen aus *Streptomyces viridochromogenes* (Hellens *et al.* 2000a, www.pgreen.ac.uk). Das dazugehörige Helferplasmid ist pSoup. Der Vektor pGreenII kann sich in Agrobakterien nur in Anwesenheit des Helferplasmids pSoup replizieren, da der Replikationsursprung *pSa Ori* für die Replikation in Agrobakterien auf

pGreenII und die Replikase *pSa Rep* auf pSoup codiert ist (Hellens *et al.* 2000a; Hellens *et al.* 2000b). Es wurden zwei binäre Vektoren mit unterschiedlichen Promotoren konstruiert. Der Vektor pGIIMH35S enthielt den 35S-Promotor des *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), der eine konstitutive Expression ermöglicht (Töpfer *et al.* 1988) und einen Potyvirus-Translationsverstärker (Carrington und Freed 1990; Nicolaisen *et al.* 1992). Der zweite Vektor pGIIMHvst enthielt den *vst*-Promotor, des Stilbensynthase codierenden *vst1*-Gen der Weinrebe (*Vitis vinifera*). Dieser Promotor kann durch Verwundungen und Streß induziert werden (Fischer 1994). PVY und PPV werden durch Blattläuse (Aphiden), die die Pflanzen verwunden, übertragen (Hoffmann *et al.* 1994). Die Menge an scFvs in transgenen Pflanzen ist meist gering, wenn die scFvs im Cytoplasma exprimiert werden (Schouten *et al.* 1996; Fecker *et al.* 1996). Das KDEL-Retentionssignal, welches eigentlich das Signal für den Verbleib des Proteins im Endoplasmatischen Reticulum ist, erhöht die Ausbeute an scFv im Cytoplasma von Pflanzen beträchtlich. Der Anteil des exprimierten scFv am Gesamtproteingehalt der Pflanze betrug bis zu 0,3 % (Schouten *et al.* 1997). Der scFv- α -N1a102 wurde in pGIIMH35S und pGIIMHvst inklusive myc-Tag, für den Nachweis des Antikörpers in transgenen Pflanzen mittels Immunfärbung, und der Aminosäuresequenz DIKDEL kloniert. Es wurden analog zu Schouten *et al.* (1996), die zwei zusätzlichen Codons für die Aminosäuren DI zwischen den myc-Tag und dem KDEL-Retentionssignal gesetzt, obwohl die Sequenz KDEL für die Expressionssteigerung der scFvs ausreichen sollte.

Mittels der pathogenvermittelten Resistenz konnten potyvirusresistente, transgene Pflanzen produziert werden, die komplett resistent waren (keine Symptome, keine Rückgewinnung von Viren aus infizierten Pflanzen) (Maiti *et al.* 1993). Fellers *et al.* (1998) konnten durch Nutzung der *nia*-Gene von TVMV, TEV und PVY gegen diese Viren resistente Pflanzen herstellen. Bei der Transformation von Pflanzen mit Virusgenen besteht jedoch immer die Gefahr der Rekombination mit verwandten Viren (Varelmann *et al.* 2000). Die bisherigen transgenen Pflanzen, die Antikörper gegen die Hüllproteine von Viren oder das ganze Virus produzierten, waren nur partiell resistent. Bestenfalls konnte die Infektiosität um mehr als 90 % reduziert werden (De Jaeger *et al.* 2000). Bei den scFv- α -N1a102 exprimierenden Kartoffeln besteht die Erwartung, daß diese eine Resistenz gegen Potyviren zeigen und die Erwartung, daß diese Resistenz zahlreiche Potyviren umfaßt (siehe auch 4.6. und 4.7.). Dies wären die ersten Pflanzen, die einen Antikörper gegen eine N1a-Protease exprimieren.

4.6. Diagnostik von potyvirusinfizierten Pflanzen

Der scFv- α -NIa102 wurde auf sein diagnostisches Potential, potyvirusinfizierte Pflanzen zu erkennen, untersucht. Die PPV-Infektion wurde mittels Immunfärbung des Hüllproteins überprüft. Im Gesamtproteinextrakt aus PPV- und PVY-infizierten Tabakpflanzen konnte mittels eines polyklonalen α -PPV-CP Antikörpers die Hüllproteine des PPV in den PPV-infizierten Pflanzen nachgewiesen werden. In den PVY-infizierten Pflanzen kam es zu einer Kreuzreaktion, bei gesunden Tabakpflanzen wurde kein Protein erkannt. Mit dem scFv- α -NIa102 konnte in den PPV- und PVY-infizierten Tabakpflanzen weder die 27 kDa NIa-Protease, der 49 kDa NIa oder ein Vorläuferprotein immungefärbt werden. In Immunfärbungen mit weiteren potyvirusresistenten Pflanzen konnte gleichfalls kein NIa detektiert werden. Der Nachweis des NIa in Gesamtproteinextrakten von potyvirusinfizierten Pflanzen, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem Antikörper gegen das NIa immungefärbt wurden, gelang bisher nur in einem Fall (Rouis et al 2001). In diesem Fall wurden insgesamt fünf kleine Proteine zwischen 18 und 32 kDa in einem durch SDS-PAGE aufgetrennten Gesamtproteinextrakt aus PVY-infizierten Kartoffeln erkannt. Interessanterweise wurde nicht das 71 kDa Vorläuferprotein des NIa nachgewiesen, welches nach Aufreinigung der Einschlußkörper aus den PVY-infizierten Pflanzen am stärksten in der Immunfärbung detektiert wurde. In weiteren Arbeiten gelang nur die Immunfärbung von aufgereinigtem NIa von TEV (Knuhtsen *et al.* 1974, Dougherty *et al.* 1988), BYMV und *Clover yellow vein potyvirus* (CYVP) (Chang *et al.* 1988), sowie PVY (Rouis *et al.* 2001). Eine Aufreinigung des NIa aus PPV-infizierten Pflanzen konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Ein Nachweis der 27 kDa NIa-Protease, des 49 kDa NIa oder eines Vorläuferproteins wird auch dadurch erschwert, daß die NIa Kerneinschlußkörper des PPV nicht nur im Kern lokalisiert sind, sondern auch im Cytoplasma. Die Kerneinschlußkörper können auch aus NIa und NIb, im Fall von TEV sogar mit HC-Pro, zusammengesetzt sein. Es gibt kein einheitliches Verteilungsmuster und einheitliche Zusammensetzung der Nichtstrukturproteine in durch verschiedene Potyviren infizierten Pflanzen (Riedel *et al.* 1998).

Ein Nachweis von potyvirusinfizierten Pflanzen im Dot-Blot war hingegen möglich. Hierzu wurden die Blätter mit Homogenisationspuffer gemörsert und ultraschall behandelt. Anschließend wurden die Proben mit 8 M Harnstoff versetzt, dialysiert und mit Methanol/Aceton gefällt, wobei die Behandlung der Proben mit Harnstoff zu stärkeren

