

**Untersuchungen zum Nachweis von Pflanzenviren
mit Peptiden und *Antibody Mimics* aus
Phagenbibliotheken**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

M. Sc. Dominik Lars Klinkenbuß

geboren am 08.06.1986 in Dorsten

2016

Referent: Prof. Dr. Edgar Maiß

Korreferent: Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer

Tag der Promotion: 09.03.2016

KURZFASSUNG

Trotz der kontinuierlichen Entwicklung neuerer und scheinbar fortschrittlicherer Methoden und Techniken für die Erkennung und Identifizierung von Pflanzenviren, eignen sich nur wenige dieser Methoden für Routinetests in Laboratorien. Aufgrund einzigartiger Merkmale, wie zum Beispiel die robuste Funktionalität bei einer genauen Reproduzierbarkeit, sind bis heute der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) und die *real-time polymerase chain reaction* (qPCR) zwei der meist genutzten Diagnosetools. Das Ziel dieser Studie war die Identifikation von sogenannten „*antibody mimics*“ aus einer Phagenbibliothek gegen das *Calibrachoa mottle virus* (CbMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Plum pox virus* (PPV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco mosaic virus* (TMV) und *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Im Bestfall sollen diese „*antibody mimics*“ die Vorteile von Antikörpern in einem ELISA besitzen und mögliche Nachteile, wie zum Beispiel die Abhängigkeit der begrenzten Ressourcen, da die benötigten Antikörper ständig nachproduziert und validiert werden müssen, vermieden werden. Dies kann durch die Produktion und Lagerung der „*antibody mimics*“ in Bakterienzellen erreicht werden. In einem Screeningverfahren, dem sogenannten „Biopanning“, werden Phagen selektiert, die fest an das Zielmolekül binden. In dieser Arbeit wurden diese Biopannings mit den kommerziell erhältlichen Phagenbibliotheken Ph.D.TM-12, Ph.D.TM-C7C und den scFv-Bibliotheken Tomlinson I/J ausgeführt. Zusätzlich wurde eine gemischte scFv-Bibliothek aus HAL9/HAL10 verwendet. Neben der bekannten Präsentation der Zielmoleküle in Form von exprimierten Hüllproteinen oder gereinigten Virionen auf Plastikoberflächen wurde außerdem eine Methode getestet, in der die gesamte Bibliothek gegen gesunden Pflanzensaft präinkubiert und danach gegen infizierten Pflanzensaft gescreent wurde. Durch diese Arbeitsschritte wurden eine signifikante Reduzierung der unspezifisch reagierenden Phagen und ein einfacherer und schnellerer Screeningprozess erwartet.

Es konnten viele Phagen identifiziert werden, die eine positive Reaktion mit exprimierten Hüllproteinen oder infiziertem Pflanzensaft aufwiesen, die meisten Phagen zeigten jedoch zusätzlich eine Interaktion mit gesundem Pflanzenmaterial. Nur fünf scFvs, die mit der neuen Methode gegen das CbMV gescreent wurden, zeigten eine signifikante Interaktion mit infiziertem *Nicotiana benthamiana* in ELISAs und führten zu starken Signalen ohne eine unspezifische Reaktion mit dem Pflanzenmaterial. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass auf Phagen basierende „*antibody mimics*“ ein wertvolles ergänzendes Werkzeug für die Verbesserung von Pflanzenvirusnachweisen in ELISAs sein können.

Schlagerworte: *antibody mimic*, Pflanzenvirus, Biopanning, ELISA, scFv, CbMV

ABSTRACT

Despite the continuous development of newer and apparently more advanced methods and techniques for detecting and identifying of plant viruses, only a few of these new methods are used for routine testing in laboratories. Due to the unique characteristics, for example an industry standard format, a robust functionality and high levels of repeatability and reproducibility, the *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) and the *real-time polymerase chain reaction* (qPCR) are two of the most common used diagnostic tools. The aim of this study was the identification of *antibody mimics* directed towards the *Calibrachoa mottle virus* (CbMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Plum pox virus* (PPV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) derived from a phage library. These *antibody mimics* should combine the benefits of antibodies in ELISA procedures but do not have some of the disadvantages, for example the costly dependence on finite resources as the required antibodies for the test procedure have to be produced and validated consistently. To overcome this disadvantage, *antibody mimics* can be easily produced and stored in bacteria. In a screening procedure called “Biopanning” phages are selected which bind tightly to target molecules. The pannings were carried out with the commercially available phage library Ph.D.TM-12, phage library Ph.D.TM-C7C, the scFv libraries Tomlinson I/J and a mixed scFv library of HAL9/HAL10. Besides the common offering of expressed virus coat proteins by bacteria or complete virions in Biopanning procedures, we also tested a method in which we preincubated a complete phage library against healthy plant sap and used virus infected plant sap for the following Biopanning. Due to these working steps, we expected a significant loss of cross binding phages and an easier screening process. As a result, many phages of different libraries demonstrated a positive reaction with expressed coat proteins or infected plant sap, but we also noticed interactions with healthy plant material. Only five scFvs, screened with the new method against CbMV, showed a significant interaction with infected *Nicotiana benthamiana* in ELISAs, revealing high readings within two hours without cross reactions to the plant material.

The results indicate that *antibody mimics* based on phages can be a valuable tool to support and improve ELISAs for detection of plant viruses.

Keywords: *antibody mimic*, plant virus, Biopanning, ELISA, scFv, CbMV

INHALTSVERZEICHNIS

KURZFASSUNG	III
ABSTRACT	IV
INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
Aminosäuren	XIV
Virusabkürzungen	XV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XVI
TABELLENVERZEICHNIS	XX
1 Einleitung	24
1.1 Ziele dieser Arbeit	24
1.2 Einleitung zu Pflanzenviren	25
1.3 Eine kurze Vorstellung der in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenviren	28
1.3.1 <i>Calibrachoa mottle virus</i> als Vertreter des Genus <i>Carmovirus</i>	29
1.3.2 <i>Cucumber mosaic virus</i> als Vertreter des Genus <i>Cucumovirus</i>	31
1.3.3 <i>Plum pox virus</i> und <i>Potato virus Y</i> als Vertreter des Genus <i>Potyvirus</i>	33
1.3.4 <i>Tobacco mosaic virus</i> als Vertreter des Genus <i>Tobamovirus</i>	37
1.3.5 <i>Tomato spotted wilt virus</i> als Vertreter des Genus <i>Tospovirus</i>	39
1.4 Bakteriophagen als „ <i>antibody mimics</i> “	41
1.4.1 Eine kurze zeitliche Einordnung der Entdeckung und Geschichte von Bakteriophagen.....	42
1.4.2 Biologie filamentöser Ff-Bakteriophagen	44
1.4.3 Biopanning mit Phagenbanken.....	49
1.5 Der Nachweis von Viren durch „ <i>antibody mimics</i> “ aus Phagenbibliotheken	52
2 Material und Methoden	54
2.1 Materialien.....	54
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	54
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	56

2.1.3	Verwendete Pflanzenviren.....	58
2.1.4	Verwendete Pflanzen.....	59
2.1.5	Lösungen und Puffer	59
2.1.6	Verwendete Antibiotika.....	62
2.1.7	<i>Escherichia coli</i> Bakterienstämme.....	62
2.1.8	<i>Rhizobium radiobacter</i> Bakterienstamm.....	62
2.1.9	Nährmedien	63
2.1.10	Oligonukleotide	64
2.1.11	Verwendete Enzymen.....	65
2.1.12	Verwendete Restriktionsendonukleasen.....	65
2.1.13	Plasmide, Phagen und Phagemide.....	66
2.1.14	Desoxyribonukleosidtriphosphate	67
2.1.15	Eingesetzte Phagenbibliotheken.....	67
2.1.16	Verwendete Antikörper	68
2.1.17	Computersoftware und Internetdienste.....	68
2.1.18	DNA- und Protein-Größenstandards	69
2.2	Methoden.....	70
2.2.1	Anzucht der Versuchspflanzen.....	70
2.2.2	Erhaltung von Pflanzenviren durch mechanische Übertragung.....	70
2.2.3	Trocknung von infiziertem Pflanzenmaterial mit Calciumchlorid.....	70
2.2.4	Extraktion von Gesamtnukleinsäuren mit Silica-Partikeln	71
2.2.5	Synthese von <i>complementary</i> DNA (cDNA)	72
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	72
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	73
2.2.8	DNA-Extraktion aus Agarosegelen (Quantum-Reinigung)	74
2.2.9	DNA-Extraktion aus Agarosegelen mit dem NucleoSpin [®] Extract II Kit.....	74
2.2.10	Reinigung von PCR-Produkten oder Plasmiden mit SureClean (Bioline).....	75
2.2.11	Sequenzierung von DNA.....	75

2.2.12	Phosphorylierung und Ligation von gereinigten PCR-Fragmenten	75
2.2.13	<i>Gibson Assembly</i> – eine isothermale Rekombinationsmethode	76
2.2.14	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	76
2.2.15	Herstellung und Transformation kompetenter <i>R. radiobacter</i>	77
2.2.16	Herstellung von Dauerkulturen	78
2.2.17	Plasmid-Minipräparation aus <i>E. coli</i> und <i>R. radiobacter</i>	78
2.2.18	Inokulation von <i>N. benthamiana</i> mit <i>R. radiobacter</i>	79
2.2.19	Expression rekombinanter Virushüllproteine mit den pQE_30 Vektoren	80
2.2.20	Expression rekombinanter Virushüllproteine mit den pRSET A Vektoren	81
2.2.21	Reinigung von TMV durch Ammoniumsulfatfällung	82
2.2.22	Chloroform/Butanol Fällung zur Aufreinigung von Pflanzenviren	82
2.2.23	Proteinkonzentrationsbestimmungen mit BCA und Roti®-Quant	83
2.2.24	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	84
2.2.25	Biopanning mit den „Ph.D.™ Phage Display Libraries“	85
2.2.26	Biopanning mit den scFv-Bibliotheken Tomlinson I und J	88
2.2.27	Biopanning mit den scFv-Bibliotheken HAL9 und HAL10	90
2.2.28	Anzucht der M13K07 Helferphagen	92
2.2.29	Anzucht einzelner Phagenklone aus den Ph.D.™ Phage Display Bibliotheken ..	92
2.2.30	Anzucht einzelner Phagen aus den HAL9/10 Bibliotheken	93
2.2.31	Titration der „Ph.D.™ Phage Display Libraries“ von New England Biolabs	93
2.2.32	Alternative Titrations ohne die Verwendung von Top Agar	94
2.2.33	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	95
3	Ergebnisse	98
3.1	Viruserhaltung und Symptomatologie	98
3.2	Expression rekombinanter Virushüllproteine	102
3.2.1	Expression rekombinanter Virushüllproteine im pQE_30 Vektor	102
3.2.2	Expression rekombinanter Virushüllproteine im pRSET A Vektor	104
3.3	Reinigung des TMV aus infiziertem Pflanzenmaterial	106

3.4	Ergebnisse des Biopanning mit den Ph.D. TM Phage Display Peptide Library Kits	107
3.4.1	Ergebnisse des Biopanning I mit den Ph.D. TM -12 Phage Display Peptide Library Kit mit exprimiertem CMV-CP und PPV-CP aus pQE_30.....	107
3.4.2	Ergebnisse des Biopanning II mit den Ph.D. TM -12 und Ph.D. TM -C7C Phage Display Peptide Library Kits mit gereinigtem TMV (<i>Ohio V</i>).....	109
3.4.3	Ergebnisse des Biopanning III mit den Ph.D. TM -12 und Ph.D. TM -C7C Phage Display Peptide Library Kits mit gereinigtem TMV <i>Ohio V</i> und exprimierten Hüllproteinen von CMV, PPV, PVY und TSWV aus den pQE_30 Vektoren...	115
3.4.4	Anpassungen der ELISAs für die Minimierung der unspezifischen Reaktionen von ausgewählten Klonen.....	120
3.5	Ergebnisse des Biopanning mit den scFv-Bibliotheken Tomlinson I und J.....	125
3.6	Ergebnisse des Biopanning mit den scFv-Bibliotheken HAL9 und HAL10	129
3.6.1	Untersuchungen zu den CbMV spezifischen Phagenklonen.....	138
3.6.2	Expression schon beschriebener scFvs im pHAL30 Phagemid	148
4	Diskussion.....	150
4.1	Das Biopanning der Ph.D. TM <i>Phage Display Libraries</i>	152
4.2	Das Biopanning der scFv <i>Phage Display Libraries</i>	158
4.3	Mögliche Vorteile im Screeningverfahren und der Produktion von scFvs gegen Pflanzenviren aus einem <i>Phage Display</i> gegenüber konventionellen Antikörpern	166
4.4	Zusammenfassung/Ausblick.....	169
5	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	170
6	LITERATURVERZEICHNIS	171
7	DANKSAGUNG	192
8	ANHANG	194
8.1	Aufbau der Plasmide und Phagemide: Sequenzen und Klonierungsstrategien.....	194
8.1.1	Aufbau der Expressionsvektoren.....	194
8.1.2	Aufbau der <i>random peptide library-gIII</i> Fusionen der <i>Ph.D.TM Phage Display Libraries</i>	198
8.1.3	Aufbau der scFv-Bibliotheken Tomlinson I und J	202

8.1.4	Aufbau der scFv-Bibliotheken HAL9 und HAL10	203
8.2	Teilsequenzen ausgewählter Klone	205
8.3	ELISA Rohdaten	212
9	Lebenslauf	236

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Adenin
abs.	Absolut
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (siehe: <i>Rhizobium radiobacter</i>)
AP	Alkalische Phosphatase
as	<i>Antisense</i>
ASPD	<i>Artificial Selected Proteins/Peptides Database</i>
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
Blast	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
C.	<i>Chenopodium</i>
ca.	Circa
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i>)
cfu	<i>colony forming units</i>
CI	<i>Cylindrical Inclusion protein</i>
CP	<i>coat protein</i> (Hüllprotein)
DAS-ELISA	<i>double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
dsDNA	(<i>double stranded</i>) doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
ebd	ebenda
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPPO	<i>European and Mediterranean Plant Protection Organization</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Fc	<i>crystallisable fragment</i>
FD	<i>Fast Digest</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanosin
Gn	<i>glycoprotein</i>
Gc	<i>glycoprotein</i>
h	hour (Stunde)
HC-Pro	<i>Helper Component-Protease</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IgG	Immunglobulin G
IGPS	Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	<i>Kilo dalton</i>
L	<i>large protein</i>
L	Liter
M	Molar
MCS	<i>Multiple cloning site</i> (Multiple Klonierungsstelle)
MEDLINE	<i>Medical Literature Analysis and Retrieval System Online</i>
mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MAbs	monoklonalen Antikörpern
MP	<i>movement protein</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
N.	<i>Nicotiana</i>
N	<i>nucleocapsid protein</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

ng	Nanogramm
NIa	<i>nuclear inclusion A</i>
NIb	<i>nuclear inclusion B</i>
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
NSm	<i>nonstructural protein</i>
NSs	<i>nonstructural protein</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
ORF	<i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen)
p	<i>protein</i>
pI-pXI	Proteine 1-11 der M13-Phagen
P1-Pro	P1-Protease
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
Pers. Komm.	Persönliche Kommunikation
pH	negativer dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PIPO	<i>Pretty Interesting Potyviridae</i> ORF
Pro	<i>Protease</i>
qPCR	<i>real time quantitative PCR</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
<i>R. radiobacter</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RS	Replikative Form
RT	Reverse Transkriptase
s	<i>sense</i>
s	Sekunde
scFv	<i>single chain fragment variable</i>
sgRNA	subgenomische RNA
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
ssp.	Subspecies
T	Thymin
tRNA	Transfer-RNA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TUP	<i>target-unrelated phages or peptides</i>
U	Uracil

U	<i>Units</i> (Einheiten)
UniProt	<i>Universal Protein Resource</i>
UV	Ultraviolett
v	<i>volume</i> (Volumen)
<i>var.</i>	<i>varietas</i>
VPg	<i>viral protein genome-linked</i>
v/v	<i>volume to volume</i>
w	<i>weight</i> (Gewicht)
w/v	<i>weight to volume</i>
z.B.	Zum Beispiel
λ	<i>Lambda</i>

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Virusabkürzungen

ACMV	<i>African cassava mosaic virus</i>
ANDV	<i>Andes virus</i>
IBV	<i>Avian infectious bronchitis virus</i>
HPAI	<i>Avian influenza virus</i>
BSV	<i>Banana streak virus</i>
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i>
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>
CbMV	<i>Calibrachoa mottle virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
EpYVV	<i>Eupatorium yellowing vein virus</i>
GVB	<i>Grapevine virus B</i>
HEV	<i>Hepatitis E virus</i>
HRV	<i>Human rotavirus</i>
IHNV	<i>Infectious haematopoietic necrosis virus</i>
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>
LChV-1	<i>Little cherry virus 1</i>
NDV	<i>Newcastle disease virus</i>
PRSV	<i>Papaya ringspot virus</i>
PZSV	<i>Pelargonium zonate spot virus</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>
PLRV	<i>Potato leafroll luteovirus</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
RBSDV	<i>Rice black streaked dwarf virus</i>
SVC	<i>Spring viremia of carp virus</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
WSSV	<i>White spot syndrome virus</i>

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.3-1 Schematische Genomstruktur des CbMV	30
Abbildung 1.3-2 Schematische Genomstruktur von Viren des Genus <i>Cucumovirus</i>	32
Abbildung 1.3-3 Schematische Genomstruktur von Viren des Genus <i>Potyvirus</i>	36
Abbildung 1.3-4 Schematische Genomstruktur von Viren des Genus <i>Tobamovirus</i>	38
Abbildung 1.3-5 Schematische Genomstruktur von Viren des Genus <i>Tospovirus</i>	40
Abbildung 1.4-1 Nachweis eines Zielmoleküls mit einem „ <i>antibody mimic</i> “	41
Abbildung 1.4-2 Replikationszyklus der Ff Phagen	48
Abbildung 1.4-3 Schematische Darstellung einer Biopanning-Prozedur	50
Abbildung 2.1-1 λ -PstI DNA-Größenstandard von Fermentas, 1,5 %iges Gel	69
Abbildung 2.1-2 Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Marker (SM0671)	69
Abbildung 3.1-1 Symptomatologie von CbMV und CMV PV-0506 an Blättern von <i>N. benthamiana</i>	98
Abbildung 3.1-2 Symptomatologie von PPV Bul PV-0212 und PVY N605 an Blättern von <i>N. benthamiana</i>	99
Abbildung 3.1-3 Symptomatologie von TMV PV-0107 und TSWV 12 an den Blättern von <i>N. benthamiana</i>	99
Abbildung 3.1-4 Ergebnis eines DAS-ELISA mit infiziertem und gesundem Pflanzenmaterial (CMV, PPV, PVY und TSWV)	100
Abbildung 3.1-5 Ergebnis zweier DAS-ELISAs mit infiziertem und gesundem Pflanzenmaterial (CbMV und TMV)	101
Abbildung 3.2-1 Nachweis der exprimierten Hüllproteine im pQE_30 Vektor in einer PAGE	102
Abbildung 3.2-2 Ergebnisse verschiedener DAS-ELISAs mit exprimierten Hüllproteinen aus pQE_30	103
Abbildung 3.2-3 Nachweis der exprimierten Hüllproteine im pRSET A Vektor in einer PAGE.....	104
Abbildung 3.2-4 Ergebnisse eines DAS-ELISA mit exprimierten Hüllproteinen aus pRSET A	105
Abbildung 3.3-1 Beispielhafter Nachweis von gereinigtem TMV Hüllprotein aus <i>N.</i> <i>benthamiana</i> in einer PAGE.....	106
Abbildung 3.4-1 Biopanning I: Ergebnisse eines Phagen-ELISA mit CMV-CP und CMV infiziertem Pflanzenmaterial	108

Abbildung 3.4-2 Biopanning II: Ergebnisse eines Phagen-ELISA mit TMV <i>Ohio V</i> (Grobreinigung).....	110
Abbildung 3.4-3 Ergebnisse von zwei Phagen-ELISAs mit den K4 Phagen mit Streptavidin, Entwicklung der Methode	112
Abbildung 3.4-4 Ergebnisse eines <i>plate-trapped</i> Phagen-ELISA mit der Phagensuspension 1/3/5 und dem Phagen M13K07 mit gereinigtem TMV <i>Ohio V</i>	113
Abbildung 3.4-5 Ergebnisse eines <i>plate-trapped</i> Phagen-ELISA der Phagensuspension 1/3/5 mit TMV <i>Ohio V</i> infiziertem und gesundem Pflanzenmaterial.....	114
Abbildung 3.4-6 Ergebnisse des Phagen-ELISA nach dem Biopanning III mit je zehn Klonen aus beiden Bibliotheken mit PPV-CP und PVY-CP	116
Abbildung 3.4-7 Ergebnisse von drei Phagen-ELISAs nach dem Biopanning III mit je zehn Klonen aus beiden Bibliotheken mit TMV <i>Ohio V</i> und dem TSWV-CP	117
Abbildung 3.4-8 Ergebnisse von zwei Phagen-ELISAs nach dem Biopanning III mit je 15 Klonen aus der Bibliothek Ph.D. TM -12 und 13 Klonen aus der Bibliothek Ph.D. TM -C7C mit TMV <i>Ohio V</i>	118
Abbildung 3.4-9 Ergebnisse eines <i>plate-trapped</i> Phagen-ELISA mit nicht infiziertem Pflanzenmaterial verschiedener Pflanzenarten.....	121
Abbildung 3.4-10 Ergebnisse eines <i>plate-trapped</i> Phagen-ELISA des K4 Phagen gegen gesundes Pflanzenmaterial.	122
Abbildung 3.4-11 Ergebnisse eines Phagen-ELISAs mit gereinigten TMV Stämmen	123
Abbildung 3.5-1 Ergebnisse des ELISA der scFv-Phagen 1-10 aus den Tomlinson Bibliotheken	126
Abbildung 3.5-2 Ergebnisse des ELISA der scFv-Phagen 11-30 aus den Tomlinson Bibliotheken	126
Abbildung 3.5-3 Ergebnisse des ELISA ausgewählter scFv-Phagen aus den Tomlinson Bibliotheken	127
Abbildung 3.5-4 Ergebnisse des ELISA des Phagen TMV_CP_1_J mit TMV und gesundem Pflanzenmaterial	128
Abbildung 3.6-1 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit PPV (PV-0212) infiziertem Pflanzenmaterial	130
Abbildung 3.6-2 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit PVY N605 infiziertem Pflanzenmaterial	131
Abbildung 3.6-3 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit CMV (PV-0506) infiziertem Pflanzenmaterial.....	132

Abbildung 3.6-4 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit TMV (PV-0107) infiziertem Pflanzenmaterial..... 133

Abbildung 3.6-5 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFv Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit TSWV (12) infiziertem Pflanzenmaterial..... 134

Abbildung 3.6-6 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit CbMV infiziertem Pflanzenmaterial..... 135

Abbildung 3.6-7 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit TMV (PV-0107) infiziertem Pflanzenmaterial..... 136

Abbildung 3.6-8 Ergebnisse des ELISA 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit PVY (N605) infiziertem Pflanzenmaterial 137

Abbildung 3.6-9 Ergebnisse eines *Capture*-ELISA mit ausgewählten gegen CbMV gerichteten Phagen 138

Abbildung 3.6-10 Ergebnisse des Vergleichs eines *Capture*-ELISA mit einem *plate-trapped* ELISA der gegen CbMV gerichteten Phagen 139

Abbildung 3.6-11 Ergebnisse eines *Capture*-ELISA mit ausgewählten gegen CbMV gerichteten Phagen aus dem pHAL30 und M13K07 Hintergrund 140

Abbildung 3.6-12 Ergebnisse eines Verdünnungstests in einem *Capture*-ELISA mit verschiedenen Konzentrationen des Pflanzenmaterials und der Phagen SH1327-C3. 141

Abbildung 3.6-13 Ergebnisse eines Verdünnungstests in einem *Capture*-ELISA mit verschiedenen Konzentrationen des Pflanzenmaterials und der Phagen SH1327-C9. 142

Abbildung 3.6-14 Ergebnisse eines Kreuztests in einem *Capture*-ELISA mit durch verschiedene Viren infiziertes Pflanzenmaterial, den jeweiligen Antiseren und den Gesundkontrollen (SH1327-C3 und SH1327-C9)..... 144

Abbildung 3.6-15 Ergebnisse eines Kreuztests in einem *Capture*-ELISA mit durch verschiedene Viren infiziertes Pflanzenmaterial, den jeweiligen Antiseren und den Gesundkontrollen (SH1327-A10 und SH1327-C10). 145

Abbildung 3.6-16 Die grafische Darstellung der Verteilung der Versuchsdaten in einem Boxplot..... 147

Abbildung 3.6-17 Ergebnisse des *Capture*-ELISA mit gegen CMV (PV-0506) und PVY (N605) gerichteten Phagen aus infiziertem Pflanzenmaterial 148

Abbildung 8.1-1 Aufbau des Expressionsvektors pQE_30..... 194

Abbildung 8.1-2 Aufbau des Expressionsvektors pRSET A, B, C 196

Abbildung 8.1-3 Sequenz der <i>random peptide library-pIII</i> Fusionen der der <i>Ph.D.TM Phage Display Libraries</i>	198
Abbildung 8.1-4 Vektorkarte und Sequenz des pIT2 Vektors	202
Abbildung 8.1-5 Vektorkarte der Phagemide pHAL30 und pHAL14	203

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.3-1 Eine Übersicht zu den Top 10 der Pflanzenviren	28
Tabelle 2.1-1 Ein Überblick über die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	54
Tabelle 2.1-2 Ein Überblick über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien	56
Tabelle 2.1-3 Ein Überblick über die verwendeten Pflanzenviren	58
Tabelle 2.1-4 Ein Überblick über die verwendeten Pflanzen.....	59
Tabelle 2.1-5 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer	59
Tabelle 2.1-6 Ein Überblick über die verwendeten Antibiotika	62
Tabelle 2.1-7 Beschreibung der verwendeten <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	62
Tabelle 2.1-8 Beschreibung des verwendeten <i>R. radiobacter</i> Stamms.....	62
Tabelle 2.1-9 Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien	63
Tabelle 2.1-10 Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide.....	64
Tabelle 2.1-11 Konzentration und Herkunft der verwendeten Enzyme.....	65
Tabelle 2.1-12 Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen	65
Tabelle 2.1-13 Referenznummern und Selektionsmarker der verwendeten Plasmide, Phagen und Phagemide	66
Tabelle 2.1-14 Konzentrationen der verwendeten Desoxyribonukleosidtriphosphate	67
Tabelle 2.1-15 Herkunft und Bindungsmolekül der verwendeten Phagenbibliotheken	67
Tabelle 2.1-16 Herkunft und Arbeitsverdünnungen der verwendeten Antikörper	68
Tabelle 2.1-17 Ein Überblick über die verwendete Computersoftware.....	68
Tabelle 2.2-1 Die Komponenten in einer beispielhaften cDNA-Synthese (10 µl Gesamtansatz)	72
Tabelle 2.2-2 Herstellung der Expressionsvektoren in pQE_30	80
Tabelle 3.4-1 Übersicht über das Biopanning I mit CMV-CP und PPV-CP aus pQE_30.....	107
Tabelle 3.4-2 Übersicht über Proteinsequenzen im variablen Teil des pIII ausgewählter Phagen des Biopanning I gegen CMV-CP	109
Tabelle 3.4-3 Übersicht über das Biopanning II mit gereinigtem TMV	109
Tabelle 3.4-4 Übersicht über Proteinsequenzen im variablen Teil des pIII ausgewählter Phagen des Biopanning II.....	111
Tabelle 3.4-5 Übersicht über das Biopanning III mit gereinigtem TMV <i>Ohio V</i> und exprimierten Hüllproteinen des CMV, PPV, PVY und TSWV	115
Tabelle 3.4-6 Übersicht über Sequenzen ausgewählter pIII-Fusionsproteine des Biopanning III.....	119
Tabelle 3.4-7 Übersicht über Proteinsequenzen im pIII von M13K07 Phagen	120

Tabelle 3.4-8 Ergebnisse der 144 weiteren Phagenklone.....	124
Tabelle 3.5-1 Übersicht über das Biopanning mit den scFv-Bibliotheken Tomlinson I und J mit gereinigtem TMV <i>Ohio V</i> und den exprimierten Hüllproteinen von CMV, PPV und TMV	125
Tabelle 3.6-1 Das Biopanning mit den scFv-Bibliotheken HAL9 und HAL10.....	129
Tabelle 8.1-1 PCR-Programme zur Amplifikation der Hüllproteinfragmente für die pQE_30 Vektoren	195
Tabelle 8.1-2 Restriktionsverdau der Fragmente aus Tabelle 8.1-1 und der pQE_30 Vektoren.	195
Tabelle 8.1-3 PCR-Programme zur Amplifikation der Hüllproteinfragmente für die pRSET A Vektoren	197
Tabelle 8.1-4 Restriktionsverdau der Fragmente aus Tabelle 8.1.-3 und der pRSET Vektoren.	197
Tabelle 8.1-5 Der Überblick über die DNA und Proteinsequenz ausgewählter Klone im Biopanning I.....	199
Tabelle 8.1-6 Der Überblick über die DNA und Proteinsequenz ausgewählter Klone im Biopanning II.....	199
Tabelle 8.1-7 Der Überblick über die DNA und Proteinsequenz ausgewählter Klone im Biopanning III	199
Tabelle 8.1-8 PCR-Programme zur Amplifikation der spezifischen M13K07-Peptidphagen200	
Tabelle 8.1-9 PCR-Programm 1 zur Amplifikation der spezifischen M13K07-scFv-Phagen mittels Gibson Assembly.....	201
Tabelle 8.1-10 PCR-Programm 2 zur Amplifikation der spezifischen M13K07-scFv-Phagen mittels Gibson Assembly.....	201
Tabelle 8.1-11 PCR-Programme zur Amplifikation der gBlocks der scFvs EU589245.1 (CMV) und 3_17 (PVY).....	204
Tabelle 8.1-12 Restriktionsverdau der Fragmente aus Tabelle 8.1-11 und dem Plasmid p2611	204
Tabelle 8.2-1 DNA-Sequenz scFv SH1327-A10 in pHAL30, <i>NcoI</i> bis Amber-Stoppcodon	205
Tabelle 8.2-2 DNA-Sequenz scFv SH1327-C3 in pHAL30, <i>NcoI</i> bis Amber-Stoppcodon ..	206
Tabelle 8.2-3 DNA-Sequenz scFv SH1327-C9 in pHAL30, <i>NcoI</i> bis Amber-Stoppcodon ..	206
Tabelle 8.2-4 DNA-Sequenz scFv SH1327-C10 in in pHAL30, <i>NcoI</i> bis Amber-Stoppcodon	207

Tabelle 8.2-5 DNA-Sequenz pQE_TMV als Beispiel für die Klonierung in pQE_30, 6xHis bis <i>Hind</i> III	208
Tabelle 8.2-6 DNA-Sequenz pRSET A_CP_TMV als Beispiel für die Klonierung in pRSET A, 6xHis bis <i>Hind</i> III.....	208
Tabelle 8.2-7 DNA-Sequenz pHALscFvCMV inklusive pelB-Leader, pelB-Leader bis Amber-Stoppodon, nach der Codon-Optimierung	209
Tabelle 8.2-8 DNA-Sequenz pHALscFv17-3A inklusive pelB-Leader, pelB-Leader bis Amber-Stoppodon, nach der Codon-Optimierung	210
Tabelle 8.2-9 DNA-Sequenz M13K07CbMV_C10 als Beispiel für die Klonierung einer scFv-Sequenz aus pHAL30 in den M13K07 Hintergrund mit zusätzlichem pelB-Leader, pelB-Leader bis Anfang pIII	211
Tabelle 8.3-1 ELISA Rohdaten zu den Abbildungen 3.1-4/3.1-5/3.2-2 und 3.2-4.....	212
Tabelle 8.3-2 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-1 A und B.....	212
Tabelle 8.3-3 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-2	212
Tabelle 8.3-4 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-3 A und B.....	212
Tabelle 8.3-5 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-4	213
Tabelle 8.3-6 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-5	213
Tabelle 8.3-7 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-6	213
Tabelle 8.3-8 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-7	214
Tabelle 8.3-9 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-8	214
Tabelle 8.3-10 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-9	215
Tabelle 8.3-11 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-10	215
Tabelle 8.3-12 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-11	215
Tabelle 8.3-13 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.5.1.....	215
Tabelle 8.3-14 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.5.2.....	216
Tabelle 8.3-15 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.5.3.....	216
Tabelle 8.3-16 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.5.4.....	216
Tabelle 8.3-17 ELISA Rohdaten zu den Abbildungen 3.6-1 – 3.6-3.....	217
Tabelle 8.3-18 ELISA Rohdaten zu den Abbildungen 3.6-4 – 3.6-6.....	219
Tabelle 8.3-19 ELISA Rohdaten zu den Abbildungen 3.6-7 und 3.6-8.....	221
Tabelle 8.3-20 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-9.....	224
Tabelle 8.3-21 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-10.....	224
Tabelle 8.3-22 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-11.....	224
Tabelle 8.3-23 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-12.....	225

Tabelle 8.3-24 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-13.....	225
Tabelle 8.3-25 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-14.....	226
Tabelle 8.3-26 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-15.....	226
Tabelle 8.3-27 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-17.....	226
Tabelle 8.3-28 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-16.....	227

1 Einleitung

1.1 Ziele dieser Arbeit

Trotz der kontinuierlichen Entwicklung neuer und immer ausgefeilterer Methoden zum Nachweis und zur Identifizierung von Viren, sind nur wenige dieser Methoden auch für den Routineeinsatz geeignet. Es zeigt sich, dass die beiden etabliertesten Nachweismethoden, der „*enzyme-linked immunosorbent assay*“ (ELISA) und die „*real-time polymerase chain reaction*“ (qPCR) über verschiedene Charakteristika verfügen, die essentiell für eine erfolgreiche Nutzung sind. Diese Plattformen sind einfach zu bedienen und können von der Industrie in standardisierten Verfahren verwendet werden. Sie zeichnen sich durch eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit aus, sind schnell zu etablieren und robust in ihren Anwendungen (Torrance & Jones 1981, Boonham *et al.* 2014). Da zusätzlich die Gerätschaften und Reagenzien für die Durchführung eines ELISA für die Routinetestung häufig relativ leicht und im Vergleich zu neueren Methoden wie zum Beispiel dem Luminex-Nachweis kostengünstig erworben werden können, hat sich der ELISA als Standardnachweisverfahren von Virusinfektionen in Nutzpflanzen etabliert. Essentiell für einen erfolgreichen ELISA ist jedoch das Vorhandensein von hochwertigem Antiserum, um die Spezifität und Sensitivität der Reaktion für einen erfolgreichen Nachweis gewährleisten zu können. Die Produktion dieser Antikörper ist jedoch weiterhin kostenintensiv und nicht immer vorhersehbar, da neben den benötigten Laboren und Technologien auch gereinigtes Virus oder exprimierte Virushüllproteine, deren Erzeugung sehr langwierig sein kann, existieren müssen (Boonham *et al.* 2014). An diesem Punkt sollen sogenannte „*antibody mimics*“ helfen, die im Bestfall die Aufgabe der Antikörper übernehmen und von Wirtsbakterien dabei kostengünstiger und schneller produziert werden können.

Obwohl die generelle Interaktion von „*antibody mimics*“ mit Pflanzenviren schon gezeigt werden konnte (zum Beispiel: (Ziegler *et al.* 1995, Harper *et al.* 1997, Hust *et al.* 2002, Chua *et al.* 2007, Jahromi *et al.* 2009, Maheshwari *et al.* 2015)), ist der Nachweis nicht immer auch aus infiziertem Pflanzenmaterial erbracht worden. In dieser Arbeit sollen auf Phagen basierte „*antibody mimics*“ gegen das *Calibrachoa mottle virus* (CbMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Plum pox virus* (PPV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco mosaic virus* (TMV) und *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) erstellt werden, die einen direkten Nachweis aus Pflanzen erlauben. Dafür wird die Hypothese überprüft, ob aus verschiedenen Bibliotheken Phagen und deren spezifische Fusionsproteine selektiert werden können, die an bakteriell exprimierte Hüllproteine, an gereinigte Viruspartikel und letztlich auch an virale Proteine aus Presssäften mit den oben genannten Viren binden und einen verlässlichen Nachweis ermöglichen. Außerdem sollen die unterschiedlichen „*antibody mimics*“ danach auf ihre Selektivität und Sensitivität untersucht werden.

1.2 Einleitung zu Pflanzenviren

Die möglicherweise erste unbewusste Beschreibung einer Viruserkrankung an Pflanzen kann bis in das Jahr 752 n. Chr. zurückverfolgt werden. Die Man'yōshū ist die größte Anthologie der japanischen Dichtkunst mit über 4.500 Gedichten, die zwischen den Anfängen des 17. und der Mitte des 18. Jahrhunderts verfasst wurden (Saunders *et al.* 2003). Ein Gedicht, das der japanischen Herrscherin Kōken zugeschrieben wird, beschreibt eine auftretende Herbstfärbung von *Eupatorium* im Sommer. Es wurde von T. Inouye ins Englische übersetzt (Hull 2014).

In this village

It looks as if frosting continuously

For, the plant I saw

In the field of summer

The color of the leaves were yellowing

Dafür verantwortlich zeigen sich das *Eupatorium yellowing vein virus* (EpYVV), ein *Geminivirus*, und die begleitenden Satelliten (Saunders *et al.* 2003). In Westeuropa wurden im 17. Jahrhundert (1600-1660) viele Bilder und Zeichnungen von Tulpen angefertigt, die für Viren typische Krankheitsbilder an den Blüten zeigten. Während dieser Zeit wurden das spezielle Aussehen der Pflanzen und die Geschichten um deren teure Verkäufe als Teil der „Tulipomania“ oder „Tulpenhysterie“ bezeichnet (Dubos 1958). Eine der ersten Beschreibungen von unabsichtlichen Übertragungen eines Virus gelang Lawrence, als er Pfropfungen von einzelnen kranken Jasminen auf gesunde Pflanzen und die anschließende Weitergabe einer Krankheit beschrieb (Lawrence 1714). Im Jahre 1886 befasste sich Adolf Mayer mit einem Zustand von Tabakpflanzen, den er „Mosaikkrankheit“ nannte (Mayer 1886). Die Pflanzen zeigten dabei auffällige Scheckungen und mosaikartige Flecken. Der Beginn der eigentlichen Virologie kann auf das Ende des 19. Jahrhunderts zurückverfolgt werden, als der russische Biologe Dmitry Ivanowski im Jahre 1892 kranke Pflanzen mit den von Mayer beschriebenen Symptomen genauer untersuchte (Ivanowski 1892). Nach mehreren Filtrationen des infizierten Blattmaterials konnte er Bakterien als Ursache für die Krankheit ausschließen, da die Blattextrakte weiterhin infektiös blieben. Er schlug unter anderem ein Toxin als Auslöser der Symptome vor. Der niederländische Mikrobiologe Martinus Beijerinck lernte bei Mayer die

Infektiosität des Presssaftes kennen und untersuchte das Agens systematisch (Beijerinck 1898). Er bezeichnete es 1898 als lebende pathogene Flüssigkeit (*contagium vivum fluidum*), die nicht auf Nährböden wachsen könne, sondern nur im lebenden Gewebe seines Wirts vermehrt werden kann (vergleiche z.B. (Drews *et al.* 2004), (Pennazio 2010), (Scholthof *et al.* 1999)). Beijerinck prägte später auch den Begriff „filtrierbares Virus (Virus = Gift)“. Im Verlauf des ersten Jahrzehnts des 20. Jahrhunderts konnte Baur (1904) zeigen, dass die Infektionen von *Abutilon* nur durch Pflöpfungen, nicht aber durch mechanische Inokulationen übertragen werden konnten (nach (Matthews & Hull 2002)). Zwischen 1900 und 1935 konnten weitere filtrierbare Pflanzenkrankheiten entdeckt werden, dabei wurde viel Wert auf genaue Beschreibungen der einzelnen Symptome, der Wirte und mögliche Arten der Übertragung gelegt. Genauere Nachweise der Größe der eigentlichen Viren oder ihrer Beschaffenheit gelangen auf Grund der fehlenden technologischen Möglichkeiten jedoch nicht (Hull 2014). Holmes konnte 1929 zeigen, dass sich entstehende Lokalläsionen nach einer mechanischen Inokulation bei einigen Wirtspflanzen für einen schnellen quantitativen Nachweis der Viren eigneten (Holmes 1929). Ein weiterer Fortschritt wurde 1931 von Smith erzielt, als er belegte, dass Viren durch die Wahl spezieller Anzeigerpflanzen differenziert werden konnten (Smith 1931). Nur vier Jahre später gelang es Chester, verschiedene Stämme von TMV und PVX mit serologischen Methoden nachzuweisen (Chester 1935, Chester 1936). In den gleichen Jahren reinigte Stanley TMV, ähnlich wie ein Enzym, durch Kristallisation (Stanley 1935, Stanley & Loring 1936). Die Nukleoproteinstruktur des Virus wurde nur ein Jahr später unter anderem von Best nachgewiesen (Best 1937). Fukushi entdeckte 1940, dass Pflanzenviren für mehrere Generationen in Insekten vorliegen konnten und trotzdem infektiös blieben (Fukushi 1940). Mit der Erhöhung der Auflösungen von Mikroskopen und angepassten Färbemethoden wurde die Elektronenmikroskopie immer wichtiger für die Erforschung der Substrukturen der Viren (Hull 2014). Crick und Watson schlugen 1956 vor, dass sich viele identische kleinere Hüllproteine zusammenlagern und die symmetrischen Hüllen der Viren bilden (Crick & Watson 1956). Die von Hull als „molekulares Zeitalter der Virologie“ beschriebene Epoche der Forschung begann um 1960 (Hull 2014), als die 158 Aminosäuren zählende Sequenz des TMV-Hüllproteins bestimmt werden konnte (Anderer *et al.* 1960). Im Lauf der folgenden Jahrzehnte gelang es dabei, Viren immer genauer zu charakterisieren. Heute werden sie als sehr kleine obligate Krankheitserreger angesehen (Büttner und Maiss in Poehling & Verreet 2013), die keinen eigenen Stoffwechsel haben und deshalb nicht den Lebewesen zugeordnet werden (Hallmann *et al.* 2007). Von den derzeit etwa 2600 bekannten Viren werden mehr als 1000 als phytopathogen eingestuft. Von diesen weist etwa die Hälfte eine stäbchen- beziehungsweise

fadenförmige Gestalt mit einer Länge von 80-2000 nm auf. Die andere Hälfte besitzt eine sphärische Struktur mit einem Durchmesser von 17-85 nm. Viele Pflanzenviren haben ein Genom, das aus einem einzigen Typ Nukleinsäure (DNA oder RNA) besteht und von einer Proteinhülle, dem Kapsid, umgeben ist (Büttner und Maiss in Poehling & Verreet 2013). Die Proteine können dabei auch Enzymfunktionen haben und spezifische Wechselwirkungen mit den Wirtszellen eingehen. Bei einfachen Viren entspricht die als Nukleokapsid bezeichnete Kombination der Nukleinsäure und des Kapsids häufig schon dem Virion, dem vollständigen Viruspartikel. Die Bindung des Komplexes ist dabei nicht immer starr, es bestehen zum Beispiel bei kubischen Viren zwischen großen Regionen der Nukleinsäure und dem Hüllprotein keine engen Wechselwirkungen, die Strukturen sind variabel (Drews *et al.* 2004). Außerdem können lokale Wechselwirkungen zwischen den Proteinen, Interaktionen zwischen Nukleinsäuren und Proteinen und verschiedene abiotische Faktoren, wie eine Veränderung des pH-Wertes oder des Wassergehaltes, zu unterschiedlichen Konformationen führen (Witz & Brown 2001). Die Übertragung von Viren erfolgt über Vektoren, vegetative Vermehrung, Pflanzverwundung, Wurzelverwachsung, Samen, Pollen oder mechanisch. Die Wechselwirkung zwischen Vektor und Virus ist dabei teilweise so spezifisch, dass nur wenige Vektoren für den Transfer einzelner Viren geeignet sind. Der Eintritt von Pflanzenviren erfolgt primär über Wunden in den Pflanzenwänden und Membranen (Hallmann *et al.* 2007). Je nach Stärke der Reaktion der Pflanzen auf die Infektion werden anfällige, tolerante und resistente Pflanzen unterschieden. Nach dem Eindringen in die Wirtszelle erfolgt das sogenannte „*Disassembly*“, bei dem die Proteinhülle von der Nukleinsäure entfernt wird (Büttner und Maiss in Poehling & Verreet 2013). Je nach Art der Nukleinsäure erfolgt nun die Transkription oder direkt die Translation der Erbinformationen. Schon während des „*Uncoatings*“ können Ribosomen an die freigelegten Nukleinsäuren der Viren binden und die Synthese spezieller viruskodierter Enzyme beginnen, die essentiell für die Vervielfältigung und Ausbreitung der Viren sind (Büttner und Maiss in Poehling & Verreet 2013). Je nach Virus können diese Enzyme zum Beispiel RNA-abhängige RNA-Polymerasen, Helikasen, Transportproteine, Hüllproteine oder „*silencing suppressoren*“ sein. Abhängig vom Anfälligkeitsgrad der jeweiligen Pflanze können sich Viren innerhalb des Organismus durch den Kurzstreckentransport von Zelle zu Zelle und durch den Langstreckentransport über die Leitgefäße verbreiten und die gesamte Pflanze infizieren (Büttner und Maiss in Poehling & Verreet 2013).

1.3 Eine kurze Vorstellung der in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenviren

In dieser Arbeit wird mit sechs Pflanzenviren aus fünf verschiedenen Genera und Familien gearbeitet. Von diesen sechs Viren befinden sich fünf (CMV, PPV, PVY, TMV, TSWV) auf der Liste der „*Top 10 plant viruses in molecular plant pathology*“, die 2011 erstellt wurde (Scholthof *et al.* 2011) (siehe Tabelle 1.3-1). Neben der wissenschaftlichen Bedeutung einzelner Viren zum Beispiel als Modelvirus sind insbesondere die ökonomischen Verluste als Folge der Infektionen ein wichtiger Indikator für eine Aufführung in dieser Auswahl. Häufiges weltweites Vorkommen und eine große Anzahl wichtiger Kultur- und Zierpflanzen als mögliche Wirte verstärken die Relevanz dieser Viren weiter.

Tabelle 1.3-1 Eine Übersicht zu den Top 10 der Pflanzenviren

Rank	Virus	Autor der Virus Beschreibung
1	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	Karen-Beth G. Scholthof
2	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	Scott Adkins
3	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)	Henryk Czosnek
4	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Peter Palukaitis
5	<i>Potato virus Y</i> (PVY)	Emmanuel Jacquot
6	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (CaMV)	Thomas Hohn and Barbara Hohn
7	<i>African cassava mosaic virus</i> (ACMV)	Keith Saunders
8	<i>Plum pox virus</i> (PPV)	Thierry Candresse
9	<i>Brome mosaic virus</i> (BMV)	Paul Ahlquist
10	<i>Potato virus X</i> (PVX)	Cynthia Hemenway

Zusätzlich wird in dieser Arbeit mit dem CbMV gearbeitet. Innerhalb des Projektverbundes „Wertschöpfungskette Gartenbau“ (WeGa) traten Infektionen mit einem Virus an Petunien auf, welches nach der Identifizierung als *Calibrachoa mottle virus* zusätzlich für das Screening von „antibody mimics“ verwendet wurde.

1.3.1 *Calibrachoa mottle virus* als Vertreter des Genus *Carmovirus*

Die Familie der *Tombusviridae* umfasst 13 Genera (*Alphanecrovirus*, *Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Betanecrovirus*, *Carmovirus*, *Dianthovirus*, *Gallantivirus*, *Macanavirus*, *Machlomovirus*, *Panicovirus*, *Umbravirus*, *Zeavirus*) mit derzeit 71 Spezies, von denen 19 Spezies auf die Gattung *Carmovirus* entfallen und sieben Spezies noch nicht zugeordnet worden sind (*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) 2014). Das *Calibrachoa mottle virus* (CbMV) wurde erstmals im Jahre 2003 beschrieben (Liu *et al.* 2003) und 2010 dem Genus *Carmovirus* zugeordnet (Gulati-Sakhuja & Liu 2010). Die Virionen der Carmoviren sind Ikosaeder (T=3-Symmetrie) mit einem Durchmesser von bis zu 30 nm. Ihr Genom besteht aus einer (+) ssRNA mit einer Größe von 3,8-4,3 kb (Tidona & Darai 2002). Die von Gulati-Sakhuja und Liu (2010) beschriebene vollständige genomische RNA-Sequenz des CbMV weist eine Länge von 3919 Nukleotiden auf. Das Genom enthält fünf entweder angrenzende oder überlappende „*open reading frames*“ (ORFs). Die Genomstruktur ist in Abbildung 1.3-1 dargestellt. Der erste ORF beginnt mit Nukleotid 37, endet bei Nukleotid 777 und kodiert für ein 28 kDa großes Protein (p28), das durch ein *Ambercodon* terminiert wird. Sobald diese Termination unterdrückt wird, führt der ORF 1 mit dem ORF 2 zu einem 87 kDa großen *in-frame* Protein (p87), der RNA-abhängigen RNA-Polymerase. *Downstream* von ORF 2 sind zwei kleine überlappende ORFs (ORF 3 und ORF 4) lokalisiert, wobei ORF 3 eine 37 Nukleotid große Überlappung mit dem ORF 2 aufweist, jedoch in einem anderen Leserahmen liegt. Er kodiert für ein 8 kDa großes Protein mit einer RNA-bindenden Domäne. ORF 4 zeigt eine Überlappung von 86 Nukleotiden mit ORF 3 und kodiert für ein integrales Membranprotein mit einer Größe von 9 kDa. Der Leserahmen ist dabei identisch mit dem der Polymerase. Die 8 kDa und 9 kDa großen Proteine ermöglichen den Kurz- und Langstreckentransport innerhalb der Pflanze. Der dem 3'-Ende am nächsten zugewandte ORF 5 ist verantwortlich für das Hüllprotein mit einer Größe von 37 kDa (Gulati-Sakhuja & Liu 2010). Für einen anderen Vertreter der Carmoviren, dem *Turnip crinkle virus* (TCV) konnte gezeigt werden, dass das CP auch als „*silencing suppressor*“ (King *et al.* 2011) agiert. CbMV konnte von Liu und Sears (2003) aus *Calibrachoa* isoliert werden, bei denen es auf den Blättern zu Marmorierungen und chlorotischen Flecken führte. Es wurde mechanisch auf *Chenopodium amaranticolor*, *C. capitatum*, *C. quinoa*, *Nicotiana benthamiana* und *N. clevelandii* übertragen, es war jedoch nicht möglich eine Infektion durch verschiedene Vektoren wie zum Beispiel der Grünen Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*), der Tabakmottenschildlaus (*Bemisia tabaci*) oder der Gewächshaus-Weiße Fliege (*Trialeurodes vaporariorum*) auszulösen (Liu *et al.* 2003).

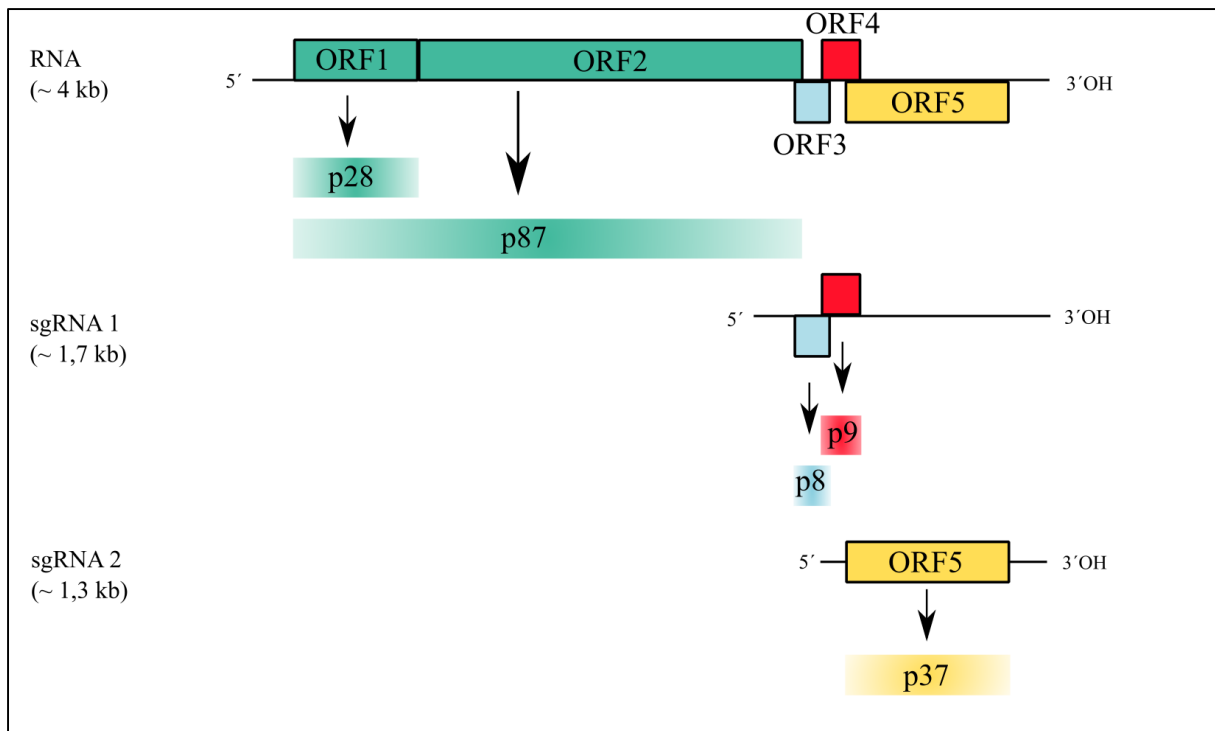


Abbildung 1.3-1 Schematische Genomstruktur des CbMV

verändert nach (Gulati-Sakhuja & Liu 2010, King *et al.* 2011): Die genomische RNA beinhaltet 5 ORFs. Der ORF 1 beinhaltet ein *Amber*-Terminationscodon, durch das Durchlesen des Leserahmens entsteht die 87 kDa große Polymerase. Die ORFs 3 und 4 werden von der sgRNA 1 abgelesen und kodieren für ein 8 kDa großes RNA-bindendes Protein und ein 9 kDa großes integrales Membranprotein. Beide Proteine sind für den Transport essentiell. Der ORF 5 kodiert für das Hüllprotein. Dieses wird von der sgRNA 2 translatiert.

1.3.2 *Cucumber mosaic virus* als Vertreter des Genus *Cucumovirus*

Die Familie der *Bromoviridae* umfasst sechs Genera (*Alfamovirus*, *Anulavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Iilarvirus*, *Oleavirus*) mit derzeit 33 Spezies, von denen vier Spezies auf die Gattung *Cucumovirus* entfallen (ICTV 2014). Die Virionen des Genus *Cucumovirus* bestehen aus ikosaedrischen Partikeln (T=3-Symmetrie) mit einem Durchmesser von 25-30 nm und drei Segmenten einer (+) ssRNA (Drews *et al.* 2004). Jedes RNA-Molekül wird durch einen schützenden Proteinmantel umgeben, insgesamt besteht das Virus somit aus drei sphärischen Partikeln, die jeweils die RNA 1, RNA 2 und RNA 3/RNA 4 beinhalten (Habili & Francki 1974, Lot & Kaper 1976). Die Genomstruktur des Genus ist in Abbildung 1.3-2 gezeigt. Das 5'-Ende der linearen RNAs ist mit einer *Cap*-Struktur versehen und die 3'-Enden weisen tRNA-ähnliche Strukturen auf (Drews *et al.* 2004). Die RNA 1 ist monocistronisch und kodiert das Protein 1a in einem einzigen ORF. Das Protein hat zwei funktionelle Domänen, eine N-terminale Methyltransferasedomäne und eine C-terminale Helikasedomäne (Gorbalenya *et al.* 1988, Hodgman 1988, Habili & Symons 1989, Rozanov *et al.* 1992). Die RNA 2 ist bei den Genera *Cucumovirus* und *Iilarvirus* bicistronisch, zusätzlich zu dem ORF für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (Protein 2a) liegt hier ein zweiter überlappender ORF vor, der für das Protein 2b kodiert. Dieses Protein ist ein *suppressor of posttranscriptional gene silencing* (Brigneti *et al.* 1998, Li *et al.* 1999). Zusätzlich ist es möglich, dass das Protein eine Rolle für den Virustransport innerhalb der Pflanze spielt, da CMV ohne das 2b Gen eine reduzierte Verteilung durch epidermale Zellen aufweist und sich eher durch Mesophyllzellen bewegt (Soards *et al.* 2002). Es ist jedoch unklar, ob diese Effekte mit dem Verlust der antiviralen Defensivfunktionen durch das Protein zusammenhängen oder ob das Protein eine aktive Rolle in der Verteilung einnimmt (Palukaitis & García-Arenal 2003). Die RNA 3 ist bicistronisch und kodiert für das Transportprotein und das Hüllprotein, beide ORFs sind dabei nicht überlappend (Palukaitis & García-Arenal 2003). Das Hüllprotein ist neben der Verpackung auch für den Virentransport innerhalb der Pflanze und zwischen den Wirten notwendig (Boccard & Baulcombe 1993) und ermöglicht die Transmission durch Blattläuse, wie zum Beispiel der grünen Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae* L) (Gildow *et al.* 2008). Das 2b Protein und das Hüllprotein werden von subgenomischen RNAs, der RNA 4 und 4A translatiert (Schwingamer & Symons 1975, Ding *et al.* 1994). Zusätzlich können weitere kleinere RNAs eingekapselt werden, die zum Beispiel aus einem heterogenen Mix aus den 3'-nichtkodierenden Regionen der RNA 2 und 3 gebildet werden (RNA 5) (Blanchard *et al.* 1996) oder aus einem Mix aus pflanzeigener tRNA und CMV RNA mit Fragmentgrößen von 70-80 nt bestehen (RNA 6) (Palukaitis *et al.* 1992).

Der Wirtskreis des weltweit vorkommenden CMV ist weit und umfasst mehr als 100 Pflanzenfamilien, darunter wichtige Gemüsearten wie Gurken, Paprika oder Tomaten. Aber auch Zierpflanzen wie zum Beispiel Begonien oder Petunien können infiziert werden. Die Übertragung erfolgt relativ effektiv auf nichtpersistente Weise durch verschiedene Blattlausarten, parasitische Samenpflanzen oder durch eine Samenübertragung. Zusätzlich sind mechanische Infektionen möglich. Je nach Pflanze zeigen sich unterschiedlichste Symptome, häufig sind Stauchungen der Pflanzen, Mosaiksymptome, Deformationen der Blüten und Blätter und nekrotische Blattflecken charakteristisch für eine Infektion (Büttner und Maiss in Poehling & Verreet 2013).

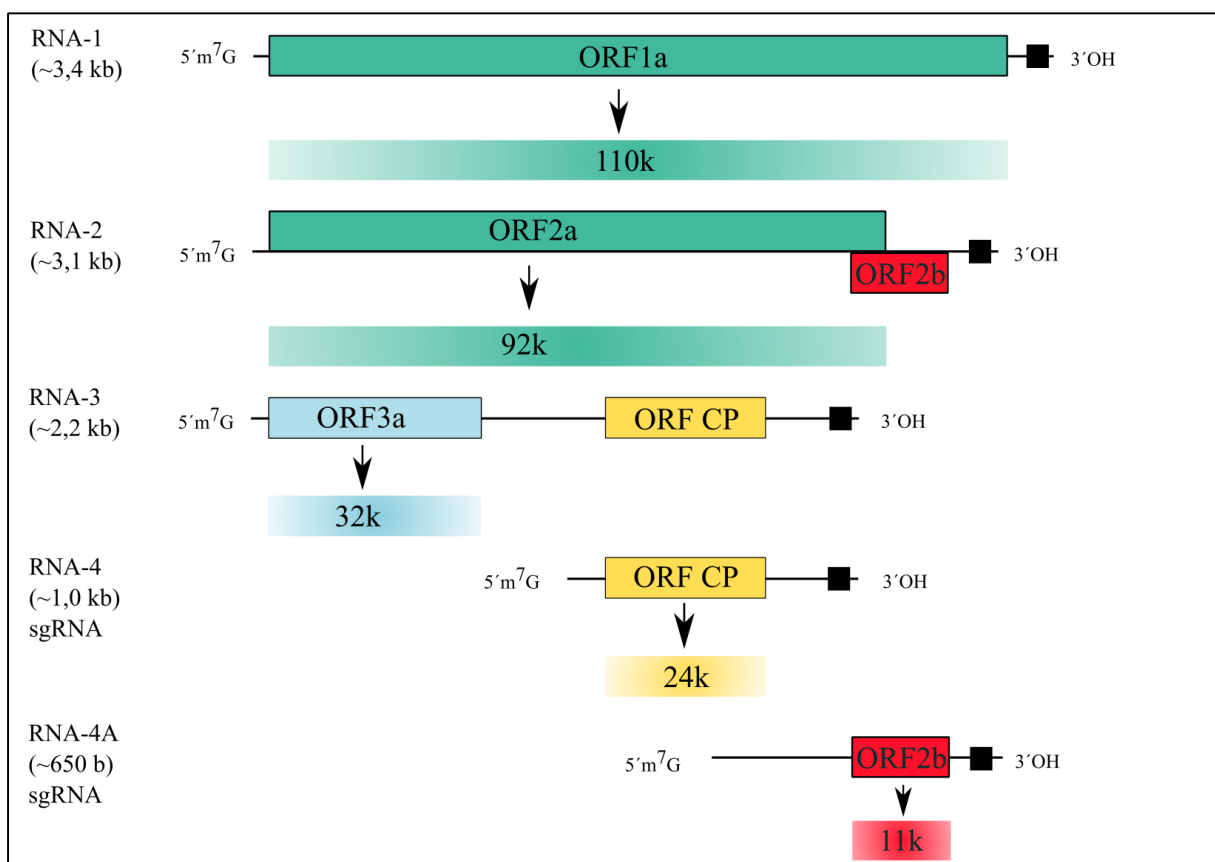


Abbildung 1.3-2 Schematische Genomstruktur von Viren des Genus *Cucumovirus*

verändert nach (Palukaitis & García-Arenal 2003): Das Genom der Cucumoviren besteht aus drei genomischen RNAs (RNAs 1-3) und zwei subgenomischen RNAs (RNAs 4 und 4A). Der ORF1a kodiert für die Methyltransferase beziehungsweise die Helikase. Die RdRp wird durch den ORF2a der RNA 2 kodiert. Das Transportprotein liegt auf der RNA 3 in ORF3a. Die beiden subgenomischen RNAs kodieren für das Hüllprotein und das 2b Protein, das neben dem „*post-transcriptional gene silencing*“ noch bei dem Zell-zu-Zell-Transport involviert ist.

1.3.3 *Plum pox virus* und *Potato virus Y* als Vertreter des Genus *Potyvirus*

Die Familie der *Potyviridae* umfasst acht Genera (*Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*) mit derzeit 190 Spezies, von denen 158 auf die Gattung *Potyvirus* entfallen und zwei Spezies noch nicht zugeordnet worden sind (ICTV 2014). Die Virionen der Potyviren bestehen aus flexiblen Stäbchen mit einer Länge von 680-900 nm bei einem Durchmesser von 11-13 nm und einer (+) ssRNA mit einer Größe von ~ 9,7 kb. Diese weist am 5'-Ende ein kovalent gebundenes VPg (*viral protein genome-linked*) mit einer Größe von 24 kDa und am 3'-Ende eine polyadenylierte Sequenz auf (Drews *et al.* 2004, King *et al.* 2011). Die genomische RNA enthält zwei ORFs, ein Haupt-ORF für ein einzelnes Polyprotein, das durch co- und posttranslationale Prozessierung durch drei viral-kodierte Proteinasen zu den individuellen Virusproteinen führt (ebd.). Außerdem gibt es einen kleineren ORF, der in einem anderen Leseraster liegt. Aus dem Polyprotein entstehen zehn einzelne Proteine. Die schematische Genomstruktur des Genus *Potyvirus* wird in Abbildung 1.3-3 gezeigt. Das P1-Pro als Serinprotease spaltet sich selbständig am Dipeptid Phe-Ser aus dem Polyprotein, die HC-Pro spaltet ihr C-terminales Dipeptid Gly-Gly. Auch die Protease Domäne der NIa Region ist eine Serinprotease, die für die übrigen Spaltungen vorwiegend in dem Motiv Gln-(Ser/Gly) verantwortlich ist (Hull 2014). Mit der autokatalytischen Freisetzung der NIa-Protease startet die proteolytische Spaltung des Polyproteins. Nachfolgend werden in verschiedenen cis- und trans-Reaktionen die weiteren Proteine generiert. Diese Aussagen und die folgenden Beschreibungen der Prozessierung konnten erst durch genaue Untersuchungen am *Tobacco etch virus* und *Plum pox virus* ermöglicht werden (zum Beispiel: (Carrington *et al.* 1989, Dougherty *et al.* 1989, Dougherty *et al.* 1989, Garcia *et al.* 1989a, García *et al.* 1989b, García *et al.* 1989c)). Überschüssige Proteine, die bei der Genexpression entstehen, können zu Einschlusskörpern aggregieren. Davon stellen die zylindrischen Einschlusskörper ein typisches Familienmerkmal dar (Edwardson *et al.* 1968). Die HC-Pro ist neben der Selbstspaltung aus dem Polyprotein für die Unterdrückung des *gene silencing* der Pflanzen und die Vektor-Übertragbarkeit notwendig (Hull 2014). Es wurde dabei vorgeschlagen, dass die HC-Pro als Bindeglied zwischen Vektor und Virus fungiert. Durch die Interaktion von Aminosäuremotiven der HC-Pro (PTK-Motiv und KITC-Motiv) mit Motiven des Hüllproteins (DAG-Motiv) und eine Bindung an Rezeptoren im vorderen Teil des Stylets wird es möglich, dass die Vektoren Viren übertragen können ((Racchah *et al.* 2001) nach (Drews *et al.* 2004)).

Das P3-Protein ist an der Virusreplikation und Symptomentwicklung beteiligt (King *et al.* 2011). Außerdem enthält das P3-Cistron den oben erwähnten PIPO-Frame (*pretty interesting potyviridae* ORF) mit einem +2 *Frameshift* (Chung *et al.* 2008). Dieser Frame kodiert für ein ~ 25 kDa großes Protein, von dem Untersuchungen mit *Knock-Out*-Mutanten zeigen, dass das PIPO an der Infektiosität und Symptomausprägung beteiligt ist (Chung *et al.* 2008). Das Fusionsprotein P3N-PIPO reguliert dabei die CI-(*Cylindrical Inclusion protein*) Lokalisierung an den Plasmodesmata und ist somit für die interzelluläre Ausbreitung mit verantwortlich (Wei *et al.* 2010). Die Proteine 6K1 und 6K2 sind 6 kDa groß, während die Funktion von 6K1 noch unbekannt ist, verankert das 6K2 als Transmembranprotein wahrscheinlich den Replikationskomplex am Endoplasmatischen Retikulum (Hull 2014). Bestätigt werden konnte zum Beispiel, dass das 6K2 die Bildung von Vesikeln des Endoplasmatischen Retikulums für die Replikation des *Tobacco etch virus* (TEV) induziert (Restrepo-Hartwig & Carrington 1994, Schaad *et al.* 1997). Beim *Turnip mosaic virus* (TuMV) konnte außerdem gezeigt werden, dass sich das 6K2 mit Vesikeln interzellulär in benachbarte Zellen bewegen kann und somit für den symplastischen Transport verantwortlich ist (Grangeon *et al.* 2013). Das CI zeigt eine ATPase- und Helikase-Aktivität und ist für die Replikation des Virus von Bedeutung. Dieses Protein bildet die für Potyviren typischen zylindrischen Einschlusskörper während der Infektion (King *et al.* 2011). Schon früh konnte gezeigt werden, dass sich diese in der Nähe des Plasmalemmas konzentrieren und sich das CI zusammen mit der viralen RNA und den Hüllproteinen nahe den Plasmodesmata assoziieren (Calder & Ingerfeld 1990, Langenberg 1993). Es wird auch deutlich, dass die Lokalisierung des CI an den Plasmodesmata durch das P3N-PIPO gesteuert werden kann (Chung *et al.* 2008). Untersuchungen weisen darauf hin, dass das CI im Zell-zu-Zell-Transport involviert ist (Sorel *et al.* 2014). Das CI kann außerdem im Phloem und den Geleitzellen nachgewiesen werden. Es wird daher angenommen, dass es eine potentielle Rolle beim Langstreckentransport einnimmt (YanHong *et al.* 2009, Otulak & Garbaczewska 2012). NIa ist das kleine „*Nuclear Inclusion*“ Protein, das die Hauptproteinasen der Potyviren enthält. Es hat zwei unterschiedliche Domänstrukturen, das N-terminale VPg und die C-terminale Protease (Dougherty & Carrington 1988). Nach der autokatalytischen Freisetzung katalysiert diese Protease die Spaltung von P3, 6K1, CI, 6K2, NIb und dem Hüllprotein aus dem Polyprotein. Außerdem trennt sich die VPg Domäne aus dem NIa Protein. Diese Spaltung ist jedoch weniger effizient (Hull 2014). Das VPg ist kovalent mit dem 5'-Ende der viralen ssRNA verbunden und hat verschiedene Aufgaben während des viralen Infektionszyklus für die Replikation und Translation. Außerdem ist es bei der Unterdrückung des *gene silencing* der Pflanzen beteiligt (King *et al.* 2011). Beschrieben wurde zusätzlich die Kontrollfunktion bei

der Anreicherung und Phloembeladung der Potyviren, zum Beispiel in Kartoffeln (Rajamäki & Valkonen 2002). Das NIb ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase und somit für die Vermehrung der Viren essentiell. Das Hüllprotein (CP) dient der Partikelbildung und spielt eine zusätzliche Rolle beim Virustransport und der Genomamplifikation (King *et al.* 2011). Zusammen mit der HC-Pro ermöglicht es darüber hinaus über die oben genannte Interaktion der spezifischen Aminosäuremotive mit den Rezeptoren im vorderen Teil des Stylets die Vektorübertragbarkeit ((Racah *et al.* 2001) nach (Drews *et al.* 2004)).

Das PPV befällt hauptsächlich *Prunus*-Arten, es kann aber auch viele andere Pflanzen wie zum Beispiel *Nicotiana spec.*, *Physalis spec.* und *Solanum spec.* infizieren. Es wird durch mechanische Inokulation, Pfropfung oder vektoriell, wie zum Beispiel durch verschiedene Blattläuse, übertragen. Die Symptome sind dabei abhängig von der Pflanzenart und den biotischen und abiotischen Faktoren. Es sind häufig Scheckungen an den Blättern und Fruchtdeformationen festzustellen. Aber auch chlorotische Ringflecken oder linienbeziehungsweise pockenförmige Einsenkungen sind möglich (Büttner und Maiss in Poehling & Verreet 2013). Das PPV ist ein Quarantäneerreger (EPPO A2 Liste).

Das PVY infiziert in erster Linie Nachtschattengewächse aber auch Amaranthaceen, Asteraceen, Chenopodiaceen und Leguminosen. Es wird hauptsächlich durch infizierte Presssäfte, also während der Pfropfung, durch mechanische Inokulation oder durch Vektoren übertragen. Die Symptome sind dabei unterschiedlich und abhängig vom Virusstamm und den Pflanzen (Büttner und Maiss in Poehling & Verreet 2013). Der in dieser Arbeit verwendete Stamm zeigt an *Nicotiana benthamiana* Mosaiksymptome und starke Kräuselungen der Blätter. Mit zunehmender Infektionszeit drehen sich die Blattspitzen ein.

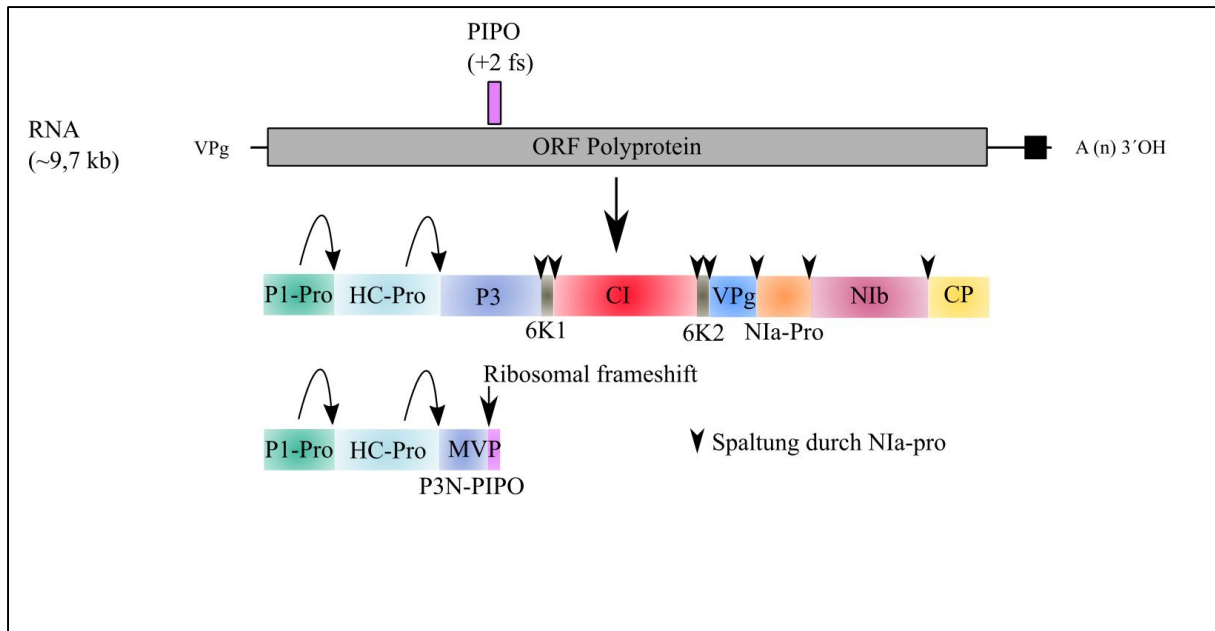


Abbildung 1.3-3 Schematische Genomstruktur von Viren des Genus *Potyvirus*

verändert nach (Hull 2014) und (<http://viralzone.expasy.org>): Das ssRNA-Genom ist durch einen einzelnen ORF gekennzeichnet, der in ein Polyprotein translatiert wird. Am 5'-Ende wird ein VPg kovalent gebunden und am 3'-Ende liegt ein Poly-A-Schwanz vor. Die P1-Pro schneidet an der Tyr/Phe-Ser Site zwischen der P1-Pro und der HC-Pro, welches sich selbst wiederum an der Gly-Gly Site aus dem „downstream“ folgenden Teil des Polyproteins schneidet. Die Protease Komponente des NIa ist für die weitere Freisetzung der anderen an den Gln/Glu-(Ser/Gly/Ala) Sites geschnittenen Proteine verantwortlich. Der kleinere ORF PIPO wird durch einen +2 Frameshift des Polyprotein ORFs translatiert und wird als Fusion mit dem N-terminalen Teil des P3 exprimiert.

1.3.4 *Tobacco mosaic virus* als Vertreter des Genus *Tobamovirus*

Die Familie der *Virgaviridae* umfasst sechs Genera (*Furovirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*) mit derzeit 54 Spezies, von denen 35 Spezies auf die Gattung *Tobamovirus* entfallen (ICTV 2014). Die Virionen der Tobamoviren sind starr und stäbchenförmig mit einer Länge von 300-310 nm und einem Durchmesser von 18 nm. Sie setzen sich aus einem Genom mit einer linearen (+) ssRNA (6,3-6,6 kb) und einem Kapsid aus ca. 2130 helikal angeordneten identischen Hüllproteinen zusammen (Drews *et al.* 2004, King *et al.* 2011). Die Genomstruktur wird in Abbildung 1.3-4 gezeigt. Die virale RNA startet am 5'-Ende mit einem m⁷-Gppp-Cap und endet am 3'-Ende in einem untranslatierten Bereich, der sich zu einer tRNA-ähnlichen Struktur falten kann (Drews *et al.* 2004). Der erste und zweite ORF werden von der viralen RNA translatiert. Der erste ORF kodiert dabei für ein 126 kDa Protein, das im Verhältnis von 10:1 durch ein *leaky stop* zu einem Fusionsprotein mit dem ORF2 verlängert wird und so zu einem 183 kDa Protein führt. Dabei enthält das Protein aus ORF1 die Methyltransferase- und Helikasedomäne, während dem Fusionsprotein die Polymerasedomäne hinzugefügt wird (Drews *et al.* 2004). Die Proteine von ORF3 und ORF4 werden von individuellen subgenomischen RNAs exprimiert. Bei den *Tobamoviren* ist die Position des dritten ORFs auf der viralen RNA relativ variabel, je nach Spezies kann er die ihn umgebenden ORFs überlappen, sich nur mit einem ORF überschneiden oder komplett losgelöst von ihnen vorliegen (King *et al.* 2011). Beim TMV überlappen die fünf terminalen Codons des zweiten ORFs den dritten ORF, der für ein 30 kDa Transportprotein kodiert. Der ORF4 des 17,6 kDa großen Hüllproteins beginnt zwei Nukleotide nach dem Stoppcodon des dritten ORFs (Hull 2014). Beide subgenomischen RNAs haben am 5'-Ende ein Cap und enden am 3'-Ende mit einer tRNA-ähnlichen Struktur (King *et al.* 2011). Zusätzlich konnte eine dritte subgenomische RNA (I₁) isoliert werden, die ungefähr einem Drittel des Genoms entspricht und für ein 54 kDa Protein kodiert. Es gibt bis jetzt jedoch noch keinen Beweis, dass es an der viralen Expression beteiligt ist (Hull 2014).

Tobamoviren sind weltweit bekannt und verbreitet. Sie befallen hauptsächlich Leguminosen, Nachtschattengewächse und Kreuzblütler (Lartey *et al.* 1996). Die Viren werden mechanisch über Pflanzenkontakte und Wunden, aber auch durch infiziertes Saatgut übertragen (Drews *et al.* 2004). Je nach Pflanzenart können Symptome unterschiedliche Ausprägungsgrade an Chlorosen, Kräuselungen und Verkrümmungen oder allgemein gehemmter Wuchs der Blätter, Blüten und kompletten Pflanze sein. Außerdem sind häufig nekrotische Läsionen und die namensgebenden Mosaiksymptome zu erkennen (Drews *et al.* 2004).

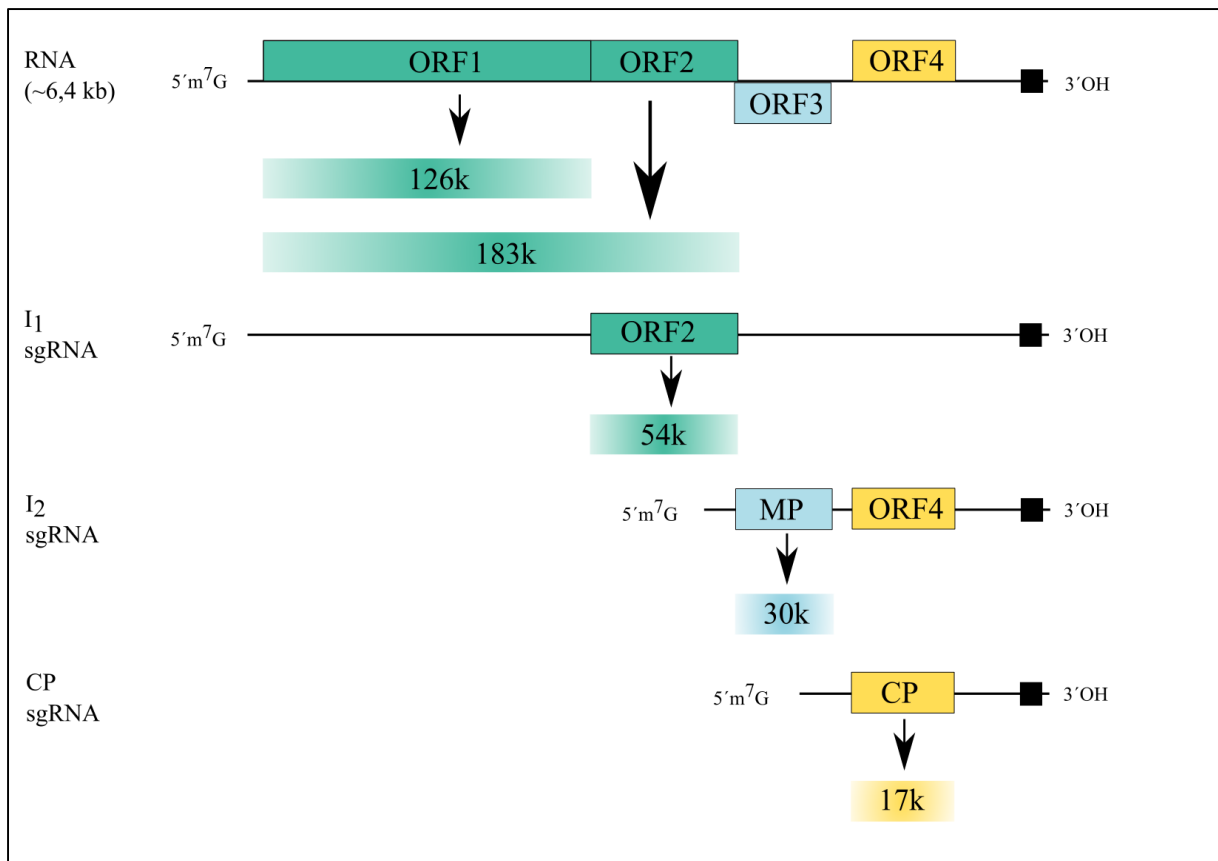


Abbildung 1.3-4 Schematische Genomstruktur von Viren des Genus *Tobamovirus*

verändert nach (Tidona & Darai 2002, Hull 2014): Das *Tobamovirus* Genom beinhaltet vier ORFs. ORF1 enthält die Methyltransferase- und Helikasemotive. Der ORF2 enthält das RdRp-Motiv. Das Produkt der beiden ORFs ist die virale Polymerase. ORF3 exprimiert das „30k“ Transportprotein und ist ein „*suppressor of silencing*“. Das Hüllprotein wird durch den ORF4 kodiert. Die beiden letzteren ORFs werden jeweils von sgRNAs exprimiert. Die I₁ sgRNA mit der Expression des ORF2 konnte nur *in vitro* gezeigt werden.

1.3.5 *Tomato spotted wilt virus* als Vertreter des Genus *Tospovirus*

Die Familie der *Bunyaviridae* umfasst fünf Genera (*Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Tospovirus*) mit derzeit 90 Spezies, von denen 11 Spezies auf die Gattung *Tospovirus* entfallen (ICTV 2014). Die sphärischen Virionen der Tospoviren haben einen Durchmesser von 80-120 nm und sind von einer Lipidhülle umgeben. In dieser sind zwei Glykoproteinfortsätze (G1/G2) inseriert. Die Hülle umschließt das dreiteilige aus dem Genom und N-Protein bestehende Ribonukleoprotein mit insgesamt 16,6 kb ssRNA (Drews *et al.* 2004). Die terminalen Nukleotide jedes Genomsegments weisen komplementäre Sequenzen auf und führen somit zu der Bildung von nicht-kovalent verknüpften, jedoch zirkulären Genomstrukturen (King *et al.* 2011). Die Komponenten der RNA werden in eine L- (*large*), M- (*medium*) und S- (*small*) Komponente unterteilt, die Genomstruktur ist in Abbildung 1.3-5 gezeigt. Dabei besteht die L-Komponente aus einer (-) ssRNA mit einer Länge von ~ 8,9 kb, die für eine 331 kDa große RdRp kodiert. Diese ist außerdem im Virion enthalten und sowohl für die Transkription und Replikation verantwortlich. Die beiden anderen Komponenten bestehen aus einer *ambisense* (+/-) ssRNA und kodieren jeweils für zwei Proteine (Drews *et al.* 2004). Der 3'ORF des M-Segments exprimiert die Glykoproteine, die später als Fortsätze in die Lipidhülle inseriert werden und der 5'ORF kodiert für das P34, das Transportprotein. Die S-Komponente des Genoms exprimiert auf dem 3'ORF das P29 (Nukleokapsidprotein) und auf dem 5'ORF ein Protein, das für die Unterdrückung des pflanzeigenen RNA „*silencing*“ verantwortlich ist (King *et al.* 2011).

Das weltweit vorkommende TSWV hat mit mehr als 900 Arten aus mehr als 90 Familien einen großen Wirtskreis mit bedeutenden Kulturpflanzen wie zum Beispiel Gurke, Salat, Kartoffel, Tomate und Tabak, aber auch Zierpflanzen wie Dahlien, Pelargonien oder *Cyclamen* können infiziert werden. Es zeigen sich vielfältige Symptome, an Tomatenpflanzen können zum Beispiel neben einem gestauchten Wuchs der Pflanze an den Blättern auch Bronzefärbungen, Kräuselungen und nekrotische Flecken und Streifen auftreten (Büttner und Maiss in Poehling & Verreet 2013). Das TSWV ist ein Quarantänerreger (EPPO A2 Liste).

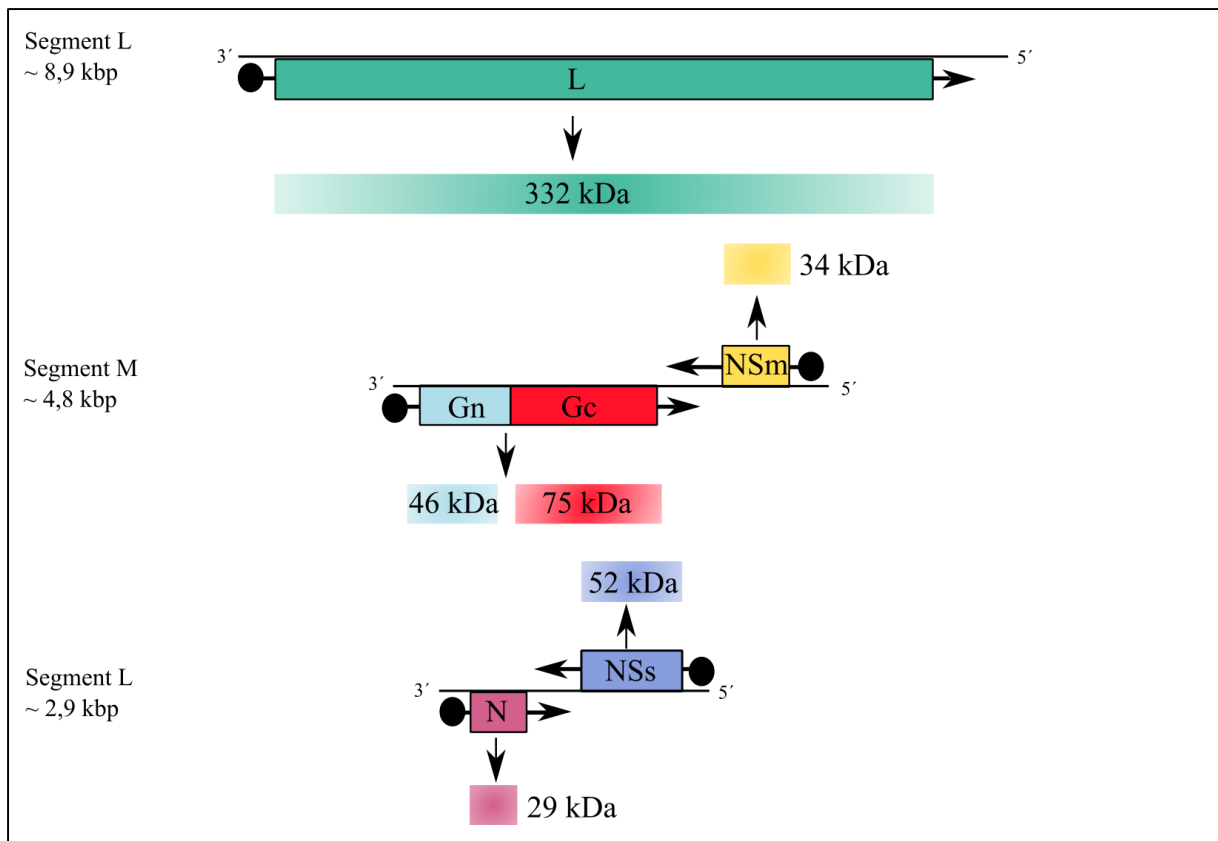


Abbildung 1.3-5 Schematische Genomstruktur von Viren des Genus *Tospovirus*

verändert nach (King *et al.* 2011, Hull 2014): Das Genom der Tospoviren enthält drei ssRNA Segmente. Die L RNA ist eine (-) ssRNA und kodiert für die virale RdRp. Die benötigte mRNA wird durch Virion assoziierte Polymerasen transkribiert. Die beiden anderen Segmente bestehen aus je zwei ORFs, die durch die „ambisense“ Strategie exprimiert werden. Vom M Segment exprimiert der 3'ORF die Fortsätze bildenden Glykoproteine und der 5'ORF das Transportprotein (P34). Auf dem S Segment liegen der 3'ORF für das Nukleokapsidprotein (P29) und der 5'ORF für den „*suppressor of silencing*“.

1.4 Bakteriophagen als „antibody mimics“

Es gibt eine konstante Nachfrage für Moleküle, die sich durch ihre Bindungseigenschaften mit einem spezifischen Zielmolekül ohne störende Kreuzreaktionen auszeichnen und zum Beispiel neben der Diagnose und der Behandlung von Krankheiten auch für das Studium von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt werden können. 1993 wurde erstmals eine Methode vorgestellt, die es erlaubte, selektive Erkennungsstellen in synthetisch hergestellten Polymeren zu erzeugen. Die Polymere konnten über diese Erkennungsstellen die Reaktionen von Antikörpern imitieren (Vlatakis *et al.* 1993). Heute gibt es verschiedene Möglichkeiten solche „antibody mimics“ zu erstellen, eine davon beinhaltet ein *Screening* innerhalb eines *phage display*. In dieser biotechnologischen Methode werden aus großen, rekombinanten Bibliotheken zufällige, an Phagenhüllproteine fusionierte Fragmente (Peptide, Proteinteile oder Proteine) auf der Oberfläche von Phagen präsentiert, um unter diesen geeignete Bindungspartner für gewünschte Zielmoleküle zu isolieren und später zu charakterisieren. Die positiv reagierenden Phagen können im Bestfall anstelle von Antikörpern in einem ELISA eingesetzt werden (siehe Abbildung 1.4-1). Die Geschichte der Entdeckung und die Biologie der Phagen werden ebenso wie die Hintergründe zu dem Screeningverfahren in den nächsten Kapiteln erklärt.

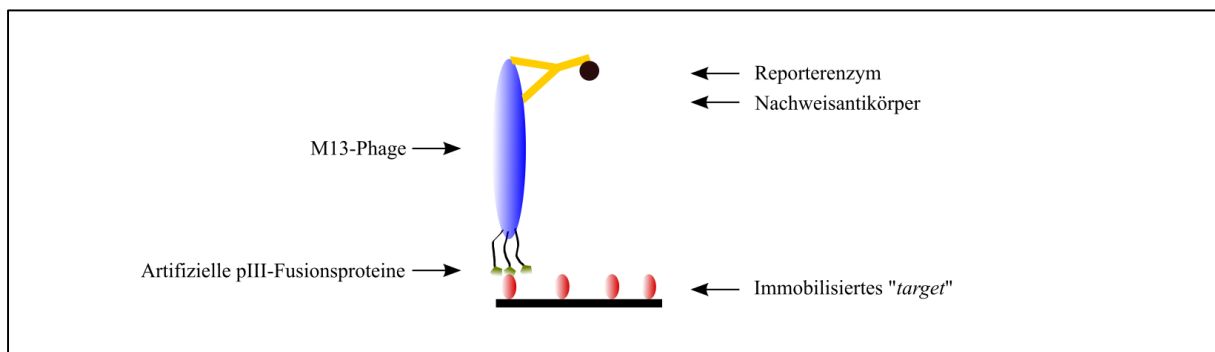


Abbildung 1.4-1 Nachweis eines Zielmoleküls mit einem „antibody mimic“

In dieser Abbildung ist ein möglicher Phagen ELISA gezeigt. Der Phage reagiert als „antibody mimic“ mit dem Zielmolekül und wird selbst mit einem Antikörper (gelb markiert) nachgewiesen. Denkbar wäre es hier auch, dass das Reporterenzym an Proteine des Phagen fusioniert wird und damit vollständig auf den Antikörper zur Detektion des Phagen verzichtet werden kann.

1.4.1 Eine kurze zeitliche Einordnung der Entdeckung und Geschichte von Bakteriophagen

Bakteriophagen wurden erstmals 1896 von Ernest Hanbury Hankin beschrieben, jedoch nicht weiterverfolgt. Er erwähnte „etwas“ im Wasser von Flüssen in Indien, das unerwartete antibakterielle Eigenschaften gegenüber Choleraerregern aufwies und durch Filtration nicht zu entfernen war (Hankin 1896). Felix d'Herelle entdeckte das in Frage kommende Agens im Jahr 1917 in Frankreich, als er Kulturen von Dysenterie auslösenden Bakterien mit bakterienfreien Filtraten aus Abwasser mischte und dadurch die Kulturen im Folgenden abtötete (d'Herelle 1917). Schon ein paar Jahre zuvor machte Frederick W. Twort (1915) die Entdeckung von sogenannten „*glassy transformations*“ in seinen Bakterienkulturen, die übertragen werden konnten und die Zellen degenerieren ließen. Erst mit der Arbeit von d'Herelle konnte dieser Umstand Phagen zugerechnet werden (Kutter & Sulakvelidze 2004). Da Bakteriophagen offensichtlich direkt gegen Bakterien wirkten und diese abtöteten, versuchte d'Herelle einen therapeutischen Ansatz zu wählen und testete sie im Feldversuch gegen *Avian typhosis* (*Salmonella gallinarum*) Infektionen von Hühnern und im Labor gegen die *Shigella dysenteriae* Infektionen von Kaninchen (d'Hérelle & Smith 1926). Bevor Phagen beim Menschen eingesetzt wurden, unterzog sich d'Herelle einem für damalige Zeiten nicht unüblichen Selbstversuch (Summers 2001). *“Before undertaking experiments on man I had to assure myself that the administration of suspensions of the Shiga-bacteriophage caused no reaction. First, I ingested increasing quantities of such suspensions, aged from six days to a month, from one to thirty cubic centimeters, without detecting the slightest malaise. Three persons in my family next ingested variable quantities several times without showing the least disturbance. I then injected myself subcutaneously with one cubic centimeter of a forty-day old suspension. There was neither a local nor a general reaction”* (d'Hérelle & Smith 1926). In weiteren Tests verabreichte er außerdem seiner Familie und seinen Mitarbeitern Phagensuspensionen. Erst nachdem sich keine für ihn nachweisbaren negativen Ergebnisse zeigten, war er bereit, die Suspensionen an Patienten zu erproben (d'Hérelle & Smith 1926). Am bekanntesten wurde d'Herelles Arbeit durch seine Behandlung der Beulenpest von vier Patienten mit seinen Phagensuspensionen. Alle Patienten erholten sich von der Krankheit und die Ergebnisse wurden in der bekannten „*La Presse médicale*“ (d'Herelle *et al.* 1930) publiziert. Im Jahre 1923 wurde das Eliava-Institut für Phagenforschung in Tiflis eröffnet, um die biologischen Eigenschaften von Bakteriophagen genauer untersuchen zu können. Obwohl die Behandlung mit Phagen in dieser Epoche durchaus weitere positive Resultate brachte, zeigte eine Evaluierung der Phagentherapie in den 1930er Jahren auch negative Einflüsse. Zusätzlich war

man besorgt, da die Biologie der Phagen nur wenig verstanden wurde (Summers 2001). Genauere Untersuchungen wurden durch die Entdeckung von wirksamen Antibiotika und dem Ausbruch des Zweiten Weltkrieges verhindert. Nach dem Ende des Krieges waren eher die allgemeinen biologischen Aspekte der Viren von Interesse und nicht die Untersuchung ihres pharmakologischen Potenzials (Summers 2001). Der in dieser Arbeit verwendete Bakteriophage M13 wurde erstmals 1963 von Peter Hans Hofschneider beschrieben (Hofschneider 1963).

Faszinierend ist außerdem, dass verschiedene Arbeiten sich mit der weltweiten Anzahl an Phagen beschäftigt haben und diese auf 1×10^{31} Partikel schätzen (Wommack & Colwell 2000, Ashelford *et al.* 2003, Suttle 2005, Hatfull 2008), somit würden Viren von Prokaryoten einen Großteil der biologischen Formen stellen.

1.4.2 Biologie filamentöser Ff-Bakteriophagen

Im Gegensatz zu vielen archetypischen Bakteriophagen mit ihren bekannten Kopf- und Schwanz-Segmenten, deren Infektionszyklen grundsätzlich mit der Lyse der Wirtszellen enden, gibt es Bakteriophagen, die sich von den oben genannten stark in ihrer Morphologie und Biologie unterscheiden (Rakonjac *et al.* 2011). Eine dieser Gruppen sind die *Inoviren*, ein Genus, das zu der Familie der *Inoviridae* zählt und dem 36 Spezies zugeordnet werden (ICTV 2014). Diese Phagen mit einer länglichen und dünnen filamentösen Struktur beinhalten ein zirkuläres ssDNA Genom und werden den Einzelstrang-DNA-Phagen der Gruppe II zugeordnet, bei denen die Replikation über ein doppelsträngiges DNA-Intermediat charakteristisch ist (Klaus *et al.* 1992). Filamentöse Phagen haben einen großen Wirtskreis unter Gram-negativen Bakterien und infizieren unter anderem Genera von *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Thermus* und *Neisseria* (Russel & Model 2006). Interessant ist ihre Eigenschaft der Reproduktion ohne den Wirt zu töten. Phagen können dabei sogar positive und regulatorische Aufgaben einnehmen, wie zum Beispiel der filamentöse Phage Pf4, der eine essentielle Rolle in der Bildung des Biofilms von *Pseudomonas aeruginosa* spielt (Rice *et al.* 2009). Unter den *E.coli* befallenden filamentösen Phagen ist die Gruppe der sogenannten Ff-Phagen (f1, fd und M13) (Loeb 1960, Hoffmann-Berling & Marvin 1963, Hofschneider 1963) am besten untersucht. Da die Genome dieser drei Bakteriophagen sequenziert wurden und zu 98 % homolog sind (Beck *et al.* 1978, van Wezenbeek *et al.* 1980, Beck & Zink 1981, Hill & Petersen 1982), wird im Folgenden der Begriff Ff-Phage stellvertretend für die Vertreter M13, fd und f1 verwendet. Die zirkuläre ssDNA besteht aus 6407 Nukleotiden (6408 bei fd), die insgesamt für elf Proteine aus neun ORFs kodieren (Day & Berkowitz 1977, Beck *et al.* 1978, van Wezenbeek *et al.* 1980, Beck & Zink 1981, Rasched & Oberer 1986, Guy-Caffey *et al.* 1992, Rapoza & Webster 1995). Von den elf phagenkodierten Proteinen bilden fünf (pIII, pVI, pVII, pVIII und pIX) die Phagenhülle, drei sind für die DNA-Replikation notwendig (pII, pV und pX) und die restlichen Proteine ermöglichen die Assemblierung des Virions (pI, pIV und pXI) (Rasched & Oberer 1986, Rapoza & Webster 1995). Eine größere und eine kleinere nicht kodierende Region mit den Signalen für die Initiation der DNA-Synthese, der Termination der RNA-Synthese und dem Verpackungssignal komplettieren das Genom des Phagen (Schaller *et al.* 1969, Webster *et al.* 1981, Dotto & Zinder 1983). Der Replikationszyklus der Phagen wird in Abbildung 1.4-2 gezeigt. Die ssDNA der Virionen wird durch die filamentöse Hülle, die durch helikal angeordnete Kopien des Hüllproteins pVIII geformt wird, geschützt. Die Enden des Virions werden durch die Proteinkombinationen aus pVII/pIX und pIII/pVI gebildet. Bevor sich das Haupthüllprotein

pVIII der Ff-Phagen mit der ssDNA zu dem Virion zusammensetzen kann, ist es ein integrales inneres Membranprotein. Es wird als ein vorläufiges Protein synthetisiert, welches erst durch die bakterieneigene Membranproteininsertase *yidC* in die innere Membran inseriert (Samuelson *et al.* 2000, Stiegler *et al.* 2011) und danach durch eine Signalpeptidase (Kuhn & Wickner 1985) prozessiert wird. Eine C-terminale hydrophobische transmembrane Helix verankert das pVIII in der inneren Membran (Russel & Model 1982, Papavoine *et al.* 1998). Während dabei der N-terminale Bereich des Proteins in das Periplasma übergeht, verbleibt das C-terminale Ende im Cytoplasma (Wickner 1975, Vos *et al.* 2009). Bis auf die letzten 4-5 negativ geladenen N-terminalen Aminosäuren ist das pVIII innerhalb des Virions eine leicht gekrümmte α -Helix, deren erste 20 Aminosäuren eine amphipathische Struktur bilden. Es folgt eine hydrophobe Sequenz bis Position 39 und den restlichen 10 positiv geladenen Aminosäuren, die mit der verpackten DNA interagieren (Marvin *et al.* 2006). Durch hydrophobe Interaktionen untereinander werden die pVIII Untereinheiten zusammengehalten und können das Virion bilden. Nach der Prozessierung lagern sich die transmembranen Hüllproteine zu Oligomeren zusammen und binden später die virale DNA (Haigh & Webster 1998, Nagler *et al.* 2007). Da die Länge des Virions von der zu verpackenden DNA abhängig ist (Marvin 1990), können neben den typischen Wildtyp-Phagen mit einer Länge von ungefähr 900 nm auch andere Größen des Virions vorliegen. Es zeigt sich zusätzlich, dass die relative Effektivität der Initiation beziehungsweise Termination des Virionenzusammenbaus abhängig von den anderen Hüllproteinen ist und durch Mutationen in diesen Proteinen verändert werden kann. Dadurch können teilweise Virionen generiert werden, die 20-fach größer sind als der Wildtyp (Lopez & Webster 1983, Rakonjac & Model 1998).

Im Gegensatz zu den ungefähr 2700 Haupthüllproteinen besteht das Viron neben der ssDNA zusätzlich nur aus jeweils fünf „*minor coat*“ Proteinen (pIII, pVI, pVII, pIX). Die Proteine pVII und pIX werden während der Initiation des Virionenzusammenbaus als erstes in das spätere Virion inkorporiert und bilden eine Art „Spitze“, die die Wirtszelle über den Sekretionskanal (ein pIV-Oligomer) zuerst verlässt (Grant *et al.* 1980, Endemann & Model 1995). Diese „Spitze“ wird dann im Folgenden durch pXIII Proteine erweitert. Die beiden kleinen hydrophoben Proteine (pVII mit 32 und pIX mit 33 Aminosäuren) sind bis dahin innere Membranproteine ohne eigene Signalsequenz, pIX integriert sich dabei möglicherweise spontan in die innere Membran (Houbiers *et al.* 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Teile der Proteine in der Nähe des C-Terminus mit dem Verpackungssignal der Phagen interagieren (Russel & Model 1989). Die beiden Proteine pIII and pVI sind innerhalb der Wirtszelle integrale Membranproteine (Boeke *et al.* 1982, Endemann & Model 1995). Sie formen die

abschließende Kappenstruktur und terminieren die Zusammensetzung des Virions. Gleichzeitig sind sie verantwortlich für die Freisetzung des Bakteriophagens aus der Wirtszelle (Rakonjac & Model 1998, Rakonjac *et al.* 1999). Das pIII wird durch die N-terminale Signalsequenz in die innere Membran transportiert und verankert sich dort durch seine C-terminale hydrophobe transmembrane α -Helix (Boeke *et al.* 1982). Bedingt durch die Position des Membranankers befinden sich nur fünf C-terminale Aminosäuren innerhalb des Zytoplasmas, der größte Teil des Proteins liegt im Periplasma (Davis *et al.* 1985, Davis & Model 1985). Das pIII besteht aus drei Segmenten (N1, N2 und C), die jeweils über zwei Glycin-reiche *Linker* flexibel miteinander verbunden sind. Neben strukturgebenden Eigenschaften ermöglicht das im Phagen nach außen hin frei zugängliche pIII zusätzlich die Infektion von Wirtszellen über die Adsorption am F-Pilus der Wirtszelle. Durch das Segment N2 des pIII wird die Adsorption des Phagens am F-Pilus initiiert. Im weiteren Verlauf der Infektion bindet das N1 an den Korezeptor TolA in der Bakterienmembran (Click & Webster 1997, Rakonjac *et al.* 1999). Das Segment C ermöglicht die Verankerung des Proteins in den späteren Phagenpartikel. Zusätzlich ist es denkbar, dass dieses Segment durch Konformationsänderungen eine aktive Rolle in der Infektionsphase einnimmt (Bennett & Rakonjac 2006). Grundsätzlich sind die genauen Abläufe, die schließlich dazu führen, dass sich das Haupthüllprotein in die innere Membran integriert und die ssDNA in das Zytoplasma freigesetzt wird, noch nicht bekannt. Nach dem Eintritt in das Zytoplasma fungiert der (+) ssDNA Strang als Vorlage für die Synthese des (-) Strangs (Rakonjac *et al.* 2011). Eine wirtseigene RNA-Polymerase bindet am „*origin of replication*“, der zwei „*stem-loop*“ Strukturen ausbildet, die den -35 und -10 Promotor-Sequenzen ähneln und synthetisiert einen Primer (Higashitani *et al.* 1997). Nach der Ablösung der RNA-Polymerase hat ein definierter Primer mit dem (+) ssDNA Strang hybridisiert (Zenkin *et al.* 2006) und wird von der DNA-Polymerase III des Wirts für die Synthese des (-) Stranges verwendet. Der Einzelstrang wird in eine doppelsträngige Form, die sogenannte „replikative Form“ (RF), überführt (Horiuchi 1980). Diese wiederum dient als Vorlage für die Synthese des (+) Stranges und für die Transkription der Phagen-Gene. Dabei replizieren sich die Ff Phagen durch den Mechanismus des „*rolling circle*“. Das durch den Phagen kodierte pII als Endonuklease erzeugt im Folgenden im (+) Strang der RF-DNA einen Einzelstrangbruch und leitet den Replikationsprozess ein. Nach deren Beendigung werden die offenen Enden durch das pII ligiert und somit rezirkularisiert (Asano *et al.* 1999). Parallel zu der DNA-Replikation werden die Proteine translatiert. Die Hüllproteine pIII, pVI, pVII, pVIII und pIX und die für die Assemblierung neuer Phagen benötigten Proteine pI und pXI werden in die innere Membran der Bakterien eingelagert. Das Protein pIV bildet in der äußeren Membran den Sekretionskanal,

durch den die Phagen die Wirte wieder verlassen (Russel *et al.* 1997). Sobald sich die Konzentration des (+) Strang bindenden pV Proteins erhöht, wird die Konvertierung neu synthetisierter (+) Stränge in die RF-Form durch Interaktionen von pV-Dimeren mit den Einzelsträngen unterdrückt. Bis auf das Verpackungssignal, eine Haarnadelstruktur, wird die DNA regelrecht umhüllt. Es bilden sich ssDNA-pV-Komplexe, welche das Verpackungssubstrat („*packaging substrate*“) der Phagenassemblierungsphase darstellen (Webster & Cashman 1973). Zusätzlich inhibiert das pV die Translation von pII (Michel & Zinder 1989) und pX (Yen & Webster 1982). Die Phagenassemblierung kann in fünf Intervalle unterteilt werden, die Preinitiation, Initiation, Elongation, Pretermination und Termination (Russel *et al.* 2004). In der Preinitiation werden die Phagenassemblierungsorte gebildet, in dem sich die Proteine pI, pIV und pXI zusammensetzen. Sobald die Phagenassemblierungsorte zusammen mit den „*minor coat*“ Proteinen pVII und pIX sowie den ssDNA-pV-Komplexen vorliegen, kann der Zusammenbau des Phagen durch eine Interaktion einer cytoplasmatischen Domäne von pI mit den freiliegenden Verpackungssignalen der ssDNA-pV-Komplexe initiiert werden (Russel & Model 1989). In der Elongationsphase werden die pV-Proteine bei der Überführung des Partikels durch die innere Membran sukzessiv durch das Haupthüllprotein pVIII ersetzt und durch die homomultimere pIV-Sekretionspore in die äußere Umgebung transloziert. Nachdem die DNA komplett mit den pVIII umhüllt ist, werden die „*minor coat*“ Proteine pVI und pIII eingebaut und das Virus kann sich von der Bakterienzelle lösen. Dies ist nur möglich, wenn beide Proteine vorhanden sind (Rakonjac & Model 1998, Rakonjac *et al.* 1999), der Phage verbleibt sonst an der Wirtszelle. Pro Wirtszelle und Generation werden bei *E. coli* geschätzte 10^6 pVIII in die innere Membran integriert (Rakonjac *et al.* 2011). Obwohl die Ff Phagen-Produktion die Wirtszelle im Normalfall nicht tötet, können Veränderungen oder fehlerhafte Biosynthesen der Proteine zu Akkumulationen von störenden inneren Faltungen der Membranen führen und die Bakterien abtöten (Schwartz & Zinder 1968). Grundsätzlich erscheinen nach der Infektion der Wirtszellen die ersten Phagen im umgebenden Medium bei 37 °C nach ungefähr zehn Minuten. Die Anzahl der Viren erhöht sich in den ersten 40 Minuten exponentiell, bevor die Vermehrungsrate linear wird. Dies führt zu 1000 produzierten Phagen innerhalb der ersten Stunde pro Wirtszelle. Da die Wirte nicht absterben und sich weiter vermehren, können unter optimalen Bedingungen unendlich viele Phagen produziert werden (Russel *et al.* 2004).