Signalen bei der Immunfärbung der Dot-Blots führte. Dies weist darauf hin, daß die Kerneinschlußkörper erst aufgeschlossen werden müssen, damit der Antikörper das Epitop erkennen kann. Im Dot-Blot konnten alle 19 getesteten potyvirusinfizierten Pflanzen mit dem scFv- α -N1a102 immungefärbt werden. Eine Kontrolle mit dem sekundären Antikörper Maus α -M13 und dem tertiären Antikörper Ziege α -Maus IgG AP war jedesmal nötig, da bei zu langer Inkubation in der Substratlösung der alkalische Phosphatase Kreuzreaktionen des polyklonalen Ziege α -Maus IgG APs auftreten können. Die Intensität der Dots von jeweils drei Dot-Blots wurden densitometrisch gemessen. Die Gesamtproteinextrakte aller potyvirusinfizierten Pflanzen wurden im Durchschnitt mindestens doppelt so intensiv angefärbt wie die Tabak-Kontrolle. Die gemessenen Signalintensitäten schwankten z.T. jedoch beträchtlich. Sehr gut erkannt wurden die Gesamtproteinextrakte aus SPCFV-, PVY, CRTLV-, SPLV-, PPV-, LYSV-Aa22-, OYDV- und CeMV-Bos-infizierten Pflanzen. Hier lagen die gemessenen durchschnittlichen Signalintensitäten mindestens fünfmal über denen der Tabak-Kontrolle. Die gemessenen mittleren Signalintensitäten von BCMV-AzMV, LMV-Ve, LYSV-Madagascar, BCMV-PSTV, TuMV-2950, LMV-Greek endive und SPFMV-46b waren mindestens doppelt so hoch wie die Tabak-Kontrolle. SPMMV-DDR, ENMV-Eissalat, CeMV-GreeceI und BYMV wiesen mittlere durchschnittliche Signalintensitäten, die drei- bis vierfach über der Kontrolle lagen. Bei den potyvirusinfizierten Pflanzen mit schwachen Signalen, z.B. LMV-Greek endive, lagen die gemessenen Einzelsignalintensitäten z.T. unter der Tabak-Kontrolle. Auf die Erkennung der N1a-Protease in den Gesamtproteinextrakten hatten die Wirtspflanzen keinen Einfluß.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des konservierten Bereichs der N1a-Protease (Aminosäuren 206 - 368 des PPV N1a, es fehlen N-terminal 6 Aminosäuren der N1a-Protease und C-terminal 71 Aminosäuren) von 14 verschiedenen Potyviren zeigt, daß es keinen Zusammenhang gibt, zwischen der gemessenen Signalintensitäten und den verwandtschaftlichen Beziehungen der Potyviren (Abb. 4.1.). Dies ist zu erwarten, da die Menge an Virusprotein in jeder potyvirusinfizierten Pflanzen variiert wird. Denn die Dot-Blots ermöglichen keine Aussage darüber, welcher Potyvirus vom scFv- α -N1a102 am besten erkannt wird. Dieser Nachweis funktioniert nur mit definierten Mengen aufgereinigter N1a-Protease.

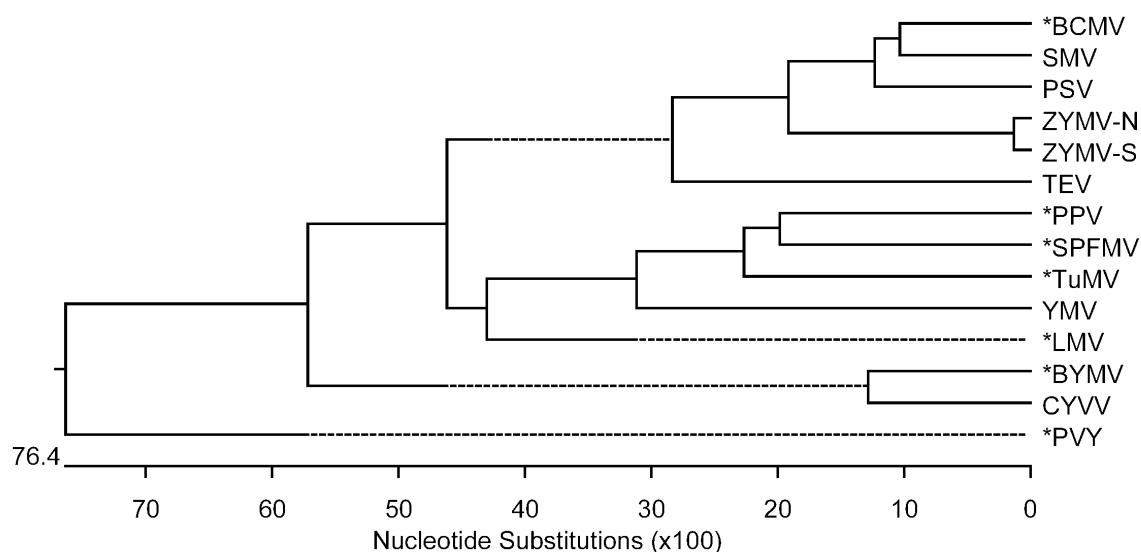


Abb. 4.1. Verwandtschaftliche Beziehung der NIa-Protease von 14 Potyviren. Es wurden die Aminosäuren 206-368, bezogen auf PPV NIa mit der Software Lasergene 5 mittels der Methode Clustal W (gap penalty 4, gap penalty length 0,2, delay divergent seqs 30 %, DNA transition weight 0,50) verglichen. Die mit * markierten Potyviren wurden auch im Dot-Blot analysiert. Es wurden folgende Sequenzen verglichen: *Plum pox virus* (PPV, Accession X81083), *Potato virus Y* (PVY, X97895), *Bean common mosaic virus* (BCMV, AJ012651), *Lettuce mosaic virus* (LMV, AJ278854), *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV, D38543), *Turnip mosaic virus* (TuMV, D10601), *Pea seed-borne mosaic virus* (PSV, AJ252242), *Soybean mosaic virus N* (SMV, D00507), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) Stamm Reunion island (L29569) und Stamm Singapore (AF014811), *Clover yellow vein virus* (CVYY, AB011819), *Tobacco etch virus* (TEV, L38714) und *Yam mosaic virus* (YMV, U42596).

Zu einer starken Kreuzreaktion des Ziege α -Maus IgG AP kam es mit dem Gesamtproteinextrakten aus den „Salatpotyviren“, die von Dr. H. J. Vetten isoliert wurden und bisher nicht näher charakterisiert wurden (persönliche Mitteilung Dr. H.J. Vetten).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von verschiedenen Potyviren soll zeigen, daß es theoretisch möglich ist, daß ein monoklonaler Antikörper die NIa-Protease einer großen Anzahl von Potyviren erkennen kann. Dies setzt Abschnitte mit stark konservierten Aminosäuresequenzen voraus. Es wurde der konservierte Bereich (siehe Abb. 4.1.) der NIa-Protease von 14 Potyviren miteinander verglichen (Abb.4.2.).

```

206 GLRDYNP IASSICQLNNSSGARQSEMFGLGFGGLIVTNQH LFKRNDGELTIRSHH
201 GLRDFNPIAQTVCR LKVSVEYGASEMYGFGFGAYIVANHH LFRSYNGSMEVQSMH
204 GLRDYNP IAAANVCLLENESA EYCDEIYGIGYG NV IITNQH LFRHNNGELTIKSKH
198 GLRDYSSVSTLICRLVNSSDGHN ETIYGIGYGSY IITNGH LFRRNNGTLTVK TWH
206 GLRDYNP IAAAICL LTNESDGMKETMYGIGFGNT IITNQH LFRRNNGMLTVQSRH
205 GLRDYNP IASVICHLVNEADGRTSDCFGIGYGG L IVTNRH LFKRNNGTLTIRSRH
7 GLRDYNP ISNNICH LTNVSDGASNSLYGVGFGL I LTNRH LFERNNNGELV I KSRH
203 GLRDYNG ISSLV CQLTNISDGHSESI FGIYGYSY IITNGH LFKRNNGV L N I R T W H
203 GLRDYS G I S T L I C Q L T N S S D G H K E T M F G V G Y G S F I I T N G H L F R R N N G M L T V K T W H
203 GVRDYNG I S T I V C Q L T N D S D G L K E T M Y G I G Y G P I I I T N G H L F R K N N G T L L V R S W H
203 GVRDYNG I S T I V C Q L T N D S D G L K E T M Y G I G Y G P I I I T N G H L F R K N N G T L L V R S W H
204 GLRDYNP I S Q N V C L L T N E S E G H R E K M F G I G Y G S V I I T N Q H L F R R N N G E L S I Q S K H
201 GLRDYNP I S S A I C H L T N E S D G H T T S L Y G I G F G P F I I T N K H L F R R N N G T L L V Q S L H
210 GLRDYNP I A T A I C M I C N D S E G Y Q T K L F G I G F G S F L I V N Q H L F R R N N G S L L T K T H H

261 GEFVVK DTKTKTLKLLPCKGRD I V I I R L P K D F P P F P K R L Q F R T P T T E D R V C L I G S N F
256 G T F R V K N L H S L S V L P I K G R D I I L I K M P K D F P V F P Q K L H F R A P T Q N E R I C L V G T N F
259 G T F K C K N T C A L K L L P I E G H D L L I Q M P K D F P V F P Q K L R F R E P T H E D K I V L V S T N F
253 G D F I I P N T T Q L K I H F I E G K D A I L I R M P R D F P P F A Q R S C F R S P K K E E R V C M V G T N F
261 G E Y V L P N T T Q L K V L P C E G R D I M V I I L T P D F P P F P Q K L K F R P P I K G E K I C L V G S L F
260 G E F V I K N T T Q L G M K P C A D R D I L I I R M P K D I P P F P Q R L K F R V P K E N E R I C L V G S N F
62 G E F V I K N T T Q L H L L P I P D R D L L I R L P K D I P P F P Q K L G F R Q P E K G E R I C M V G S N F
258 G E F E I K N T T Q I K I H F I E G K D A I L I R M P K D F P P F A K K S L F R P P I K E E R V C M V G T N F
258 G E F V I H N T T Q L K I H F I Q G K D V I L I R M P K D F P P F G K R N L F R Q P K R E E R V C M V G T N F
258 G E F I V K N T T T L K V H F I E G K D V V L V R M P K D F P P F K S N A S F R A P K R E E R C L V G T N F
258 G E F T V K N T T T L K V H F I E G K D V V L V R M P K D F P P F R S N A S F R A P K R E E R A C L V G T N F
259 G Y F R C R N T T S L K M L P L E G H D I L L I Q L P R D F P V F P Q K I R F R E P R V D D K I V L V S T N F
256 G V F K V K N T T T L Q Q H L I D G R D M M L I R M P K D F P P F P Q K L K F R E P Q R E E R I C L V T N F
265 G E F L V K N S A T I K I S P C E G R D I A L L R L P K D C P P F S Q K L N F R A P E E G E K V C M V G S N F

316 Q T K S I S S T M S E T S A T Y P V D N S H F W K H W I S T K D G H C G L P I V S T R D G S I L G L H S L PPV*
311 Q E K Y A S S I I T E T S T Y N I P G S T F W K H W I E T D N G H C G L P V V S T A D G C I V G I H S L PVY*
314 Q E K S F S S V S E S S N I S R V K Q A N F F K H W I S T V A G Q C G N P M V S T K D G F I V G I H S L BYMV*
308 Q E K S L R S T V S E S S I I V P E G K G S F W V H W I T T Q D G D C G L P M V S V N D G Y I V G I H G L BCMV*
316 Q D K S I T S T V S E T S V T T P V D N S F L W K H W I T T K D G H C G L P L V S S N D G Y I V G I H S A LMV*
315 Q D K S I T S T I S E T S V T C H V P N S H F W K H W I D T K D G H C G L P L V S T T D G A L L G V H S L SPFMV*
117 Q T K S I T S V S E T S T I M P V E N S Q F W K H W I S T K D G Q C G S P M V S T K D G K I L G L H S L TuMV*
313 Q E K S L R A T V S E S S M V L P E G V G S F W I H W I T T Q D G Y C G L P L V S V S D G L I V G F H G L PSV
313 Q E K S L R A T V S E S S M I L P E G K G S F W I H W I T T Q D G F C G L P L V S V N D G H I V G I H G L SMV
313 Q E K S L R S T V S E S S M T I P E G T G S Y W I H W I S T N E G D C G L P M V S T T D G K I I G V H G L ZYMV-R
313 Q E K S L R S T V S E S S M T I P E G T G S Y W I H W I S T N E G D C G L P M V S T T D G K I I G I H G L ZYMV-S
314 Q E K S S S T V S E S S N I S R V Q S A N F Y K H W I S T V A G H C G N P M V S T K D G F I V G I H S L CVYY
311 Q T K S M S S M V S D T S C T F P S S D G I F W K H W I Q T K D G H C G S P L V S T R D G F I V G I H S A TEV
320 Q E K S I T S T V S E A S I T R S L P N S H F W Q Y W I T T K E G Y C G L P V V A L K D G A I V G V H S L YMV

```

Abb. 4.2. Vergleich der Aminosäuresequenz der N1a-Protease von 14 Potyviren. Es wurden die Aminosäuren 206-368, bezogen auf PPV N1a mit der Software Lasergene 5 mittels der Methode Clustal W (gap penalty 10, gap penalty length 0,2) verglichen. Die mit * markierten Potyviren wurden auch im Dot-Blot analysiert. Die Angaben zu den Potyviren stehen in Abb. 4.1.. Die homologen Bereiche sind grau markiert und die Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure und Cystein, die die katalytische Triade der Chymotrypsin ähnlichen N1a-Protease bilden, sind rot markiert.

Der Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz (ohne die 6 Aminosäuren direkt hinter der internen NIa-Site) der NIa-Protease von 14 Potyviren zeigt, daß dieser Bereich konserviert ist und somit ein Antikörper, der die NIa-Protease zahlreicher Potyviren erkennt, möglich ist. Dieser Bereich enthält auch die katalytische Triade der Chymotrypsin ähnlichen NIa-Protease. Der C-terminale Bereich hingegen ist variable und die letzten 20 Aminosäuren haben keinen Einfluß auf die Aktivität der NIa-Protease (Kim *et al.* 1996b; Kim *et al.* 1998).

Die Diagnose von potyvirusinfizierten Pflanzen kann mittels optischer Beurteilung, RT-PCR-Analyse, Hybridisierung oder einem ELISA erfolgen (López-Moya *et al.* 2000). Mittels eines universellen PCR-Primerpaares können zahlreiche Potyviren nachgewiesen werden (Chen *et al.* 2001). Für den Nachweis mittels PCR müssen jedoch Geräte wie eine PCR-Maschine und Elektrophoresekammern vorhanden sein. Diese Methode ist verglichen mit ELISA und Protein Dot-Blots sehr teuer und aufwendig. Mit den Antikörpern, die in den vorhandenen ELISAs eingesetzt werden, kann nur eine begrenzte Anzahl (was zum Teil auch erwünscht ist), an Potyviren erkannt werden, z.B. nur PPV-Isolate (Cambra *et al.* 1994), PVY-Isolate (Bonham und Barker 1998) oder *Banana bract mosaic virus* (BBrMV)-Isolate (Rodoni *et al.* 1999), da die in diesen ELISAs eingesetzten Antikörper gegen die nicht konservierten Hüllproteine oder das ganze Virus gerichtet sind. Der Vorteil ist, daß diese Antigene im isoliertem Gesamtproteinextrakt leichter zugänglich sind als die NIa-Protease, die in Einschlußkörpern vorliegt. Der scFv- α -NIa102 hingegen ermöglicht den Nachweis einer großen Bandbreite von Potyviren (Hust *et al.* in Vorbereitung). Die Protein Dot-Blot Methode mit dem scFv- α -NIa102 zum Nachweis potyvirusinfizierter Pflanzen, ist eine Alternative zum ELISA.