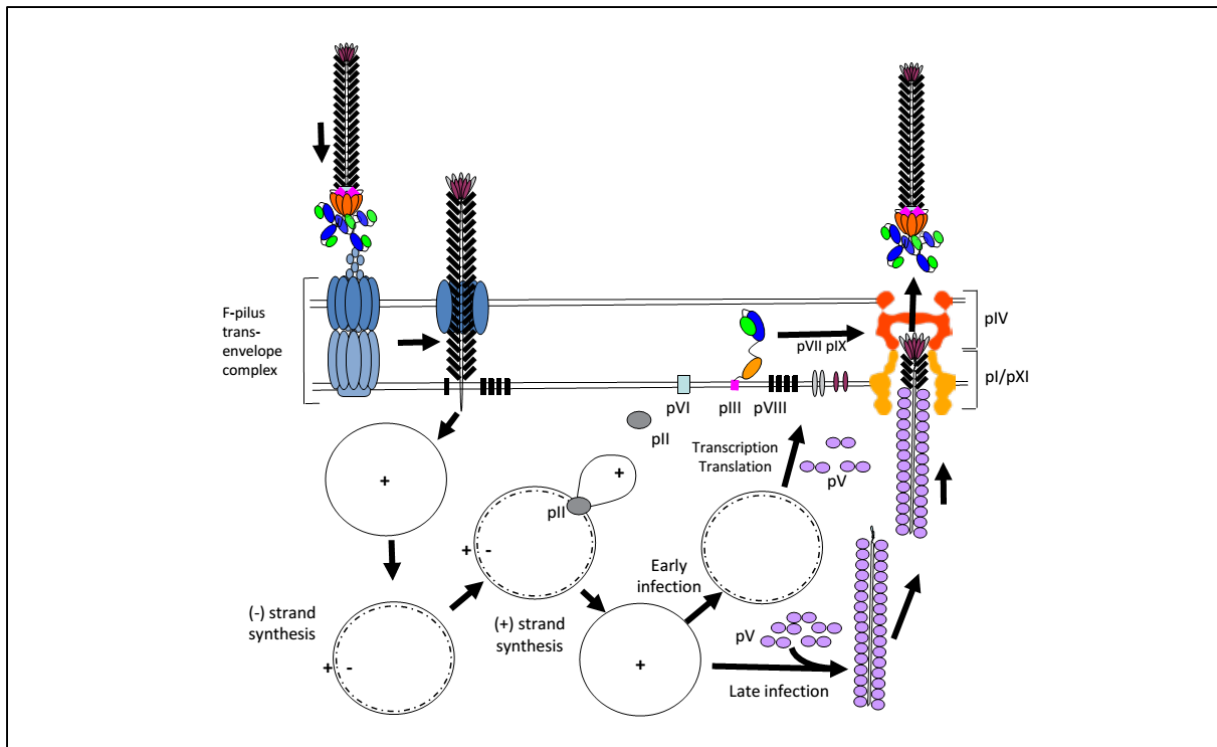


Abbildung 1.4-2 Replikationszyklus der Ff Phagen

nach: (Rakonjac *et al.* 2011): Während die (+) ssDNA bei der Infektion in das Cytoplasma gelangt, integrieren sich die pVIII Hüllproteine in die innere Membran. Die Synthese des negativen DNA-Stranges wird durch die wirtseigene RNA-Polymerase initiiert, indem durch sie ein Primer generiert wird. Nach der Ablösung des Enzyms repliziert die wirtseigene DNA-Polymerase III mit Hilfe des Primers den kompletten negativen Strang. Die Synthese des positiven Stranges wird durch das pII initiiert, das einen „nick“ im (+) Strang am positiven „origin of replication“ erzeugt. Durch eine „rolling circle“ Replikation werden beide Stränge nacheinander vermehrt. Am Anfang der Infektion werden neue positive Stränge als Matrize für die Synthese weiterer negativer Stränge verwendet, die Kopienanzahl der doppelsträngigen „Replikativen Form“ (RF) wird dadurch erhöht. Von der RF werden die Phagenproteine erzeugt. Die Proteine pII, pV und pX verbleiben im Cytoplasma und steuern die Genomreplikation und die Substratbildung (als Substrat gilt der ssDNA-pV-Komplex). Die Hüllproteine pIII, pVI, pVII, pVIII und pIX werden für den späteren Phagenzusammenbau in die Membran integriert, während pI, pIV und pXI den Transportkomplex bilden. Während der späteren Phase der Infektion werden die positiven Stränge durch die pV-Dimere umhüllt und als Verpackungssubstrat zu den Transport- beziehungsweise Verpackungskomplexen gebracht.

1.4.3 Biopanning mit Phagenbanken

In der Pionierarbeit gelang es 1985 erstmals, fremde DNA-Segmente in das Genom von Phagen zu klonieren und stabile Fusionsproteine auf der Oberfläche zu exprimieren (Smith 1985). Die ersten „*phage display*“ Bibliotheken mit Peptiden beziehungsweise Antikörpern wurden in den Jahren 1990/91 veröffentlicht (zum Beispiel: (Scott & Smith 1990, Barbas *et al.* 1991, Clackson *et al.* 1991)). Es folgten weitere Versuche, die je nach Zielsetzung Bindemotive von Domänen oder Rezeptoren identifizieren (Peptidbibliotheken) oder als „monoklonale“ Antikörper (Antikörper-Bibliotheken) wirken sollten (Rakonjac *et al.* 2011). Bevor es möglich ist, spezielle Varianten innerhalb einer Bibliothek zu identifizieren, müssen die Phagen erst in ausreichend hohen Mengen und Variationen angezogen werden, damit die Wahrscheinlichkeit bindender Moleküle erhöht wird. Je nach Herkunft und Art der Bibliothek unterscheiden sich diese Varianten dabei relativ stark voneinander. Der spätere Erfolg hängt direkt von der Spezifität und Sensitivität des Moleküls zu seinem Liganden ab (Rakonjac *et al.* 2011). Die Standardmethode für ein Affinitätsscreening wird häufig als Biopanning bezeichnet (Parmley & Smith 1988). Das „*target*“ wird im Normalfall auf einer Plastikoberfläche immobilisiert und mit der Phagenbibliothek in flüssiger Form inkubiert (siehe Abbildung 1.4-3). Nicht-bindende Phagen werden durch mehrere Waschschriffe entfernt und die gebundenen Phagen danach eluiert und amplifiziert. Häufig werden die Phagen nach drei „Biopanningrunden“ charakterisiert, wenn der „Hintergrund“ nicht-bindender Phagen stark genug reduziert ist.

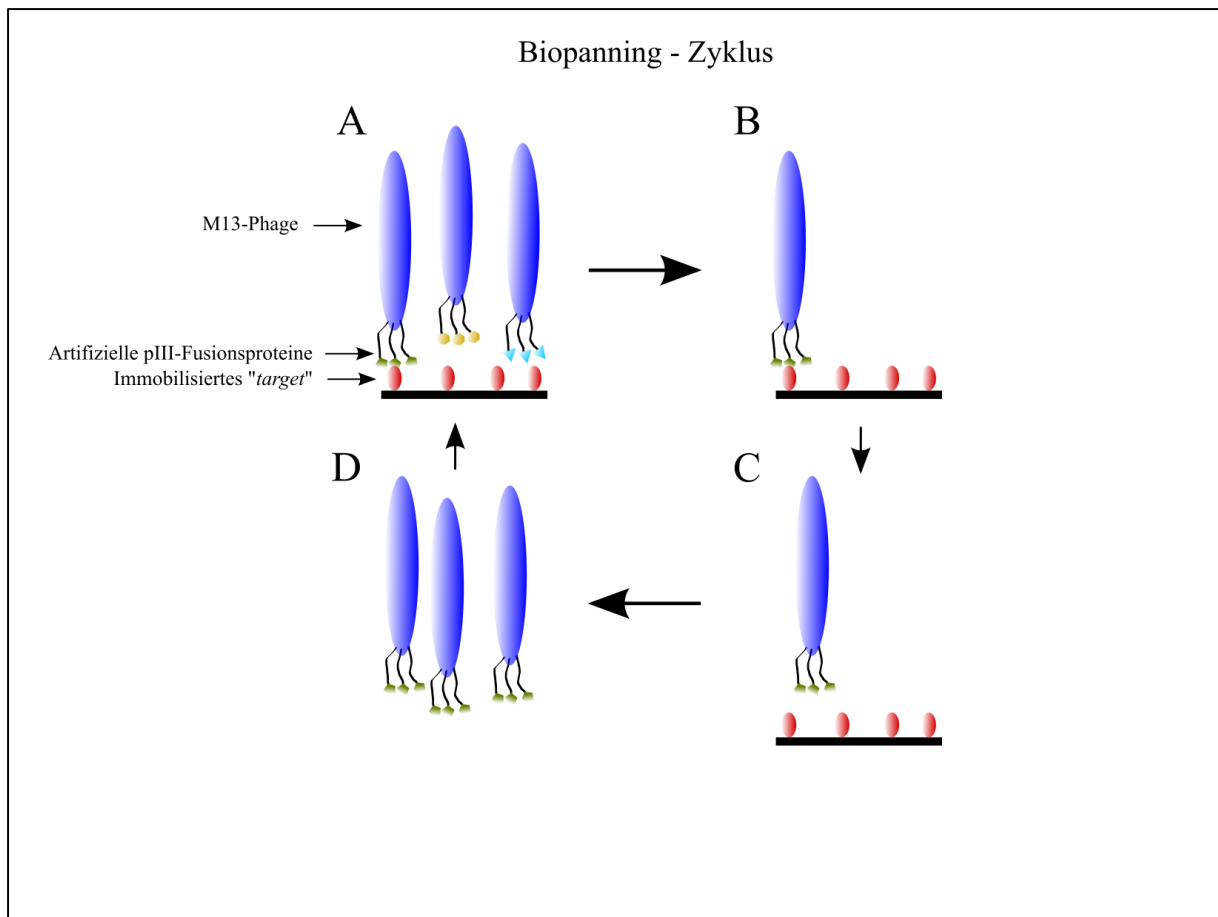


Abbildung 1.4-3 Schematische Darstellung einer Biopanning-Prozedur

A: Das immobilisierte Zielmolekül wird mit der vollständigen Phagenbibliothek inkubiert. B: Nur bindende Phagen verbleiben nach mehreren Waschschritten. C: Diese können zum Beispiel durch Veränderungen im pH-Wert eluiert werden. D: Die eluierten Phagen werden in Bakterien amplifiziert und können in weiteren Biopanningrunden eingesetzt oder charakterisiert werden.

Jedes der Hüllproteine von Ff-Phagen wurde schon für das Biopanning verwendet, das pIII wird dabei jedoch am häufigsten benutzt. Das Protein wird durch seine N-terminale Signalsequenz in die Membran geleitet, diese wird später durch eine Signalpeptidase entfernt. Der N-Terminus des Proteins verbleibt im Periplasma. Für die Verwendung in einem Biopanning ist es somit notwendig, die auf der Oberfläche exprimierten Proteine auf DNA-Ebene in *frame* zwischen die Signalsequenz und das spätere pIII Protein zu klonieren (Barbas *et al.* 1991). Da die C-terminale Domäne des pIII für den Zusammenbau des Virions benötigt wird, dürfen Variationen innerhalb des Proteins nur im Bereich des N-Terminus vorgenommen werden. Dieser ist für die späteren Infektionen der Wirtszellen jedoch essentiell, somit können Veränderungen zu nicht infektiösen Phagen führen. Um dieses Problem zu umgehen, werden die pIII-Fusionsproteine häufig von sogenannten Phagemiden exprimiert, die einen eigenen Plasmid- und f1- „origin of

replication“, das *f1*-Verpackungssignal und Antibiotikaresistenzgene besitzen (Barbas *et al.* 2004). Das exprimierte pIII wird dann mit einem Helferphagen “gerettet”. Dieser bringt durch sein Genom neben allen fehlenden Proteinen noch zusätzliche Wildtyp pIII mit, die eine spätere Infektion von weiteren Wirten und somit die Amplifikation erst in größerem Maßstab ermöglichen. Die Phagmid-DNA mit den gewünschten “*inserts*” wird in F⁺-Zellen transformiert. Sobald eine Infektion mit Helferphagen vorliegt, können sich die Phagemide durch das *f1* „*origin*“ replizieren. Die dadurch produzierte ssDNA wird in die Virionen verpackt, die je nach gewähltem Helferphagen zwischen null und fünf der durch die Phagemide kodierten pIII-Fusionsproteine auf ihrer Oberfläche präsentieren. Wenn unveränderte Helferphagen verwendet werden, liegt im Durchschnitt weniger als ein pIII-Fusionsprotein pro Virion vor, da das Wildtyp pIII präferiert wird. Durch die Verwendung von Helferphagen mit dem „*gene III amber*“ Mutationen in „*suppressor*“ Bakterienstämmen kann der Anteil an Wildtyp pIII im Virion gesenkt werden (Oh *et al.* 2007). Helferphagen mit Deletionsmutationen bezüglich des pIII erlauben sogar eine Verpackung mit fünf pIII-Fusionsproteinen. In der Abwesenheit von Helferphagen können die Phagemide wie Plasmide in den Bakterien vermehrt werden (Rakonjac *et al.* 2011). Nach der erfolgreichen Durchführung eines Biopannings und der Charakterisierung der bindenden Phagen können diese jederzeit neu produziert und eingesetzt werden.

1.5 Der Nachweis von Viren durch „*antibody mimics*“ aus Phagenbibliotheken

Die Idee der Identifikation von virusbindenden „*antibody mimics*“ durch die Verwendung von Phagenbibliotheken ist nicht neu. Schon 1994 stellte Nissim fest, dass die Präsentation eines Spektrums von Antikörper-Fragmenten auf der Oberfläche von filamentösen Bakteriophagen eine neuartige Möglichkeit der Produktion von Antikörpern mit bekannten Bindungsspezifitäten ermöglicht. Dadurch eröffneten sich neue Möglichkeiten für die Forschung (Nissim *et al.* 1994). In den folgenden Jahren zeigten sich erste Erfolge im Pflanzenvirussektor. So wurden humane scFv-Bibliotheken gegen gereinigtes CMV (Ziegler *et al.* 1995) und das *Potato leafroll luteovirus* (PLRV) (Harper *et al.* 1997) eingesetzt und auf bindende Moleküle untersucht. Es gelang scFvs zu identifizieren, die einen positiven Nachweis der jeweiligen Viren in Pflanzenmaterial ermöglichten. Innerhalb der folgenden Jahre wurden weitere erfolgreiche Biopannings von scFv-Bibliotheken gegen Pflanzenviren beschrieben, wie zum Beispiel gegen das PVY (Boonham & Barker 1998) oder verschiedene Tospoviren (Franconi *et al.* 1999). Die Methode des Biopanning erwies sich auch bei unterschiedlichen Zielsetzungen als stabil, es konnten zum Beispiel scFvs identifiziert werden, die funktional in Pflanzen exprimiert werden (Franconi *et al.* 1999), Virusepitope detektieren (Holzem *et al.* 2001) oder spezifische virusassoziierte Proteine wie die NIa der Potyviren unterscheiden (Hust *et al.* 2002) konnten. Auf dem Gebiet des Nachweissektors für Pflanzenviren muss jedoch festgestellt werden, dass sich nur relativ wenige Arbeiten in den letzten 15 Jahren mit der Verwendung von „*antibody mimics*“ aus scFv-Phagenbibliotheken für direkte Nachweisreaktionen von Pflanzenviren aus Pflanzenmaterial beschäftigten. Es gelang unter anderem die Isolation von scFvs, die das *Grapevine virus B* in infizierten *Nicotiana occidentalis* nachweisen konnten (Saldarelli *et al.* 2005), die Isolation eines Hüllprotein spezifischen scFv aus einem *mouse phage library antibody* für das *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) (Jahromi *et al.* 2009) und der Nachweis des *Papaya ringspot virus* in infiziertem Pflanzenmaterial (Maheshwari *et al.* 2015). Die Verwendbarkeit von *Phage Display Peptide* Bibliotheken für den Nachweis einer Peptid-Pflanzenvirus-Interaktion wurden zum Beispiel für das CMV (Gough *et al.* 1999), das *Rice black streaked dwarf virus* (RBSDV) (Bai *et al.* 2001) und das *Banana streak virus* (BSV) gezeigt (Chua *et al.* 2007).

Innerhalb der Erforschung der animal- und humanpathogenen Viren zeigt sich ein anderer Ansatz. Obwohl auch hier durch Biopanning Fusionsproteine für den Nachweis von Viren identifiziert wurden, gehen die Ansätze oft noch einen Schritt weiter. Die Interaktion mit dem

Virus soll außerdem noch antiviral sein. Um dieses inhibierende Potential zu entfalten, müssen die Moleküle zusätzlich häufig die Fähigkeit besitzen, in die Zielzellen eindringen zu können (Brissette & Goldstein 2007). An dieser Stelle soll nur ein kleiner Einblick entdeckter „*antibody mimics*“ zu verschiedenen Viren gegeben werden, eine Übersicht über weitere antivirale Peptide zeigt zum Beispiel das Review „*Phage Display of Combinatorial Peptide Libraries: Application to Antiviral Research*“ von Castel *et al.* (Castel *et al.* 2011).

Innerhalb der Humanmedizin konnten unter anderem Peptide aus Phagenbibliotheken identifiziert werden, die die Infektiosität des *Human rotavirus in vitro* (Ning *et al.* 2007) verringern, den Zugang des *Andes virus* (ANDV) zu Wirtszellen unterbinden (Hall *et al.* 2009) oder die Infektionsrate des *West nile virus* (WNV) reduzieren können (Bai *et al.* 2007). Spezifische Reaktionen mit scFvs aus Phagenbibliotheken konnten zum Beispiel für das *Dengue virus* (DENV) (Cabezas *et al.* 2008) und das *avian influenza A virus* (HPAI) des H5N1 Subtyps gezeigt werden (Poungpair *et al.* 2014).

Auch im Sektor der animalpathogenen Viren konnten Peptide mit antiviraler Wirkung aus Phagenbibliotheken gegen unterschiedliche Viren gewonnen werden, zum Beispiel wurde *in vitro* die Infektion der Wirtszellen durch das *avian infectious bronchitis virus* (IBV) verhindert (Peng *et al.* 2006), die hämolytische Wirkung und Vermehrung des *Newcastle disease virus* (NDV) (Ramanujam *et al.* 2002) inhibiert und die Infektion mit dem *White spot syndrome virus* in Shrimps gehemmt (Yi *et al.* 2003). Im Bereich der scFvs aus Phagenbibliotheken wurde unter anderem für diagnostische Zwecke der Nachweis des *Spring viremia of carp virus* (SVC) (Liu *et al.* 2013) und des *Infectious haematopoietic necrosis virus* (IHNV) (Liu *et al.* 2014) ermöglicht.

Auch durch diese recht knapp gehaltene Übersicht wird deutlich, wie groß das Potential von „*antibody mimics*“ aus Phagenbibliotheken für den Nachweis beziehungsweise für Interaktionsstudien mit Viren ist.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1-1 Ein Überblick über die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Modell	Vertriebspartner
Aktivkohle		Sigma
Analysewaage	Analytic 200 S	Satorius
Autoklav	VX-75	System
Autoklav	DE-23	System
Bidestanlage	GFL Bi-Dest 2104	GFL
Bio-Assay-Schale		
Computer	Gel Jet Imager	INTAS
Digitalkamera	Powershot A3200 IS	Canon
Drucker	Mitsubishi P91D	INTAS
Elektrophoresekammer	Mini 440.000, Serien-Nr. 0014	Polymehr
Elektroporator	ECM 399 Electroporations System	BTX
Eppendorf Zentrifuge	8510R	Eppendorf
Reaktionsgefäße 0,2; 1,5; 2,0 ml		Sarstedt
Falcon-Gefäß	15 und 50 mL	Sarstedt
Feinwaage	Sartorius analytic	Sartorius
Fotometer	BioPhotometer plus	Eppendorf
Handschuhe	Nitril 3000	Meditrade
Heizblock	Block heater	Stuart Scientific
Heizblock	Techne Dri-Block DB3	thermo-DUX
Immunoröhrchen		
Inkubationsschrank		Heraeus
Inkubationsschrank	Unihood 650	LTF Labortechnik
Kamera		INTAS
Klebefolie für Mikrotiterplatten (luftdurchlässig)	dunn B-100	
Kit: NucleoSpin Extract II	740609	Macherey-Nagel
Kit: Ni-NTA Spin Kit	31314	Qiagen
Kolben	100 mL	SIMAX

Küvetten	Spaltbreite 1 mm	Roth
Küvetten Fotometer		
Laborzentrifuge	Sigma 113	SIGMA
Mikrowelle	Mikrowellenkochgerät News 113B	NT News
Minipistill		Roth
Mischer HPLC	MKR 23	HLC BioTech
MTP Schüttler	Vortemp 56	
Ni-NTA Spin Columns		Qiagen
Pikocycler	Piko 24	Finnzymes
Pipette 5 mL		Roth
Pipetten 2, 20, 200, 1000 µl	Pipetman	Gilson
Pipettenspitzen 0,1-10 µL	TXL-10-L	AXYGEN
Pipettenspitzen 1 mL	Ultratip	greiner bio-one
Pipettenspitzen 200 µL	Gelb	Sarstedt
Pipettenspitzen 1 mL gestopft		
Pipettenspitzen 200 µL gestopft		
Pistill + Mörser		Haldenwanger
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
PP Deep Well MTP		Greiner
Schüttler	Certomat MO 2	Sartorius
Schwenktisch		
Spannungsquelle	Microcomputer electrophoresis power supply	Consort
Spannungsquelle	MP 300v	MS major science
Spannungsquelle	Elite 300+	Schütt
Spritze	Omnifix(R)-F	Braun
Tecan Columbus ELISA Washer		
Sterilbank	Lamina Air HA 2448 GS	Haraeus
Thermocycler	C1000 Touch™	BIORAD
Thermocycler	PIKO	Finnzymes
Thermo Shaker	PST-60HL-4	
Tischzentrifuge	MiniSpin, Festwinkelrotor	Eppendorf
UV-Tisch		INTAS
Vakuumkonzentrator	Hetovac VR-1+CT60e	Heto
Vortex	MS2 MiniShaker	IKA
Zentrifuge	Sorvall RC-5C	
Zentrifuge	Sigma 4K10	

96-well Platten (Mikrotiterplatten)	PS, Microlon, med-binding	Greiner bio-one
96-well Platten (Mikrotiterplatten)	F96 MAXISORB Nunc Immuno Plate	Nunc Products

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.1-2 Ein Überblick über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Summenformel	Vertriebspartner
Aceton	C_3H_6O	Roth
Acetosyringon	$C_{10}H_{12}O_4$	Roth
Agar	$(C_{12}H_{18}O_9)_n$	Roth
Agarose LE	$(C_{12}H_{18}O_9)_n$	Biozym
Aktivkohle		Sigma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	$H_8N_2O_8S_2$	Roth
Aqua _{bidest}	H_2O	IGPS
Aqua _{dmin}	H_2O	IGPS
Bromphenolblau	$C_{19}H_9Br_4O_5Na$	Serva
Calciumchlorid	$CaCl_2$	Roth
Celite 545		Serva
DIECA	$C_5H_{11}NS_2$	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$	Roth
Dimethylformamid (DMF)	C_3H_7NO	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	C_2H_6OS	Roth
Dithiothreitol (DTT)	$C_4H_{10}C_2S_2$	Roth
Essigsäure	$C_2H_4O_2$	Roth
Ethanol, reinst	C_2H_6O	Sigma
Ethanol, vergällt	C_2H_6O mit MEK	Roth
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}BrN_3$	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Merck
GelRed	$C_{60}H_{72}I_2N_8O_5$	GeneON
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	Roth
Glycerin (99,5 %)	$C_3H_8O_5$	Roth
Guanosin	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	Sigma
Hefeextrakt		Roth
Hexamincobaltchlorid	$HaCoCl_3$	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG)	$C_9H_{18}O_5S$	Appllichem
Isopropanol	C_3H_8O	Roth

Kalium-Acetat	$C_2H_3KO_2$	Roth
Kaliumchlorid	KCl	Roth
Kaliumcitrat	$C_6H_5K_3$	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Roth
Kanamycin	$C_{18}H_{36}NO_4O_{11}$	Roth
Magnesiumchlorid Hexahydrat	$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	Roth
MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)	$C_6H_{13}NO_4S$	Roth
Nicotinamadeninindinukleotid (NAD)	$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$	New England BioLabs
Natriumacetat Trihydrat	$C_2H_3NaO_2 \cdot 3 H_2O$	Roth
Natriumchlorid	NaCl	Roth
Natriumdiethyldithiocarbamate	$C_5H_{10}NS_2Na$	Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Roth
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	NaH_2PO_4	Roth
Natriumhydroxid	NaOH	Merck
Natriumiodid	NaI	Roth
Natriumsulfit	Na_2SO_3	Roth
Natriumperchlorat	$NaClO_4$	Serva
Polyethylenglycol (PEG)	$C_2H_6O_2$	Fluka
Polyvinylpyrrolidon K 90 (PVP)	$(C_6H_9NO)_n$	Carl Roth
Quantum Matrix Lösung		Biorad
Rotiphorese® Gel 30		Roth
Roti®-Quant		Roth
Rubidiumchlorid	RbCl	Roth
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Roth
Salzsäure	HCl	Roth
Silika Partikel		
Stickstoff	N_2	CryoEase
Tetramethylbenzidin	$C_{16}H_{20}N_2$	Roth
Tetramethylethyldiamin	$C_6H_{16}N_2$	Appllichem
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	$C_4H_{11}NO_3$	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid	$C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$	Roth
Trypsin		Sigma
Urea	CH_4N_2O	Roth
Zitronensäure	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Roth
2TY Medium		Roth

2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure (ABTS))	$C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$	Sigma
4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat	$C_6H_4NNa_2O_6P \cdot$ $6 H_2O$	Roth
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (Xgal)	$C_{14}H_{15}BrClNO_6$	Roth

2.1.3 Verwendete Pflanzenviren

Tabelle 2.1-3 Ein Überblick über die verwendeten Pflanzenviren

Pflanzenvirus	Isolat	Herkunft	Plasmid
CbMV		Institut für gartenbauliche Produktionssysteme (IGPS), Abteilung Phytomedizin, Hannover, Deutschland	p2447
CMV	PV-0183	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland	
CMV	PV-0506	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland	
PPV	Bul PV-0212	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland	p2161
PVY	N605	Gábor Jakab (Jakab <i>et al.</i> 1997)	p2345
TMV	Ohio V PV-0171	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland	p2129
TMV	Vulgare PV-0107	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland	p1922
TSWV	Interne Bezeichnung: 12	Pers. Komm.: Pamela Akoth Ogada, IGPS, Abteilung Phytomedizin, Hannover, Deutschland	

2.1.4 Verwendete Pflanzen

Tabelle 2.1-4 Ein Überblick über die verwendeten Pflanzen

Pflanze	Sorte	Herkunft
<i>Chenopodium quinoa</i>		IGPS, Abteilung Phytomedizin, Hannover, Deutschland
<i>Lactuca sativa</i>	Pirat	Quedlinburger Saatgut, Bauhaus, Hannover
<i>Nicotiana tabacum var. Xanthi</i>		IGPS, Abteilung Phytomedizin, Hannover, Deutschland
<i>Nicotiana benthamiana</i> Linie 17.27.1		IGPS, Abteilung Phytomedizin, Hannover, Deutschland
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Neckargold	Quedlinburger Saatgut, Bauhaus, Hannover

2.1.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.1-5 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Virusinokulationspuffer (mech. Inokulation)	0,05 M KH_2PO_4 , 0,05 M Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA, 5 mM Na-DIECA, (pH 7)
APS-Lösung (10 %)	10 % Ammoniumperoxoidsulfat (w/v) in Aqua _{bidest}
Anodenpuffer	200 mM Tris in Aqua _{bidest} (pH 8,9), autoklaviert
dNTP-Mix (10 mM)	10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP; gelagert bei -20 °C
Coomassie-Färbelösung	25 % Isopropanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v), 0,1 % Coomassie-R250 (w/v)
Coomassie-Entfärbelösung	10 % Essigsäure (v/v)
DNA-Ladepuffer	37,5 % Glycerin (v/v), 0,2 % Bromphenolblau (w/w)
DND	1 M DTT, 10 mM Kalium-Acetat (pH 7,5), 90 % DMSO
ELISA Coating Puffer	15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 , (pH 9,6)
ELISA Probenpuffer	ELISA Waschpuffer, 2 % PVP (K10-K40) (w/v), 0,2 % BSA (w/v), (pH 7,4)
ELISA Probenpuffer (alternativ)	ELISA Waschpuffer, 2 % PVP (K10-K40) (w/v), 2 % Milchpulver (w/v), (pH 7,4)
ELISA Substratlösung (alkalische Phosphatase)	1 mg/ml 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat in Substratpuffer, frisch ansetzen

ELISA Substratpuffer (alkalische Phosphatase)	9,7 % Diethanolamin (v/v), 0,02 % $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (w/v), (pH 9,8/HCL)
ELISA Substratlösung (<i>horseradish peroxidase</i> (HRP))	0,22 mg/ml ABTS in Substratpuffer, frisch hinzugefügt werden 0,051 % H_2O_2 (30 %)
ELISA Substratpuffer (<i>horseradish peroxidase</i>)	0,05 M Zitronensäure, (pH 4)
Eluationspuffer	10 mM Tris-HCL, (pH 8,5)
Ethidiumbromidlösung	7,5 mg/ml Ethidiumbromid in Aqua _{bidest}
Expressionspuffer B	8 M Urea, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Tris·Cl, (pH 8,0)
Expressionspuffer C	8 M Urea, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Tris·Cl, (pH 6,3)
Expressionspuffer E	8 M Urea, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Tris·Cl, (pH 4,5)
<i>Gibson Assembly</i> (5x isothermaler Puffer)	25 % PEG 8000, 500 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM MgCl_2 , 50 mM DTT, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 mM dTTP, 5 mM NAD, ad Aqua _{bidest}
<i>Gibson Assembly Mix</i>	100 μl 5x isothermaler Puffer, 20 μl T5-Exonuklease (0,1 U/ μl), 6,25 μl Phusion DNA-Polymerase 2 (2 U/ μl), Taq-DNA-Polymerase (40 U/ μl), 73,75 μl Aqua _{bidest}
Homogenisationspuffer	PCA-buffer, 20 mM Na_2SO_3 , 15 mM DIECA, 6,5 mM EDTA
Inokulationspuffer (<i>Rhizobium radiobacter</i>)	10 mM MgCl_2 -Hexahydrat, 10 mM MES, 100 μM Acetosyringon
IptG/Xgal Stocklösung	5 % IPTG (w/v), 4 % Xgal (w/v) in DMF
Kaliumphosphatpuffer	0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4
Kathodenpuffer	100 mM Tris, 100 mM Tricine, 0,1 % SDS (v/v), (pH ~8,25)
Ladepuffer (Nukleinsäure)	4,71 M Glycerin, 2,89 mM Bromphenolblau
Lösung A (klare Lysate)	50 mM Glucose, 15 mM Tris-Base (pH 8,0), 10 mM EDTA
Lösung B (klare Lysate)	0,2 M NaOH, 1 % SDS (w/v)
Lösung C (klare Lysate)	3 M NaAc (pH 5,2 mit Eisessig)
Lösung D (klare Lysate)	10 % klare Lysate Lösung D1, 10 % klare Lysate Lösung D2 in Aqua _{bidest}
Lösung D1 (klare Lysate)	500 mM Tris-HCL, (pH 8,0)
Lösung D2 (klare Lysate)	1 M NaAc, (pH 7,0)
NaI-Lösung	149 mM Na_2SO_3 , 6 M NaI
Panningblock	1 % Milchpulver (w/v), 1 % BSA (w/v), 0,1 % Tween 20 (v/v) in PBS
PCA-Puffer	160 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 18 mM Zitronensäure-Monohydrat, (pH = 7)
PEG/NaCl Lösung	16,7 % PEG 8000 (w/v), 3,3 M NaCl, autoklaviert

PEG/NaCl Lösung	20 % PEG 8000 (w/v), 2,5 M NaCl, autoklaviert
PEG/NaCl Lösung	24 % PEG 8000 (w/v), 6,9 % NaCl (w/v), autoklaviert
Ph.D. Blocklösung	2 % Milchpulver (w/v) in TBS
Ph.D. Coating Puffer	0,1 M NaHCO ₃ , (pH 8,6)
Ph.D. Eluationspuffer	200 mM Glycin-HCl (pH 2,2), 1 mg/ml BSA
Ph.D. Waschpuffer	0,1 % Tween-20 (v/v) in TBS
Ph.D. Waschpuffer	0,5 % Tween-20 (v/v) in TBS
Phosphat-Buffered Saline Puffer (PBS) (10 x)	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄ , (pH = 7,4/HCL)
Quantum Binding Buffer	6 M Natriumperchlorat, 50 mM Tris-HCL (pH 8,0), 10 mM EDTA, (pH 8,0/NaOH)
Quantum Wash Buffer	400 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 8,0/HCl), 2 mM EDTA (pH 8,0/NaOH), 50 % Reinst-Ethanol (v/v), (pH ~ 8,0)
RNA-Extraktionspuffer	5 M Guanidine-HCl, 0,2 M NaAc (pH 5,2), 25 mM EDTA, 1 M Kac, 2,5 % PVP, (pH 5,6)
RNase-Lösung	1 % RNase A (w/v) in TE-Puffer
RNA-Waschpuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,05 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50 % Reinst-Ethanol, (pH 7,5)
SDS-Probenpuffer (2x)	100 mM Tris-HCl (pH 6,5), 4 % SDS (w/v), 200 mM DTT, 20 % Glycerin (v/v), 0,2 % Bromphenolblau (w/v)
STE-Puffer	10 mM EDTA, 1 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl
STE/16.5 % EtOH	1x STE-Puffer, 16,5 % EtOH (v/v)
TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris-Acetat, 50 mM EDTA (pH 8,0/NaOH), 5,71 % Essigsäure (v/v), (pH 8,44)
TE/RNase-Mix	10 µg RNase A/ml TE-Puffer (10/0,1)
TE-Puffer (10/0,1)	10 mM Tris (pH 8,0/HCl), 0,1 mM EDTA (pH 8,0/NaOH)
TE-RNase	TE-Puffer, 10 µg/ml RNase A aus RNase-Lösung
TMB Lösung A	0,05 M Zitronensäure, 0,05 M Kaliumcitrat, (pH 4.1)
TMB Lösung B	1 mM Tetramethylbenzidin, 10 % Aceton (v/v), 89,1 % Ethanol (v/v), 0,907 % H ₂ O ₂ (30 %) (v/v)
Transformationspuffer	100 mM RbCl, 45 mM CaCl ₂ × H ₂ O, 10 mM MES (mit 10 M KOH auf pH 6 eingestellt), 10 mM CaCl ₂ × H ₂ O, 3 mM HaCoCl ₃ , pH 6,3, sterilfiltriert
Tricine-Gelpuffer	3 M Tris, 0,3 % SDS (w/v), (pH 8,45)
Tris-Buffered Saline Puffer (TBS)	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, autoklaviert
Trypsin PBS	10 µg/ml Trypsin in PBS

2.1.6 Verwendete Antibiotika

Tabelle 2.1-6 Ein Überblick über die verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Summenformel	Konzentration Stocklösung	Vertriebspartner
Ampicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	150 mg/ml	Roth
Kanamycin	C ₁₈ H ₃₆ NO ₄ O ₁₁	50 mg/ml	Roth
Tetracyclin	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	20 mg/ml	Roth

2.1.7 *Escherichia coli* Bakterienstämme

Tabelle 2.1-7 Beschreibung der verwendeten *Escherichia coli* Stämme

Bakterienstamm (Vertriebspartner)	Genotyp
BL21-Gold(DE3) (Agilent Technologies)	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i>
ER2738 (New England Biolabs)	F' <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>zzf::Tn10</i> (Tet ^R)/ <i>fhuA2 glnV</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>thi-1</i> Δ(<i>hsdS-mcrB</i>)5
M15 (Qiagen)	F ⁻ , Φ80Δ <i>lacM15</i> , <i>thi</i> , <i>lac</i> ⁻ , <i>mtl</i> ⁻ , <i>recA</i> ⁺ , <i>KmR</i>
NM522 (Pharmacia)	F' <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15/ Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>glnV thi-1</i> Δ(<i>hsdS-mcrB</i>)5
TG1	K-12 <i>supE thi-1</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) Δ(<i>mcrB-hsdSM</i>)5, (r _K ⁻ m _K ⁻)
XL1-Blue MRF'	Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proABlacIqZ</i> ΔM15 Tn 10 (Tet ^r)]

2.1.8 *Rhizobium radiobacter* Bakterienstamm

Tabelle 2.1-8 Beschreibung des verwendeten *R. radiobacter* Stamms

Bakterienstamm	Chromosomaler Hintergrund	Ti-Plasmid
GV2260	C58	pGV2260 (pTiB6S3DT-DNA)

2.1.9 Nährmedien

Tabelle 2.1-9 Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
Luria-Bertani-Agar (LB-Agar)	LB-Medium, 1,5 % Agar (w/v), autoklaviert
LB-Agar mit Ampicillin	LB-Medium, 1,5 % Agar (w/v), 150 µg/ml Ampicillin
LB-Agar IPTG/Xgal	LB-Medium, 1,5 % Agar (w/v), 1 ml IPTG/Xgal Stammlösung
LB-Agar mit Kanamycin	LB-Medium, 1,5 % Agar (w/v), 50 µg/ml Kanamycin
LB-Agar mit Tetracyclin	LB-Medium, 1,5 % Agar (w/v), 20 µg/ml Tetracyclin
Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	1 % Pepton (w/v), 1 % NaCl (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v) in Aqua _{dest.} , (pH 7,5), autoklaviert
LB-Medium mit Ampicillin	LB-Medium, 150 µg/ml Ampicillin
LB-Medium mit Kanamycin	LB-Medium, 50 µg/ml Kanamycin
LB-Medium mit Tetracyclin	LB-Medium, 20 µg/ml Tetracyclin
<i>Super Optimal Broth</i> Medium (SOB)	2 % Pepton (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl in Aqua _{dest.} , (pH 6-7)
<i>Super Optimal Broth with Catabolite Repression</i> Medium (SOC)	SOB, 10 mM Glucose, 20 mM MgCl ₂
2xYT Agar mit Ampicillin	2xYT, 1,5 % Agar (w/v), 100 µg/ml Ampicillin
LB-Agar IPTG/Xgal	2xYT, 1,5 % Agar (w/v), 1 ml IPTG/Xgal Stocklösung
2xYT Agar mit Kanamycin	2xYT, 1,5 % Agar (w/v), 50 µg/ml Kanamycin
2xYT Agar mit Tetracyclin	2xYT, 1,5 % Agar (w/v), 20 µg/ml Tetracyclin
2xYY Medium	1,6 % Bacto Tryptone (w/v), 0,5 % NaCl (w/v), 1 % Hefeextrakt (w/v) in Aqua _{dest.} , (pH 7,5), autoklaviert
2xYT Medium (gepuffert)	2xYT Medium, 10% Kaliumphosphatpuffer (v/v)
2xYT mit Ampicillin	2xYT, 100 µg/ml Ampicillin
2xYT mit Ampicillin und Glucose	2xYT, 100 mM Glucose, 100 µg/mL Ampicillin
2xYT mit Kanamycin	2xYT, 50 µg/ml Kanamycin
2xYT (gepuffert) + SA	2xYT, 50 mM Saccharose, 100 µg/mL Ampicillin
2xYT mit Tetracyclin	2xYT, 20 µg/ml Tetracyclin
2xYT Top Agar	2xYT, 0,6 % Agar (w/v)

2.1.10 Oligonukleotide

Tabelle 2.1-10 Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid Bezeichnung	Interne Nummer	Spezifische Sequenz
pQE_30CMVAs	2876	AACTGCAGTCATCAAACCTGGGAGCACT
pQE_30CMVs	2877	AAGGATCCATGGACAAATCTGAATCAACC
pQE_30PPVAs	2878	AAAAGCTTCTACACTCCCCTCACACCGAGGA
pQE_30PVYAs	2880	AAAAGCTTTCACATGTTCTTCACTCCAAGT
pQE_30PVYs	2881	AAGGATCCGGAAATGACACAATCG
pQE_30TMVAs	2882	AAAAGCTTTCATCAAGTTGCAGGACTA
pQE_30TMVs	2883	AAGGATCCATGTCTTATAGTATCACTACTCCA
pQE_30TSWVAs	2884	AAAAGCTTTCATCAAGCAAGTTCTG
pQE_30TSWVs	2885	AAGGATCCATGTCTAAGGTTAAGCTCA
pQE_30PPVneu_s	2945	AAGGATCCGCTGATGAAAAGGAGGACGA
pQE_30As	2953	GGATCTATCAACAGGAGTCCAAG
pQE_30s	2954	ACTATGAGAGGATCGCATCACC
M13K4as	3371	ATGTGCAAAGGTACCACAAGCGGAGTGAGAATAGAAAGGAAC
M13K4s	3372	CCGCAGTGCGGTGGTGGTAGCGAAACTGTTGAAAGTTGTTTAGC
M13KTMVs	3489	CTGACTCAGCGGTGGTATCTGCGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGG TGC
M13KTMVas	3490	CTGCGCCAATCGGAGTGAGAATAGAAAGGAACAACACTAAAG
TMVC7C1s	3662	TATGGTGCTTGCAGGTGGAGGTTTCGGCCGAAACTGTTGAAAGTTG TTTAGC
TMVC7C1as	3663	CCAACCCCAACAACAAGCGGAGTGAGAATAGAAAG
TMV12_2s	3664	CCTTATATGAGGGAGCCGGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGC
TMV12_2as	3665	ATTAAGAGTCCGATGCCAGGAGTGAGAATAGAAAGGAACAAC
CbMV_CPs	4207	ATGGGGATCCATGGATAATTACAAGAACTCACCTG
CbMV_CPas	4208	TTCGAATTCCTATAACCGAGAAACGTACCACTTAAG
scfv17_3_EcoRIs	4372	TTCACACAGAATTCATTAAGAGGAG
scFv17_3_BamHIas	4373	GATATCTTTGGATCCCTAATGATGATG
M13p3s	4405	GGATCCAAAGATATCAGAGCTGAAACTGTTGAAAG
M13p3as	4406	GTTGAAAATCTCCAAAAAAAAGGCTC
scFvpelBs	4407	CTTTTTTTTTGGAGATTTTCAACATGAAATACCTATTGCCTAC
scFvh6as	4408	CTCTGATATCTTTGGATCCATGATGATGGTGGATGATG

Die in Tabelle 2.1-10 benannten Oligonukleotide werden von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert. Sie werden in TE-Puffer (10/0,1) in einer Konzentration von 100 μM aufgenommen. Die Arbeitslösung wird zu einer Konzentration von 10 μM verdünnt. Die Oligonukleotide können bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

2.1.11 Verwendete Enzymen

Tabelle 2.1-11 Konzentration und Herkunft der verwendeten Enzyme

Enzym	Konzentration	Reaktionspuffer	Vertriebspartner
<i>Phusion Flash</i> TM MM		2x Phusion Flash Master Mix	Fermentas
RevertAid Reverse Transcriptase	200 U/ μl	5x Reaktionpuffer	Thermo Scientific
Ribolock-RNase Inhibitor	20 U/ μl	<i>Reaction buffer</i>	Fermentas
RNaseT1	1 U/ μl		Roche
RNase1	1 U/ μl		Roche
T4 Ligase	5 U/ μl		Thermo Scientific
T5 Exonuclease	0,1 U/ μl	Isothermal buffer	Thermo Scientific
Taq DNA-Polymerase	40 U/ μl	Isothermal buffer	New England Biolabs
TE-RNase	2x		Serva

2.1.12 Verwendete Restriktionsendonukleasen

Tabelle 2.1-12 Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen

Enzym	Konzentration der Stammlösung	Erkennungssequenz	Reaktionspuffer	Vertriebspartner
<i>Bam</i> HI	10 U/ μl	5'- G↓GATCC -3' 3'- CCGTA↑G -5'	10x Fast Digest Puffer	Thermo Scientific
<i>Eco</i> RI	10 U/ μl	5'- G↓AATTC -3' 3'- CTAA↑G -5'	10x Fast Digest Puffer	Thermo Scientific
<i>Hind</i> III	10 U/ μl	5'- A↓AGCTT -3' 3'- TTCGA↑A -5'	10x Fast Digest Puffer	Thermo Scientific
<i>Pst</i> I	10 U/ μl	5'- CTGCA↓G -3' 3'- G↑ACGTC -5'	10x Fast Digest Puffer	Thermo Scientific

2.1.13 Plasmide, Phagen und Phagemide

Tabelle 2.1-13 Referenznummern und Selektionsmarker der verwendeten Plasmide, Phagen und Phagemide

Bezeichnung (Herkunft)	Art	Interne Referenznummer	Selektionsmarker
M13K07 (NEB Biolabs)	Phage		Kanamycin
pBIN_PVY	Plasmid	1415	Kanamycin
pCB:p35TMVr.2	Plasmid	1922	Kanamycin
pCB:p35_TMV_Ohio_HDVpa	Plasmid	2129	Kanamycin
pCB:p35TMV_OhioV	Plasmid	2161	Kanamycin
pQE_TMV	Plasmid	2303	Ampicillin
pQE_PVY	Plasmid	2304	Ampicillin
pQE_PPV	Plasmid	2305	Ampicillin
pQE_TSWV	Plasmid	2306	Ampicillin
pQE_CMV	Plasmid	2307	Ampicillin
M13_K07	Plasmid	2340	Kanamycin
MK13K07_K4	Plasmid	2341	Kanamycin
pCB:p35_PVY_gfp	Plasmid	2345	Kanamycin
pCB:p35CbMV	Plasmid	2447	Kanamycin
pEMBHT:p35CbMV	Plasmid	2448	Kanamycin
pRSET A_CP_TMV	Plasmid	2574	Ampicillin
pRSET A_CP_PVY	Plasmid	2575	Ampicillin
pRSET A_CP_PPV	Plasmid	2576	Ampicillin
pRSET A_CP_TSWV	Plasmid	2577	Ampicillin
pRSET A_CP_CMV	Plasmid	2578	Ampicillin
pRSET A_CP_CbMV	Plasmid	2579	Ampicillin
SH1327-C9	Phagemid	2609	Ampicillin
SH1327-C10	Phagemid	2610	Ampicillin
SH1327-A10	Phagemid	2611	Ampicillin
SH1327-C3	Phagemid	2612	Ampicillin
M13K07TMV1	Plasmid	2645	Kanamycin
M13K07TMVC1	Plasmid	2646	Kanamycin
M13K07TMV2	Plasmid	2647	Kanamycin
pHALscFv17-3A	Phagemid	2653	Ampicillin
TSWV - Pers. Komm. Edgar Maiss, basiert auf PV-0182 der DSMZ	Plasmid	3363	-
M13K07CbMV_C9	Plasmid	Noch nicht vergeben	Kanamycin
M13K07CbMV_C10	Plasmid	Noch nicht vergeben	Kanamycin
M13K07CbMV_A10	Plasmid	Noch nicht vergeben	Kanamycin

M13K07CbMV_C3	Plasmid	Noch nicht vergeben	Kanamycin
pHALscFvCMV	Phagemid	Noch nicht vergeben	Ampicillin

2.1.14 Desoxyribonukleosidtriphosphate

Tabelle 2.1-14 Konzentrationen der verwendeten Desoxyribonukleosidtriphosphate

Triphosphate	Bezeichnung	Konzentration Stammlösung	Konzentration Arbeitslösung
Desoxyadenosintriphosphat	dATP	100 mM	10 mM
Desoxycytosintriphosphat	dCTP	100 mM	10 mM
Desoxyguanosintriphosphat	dGTP	100 mM	10 mM
Desoxythymidintriphosphat	dTTP	100 mM	10 mM

2.1.15 Eingesetzte Phagenbibliotheken

Tabelle 2.1-15 Herkunft und Bindungsmolekül der verwendeten Phagenbibliotheken

Phagen / Phagenbibliothek	Vertriebspartner	Bindungsmolekül
Ph.D. TM -12 Phage Display Peptide Library Kit	New England Biolabs	Peptid (12-mer)
Ph.D. TM -C7C Phage Display Peptide Library Kit	New England Biolabs	Peptid (7-mer)
Human Single Fold scFv Libraries J (Tomlinson J)	MRC HGMP Resource Centre	scFv
Human Single Fold scFv Libraries I (Tomlinson I)	MRC HGMP Resource Centre	scFv
HAL9/10 scFv-Bibliotheken	IBB, Technische Universität Braunschweig	scFv

2.1.16 Verwendete Antikörper

Tabelle 2.1-16 Herkunft und Arbeitsverdünnungen der verwendeten Antikörper

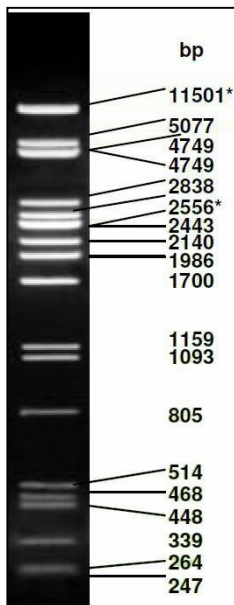
Antikörper	Arbeitsverdünnung	Produktnummer	Vertriebspartner
Anti-CbMV-IgG	1:200	07008	Loewe
Anti-CbMV-IgG-AP-Konjugat	1:200	07008	Loewe
Anti-CMV-IgG	1:200	07108	Loewe
Anti-CMV-IgG-AP-Konjugat	1:200	07108	Loewe
Anti-PPV-IgG	1:200	07186	Loewe
Anti-PPV-IgG-AP-Konjugat	1:200	07186	Loewe
Anti-PVY-IgG	1:200	07038	Loewe
Anti-PVY-IgG-AP-Konjugat	1:200	07038	Loewe
Anti-TMV-IgG	1:200	07042	Loewe
Anti-TMV-IgG-AP-Konjugat	1:200	07042	Loewe
Anti-TSWV-IgG	1:500	07501	Loewe
Anti-TSWV-IgG-AP-Konjugat	1:500	07501	Loewe
<i>Goat α-Mouse IgG HRP</i> (Fc-spezifisch)	1:1000	A0168	Sigma
<i>Goat anti-Rabbit IgG</i>	1:10000	A3687	Sigma
HRP/Anti-M13 monoklonales Konjugat	1:5000	27942101	GE Healthcare Life Sciences
<i>Mouse α-myc-tag (9E10)</i>	1:50		Arbeitsgruppe Hust
<i>Rabbit anti-fd</i>	1:8000	B7786	Sigma

2.1.17 Computersoftware und Internetdienste

Tabelle 2.1-17 Ein Überblick über die verwendete Computersoftware

Software/Dienst	Version	Anbieter
Basic Local Alignment Search Tool	Jahr 2011-2015	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Clustal X	2.1	European Bioinformatics Institute
ChromasPro 1.5	1.5	Technelysium
Gel Documentation	2002	Intas GDS
JCAT	2015	http://www.jcat.de/
Microsoft Office	2013	Microsoft
PepBank	Jahr 2015	http://pepbank.mgh.harvard.edu
ThermoScientific™ SkanIt™ Software	3.1	ThermoScientific
VectorNTI Advance®	11 (Demoversion)	Invitrogen, Life Technologies

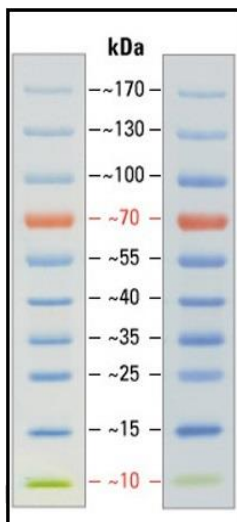
2.1.18 DNA- und Protein-Größenstandards



Für die Herstellung des DNA-Größenstandards wird die Lambda-Phagen-DNA bei 37 °C mit der Restriktionsendonuklease *Pst*I für drei Stunden verdaut.

Die durch den Verdau entstehenden Fragmente unterschiedlicher Größe sind in Abbildung 2.1-1 dargestellt. Sämtliche in dieser Arbeit angefertigten Agarosegele wiesen einen Agarosegehalt von 1 % (w/v) auf.

Abbildung 2.1-1 λ -*Pst*I DNA-Größenstandard von Fermentas, 1,5 %iges Gel



Der verwendete Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Marker (SM0671). Die Proteine und ihr Molekulargewicht sind in Abbildung 2.1-2 dargestellt.

Abbildung 2.1-2 Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Marker (SM0671)

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht der Versuchspflanzen

Die Versuchspflanzen werden im Gewächshaus auf dem Gelände der Universität, IGPS, Abteilung Phytomedizin bei einer Tagestemperatur von 21 °C und einer Nachttemperatur von 18 °C angezogen, wobei die Lichtphase von 6:00-22:00 Uhr vorliegt und eine Bestrahlungsstärke von 20 W/m² gewährleistet wird. Die Samen werden in Pflanzschalen ausgesät und in einer eigenen Anzuchtammer aufgezogen. Je nach Dichte und Größe der Sämlinge werden diese in weitere Pflanzschalen pikiert, später vereinzelt und unter den Anzuchtbedingungen in den Versuchskammern angezogen.

2.2.2 Erhaltung von Pflanzenviren durch mechanische Übertragung

Bei der Erhaltung von Pflanzenviren durch eine mechanische Übertragung wird in der Regel auf schon infiziertes Pflanzenmaterial zurückgegriffen und das Virus durch wiederholte mechanische Übertragung auf neue Wirtspflanzen bewahrt. Je nach Versuchsaufbau und Virus können die Testpflanzen dabei unterschiedlich alt sein. In dieser Arbeit werden häufig Pflanzen verwendet, die im Fünfblattstadium sind. In einem Mörser werden ein bis drei infizierte Blätter mit dem Inokulationspuffer, einer Spatelspitze Celite und einer Prise Aktivkohle homogenisiert. Danach wird das Homogenat vorsichtig mit einem Handschuh über die Blätter gerieben. Durch kleinste Verletzungen der Blattoberfläche, herbeigeführt durch die feinen Schalenbruchstücke fossiler Kieselalgen, gelangen die Viren in die Zellen. Die Aktivkohle bindet dabei störende, die Virusinfektion hemmende, Inhibitoren. Nach dieser Prozedur erfolgt eine Inkubationsphase von fünf Minuten, danach wird die restliche Suspension von den Blättern abgewaschen.

2.2.3 Trocknung von infiziertem Pflanzenmaterial mit Calciumchlorid

Die Trocknung von infiziertem Pflanzenmaterial mit Calciumchlorid ermöglicht eine langfristige Lagerung der infizierten Proben. Sie können in späteren Versuchen wieder mechanisch übertragen werden. Hierfür wird ein 50 ml Falcon-Gefäß bis zur 20 ml Markierung mit CaCl₂ befüllt. In solch einem Ansatz können mehrere virusinfizierte Blätter getrocknet werden. Damit ein direkter Kontakt zwischen Blattmaterial und CaCl₂ ausbleibt, wird das CaCl₂ durch eine Papierschicht abgedeckt. Das Gefäß wird geschlossen und mehrere Wochen bei 4 °C gelagert. In dieser Zeit wird dem Pflanzenmaterial durch das CaCl₂ Wasser entzogen. Nach der

Trocknung werden die Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und können bei Bedarf für Infektionen von Pflanzen verwendet werden.

2.2.4 Extraktion von Gesamtnukleinsäuren mit Silica-Partikeln

Für die Silica-Suspension werden 60 g Silica mit 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ versetzt und für 24 h inkubiert. Es werden 470 ml abgenommen und verworfen. Die Suspension wird mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 500 ml aufgefüllt. Nach 5 Stunden werden weitere 440 ml abgenommen und verworfen. Der pH-Wert der Suspension wird mit HCl auf pH 2 eingestellt. Aliquots werden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für den Nachweis der Viren in Pflanzenmaterial wird eine Gesamtnukleinsäure-Extraktion des Pflanzengewebes durchgeführt. Die verwendete Silica-Methode wurde 2001 entwickelt (Rott & Jelkmann 2001) und später modifiziert (Menzel *et al.* 2002). Das Virus wird nach der Extraktion in einer Reverse-Transkriptase-PCR nachgewiesen. Je nach Umgebungstemperatur während der Probenentnahme können die Blattproben in Stickstoff schockgefroren werden. Dies erhöht die Stabilität der Nukleinsäuren und vereinfacht die Homogenisation. Es werden mit dem Deckel eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes vier Blattstücke aus dem zu untersuchenden Gewebe ausgestanzt und auf Eis gekühlt. In das Reaktionsgefäß wird 1 ml RNA-Extraktionspuffer gegeben und das Gewebe mit einem Pistill gemörsert. Darauf folgend werden 100 μl SDS (10 %) in das Gemisch pipettiert und die Probe für 10 Minuten bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. In dieser Zeit werden die Proteine denaturiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wird die Suspension für 10 Minuten bei $11.500 \times g$ (MiniSpin) zentrifugiert. Während dieses Arbeitsschrittes wird ein weiteres Reaktionsgefäß mit 150 μl Ethanol (100 % und $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), 300 μl NaI-Lösung und 25 μl Silica-Suspension vorbereitet. 300 μl des Überstandes der Probe werden in die vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Es folgt eine 1 minütige Zentrifugation bei $2.500 \times g$. Der Überstand wird verworfen, während das Pellet in 500 μl RNA-Waschpuffer gelöst wird, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation und einer Wiederholung des Waschschrittes. Der Überstand wird abgenommen, so dass nur das Pellet verbleibt. Dieses wird in 150 μl TE-Puffer gelöst und für 4 Minuten bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach einem 3 minütigen Zentrifugationsschritt bei $11.500 \times g$ wird der Überstand mit den darin enthaltenen Nukleinsäuren in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

2.2.5 Synthese von *complementary* DNA (cDNA)

Nach der Extraktion von Gesamtnukleinsäuren können RNA-Sequenzen in einer reversen Transkriptase-PCR (RT-PCR) in sogenannte komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) umgeschrieben und später in einer PCR vervielfältigt werden. Die Synthese der cDNA aus der RNA erfolgt durch die Verwendung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der reversen Transkriptase, die erstmals 1970 nachgewiesen wurde ((Baltimore 1970) und (Temin & Mizutani 1970)). Es werden 1–3 µl des Gesamtnukleinsäureextrakts und 1 µl des Oligonukleotids für 3 Minuten bei 99 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und danach die spezifische Menge eines RT-Mixes hinzugegeben. Die reverse Transkription wird für eine Stunde in einem Thermocycler bei 42 °C durchgeführt. Danach kann die cDNA in einer PCR amplifiziert werden.

Tabelle 2.2-1 Die Komponenten in einer beispielhaften cDNA-Synthese (10 µl Gesamtansatz)

Reagenz	Einzusetzendes Volumen
5x RT-Puffer	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
RevertAid reverse Transkriptase (20 U/µl)	0,5 µl
Aqua _{bidest}	3-5 µl
Gesamtnukleinsäureextrakt	1-3 µl
Oligonukleotid (10 µM)	1 µl

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („*Polymerase chain reaction*“, PCR) ist eine Methode, um DNA mit Hilfe einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase und spezifischen Oligonukleotiden zu amplifizieren oder zu modifizieren, die 1983 von Mullis erfunden wurde (Saiki *et al.* 1988). In dem ersten der drei wesentlichen Schritte, der Denaturierungsphase, wird die DNA auf 95-99 °C erhitzt. Die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Strängen lösen sich im Folgenden auf und die DNA wird in ihre Einzelstränge getrennt. In der nächsten Phase (Hybridisierung) lagern sich die spezifischen Oligonukleotide bei gezielt angepassten Temperaturen zwischen 45 °C und 65 °C an die komplementären Stellen der DNA-Einzelstränge an. In der Elongationsphase wird die Temperatur auf 72 °C erhöht. Die DNA-abhängigen DNA-Polymerasen beginnen an den Oligonukleotiden mit der Anlagerung der komplementären Basen in der 5' > 3'-Richtung, wobei ein neuer DNA-Doppelstrang gebildet wird. Diese drei Phasen werden in Abhängigkeit der gewünschten Menge an DNA zwischen

25-35 mal wiederholt. Als Enzym wird in dieser Arbeit die Phusion Flash™ High Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes) verwendet, die eine „proofreading“ Funktion beinhaltet. Dadurch werden falsch eingebaute Nukleotide erkannt und können durch das korrekte Nukleotid ersetzt werden. Außerdem erzeugt diese Polymerase keine A-Überhänge in den PCR Fragmenten. In dieser Arbeit wird die PCR neben dem Nachweis von Pflanzenviren auch für gerichtete Mutagenesen und die Erzeugung spezifischer PCR-Fragmente für die gerichtete Klonierung verwendet. PCR-Fragmente können in einer Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Größe untersucht werden (siehe 2.2.7).

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

In einer Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach dem Anlegen einer Spannung der Größe nach aufgetrennt und in einem weiteren Schritt durch Einlagerung eines Farbstoffs mittels UV-Anregung sichtbar gemacht. Die negativ geladene DNA wird durch das elektrische Feld durch die Gelmatrix zur Anode gezogen. Es kommt zu einer Auftrennung der verschieden großen DNA-Fragmente, da sich kleinere Fragmente schneller durch die Gelporen bewegen können, als die größeren Fragmente. Die PCR-Proben werden mit einem Fünftel ihres Volumens mit DNA-Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen gegeben und die Elektrophorese durch das Anlegen einer Spannung (80-115 V für 15-20 Minuten) gestartet. Während dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Färbemethoden für die Visualisierung der DNA-Fragmente verwendet, die jeweilige Methode wird in dem Ergebnissteil an den Abbildungen vermerkt. In beiden Fällen wird ein Farbstoff eingesetzt, der in die DNA interkaliert und Licht unter UV-Strahlung emittiert. Diese Signale können dann mit einer Kamera aufgenommen werden. Spezifische Banden können nachträglich aus dem Gel extrahiert werden. Für die Bestimmung der Größen wird zusätzlich ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Bei der ersten Methode wird der Gellösung, nachdem sie handwarm abgekühlt wurde, 1,2 µl einer Ethidiumbromidlösung (7,5 mg/ml in H₂O_{bidest}) hinzugegeben. Ethidiumbromid wurde im Laufe der Arbeit in der Arbeitsgruppe jedoch durch *GelRed* der Firma *Biotium Inc.* ersetzt. Hier wird der Farbstoff der Probe vor dem Auftragen direkt mit dem Ladepuffer zugesetzt. Mit *GelRed* versetzte DNA-Proben weisen jedoch Veränderungen im Migrationsverhalten in Agarosegelen bei der elektrophoretischen Auftrennung in Abhängigkeit der DNA- und *GelRed*-Konzentration auf (Huang *et al.* 2010), so dass eine Sequenzierung notwendig sein kann, um eine eindeutige Bestimmung durchführen zu können.

2.2.8 DNA-Extraktion aus Agarosegelen (Quantum-Reinigung)

Werden Banden aus den Agarosegelen ausgeschnitten, muss die darin enthaltene DNA für eine weitere Verwendung erst aus der Gelmatrix gelöst werden. Das Fragment wird mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten und in einem Reaktionsgefäß für die weitere Verarbeitung verwahrt. In das Gefäß wird 600 µl Quantum Bindungspuffer gegeben und das Gelstück dann auf einem Heizblock bei 50 °C geschmolzen. Nach der Zugabe von 10 µl Quantummatrix wird die Probe invertiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt ein Zentrifugationsschritt für 30 Sekunden bei 11.300 $x g$ (MiniSpin). Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 500 µl Quantum Waschpuffer gewaschen. Die Zentrifugation und der Waschschrift werden ein weiteres Mal wiederholt. Die restliche Lösung wird abgenommen und das Pellet in einem Heizblock für 5-10 Minuten getrocknet. Danach wird das Pellet in 25 µl EB-Puffer gelöst und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem Schritt wird die Nukleinsäure von der Quantum Matrix eluiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 11.300 $x g$ für 30 Sekunden werden 20 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und können bei -20 °C gelagert werden.

2.2.9 DNA-Extraktion aus Agarosegelen mit dem NucleoSpin® Extract II Kit

Das Zielfragment wird mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Für je 100 mg Agarose Gel werden 200 µl NT-Puffer hinzugegeben und die Probe wird für 5-10 min bei 50 °C und unter leichtem Schütteln inkubiert und gelöst. Die NucleoSpin® Extract II Säule wird in ein „*collection tube*“ gesetzt und mit der Probe beladen. Danach wird es für 1 Minute bei 11.000 $x g$ (MiniSpin) zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die NucleoSpin® Extract II Column wieder in das „*collection tube*“ gehängt. 700 µl an Puffer NT3 werden auf die Säule gegeben und in einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 11.000 $x g$ für 1 Minute zentrifugiert. Ein weiteres Mal wird der Durchfluss verworfen und die Probe für 2 Minuten bei 11.000 $x g$ zentrifugiert, um den Puffer komplett von der Säule zu entfernen. Für die Elution der DNA aus der Membran wird die NucleoSpin® Extract II Säule in einem neuen Reaktionsgefäß mit 25 µl NE-Puffer versetzt. Nach einer 1 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur kann die Probe bei 11.000 $x g$ für 1 Minute zentrifugiert werden. Der Durchfluss enthält das Zielfragment und kann bei -20 °C gelagert werden.

2.2.10 Reinigung von PCR-Produkten oder Plasmiden mit SureClean (Bioline)

Um möglicherweise störende Bestandteile in Plasmidextraktionen oder eluierten PCR-Produkten zu entfernen, können diese nachträglich gereinigt werden. Dazu wird SureClean von der Firma Bioline verwendet. Es werden 10 oder 20 µl der DNA-Suspension 1:1 mit SureClean vermischt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 10 Minuten bei 11.500 x g (MiniSpin) zentrifugiert. Das Pellet wird mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen und danach erneut bei 11.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wird gründlich entfernt und das Pellet luftgetrocknet. Es wird danach in 20 µl Elutionspuffer aufgenommen.

2.2.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung ausgewählter Plasmide oder PCR-Produkte erfolgt durch den DNA-Serviceanbieter *Sequence Laboratories Göttingen* (Seqlab). Für diese Arbeit wurden dabei zwei verschiedene Methoden der Probenvorbereitung verwendet, da die Firma ihre Arbeitsmethodik umstellte. Bis zu dieser Umstellung wurden 5 µl der mit Sure Clean gereinigten DNA mit 2 µl spezifischem Sequenzieroligonukleotid in einem kleinen Reaktionsgefäß vermischt, beschriftet und nach der Anmeldung eingeschickt. Zurzeit (Jahr 2015) setzten sich die Proben aus 3-6 µl der zu sequenzierenden DNA, 3 µl Sequenzieroligonukleotid und 6-9 µl H₂O_{bidest} in einem Gesamtvolumen von 15 µl zusammen.

2.2.12 Phosphorylierung und Ligation von gereinigten PCR-Fragmenten

Wenn ein durch einen Restriktionsverdau vorbereitetes DNA-Fragment in einen präparativ verdauten Vektor eingefügt werden soll oder lineare Plasmide wieder zirkularisiert werden müssen, ist eine Ligation essenziell. Bei den in dieser Arbeit gewählten Oligonukleotiden ist es zusätzlich notwendig, die 5'-Enden der zu ligierenden PCR-Fragmente vor der eigentlichen Ligation zu phosphorylieren. Es werden 7 µl des gereinigten Fragments mit 9 µl H₂O_{bidest} vermischt und in einem Wasserbad für 10 Minuten bei 70 °C erwärmt. Danach werden die Proben sofort auf Eis abgekühlt. Zur Phosphorylierung werden 2 µl 10 x Ligase Puffer, 1 µl 10 mM ATP und 1 µl T4 Kinase (entspricht 10 U) in den Mix gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Für die Ligation werden zu 8 µl der phosphorylierten DNA 1 µl H₂O_{bidest} und 1 µl T4 Ligase (entspricht 5 U) gegeben und der Mix über Nacht bei 4 °C inkubiert. In der Ligrationsreaktion katalysiert das Enzym die Inkorporation des Fragments in den Vektor, es entstehen durch die Verknüpfung der 5'-Phosphatreste mit den 3'-Hydroxylresten von Vektor und Fragment stabile Phosphordiesterbindungen.

2.2.13 *Gibson Assembly* – eine isothermale Rekombinationsmethode

Das *Gibson Assembly* ermöglicht es, DNA-Fragmente ohne vorhergehende Spaltungen zu assemblieren (Gibson 2009). Die dabei aneinanderzufügenden DNA-Fragmente benötigen für eine erfolgreiche Reaktion überlappende DNA-Sequenzen mit einer Länge von 20-40 bp, die in einer PCR zu dem Insert durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide hinzugefügt werden. In der folgenden isothermalen Reaktion werden drei enzymatische Reaktionen parallel katalysiert. Eine Temperatur-sensitive Exonuklease verdaut die 5'-Enden der doppelsträngigen Nukleinsäuren, es entstehen somit an beiden Fragmenten 3'-ssDNA-Überhänge. Die einzelnen Stränge lagern sich im Folgenden in ihren komplementären Überlappungsbereichen des 3'-Endes aneinander. Das Reaktionsgemisch wird auf 50 °C erwärmt und die Exonuklease inaktiviert. Eine DNA-Polymerase verlängert in einer zweiten Reaktion die 3'-Enden des zusammengelagerten Fragmentes. Offene Phosphordiesterbindungen werden dann durch eine Ligase geschlossen und beide Stränge miteinander verbunden. Die assemblierten DNA-Moleküle können direkt in weitere PCRs oder eine Transformation eingesetzt werden (Gibson 2009).

2.2.14 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*

Die in dieser Arbeit durchgeführten Transformationen von *E. coli* erfolgen nach der Hitzeschock-Methode (Hanahan 1983) mit Calciumchlorid und Rubidiumchlorid. Die Plasmid-DNA lagert sich dabei während einer Inkubation auf Eis an die Zellwände der kompetenten Bakterien an. Diese nehmen die DNA durch kurzes Erhitzen in einem Wasserbad auf. Bevor die Bakterien jedoch verwendet werden, müssen sie in die Lage versetzt werden, fremde DNA aus der Umgebung aufnehmen zu können. Erst diese kompetenten Zellen können für die Transformation eingesetzt werden. Es werden die gewünschten Bakterienstämme (z.B. NM522) auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Es werden Einzelkolonien abgenommen und in 1 ml SOB resuspendiert. Danach erfolgt eine Überführung in einen 2 Liter Erlenmeyer-Kolben mit 30 ml SOB und 300 µl 2 M Mg²⁺. Die Bakterien werden bei 37 °C auf einem Schüttler mit 250 rpm bis zu einer optischen Dichte von OD_{550nm} = 0,45-0,55 angezogen. Die Suspension wird in ein steriles 25 ml Polycarbonatröhrchen gegeben und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Für weitere 10 Minuten werden die Bakterien bei 1.000 rpm (Heraeus Swing Out) und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml Transformationspuffer (TFB) gelöst und erneut auf Eis abgekühlt. Es folgt eine Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen, danach kann das Pellet in 4 ml

Transformationspuffer und 140 µl DND-Puffer aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis inkubiert werden. Nach der Zugabe von weiteren 140 µl DND-Puffer und einer erneuten Inkubation auf Eis für 15 Minuten, können die kompetenten Zellen für die Transformation eingesetzt werden. Je nach Bedarf können 50-200 µl der kompetenten Zellen auf einen Ligationsansatz gegeben werden. Es folgt ein Inkubationsschritt für 30 Minuten auf Eis. Danach erfolgt die eigentliche Transformation durch den Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C in einem Wasserbad. Die Bakterien werden danach sofort für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Es werden 800 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Bakterien danach bei 37 °C für 60 Minuten und 200 rpm inkubiert. Abschließend werden 100 µl der Bakteriensuspension auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 28 °C (für Volllängeklone) oder 37 °C inkubiert.

2.2.15 Herstellung und Transformation kompetenter *R. radiobacter*

Die Bakterien (GV2260) werden auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und anschließend für 48 Stunden bei 28 °C inkubiert. Danach werden Einzelkolonien entnommen und in 20 ml flüssiges LB-Medium angeimpft. Es findet eine erneute Inkubation bei 28 °C und leichtem Schütteln über Nacht bei 200 rpm statt. 10 ml der Übernachtskultur werden in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit 500 ml LB-Medium überführt und wiederum bei 28 °C und leichtem Schütteln bis zu einer $OD_{600} = 0,5-0,8$ für etwa 3-4 Stunden inkubiert. Die Zellen werden in zwei kalte Sorvallbecher gleichmäßig überführt. Dann werden die beiden Becher in einem Festwinkelrotor (RC-5C) bei $2.500 \times g$ für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgossen und die Sorvallbecher mit dem Pellet auf Eis gekühlt. Das Pellet wird in 100 ml kaltem 1 mM HEPES resuspendiert und anschließend erneut für 15 Minuten bei $2.500 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum verworfen und die Sorvallbecher auf Eis gestellt. Danach wird das dabei entstandene Pellet ein zweites Mal in 100 ml kaltem HEPES resuspendiert und für 15 Minuten bei $2.500 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Sorvallbecher auf Eis gestellt. Der restliche Überstand wird vorsichtig abgenommen. Das Pellet wird in 10 ml kaltem Glycerol (10 % (v/v)) resuspendiert und in ein kleines Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wird es für weitere 15 Minuten bei $2.500 \times g$ zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Zentrifugenröhrchen auf Eis gestellt. Das Pellet wird in 1 ml kaltem Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 40 µl in eisgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Bei der anschließenden Elektroporation werden mit Hilfe eines Stromstoßes Mikroperforationen in den Membranen der Bakterien erzeugt, durch die Fremd-DNA beziehungsweise Plasmide

aufgenommen werden können. Es werden 40 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Darauf folgt eine Inkubation für 1 Minute auf Eis. Nachdem die Küvetten in den Elektroporator eingesetzt wurde, kann der elektrische Impuls von 1440 V für 4 Millisekunden ausgelöst werden. Die nachträgliche Zugabe von 1 ml SOC-Medium ermöglicht es den Bakterien, ihre Membranen während einer Inkubationszeit von 3 - 4 Stunden bei 28 °C unter leichtem Schütteln (250 rpm) zu regenerieren. Nach der Inkubationszeit werden 100 µl der Bakterienlösung auf einer LB-Agarplatte mit den gewünschten Antibiotika ausplattiert. Wenn diese nach ca. 48 Stunden gewachsen sind, können einzelne Kolonien abgenommen und verwendet werden.

2.2.16 Herstellung von Dauerkulturen

Oft werden Plasmide, die in Bakterien transformiert wurden, häufiger benötigt. Im Fall von Expressionsklonen oder Volllängeklonen von Pflanzenviren bietet es sich an, Dauerkulturen der Bakterien für eine längere Lagerung anzulegen. Dazu werden die Bakterien in Selektivmedium angeimpft und über Nacht bei 250 rpm angezogen. Anschließend werden 850 µl der Bakteriensuspension und 150 µl Glycerin (87 %) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt und für 30 Minuten inkubiert. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

2.2.17 Plasmid-Minipräparation aus *E. coli* und *R. radiobacter*

Häufig müssen die in den Bakterien vermehrten Plasmide wieder extrahiert werden, sei es um Restriktionsverdau durchzuführen, reine Plasmid-DNA für weitere Versuche zur Verfügung zu haben oder um die Plasmide lagern zu können. Je nach Verwendungszweck können die Plasmide aus *E. coli* oder *R. radiobacter* extrahiert werden. Die beiden Methoden unterscheiden sich dabei in nur wenigen Schritten. Es werden im Folgenden einzelne Bakterienkolonien von ihren LB- Platten genommen und in flüssigem LB mit dem jeweiligen Antibiotikum angeimpft. Sie inkubieren bei 200 rpm, je nach Vektor bei 37 °C für fünf Stunden (pJET1.2 *blunt cloning vector*-Vektor, T-Vektor, Phagemid) oder bei 28 °C über Nacht (pCB-Vektor, Phagemid).

Die folgenden ersten Arbeitsschritte sind dabei nur für die Extraktion aus *R. radiobacter* gültig. Die Bakteriensuspension wird in 2 ml Reaktionsgefäße umgefüllt. Die eigentliche Plasmidextraktion beginnt mit einer 90 sekundigen Zentrifugation bei 11.500 \times g (MiniSpin). Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 1 ml 1 M NaCl resuspendiert. Dieser Waschschritt wird wiederholt und soll verhindern, dass die Plasmid-DNA zu stark verunreinigt ist. Die nachfolgenden Arbeitsgänge sind bei beiden Extraktionen gleich. Die

Bakteriensuspension wird in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 90 Sekunden bei $11.500 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 200 μl Lösung A gelöst und anschließend mit 400 μl Lösung B versetzt. Beide Lösungen führen zu einer alkalischen Lyse der Bakterien. Das 10 mM EDTA in Lösung A geht dabei eine Verbindung mit zweiwertigen Kationen wie zum Beispiel Mg^{2+} und Ca^{2+} ein. Die Kationen sind für die Stabilität der Zellwand wichtig, die nach der Komplexbildung zerstört wird. Anschließend werden die Bakterien durch das in Lösung B befindliche SDS und NaOH lysiert, so dass die Zellinhaltsstoffe austreten können. Durch die Zugabe von 300 μl Lösung C (3 M NaAc) fallen die chromosomale DNA und Proteine, die einen Komplex mit SDS und den Kalium-beziehungsweise Natriumionen bilden und zum größten Teil an den Zelltrümmern gebunden sind, aus. Die Probe wird vorsichtig invertiert. Es folgt eine 30 minütige Inkubation der Probe auf Eis und eine anschließende Zentrifugation bei $11.500 \times g$ für 10 Minuten. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wieder zentrifugiert. Durch die Zugabe von 600 μl Isopropanol ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) zu dem Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß wird die Plasmid-DNA nach Durchmischung und Zentrifugation für zehn Minuten bei $11.500 \times g$ gefällt. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 200 μl Lösung D resuspendiert. Nach der Zugabe von 400 μl kaltem Ethanol (100%) wird die Suspension bei $11.500 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand danach gründlich entfernt. Danach kann das Präzipitat im Vakuumtrockner für 10-15 min getrocknet werden. Abschließend wird die Plasmid-DNA in 80 μl TE-RNase (10 μl in 10 ml TE-Puffer) aufgenommen und kann bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

2.2.18 Inokulation von *N. benthamiana* mit *R. radiobacter*

Für eine Inokulation von *N. benthamiana* wird *R. radiobacter* (ehemals: *Agrobacterium tumefaciens*) auf LB-Platten mit Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausgestrichen und für 1-2 Tage bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Einzelne Kolonien werden gepickt, in 30 ml LB-Kanamycin-Medium überführt und für 14-20 Stunden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ und 250 rpm inkubiert. Bei einer $\text{OD}_{600} \sim 1$ werden jeweils 2 ml der Bakteriensuspension in Reaktionsgefäße überführt, bei $11.500 \times g$ (Minispin) für eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 2 ml Inokulationspuffer gelöst und unter gelegentlichem Schütteln zur Induktion des *vir*-Gens für 2-3 Stunden inkubiert. Es werden 2 ml der Suspension in eine nadellose Spritze aufgezogen und danach direkt in die Unterseite der Laubblätter inokuliert.

2.2.19 Expression rekombinanter Virushüllproteine mit den pQE_30 Vektoren

Für die Erstellung rekombinanter Virushüllproteine werden im Fall des TMV, TSWV, PPV und PVY auf Plasmide mit infektiösen Volllängeclonen zurückgegriffen. Über Oligonukleotide und eine folgende PCR werden die spezifischen Restriktionsschnittstellen für die spätere gerichtete Klonierung in die Expressionsvektoren zu den Sequenzen der Hüllproteine hinzugefügt. Das Hüllproteingen des CMV wird durch eine RT-PCR einer Gesamtnukleinsäureextraktion einer mit CMV infizierten Pflanze amplifiziert. Auch hier werden die Restriktionsschnittstellen während der PCR hinzugefügt. Die PCR-Fragmente werden mit Restriktionsenzymen geschnitten, gereinigt und, nachdem der Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geöffnet wurde, gerichtet kloniert (siehe Tabelle 2.2-2). Nach der Transformation in *E. coli* Stamm NM522 werden die Plasmide gereinigt und durch eine Sequenzierung überprüft. Die Expressionsvektoren mit einer vollständigen und korrekten DNA-Sequenz des rekombinanten Proteins in der „multiple cloning site“ werden in den *E. coli* Expressionsstamm M15 transformiert

Tabelle 2.2-2 Herstellung der Expressionsvektoren in pQE_30

Hüllprotein	Verwendete Oligonukleotide	Verwendete Restriktionsendonukleasen	Ausgangsplasmid
CMV	2876 / 2877	<i>Bam</i> HI / <i>Pst</i> I	-
TMV	2882 / 2883	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	p1922
TSWV	2884 / 2885	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	p3363
PPV	2880 / 2881	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	p2161
PVY	2945 / 2878	<i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III	p1415

Dieser Stamm wird von Qiagen bezogen und beinhaltet zusätzlich das pREP Plasmid, das eine Kanamycin Resistenz vermittelt. Für die Expression der Proteine werden 10 µl einer *E. coli* Dauerkultur über Nacht in 20 ml LB + Ampicillin (100 µg/ml) + Kanamycin (25 µg/ml) bei 37 °C und 250 rpm angezogen. Es werden 50 ml vorgewärmtes Medium (Ampicillin (100 µg/ml) + Kanamycin (25 µg/ml)) mit 2,5 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ = 0,6 erreicht ist. Die Expression wird durch die Zugabe von IPTG zu einer finalen Konzentration von 1 mM induziert. Die Kulturen werden für weitere 4-5 Stunden bei 37 °C und unter leichtem Schütteln von 250 rpm inkubiert. Durch eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 4.000 x g (Sorvall RC-5C) werden die Zellen geerntet. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bei -20 °C eingefroren. Sobald die Proteine gereinigt

werden sollen, wird das Pellet mit 1 ml Expressionspuffer B für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln auf einer Vortex-Platte inkubiert. Die Lysate werden bei 13.000 rpm (MiniSpin) für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Ni-NTA Säulen werden mit 600 µl Expressionspuffer B equilibriert und die Säulen danach für 2 Minuten bei 2.000 rpm zentrifugiert. 600 µl des Überstandes aus dem neuen Reaktionsgefäß werden auf eine der vor-equilibrierten Ni-NTA Säulen gegeben und danach bei 2.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Die Säulen werden mit 600 µl des Expressionspuffers C gewaschen und wieder für 2 Minuten bei 2.000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird wiederholt. Danach kann das Protein von der Säule eluiert werden, indem 200 µl Expressionspuffer E auf die Säule pipettiert werden und diese danach für 2 Minuten bei 2.000 rpm zentrifugiert wird. Dieser Schritt wird danach ein weiteres Mal wiederholt. Das Eluat kann bei -20 °C eingefroren werden.

2.2.20 Expression rekombinanter Virushüllproteine mit den pRSET A Vektoren

Für die Erstellung rekombinanter Virushüllproteine werden im Fall des CMV, TMV, TSWV, PPV und PVY auf die pQE-30-Vektoren mit den Hüllproteinsequenzen zurückgegriffen. Sie werden durch die in Kapitel 2.2.19 erwähnten Restriktionsschnittstellen gespalten und in die an den spezifischen Stellen geöffnete MCS der pRSET A Vektoren kloniert. Die CbMV-CP Sequenz wird an dem Plasmid p2448_17 mit den spezifischen Oligonukleotiden 4207 und 4208 amplifiziert. Durch die beiden Oligonukleotide werden die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI hinzugefügt, die eine gerichtete Klonierung in den pRSET Vektor ermöglichen. Nach der Transformation in den *E. coli* Stamm NM522 werden die Plasmide gereinigt und durch eine Sequenzierung überprüft. Die Expressionsvektoren mit einer vollständigen und korrekten DNA-Sequenz des rekombinanten Proteins in der „multiple cloning site“ werden in den *E. coli* Stamm BL21-Gold (DE3) transformiert. Für die Expression der Proteine werden 10 µl einer *E. coli* Dauerkultur über Nacht in 20 ml LB + Ampicillin (100 µg/ml) bei 37 °C und 250 rpm angezogen. Es werden 50 ml vorgewärmtes Medium + Ampicillin (100 µg/ml) mit 2 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bis eine $OD_{600} = 0,6$ erreicht ist. Die Expression wird durch die Zugabe von IPTG zu einer finalen Konzentration von 1 mM induziert. Die Kulturen werden für weitere 4 Stunden bei 37 °C und unter leichtem Schütteln von 250 rpm inkubiert. Interessanterweise ist es in der Kombination aus Bakterienstamm und Plasmid nicht zwangsweise notwendig, eine Induktion mit IPTG durchzuführen, die Expression ist auch ohne diese Zugabe möglich (Sarabipour *et al.* 2014). Durch eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 4.000 $\times g$ Sorvall (RC-5C) werden die Zellen

geerntet. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bei -20 °C eingefroren. Die Aufreinigung erfolgt wie in Kapitel 2.2.19 über den His-Tag der exprimierten Protein.

2.2.21 Reinigung von TMV durch Ammoniumsulfatfällung

Virusreinigungen bilden die Grundlage für die Gewinnung von Antigenen zur Immunisierung oder für den Einsatz als Zielmolekül im Biopanning. In dieser Arbeit wird eine Grobreinigung des TMV im Biopanning eingesetzt (Gooding Jr & Hebert 1967). Von infiziertem Blattmaterial werden 5 g in 10 ml 300 mM Na_2HPO_4 homogenisiert und danach durch ein Mulltuch gepresst, um grobe Pflanzenreste zu entfernen. Das Filtrat wird in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 60 °C für 10 Minuten in einem Wasserbad inkubiert. Das Extrakt wird unter fließendem Leitungswasser abgekühlt und bei $2.500 \times g$ zentrifugiert (SS34; RC-5C). Der Überstand wird in einen Messzylinder überführt und das Volumen bestimmt. Es werden im Folgenden 2,5 g Ammoniumsulfat pro 10 ml Extrakt schrittweise zugesetzt und vorsichtig gelöst. Danach erfolgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten und eine Zentrifugation bei $12.000 \times g$ (SS34; RC-5C) für 20 Minuten. Der Überstand kann verworfen werden und das Pellet wird in deionisiertem Wasser (1/5 des Originalvolumens) aufgenommen. Die Suspension wird über Nacht gegen Leitungswasser dialysiert und kann danach bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.2.22 Chloroform/Butanol Fällung zur Aufreinigung von Pflanzenviren

Das folgende Protokoll gilt am *Plant Research International* (PRI) Institut in Wageningen als Basisprotokoll für die Aufreinigung für unbekannte Viren und wurde von Prof. Dr. ir. Rene van der Vlugt zur Verfügung gestellt. Bei bekannten Viren können die Puffer und andere Verfahren innerhalb der Prozedur angepasst werden. Es werden 300-500 mg Blattmaterial unter der Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemahlen. Es werden 2 ml Homogenisationspuffer hinzugegeben und mit dem Pulver vermischt. Das Gemisch wird in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 Minute bei 13.400 rpm (MiniSpin) zentrifugiert. Vom Überstand wird 1 ml mit 250 μl Chloroform und 250 μl Butanol versetzt und das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert. Es erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 13.400 rpm für 10 Minuten. Die obere Phase wird abgenommen und mit 500 μl einer PEG/NaCl Lösung (24 %/6,9 %) vermischt. Nach einer Inkubation auf Eis für 1 Stunde wird die Suspension für 20 Minuten bei 13.400 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 200 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen. Um Reste des PEG zu entfernen, sollte die Lösung für 10 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand mit den Viren kann für die weiteren Versuche verwendet werden.

2.2.23 Proteinkonzentrationsbestimmungen mit BCA und Roti®-Quant

Roti®-Quant, basierend auf Bradford (Bradford 1976)

Es werden 5 µl Probe und 795 µl H₂O_{bidest} und 10 µl Probe mit 790 µl H₂O_{bidest} vermischt. Für den Nullwert wird ein 1X Probenpuffer (800 µl H₂O_{bidest}) ohne Probe verwendet. Zusätzlich wird ein Standard angesetzt, der jeweils aus 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml und 25 µg/ml BSA besteht. Zu den Proben, dem 1X Probenpuffer beziehungsweise den 800 µl des jeweiligen Standards werden 200 µl der 5X-Färbelösung (Roti®-Quant) hinzugegeben und die Lösung dann mehrmals invertiert. Nach 30 minütiger Inkubation wird die OD₅₉₅ der Eichproben und der Proben gegen den Nullwert gemessen. Die Proteinmenge kann anhand der Eichgerade bestimmt werden.

BCA (Bicinchoninsäure)

Es zeigte sich, dass bei der Konzentrationsbestimmung nach Bradford Probleme durch den Expressionspuffer E (8 M Urea, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-Cl (pH 4,5)), in dem die exprimierten Proteine aufbewahrt wurden, auftraten. Es wurde in diesem Fall auf das „BCA Protein Micro Assay Kit“ (Kat.-Nr.39229) von SERVA zurückgegriffen, das auf der Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure basiert. Es werden 500 µl H₂O_{bidest}, Referenzlösungen (BSA als Eichprotein in verschiedenen Konzentrationen: 20, 15, 10, 5, 2,5 und 1 µg/ml) und die Proteinproben in Reaktionsgefäßen vorgelegt. Danach wird die Reaktion durch die Zugabe von 500 µl BCA-Arbeitslösung (BAL) gestartet. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C werden die Proben auf Raumtemperatur gekühlt und die Absorption bei 562 nm gegen Wasser als Referenz gemessen. Danach wird die Kalibrationskurve unter Berücksichtigung der Blindwerte zur Ermittlung der Proteinkonzentration erstellt und die Konzentrationen errechnet.

2.2.24 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für den Nachweis und die Visualisierung von Proteinen (zum Beispiel: exprimierte Proteine in Expressionsstudien oder Hüllproteine von Viren in infizierten Pflanzen) haben sich Polyacrylamidgele zu einem wichtigen Trennmedium bei der analytischen Elektrophorese entwickelt. Analog zu dem Nachweis von Nukleinsäuren in Agarosegelen erfolgt die Trennung in einem Gel, das durch einen Molekularsieb-Effekt die Mobilität von Proteinen selektiv herabsenken kann. Kleine negativ geladene Moleküle lassen sich zum Beispiel am schnellsten in Richtung der positiv geladenen Anode auftrennen. Für die Herstellung der Gele werden Acrylamidmonomere in Gegenwart eines Quervernetzers radikalisch polymerisiert, um ein geeignetes Netzwerk zu erhalten. Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird in dieser Arbeit das Rotiphorese® Gel 30, eine gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige, 30 %ige Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1 von Roth© eingesetzt, wobei das Bisacrylamid als Quervernetzer wirkt (Berg *et al.* 2012). Für die Initialisierung der Kettenreaktion eignen sich 10 %iges (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator. Sobald das Gel polymerisiert ist, kann es in die Elektrophoresekammer (Hofer Mighty Small II) überführt werden. In die obere Pufferkammer wird der Kathodenpuffer gegeben, während die untere Pufferkammer mit dem Anodenpuffer befüllt wird. Es werden zwischen 15-20 µl der Probe mit der gleichen Menge SDS-Probenpuffer versetzt und 25 bis 40 µl der Probe in die Taschen pipettiert. Der Marker setzt sich aus 6 µl des „Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Markers (SM0671)“ und 10 µl PAGE-Ladepuffer zusammen. Die Elektrophoresekammer wird an das Netzgerät angeschlossen und bei 80 V betrieben. Sobald sich die Proben im Gel befinden, kann die Spannung auf 120 V erhöht werden. Die Elektrophorese wird nach 3-4 Stunden angehalten. Proteine in klaren, durchsichtigen Polyacrylamidgelen lassen sich über diverse Methoden anfärben und somit visualisieren. In dieser Arbeit werden die Gele in eine Coomassie Färbelösung überführt, in der sie zwischen 20 und 60 Minuten inkubieren. Die Gele werden danach über Nacht in einer Coomassie-Entfärbelösung entfärbt.

2.2.25 Biopanning mit den „Ph.D.TM Phage Display Libraries“

Das Ph.D.TM System basiert auf einem M13 Phagen Vektor, der modifiziert wurde, um kleinere Peptide als N-terminale Fusionen mit dem Hüllprotein pIII zu präsentieren. Jedes der fünf Proteine trägt dabei diese Fusion, im Gegensatz zu anderen Fusionssystemen wie zum Beispiel mit den scFvs, haben diese kurzen Peptide keinen negativen Einfluss auf die Effektivität der Infektion. *New England Biolabs* bietet neben dem reinen Vektor M13KE, drei verschiedene vorgefertigte Bibliotheken an, die als Fusion entweder aus linearen 7-meren (Ph. D.-7) oder 12-meren (Ph. D.-12) bestehen oder eine zirkuläre Struktur aufweisen (Ph. D.-C7C), da die umgebenden Cysteine eine Disulfidbrücke bilden. Der Hersteller sichert für alle Bibliotheken Umfänge von 10^9 unabhängigen Klonen zu, die in den einzelnen Biopannings jeweils in hundertfacher Anzahl eingesetzt werden.

Die folgende Methode wird nach der Anleitung von *New England Biolabs* bezüglich des *Biopannings* mit den „Ph.D.TM Phage Display Libraries“ beschrieben.

Tag 1: Die Proteinlösung mit dem Zielprotein wird auf eine Konzentration von 100 µg/ml im „*coating buffer*“ verdünnt. Es werden 150 µl dieser Lösung in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben und danach leicht geschüttelt. Die Platten werden über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln (50 rpm) inkubiert. Dabei sollte sie sich in einem befeuchteten Behältnis befinden, damit die Vertiefungen nicht austrocknen können.

Tag 2: Es werden 10 ml Medium (LB-Medium mit Tetracyclin (20 µg/ml)) mit dem Bakterienstamm ER2738 angeimpft. Diese Kultur wird später verwendet, um den Titer der Phagensuspension bestimmen zu können. Wenn die eluierten Phagen noch am gleichen Tag amplifiziert werden sollen, dann werden außerdem 20 ml des Mediums in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit ER2738 angeimpft. Beide Kulturen werden in einem Inkubationsschrank bei 200 rpm und 37 °C angezogen, die 20-ml Kultur darf bei einer $OD_{600} = 0,01-0,05$ verwendet werden. Die Proteinlösung wird aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte entfernt. Die Vertiefungen werden mit 400 µl Blocklösung befüllt und für mindestens 1 Stunde bei 4 °C geblockt. Nach dieser Zeitspanne wird die Blocklösung ausgeklopft und die Platten danach mit TBST (Waschpuffer (TBS + 0,1% Tween-20 [v/v])) 6-mal ausgewaschen. Nach jedem Waschgang wird die Lösung vorsichtig auf einem sauberen Papiertuch ausgeschlagen. Eine 100-fache Repräsentation der Bibliothek wird in 100 µl TBST verdünnt und in die Vertiefung pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird dann für 60 Minuten unter leichtem Schütteln (50 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Nichtbindende Phagen werden mit der Flüssigkeit im Folgenden auf einem sauberen Papiertuch ausgeschlagen. Die Platten werden

10-mal mit TBST gewaschen. Gebundene Phagen können mit 100 µl des Elutionspuffers eluiert werden. Die gebundenen Phagen in den Vertiefungen werden mit dem Elutionspuffer für 20 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert und das Gemisch dann in ein neues Gefäß überführt. Um den Elutionspuffer zu neutralisieren, werden 15 µl 1 M Tris-HCl (pH 9,1) hinzugefügt und danach 1 µl des Eluates für die Bestimmung der Phagenkonzentration getitert. Die restlichen Phagen können amplifiziert werden, indem das Eluat zu der 20 ml ER2738 Kultur (OD₆₀₀ von 0,01-0,05) gegeben wird. Die Kultur wird für 4,5 Stunden bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Nach der Inkubation wird die Kultur in Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 12.000 \times g (Sigma 4K10) und 4 °C zentrifugiert. Die Zentrifugation wird mit dem Überstand danach wiederholt. 80 % des Überstandes werden in ein neues Zentrifugengefäß überführt und mit 1/6 Volumen 20 % PEG/ 2,5 M NaCl Lösung versetzt. Die Phagen werden für mindestens 2 Stunden auf Eis präzipitiert. In dieser Arbeit erfolgt die Präzipitation im Kühlschrank über Nacht.

Tag 3: Die PEG Präzipitation wird für 15 Minuten bei 12.000 \times g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Phagenpellet wird in 1 ml TBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um eventuell vorhandene Zellreste entfernen zu können, erfolgt eine weitere Zentrifugation bei 14.000 rpm für 5 Minuten und 4 °C. Die Phagen im Überstand werden ein weiteres Mal gefällt, wieder indem 1/6 Volumen 20% PEG/2,5 M NaCl Lösung hinzugefügt wird. Die Fällung wird für 60 Minuten auf Eis inkubiert und für 10 Minuten bei 4 °C bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, kann das Pellet in 200 µl TBS aufgenommen werden. Auch hier wird nicht lösliches Material durch eine kurze Zentrifugation bei 14.000 rpm (10 Minuten / 4 °C) pelletiert. Der Überstand enthält die Phagen und wird in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Das amplifizierte Eluat wird in einem weiteren Schritt titriert und kann bei -20 °C gelagert werden, wenn ihm die gleiche Menge an Glycerol zugesetzt wird. Für die zweite Panningrunde wird eine Mikrotiterplatte wie weiter oben beschrieben vorbereitet.

Tag 4 und 5: Die getiterten Phagen werden ausgezählt, indem die Anzahl der „*colony forming units*“ (cfu) des amplifizierten Eluates bestimmt wird. Als Ausgangsmaterial für die zweite Panningrunde wird eine Anzahl an Phagen gewählt, die der Anzahl aus Panningrunde 1 entsprechen. Die Panningrunde 2 wird durchgeführt wie oben beschrieben, jedoch wird die Tween Konzentration im Waschpuffer auf 0,5 % (v/v) erhöht. Außerdem wird wieder eine Mikrotiterplatte für die dritte Panningrunde beschichtet.

Tag 6: Die Durchführung der dritten Panningrunde entspricht derjenigen der zweiten Panningrunde, jedoch werden die amplifizierten Phagen aus Runde 2 für das Biopanning verwendet. Es ist dabei nicht notwendig, das Eluat wieder zu amplifizieren. Es kann direkt verwendet werden, um über eine Titration Einzelkolonien zu erzeugen. Diese können dann auf die spezifischen Phagen untersucht werden. Möglich wäre danach ein Phagen-ELISA oder die Amplifikation der Phagen-DNA in einer PCR mit anschließender Sequenzierung der Nukleotidsequenz, um die interagierende Peptidsequenz zu ermitteln.

2.2.26 Biopanning mit den scFv-Bibliotheken Tomlinson I und J

Die Tomlinson I und J Bibliotheken, die von dem *MRC HGMP Resource Centre* vertrieben werden, bestehen jeweils aus über 100 Millionen unterschiedlichen scFv Fragmenten, die in das Ampicillinresistenz vermittelnde Phagemid pIT2 kloniert wurden. Vom Hersteller wird eine Bibliotheksgröße von $1,47 \times 10^8$ (Tomlinson I) beziehungsweise $1,37 \times 10^8$ (Tomlinson J) Phagen angegeben. Die folgende Prozedur wird nach den Angaben der beiliegenden Anleitung „*Human Single Fold scFv Libraries I + J (Tomlinson I + J)*“ durchgeführt.

Bevor das eigentliche Biopanning beginnt, müssen die gekauften Bibliotheken I und J vermehrt werden. Dazu werden sie jeweils mit 200 ml vorgewärmtem 2xYT Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 % Glukose bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angezogen. 50 ml dieser Suspension werden mit 2×10^{11} KM13 Helferphagen infiziert und für 30 Minuten in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die restlichen 150 ml der Bakteriensuspension können für die Erstellung von Dauerkulturen und für spätere Biopannings verwendet werden. Nach der Inkubation werden die Suspensionen bei 3.000 rpm (Sigma 4K10) für 10 Minuten zentrifugiert und die Pellets danach in 100 ml 2xYT Medium (100 µl/ml Ampicilin, 50 µg /ml Kanamycin, 0,1 % Glukose) gelöst. Es erfolgt eine weitere Inkubation bei 30 °C über Nacht und 250 rpm. Die Übernachtskultur wird bei $3.000 \times g$ für 30 Minuten zentrifugiert und 80 ml des Überstandes mit 20 ml PEG/NaCl (20 % PEG 6000 / 2,5 M NaCl) vermischt. Nachdem die Suspension für 1 Stunde auf Eis inkubiert ist, wird sie bei $3.300 \times g$ für 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird in 4 ml PBS suspendiert und danach ein weiteres Mal bei $11.600 \times g$ zentrifugiert, damit noch vorhandenes nicht lösliches Material entfernt werden kann. Der Überstand kann bei 4 °C gelagert werden und wird vor dem Einsatz im Biopanning titriert.

Tag 1: Für das Biopanning werden Immunoröhrchen mit 4 ml des Antigens beschichtet. Die Konzentration an Antigen wird dafür in PBS auf 100 µg/ml verdünnt.

Tag 2: Am nächsten Tag werden die Immunoröhrchen geleert und dreimal mit PBS gewaschen. Zum Blocken werden sie komplett mit 2 % MPBS (2 % Milchpulver in PBS) gefüllt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Immunoröhrchen werden wieder dreimal mit PBS gewaschen. Parallel werden 10^{12} Phagen mit 4 ml 2 % MPBS gemischt und für 60 Minuten in einem Schwenktisch in den beschichteten Röhrchen inkubiert. Nach einer weiteren 60 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur kann der Überstand verworfen werden. Die Reaktionsgefäße werden 10-mal mit 0,1 % PBST (PBS mit 0,1 % Tween 20) gewaschen und die Phagen dann mit 500 µl Trypsin-PBS eluiert. Dazu werden die Röhrchen wieder mit einem Schwenktisch für 10 Minuten geschwenkt. 250 µl der eluierten Phagen werden zu 1,75 ml TG1

bei einer $OD_{600} = 0,4$ gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Um die Phagen zu titern, können 10 µl der ursprünglichen Suspension, eine 10^{-2} Verdünnung und eine 10^{-4} Verdünnung auf YTE-Platten (100 µg/µl Ampicillin, 1 % Glukose) ausgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert werden. Die übrige TG1 Kultur wird bei $11.600 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet danach in 1 ml 2xYT-Medium resuspendiert. Dieser Milliliter wird danach komplett in einer Bio-Assay-Schale auf YTE (100 µg/ml Ampicillin und 1 % Glukose) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tag 3: Am nächsten Tag werden 7 ml 2xYT-Medium mit 15 % Glycerol auf die Platten gegeben und die Bakterien vorsichtig mit einem sterilen Spatel abgelöst und danach durchgemischt. 1 ml der Bakterien kann bei -70 °C aufbewahrt werden, während weitere 50 µl in 50 ml 2xYT Medium (100 µg/ml Ampicillin, 1 % Glukose) bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ bei 250 rpm und 37 °C inkubiert werden. 10 ml dieser Kultur werden dann mit 5×10^{10} Helferphagen infiziert und für 30 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Die Suspension wird bei $3.000 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet danach in 50 ml 2xYT Medium (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 0,1 % Glukose) resuspendiert. Die Bakterien werden in dem Medium über Nacht bei 30 °C und 250 rpm angezogen.

Tag 4: Die Übernachtskultur wird bei $3.300 \times g$ für 15 Minuten zentrifugiert und 40 ml des Überstands mit 10 ml PEG/NaCl (20 % PEG 6000, 2,5 M NaCl) versetzt. Nach einer Inkubation auf Eis für mindestens 1 Stunde erfolgt eine weitere Zentrifugation bei $3.300 \times g$. Die letzten Reste des Überstandes werden vorsichtig entfernt, bevor das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert wird. Um nichtlösliche Bestandteile zu entfernen, erfolgt danach eine weitere Zentrifugation bei $11.600 \times g$ für 10 Minuten. Für die nächste Biopanningrunde wird 1 ml des Überstandes eingesetzt. Die Beschichtung der Immunoröhrchen mit dem Antigen für die zweite Biopanningrunde wird parallel durchgeführt.

Tag 5-9: Die Prozedur wird für insgesamt 3 Biopanningrunden wiederholt.

2.2.27 Biopanning mit den scFv-Bibliotheken HAL9 und HAL10

Das folgende Biopanning wurde am Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Biotechnologie der Universität Braunschweig mit Hilfe von Prof. Dr. Stefan Dübel, Prof. Dr. Michael Hust und Saskia Helmsing und den dort erstellten Phagenbibliotheken HAL9 und HAL10 durchgeführt. Zusammen weisen sie eine theoretische Diversität von 1.5×10^{10} unabhängigen Klonen auf (Kuegler *et al.* 2015). Dabei wurde ein neuer Ansatz erprobt, der es erlaubt, Virionen direkt aus infiziertem Pflanzenmaterial durch einen Antikörper-, „Capture“ zu präsentieren. Hierfür wird der Virus-spezifische Loewe® Antikörper 1:200 in ELISA-Coating Buffer verdünnt und 100 µl in die Vertiefungen der ELISA-Platten gegeben. Nach einer Inkubation für vier Stunden bei 37 °C werden die Vertiefungen viermal mit ELISA-Waschpuffer ausgespült und danach je 100 µl Probe in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Die Probenerstellung ist dabei in Unterkapitel 2.2.33 beschrieben. Im Probenpuffer werden statt 0,2 % BSA (w/v) 2 % Milchpulver (w/v) eingesetzt. Die Proben inkubieren in den Vertiefungen über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag werden die Platten wieder viermal gewaschen. Es werden pro Panning eine infizierte und eine gesunde Pflanze eingesetzt, wobei die Bibliotheken jeweils vor dem eigentlichen Biopanning gegen das gesunde Pflanzenmaterial vorinkubiert werden, um unspezifisch reagierende Phagen direkt zu entfernen.

Am nächsten Tag wird eine zusätzliche leere Vertiefung pro Ansatz komplett mit Panningblock für 1 Stunde geblockt und danach in diesen Vertiefungen jeweils 5×10^{10} cfu/ml HAL9 und HAL10 mit 150 µl Panningblock unter leichtem Schütteln für 1 Stunde präinkubiert. In den späteren Panningrunden werden 50 µl der amplifizierten Phagen mit 100 µl Panningblock verwendet. Die Waschschrte werden im „Tecan Columbus ELISA Washer“ durchgeführt.

Die Antigenlösug mit dem gesunden Pflanzenmaterial wird in einem ELISA-Wascher 3x mit PBST (PBS+0,1 % Tween 20) ausgewaschen und die präinkubierten Phagen in die Vertiefungen gegeben. Es erfolgt eine weitere Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Nachdem die Antigenlösug mit dem infizierten Pflanzenmaterial 3x mit einem ELISA-Wascher gewaschen wurde, kann der Überstand der Phagen überführt werden und für 2 Stunden inkubieren. Parallel werden die *E. coli* für die Infektion mit den eluierten Phagen vorbereitet, indem 50 mL 2xYT mit einer Übernachtskultur von TG1 angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ angezogen werden. Die nicht oder schwach gebundenen Phagen werden im ELISA-Wascher entfernt, in dem die Vertiefungen insgesamt 9x ausgespült werden. Die gebundenen Phagen werden mit 150 µL 10 µg/ml Trypsin für 30 Minuten bei 37 °C eluiert. 150 µL der eluierten scFv-Phagen werden zu 150 µL TG1 in die PP Deepwell MTP gegeben

und danach für 30 Minuten bei 37 °C unter leichtem Schütteln und anschließend 30 Minuten bei 37 °C und 550 rpm inkubiert (Inkubationen bei 550 rpm immer im MTP Schüttler Vortemp 56). Es werden 1 ml 2xYT Medium mit 150 µl 10xGA (1 M Glucose + 1 mg/ml Ampicillin) hinzugefügt und die Suspension für 1 Stunde bei 37 °C und 550 rpm inkubiert. Danach werden 50 µl Helferphagen (2×10^{11} /ml, ergeben 1×10^{10} Phagen in 50 µl) hinzugegeben und erst 30 Minuten bei 37 °C ohne zu Schütteln und danach für 30 Minuten bei 550 rpm inkubiert. Die infizierten Bakterien werden bei $3.220 \times g$ für 10 Minuten in einem Eppendorf 5810R (Rotor A-4-81, Mikrotiterplattengehänge) pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und das Pellet in 950 µL 2xYT + 100 µg/ml Ampicillin + 50 µg/ml Kanamycin resuspendiert. Die Bakterien werden über Nacht bei 30 °C und 550 rpm kultiviert. Am nächsten Tag werden sie bei $3.220 \times g$ für 10 Minuten pelletiert. Der Überstand mit den Phagen kann in weiteren Panningrunden eingesetzt werden. Das Biopanning besteht insgesamt aus drei Runden. Nach der 3. Panningrunde können 5 µL der eluierten Phagen mit dem *E. coli* Stamm XL1-Blue MRF⁺ getitert werden, um danach Einzelklone zu analysieren.

Für die Produktion löslicher Antikörper in Mikrotiterplatten werden die Vertiefungen mit jeweils 150 µl 2xYT-GA (2xYT + 100 mM Glucose + 100 µg/ml Ampicillin) gefüllt. Es werden 92 Antikörperklone der Titerplatten nach der letzten Panningrunde mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und dann in das Medium angeimpft (H3, H6, H9 und H12 bleiben frei). Die Vertiefungen H9 und H12 werden mit dem gegen Streptavidin gerichteten Kontrollklon „pHAL14-D1.3“ (in XL1-Blue) angeimpft. Die Platten werden über Nacht bei 37° C und 800 rpm inkubiert (Thermo Shaker PST-60HL-4). Eine neue 96 Well-Mikrotiter-Platte wird dann mit 180 µl 2xYT-GA je Vertiefung gefüllt. Aus der Masterplatte werden 10 µl der Übernachtskultur aus jeder Vertiefung in die entsprechende Vertiefung der neuen Platte übertragen und diese bei 800 rpm für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Bakterien bei $3.220 \times g$ für 10 Minuten pelletiert wurden (Eppendorf 5810R), wird der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 180 µl 2xYT-SA mit 50 µM IPTG aufgenommen. Die Kultur wird über Nacht bei 30 °C und 800 rpm inkubiert. Die Bakterien werden bei $3.220 \times g$ für 10 Minuten pelletiert und jeweils 180 µl des Überstands in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Für einen ELISA mit den löslichen scFvs werden 50 µl Überstand mit 50 µl Blocklösung vermischt und eingesetzt (H3, H6 sind die negativen und H9 und H12 sind die positiven Kontrollen).

2.2.28 Anzucht der M13K07 Helferphagen

Für die Anzucht der Helferphagen wird der *E. Coli* Stamm NM522 aus einer Übernachtskultur in 20 ml 2xYT-Medium bis zu einer $OD_{600} \sim 0,5$ bei 250 rpm und 37 °C inkubiert. Es werden 1 µl einer M13K07 Stocklösung mit 500 µl der Bakteriensuspension und 3 ml flüssigem Top Agar vermischt und danach auf 2xYT-Platten gegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wird am nächsten Tag ein einzelner, gut separierter „*Plaque*“ abgenommen und mit 20 ml 2xYT + 50 µg/ml Kanamycin für 5 Stunden bei 37 °C angeimpft. Von dieser Kultur können Dauerkulturen genommen werden. Es werden im Folgenden 150 ml 2xYT + Kanamycin Medium mit 3 ml der Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wird die Kultur für 15 Minuten bei 8.000 rpm und 4 °C (GSA Rotor, Sorvall RC-5C) zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit dem 0,15-fachen Volumen einer PEG/NaCl Lösung (16,7 %/3,3 M) versetzt und für mindestens 2 Stunden auf Eis inkubiert. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 8.000 rpm (GSA Rotor) für 40 Minuten bei 4 °C, bevor der Überstand abgenommen werden kann. Das Pellet wird in 1,5 ml PBS gelöst und für 10 Minuten bei 12.000 rpm (MiniSpin) zentrifugiert, danach wird der Überstand mit den Phagen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann bei 4 °C gelagert werden.