4.7. Prozessierung der PPV NIa-Protease

In Immunfärbungen der überexprimierten NIa-Protease mit dem scFv- α -NIa102 konnte neben der 27 kDa NIa-Protease ein kleineres Protein von 23-24 kDa immungefärbt werden. Dieses Ergebnis weckte das Interesse die Prozessierung der NIa-Protease des *Plum pox virus* zu untersuchen. Parks *et al.* (1995) entdeckten, daß von der NIa-Protease des TEV nach Expression in *E.coli* zwei Formen vorkommen, eine 27 kDa und eine 25 kDa Form. Das 25 kDa Fragment entstand auch nach Inkubation der aufgereinigten 27 kDa NIa-Protease für

bis zu 48 h in einem Reaktionspuffer. Für das TuMV konnten Kim *et al.* (1995) die C-terminale Abspaltung von 2 kDa von der 27 kDa NIa-Protease zeigen. Sie konnten ebenfalls nachweisen, daß die Spaltung nicht auf der Aktivität von Enzymen in *E.coli* zurückzuführen ist, sondern auf eine Selbstspaltung der NIa-Protease. Dies wurde erreicht, indem die Aminosäuren Asparaginsäure oder Cystein der katalytischen Triade mittels „site-directed mutagenesis“ gegen Asparagin oder Serin ausgetauscht wurden. Ein weiterer Prozessierungsschritt wurden von Kim *et al.* (1996b) entdeckt. Die aufgereinigte 27 kDa NIa-Protease wurde in *in vitro* Versuchen für 150 h bei 30 °C in Reaktionspuffer inkubiert. Danach konnte neben der 25 kDa Protease ein 24 kDa Protein nachgewiesen werden. Der zweite Prozessierungsschritt führt auch zu Inaktivierung der NIa-Protease, wohingegen der erste kaum Einfluß auf die Aktivität hat. Für TEV, *Tobacco vein mottling virus* (TVMV), PVY und PPV wurde das gleiche Prozessierungsverhalten postuliert. Im Fall von TVMV konnte gezeigt werden, daß dies für dieses Virus nicht der Fall ist. Die 27 kDa NIa-Protease des TVMV wird nicht prozessiert. Die Aktivität dieser Protease beträgt auch nur ein Fünftel der von TuMV (Hwang *et al.* 2000).

Aufgrund der Postulats von Kim *et al.* (1996b) wurden für die 27,3 kDa (*in natura* 27,6 kDa) PPV NIa-Protease im ersten Prozessierungsschritt ein 25,4 kDa Protein und nach dem zweiten Prozessierungsschritt ein 23,5 kDa Protein erwartet.

Die NIa-Protease, codiert auf pETMHN_{1a}, wurde hierzu in BLR(DE3) überexprimiert. Proben wurden zwischen 0 h und 40 h nach IPTG Zugabe entnommen und das Gesamtprotein isoliert. Die Proteine wurden mittels 18 % SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und die NIa-Protease mit dem scFv- α -NIa102 immungefärbt. Eine 18 % SDS-PAGE erlaubte im Vergleich zur 12 % SDS-PAGE eine bessere Auftrennung der Fragmente zwischen 20 und 30 kDa. Direkt nach Induktion war die 27,3 kDa NIa-Protease und die 25,4 kDa Protease nachweisbar. Nach 20 h Inkubation *in vivo* verschwand die 25,4 kDa Bande fast gänzlich und die 23,5 kDa Protease wurde sichtbar. Die 27 kDa Protease verschwindet nicht, da sie stetig nachproduziert wird.

Das von Kim *et al.* (1996b) postulierte Prozessierungsverhalten für die PPV NIa-Protease konnte mittels des rekombinanten Antikörpers scFv- α -NIa102 bestätigt werden. Der für TuMV *in vitro* nachgewiesene zweite Prozessierungsschritt konnte hier für PPV *in vivo* gezeigt werden (Hust *et al.* in Vorbereitung).

Es werden von jedem Virusprotein die selbe Anzahl gebildet, jedoch werden die Nichtstrukturproteine im Vergleich zum Hüllprotein in nur geringer Anzahl benötigt. Die

Prozessierung der NIa-Protease könnte, genauso wie die Bildung der NIa und NIb Einschlußkörper, den biologischen Zweck haben, die Pflanzenzelle vor einer Schädigung durch die Nichtstrukturproteine des Virus zu schützen, um eine stärkere Amplifikation des Virus zu ermöglichen.

Der Nachweis der Prozessierungsprodukte der NIa-Protease zeigte auch, daß der scFv- α -NIa102 nicht am C-Terminus bindet, sondern davor, daß heißt in dem konservierten Bereich, der für die Aktivität der NIa-Protease verantwortlich ist. Somit besteht auch die Erwartung, daß die scFv- α -NIa102 exprimierenden Pflanzen eine Virusresistenz zeigen (siehe auch 4.8.).

4.8. Ausblick

Der rekombinante Antikörper scFv- α -NIa102 konnte für die Konstruktion von binären Vektoren für die Transformation von Pflanzen, die Diagnostik von potyvirusinfizierten Pflanzen und der Grundlagenforschung an der NIa-Protease eingesetzt werden.

Die Transformation von Kartoffeln mit den konstruierten binären Vektoren pGIIMH35S-scFv- α -NIa102 und pGIIMHvst-scFv- α -NIa102 werden von Marco Swenty in der Arbeitsgruppe Schiemann an der Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) Braunschweig durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Drucklegung dieser Arbeit lagen die ersten regenerierten Kartoffeln vor. Diese Kartoffeln werden in zukünftigen Arbeiten molekularbiologisch und biochemisch untersucht, sowie auf Potyvirusresistenz, insbesondere PVY, überprüft.

Der binäre Vektor pGIIMH35S-scFv- α -NIa102 wird im Lehrgebiet Molekulargenetik auch zur Konstruktion von potentiell potyvirusresistenten Bohnen (*Phaseolus acutifolius*) genutzt. Bohnen sind Wirtspflanzen des *Bean common mosaic virus* (BCMV) und des *Bean yellow mosaic virus* (BYMV). Beide Viren werden durch den scFv- α -NIa102 erkannt (4.6.).

Für die Diagnostik von potyvirusinfizierten Pflanzen ist geplant, den rekombinanten Antikörper mit einer alkalischen Phosphatase zu fusionieren. Dies wird die Detektion erleichtern, da nur noch ein Antikörper anstatt von dreien eingesetzt werden muß und Kreuzreaktionen wie mit dem Ziege- α -Maus IgG AP vermieden werden. Dieses Antikörperkonjugat wird den Nachweis im Dot-Blot verbessern und ermöglicht auch die Entwicklung eines ELISA-Testsystem für potyvirusinfizierte Pflanzen.

5. Literaturverzeichnis

- Allison, R.F., Sorenson, J.C., Kelly, M.E., Armstrong, F.B. und Dougherty, W.G. (1985). Sequence determination of the capsid protein gene and flanking regions of tobacco etch virus: evidence for synthesis and processing of a polyprotein in potyvirus genome expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3696-3972
- Allison, R.F., Johnston, R.E. und Dougherty, W.G. (1986). The nucleotid sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology* 154, 9-20
- Alvarez, V., Ducasse, D.A., Biderbost, E. und Nome, S.F. (1997). Sequencing and characterization of the coat protein and 3' non-coding region of a new sweet potato potyvirus. *Archives of Virology* 1997. 1635-1644
- Atanasoff, D. (1932). Plum pox - a new virus disease. Jahrbuch Universität Sofia, Agronomische Fakultät 11, 49-69
- Atanasoff, D. (1935). Mosaic of stone fruits. *Phytopathol. Z.* 8, 259-284
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 411-421
- Barbas III, C.F., Kang, A.S., Lerner, R.A. und Benkovic, S.J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phages surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7987-7982
- Bardor, M., Faye, L. und Lerouge, P. (1999). Analysis of the N-glycosylation of recombinant glycoproteins produced in transgenic plants. *Trends in Plant Science* 4, 376-380
- Barnett, O.W. (1991). Potyviridae, a proposed family of plant viruses. *Archives of Virology* 178, 161-165
- Berdichevsky, Y. E., Ben-Zeev, E., Lamed, R. und Benhar, I. (1999). Phage display of cellulose binding domain from clostridium thermocellum and its application as a tool for antibody engineering. *J. Immunol. Methods* 228, 151-162
- Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Pierandrei-Amaldi, P. und Cattaneo, A. (1995). Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria. *Biotechnology* 13, 1110-1115

- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobsen, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M, Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S. und Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-426
- Bonham, N. und Barker, I. (1998). Strain specific recombinant antibodies to potato virus Y potyvirus. *J. Virol. Methods.* 74, 193-199
- Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Kleewinghaus, I, und Little, M. (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104, 1047-153
- Breitling, F. und Dübel, S. (1997). Rekombinante Antikörper. Spektrum Akademischer Verlag.
- Brendel, V., Bucher, P., Nourbakhsh, I., Blaisdell, B.E. und Karlin, S. (1992). Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2002-2006
- Brock, D.B., Madigan, M.T., Martinko, J.M. und Parker, J. (1994). Biology of Microorganisms, seventh edition. Prentice Hall
- Burkhard, M. (1999). DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics* 15, 211 - 218
- Cabanes-Macheteau, M., Fichette-Lainé, A.-C., Loutelier-Bourhis, C., Lange, C., Vine, N.D., Ma, J.K.C, Lerouge, P. und Faye, L. (1999). N-Glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants. *Glycobiology* 9, 365-372
- Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Pérez, E., Camarasa, E., Garcia, J.A., Moya, J.J., López-Abella, D., Vela, C. und Sanz, A. (1994). Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non structural proteins. *EPPO Bull.* 24, 569-577
- Carrington, J.C. und Dougherty, W.G. (1987a). Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genom is a protease. *Journal of Virology* 61. 2540-2548
- Carrington, J.C. und Dougherty, W.G. (1987b). Processing of the tobacco etch virus 49k protease requires autoproteolysis. *Virology* 160, 355-362
- Carrington, J.C. und Dougherty, W.G. (1988). A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 3391-3395
- Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D. und Dougherty, W.G. (1989). A second proteinase encoded by a plant potyvirus. *The EMBO Journal* 8, 365-370
- Carrington, J.C., und Freed, D.D. (1990). Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *Journal of Virology* 64, 1590-1597

- Chamberlin, M., McGrath, J. und Waskell, L. (1970). New RNA-Polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. *Nature* 228, 227-231
- Chang, C.-A., Hiebert, E. und Purcifull, D.E. (1988). Purification, characterization, and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyvirus. *Physiology and Biochemistry* 78, 1266-1275
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffith.A.D. und Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624-628
- Conrad, U. und Fiedler, U. (1994). Expression of engineered antibodies in plant cells. *Plant Mol. Biol.* 26, 1023-1030
- Conrad, U. und Fiedler, U. (1998). Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol. Biol.* 38, 101-109
- Courtney, B.C., Williams, K.C. und Schlager, J.J. (1995). A phage display vector with improved stability, applicability and ease of manipulation. *Gene* 165, 139-140
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. und Tsien, R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *TIBS* 20, 448-455
- Cuzzo, M., O'Connell, M.K., Kaniewski, W., Fang, R.X., Chua, N.H. und Tumer, N.E. (1988). Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Biotechnology* 6, 549-557
- Czihak, G., Langer H. und Ziegler H. (1990). Biologie, 4. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- De Jaeger, G., De Wilde, C., Eeckhout, D., Fiers, E. und Depicker, A. (2000). The plantibody approach : expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. *Plant. Mol. Biol.* 43, 419-428
- De Neve, M., De Loose, M., Jacobs, A., van Houdt, H., Kaluza, B., Weidle, U., van Montagu, M. und Depicker, A. (1993). Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Res.* 2, 227-237
- Deutscher, M.P. (1990). Methods in Enzymology, Guide to protein purification. Academic Press 182
- Domier, L.L., Franklin, K.M., Shahabuddin, M., Hellmann, G.M., Overmeyer, J.H., Hiremath, S.T., Siaw, M.F.E., Lomonossoff, G.P., Shaw, J.G. und Rhoads, R.E. (1989).

- The nucleotide sequence of tobacco vein mottling virus RNA. *Nucl. Acids. Res.* 14, 5417-5430
- Dougherty, W.G., Carrington, J.C., Cary, S.M. und Parks, T.D. (1988). Biochemical and mutational analysis of a plnat virus polyprotein cleavage site. *The EMBO Journal* 7, 1281-1287
 - Dougherty, W.G., Cary, S.M. und Parks, T.D. (1989a). Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: A model. *Virology* 171, 356-364
 - Dougherty, W.G., Parks, T.D., Cary, S.M., Bazan, J.F. und Fletterick, R.J. (1989b). Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-kDa proteinase. *Virology* 172, 302-310
 - Dougherty, W.G. und Parks, T.D. (1989). Molecular genetic and biochemical evidence for the involvement of the heptapeptide cleavage sequence in determining the reaction profile at two tobacco etch virus cleavage sites in cell-free assays. *Virology* 172, 145-155
 - Dunn, J.J. und Studier, F.W. (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.* 166, 477-535
 - Düring, K., Hippe, S., Kreuzaler, F. und Schell, J. (1990). Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.* 15, 281-293
 - Dziegiel, M., Nielsen, L.K., Andersen, P.S., Blancher, A., Dickmaiss, E. und Engbert, J. (1995). Phage display used for gene cloning of human recombinant antibody against the erythrocyte surface antigen D. *J. Immunol. Methods* 182, 7-19
 - Eckert, W.A. und Kartenbeck, J. (1996). Proteine: Standardmethoden der Molekular und Zellbiologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
 - Esen, A. (1978). A simple method for quantitative, semiquantitative and qualitative assay of protein. *Anal. Biochem.* 89, 464-273
 - Fecker, L.F., Kaufmann, A., Commandeur, U., Commandeur, J., Koenig, R. und Burgermeister, W. (1996). Expression of single-chain antibody fragments (scFv) specific for beet necrotic yellow vein virus coat protein or 25 kDa protein in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol. Biol.* 32, 979-986
 - Fecker, L.F., Koenig, R. und Obermeier, C. (1997). *Nicotiana benthamiana* plants expressing beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) coat protein-specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection. *Archives of Virology* 142, 1857-1863

- Feilmeier, B.J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. und Phillips, G.J. (2000). Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 182, 4068-4076
- Fellers, J.P., Collins, G.B. und Hunt, A.G. (1998). The NIa-proteinase of different plant potyvirus provides specific resistence to viral infection. *Crop Science* 38, 1309-1319
- Fischer, R. (1994). Optimierung der heterologen Expression von Stilbensynthasegenen für den Pflanzenschutz. Dissertation an der Universität Hohenheim
- Fischer, R., Emans, N. und Schillberg, S. (2001). Achieving plant disease resistance by antibody expression. *Can. J. Plant. Pathol.* 23, 235-245
- García, J.A., Riechmann, J.L. und Laín, S. (1989a). Artificial cleavage site recognized by plum pox potyvirus protease in *Escherichia coli*. *Journal of Virology* 63, 2457-2460
- García, J.A., Riechmann, J.L. und Laín, S. (1989b). Proteolytic activity of the plum pox potyvirus NIa-like protein in *Escherichia coli*. *Virology* 170, 362-369
- García, J.A., Riechmann, J.L., Martin, M.T. und Laín, S. (1989c). Proteolytic activity of the plum pox potyvirus NIa-like protein on excess of natural and artificial substrates in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 256, 269-273
- García, J.A., Laín, S., Cervera, M.T., Riechmann, J.L. und Martin, M.T. (1990). Mutational analysis of plum pox potyvirus polyprotein processing by the NIa protease in *Escherichia coli*. *Journal of General Virology* 71, 2773-2779
- García, J.A., Martin, M.T., Cervera, M.T. und Riechmann, J.L. (1992). Proteolytic processing of the plum pox potyvirus polyprotein by the NIa Protease at a novel cleavage site. *Virology* 188, 697-703
- Ghabrial, S.A., Smith, H.A., Parks, T.D. und Dougherty, W.G. (1990). Molecular genetic analysis of the soybean mosaic virus NIa proteinase. *Journal of General Virology* 71, 1921-1927
- Gorbalenya, A.E., Donchenko, A.P., Blinov, V.M. und Koonin, E.V. (1989). Cysteine proteinases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serin proteases: A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Letters* 243, 103-114
- Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Marks, J.D., Bye, J.M., Embleton, M.J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K.P., Gorick, B.D., Hughes-Jones, N.C., Hoogenboom, H.R. und Winter G. (1993). Human anti-self antibodies with high specificity from phage display library. *The EMBO Journal* 12, 725- 734

- Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J., Prospero, T.D., Hoogenboom, H.R., Nissim, A., Cox, J.P.L., Harrison, J.L., Zacco, M., Gherardi, E. und Winter, G. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *The EMBO Journal* 13, 3245-3260
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T, Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Bajyana Songa, E., Bendahman, N. und Hamer, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446-448
- Harrison, J.L., Williams, S.C., Winter, G., Nissim, A. (1996). Screening of phage antibody libraries. *Methods in Enzymology* 267, 83-109
- Harmsen, M.M., Ruuls, R.C., Nijman, I.J., Niewold, T.H., Frenken, L.G.J. und de Geus, B. (2000). Lama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Molecular Immunology* 37, 579-590
- Hawlisch, H., Frank, R., Hennecke, M., Baensch, M., Sohns, B., Arseniev, L., Bautsch, W., Kola, A., Klos, A. und Köhl, J. (1998). Site-directed C3a receptor antibodies from phage display libraries. *The Journal of Immunology* 160, 2947-2958
- Hawlisch, H., Müller, M., Frank, R., Bautsch, W., Klos, A. und Köhl, J. (2001). Site-specific anti-C3a receptor single-chain antibodies selected by differential panning on cellulose sheets. *Analytical Biochemistry* 293, 142-145
- Hawkins, R.E., Russel, S.J., Baier, M. und Winter, G. (1993). The contribution of contact and non-contact residues of antibody in the affinity of binding to antigen. *J. Mol. Biol.* 234, 958-964
- Hayashi, N., Welschof, M., Zewe, M., Braunagel, M., Dübel, S., Breitling, F. und Little, M. (1994). Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR. *BioTechniques* 17, 310-313
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. und Mullineaux, P.M. (2000a). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Bio.* 42, 819-832
- Hellens, R.P., Mullineaux, P.M. und Klee, H. (2000b). A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science* 5, 446-451
- Heim, R., Prasher, D.C. und Tsien, R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12501-12504

- Heim, R., Cubitt, A.B. und Tsien, R.Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663-664
- Hiatt, A., Cafferkey, R. und Bowdish, K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342, 76-78
- Hoffmann, G.M., Nienhaus, F., Poehling, H.-M., Schönbeck, F., Weltzien, H.C. und Wilbert, H. (1994). Lehrbuch der Phytomedizin, 3. neubearbeitete Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag
- Hollings, M. und Brunt, A.A.(1981). Potyviruses. Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis. Elsevier
- Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P. und Winter, G. (1991). Multi subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucl. Acid Res.* 19, 4133-4137
- Hoogenboom, H.R. (1997). Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Tibtech* 15, 62-70
- Hust, M., Krumbein, W.E. und Rhiel, E. (1999). An immunochemical in situ approach to detect adaption processes in the photosynthetic apparatus of diatoms of the Wadden Sea sediment surface layers. *Journal of Microbiological Methods* 38, 69-80
- Hust, M., Maiss, E., Jacobsen, H.-J. und Reinard, T. (2002). The single chain variable fragment scFv102 is a broad range diagnostic tool for the detection of potyvirus infected plants. *Journal of Immunological Methods* (angenommen).
- Hust, M., Maiss, E., Jacobsen, H.-J. und Reinard, T. (in Vorbereitung). An internal C-terminal self-cleavage of the NIa 27 kD protease of plum pox virus.
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett, H.M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoloreri, R.E., Haber, E., Crea, R. und Oppermann, H. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5879-5883
- Hwang, D.C., Kim, D.-H., Kang, B.H., Song, B.D. und Choi, K.Y. (2000). Molecular cloning, expression, and purification of nuclear inclusion a protease from Tobacco vein mottling virus. *Mol. Cells* 10, 148-155
- Jacob, F. und Monod J. (1961). Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3. 318-356

- Janeway, C.A. und Travers, P. (1997). Immunologie, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag
- Jespers, L.S., Messens, J.H., de Keyser, A., Eeckhout, D., van den Brande, I., Gansemans, Y.G., Lauwerey, M.J., Vlasuk, G.P. und Stanssens, P.E. (1995). Surface expression and ligand based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Biotechnology* 13, 378-381
- Joseph, J. und Savithri, H.S. (2000). Mutational analysis of the NIa protease from pepper vein banding potyvirus. *Archives of Virology* 145, 2493-2502
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M. und Gottesmann, K.S. (1987) Sequences of proteins of immunological interest. *US Dept. of Health and Human Services*. US Government Printing Office
- Kim, D.-H., Park, Y.S., Kim, S.S., Lew, J., Nam, H.G. und Choi, K.Y. (1995). Expression, purification, and identification of a novel self-cleavage site of the NIa C-terminal 27-KDa protease of turnip mosaic potyvirus C5. *Virology* 213, 517-525
- Kim, D.-H., Hwnag, D.C., Kang, B.H., Lew, J. und Choi, K.Y. (1996a). Characterization of NIa protease from turnip mosaic potyvirus exhibiting a low-temperature optimum catalytic activity. *Virology* 221, 245-249
- Kim, D.-H., Hwnag, D.C., Kang, B.H., Lew, J., Han, J., Song, B.D., und Choi, K.Y. (1996b). Effects of internal cleavages and mutations in the C-terminal region of NIa protease of turnip mosaic potyvirus on the catalytic activity. *Virology* 226, 183-190
- Kim, D.-H., Han, J.S., Lew, J., Kim, S.S., Kang, B.H., Hwang, D.C., Jang, D.S., Kim, W., Song, B.D. und Choi, K.Y. (1998). Effects of mutations in the C-terminal region of NIa protease on cis-cleavage between NIa and NIb. *Virology* 241, 94-100
- Kneissel, S., Queitsch, I., Petersen, G., Behrsing, O., Micheel, B. und Dübel, S. (1999). Epitope structures recognised by antibodies against the major coat protein (g8p) of filamentous bacteriophage fd (Inoviridae). *J. Mol. Biol.* 288, 21-28
- Knippers, R., Phillippsen, P., Schäfer, K.P. und Fanning, E. (1990). Molekulare Genetik, 5.Auflage. Georg Thieme Verlag
- Knuhtsen, H., Hiebert, E. und Purcifull, D.E. (1974). Partial purification and some properties of tobacco etch virus induced intranuclear inclusions. *Virology* 61, 200-209
- Köhler, G. und Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497