2.2.29 Anzucht einzelner Phagenklone aus den Ph.D.TM Phage Display Bibliotheken

Eine Übernachtskultur von ER2738 wird 1:100 in 2xYT + Tetracyclin verdünnt. Alternativ kann eine ER2738 Kultur bis zu einer $OD_{600} \sim 0,5$ angezogen werden. Kolonien aus der Titrierung oder 10 µl einer entsprechenden Dauerkultur werden in 1 ml der Bakteriensuspension überführt und bei 220 rpm und 37 °C für 5 Stunden inkubiert. Im späteren Verlauf dieser Arbeit wurden ausgewählte Klone teilweise auch über Nacht bei 30 °C angezogen. Die Kulturen werden bei 14.000 rpm (MiniSpin) für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wiederum zentrifugiert. Es werden die oberen 80 % des Überstandes vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die Phagen können jetzt zusätzlich mit einer PEG/NaCl Lösung gefällt (siehe Kapitel 2.2.28) und danach titriert werden (siehe Kapitel 2.2.31).

2.2.30 Anzucht einzelner Phagen aus den HAL9/10 Bibliotheken

Für die Anzucht spezifischer Phagen aus den HAL9/10 Bibliotheken werden Dauerkulturen, die auf Einzelkolonien nach der Titration basieren, in 1 ml 2xYT-GA (2xYT + 100 mM Glucose + 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag werden 20 µl der Bakterienkultur in 1,5 ml 2xYT-GA umgeimpft und danach bis zu einer $OD_{600} \sim 0,5$ bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Es werden 1×10^{10} Helferphagen (M13K07) hinzugegeben und die Suspension danach bei 37 °C ohne zu schütteln für 30 Minuten inkubiert. Es erfolgt eine weitere 30 minütige Inkubation bei 37 °C und 250 rpm. Die Bakterien werden bei $4.000 \times g$ (MiniSpin) für 4 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wird in 1 ml 2xYT-AK (100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin) + IPTG (50 µM) aufgenommen und über Nacht bei 28 °C und 250 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wird der Überstand mit den Phagen durch eine weitere Zentrifugation bei $4.000 \times g$ von den Bakterien getrennt. Er kann mit dem Medium sofort für Versuche eingesetzt werden. Sollen Phagen titriert werden, dann bietet sich jedoch eine Fällung und somit Reinigung der Viren als erster Schritt an.

Dafür wird der Überstand mit 1/5 Volumen einer PEG/NaCl-Lösung versetzt (-20 °C, 20 % PEG (w/v) + 2,5 M NaCl) und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Es erfolgt eine Zentrifugation bei $3.220 \times g$ (Sigma 4K10) und 4 °C für 1 Stunde. Der Überstand wird verworfen und das Pellet vorsichtig in 1 ml PBS resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13.000 rpm (MiniSpin) kann der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden und in den Versuchen eingesetzt werden.

2.2.31 Titration der „Ph.D.TM Phage Display Libraries“ von New England Biolabs

Der in diesen Bibliotheken verwendete Vektor M13KE ist ein Derivat des bekannten Bibliothekenvektors M13mp19, der das *lacZα* Gen exprimiert. Somit erscheinen Bakterienkolonien blau, wenn sie mit diesen Phagen infiziert und auf LB-Platten mit Xgal/IPTG ausplattiert werden. Es werden 5-10 ml LB mit ER2738 von einer Platte oder Übernachtskultur angeimpft und für 4-8 Stunden bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bis die *mid-log* Phase mit einer $OD_{600} \sim 0,5$ erreicht ist. Während die Bakterien wachsen, werden je 3 ml Top Agar in sterile Falcon-Gefäße überführt. Für mindestens 1 Stunde werden LB/IPTG/Xgal Platten bei 37 °C angewärmt und parallel die Verdünnungsreihen angesetzt. Für die Bestimmung des Titors von amplifizierten Phagen während des Biopannings bieten sich Verdünnungen von 10^{-8} - 10^{-11} an, während unamplifizierte Eluate schon mit Verdünnungen von

10^{-1} - 10^{-4} erfolgreich titriert werden können. Wenn die Bakterienkultur die *mid-log* Phase erreicht hat, werden pro Verdünnung 200 μl in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Um die Infektion der Phagen zu ermöglichen, werden 10 μl jeder Phagenverdünnungen in die zugeordneten Reaktionsgefäße überführt, gemischt, und für 1-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die infizierten Bakterien werden jeweils in ein Falcongefäß mit Top Agar gegeben und kurz gevortext. Die kompletten Suspensionen werden danach sofort auf die angewärmten LB/IPTG/Xgal Agarplatten überführt. Die Agarplatten werden für 5 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und danach über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Kolonien in einem „Blue White Screening“ ausgezählt und die Anzahl der infizierten Kolonien mit der Verdünnung verrechnet, um die Menge an cfu in 10 μl bestimmen zu können.

2.2.32 Alternative Titrations ohne die Verwendung von Top Agar

Es wird LB/Tetracyclin (20 $\mu\text{g}/1\text{ ml}$) mit ER2738 angeimpft und über Nacht bei 250 rpm und 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden 20 ml LB/Tetracyclin mit 200 μl der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,5$ unter Schütteln (250 rpm) bei 37 °C angezogen. Für jede Probe werden 90 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ in Reaktionsgefäße vorgelegt und danach mit jeweils 10 μl der Phagensuspensionen Verdünnungsreihen von 10^{-3} - 10^{-10} erstellt. Es werden 100 μl der sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Bakterien hinzugegeben und vermischt. Danach erfolgt eine Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C. Im Anschluss werden 20 μl der infizierten Bakteriensuspensionen auf die entsprechenden LB-Agar Platten getropft. Dabei muss neben Tetracyclin noch das Selektivantibiotikum für den Nachweis der Phagen in dem Medium vorliegen. M13K07 wird zum Beispiel durch die Zugabe von Kanamycin (50 $\mu\text{l}/\text{ml}$) nachgewiesen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C können die Bakterienkolonien am nächsten Tag gezählt und der Titer in der Ausgangslösung bestimmt werden.

Als Alternative und schnellere Titrationsmethode können Verdünnungen der Phagen in den Größenordnungen 10^{-2} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} angesetzt werden. Von den 10^{-8} , 10^{-9} und 10^{-10} Verdünnungen werden jeweils 10 μl mit 50 μl ER2738 mit einer $\text{OD}_{600} = 0,5$ angeimpft und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Von jeder Reaktion werden 3 Tropfen mit dem Volumen von 10 μl auf entsprechende Selektionsplatten getropft, die Platten an der Luft getrocknet und über Nacht inkubiert. Alle Kolonien der Tropfen werden ausgezählt und mit dem Faktor 2 multipliziert. Danach kann der Titer in der Ausgangslösung bestimmt werden.

2.2.33 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die hier durchgeführten Arbeiten mit Pflanzenmaterial werden, wenn nicht anders beschrieben, vier Blattscheiben mit dem Deckel eines Reaktionsgefäßes ausgestanzt und danach mit 600 µl ELISA-Probenpuffer versetzt. Die Probe wird gemörsert und danach bei 13.000 rpm (MiniSpin) für 10 Minuten zentrifugiert. 150 µl des Überstandes werden mit 750 µl ELISA-Probenpuffer vermischt und danach im ELISA eingesetzt. Die Verdünnung gilt als 1:30 Verdünnung.

In dieser Arbeit werden je nach verwendetem Antikörper zwei verschiedene Enzyme für den Farbumschlag verwendet. Die alkalische Phosphatase spaltet den Phosphatrest vom farblosen Nitrophenylphosphat ab. Das entstehende p-Nitrophenol ist gelblich. Die Meerrettich-Peroxidase (HRP) nutzt Tetramethylbenzidin als Substrat und färbt die Reaktionslösung blau.

Standard Doppel-Antikörper-Sandwich Assay (DAS-ELISA) nach Loewe®

Der spezifische Loewe® Antikörper wird 1:200 in ELISA-*Coating Buffer* verdünnt und in die Vertiefungen der ELISA Platten gegeben. Im Gegensatz zu dem offiziellen Protokoll werden hier 100 µl verdünnter Antikörper eingesetzt. Nach einer Inkubation für vier Stunden bei 37 °C werden die Vertiefungen viermal mit Waschpuffer ausgespült und danach je 100 µl Probe in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Die anschließende Inkubation findet über Nacht bei 4 °C statt. Am nächsten Tag werden die Platten wieder viermal gespült und danach 100 µl des zweiten Antikörpers mit der alkalischen Phosphatase (IgG-AP-Konjugat) hinzugegeben. Wieder erfolgt die Inkubation bei 37 °C über vier Stunden bei 37 °C und vier weitere Waschschriffe. Nach der Zugabe der Substratlösung (1 mg/ml 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat in Substratpuffer, frisch angesetzt) kann der Farbumschlag innerhalb von 1-2 Stunden photometrisch bei 405 nm bestimmt werden.

ELISA für den Nachweis mit löslichen Antikörpern der Bibliotheken HAL9 und HAL10

Das Antigen und der gegen das spezifische Pflanzenvirus gerichtete Antikörper werden in dieser Arbeit wie im DAS-ELISA nach Loewe® verwendet. Nach der Inkubation über Nacht werden die Mikrotiterplatten in dem ELISA-Wascher 3x gewaschen und danach in jede Vertiefung 60 µl Blocklösung (2 % Milchpulver in PBS (w/v), 0,1% Tween 20 (v/v)) und 40 µl löslicher Antikörper (Produktion siehe Kapitel: 2.2.27) hinzugefügt und für 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Die Platte wird dann 3x mit PBST im ELISA-Wascher gewaschen. Pro Reaktion werden 100 µl *Mouse α-myc-tag* (1:50 in Blocklösung) hinzugefügt und danach für 1 Stunde inkubiert. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschriffe werden 100 µl *Goat α-Mouse IgG*

HRP (1:1000 in Blocklösung) je Vertiefung hinzugefügt und für 45 Minuten bei RT inkubiert. Wieder erfolgt ein dreimaliger Waschschrift mit PBST und die Zugabe von 100 µl Substratlösung (19 Teile TMB A + 1 Teil TMB 1). Nach einer ausreichenden Blaufärbung (15-20 Minuten Inkubation) kann die Reaktion mit 100 µl 1 N H₂SO₄ gestoppt werden. Es kommt zu einem gelben Farbumschlag, dessen Intensität bei 450 nm bestimmt werden kann.

Capture-ELISA für den Nachweis von Pflanzenviren mit Phagen „antibody mimics“

Der spezifische Loewe® Antikörper wird 1:200 in *ELISA-coating buffer* verdünnt und in die Vertiefungen der ELISA Platten gegeben. Im Gegensatz zu dem offiziellen Protokoll werden hier 100 µl verdünnter Antikörper eingesetzt. Nach einer Inkubation für vier Stunden bei 37 °C werden die Vertiefungen viermal mit Waschpuffer ausgespült und danach je 100 µl Probe in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Die anschließende Inkubation findet über Nacht bei 4 °C statt. Am nächsten Tag werden die Platten wieder viermal gespült und die gewünschte Menge an Phagen in 50 µl PBS aufgenommen. Diese 50 µl werden 1:1 mit Blocklösung (2 % Milchpulver (w/v)) vermischt und in die Vertiefungen gegeben. Nach einer Inkubation für 90 Minuten bei Raumtemperatur werden die Phagen ausgeschlagen und die Vertiefungen 3-mal gewaschen. Der pVIII spezifische *HRP-Anti-M13* Antikörper wird 1:5000 in Blocklösung verdünnt und jeweils 100 µl zu jeder Reaktion hinzugegeben. Es erfolgt eine Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem abermaligen dreifach wiederholten Waschschrift werden 100 µl der Substratlösung (0,22 mg/ml ABTS in Substratpuffer, 0,051 % H₂O₂ (30 %)) hinzugefügt. Nach der Zugabe der Substratlösung kann der Farbumschlag innerhalb von 15-60 Minuten photometrisch bei 405 nm bestimmt werden.

Plate-trapped ELISA für den Nachweis von Antigenen mit „antibody mimics“

Das spezifische Antigen wird in der Blocklösung oder 50 mM NaHCO₃ verdünnt und jeweils 100 µl in die Vertiefungen gegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C werden die Mikrotiterplatten dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Es werden je 400 µl Blocklösung hinzupipettiert und die Platten danach für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder erfolgt ein dreimaliger Waschschrift bevor 100 µl der 1:1 in Blocklösung vermischten Phagensuspension hinzugegeben und für 90 Minuten inkubiert werden können. In dieser Arbeit wurden ab diesem Zeitpunkt zwei verschiedene Methoden verwendet. Bei der schnelleren Methode wird nach einem weiteren Waschgang der pVIII spezifische *HRP-Anti-M13* Antikörper 1:5000 in Blocklösung verdünnt und jeweils 100 µl zu jeder Reaktion hinzugegeben. Es erfolgt eine Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren Waschschriften werden 100 µl der Substratlösung (0,22 mg/ml ABTS in 0,05 M Zitronensäure

(pH=4), kurz vor der Verwendung werden 0,051 % (v/v) H₂O₂ (30 %) dazugegeben) hinzugefügt. Nach der Zugabe der Substratlösung kann der Farbumschlag innerhalb von 15-60 Minuten photometrisch bei 405 nm bestimmt werden.

Bei der langsameren Methode werden 100 µl des *Rabbit Anti-fd* Antikörpers von Sigma verwendet, der 1:8000 in Blocklösung verdünnt wird und bei 4 °C über Nacht in den entsprechenden Vertiefungen eingesetzt wird. Am nächsten Tag wird die Antikörperlösung dreimal ausgespült und 100 µl des *Goat anti-Rabbit igG* mit alkalischen Phosphatase in der Verdünnung 1:10000 (in Blocklösung) eingesetzt. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37 °C können die Vertiefungen wieder gespült und mit 100 µl Substratlösung (1 mg/ml 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat in Substratpuffer, frisch angesetzt) gefüllt werden. Der Farbumschlag kann innerhalb von 1-2 Stunden photometrisch bei 405 nm bestimmt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Viruserhaltung und Symptomatologie

Die Viren wurden erfolgreich auf *N. benthamiana* übertragen und vermehrt (siehe Kapitel 2.2.2). Überprüft wurde die erfolgreiche Infektion durch die Beurteilung der Symptome und den Einsatz spezifischer DAS-ELISAs und RT-PCRs. In den folgenden Abbildungen (Abbildung 3.1-1, Abbildung 3.1-2 und Abbildung 3.1-3) sind die Symptome der Viren an den Blättern gezeigt.

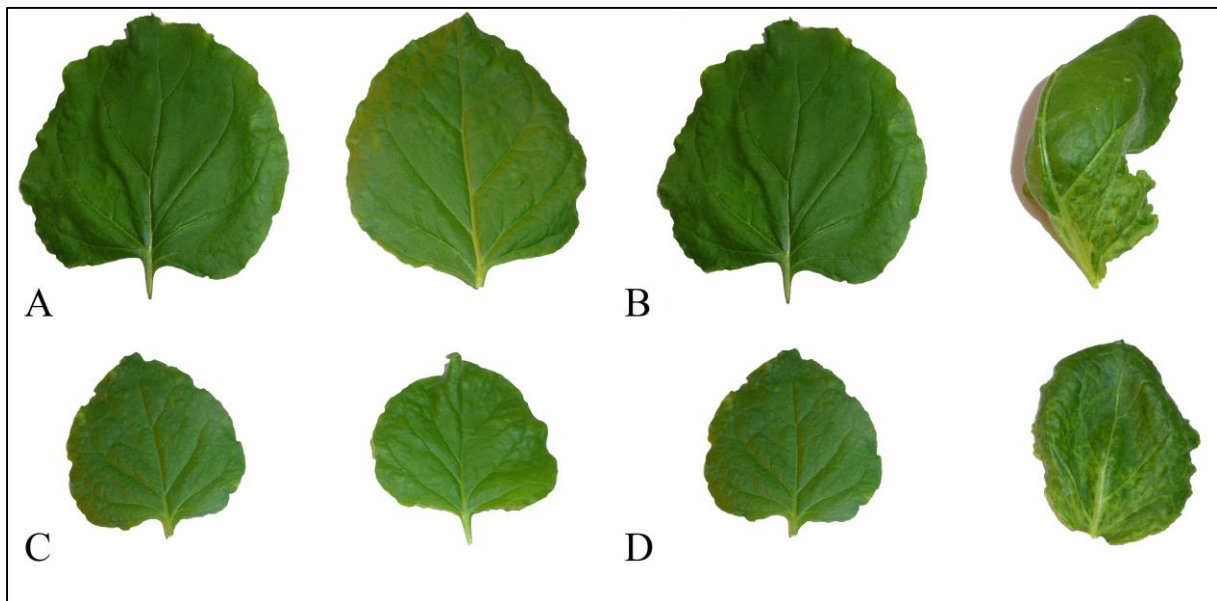


Abbildung 3.1-1 Symptomatologie von CbMV und CMV PV-0506 an Blättern von *N. benthamiana*

In der obigen Abbildung sind die Symptome von CbMV (A und C) und CMV PV-0506 (B und D) an Blättern von *N. benthamiana* 21 Tage nach der mechanischen Inokulation gezeigt. Links sind jeweils die Blätter gesunder Pflanzen dargestellt und rechts Blätter infizierter Pflanzen. Bei der Infektion mit CbMV waren keine Symptome zu erkennen, während die Infektion des CMV klassische Symptome hervorrief. Sichtbar waren Mosaikerscheinungen, Stauchungen, Blattdeformationen und gelbliche Flecken. Es kam außerdem zu Adernaufhellungen.

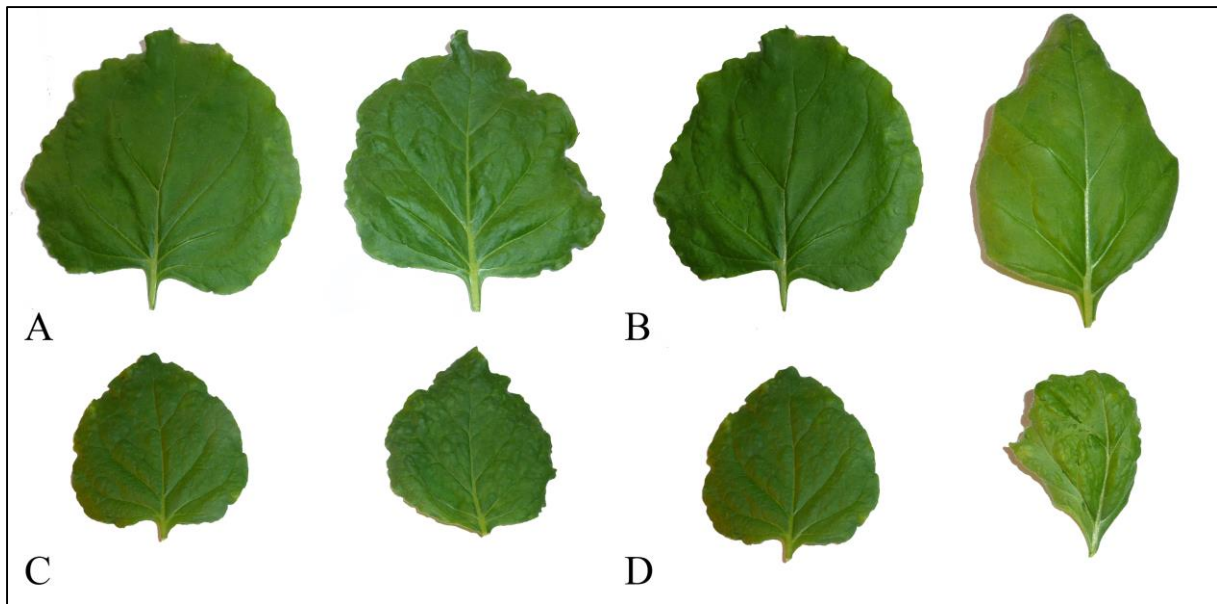


Abbildung 3.1-2 Symptomatologie von PPV Bul PV-0212 und PVY N605 an Blättern von *N. benthamiana*

In der obigen Abbildung sind die Symptome von PPV Bul PV-0212 (A und C) und PVY N605 (B und D) an Blättern von *N. benthamiana* 21 Tage nach der mechanischen Inokulation gezeigt. Links sind jeweils die Blätter gesunder Pflanzen gezeigt und rechts die Blätter infizierter Pflanzen. Bei der Infektion mit dem PPV waren nur sehr schwache Symptome zu erkennen, da dieser Stamm relativ milde Auswirkungen auf die Pflanzen hatte. Es kam teilweise zu Mosaikerscheinungen und gelblichen Aufhellungen. Bei der Infektion mit PVY zeigten sich Blattscheckungen, chlorotische Aufhellungen und Blattkräuselungen. Außerdem drehten sich die Blattspitzen ein.

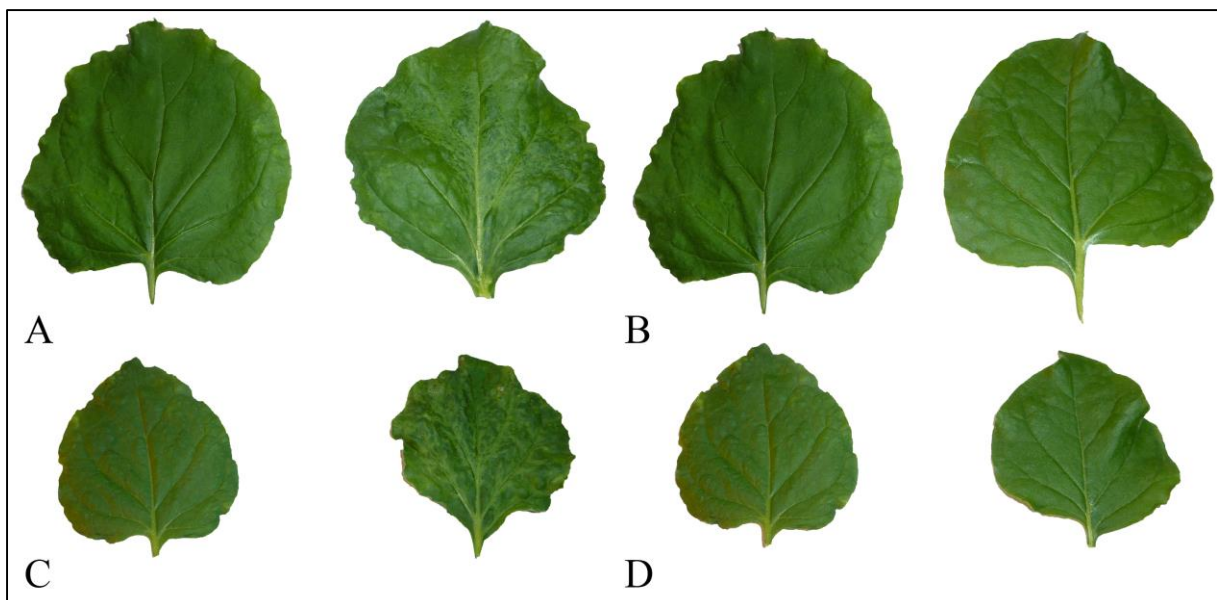


Abbildung 3.1-3 Symptomatologie von TMV PV-0107 und TSWV 12 an den Blättern von *N. benthamiana*

In der obigen Abbildung sind die Symptome von TMV *Vulgare* PV-0107 (A und C) und TSWV 12 (B und D) an Blättern von *N. benthamiana* 21 Tage nach der mechanischen Inokulation gezeigt. Links sind jeweils die Blätter gesunder Pflanzen und rechts die Blätter infizierter Pflanzen gezeigt. Bei der Infektion mit dem TMV waren typische Marmorierungen, Mosaiksymptome, chlorotische Flecken und Verformungen des Blattes zu erkennen. Die Infektion mit TSWV führte zu relativ schwachen Symptomen mit hellgrünen Aufhellungen der Blätter und Blattadern.

Neben dem Virusnachweis durch Feststellung der Symptomatologie wurden die Pflanzen auch serologisch überprüft (siehe 2.2.33). In den nächsten beiden Abbildungen (Abbildung 3.1-4 und Abbildung 3.1-5) werden die Ergebnisse der spezifischen ELISAs dargestellt.

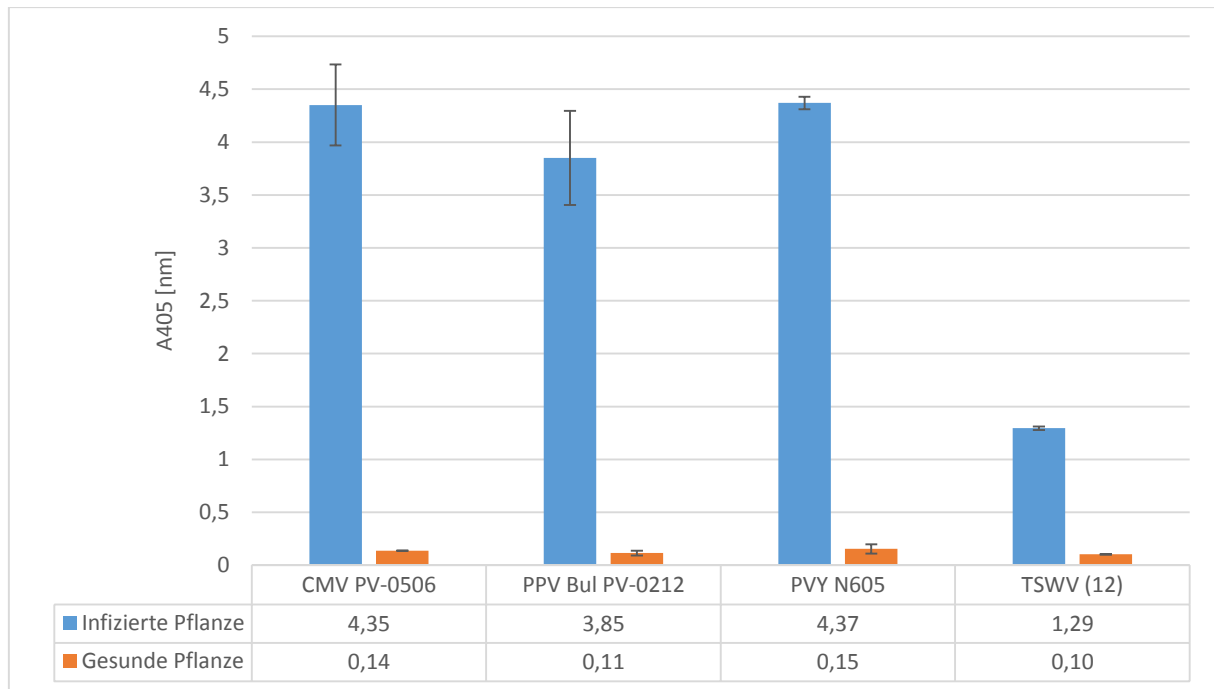


Abbildung 3.1-4 Ergebnis eines DAS-ELISA mit infiziertem und gesundem Pflanzenmaterial (CMV, PPV, PVY und TSWV)

In der obigen Abbildung ist das Ergebnis eines DAS-ELISA mit infiziertem und gesundem Pflanzenmaterial (CMV, PPV, PVY, und TSWV) gezeigt. Der Nachweis erfolgte über den Farbumschlag von para-Nitrophenylphosphat hervorgerufen durch die alkalische Phosphatase. Die Unterschiede in der Signalstärke zwischen den gesunden und infizierten Pflanzen sind deutlich zu erkennen. Mittelwert, (n=2). Messung nach 90 Minuten.

In der obigen und der folgenden Abbildung zeigt sich deutlich, dass die jeweiligen Viren in den Pflanzen nachgewiesen werden konnten und es zu keinen unspezifischen Reaktionen mit den Negativkontrollen kam. Die Signale der Negativkontrollen lagen dabei alle niedriger als 0,16, während sich bei den infizierten Pflanzen deutliche Unterschiede in den Maximalwerten zeigten (zum Beispiel CMV mit 4,35 zu TSWV mit 1,29). Jedoch konnten alle Viren eindeutig bestimmt werden. Dies war die Grundvoraussetzung für die späteren Biopannings und Nachweise mit den „*antibody mimics*“. Die Viruserhaltung wurde parallel in dieser Arbeit fortgeführt und regelmäßig überprüft.

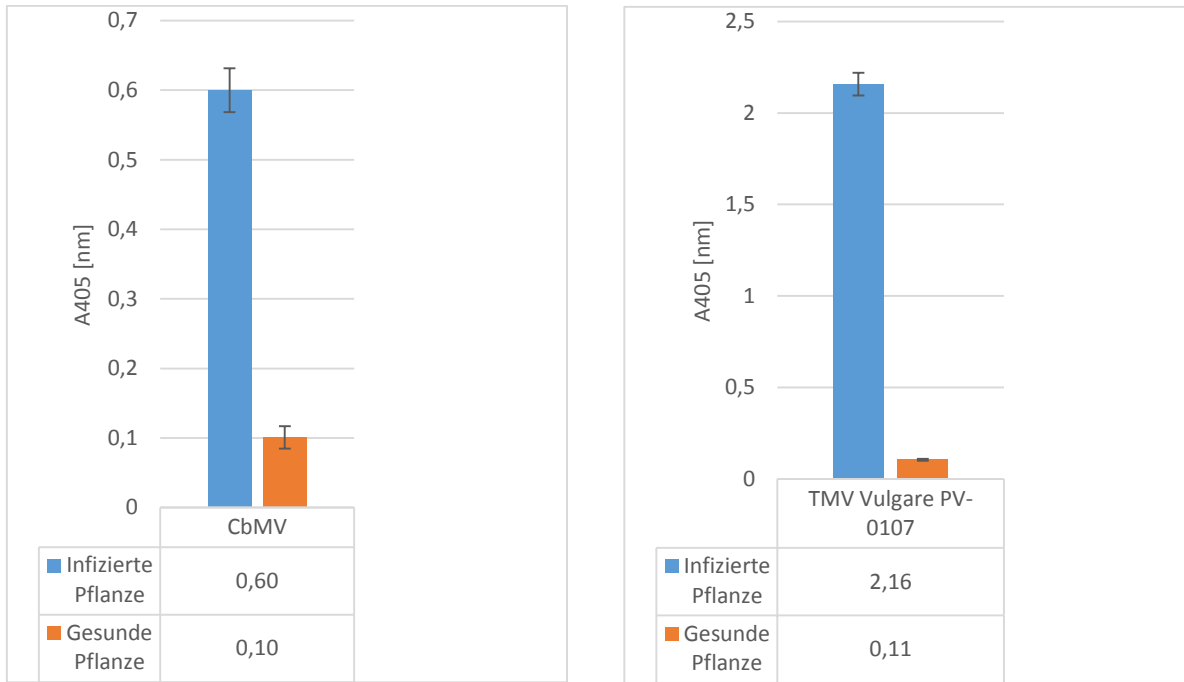


Abbildung 3.1-5 Ergebnis zweier DAS-ELISAs mit infiziertem und gesundem Pflanzenmaterial (CbMV und TMV)

In der obigen Abbildung ist das Ergebnis zweier DAS-ELISAs mit infiziertem und gesundem Pflanzenmaterial (CbMV und TMV) gezeigt. Der Nachweis erfolgte über den Farbumschlag von *para*-Nitrophenylphosphat hervorgerufen durch die alkalische Phosphatase. Die Unterschiede in der Signalstärke zwischen den gesunden und infizierten Pflanzen sind deutlich zu erkennen. Mittelwert, (n=2). Messung nach 30 Minuten (CbMV) bzw. 90 Minuten (TMV *Vulgare*).

3.2 Expression rekombinanter Virushüllproteine

3.2.1 Expression rekombinanter Virushüllproteine im pQE_30 Vektor

Nach der Induktion wurden Fusionsproteine, bestehend aus dem Zielprotein und dem His-Tag, in *E. coli* exprimiert (siehe Kapitel 2.2.19). Sie wurden danach über den His-Tag mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proteine konnten anschließend in einer Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE, siehe Kapitel 2.2.24) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.2-1).

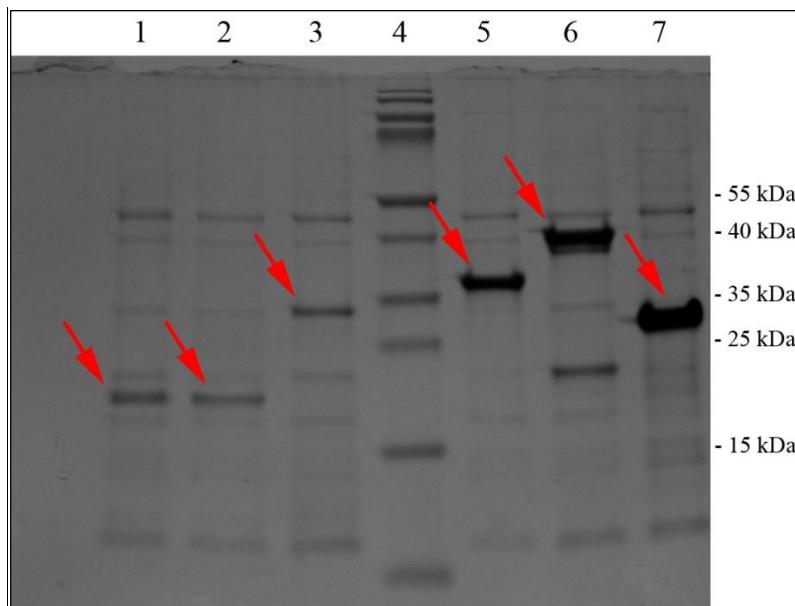


Abbildung 3.2-1 Nachweis der exprimierten Hüllproteine im pQE_30 Vektor in einer PAGE

Laufbahn 1: Reinigung der Proteine der Expression des TMV-CP; Laufbahn 2: Reinigung der Proteine der Expression des TMV-CP; Laufbahn 3: Reinigung der Proteine der Expression des TSWV-CP; Laufbahn 4: SM0671 Standard (6 μ l Marker + 12 μ l SDS-Probenpuffer); Laufbahn 5: Reinigung der Proteine der Expression des PVY-CP; Laufbahn 6: Reinigung der Proteine der Expression des PPV-CP; Laufbahn 7: Reinigung der Proteine der Expression des CMV-CP. Die roten Pfeile weisen auf die exprimierten Proteine hin. Jeweils aufgetragen: 15 μ l Probe + 15 μ l SDS-Probenpuffer.

In der obigen Abbildung ist die PAGE der gereinigten Proteine aus *E.coli* dargestellt, die aufgetrennten Hüllproteine sind mit roten Pfeilen markiert. Es zeigen sich in Laufbahn eins und zwei das TMV-CP (berechnetes Molekulargewicht: 19,06 kDa), in Laufbahn drei das TSWV-CP (berechnetes Molekulargewicht: 30,25 kDa), in vier der verwendete Marker SM0671, in Laufbahn fünf das PVY-CP (berechnetes Molekulargewicht: 31,27 kDa), in sechs das CP von PPV (berechnetes Molekulargewicht: 38,04 kDa) und in Laufbahn sieben das Hüllprotein von

CMV (berechnetes Molekulargewicht: 25,54 kDa). Bis auf das PVY-CP stimmen die in den Gelen gezeigten Proteinbanden und die durch den Marker abgeleiteten Molekulargewichte relativ gut mit den berechneten Molekulargewichten überein. Zudem sind in einigen Spuren weitere Proteinbanden, wahrscheinlich bakteriellen Ursprungs, zu erkennen.

Zusätzlich wurden einige der Hüllproteine (CMV, PPV, TMV und TSWV) nach der Aufreinigung in einem DAS-ELISA (siehe Abbildung 3.2-2) mit den spezifischen Antikörpern der Firma Loewe untersucht. Bei Erkennung der Proteine durch die Antikörper ist zu erwarten, dass sich die Proteine korrekt falten und im Biopanning ähnliche Strukturen wie in vollständigen Virionen anbieten.

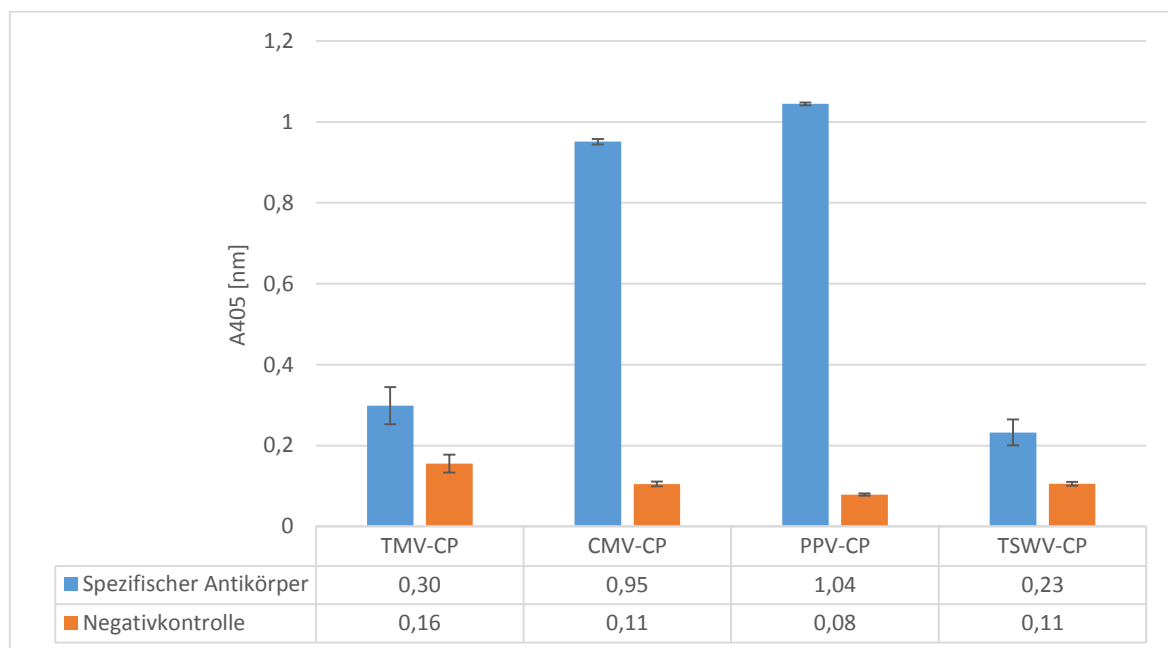


Abbildung 3.2-2 Ergebnisse verschiedener DAS-ELISAs mit exprimierten Hüllproteinen aus pQE_30

Die oben gezeigten Resultate ergeben sich aus unterschiedlichen ELISAs, sie werden für eine bessere Übersicht in einer Abbildung gezeigt. In der obigen Abbildung sind die exprimierten Proteine (CMV-CP; PPV-CP; TSWV-CP jeweils 1:20 in PBS verdünnt; TMV-CP 1:3 in PBS verdünnt) in verschiedenen DAS-ELISAs gezeigt. Der Nachweis erfolgte über den Farbumschlag von *para*-Nitrophenylphosphat hervorgerufen durch die alkalische Phosphatase. Während das CMV-CP und das PPV-CP nachgewiesen werden konnten, ist das Signal beim TMV-CP und beim TSWV-CP relativ gering. Mittelwert, (n=2). Messungen für TMV-CP nach 60 Minuten; CMV-CP nach 90 Minuten; PPV-CP nach 120 Minuten; TSWV-CP nach 90 Minuten.

Es wird in der obigen Abbildung deutlich, dass nur das PPV-CP (1,04 zu 0,08) und das CMV-CP (0,95 zu 0,11) durch den DAS-ELISA eindeutig erkannt werden konnten, während der Nachweis des TMV-CP (0,30 zu 0,16) und TSWV-CP (0,23 zu 0,11) relativ geringe Signale ergab. Es wurden im Folgenden trotzdem alle exprimierten Proteine im Biopanning verwendet.

3.2.2 Expression rekombinanter Virushüllproteine im pRSET A Vektor

Da die Ausbeute der exprimierten Proteine mit pQE_30 Vektoren zu gering war und die ersten Biopanningversuche keine positiven Ergebnisse brachten, wurde zusätzlich ein weiterer Expressionsvektor verwendet (siehe Kapitel 2.2.20). Auch hier wurden die Fusionsproteine bestehend aus dem Zielprotein und dem His-Tag in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proteine konnten anschließend in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe Abbildung 3.2-3) nachgewiesen werden.

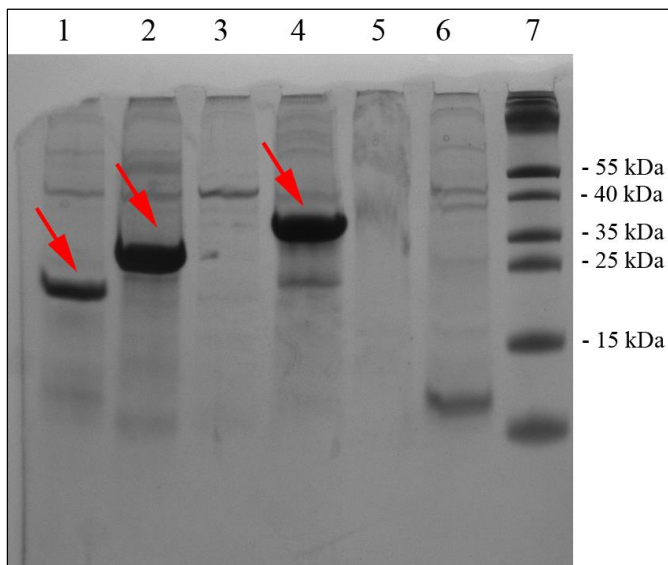


Abbildung 3.2-3 Nachweis der exprimierten Hüllproteine im pRSET A Vektor in einer PAGE

Laufbahn 1: Reinigung der Proteine der Expression des TMV-CP; Laufbahn 2: Reinigung der Proteine der Expression des CMV-CP; Laufbahn 3: Reinigung der Proteine der Expression des PPV-CP; Laufbahn 4: Reinigung der Proteine der Expression des PVY-CP; Laufbahn 5: Reinigung der Proteine der Expression des TSWV-CP; Laufbahn 6: Reinigung der Proteine der Expression des CbMV-CP; Laufbahn 7: SM0671 Standard (6 μ l Marker + 12 μ l SDS-Probenpuffer). Die roten Pfeile weisen auf die exprimierten Proteine hin. Jeweils aufgetragen: 15 μ l Probe + 15 μ l SDS-Probenpuffer.

Es konnten nur die Hüllproteine des TMV, CMV und PVY exprimiert werden. Nach der Reinigung wurden die Hüllproteine in einem DAS-ELISA (siehe Abbildung 3.2-4) mit den spezifischen Antikörpern von Loewe untersucht.

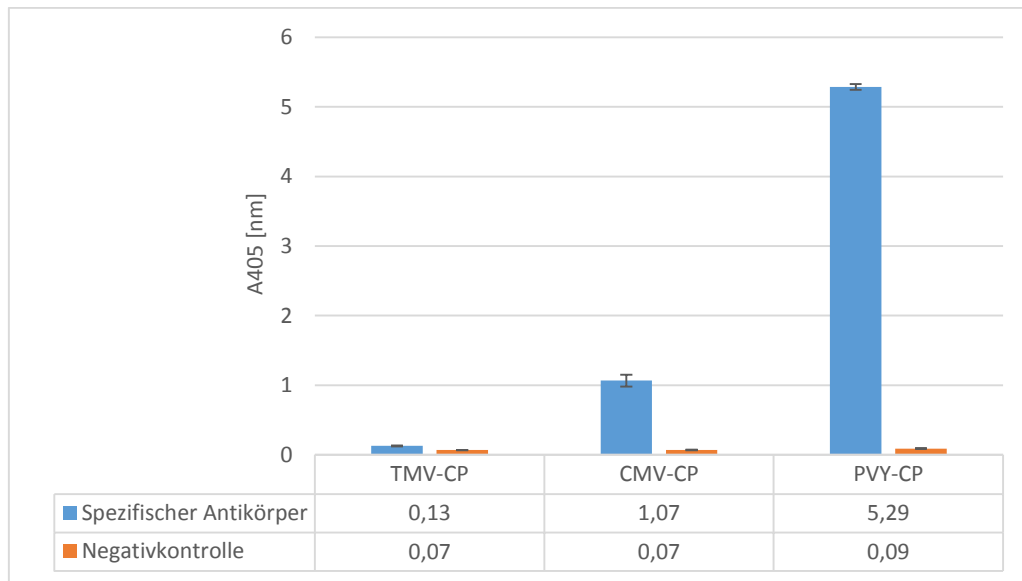


Abbildung 3.2-4 Ergebnisse eines DAS-ELISA mit exprimierten Hüllproteinen aus pRSET A

In der obigen Abbildung sind die exprimierten Proteine (1:20 in PBS verdünnt) in einem DAS-ELISA gezeigt. Der Nachweis erfolgte über den Farbumschlag von *para*-Nitrophenylphosphat hervorgerufen durch die alkalische Phosphatase. Während das CMV-CP und das PVY-CP nachgewiesen werden konnten, wird das TMV-CP nicht erkannt. Mittelwert, (n=2). Messung nach 90 Minuten.

Wie in der obigen Abbildung gezeigt, konnte nur das PVY-CP (5,29 zu 0,09) und das CMV-CP (1,07 zu 0,07) durch den DAS-ELISA spezifisch erkannt werden, das TMV-CP (0,13 zu 0,07) konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wurden weiterführend alle erfolgreich exprimierten Proteine im Biopanning verwendet.

3.3 Reinigung des TMV aus infiziertem Pflanzenmaterial

In der nächsten Abbildung 3.3-1 wird exemplarisch das Ergebnis der Reinigung des TMV aus *N. benthamiana* nach Kapitel 2.2.21 gezeigt. Diese Reinigungen wurden später teilweise in den Biopannings verwendet. Die Stämme *Vulgare* und *Ohio V* ließen sich beide in Mengen zwischen 0,5 µg/µl – 10 µg/µl reinigen.

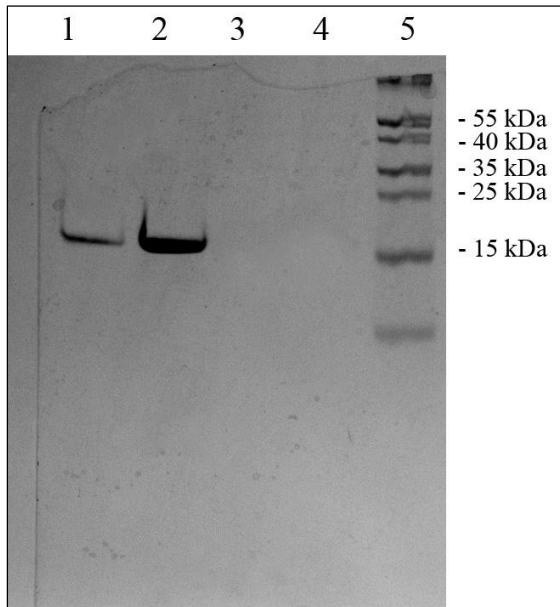


Abbildung 3.3-1 Beispielhafter Nachweis von gereinigtem TMV Hüllprotein aus *N. benthamiana* in einer PAGE

Laufbahn 1: Gereinigtes TMV *Vulgare* 1 µg/30 µl; Laufbahn 2: Gereinigtes TMV *Vulgare* 5 µg/30 µl; Laufbahn 3 und 4: leer; Laufbahn 5: SM0671 Standard (6 µl Marker + 12 µl SDS-Probenpuffer). Jeweils aufgetragen: 15 µl auf 1 µg beziehungsweise 5 µg verdünntes Probenmaterial + 15 µl SDS-Probenpuffer.

Wie in der obigen Abbildung deutlich zu erkennen ist, war die Reinigung des TMV aus infiziertem Pflanzenmaterial möglich. Es zeigten sich in diesem Fall keine störenden weiteren Proteinbanden, so dass eine relativ reine Probe für das Biopanning eingesetzt werden konnte.

3.4 Ergebnisse des Biopanning mit den Ph.D.TM Phage Display Peptide Library Kits

3.4.1 Ergebnisse des Biopanning I mit den Ph.D.TM-12 Phage Display Peptide Library Kit mit exprimiertem CMV-CP und PPV-CP aus pQE_30

In der folgenden Tabelle 3.4-1 ist eine Übersicht über das Biopanning I mit exprimiertem CMV-CP und PVY-CP aus den pQE_30 Vektoren zu entnehmen (siehe Kapitel 2.2.25). Es wurden Mikrotiterplatten von *Greiner Bio-One* verwendet.

Tabelle 3.4-1 Übersicht über das Biopanning I mit CMV-CP und PPV-CP aus pQE_30

	CMV-CP	PPV-CP
Eingesetzte Menge an Hüllprotein in Biopanningrunde 1	50 µg/ml	50 µg/ml
Eingesetzte Menge an Hüllprotein in Biopanningrunde 2	50 µg/ml	50 µg/ml
Eingesetzte Menge an Hüllprotein in Biopanningrunde 3	50 µg/ml	50 µg/ml
Phagentiter im Eluat nach Biopanningrunde 1	~ 5×10 ⁶ cfu/ml	~ 4×10 ⁶ cfu/ml
Phagentiter im Amplifikat nach Biopanningrunde 1	~ 2×10 ¹² cfu/ml	~ 5,3×10 ¹¹ cfu/ml
Phagentiter im Eluat nach Biopanningrunde 2	~ 3,6×10 ⁶ cfu/ml	~ 1×10 ⁶ cfu/ml
Phagentiter im Amplifikat nach Biopanningrunde 2	~ 6,6×10 ¹¹ cfu/ml	-
Phagentiter im Eluat nach Biopanningrunde 3	~ 1,5×10 ⁷ cfu/ml	-

Wie in der obigen Tabelle gezeigt, war es im Biopanning I nicht möglich, spezifische gegen das PPV-CP gerichtete Phagen anzureichern. Schon im Eluat der zweiten Biopanningrunde war die Konzentration an Phagen sehr gering, es konnte kein Amplifikat in geeigneten Mengen gegen das PPV-CP angezogen werden. Dabei gelten laut Hersteller 10⁹ eingesetzte cfu als ausreichend für eine Biopanningrunde (*Ph.D. Phage Display Libraries: Instruction manual, New England Biolabs*). Die vom Hersteller angegebenen Größenordnungen nach der Amplifikation von 1×10¹³⁻¹⁴ cfu/ml wurden auch bei dem Biopanning mit CMV-CP nicht erreicht.

Im Folgenden wurden erste Versuche unternommen, Teile des Eluates aus der dritten Biopanningrunde auszuwerten. Dazu wurde es titriert und 10 Einzelklone angezogen. Diese wurden später vermischt und in einem ELISA mit CMV-CP und CMV infiziertem Pflanzenmaterial eingesetzt (siehe Abbildung 3.4-1). In ersten Versuchen sollte geklärt werden, ob sich die Klone als polyklonale „antibody mimics“ eignen würden, um sie danach zu separieren und einzeln zu testen.

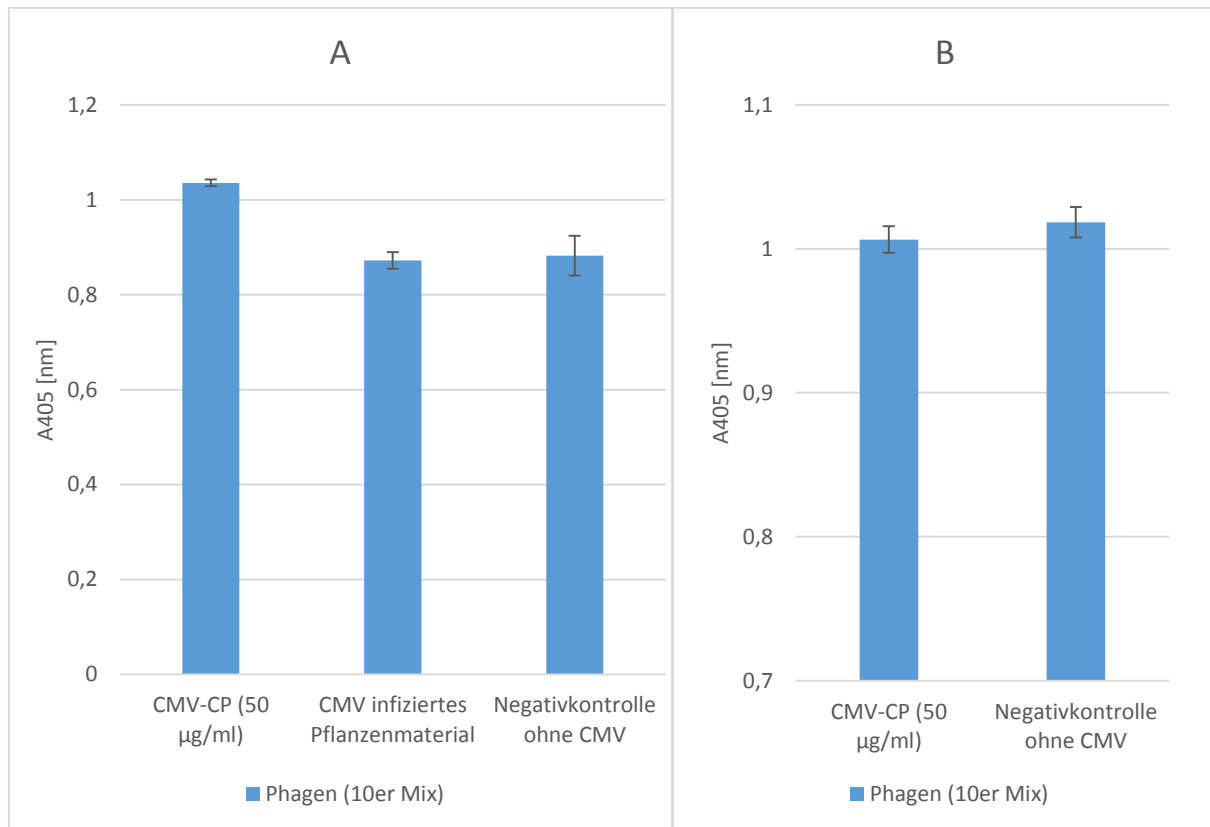


Abbildung 3.4-1 Biopanning I: Ergebnisse eines Phagen-ELISA mit CMV-CP und CMV infiziertem Pflanzenmaterial

In A und B sind ELISAs der Phagensuspensionen (1:1 in Blocklösung, 100 µl eingesetzt) bestehend aus 10 mit CMV-CP gescreenten Phagen zur Erkennung von CMV dargestellt. In A wurde zusätzlich CMV infiziertes Pflanzenmaterial eingesetzt. In beiden Fällen wurde der *plate-trapped* ELISA für den Nachweis von Antigenen mit „antibody mimics“ mit dem *Anti-fd antibody from Rabbit* und dem *Goat anti-Rabbit IgG* (alkalische Phosphatase) durchgeführt. Deutlich ist zu erkennen, dass in beiden ELISAs ein Signal mit den CMV-CP und in A mit dem CMV infizierten Pflanzenmaterial vorliegt. Jedoch liefern beide Negativkontrollen ohne den Einsatz von CMV ähnliche Werte. Mittelwert, (n=2). Messungen A: nach 30 Minuten B: nach 10 Minuten. Blocklösung: 1 % Ovalbumin.

In der obigen Abbildung sind exemplarisch zwei ELISAs mit CMV gezeigt. Es wird deutlich, dass die Phagen nicht nur beim Vorhandensein von CMV oder CMV-CP, sondern auch in den Negativkontrollen nachgewiesen werden konnten. Weitere ELISAs ergaben ähnliche Ergebnisse. Eine unspezifische Reaktion zwischen den Antikörpern untereinander oder mit dem Pflanzenmaterial konnte in weiteren hier nicht gezeigten Versuchen ausgeschlossen werden. Es wurden zusätzlich fünf Einzelkolonien ausgewählt und die spezifischen pIII-Fusionsproteinsequenzen der Phagen bestimmt (siehe Tabelle 3.4-2). Dabei wiesen die Klone 1 und 2 eine identische Sequenz auf, die anderen Phagen unterschieden sich untereinander. (Für eine Einordnung der Sequenz innerhalb des Phagens: siehe Kapitel 8.1.2).

Tabelle 3.4-2 Übersicht über Proteinsequenzen im variablen Teil des pIII ausgewählter Phagen des Biopanning I gegen CMV-CP

Klon Nr.	Sequenz	Klon Nr.	Sequenz
Ph.D. TM -12, Klon 1	HMWTLKEWRWKP	Ph.D. TM -12, Klon 4	HYTGNWGFWPGR
Ph.D. TM -12, Klon 2	HMWTLKEWRWKP	Ph.D. TM -12, Klon 5	APHKNPALSALL
Ph.D. TM -12, Klon 3	HLKYPLYMWLNP		

Im Biopanning I wurden keine für den Nachweis des CMV bzw. PPV geeigneten Phagen erhalten. Es wurde ein weiteres Biopanning mit TMV *Ohio V* durchgeführt.

3.4.2 Ergebnisse des Biopanning II mit den Ph.D.TM-12 und Ph.D.TM-C7C Phage Display Peptide Library Kits mit gereinigtem TMV (*Ohio V*)

In der folgenden Tabelle 3.4-3 findet sich eine Übersicht über das Biopanning II mit gereinigtem TMV. In diesem Fall wurde das TMV vor der Verwendung mit Ammoniumsulfat gefällt und danach die Proteinkonzentration in einem Bradford bestimmt. Es wurden die Mikrotiterplatten von *Greiner Bio-One* verwendet.

Tabelle 3.4-3 Übersicht über das Biopanning II mit gereinigtem TMV

	Ph.D. TM -C7C	Ph.D. TM -12
Eingesetzte Menge TMV <i>Ohio V</i> in Biopanningrunde 1	100 µg/ml	100 µg/ml
Eingesetzte Menge TMV <i>Ohio V</i> in Biopanningrunde 2	100 µg/ml	100 µg/ml
Eingesetzte Menge TMV <i>Ohio V</i> in Biopanningrunde 3	100 µg/ml	100 µg/ml
Phagentiter im Eluat nach Biopanningrunde 1	~ 2,5×10 ⁵ cfu/ml	~ 2×10 ⁵ cfu/ml
Phagentiter im Amplifikat nach Biopanningrunde 1	~ 2,1×10 ¹² cfu/ml	~ 1,18×10 ¹² cfu/ml
Phagentiter im Eluat nach Biopanningrunde 2	~ 1,5×10 ⁶ cfu/ml	~ 3,4×10 ⁷ cfu/ml
Phagentiter im Amplifikat nach Biopanningrunde 2	~ 2,7×10 ¹² cfu/ml	~ 2,4×10 ¹² cfu/ml
Phagentiter im Eluat nach Biopanningrunde 3	~ 8×10 ⁵ cfu/ml	~ 1×10 ⁸ cfu/ml

Parallel zu dem in Kapitel 3.4.1 gezeigten Biopanning I wurden die Bibliotheken Ph.D.TM-C7C und Ph.D.TM-12 mit Ammoniumsulfat gefälltem TMV *Ohio V* gescreent. Es wurden im Folgenden wieder Einzelklone angezogen und zu einer Suspension vereint. Jeweils zwölf Phagen beider Bibliotheken wurden nach der Anzucht in gleichen Mengen vermischt und in einem ELISA mit TMV *Ohio V* eingesetzt (siehe Abbildung 3.4-2).

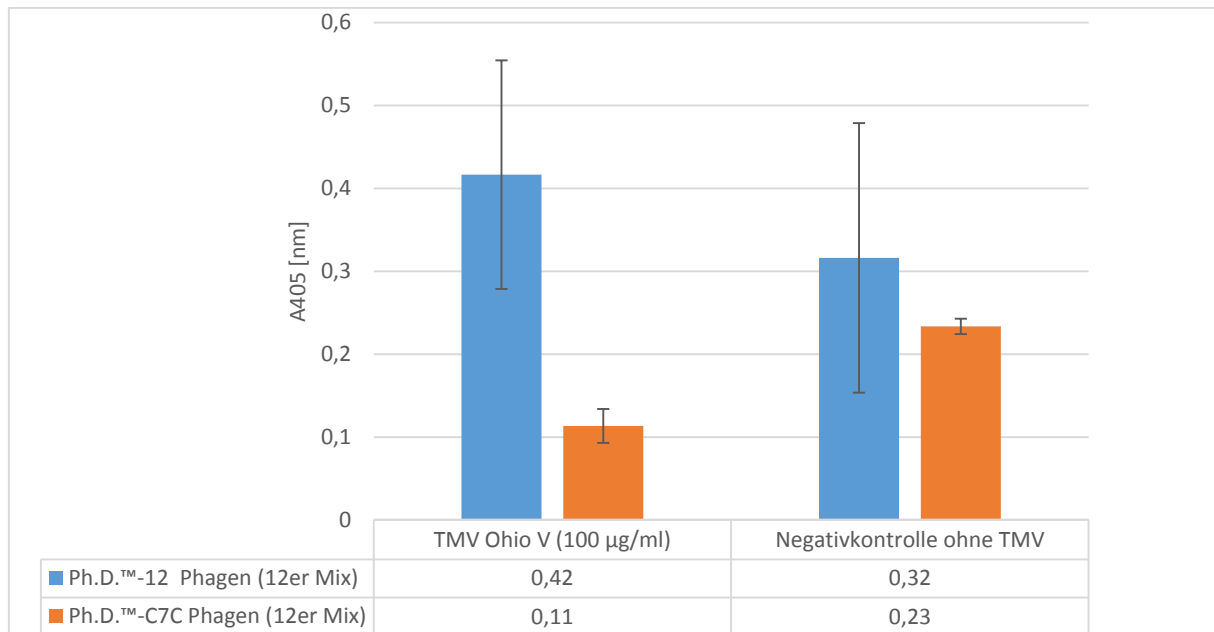


Abbildung 3.4-2 Biopanning II: Ergebnisse eines Phagen-ELISA mit TMV *Ohio V* (Grobreinigung)

In der obigen Abbildung ist ein ELISA der Phagensuspensionen (1:1 in Blocklösung, 100 µl eingesetzt) bestehend aus jeweils zwölf Klonen der mit TMV *Ohio V* gescreenten Phagen dargestellt. Es wurde der *plate-trapped* ELISA für den Nachweis von Antigenen mit „*antibody mimics*“ mit dem *Anti-fd antibody from Rabbit* und dem *Goat anti-Rabbit IgG* (alkalische Phosphatase) angewandt. Deutlich ist zu erkennen, dass in beiden Reaktionen ein starkes Signal der Negativkontrolle und insgesamt eine hohe Varianz innerhalb der Reaktion vorlag. Im Fall der Phagensuspension der C7C Phagen gibt die Negativkontrolle ein mehr als doppelt so hohes Signal als die eigentliche Reaktion mit dem TMV *Ohio V*. Eine eindeutige Zuordnung positiver und negativer Proben ist somit nicht möglich. (n=2). Messung nach 18 Stunden. Blocklösung: 1 % Ovalbumin.

Wie anhand der obigen Abbildung exemplarisch gezeigt werden kann, war es nicht möglich, das TMV verlässlich mit einer Phagensuspension nachzuweisen, da die jeweiligen Negativkontrollen starke Signale lieferten. Im Folgenden wurden einzelne Klone der gescreenten Ph.D.TM-12 Bibliothek ausgewählt und sequenziert, um generelle Aussagen über die Häufigkeit verschiedener Proteinsequenzen tätigen und eventuell Aussagen über die Gründe der hohen ELISA Werte in den Negativkontrollen treffen zu können (siehe Tabelle 3.4-4). (Für eine Einordnung der Sequenz innerhalb des Phagens: siehe Kapitel 8.1.2).

Tabelle 3.4-4 Übersicht über Proteinsequenzen im variablen Teil des pIII ausgewählter Phagen des Biopanning II

Klon Nr.	Sequenz	Klon Nr.	Sequenz
Ph.D. TM -12, Klon 1	DWAQLTQRWYLR	Ph.D. TM -12, Klon 6	WHWAPYFPWPVA
Ph.D. TM -12, Klon 2	WHPTLNPYMREP	Ph.D. TM -12, Klon 7	WHWAPYFPWPVA
Ph.D. TM -12, Klon 3	DWAQLTQRWYLR	Ph.D. TM -12, Klon 8	HGRHFEFWPTGS
Ph.D. TM -12, Klon 4	WHWAPYFPWPVA	Ph.D. TM -12, Klon 9	WYPWSTTWAPPA
Ph.D. TM -12, Klon 5	DWAQLTQRWYLR	Ph.D. TM -12, Klon 10	WHWAPLFSVACC

Dabei zeigte sich, dass zwei Proteinsequenzen jeweils dreimal (Klon 1, 3, 5 und Klon 4, 6, 7) vorkamen. Mit den Ergebnissen der Sequenzierung wurde außerdem deutlich, dass eine Akkumulation von Sequenzen stattgefunden hatte, die Motive aufwiesen, die bekannt für eine Proteinbindung an Plastikoberflächen sind (Vodnik *et al.* 2011). Dabei werden unter anderem die Motive „WXXW“, „WHXW“, „WHW“ und „FHENWPS“ als schon bekannte oder potentielle „Plastikbinder“ erwähnt. Nach einem Vergleich mit den vorliegenden Sequenzen wurden für weitere Versuche deshalb die Phagen 1, 3 und 5 verwendet, denen diese Motive fehlen. Die Ergebnisse beider Biopannings legen den Schluss nah, dass die Mikrotiterplatten offensichtlich nicht vollständig geblockt werden konnten und den modifizierten pIII-Proteinen der Phagen somit eine Interaktion mit der Plastikoberfläche möglich war. Um dieses Problem genauer charakterisieren zu können, wurde ein sogenannter K4-Phage (Lunder *et al.* 2008) in einem M13K07 Hintergrund erstellt, der eine spezifische Streptavidin bindende Sequenz aufwies. Mit diesem wurden Versuche unternommen, um eine mögliche störende Interaktion mit der Plastikoberfläche zeigen zu können. Zusätzlich wurde der Mikrotiterplattentyp verändert und dem ELISA von Lunder angepasst (Lunder *et al.* 2008). Außerdem wurde ein HRP/Anti-M13 Konjugat verwendet, um die Anzahl der benötigten Antikörper für die finale Nachweisreaktion zu reduzieren. Darüber hinaus wurde die Blocklösung von Ovalbumin (1 % (w/v)) auf Milchpulver (2 % (w/v)) umgestellt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 3.4-3 gezeigt.

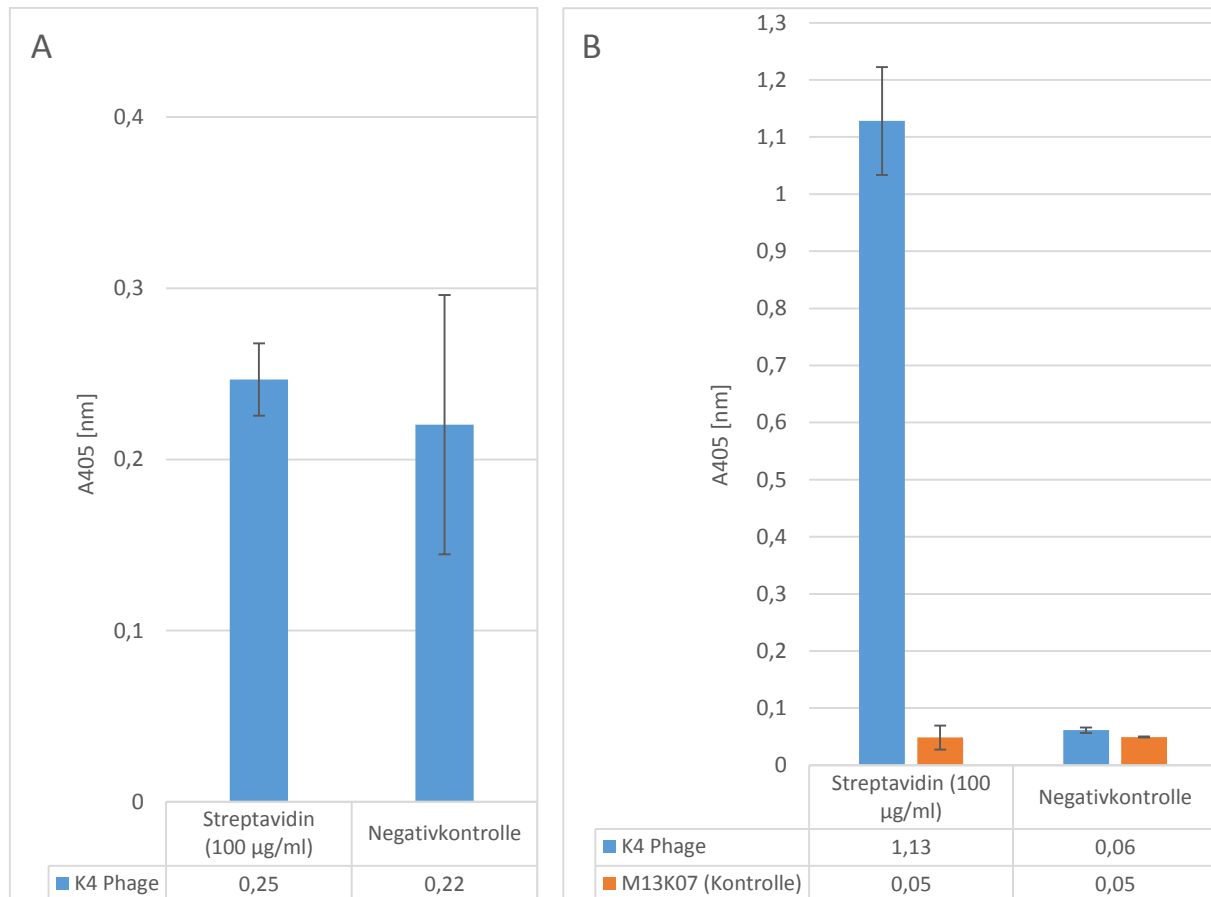


Abbildung 3.4-3 Ergebnisse von zwei Phagen-ELISAs mit den K4 Phagen mit Streptavidin, Entwicklung der Methode

In der obigen Abbildung sind in den ELISAs K4 Phagen (1:1 in Blocklösung, 100 µl eingesetzt) eingesetzt worden. In A wurde der *plate-trapped* ELISA für den Nachweis von Antigenen mit „*antibody mimics*“ mit dem *Anti-fd antibody from Rabbit* und dem *Goat anti-Rabbit IgG* (alkalische Phosphatase) angewandt. Es wurden Mikrotiterplatten von Greiner *Bio-One* und Ovalbumin (1 % (w/v)) als Blocklösung eingesetzt. Der Aufbau entspricht somit im Wesentlichen den ELISAs der Biopannings I und II. Auch hier zeigten sich relativ hohe Messwerte in der Negativkontrolle. In Abbildung B ist die optimierte Variante gezeigt. Die Blocklösung besteht aus 2 % Milchpulver (w/v), Mikrotiterplatten von Nunc wurden verwendet und der Nachweis von gebundenen Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Um zu zeigen, dass keine grundsätzlichen Interaktionen mehr mit Phagen vorliegen, wurde außerdem der Helferphage M13K07 im ELISA eingesetzt. Der positive Nachweis von Streptavidin ist im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich zu erkennen. Mittelwert, (n=3). Messung nach 30 Minuten.

Die in der obigen Abbildung in A gezeigten Ergebnisse stimmten mit den Resultaten der bisherigen ELISAs überein. Es ließen sich wieder Reaktionen mit den Negativkontrollen nachweisen. Das in B sichtbare Ergebnis ist das Endprodukt verschiedener Anpassungen der Methode. Neben Milchpulver als Blocklösung (2 % (w/v)) wurden ab diesem Zeitpunkt auch Mikrotiterplatten der Firma Nunc verwendet, sie ersetzten die Mikrotiterplatten von *Greiner*

Bio-One. Außerdem wurde der ELISA in B auf den Nachweis der Phagen mit dem HRP/Anti-M13-Konjugat umgestellt und verschiedene Inkubationszeiten verändert. Die Reaktionen in den Negativkontrollen konnten so im Vergleich zu dem Streptavidinnachweis stark reduziert werden (1,13 zu 0,06). Mit diesen Anpassungen wurden die TMV Phagen der Klone 1/3/5 aus dem Biopanning mit der Fusionssequenz „DWAQLTQRWYLR“ in weiteren ELISAs getestet. Exemplarisch hierfür steht das in Abbildung 3.4-4 gezeigte Ergebnis.

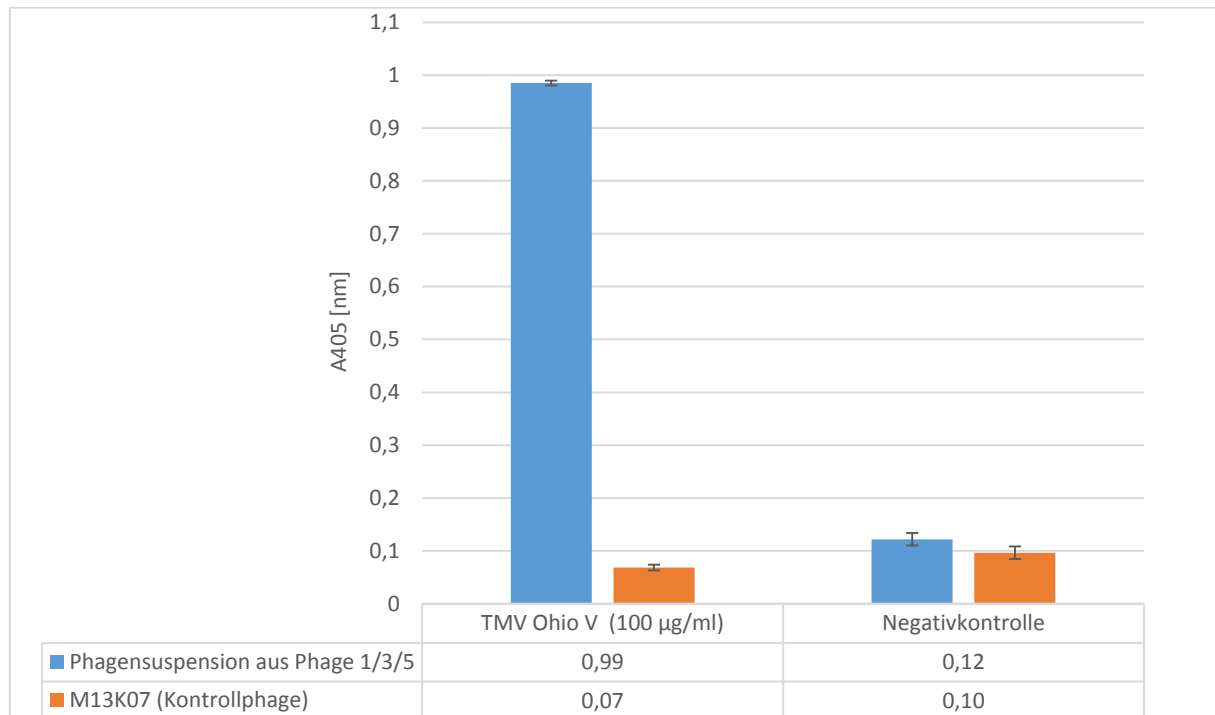


Abbildung 3.4-4 Ergebnisse eines *plate-trapped* Phagen-ELISA mit der Phagensuspension 1/3/5 und dem Phagen M13K07 mit gereinigtem TMV *Ohio V*

In der obigen Abbildung ist in dem ELISA die Phagensuspension bestehend aus gleichen Anteilen der TMV Phagen 1/3/5 eingesetzt worden, zusätzlich diente der M13K07 Phage als Kontrolle (1:1 in Blocklösung bestehend aus 2 % (w/v) Milchpulver, 100 µl eingesetzt). Der Nachweis von gebundenen Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Deutlich wird, dass die Suspension nur mit dem TMV *Ohio V* reagiert und nicht mit der geblockten Mikrotiterplatte (Nunc). Mittelwert, (n=3). Messung nach 20 Minuten.

In der obigen Abbildung wird deutlich, dass die Phagensuspension mit dem gereinigtem TMV *Ohio V* reagierte. Die Signale waren ungefähr achtmal stärker als die der Negativkontrolle (0,99 zu 0,12). Der Kontrollphage zeigte keine Reaktion. Die veränderte Methode führte somit zu den gewünschten Ergebnissen und wurde im Folgenden weiterverwendet. Nachdem eine Interaktion mit Plastik ausgeschlossen werden konnte, wurde in den nächsten Versuchen infiziertes und gesundes Pflanzenmaterial in einem ELISA eingesetzt (siehe Abbildung 3.4-5).

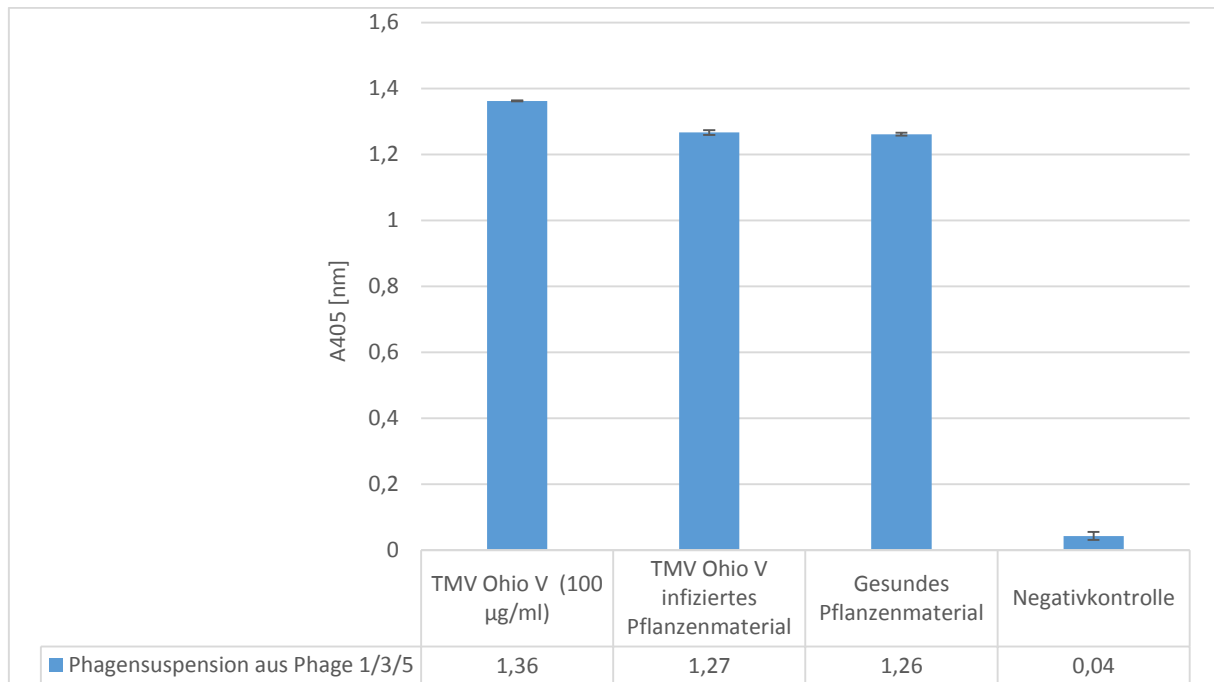


Abbildung 3.4-5 Ergebnisse eines *plate-trapped* Phagen-ELISA der Phagensuspension 1/3/5 mit TMV *Ohio V* infiziertem und gesundem Pflanzenmaterial

Gezeigt wird der Phagen ELISA mit TMV *Ohio V* und der Phagensuspension 1/3/5 (1:1 in Blocklösung). Es wird deutlich, dass neben dem TMV und der infizierten Pflanze zusätzlich auch das gesunde Pflanzenmaterial erkannt wurde. Der Nachweis von gebundenen Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Mittelwert, (n=3). Messung nach 40 Minuten.

Wie in der obigen Abbildung zu sehen, war es nicht möglich, TMV in infiziertem Pflanzenmaterial nachzuweisen. Die durchschnittlichen Absorptionswerte lagen bei 1,36 (TMV *Ohio V*), 1,27 (infiziertes Pflanzenmaterial) und 1,26 (gesundes Pflanzenmaterial) bei einer Negativkontrolle von 0,043. Die Standardabweichungen waren minimal. Durch die Reaktion mit dem gesunden Pflanzenmaterial war von einer möglichen unspezifischen Reaktion auszugehen. Da das Biopanning nach der alten Methode mit den Mikrotiterplatten von Greiner *Bio-One* durchgeführt wurde, war eine möglicherweise verstärkte Amplifikation und Selektion auf „Plastikbinder“ im Screening denkbar. Als Reaktion wurde ein Biopanning mit den optimierten Methoden durchgeführt.

3.4.3 Ergebnisse des Biopanning III mit den Ph.D.TM-12 und Ph.D.TM-C7C Phage Display Peptide Library Kits mit gereinigtem TMV *Ohio V* und exprimierten Hüllproteinen von CMV, PPV, PVY und TSWV aus den pQE_30 Vektoren

Als Reaktion auf die mögliche Akkumulation sogenannter „Plastikbinder“ in den Eluaten der beiden Biopanningrunden I und II wurde ein weiteres Biopanning durchgeführt. In diesem Fall wieder mit beiden Bibliotheken und bakteriell exprimierten Hüllproteinen beziehungsweise gereinigtem TMV. In der folgenden Tabelle 3.4-5 wird eine kurze Übersicht über das Biopanning III mit gereinigtem TMV und exprimierten Hüllproteinen des CMV, PPV, PVY und TSWV gegeben. Es wurden die Mikrotiterplatten von Nunc verwendet.

Tabelle 3.4-5 Übersicht über das Biopanning III mit gereinigtem TMV *Ohio V* und exprimierten Hüllproteinen des CMV, PPV, PVY und TSWV

	Ph.D. TM -C7C	Ph.D. TM -12
Eingesetzte Menge TMV <i>Ohio V</i> in jeder Biopanningrunde	80 µg/ml	80 µg/ml
Eingesetzte Menge CMV-CP in jeder Biopanningrunde	80 µg/ml	80 µg/ml
Eingesetzte Menge PPV-CP in jeder Biopanningrunde	80 µg/ml	80 µg/ml
Eingesetzte Menge PVY-CP in jeder Biopanningrunde	80 µg/ml	80 µg/ml
Eingesetzte Menge TSWV-CP in jeder Biopanningrunde	80 µg/ml	80 µg/ml

Beide Bibliotheken wurden erneut mit Ammoniumsulfat gefälltem TMV *Ohio V* gescreent. Nach den einzelnen Runden wurde diesmal nur der Titer von Verdünnungen bis 1:10000 des Amplifikats auf das Vorhandensein von Phagen überprüft. Jede weitere Runde wurde in diesem Biopanning mit je 100 µl des amplifizierten Eluats durchgeführt, wobei das Biopanning mit CMV-CP nach der zweiten Runde eingestellt werden musste, da in beiden Eluaten zu wenig Phagen vorlagen.

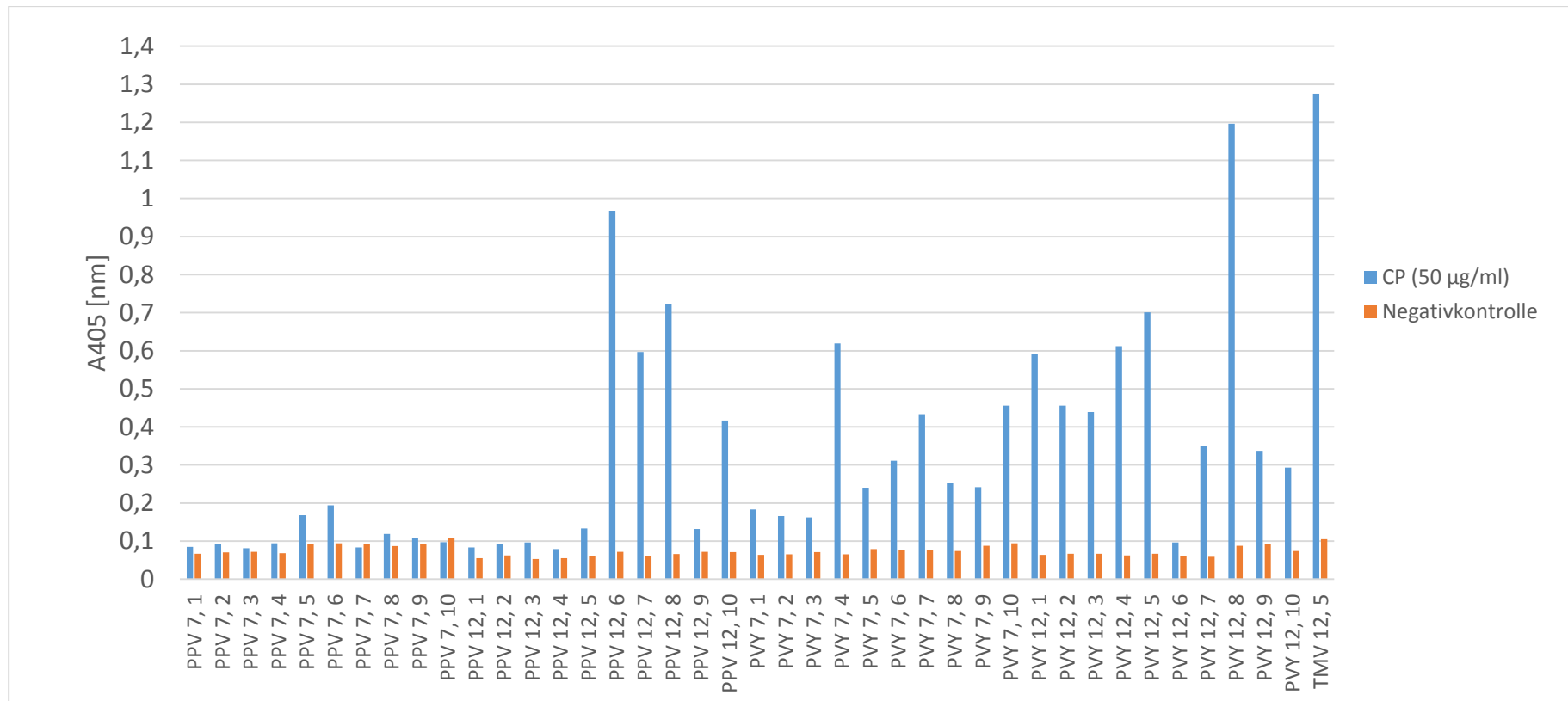


Abbildung 3.4-6 Ergebnisse des Phagen-ELISA nach dem Biopanning III mit je zehn Klonen aus beiden Bibliotheken mit PPV-CP und PVY-CP

In der obigen Abbildung ist der Phagen-ELISA gegen das jeweilige CP gezeigt. Dabei bezeichnet der Virusname das CP, welches im Biopanning eingesetzt wurde, die erste Zahl den Bibliothekstyp und die Zahl hinter dem Komma den Klon. Der TMV 5 Klon aus der Biopanningrunde II ist als Kontrolle ebenfalls getestet worden. Deutlich ist zu erkennen, dass einige Phagen keine Reaktion mit dem jeweiligen Hüllprotein aufweisen, während andere Phagen starke Unterschiede zeigen (zum Beispiel: PPV 12,6; PPV 12,8; PVY 7,4; PVY 12,5 und PVY 12,8). Der Nachweis von gebundenen Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Messung nach 50 Minuten.

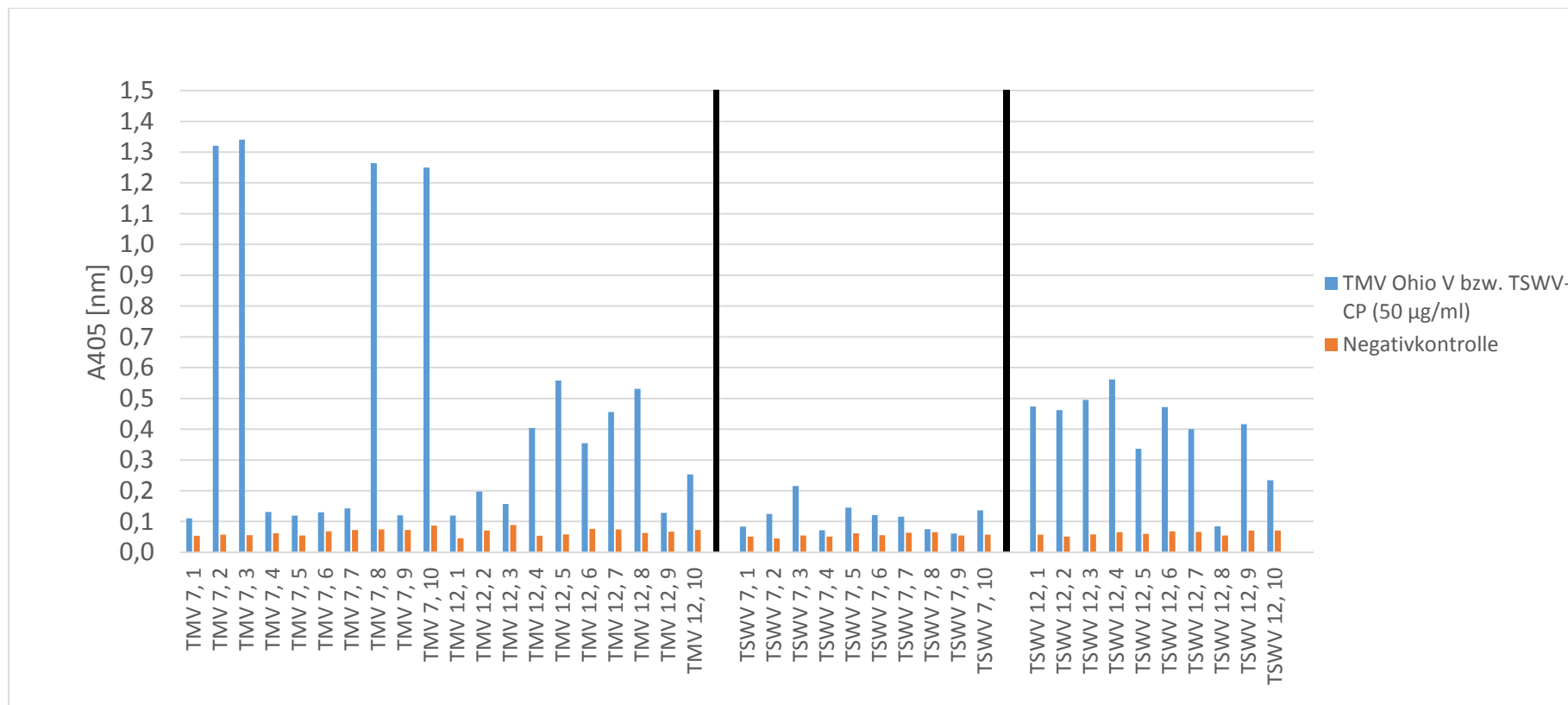


Abbildung 3.4-7 Ergebnisse von drei Phagen-ELISAs nach dem Biopanning III mit je zehn Klonen aus beiden Bibliotheken mit TMV *Ohio V* und dem TSWV-CP

In der obigen Abbildung sind Phagen-ELISAs gegen das TSWV-CP beziehungsweise die Grobreinigung des TMV *Ohio V* gezeigt. Dabei bezeichnet der Virusname das CP, welches im Biopanning eingesetzt wurde, die erste Zahl den Bibliothekstyp und die Zahl hinter dem Komma den Klon. Für den besseren Überblick werden die Ergebnisse in einer Abbildung gezeigt, jedoch sind drei ELISAs zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden. Dies wird durch die schwarzen Trennstriche dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass einige Phagen keine Reaktion mit dem jeweiligen *target* aufwiesen, während andere Phagen Unterschiede in ihren Reaktionen zeigten (zum Beispiel: TMV 12,5; TMV 12,7; TMV 12,8; TMV 7,2; TMV 7,3; TMV 7,8; TMV 7,10; TSWV 7,2; TSWV 7,3; TSWV 7,4; TSWV 12,1; TSWV 12,2). Der Nachweis von gebundenen Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Messungen nach 12 Minuten, 70 Minuten bzw. 20 Minuten.

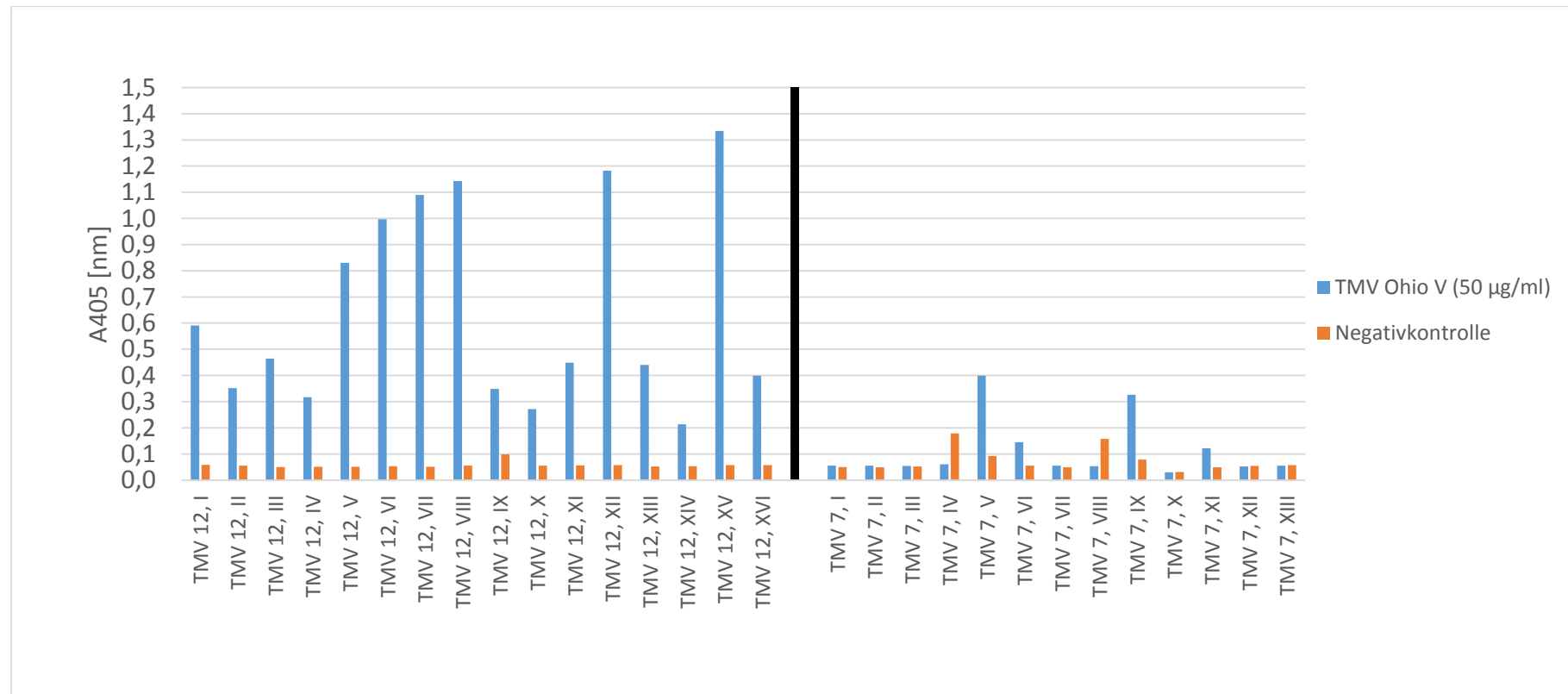


Abbildung 3.4-8 Ergebnisse von zwei Phagen-ELISAs nach dem Biopanning III mit je 15 Klonen aus der Bibliothek Ph.D.TM-12 und 13 Klonen aus der Bibliothek Ph.D.TM-C7C mit TMV *Ohio V*

In der obigen Abbildung sind weitere Phagen-ELISAs gegen die Grobreinigung des TMV *Ohio V* gezeigt. Für den besseren Überblick werden die Ergebnisse in einer Abbildung gezeigt, jedoch sind zwei ELISAs zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden. Dies wird durch den schwarzen Trennstrich dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass einige Phagen keine Reaktion mit dem jeweiligen *target* aufwiesen, während andere Phagen Unterschiede in ihren Reaktionen zeigten. Im Vergleich reagierten mehr lineare (12er Bibliothek) als zirkuläre (7bener Bibliothek) Phagen erfolgreich. Der Nachweis von gebundenen Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Messungen nach 90 bzw. 60 Minuten.

Von ausgewählten Phagen wurde die DNA-Sequenz des pIII-Fusionsproteins bestimmt und anschließend translatiert. (Für eine Einordnung der Sequenz innerhalb des Phagens: siehe Kapitel 8.1.2)

Tabelle 3.4-6 Übersicht über Sequenzen ausgewählter pIII-Fusionsproteine des Biopanning III

Klon Nr.	Sequenz	Klon Nr.	Sequenz
PPV Ph.D. TM -12, Klon 6	TTHLHYRAHLHR	TMV Ph.D. TM -7, Klon 3	LWGWYGA
PPV Ph.D. TM -12, Klon 7	HYKHLHSLHTRT	TMV Ph.D. TM -7, Klon 8	LWGWYGA
PPV Ph.D. TM -12, Klon 8	TTHLHYRAHLHR	TMV Ph.D. TM -7, Klon 10	LWGWYGA
PPV Ph.D. TM -12, Klon 10	TTHLHYRAHLHR	TMV Ph.D. TM -12, Klon 5	WHPTLNPYMREP
PVY Ph.D. TM -7, Klon 4	NRWHHLE	TMV Ph.D. TM -12, Klon 7	WHPTLNPYMREP
PVY Ph.D. TM -7, Klon 10	ASSICMS	TMV Ph.D. TM -12, Klon 8	WHPTLNPYMREP
PVY Ph.D. TM -12, Klon 4	WQFHFGTPIRHT	TMV Ph.D. TM -7, V	LWGWYGA
PVY Ph.D. TM -12, Klon 5	WQFHFGTPIRHT	TMV Ph.D. TM -7, IX	LWGWYGA
PVY Ph.D. TM -12, Klon 8	HWWQSHSQRYPT	TMV Ph.D. TM -12, XV	NPHDFSHFPHVR
TMV Ph.D. TM -7, Klon 2	LWGWYGA		

In den vorherigen Abbildungen (Abbildung 3.4-6, Abbildung 3.4-7, Abbildung 3.4-8) wird deutlich, dass nach einem Biopanning noch viele Phagen, die nicht mit dem Zielmolekül binden, vorliegen. Diese müssen durch das Screening entfernt werden. Durch die Sequenzierung zeigte sich außerdem, dass es zu einer Anhäufung einzelner Fusionssequenzen kommt (siehe Tabelle 3.4-6). So entsprechen einzelne Phagenklone einander in ihrem Fusionsprotein und zeigten jeweils eine positive Reaktion auf das Zielmolekül (zum Beispiel Phage TMV Ph.D.TM-12, Klon 5,7 und 8 oder PVY Ph.D.TM-12, Klon 4 und 5). In weiteren ELISAs stellte sich jedoch auch hier heraus, dass alle genauer untersuchten Phagen (Phagenklone aus Tabelle 3.4-6, außerdem die Phagenklone TSWV Ph.D.TM-7, Klon 2; TSWV Ph.D.TM-7, Klon 3; TSWV Ph.D.TM-7, Klon 4; TSWV Ph.D.TM-12, Klon 1; TSWV Ph.D.TM-12, Klon 2) unspezifische Reaktionen zeigten und keine eindeutigen Nachweise der jeweiligen Viren erlaubten. Um zu überprüfen, ob diese Reaktionen durch Veränderungen innerhalb der Methode minimiert werden können, wurden im Weiteren verschiedene Anpassungen angewendet, die im folgenden Kapitel gezeigt werden sollen.

3.4.4 Anpassungen der ELISAs für die Minimierung der unspezifischen Reaktionen von ausgewählten Klonen

Um genauere Untersuchungen der unspezifischen Reaktionen durchführen zu können, wurden in einem ersten Schritt drei häufig vorkommende Proteinsequenzen der Fusionsproteine mit der Linkersequenz in den Hintergrund der M13K07 Phagen kloniert. Auch hier führt die Expression des Gens zu einem Fusionsprotein mit dem pIII. Im Gegensatz zu dem Ph.D.TM Klonierungsvektor (M13KE) hat der M13K07 Phage zusätzlich ein Gen für eine Kanamycinresistenz. Dies erleichterte die Selektion infizierter Bakterien. Außerdem wurden ausschließlich gegen das TMV gerichtete Sequenzen ausgewählt, da dieses Virus relativ einfach gereinigt werden konnte und somit in größeren Mengen zur Verfügung stand.

Tabelle 3.4-7 Übersicht über Proteinsequenzen im pIII von M13K07 Phagen

Klon Nr.	Sequenz	Klon im M13K07 Hintergrund
Ph.D. TM -12, Klon 1, Biopanning II	DWAQLTQRWYLR	M13K07TMV1
TMV Ph.D. TM -7, Klon 10, Biopanning II	LWGWYGA	M13K07TMVC1
TMV Ph.D. TM -12, Klon 8, Biopanning II	WHPTLNPYMREP	M13K07TMV2

Auch die in der obigen Tabelle gezeigten M13K07 Phagen mit den Fusionsproteinen zeigten unspezifische Reaktionen mit gesundem Pflanzenmaterial in den verschiedenen Anpassungen der Methode. Es wurde außerdem deutlich, dass die Phagen auch mit dem gereinigten TMV *Vulgare* reagierten. Veränderungen der Inkubationszeiten, dem pH-Wert, der Blocklösung, der Konzentrationen verschiedener Arbeitslösungen und unterschiedlichen Verdünnungen der Phagen und den Reaktionslösungen führten zu keiner nennenswerten Reduktion der Signale von Negativkontrollen mit gesundem Pflanzenmaterial, teilweise waren die Signale sogar höher als bei den Positivkontrollen. Wie in der folgenden Abbildung dargestellt, variierte diese Reaktion jedoch abhängig vom Pflanzenmaterial voneinander.

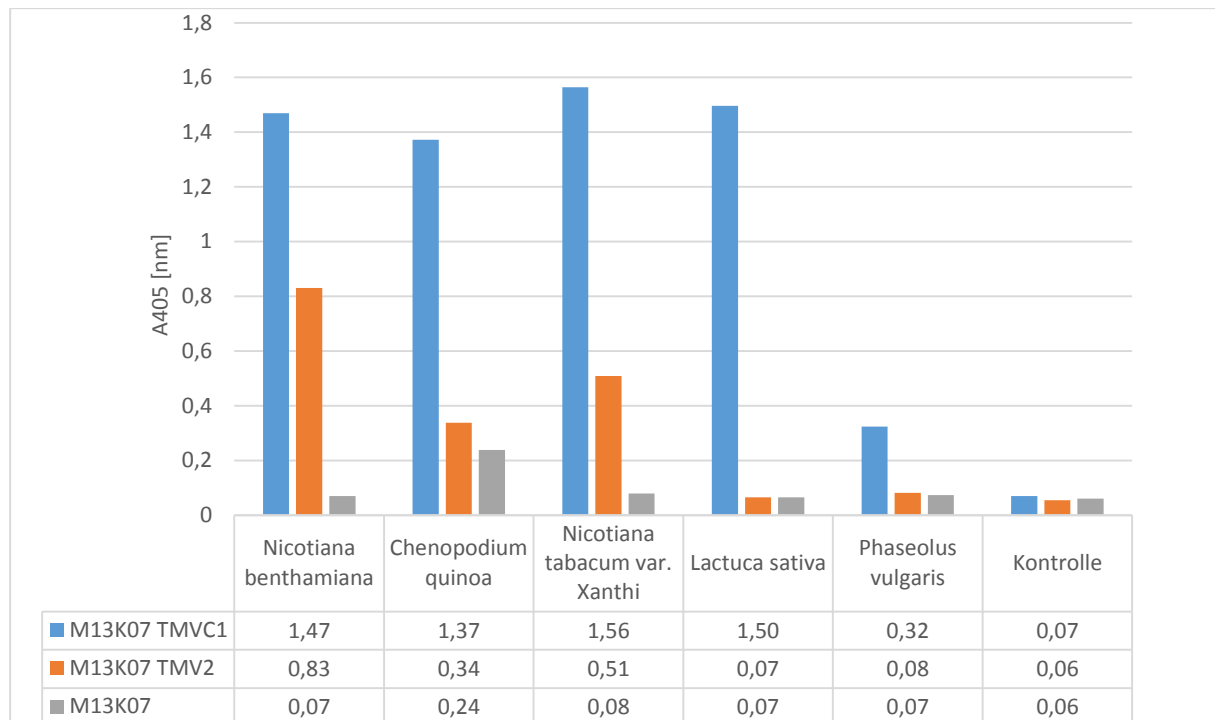


Abbildung 3.4-9 Ergebnisse eines *plate-trapped* Phagen-ELISA mit nicht infiziertem Pflanzenmaterial verschiedener Pflanzenarten.

Gezeigt wird der *plate-trapped* Phagen ELISA mit nicht infiziertem Pflanzenmaterial. Es wird deutlich, dass die Phagen mit dem pIII-Fusionsprotein (1:1 in Blocklösung, 100 µl eingesetzt) im Gegensatz zum Wildtyp (M13K07) zu unspezifischen Reaktionen mit dem Pflanzenmaterial neigten und diese nach Pflanzenart unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Nur bei *C. quinoa* zeigt auch der Wildtypphage eine leichte Reaktion. Der Nachweis der Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Messung nach 40 Minuten.

In der obigen Abbildung wird gezeigt, dass sich die unspezifische Reaktion mit dem Pflanzenmaterial nicht nur auf *N. benthamiana* begrenzt, sondern auch bei anderen Pflanzen auftritt. Dabei sind die Unterschiede abhängig von den eingesetzten Phagen teilweise relativ stark, zum Beispiel bei: M13K07 TMVC1 *N. benthamiana*: 1,47 zu *Phaseolus vulgaris*: 0,32. Der Kontrollphage M13K07 zeigt eine schwächere Reaktion mit *C. quinoa*, bei den anderen Versuchen ist kein positives Signal nachzuweisen. Wie schon früher gezeigt, liegt also kein grundsätzliches Problem einer Phagen-Pflanzen-Bindung vor. Zusätzlich fällt auf, dass der Phage M13K07 TMVC1 mit dem zirkulären Fusionsprotein stärkere Interaktionen mit dem Pflanzenmaterial aufweist, als der lineare Phage M13K07 TMV2.

Um zu überprüfen, ob möglicherweise die Linkersequenz zwischen dem pIII und dem Fusionsprotein oder die beiden Cysteinreste in den zirkulären Peptiden für die Interaktion mit dem Pflanzenmaterial verantwortlich war, wurde der gegen Streptavidin gerichtete K4-Phage

mit der identischen Linkersequenz, die die bisher eingesetzten Phagen aufwiesen, zusätzlich mit Pflanzenmaterial getestet.

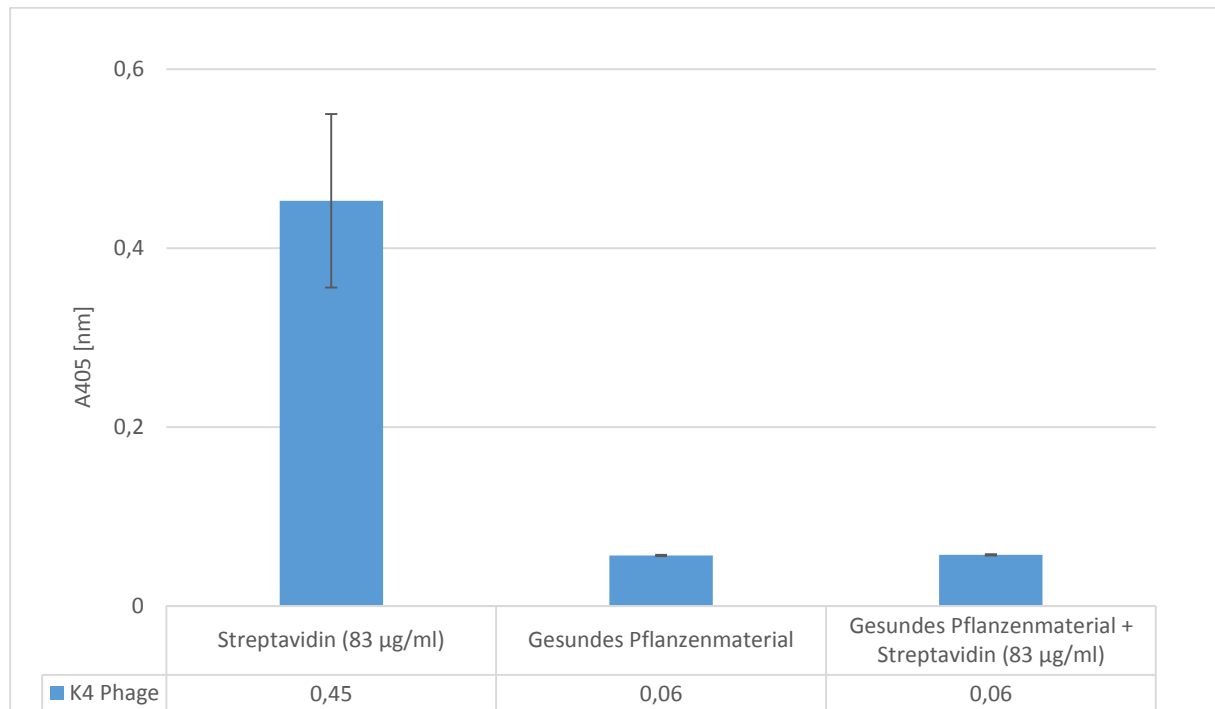


Abbildung 3.4-10 Ergebnisse eines *plate-trapped* Phagen-ELISA des K4 Phagen gegen gesundes Pflanzenmaterial.

In der obigen Abbildung ist zu erkennen, dass der Streptavidin spezifische K4 Phage zu keiner Reaktion mit dem Pflanzenmaterial führte. Der Nachweis der Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Mittelwert, (n=2). 90 Minuten.

Wie in der obigen Abbildung deutlich wird, besteht keine Reaktion zwischen dem K4 Phagen und gesundem Pflanzenmaterial (0,06). Mit Streptavidin liegt hingegen eine Reaktion vor (0,45). Somit ist es unwahrscheinlich, dass die spezifische Linkersequenz, die alle Phagen aus diesen Peptidbanken besitzen, für die Reaktion mit Pflanzenmaterial verantwortlich ist. Nachträglich zugesetztes Streptavidin wird jedoch in Pflanzenmaterial nicht erkannt (0,06).