- Koshland, D. und Botstein, D. (1980). Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. *Cell* 20, 749-760
- Krebber, A.S., Bornhause, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H.R. und Plückthun, A. (1997). Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J. Immunol. Methods* 201, 35-55
- Kwon, J., Park, K.S., Park, S.W. und Choi, S.-Y. (1998). T Vector for direct selection using green fluorescent protein. *BioTechniques* 25, 192-196
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685
- Laliberte, J.F., Nicolas, O., Chatel, H., Lazure, C. und Morosoli, R. (1992). Release of a 22-kDa protein derived from the amino-terminal domain of the 49-kDa NIa of turnip mosaic potyvirus in *Escherichia coli*. *Virology* 190, 510-514
- Langley, K.E., Villarejo, M.R., Fowler, A.V., Zamenhof, P.J. und Zabin, I. (1975). Molecular basis of β -galactosidase α -complementation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 1254-1257
- Lederberg, E.M. (1951). Lysogeny in *E. coli* K12. *Genetics* 36. 560
- Lei, S.-P., Lin, H.-C, Wang, S.-S., Callaway, J. und Wilcox, G. (1987). Characterization of the *Erwinia caratovora pelB* gene and its product pectate lyase. *Journal of Bacteriology* 169, 4379-4383
- Liddell, E. und Weeks, I. (1996). Antikörper Techniken. Spektrum Akademischer Verlag
- Little, M. (1993). Bacterial surface presentation of proteins and peptides: an alternative to phage technology. *Tibtech* 11, 3-5
- López-Moya, J.J., Fernández-Fernández, M.R., Cambra, M. und García, J.A. (2000). Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology* 76. 121-136
- Maiti, I., Murphy, J.F., Shaw, J.G. und Hunt, A.G. (1993). Plants that express a potyvirus gene are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6110-6114
- Maiß, E., Timpe, U., Briske, A., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, G., Mattanovich, D. und Katinger, H.W.D. (1989). The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *Journal of General Virology* 70, 513-524

- Maiß, E. (1993). Das Scharka-Virus der Pflaume (PPV), ein Beispiel für die Nutzung der molekularbiologischen Charakterisierung von Pflanzenviren. Habilitationsschrift, Universität Hannover
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. und Winter, G. (1991). By-passing immunization: human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J.Mol. Biol.* 222, 581-597
- Marks, J.D., Malmqvist, A.D., Clackson, T.P., Bye, J.M. und Winter, G. (1992). By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology* 10, 779-783
- Martineau, P., Jones, P. und Winter, G. (1998). Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 280, 117-217
- Martineau, P. und Betton, J.-M. (1999). *In vitro* folding and thermodynamic stability of an antibody fragment selected *in vivo* for high expression levels in *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 292, 921-929
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. und Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554
- McConnell, S.J., Dinh, T., Le, M.-H. und Spinella, D.G. (1999). Biopanning phage display library using magnetic beads vs. polystyrene plates. *BioTechniques* 26, 208-214
- McKinney, H.D.(1929). Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *J. Agric. Res.* 39, 557-578
- Melton, D.A, Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M.R. (1984). Efficient *in vitro* translation of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* 12, 7035-7056
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology* 51, 263-73
- Nakata, Y., Tang, X. und Yokoyama, K.K. (1997). Preparation of competent cells for high-efficiency plasmid transformation of *Escherichia coli*. *Methods in Molecular Biology* 69, 129-137
- Nejdat, A., Clark, W.G. und Beachy, R.N. (1990). Engineered resistance against plant virus diseases. *Physiologia Plantarum* 80, 662-668

- Nicolaisen, M., Johansen, E., Poulsen, G.B. und Bokhardt, B. (1992). The 5' untranslated region from pea seedborne mosaic potyvirus RNA as a translational enhancer in pea and tobacco protoplasts. *FEBS Letters* 303, 169-172
- Nissim, A., Hoogenboom, H.R., Tomlinson, I.M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D. und Winter, G. (1994) Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *The EMBO Journal* 13, 692-698
- Parks, T.D. und Dougherty, W.G. (1991). Substrate recognition by the NIa proteinase of two potyviruses involves multiple domains: characterization using genetically engineered hybrid proteinase molecules. *Virology* 182, 17-27
- Parks, T.D., Howard, E.D., Wolpert, T.J., Arp, D.J. und Dougherty, W.G. (1995). Expression and purification of a recombinant tobacco etch virus NIa proteinase: biochemical analyses of the full-length and a naturally occurring truncated proteinase form. *Virology* 210, 194-201
- Parmley, S.F. und Smith, G.P. (1988). Antibody selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73, 305-318
- Pearson, W.R. (1990). Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology* 183, 63- 98
- Pérez-Martin, J., Cases, I. und de Lorenzo, V. (1997). Design of a solubilization pathway for recombinant polypeptides *in vivo* through processing of a bi-protein with a viral protease. *Protein Engineering* 10, 725-730
- Plückthun, A. (1990). Antibodies from *Escherichia Coli*. *Nature* 347, 497-498
- Powell-Abel, P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T. und Beachy, R.N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232, 738-743
- Proba, K., Ge, L. und Plückthun, A. (1995). Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli* influence of thioredoxin reductase (TrxB). *Gene* 159, 203-207
- Quaedvlieg, N.E.M., Schlaman, H.R.M., Admiraal, P.C., Wijting, S.E., Stougaard, J. und Spalink, H.P. (1998). Fusions between green fluorescent protein and β -glucuronidase as sensitive and vital bifunctional reporters in plants. *Plant Mol. Biol.* 37. 715-727
- Rademacher, T.W., Homans, S.W., Parekh, R.B. und Dwek, R.A. (1986). Immunoglobulin G as glycoprotein. *Biochem. Soc. Symp.* 51, 131-148

- Rasheed, I. und Oberer, E. (1986). Ff coliphages: Structural and functional relationship. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 33, 240-243
- Reinard, T., Sprunck, S., Altherr, S. und Jacobsen, H.-J. (1994). Biochemical properties of a novel cell wall protein associated with elongation growth in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 45, 1593-1601
- Reinard, T. und Jacobsen, H.-J. (1995). A soluble high affinity auxin-binding protein from pea apex. *J. Plant. Physiol.* 147, 132-138
- Remane, A., Storch, V. und Welsch, U. (1989). Kurzes Lehrbuch der Zoologie, Verlag 6. Auflage. Gustav Fischer Verlag
- Restrepo-Hartwig, M.A. und Carrington, J.C. (1992). Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *Journal of Virology* 66, 5662-5666
- Riechmann, J.L., Laín, S. und García, J.A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73, 1-16
- Riedel, D., Lesemann, D.-E. und Maiß, E. (1998). Ultrastructural localization of nonstructural and coat proteins of 19 potyviruses using antisera to bacterially expressed proteins of plum pox potyvirus. *Archives of Virology* 143, 2133-2158
- Rodini, B.C., Dale, J.L. und Harding, R.M. (1999). Characterization and expression of the coat protein-coding region of banana bract mosaic potyvirus, development of diagnostic assays and detection of the virus in banana plants from five countries in southeast Asia. *Archives of Virology* 144, 1725-1737
- Rorrer, K., Parks, T.D., Scheffler, B., Bevan, M. und Dougherty W.G. (1992). Autocatalytic activity of the tobacco etch virus NIa proteinase in viral and foreign protein sequences. *Journal of General Virology* 73, 775-783
- Rosidi, B. (2001). Molekularbiologische un immunbiochemische Charakterisierung der Antigene der monoklonalen Antikörpers TIM-11B2. Doktorarbeit am Lehrgebiet Molekulargenetik, Universität Hannover
- Rouis, S., Traincard, F., Gargouri, R., Dartevelle, S., Jeannequin, O., Mazié, J.C. und Ayadi, H. (2001). Inhibition of potato virus Y NIa activity: preparation of monoclonal antibody directed against PVY NI protein that inhibits cleavage of PVY polyprotein. *Archives of Virology* 146, 1297-1306
- Ryan, M.D. und Flynt, M. (1997). Virus encodes proteinases of the picornavirus supergroup. *Journal of General Virology* 78, 699-723