Obwohl in den PAGEs zu der Aufreinigung des TMV mit Ammoniumsulfat (siehe Kapitel 3.3) neben den TMV-CPs keine weiteren, möglicherweise den Nachweis störenden Proteinbanden identifiziert werden konnten, war es trotzdem möglich, dass Bestandteile der Pflanze, die sich in einer PAGE nicht anfärben ließen, vorlagen und für die unspezifischen Interaktionen in den ELISAs verantwortlich waren. Deshalb wurde in einem weiteren Versuch das TMV infizierte Pflanzenmaterial mit einer anderen Reinigungsmethode bearbeitet und wiederum untersucht (siehe Abbildung 3.4-11).

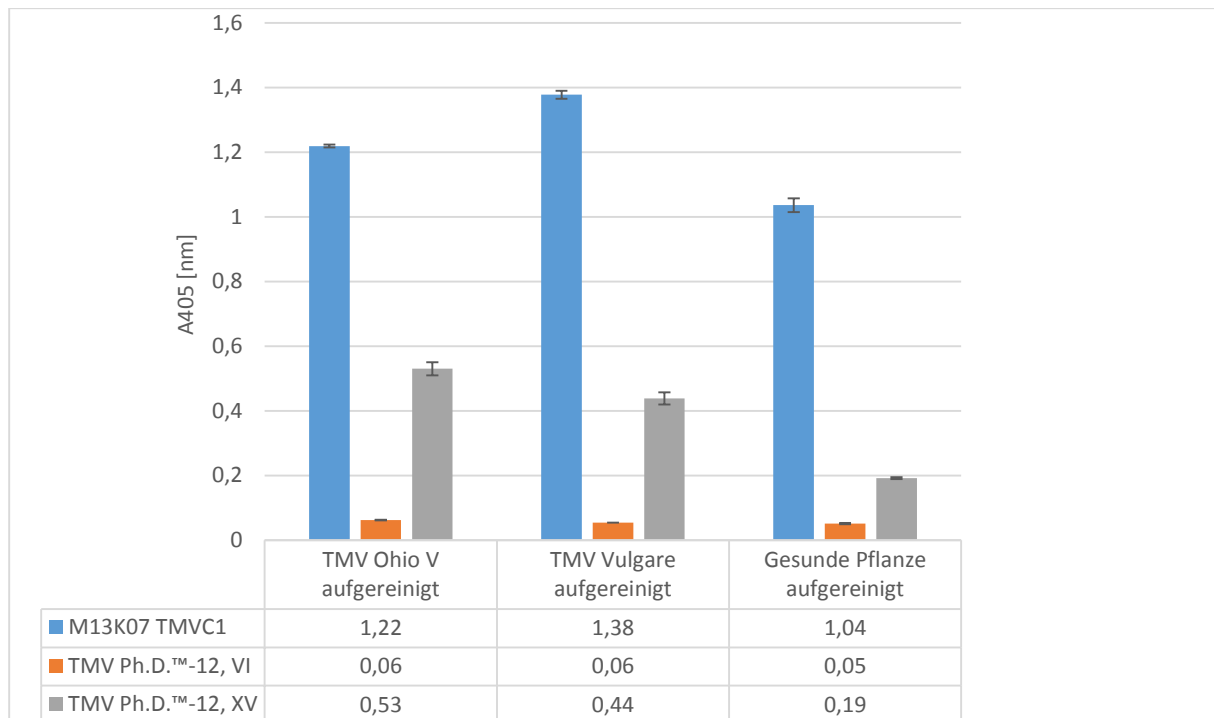


Abbildung 3.4-11 Ergebnisse eines Phagen-ELISAs mit gereinigten TMV Stämmen

In der obigen Abbildung ist zu erkennen, dass bei einer Butanol/Chloroform Fällung (siehe Kapitel 2.2.22) mit gesundem und TMV infiziertem Pflanzenmaterial die Möglichkeit besteht, die unspezifischen Reaktionen mit dem Pflanzenmaterial zu reduzieren (Nachweis mit dem Phagen TMV Ph.D.TM-12, XV). Hier zeigte die gesunde Pflanzenkontrolle eine geringere Reaktion als die infizierten Proben. Bei dem Phagen M13K07TMVC1 zeigte sich nur ein geringer Unterschied in den Messgrößen, hier liegt eine unspezifische Reaktion weiterhin vor. Der Nachweis der Phagen erfolgt mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Mittelwert, (n=2). Messung nach 90 Minuten.

Es gelang bei einem Phagenklon (TMV Ph.D.TM-12, XV) ein eindeutiges positives Signal (0,53) bei gleichzeitigem niedrigem Signal der Kontrolle (0,19) nachzuweisen. Auch bei diesem Versuch war der eindeutige Nachweis von TMV mit dem Phagen M13K07 TMVC1 nicht erfolgreich. Da zusätzlich diese Art der Pflanzenvirusreinigung nur bei TMV erfolgreich und dazu relativ zeitaufwändig war, wurden keine weiteren Versuche mit anderen Klonen durchgeführt. Zusätzlich zu den oben genannten Ansätzen wurden verschiedene Eluate aus den dritten Panningrunden ein weiteres Mal in einer einzelnen Biopanningrunde eingesetzt, um den Selektionsdruck auf bindende Phagen zu erhöhen. Dadurch wurden weitere 144 Phagenklone gegen unterschiedliche Viren bzw. Hüllproteine in ELISAs getestet. Es war jedoch auch hier unmöglich, einen positiven Nachweis ohne eine unspezifische Reaktion zu erbringen (siehe Tabelle 3.4-8). Somit wurden die Arbeiten mit den Peptidbibliotheken eingestellt und weitere Biopannings mit scFv-Bibliotheken durchgeführt.

Tabelle 3.4-8 Ergebnisse der 144 weiteren Phagenklone

Versuchsnr.	<i>target</i>	Keine Reaktion mit Virusreinigung bzw. exprimiertem CP und gesundem Pflanzenmaterial	Reaktion mit Virusreinigung bzw. exprimiertem CP <u>und</u> gesundem Pflanzenmaterial
1	TMV	2	18
2	TMV	6	6
3	TMV	12	4
4	PPV-CP	10	14
5	PPV	8	16
6	PVY-CP	12	12
7	PPV-CP	7	17

In der obigen Tabelle ist die Anzahl der weiteren Versuche mit den unterschiedlichen Klonen gezeigt. Es wird deutlich, dass sich kein Phagenklon für einen Nachweis eines Virus aus infiziertem Pflanzenmaterial eignete.

3.5 Ergebnisse des Biopanning mit den scFv-Bibliotheken Tomlinson I und J

In der folgenden Tabelle 3.5-1 wird eine Übersicht über das Biopanning mit den scFv-Bibliotheken Tomlinson I und J gegeben. Beide Bibliotheken wurden wieder mit Ammoniumsulfat gefälltem TMV *Ohio V* gescreent. Außerdem wurden in diesem Biopanning die exprimierten Hüllproteine der pRSET Vektoren verwendet. Die Expression war nur bei den Hüllproteinen von CMV, PVY und TMV möglich, somit wurden auch nur diese Proteine eingesetzt. Es wurden die Mikrotiterplatten von Nunc verwendet.

Tabelle 3.5-1 Übersicht über das Biopanning mit den scFv-Bibliotheken Tomlinson I und J mit gereinigtem TMV *Ohio V* und den exprimierten Hüllproteinen von CMV, PVY und TMV

	Tomlinson I	Tomlinson J
Eingesetzte Menge TMV <i>Ohio V</i> in jeder Biopanningrunde	100 µg/ml	100 µg/ml
Eingesetzte Menge CMV-CP in jeder Biopanningrunde	50 µg/ml	50 µg/ml
Eingesetzte Menge PVY-CP in jeder Biopanningrunde	50 µg/ml	50 µg/ml
Eingesetzte Menge TMV-CP in jeder Biopanningrunde	50 µg/ml	50 µg/ml

Die ersten Ergebnisse des Screenings werden in der nächsten Abbildung dargestellt. Dabei wurde überprüft, ob das Blockverfahren auch mit den scFv-Phagen problemlos durchzuführen war. Außerdem sollte die Stärke einer möglichen unspezifischen Reaktion mit Pflanzenmaterial bestimmt werden, so dass gesundes Pflanzenmaterial als Kontrolle zusätzlich getestet wurde.

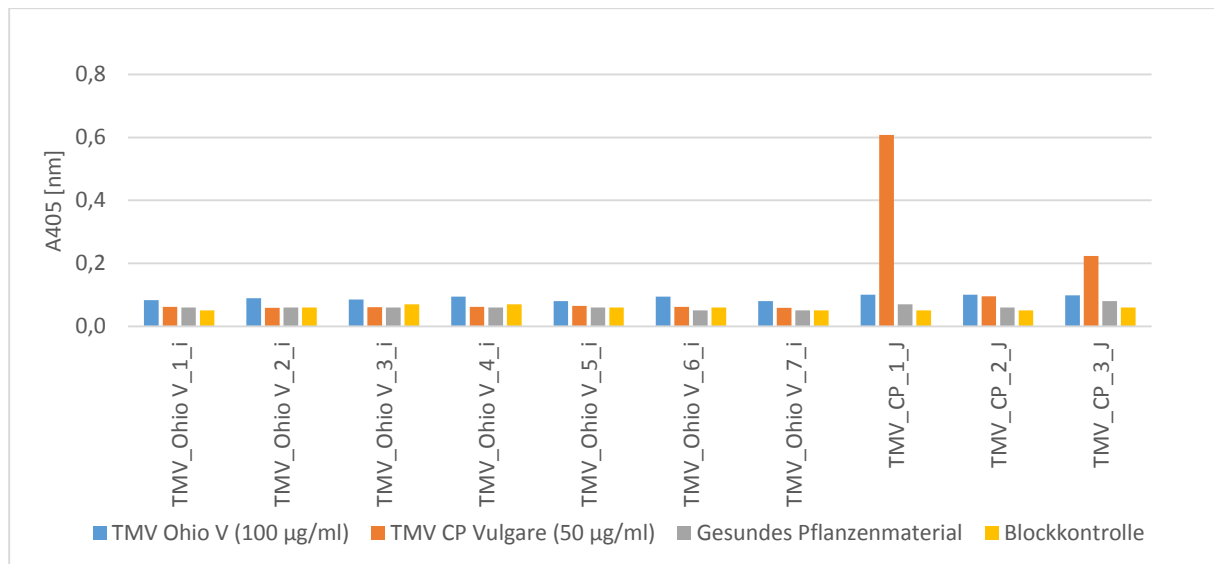


Abbildung 3.5-1 Ergebnisse des ELISA der scFv-Phagen 1-10 aus den Tomlinson Bibliotheken

In der obigen Abbildung ist ein ELISA von zehn scFv-Phagen aus den Tomlinson Bibliotheken gezeigt. Dabei beschreibt die Virusabkürzung das *target*, gegen das gescreent wurde, die Zahl den Phagenklon und der Buchstabe I oder J die ursprüngliche Bibliothek des Klons. Im Gegensatz zu den Peptidbibliotheken wurde sofort deutlich, dass es nur zu sehr geringen unspezifischen Reaktionen mit dem Pflanzenmaterial kam. Bis auf die Phagen TMV CP 1 J und TMV CP 3 J zeigten keine weiteren Phagen eine positive Interaktion mit dem Zielmolekül. Der Nachweis der Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Messung nach 30 Minuten.

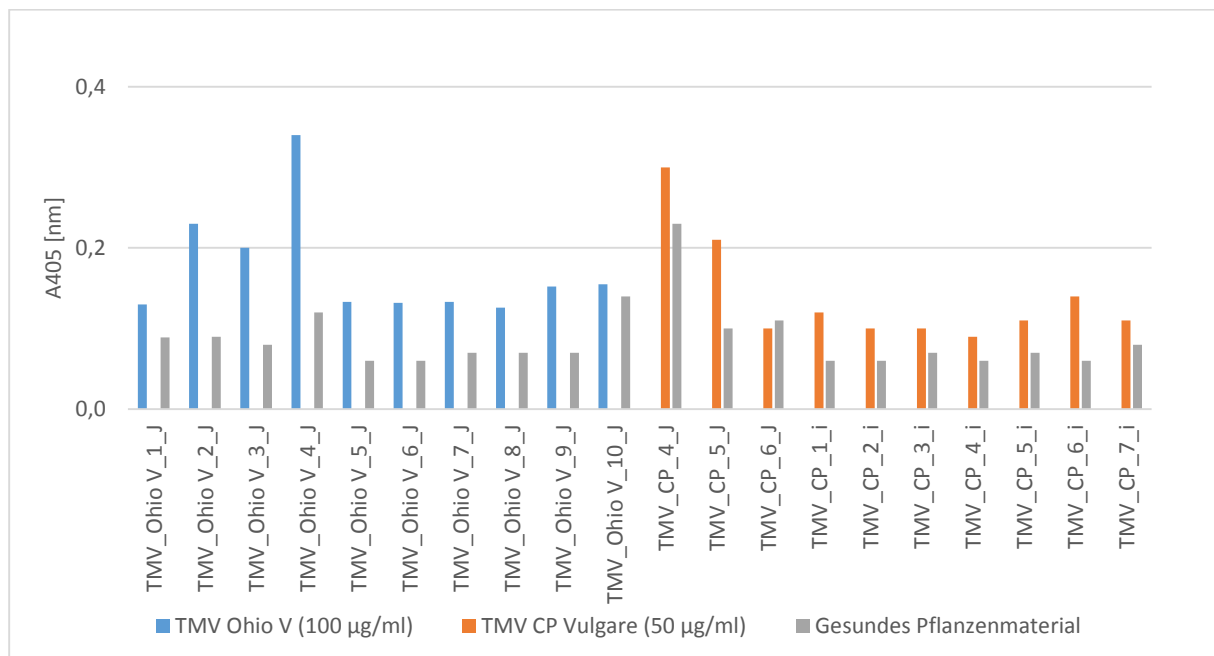


Abbildung 3.5-2 Ergebnisse des ELISA der scFv-Phagen 11-30 aus den Tomlinson Bibliotheken

In der obigen Abbildung ist der ELISA der scFv-Phagen 11-30 aus den Tomlinson Bibliotheken gezeigt. Dabei beschreibt die Virusabkürzung das *target*, gegen das gescreent wurde, die Zahl den Phagenklon und der Buchstabe I oder J die ursprüngliche Bibliothek des Klons. Der Nachweis der Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Messung nach 105 Minuten.

In den beiden obigen Abbildungen (Abbildung 3.5-1 und Abbildung 3.5-2) sind die Ergebnisse der *plate-trapped* ELISA von 30 getesteten Phagenklonen mit dem TMV-CP bzw. mit gereinigtem TMV *Ohio V* gezeigt. Dabei wurde zusätzlich die Reaktion auf gesundes Pflanzenmaterial geprüft, um unspezifisch reagierende Phagen sofort aussortieren zu können. In dem ersten Versuch in Abbildung 3.5-1 wurden die Phagen außerdem mit der geblockten Plastikoberfläche auf mögliche Interaktionen untersucht. Sie lagen nicht vor, so dass in den weiteren Versuchen auf diese Kontrolle verzichtet werden konnte. Einzelne Phagenklone wurden ausgewählt und weiter untersucht (Abbildung 3.5-3).

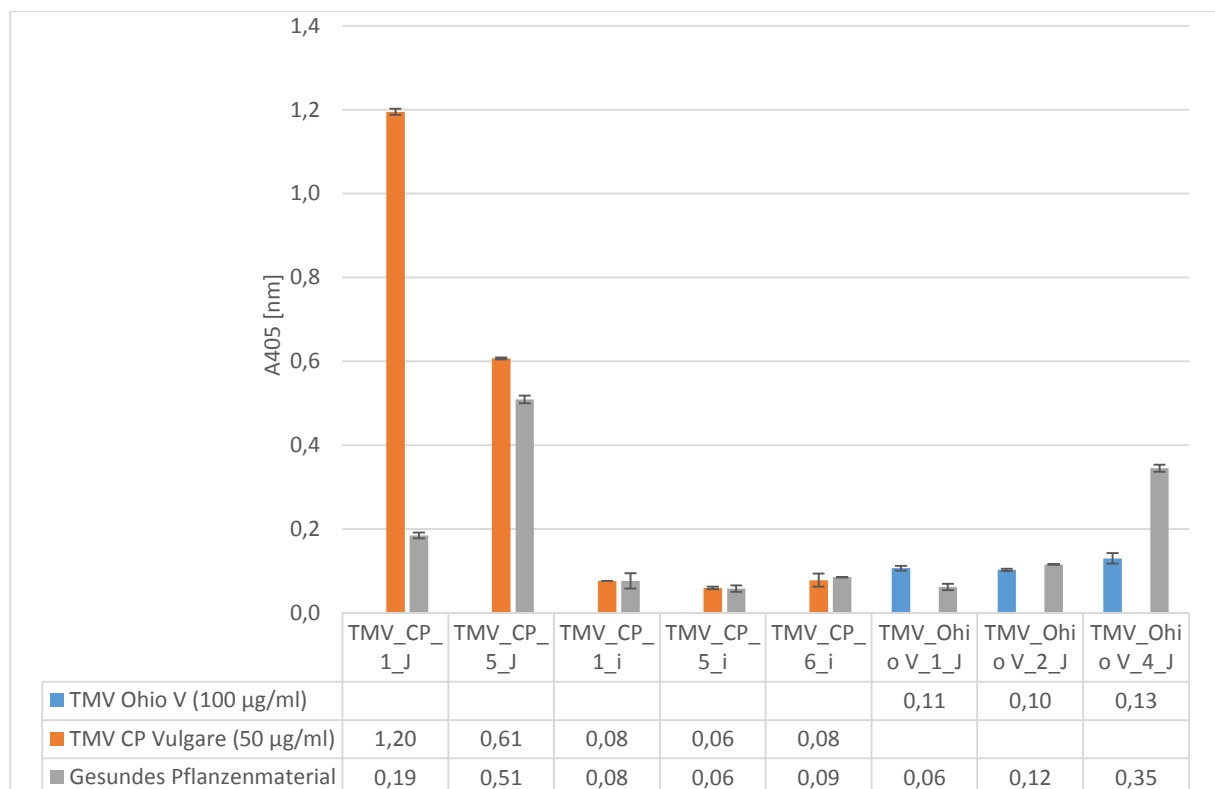


Abbildung 3.5-3 Ergebnisse des ELISA ausgewählter scFv-Phagen aus den Tomlinson Bibliotheken

In der obigen Abbildung sind die Ergebnisse des ELISA ausgewählter scFv-Phagen aus den Tomlinson Bibliotheken mit gereinigtem TMV beziehungsweise exprimierten Hüllproteinen gezeigt. Nur der Phage TMV_CP_1_J zeigte ein eindeutig positives Signal gegenüber dem Zielmolekül bei einer schwachen Reaktion der Negativkontrolle. Der Nachweis der Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Mittelwert, (n=2). Messung nach 90 Minuten.

Wie aus der obigen Abbildung deutlich wird, war ein positives Signal nur bei dem Phagen TMV_CP_1_J (1,20 zu 0,19) gegen exprimiertes TMV-CP nachzuweisen. Die Phagen, die gegen gereinigtes TMV gescreent wurden, zeigten keine positive Reaktion. In einem weiteren Versuch sollte daraufhin überprüft werden, ob der Phage TMV_CP_1_J vollständige TMV-

Virionen detektieren konnte. Dazu wurde er zusätzlich mit Ammoniumsulfat gefälltem TMV *Vulgare* eingesetzt (Abbildung 3.5-4).

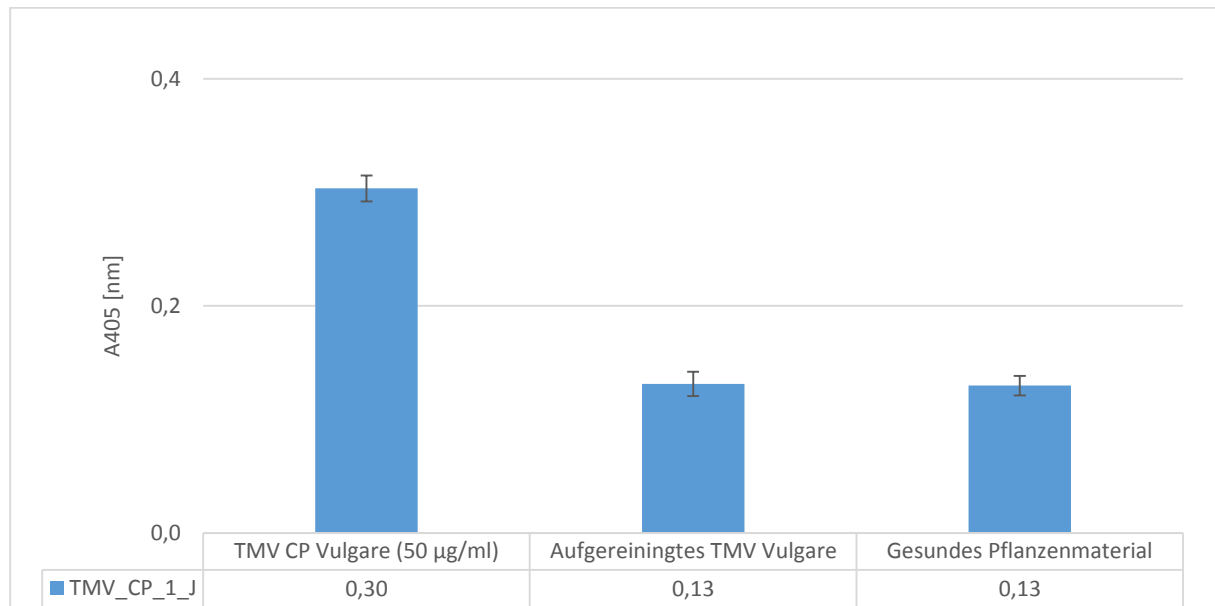


Abbildung 3.5-4 Ergebnisse des ELISA des Phagen TMV_CP_1_J mit TMV und gesundem Pflanzenmaterial

In der obigen Abbildung sind die Ergebnisse des ELISA des Phagen TMV_CP_1_J mit exprimiertem TMV-CP, gereinigtem TMV und gesundem Pflanzenmaterial gezeigt. Es zeigte sich ein positives Signal mit dem exprimierten CP, der Unterschied zwischen TMV *Vulgare* und der Negativkontrolle war jedoch sehr gering. Der Nachweis erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Mittelwert, (n=2). Messung nach 60 Minuten.

Wie in der obigen Abbildung gezeigt werden kann, war die Reaktion des Phagen TMV_CP_1_J in einem ELISA mit dem gereinigten TMV *Vulgare* schwächer als mit dem exprimierten TMV-CP (0,30 zu 0,13). Die ELISA Signale zwischen dem gereinigten TMV *Vulgare* und der eigentlichen Negativkontrolle, dem gesunden Pflanzenmaterial, waren jedoch gleich (0,13 zu 0,13). Es war somit nicht möglich, einen eindeutigen Nachweis auf das vollständige TMV-Virion zu erbringen. Im Folgenden wurden 24 weitere Klone gegen TMV und TMV-CP untersucht. Außerdem wurden 48 Phagensuspensionen aus verschiedenen neu angezogenen Klonen der TMV-Biopanning erstellt. Keine der Suspensionen beziehungsweise kein Einzelklon zeigte eine eindeutige positive Reaktion auf das TMV bei akzeptabler Negativkontrolle. Zusätzlich sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass bei dem vom Hersteller mitgelieferten Vermehrungsbakterienstamm TG1 (beschriftet mit TG1Tr) nachträglich eine unerwartete Resistenz gegenüber Kanamycin und Ampicillin nachgewiesen werden konnte, die das Ergebnis des Biopannings möglicherweise verfälschte. Auf eine genauere Untersuchung der Ergebnisse des CMV-CP und PVY-CP wurde deshalb verzichtet und stattdessen ein weiteres Biopanning mit scFv-Phagen und einer neuen Methode durchgeführt (siehe Kapitel 3.6).

3.6 Ergebnisse des Biopanning mit den scFv-Bibliotheken HAL9 und HAL10

In der folgenden Tabelle 3.6-1 wird eine kurze Übersicht über das Biopanning mit den scFv-Bibliotheken HAL9 und HAL10 gegeben. Das mit dem jeweiligen Virus infizierte Pflanzenmaterial wurde über Nacht in einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit einem Virus-spezifischen Antikörper inkubiert. Als Negativkontrolle wurde nicht infiziertes Pflanzenmaterial in Kombination mit den Antikörpern angeboten und im Biopanning für eine Präinkubation der Phagenbibliothek verwendet. Die exprimierten Proteine PVY-CP und TMV-CP wurden direkt im Biopanning eingesetzt, um eine Vergleichbarkeit gegenüber den vorherigen Versuchen zu haben. Für jede Versuchsnummer wurden für das Screening nach dem Biopanning 92 Einzelklone eingesetzt und untersucht. Als Positivkontrolle wurde der Streptavidin bindende Phage pHAL30-SH1173-D8 gegen 200 ng Streptavidin eingesetzt. In der Negativkontrolle lagen weder Phagen noch Pflanzenmaterial vor. Es wurden Mikrotiterplatten von Nunc eingesetzt. Durch die Präsentation vollständiger Virionen aus infiziertem Pflanzenmaterial, die durch die Antikörper angeboten wurden, sollte die Anzahl an möglichen Epitopen für die „*antibody mimics*“ erhöht werden. Die Präinkubation mit dem gesunden Pflanzenmaterial sollte unspezifisch bindende Phagen direkt aus dem Pool möglicher Binder entfernen.

Tabelle 3.6-1 Das Biopanning mit den scFv-Bibliotheken HAL9 und HAL10

Versuch	Target	Methode
SH1322	PPV Bul PV-0212 aus infizierter <i>N. benthamiana</i>	Capture des Virus durch Antikörper
SH1323	PVY N605 aus infizierter <i>N. benthamiana</i>	Capture des Virus durch Antikörper
SH1324	CMV PV-0506 aus infizierter <i>N. benthamiana</i>	Capture des Virus durch Antikörper
SH1325	TMV <i>Vulgare</i> PV-0107 aus infizierter <i>N. benthamiana</i>	Capture des Virus durch Antikörper
SH1326	TSWV 12 aus infizierter <i>N. benthamiana</i>	Capture des Virus durch Antikörper
SH1327	CbMV aus infizierter <i>N. benthamiana</i>	Capture des Virus durch Antikörper
SH1328	pRSET-TMV-CP (100 µg/ml)	Plate-trapped
SH1329	pRSET-PVY-CP (100 µg/ml)	Plate-trapped

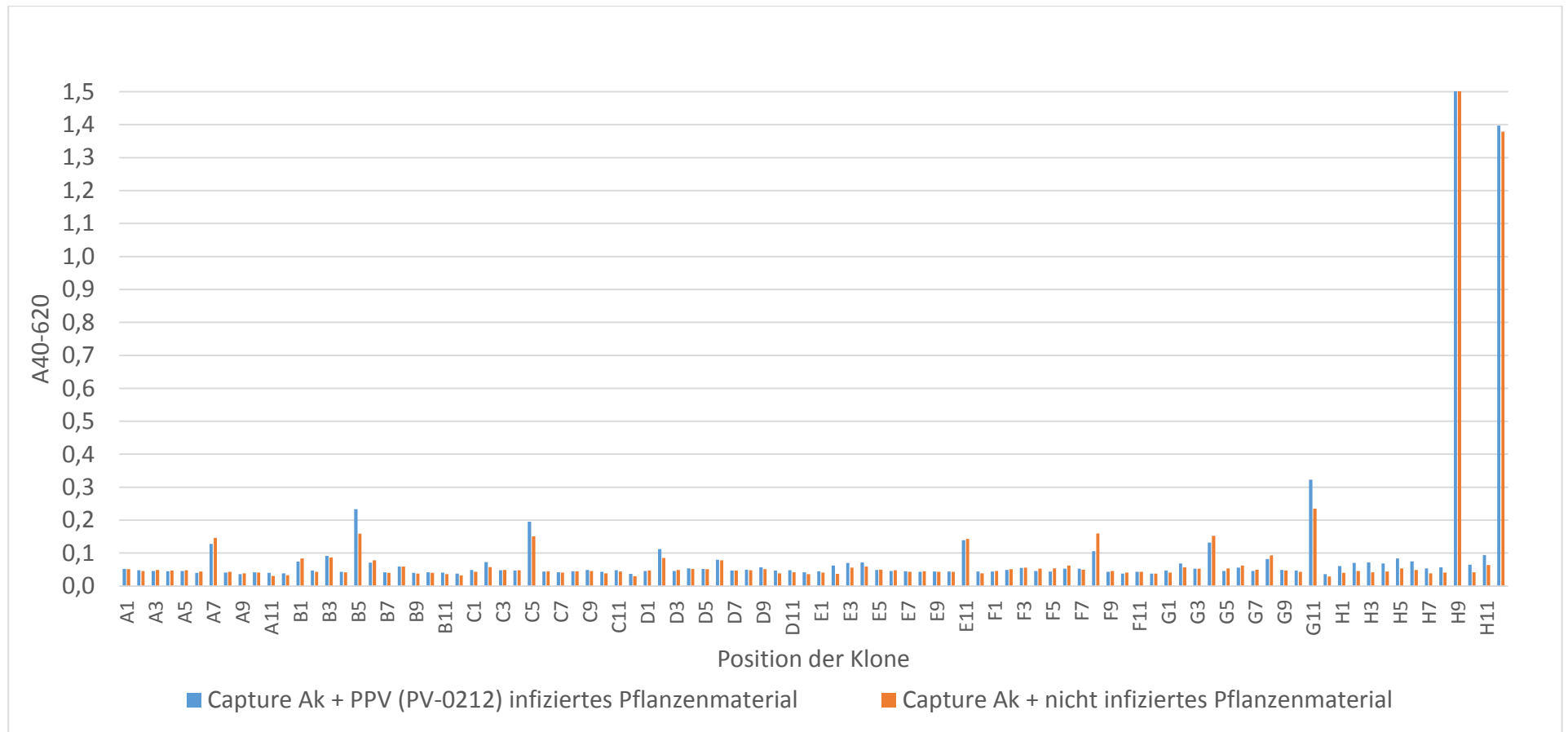


Abbildung 3.6-1 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit PPV (PV-0212) infiziertem Pflanzenmaterial

In der obigen Abbildung ist der ELISA des Versuchs SH1322 mit PPV dargestellt. Als Positivkontrolle wurde der Streptavidin bindende Antikörper des Phagemids pHAL30-SH1173-D8 verwendet. Es zeigte kein scFv einen größeren Unterschied in der Reaktion mit gesunder und infizierter Pflanze. Fast alle Signale der Klon bewegten sich auf dem Niveau der Negativkontrollen (H3 und H6). Die Positivkontrollen (H9 und H12) zeigten eine erfolgreiche Durchführung der Methode an. Nachweis mit dem Mouse α -myc-tag (9E10) und Goat α -Mouse IgG HRP. Messung nach 15 Minuten.

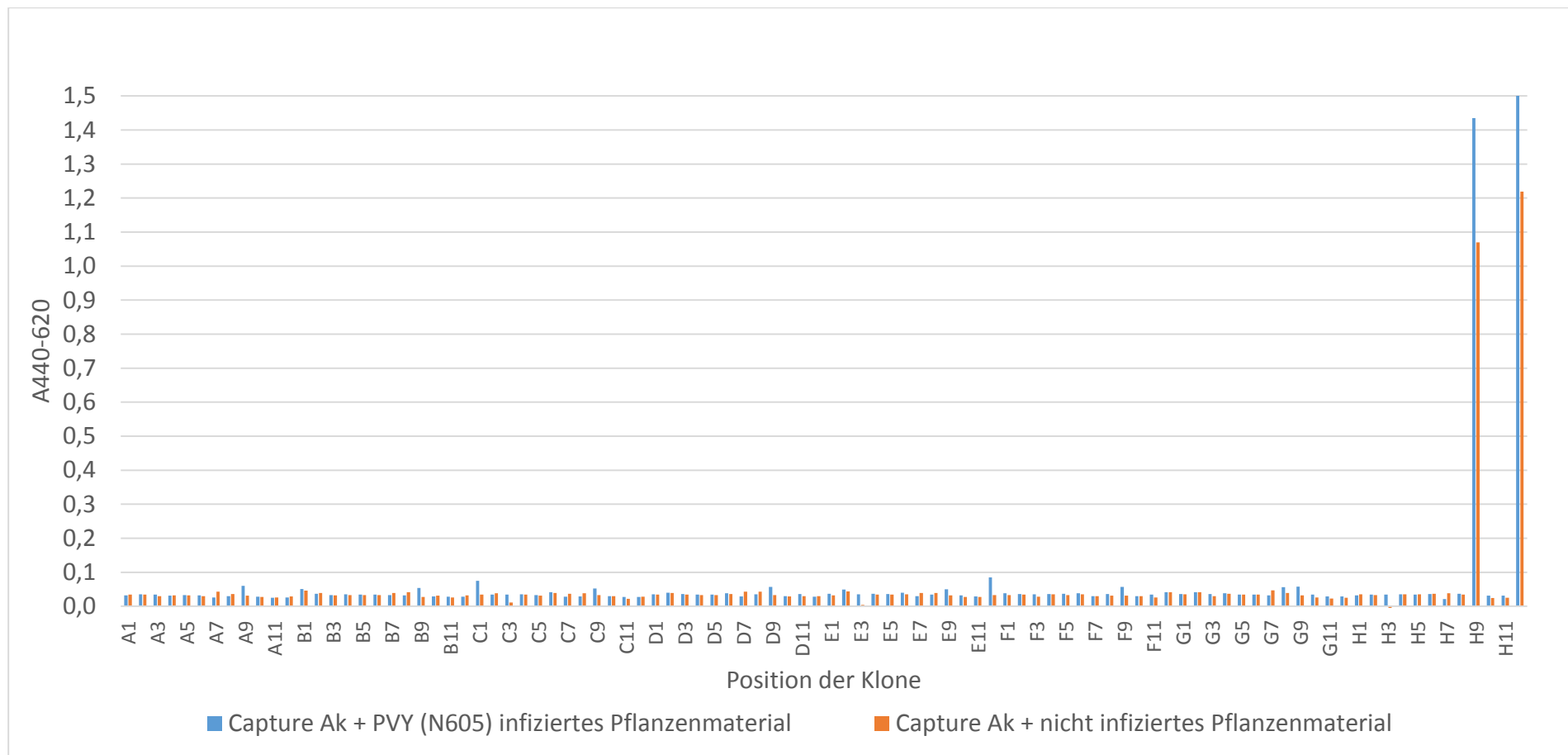


Abbildung 3.6-2 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit PVY N605 infiziertem Pflanzenmaterial

In der obigen Abbildung ist der ELISA des Versuchs SH1323 gegen das PVY dargestellt. Als Positivkontrolle wurde der Streptavidin bindende Antikörper des Phagemids pHAL30-SH1173-D8 verwendet. Kein scFv zeigte einen größeren Unterschied zwischen gesunder und infizierter Pflanze. Fast alle Signale der Klonen bewegten sich auf dem Niveau der Negativkontrollen (H3 und H6). Die Positivkontrollen (H9 und H12) zeigten eine erfolgreiche Durchführung der Methode an. Nachweis mit dem Mouse α -myc-tag (9E10) und Goat α -Mouse IgG HRP. Messung nach 15 Minuten.

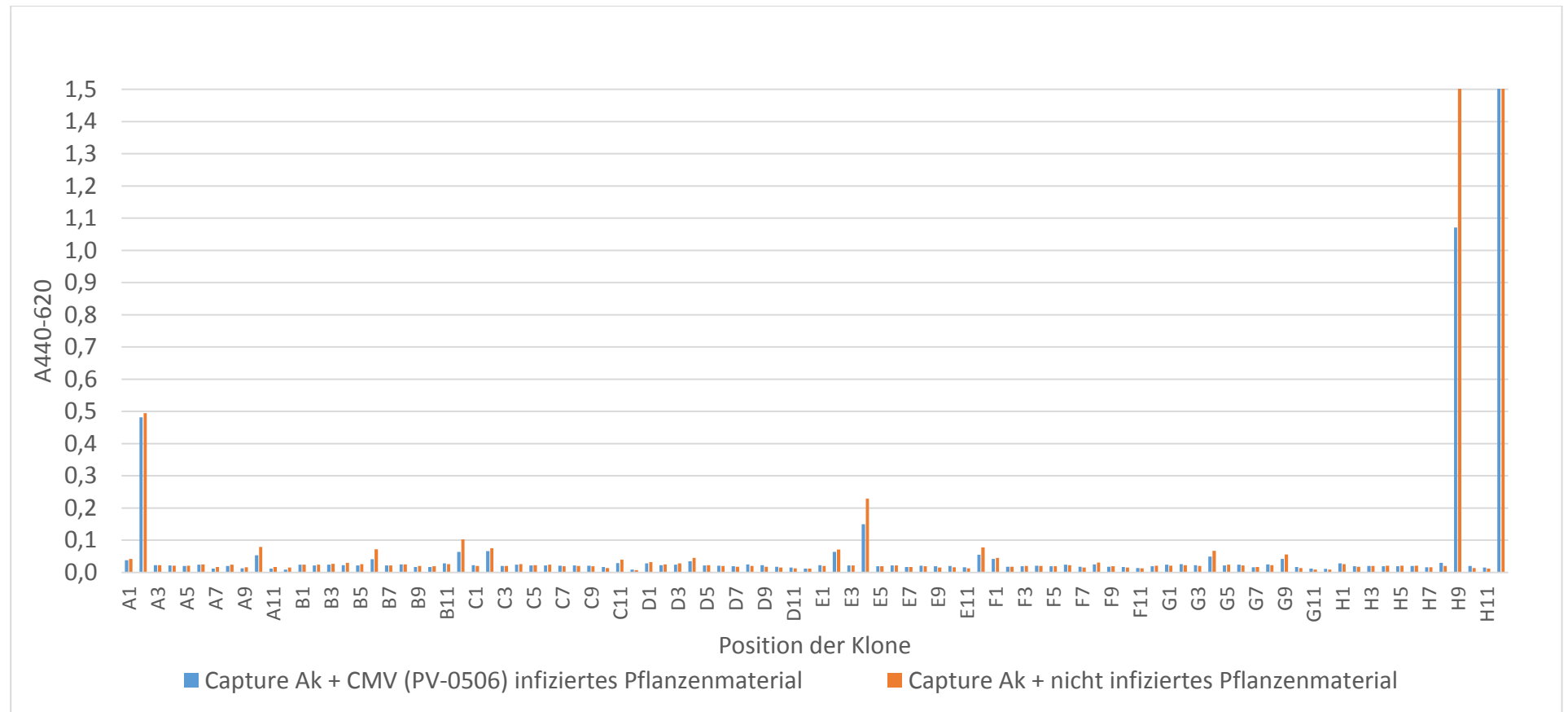


Abbildung 3.6-3 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit CMV (PV-0506) infiziertem Pflanzenmaterial

In der obigen Abbildung ist der ELISA des Versuchs SH1324 gegen das CMV dargestellt. Als Positivkontrolle wurde der Streptavidin bindende Antikörper des Phagemids pHAL30-SH1173-D8 verwendet. Es zeigte kein scFv einen größeren Unterschied zwischen gesunder und infizierter Pflanze. Fast alle Signale der Klone bewegten sich auf dem Niveau der Negativkontrollen (H3 und H6). Die Positivkontrollen (H9 und H12) zeigten eine erfolgreiche Durchführung der Methode an. Nachweis mit dem Mouse α -myc-tag (9E10) und Goat α -Mouse IgG HRP. Messung nach 15 Minuten.

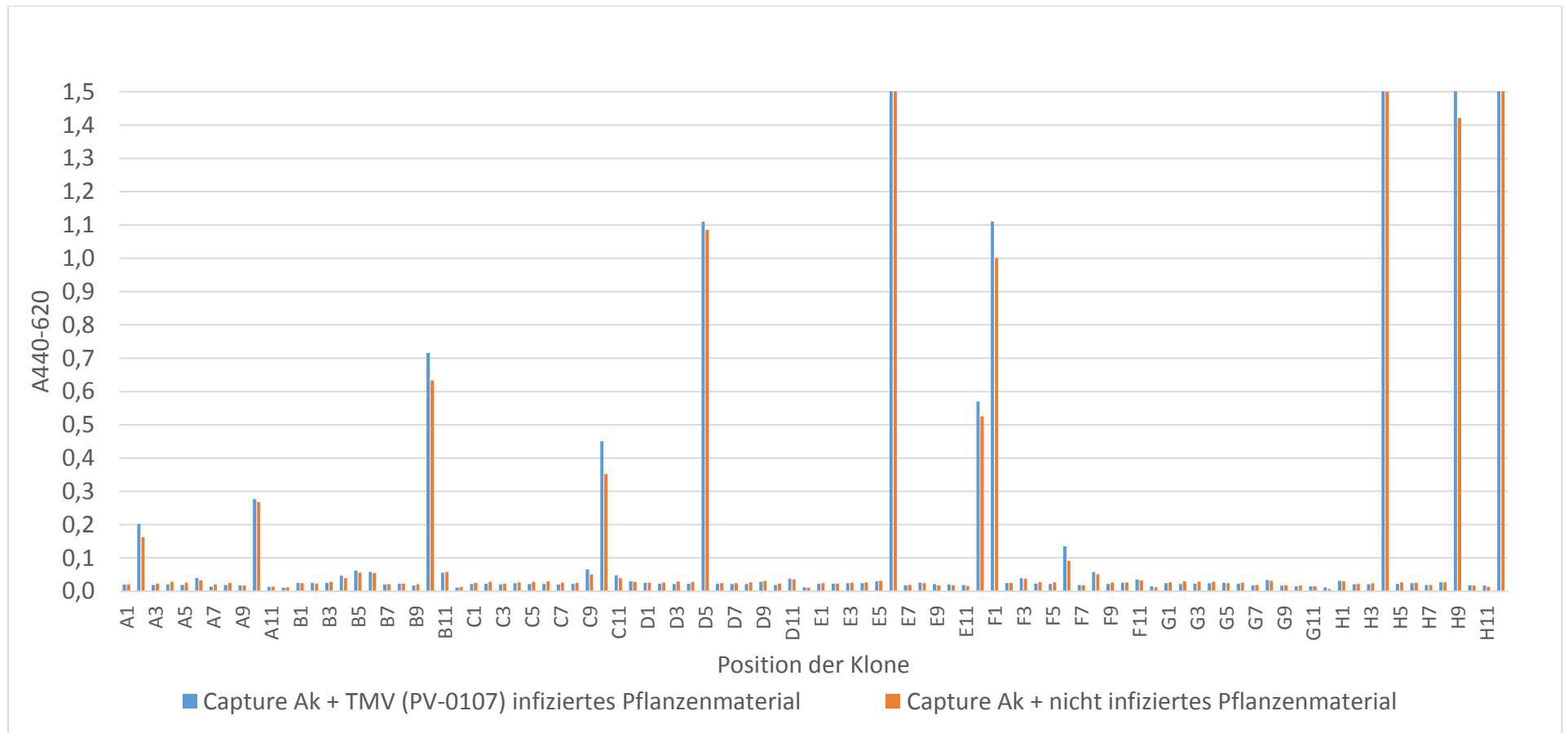


Abbildung 3.6-4 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit TMV (PV-0107) infiziertem Pflanzenmaterial

In der obigen Abbildung ist der ELISA des Versuchs SH1325 gegen das TMV dargestellt. Als Positivkontrolle wurde der Streptavidin bindende Antikörper des Phagemids pHAL30-SH1173-D8 verwendet. Es zeigte kein scFv einen größeren Unterschied zwischen gesunder und infizierter Pflanze. Viele Signale der Klonen bewegten sich auf dem Niveau der Negativkontrollen (H3 und H6). Einzelne starke Signale wie zum Beispiel E6 wiesen ähnliche Werte auch bei den Negativkontrollen gegen gesundes Pflanzenmaterial auf. Die Positivkontrollen (H9 und H12) zeigten eine erfolgreiche Durchführung der Methode an. Nachweis mit dem Mouse α -myc-tag (9E10) und Goat α -Mouse IgG HRP. Messung nach 15 Minuten.

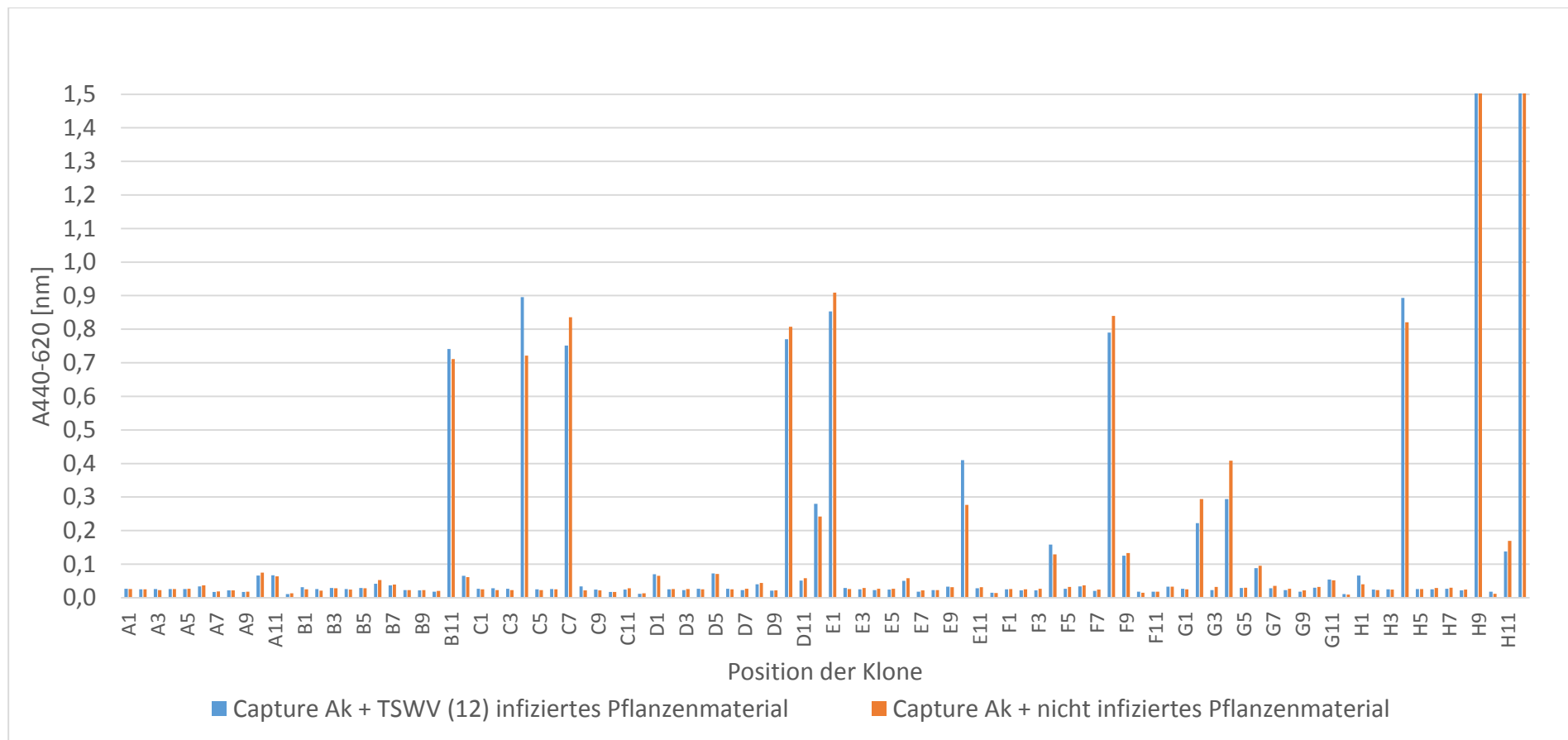


Abbildung 3.6-5 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFv Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit TSWV (12) infiziertem Pflanzenmaterial

In der obigen Abbildung ist der ELISA des Versuchs SH1326 gegen das TSWV dargestellt. Als Positivkontrolle wurde der Streptavidin bindende scFv des Phagemids pHAL30-SH1173-D8 verwendet. Es zeigte kein scFv einen größeren Unterschied zwischen gesunder und infizierter Pflanze. Viele Signale der Klone bewegten sich auf dem Niveau der Negativkontrollen (H3 und H6). Einzelne starke Signale wie zum Beispiel von E1 traten in ähnlicher Weise bei den Negativkontrollen mit gesundem Pflanzenmaterial auf. Die Positivkontrollen (H9 und H12) zeigten eine erfolgreiche Durchführung der Methode an. Nachweis mit dem Mouse α -myc-tag (9E10) und Goat α -Mouse IgG HRP. Messung nach 15 Minuten.

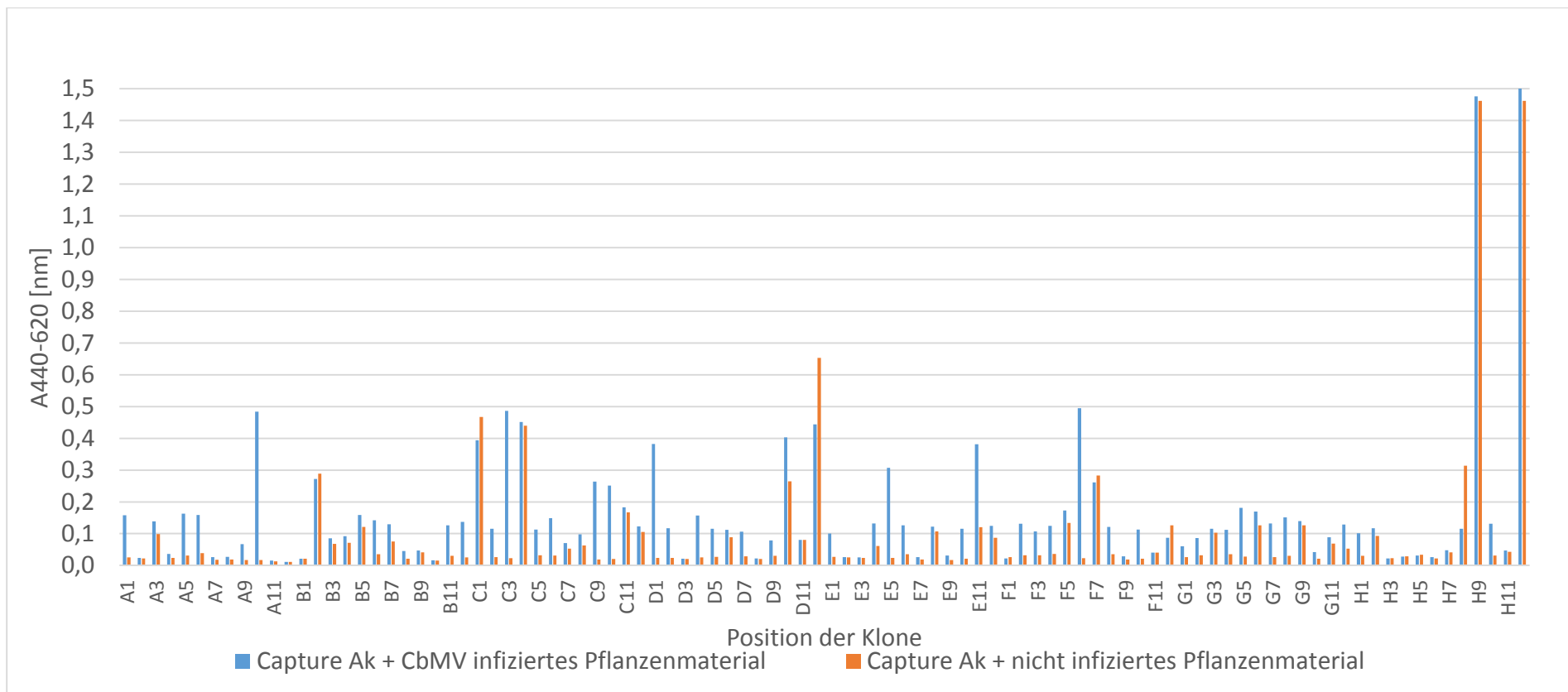


Abbildung 3.6-6 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit CbMV infiziertem Pflanzenmaterial

In der obigen Abbildung ist der ELISA des Versuchs SH1327 gegen das CbMV dargestellt. Als Positivkontrolle wurde der Streptavidin bindende Antikörper des Phagemids pHAL30-SH1173-D8 verwendet. Es zeigten einzelne scFvs Unterschiede in der Stärke des Signals zwischen gesunder und infizierter Pflanze. Nur wenige Signale der Klone bewegen sich auf dem Niveau der Negativkontrollen (H3 und H6). Einzelne Klone wie zum Beispiel A10, C3 oder D1 zeigten deutliche Unterschiede in den Signalstärken mit Material aus infizierten Pflanzen im Vergleich zu Material aus gesunden Pflanzen. Die Positivkontrollen (H9 und H12) zeigten eine erfolgreiche Durchführung der Methode an. Nachweis mit dem Mouse α -myc-tag (9E10) und Goat α -Mouse IgG HRP. Messung nach 15 Minuten.

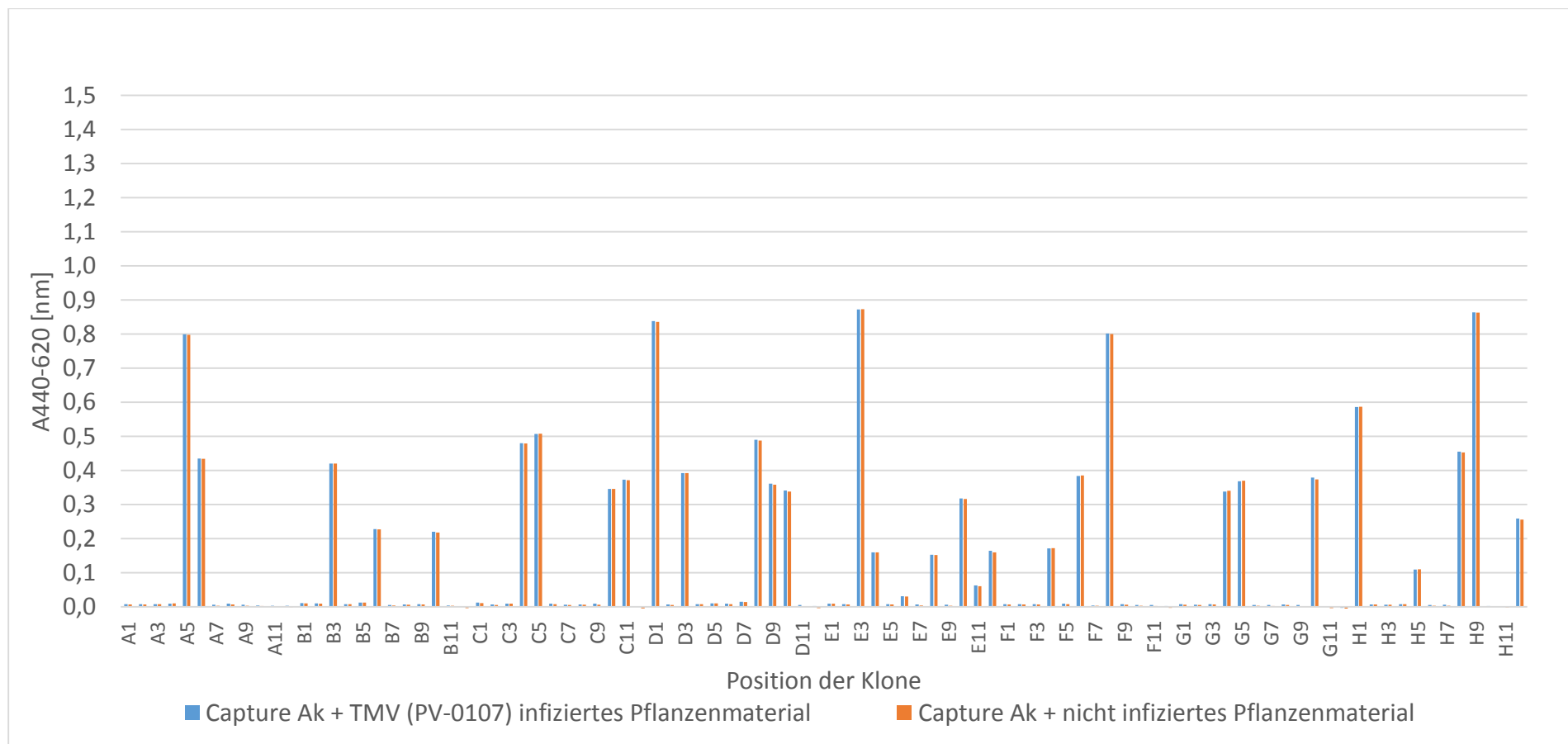


Abbildung 3.6-7 Ergebnisse des ELISA von 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit TMV (PV-0107) infiziertem Pflanzenmaterial

In der obigen Abbildung ist der ELISA des Versuchs SH1328 gegen das TMV dargestellt. Als Positivkontrolle wurde der Streptavidin bindende Antikörper des Phagemids pHAL30-SH1173-D8 verwendet. Es zeigte kein scFv einen starken Unterschied zwischen gesunder und infizierter Pflanze. Viele Signale der Klonen bewegen sich auf dem Niveau der Negativkontrollen (H3 und H6). Einzelne starke Signale wie zum Beispiel D1 traten bei den Negativkontrollen mit gesundem Pflanzenmaterial auf. Die Positivkontrollen (H9 und H12) zeigten eine erfolgreiche Durchführung der Methode an. Nachweis mit dem Mouse α -myc-tag (9E10) und Goat α -Mouse IgG HRP. Messung nach 15 Minuten.