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Edn.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Santini, C.L., Bernadac, A., Zhang, M., Chanal, A., Ize, B., Blanco, C. und Wu, F.-E. (2001). Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 8159-8164
- Sawyer, C., Embleton, J. und Dean, C. (1997). Methodology for selection of human antibodies to membrane proteins from a phage-display library. *Journal of Immunological Methods* 204, 193-203
- Schaad, M.C., Haldemann-Cahill, R., Cronin, S. und Carrington, J.C. (1996). Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *Journal of Virology* 70, 7039-7048
- Schlegel, H.G. und Zaborosch, C. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. überarbeitete Auflage. Thieme Verlag
- Schlösser, E. (1997). *Allgemeine Phytopathologie*, 2. neubearbeitete Auflage. Thieme Verlag.
- Schouten, A., Roosien, J., van Engelen, F.A., de Jong, G.A.M., Borst-Vrensens, A.W.M., Zilverentant, J.F., Bosch, D., Stiekema, W.J., Gommers, F.J., Schots, A. und Bakker J. (1996). The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 30, 781-793
- Schouten, A., Roosien, J., de Boer, J.M., Wilmik, A., Rosso, M.-N., Bosch, D., Stiekema, W.J., Gommers, F.J., Bakker J. und Schots, A. (1997). Improving scFv antibody expression levels in the plant cytosol. *FEBS Letters* 415, 235-241
- Schwalbach, G., Sibler, A.-P., Choulier, L., Deryckère, F. und Weiss, E. (2000). Production of fluorescent single-chain antibody fragments in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 18, 121-132
- Seehaus, T., Breitling, F., Dübel, S., Klewinghaus, I. und Little, M. (1992). A vector for the removal of deletion mutants from antibody libraries. *Gene* 114, 235-237
- Shirai, H., Nakajima, N., Higo, J., Kidera, A. und Nakamura, H. (1996). Conformational sampling of CDR-H3 in antibodies by multicanonical molecular dynamics simulation. *J. Mol. Biol.* 278, 481-496

- Shirai, H., Kidera, A. und Nakamura, H. (1999). H3-rules: identification of CDR-H3 structures in antibodies. *FEBS Letters* 455, 188-197
- Skerra, A. und Plückthun A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041
- Slade, D.E., Johnston, R.E. und Dougherty, W.G. (1989). Generation and characterization of monoclonal antibodies reactive with the 49-kDa proteinase of tobacco etch virus. *Virology* 173, 499-508
- Slilaty, S.N. und Lebel, S. (1998). Accurate insertional inactivation of *lacZ α* : construction of pTrueBlue and M13TrueBlue cloning vectors. *Gene* 213, 83-91
- Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317
- Soderlind, E., Vergeles, M. und Borrebaeck, C.A. (1995). Domain libraries: synthetic diversity for de novo design of antibody V region. *Gene* 160, 269-272
- Sparks, A. (1996). Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual. Academic Press, Inc.
- Stark, D.M. und Beachy, R.N. (1989). Protection against potyvirus infection in transgenic plants: Evidence for broad spectrum resistance. *Biotechnology* 7, 1257-1262
- Stryer, L. (1995). Biochemie, 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology* 185, 60-89
- Tang, X., Nakata, Y., Li, H.-O., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Ohta, T. und Yokoyama, K. (1994). The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E.coli*. *Nucleic Acids Research* 22, 2857-2858
- Tavlodoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., de Martinis, D., Cattaneo, A. und Galeffi, P. (1993). Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* 366, 469-472
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680
- Töpfer, R., Schell, J. und Steinbüß, H.-H. (1988). Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer. *Nucl. Acids Res.* 16, 8725

- Towbin, H., Staehlin, T. und Gordon, J. (1979). Elektrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354
- Tur, M.K., Huhn, M., Sasse, S., Engert, A. und Barth, S. (2001). Selection of scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to significant loss of insert-free phages. *BioTechniques* 30, 404-413
- Van der Vlugt, R.A.A., Ruiter, R.K. und Goldbach, R. (1992). Evidence for sense RNA-mediated protection to PVY^N in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Mol. Biol.* 20, 631-639
- Van der Vlugt, R.A.A. und Goldbach, R. (1993). Tobacco plants transformed with the potato virus Y^N coat protein gene are protected against different PVY isolates and against aphid-mediated infection. *Transgenic Res.* 2, 109-114
- Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. und Wickner, R.B. (2000). Virus Taxonomy, seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press
- Varrelmann, M., Palkovics, L. und Maiss, E. (2000). Transgenic or plant expression vector-mediated recombination of plum pox virus. *Journal of Virology* 74, 7462-7469
- Verchot, J., Koonin, E.V. und Carrington, J.C. (1991). The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus encoded proteinase. *Virology* 185, 527-535
- Verchot, J., Herndon, K.L. und Carrington, J.C. (1992). Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology* 190, 298-306
- Voet, D. und Voet, J.G. (1994). Biochemie, 1. korrigierte Auflage. Verlag Chemie
- Ward, E.S., Güssow, D., Griffith, A.D., Jones, P.T., Winter, G. (1989). Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 341, 544-546
- Wilkinson, K.A., Belisle, J.T., Mincek, M., Wilkinson, R.J. und Toossi, Z. (2000). Enhancement of the human T cell response to culture filtrate fractions of *Mycobacterium tuberculosis* by microspheres. *Journal of Immunological Methods* 235, 1-9

- Williamson, R.A., Burioni, R., Sanna, P.P., Partridge, L.J., Barbas III, C.F. und Burton, D.R. (1993). Human monoclonal antibodies against a plethora of viral pathogens from single combinatorial library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4141-4145
- Winter, G. und Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature* 349, 293-299
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. und Hoogenboom, H.R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455
- Wu, T.T., Johnson, G. und Kabat, E.A. (1993). Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* 16, 1-7
- Xiao, X.W., Chu, P.W.G., Frenkel, M.J., Tabe, L.M., Shukla, D.D., Hanna, P.J., Higgins, T.J.V., Müller, W.J. und Ward, C.W. (2000). Antibody-mediated improved resistance to CIYVV and PVY infections in transgenic tobacco plants expressing a single chain variable region antibody. *Molecular Breeding* 6, 421-431

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. H.-J. Jacobsen für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit, die sehr guten Arbeitsmöglichkeiten und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Maiß danke ich für die zur Verfügung gestellten Plasmide, die potyvirusinfizierten Tabakpflanzen, für seine stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die Übernahme des Korreferats.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Dr. T. Reinard für die Betreuung der Arbeit und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft. Er ließ mir in der Entwicklung der Arbeit freie Hand, so daß ich auch meiner wissenschaftlichen Neugier nachgehen konnte und Themengebiete abseits der eigentlichen Arbeitsaufgaben, wie die Untersuchung der Prozessierung der NIa-Protease, untersuchen konnte.

Herrn Dr. H.J. Vetten von der Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) Braunschweig danke ich für die Bereitstellung des potyvirusinfizierten Pflanzenmaterials.

Marco Swenty und der Arbeitsgruppe Schiemann der BBA danke ich für die Herstellung der transgenen Kartoffeln.

Ich danke der ganzen Arbeitsgruppe insbesondere denen, die mit mir zusammen im Labor standen, Andre Frenzel, Wendy Gerlach, Viktoria Janke, Gabi Köhl, Björn Lauer, Ilka Otteleben, Bustanur Rosidi und Mark von Stackelberg, für die gute Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und die schöne gemeinsame Zeit. Bustanur danke ich speziell für die Einarbeitung in die biochemischen Methoden.

Mein besonderer Dank geht an meine Freundin Dagmar Bauerbach.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich stets gefördert, unterstützt und mir das Studium ermöglicht haben.

Lebenslauf

Lebensdaten

Name	Michael Hust
Geburtsdatum	22.10.1972
Geburtsort	Oldenburg (Niedersachsen)

Schulischer Werdegang

1979-1983	Grundschule in Ganspe, Gemeinde Berne (Niedersachsen)
1983-1985	Orientierungsstufe in Berne
1985-1989	Realschule in Berne
1989-1992	Gymnasium in Brake (Unterweser), Abschluß Abitur
1992-1993	Zivildienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe

Studium

1993-1999	Studium der Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
1998-1999	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Geomikrobiologie (Institut für Biologie und Chemie des Meeres, ICBM), Abschluß Diplom-Biologe
Seit 1999	Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Lehrgebiet Molekulargenetik, Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hannover, den xx.xx.2002

(Michael Hust)