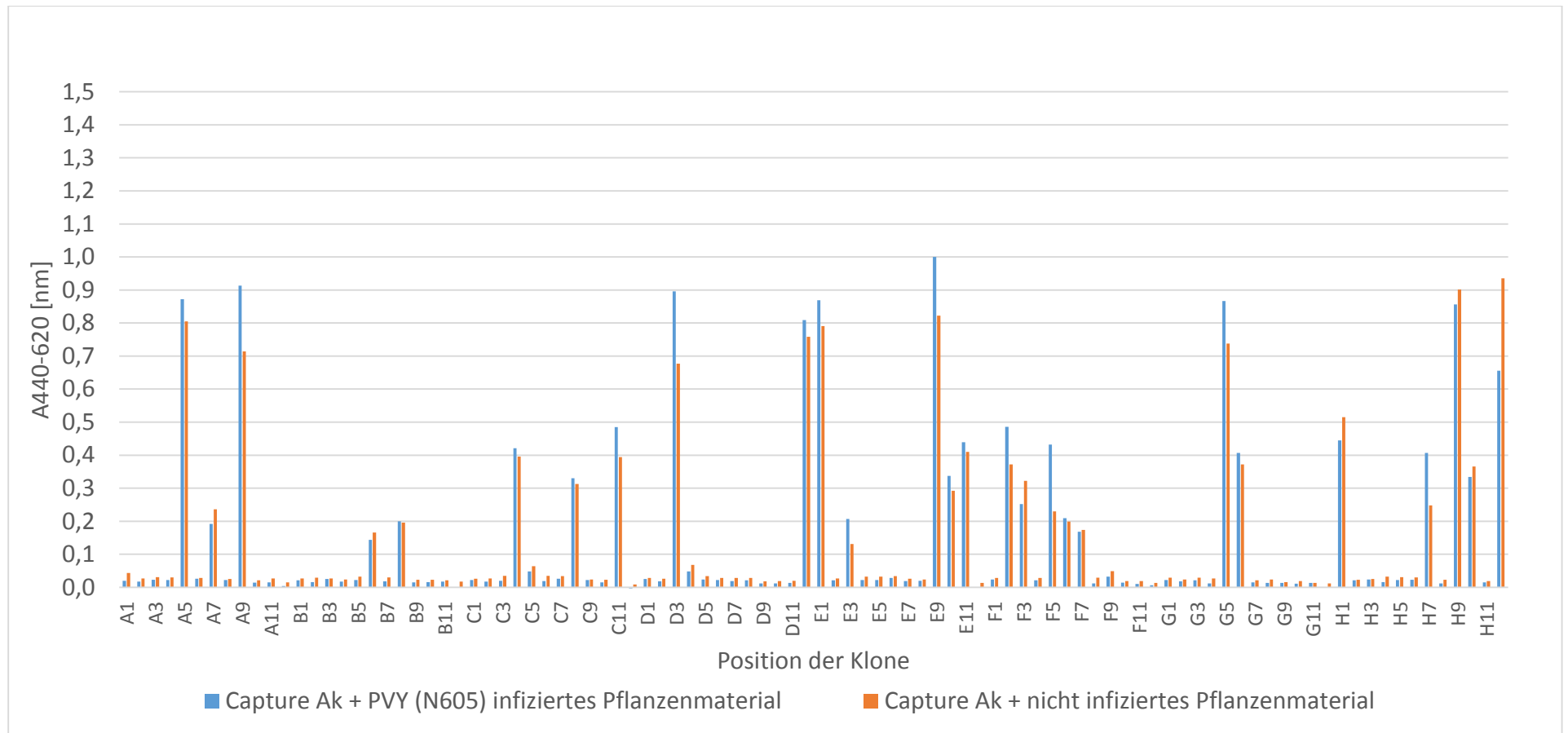


Abbildung 3.6-8 Ergebnisse des ELISA 92 löslichen scFvs der Bibliotheken HAL9 und HAL10 mit PVY (N605) infiziertem Pflanzenmaterial

In der obigen Abbildung ist der ELISA des Versuchs SH1329 gegen das PVY dargestellt. Als Positivkontrolle wurde der Streptavidin bindende Antikörper des Phagemids pHAL30-SH1173-D8 verwendet. Es zeigte kein scFv einen starken Unterschied zwischen gesunder und infizierter Pflanze. Viele Signale der Klone bewegten sich auf dem Niveau der Negativkontrollen (H3 und H6). Einzelne starke Signale wie zum Beispiel des Phagen E1 fanden sich auch bei den Negativkontrollen mit gesundem Pflanzenmaterial. Die Positivkontrollen (H9 und H12) zeigten eine erfolgreiche Durchführung der Methode an. Nachweis mit dem Mouse α -myc-tag (9E10) und Goat α -Mouse IgG HRP. Messung nach 15 Minuten.

3.6.1 Untersuchungen zu den CbMV spezifischen Phagenklonen

Wie in den obigen Abbildungen (Abbildung 3.6-1 bis Abbildung 3.6-8) gezeigt wird, konnten aus dem Screeningverfahren nur Phagenklone identifiziert werden, die in diesem ersten Versuch eine Reaktion mit CbMV infiziertem Pflanzenmaterial aufwiesen und dabei nicht mit gesundem Pflanzenmaterial reagierten (Abbildung 3.6-6). Ausgewählte Klone wurden im Folgenden sequenziert und weiter ausgewertet. Es zeigte sich, dass die Klone SH1327-A10/SH1327-D1/SH1327-F6 und SH1327-C3/SH1327-E5 jeweils identisch waren und SH1327-C9, SH1327-C10 und SH1327-G5 einzeln vorlagen. Die Phagenklone SH1327-A10, SH1327-C3, SH1327-C9 und SH1327-C10 wurden weiter auf ihre Spezifität und Sensitivität getestet. Um einen Vergleich mit den anderen Biopannings ziehen zu können, wurden im Folgenden nicht die löslichen scFvs wie im Screeningverfahren eingesetzt, sondern wieder vollständige Phagenvirionen mit den entsprechenden Fusionsproteinen aus pIII und dem scFv. Die Anzucht erfolgte durch den Einsatz der Helferphagen (siehe Kapitel 2.2.30). In einem ersten Schritt musste dazu der erfolgreiche Nachweis von CbMV aus Pflanzenmaterial mit den scFvs bestätigt werden. Zusätzlich wurde mit dieser Methode getestet, ob ein veränderter Phage einen Einfluss auf die unspezifische Reaktion mit Pflanzenmaterial hat. Die folgende Abbildung (Abbildung 3.6-9) zeigt die Resultate der Versuche dabei exemplarisch.

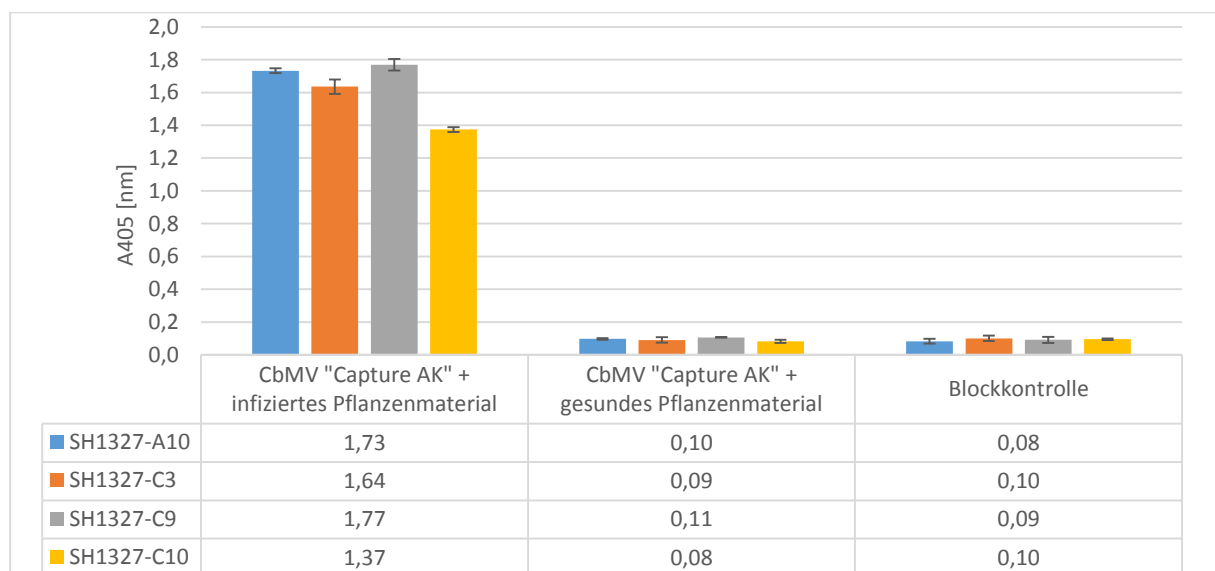


Abbildung 3.6-9 Ergebnisse eines Capture-ELISA mit ausgewählten gegen CbMV gerichteten Phagen

In der obigen Abbildung ist der Capture-ELISA mit den Klonen SH1327-A10, SH1327-C3, SH1327-C9 und SH1327-C10 (1:1 in Blocklösung, 100 µl eingesetzt) gegen CbMV gezeigt. Eine positive Reaktion lag nur mit dem infizierten Pflanzenmaterial vor, die Negativkontrollen zeigten keine unspezifische Reaktion. Der Nachweis der Phagen erfolgte mit dem HRP/Anti-M13 Konjugat. Mittelwert, (n=2). Messung nach 90 Minuten.

In der Abbildung 3.6-9 wird deutlich gezeigt, dass erstmals ein Nachweis eines Virus möglich war ohne gleichzeitige unspezifische Reaktionen mit dem Pflanzenmaterial. Die Absorption in den infizierten Proben bei A_{405} lag bei allen Phagen über 1,3, während die Negativkontrollen unter 0,12 lagen. In dem gezeigten Versuch wurden die Pflanzenviren vor dem eigentlichen Nachweis mit Anti-CbMV Antikörpern gebunden, der Aufbau ähnelte einem DAS-ELISA, nur der zweite Nachweisantikörper wurde dabei durch die Phagen ersetzt. In der nächsten Abbildung (Abbildung 3.6-10) sind die Nachweisversuche in einem *plate-trapped* ELISA gezeigt.

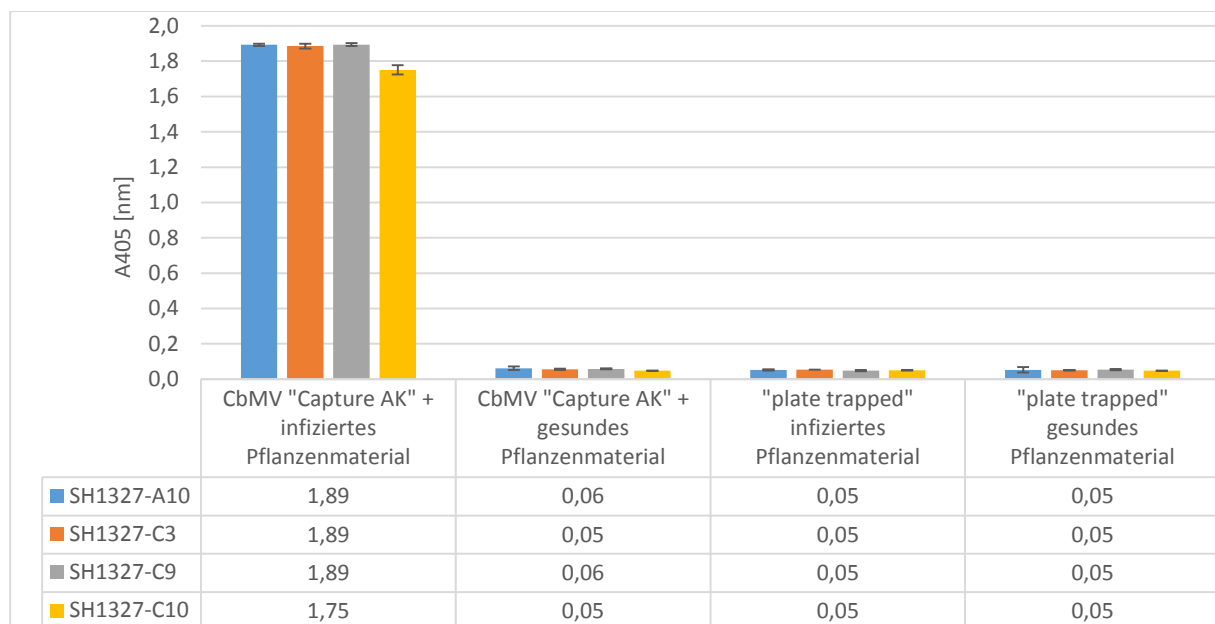


Abbildung 3.6-10 Ergebnisse des Vergleichs eines *Capture*-ELISA mit einem *plate-trapped* ELISA der gegen CbMV gerichteten Phagen

In der obigen Abbildung ist der Vergleich eines *Capture*-ELISA mit einem *plate-trapped* ELISA der ausgewählten gegen CbMV gerichteten Phagenklone (1:1 in Blocklösung, 100 μ l eingesetzt) SH1327-A10, SH1327-C3, SH1327-C9 und SH1327-C10 gezeigt. Es wird deutlich, dass eine positive Reaktion nur bei dem *Capture*-ELISA mit dem infizierten Pflanzenmaterial vorlag und kein Nachweis aus infiziertem Pflanzenmaterial in der *plate-trapped* Variante gelang. In den Kontrollen mit dem gesunden Pflanzenmaterial sind keine unspezifischen Reaktionen zu erkennen. Der Nachweis der gebundenen Phagen erfolgt mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. (n=2). Messung nach 105 Minuten.

In der Abbildung 3.6-9 wird gezeigt, dass der Nachweis von CbMV in einem *plate-trapped* ELISA nicht möglich war. Im Vergleich zu den positiven Reaktionen im *Capture*-ELISA mit Absorptionswerten von $A_{405} = 1,75-1,89$ waren die Signale ähnlich schwach wie die der Kontrollen mit dem gesunden Pflanzenmaterial ($A_{405} = 0,05-0,06$). Gleichzeitig deuteten die Ergebnisse in den letzten beiden Abbildungen darauf hin, dass auch keine alleinige Interaktion

der Phagen mit den Antikörpern vorlag, da die jeweiligen Negativkontrollen keine stärkeren Signale zeigten.

In einem weiteren Versuchsteil sollte überprüft werden, ob Phagen, bei denen alle fünf pIII Proteine die Fusion mit dem scFv zeigen, angezogen und für die Nachweismethode verwendet werden können. Dazu wurde der scFv als Fusion mit dem pIII Protein in den Hintergrund des M13K07 Phagens kloniert und in einem ELISA mit dem CbMV getestet (siehe Abbildung 3.6-11).

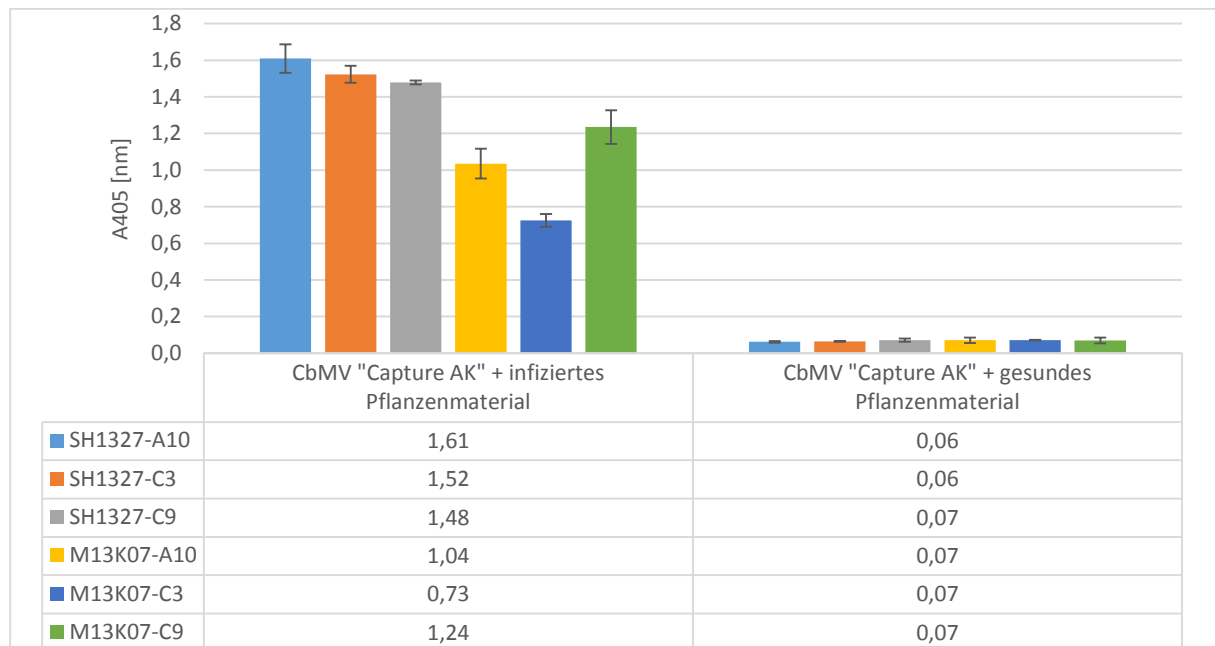


Abbildung 3.6-11 Ergebnisse eines *Capture*-ELISA mit ausgewählten gegen CbMV gerichteten Phagen aus dem pHAL30 und M13K07 Hintergrund

In der obigen Abbildung sind die Ergebnisse eines *Capture*-ELISA mit ausgewählten gegen CbMV gerichteten Phagen (1:1 in Blocklösung, 100 µl eingesetzt) SH1327-A10, SH1327-C3, SH1327-C9 aus dem pHAL30 und M13K07 Hintergrund gezeigt. Es wird deutlich, dass bei allen Phagen eine positive Reaktion bei dem infizierten Pflanzenmaterial vorlag und keine unspezifische Reaktion mit dem Pflanzenmaterial auftrat. Der Nachweis erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. Mittelwert, (n=2). Messung nach 60 Minuten.

In der obigen Abbildung kann deutlich gezeigt werden, dass auch Phagen, die einzig pIII-Fusionsproteine besitzen, erfolgreich angezogen und für den Nachweis verwendet werden konnten. Die Abweichungen in der Nachweisstärke zwischen den einzelnen scFv-Konstrukten waren wahrscheinlich durch die Unterschiede der jeweiligen eingesetzten Phagenkonzentration zu erklären. Der Titer wurde bei diesem Versuch nicht bestimmt, da die Infektionseffektivität der M13K07-Klone durch die veränderten pIII Proteine unbekannt war. In weiteren Versuchen sollten nun Nachweisgrenzen der Phagen bestimmt werden. Dafür stehen exemplarisch die nächsten beiden Abbildungen (Abbildung 3.6-12 und Abbildung 3.6-13).

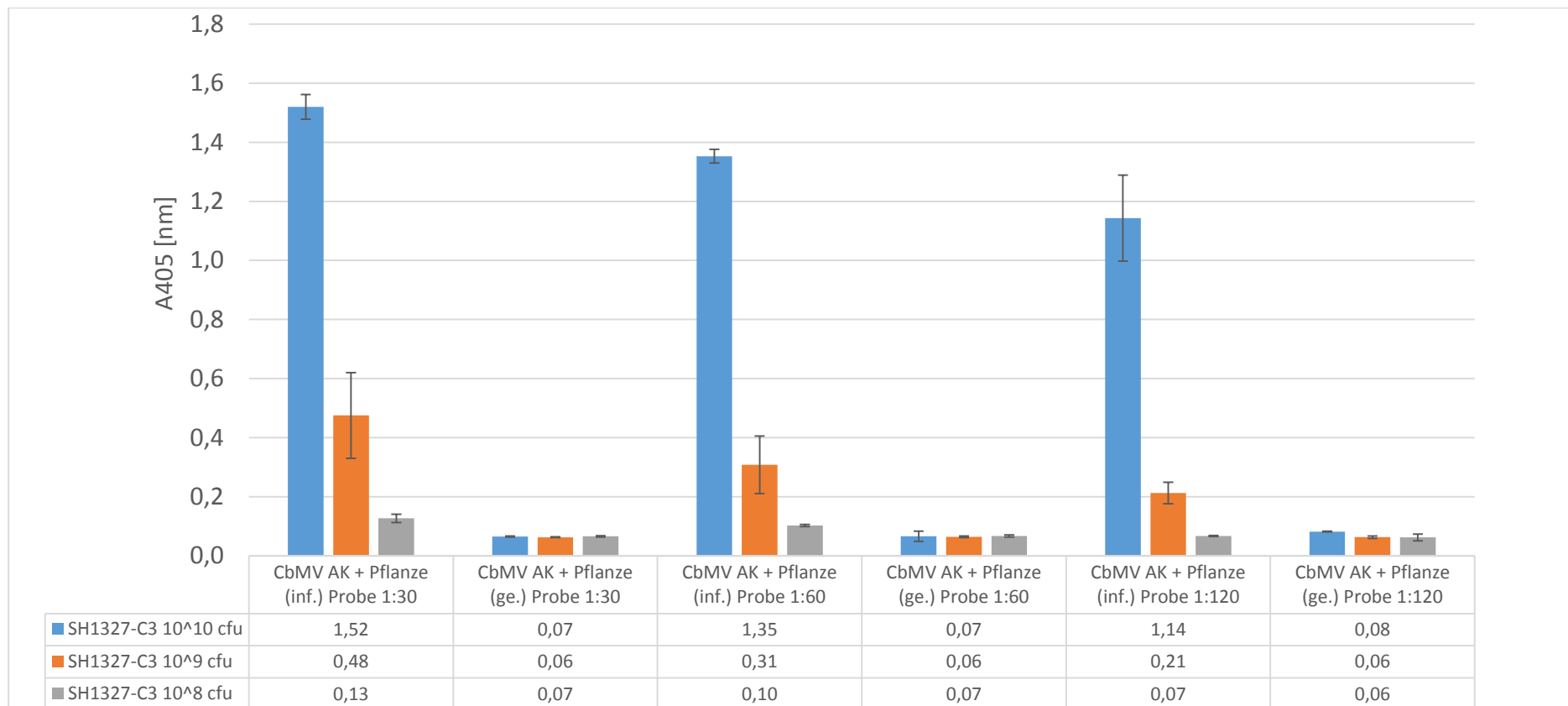


Abbildung 3.6-12 Ergebnisse eines Verdünnungstests in einem *Capture*-ELISA mit verschiedenen Konzentrationen des Pflanzenmaterials und der Phagen SH1327-C3.

In der obigen Abbildung sind die Ergebnisse eines Verdünnungstests in einem *Capture*-ELISA mit verschiedenen Konzentrationen des Pflanzenmaterials und der Phagen SH1327-C3 gezeigt. Die Phagen wurden in den genannten Konzentrationen pro Vertiefung eingesetzt. Das Pflanzenmaterial wurde nach der Standardmethode vorbereitet und danach in weiteren Ansätzen jeweils verdünnt. Deutlich wird, dass eine Abnahme der Phagenkonzentration und/oder der Pflanzenviruskonzentration in den Proben jeweils eine Reduzierung des Signals im ELISA zur Folge hatte. Der Nachweis der gebundenen Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat, inf.=infiziert, ge.=gesund; Mittelwert, (n=3). Messung nach 70 Minuten.

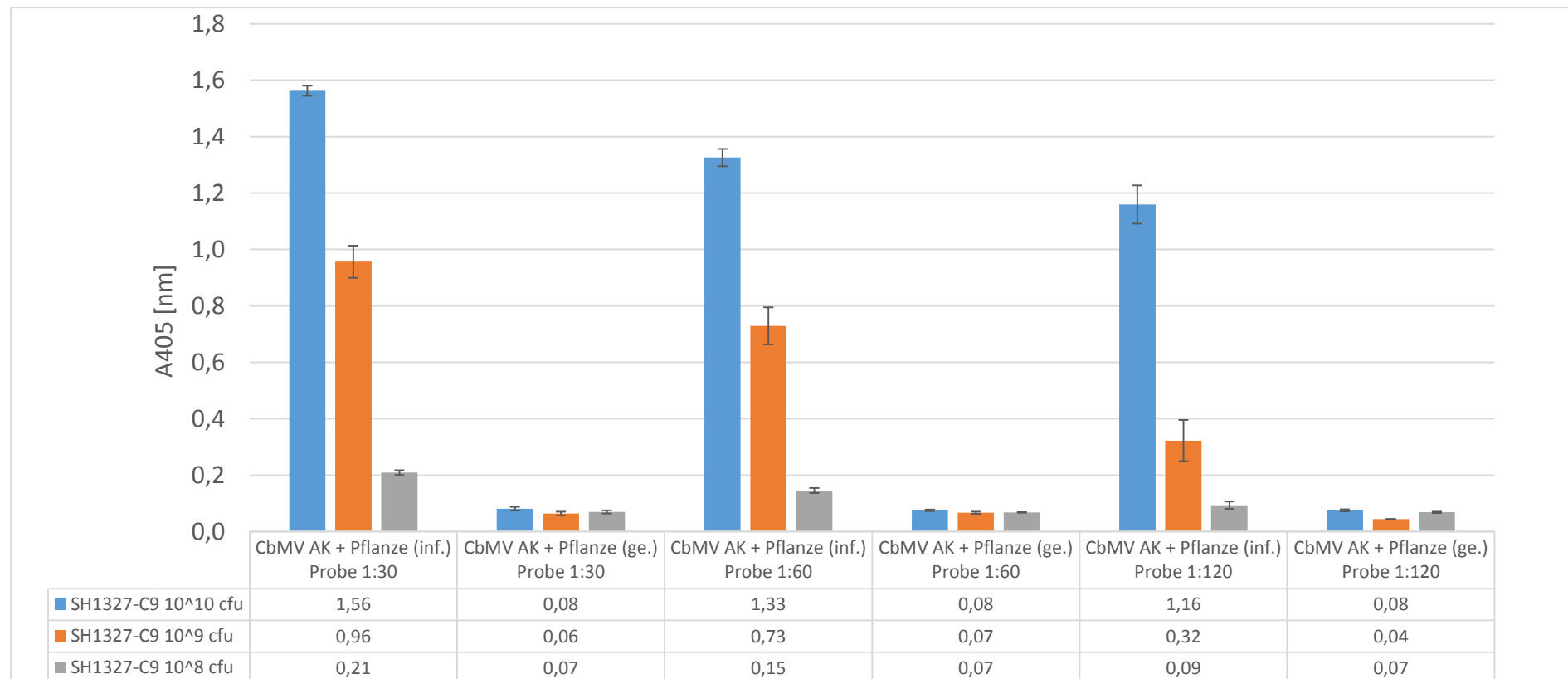


Abbildung 3.6-13 Ergebnisse eines Verdünnungstests in einem Capture-ELISA mit verschiedenen Konzentrationen des Pflanzenmaterials und der Phagen SH1327-C9.

In der obigen Abbildung sind die Ergebnisse eines Verdünnungstests in einem *Capture*-ELISA mit verschiedenen Konzentrationen des Pflanzenmaterials und der Phagen SH1327-C9 gezeigt. Die Phagen wurden in den genannten Konzentrationen pro Vertiefung eingesetzt. Das Pflanzenmaterial wurde nach der Standardmethode vorbereitet und danach in weiteren Ansätzen jeweils verdünnt. Deutlich wird, dass eine Abnahme der Phagenkonzentration und/oder der Pflanzenviruskonzentration in den Proben jeweils eine Reduzierung des Signals im ELISA zur Folge hatte. Der Nachweis der gebundenen Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat, inf.=infiziert, ge.=gesund, Mittelwert, (n=3). Messung nach 70 Minuten.

In den beiden obigen Abbildungen sind exemplarisch die Ergebnisse eines Verdünnungstests in einem *Capture*-ELISA mit verschiedenen Konzentrationen des Pflanzenmaterials und der Phagen SH1327-C3 und SH1327-C9 gezeigt.

Bei dem Phagen SH1327-C3 (Abbildung 3.6-12) konnte mit einer Konzentration von 10^{10} cfu/Vertiefung das CbMV in allen drei Verdünnungen des infizierten Pflanzenmaterials nachgewiesen werden. Das Signal war jeweils um mehr als das zehnfache stärker als in den jeweiligen Negativkontrollen (1,52 zu 0,07; 1,35 zu 0,07; 1,14 zu 0,08). Sobald die Phagen um den Faktor 10 verdünnt wurden, nahm die allgemeine Signalstärke in den Nachweisreaktionen ab. Eine Konzentration von 10^9 eingesetzten cfu ergab jedoch auch bei der stärksten Verdünnung des Pflanzenmaterials ein mehr als doppelt so starkes Signal wie in der vergleichbaren Negativkontrolle (0,21 zu 0,06). Die schwächer verdünnten Proben konnten eindeutig als negativ und positiv bestimmt werden. Ab einer Konzentration von 10^8 cfu zeigten sich die Grenzen der Nachweissensitivität. Bei der Standardprobe ist das Signal im Vergleich zu der Negativkontrolle noch doppelt so stark (0,13 zu 0,07), bei weiteren Verdünnungen gleichen sich die Werte dann aber an (0,10 zu 0,07 und 0,07 zu 0,07).

Bei dem Phagen SH1327-C9 (Abbildung 3.6-13) zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Eingesetzte Konzentrationen von 10^{10} cfu/Vertiefung lieferten bei dem infizierten Pflanzenmaterial zehnmals stärkere Werte als bei den Kontrollen (1,56 zu 0,08; 1,33 zu 0,08; 1,16 zu 0,08). Auch hier konnten die Nachweise mit 10^9 eingesetzten cfu erbracht werden (0,96 zu 0,06; 0,73 zu 0,07; 0,32 zu 0,04), während ab einer Konzentration von 10^8 cfu und einer weiteren Verdünnung des Pflanzenmaterials wieder eine Angleichung in den Signalstärken stattfand (0,21 zu 0,07; 0,15 zu 0,07; 0,09 zu 0,07).

Es konnte somit gezeigt werden, dass bei einer Standardprobenaufbereitung eine Konzentration an Phagen pro Reaktion von 10^9 - 10^{10} cfu für einen Nachweis in einem *Capture*-ELISA ausreichend war.

Bis zu diesem Zeitpunkt deuteten keine Resultate auf eine mögliche unspezifische Reaktion mit Pflanzenmaterial oder den Antikörpern hin. Um die Spezifität der Phagen weiter zu untersuchen, wurden *Capture*-ELISA mit verschiedenen Pflanzenviren und ihren jeweiligen *Capture*-Antikörpern vorbereitet und mit den Phagen getestet. Die Ergebnisse sind in den nächsten beiden Abbildungen (Abbildung 3.6-14 und Abbildung 3.6-15) gezeigt.

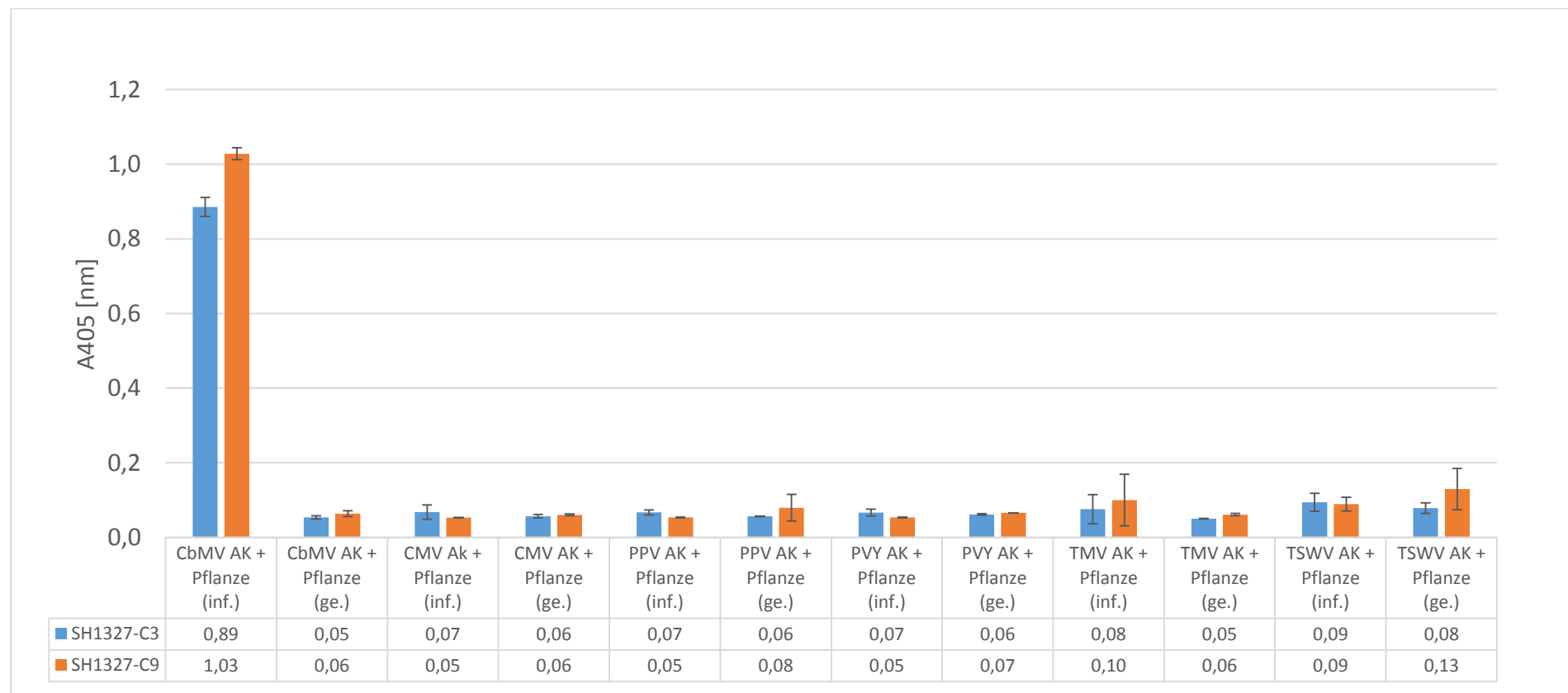


Abbildung 3.6-14 Ergebnisse eines Kreuztests in einem *Capture*-ELISA mit durch verschiedene Viren infiziertes Pflanzenmaterial, den jeweiligen Antiseren und den Gesundkontrollen (SH1327-C3 und SH1327-C9).

In der obigen Abbildung sind die Ergebnisse eines *Capture*-ELISA der Phagen (SH1327-C3 und SH1327-C9) mit durch verschiedene Viren infiziertes Pflanzenmaterial, den jeweiligen Antiseren und den Gesundkontrollen gezeigt. Nur der Versuch mit CbMV infiziertem Pflanzenmaterial führte zu einem eindeutigen positiven Ergebnis. Es sind keine Kreuzreaktionen mit anderen Viren oder Antikörpern ersichtlich. Der Nachweis der gebundenen Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat, inf.=infiziert, ge.=gesund, pro Vertiefung wurden 10^9 cfu eingesetzt. Mittelwert, (n=3). Messung nach 80 Minuten.

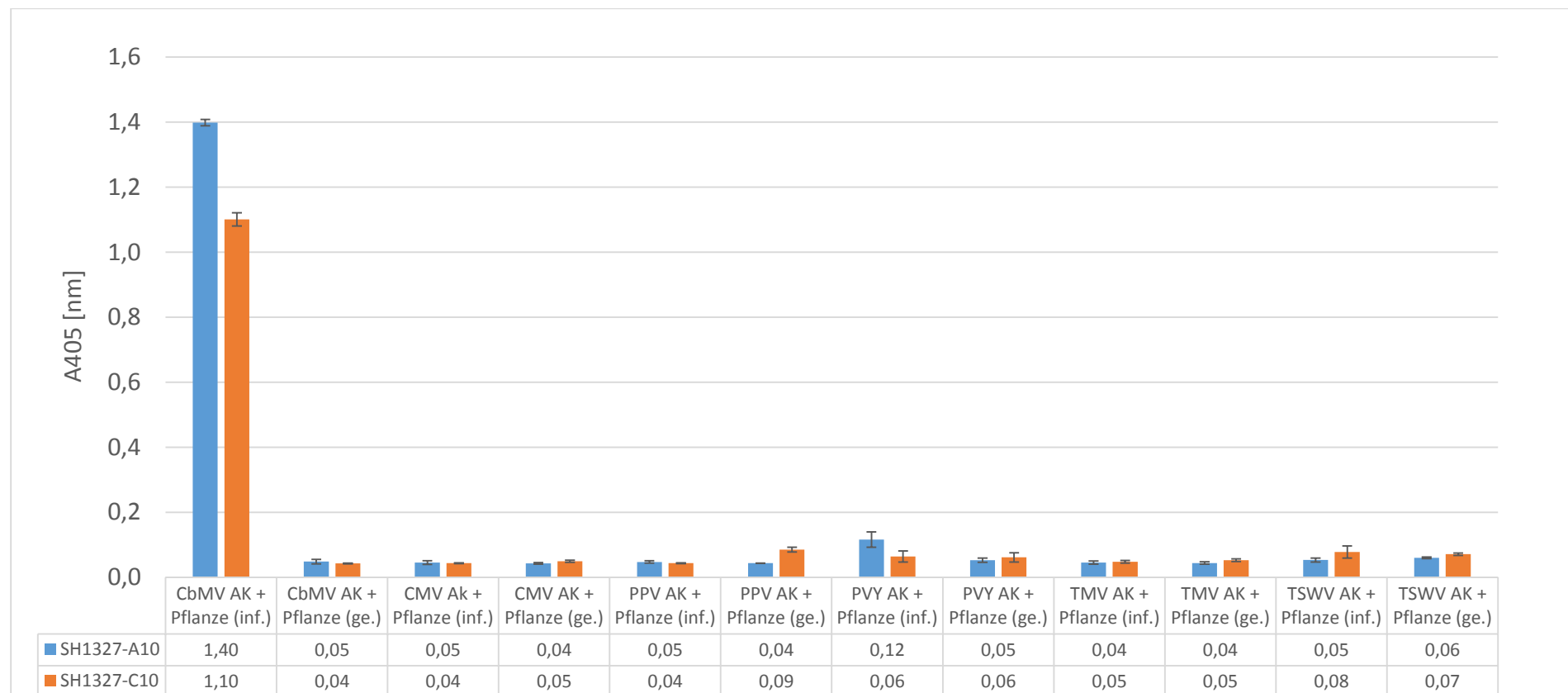


Abbildung 3.6-15 Ergebnisse eines Kreuztests in einem *Capture*-ELISA mit durch verschiedene Viren infiziertes Pflanzenmaterial, den jeweiligen Antiseren und den Gesundkontrollen (SH1327-A10 und SH1327-C10).

In der obigen Abbildung sind die Ergebnisse eines *Capture*-ELISA der Phagen (SH1327-A10 und SH1327-C10) mit durch verschiedene Viren infiziertes Pflanzenmaterial, den jeweiligen Antiseren und den Gesundkontrollen gezeigt. Nur der Versuch mit CbMV infiziertem Pflanzenmaterial führte zu einem eindeutigen positiven Ergebnis. Es sind keine Kreuzreaktionen mit anderen Viren oder Antikörpern ersichtlich. Der Nachweis der gebundenen Phagen erfolgte mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat, inf.=infiziert, ge.=gesund, pro Vertiefung wurden 10^9 cfu eingesetzt. Mittelwert, (n=3). Messung nach 60 Minuten.

In den beiden obigen Abbildungen sind die jeweiligen Ergebnisse der Kreuztests in einem *Capture*-ELISA mit verschiedenen Antikörpern und Pflanzenviren der vier Phagen gezeigt. Neben der erwarteten positiven Reaktion mit CbMV infiziertem Pflanzenmaterial zeigte sich in den Versuchen keine Kreuzinteraktion, sobald andere Antikörper oder Pflanzenviren getestet wurden. Es war im Gegensatz zu den Peptidphagen somit möglich, einen eindeutigen Nachweis eines Pflanzenvirus aus infizierten Pflanzen zu erbringen. Die mit unterschiedlichen Viren infizierten Pflanzen wiesen dabei eindeutige Symptome auf beziehungsweise wurden vor der Verwendung (CbMV) auf das Vorhandensein der jeweiligen Pflanzenviren getestet.

Die Versuche wurden danach weiter ausgewertet, in dem die jeweilige Behandlung (i = infizierter Pflanzensaft, k = gesunder Pflanzensaft), der Phagenklon (A10, C3, C9, C10), die Phagenkonzentration (a = unspezifische Konzentration, b = 10^{10} cfu/Vertiefung, c = 10^9 cfu/Vertiefung) und die Probenkonzentration (f = Probe 1:30 verdünnt, g = Probe 1:60 verdünnt) miteinander verglichen wurden.

Der Boxplot der Daten ist in der folgenden Abbildung 3.6-16 dargestellt.

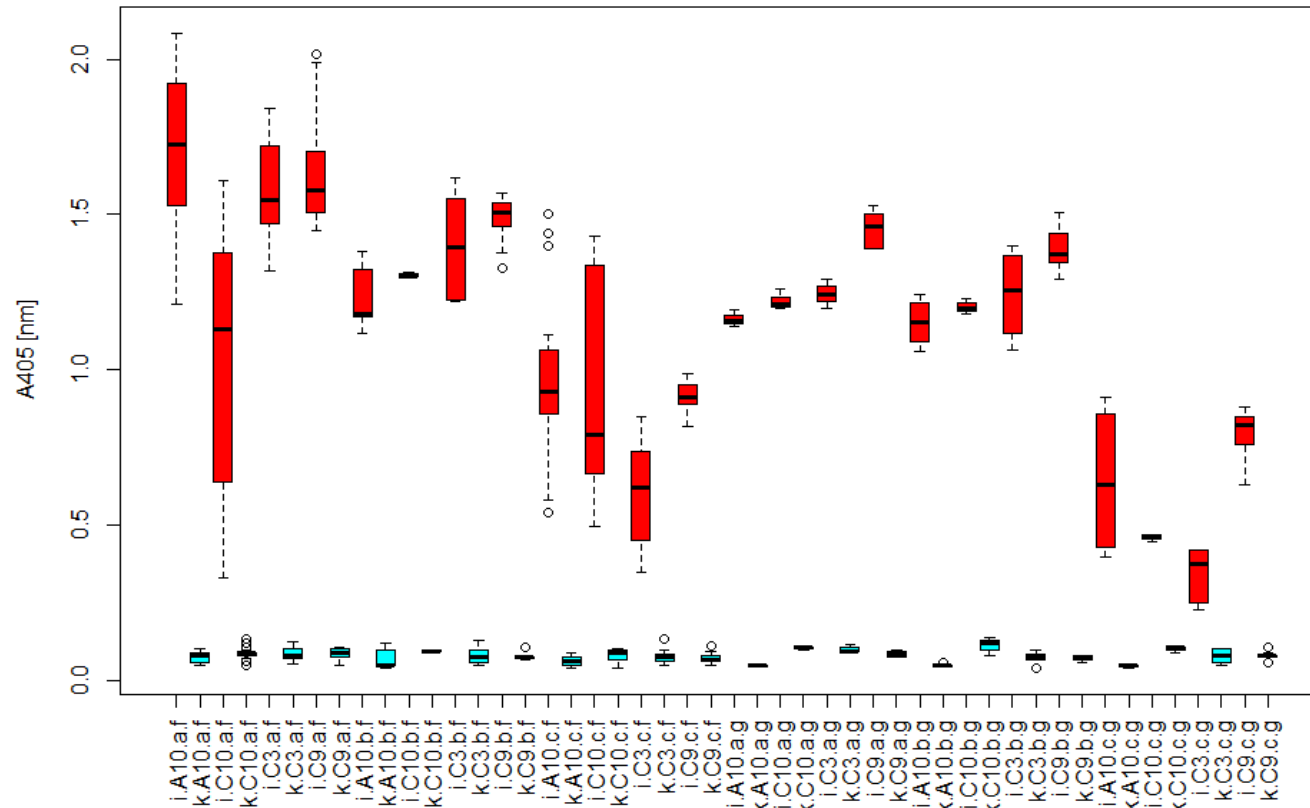


Abbildung 3.6-16 Die grafische Darstellung der Verteilung der Versuchsdaten in einem Boxplot

In der obigen Abbildung kann der Unterschied zwischen gesundem und CbMV infiziertem Pflanzenmaterial deutlich gezeigt werden. Außerdem wird die Abnahme der Signalstärken bei der Verdünnungen sichtbar. Behandlung (i = infizierter Pflanzensaft, k = gesunder Pflanzensaft), Phagenklon (A10, C3, C9, C10), Phagenkonzentration (a = unspezifische Konzentration, b = 10^{10} cfu/Vertiefung, c = 10^9 cfu/Vertiefung), Probenkonzentration (f = Pflanzenprobe 1:30 verdünnt, g = Pflanzenprobe 1:60 verdünnt))

Durch die grafische Darstellung der Verteilung der Versuchsdaten im obigen Boxplot kann der Unterschied in den Signalstärken zwischen gesundem und mit CbMV infiziertem Pflanzenmaterial deutlich gezeigt werden. Durch die Verdünnungen einzelner eingesetzter Komponenten nimmt das Signal im Mittel jeweils weiter ab.

3.6.2 Expression schon beschriebener scFvs im pHAL30 Phagemid

In einem weiteren Versuch sollte zusätzlich noch getestet werden, ob schon in der Literatur beschriebene scFvs mit den hier verwendeten Methoden und der Expression im pHAL30 Phagemid für den Nachweis von Pflanzenviren aus Pflanzensaft eingesetzt werden können. Dazu wurden jeweils ein scFv gegen CMV (Koohapitagtam *et al.* 2009) und PVY (Xiao *et al.* 2000) ausgewählt. Zusätzlich wurde die ursprüngliche Linkersequenz durch den in den pHAL9/10-Bibliotheken vorliegenden Linker ersetzt und beide scFvs in ihren Codons für die Expression in *E. coli* optimiert.

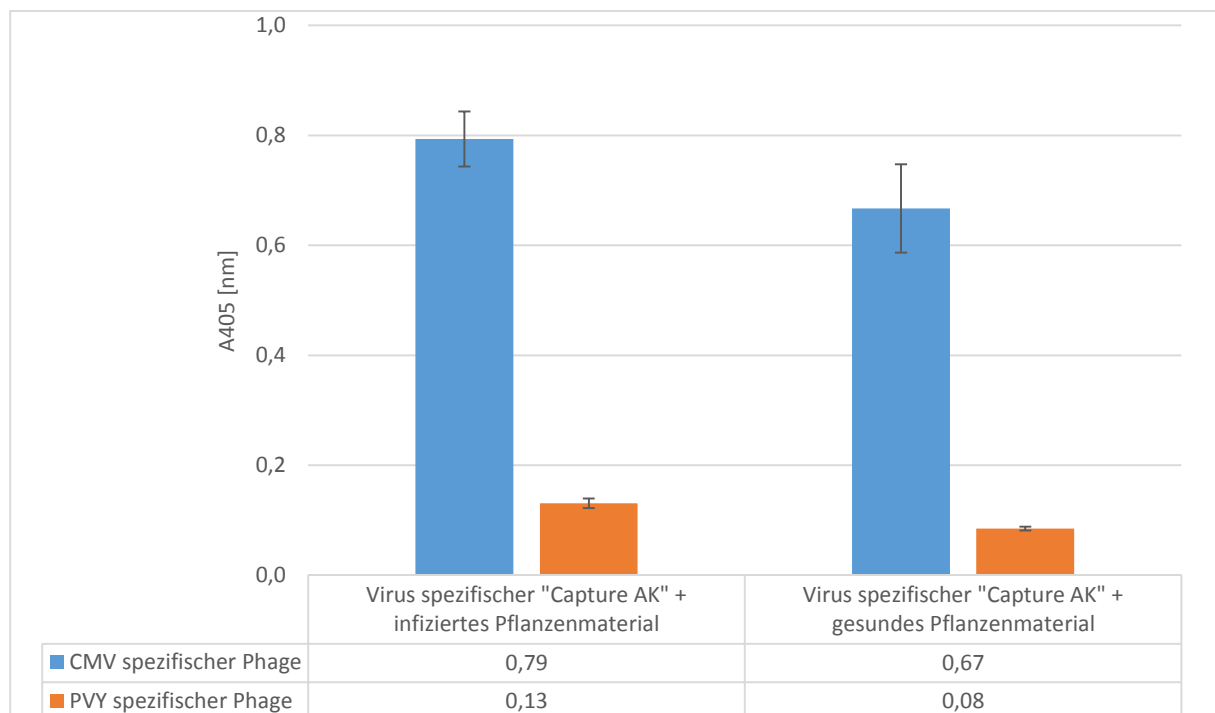


Abbildung 3.6-17 Ergebnisse des *Capture*-ELISA mit gegen CMV (PV-0506) und PVY (N605) gerichteten Phagen aus infiziertem Pflanzenmaterial

In der obigen Abbildung sind die Ergebnisse eines *Capture*-ELISA mit gegen CMV und PVY gerichteten Phagen aus infiziertem Pflanzenmaterial gezeigt (CMV PV-0506 und PVY N605). Während die Reaktion des PVY spezifischen Phagen sehr geringe Signale mit beiden Proben zeigt, sind die Reaktionen des CMV spezifischen Phagen stärker. Hier kommt es auch zu einer unspezifischen Reaktion mit dem gesunden Pflanzenmaterial. Pro Vertiefung wurden 10^{10} cfu eingesetzt. Der Nachweis der gebundenen Phagen erfolgt mit dem *HRP/Anti-M13* Konjugat. (n=3). Messung nach 70 Minuten.

Wie in der obigen Abbildung deutlich zu erkennen ist, waren die Versuche mit zwei in der Literatur beschriebenen scFvs mit dieser Methode nicht erfolgreich. Der CMV spezifische scFv (EU589245.1) führte zu einer unspezifischen Reaktion (0,79 zu 0,67 im ELISA) und der Nachweis des PVY spezifischen scFv (3_17) ergab im ELISA nur sehr geringe Signale (0,13 zu 0,08). Abweichend zu der in der Literatur beschriebenen Vorgehensweise wurde hier jedoch wie schon bei den CbMV Nachweisen für eine bessere Vergleichbarkeit innerhalb dieser Arbeit der M13-Phage mit pIII-Fusionsproteinen in einem *Capture-ELISA* eingesetzt und nicht nur der lösliche scFv. Im Gegensatz dazu erfolgte der Nachweis von CMV bei Koohapitagtam *et al.* (2009) in einem *plate-trapped ELISA* und mit den löslichen scFvs. Die Interaktion des scFv 3_17 mit PVY wurde von Xiao *et al.* (2000) in einem Western Blot gezeigt.

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollten auf Phagen basierte „*antibody mimics*“ gegen das *Calibrachoa mottle virus* (CbMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Plum pox virus* (PPV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco mosaic virus* (TMV) und *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) erstellt werden, die einen direkten Nachweis aus Pflanzen erlauben und in einem ELISA gesundes Pflanzenmaterial von infiziertem Pflanzenmaterial unterscheiden können.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeiten diskutiert und neben positiven Aspekten bei der Verwendung der „*antibody mimics*“ auch mögliche Probleme herausgestellt.

Grundsätzlich ist die Idee der Identifikation von virusbindenden „*antibody mimics*“ durch die Verwendung von Phagenbibliotheken nicht neu. Schon 1994 stellte Nissim fest, dass durch die Verwendung der *Phage Display* Technologie immunochemische Reagenzien mit hohen Spezifitäten identifiziert werden konnten und sich somit neue Möglichkeiten für die Forschung eröffneten (Nissim *et al.* 1994). In den folgenden Jahren zeigten sich erste Erfolge. So wurden humane scFv-Bibliotheken gegen gereinigtes CMV (Ziegler *et al.* 1995) und das *Potato leafroll luteovirus* (PLRV) (Harper *et al.* 1997) eingesetzt und auf bindende Moleküle untersucht. Es gelang scFvs zu identifizieren, die einen positiven Nachweis der jeweiligen Viren in Pflanzenmaterial ermöglichen. In den folgenden Jahren wurde das Screening verschiedener scFv-Bibliotheken gegen weitere Pflanzenviren beschrieben, wie zum Beispiel gegen das PVY (Boonham & Barker 1998) oder verschiedene Tosspoviren (Franconi *et al.* 1999). Die Methode des Biopanning mit scFv-Bibliotheken erwies sich als relativ stabil, obwohl den Arbeiten unterschiedliche Zielsetzungen zu Grunde lagen. So stand nicht nur zwangsläufig der Nachweis von Viren aus infiziertem Pflanzenmaterial im Vordergrund, sondern die scFvs sollten zum Beispiel auch funktional in Pflanzen exprimiert werden (Franconi *et al.* 1999), Virusepitope detektieren (Holzem *et al.* 2001) oder spezifische virusassoziierte Proteine wie die NIa der Potyviren unterscheiden (Hust *et al.* 2002). Obwohl Bernal 2004 der *Phagen Display* Technologie auch in der Pflanzenforschung spannende Zukunftsperspektiven zusprach (Bernal & Willats 2004), muss auf dem Nachweissektor für Pflanzenviren bis jetzt aber festgestellt werden, dass sich nur relativ wenige Arbeiten in den letzten 15 Jahren mit der Verwendung von „*antibody mimics*“ aus scFv-Phagenbibliotheken für direkte Nachweisreaktionen von Pflanzenviren aus infizierten Pflanzen befasst haben. So gelang unter anderem die Isolation von scFvs, die das *Grapevine virus B* in infizierten *N. occidentalis* nachweisen konnten (Saldarelli *et al.* 2005), die Isolation eines Hüllprotein spezifischen scFv aus einem *mouse phage library antibody* für das *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) (Jahromi *et al.* 2009) und der

Nachweis des *Papaya ringspot virus* in infiziertem Pflanzenmaterial (Maheshwari *et al.* 2015). Die Verwendbarkeit von *Phage Display Peptide* Bibliotheken für den Nachweis einer Peptid-Virus-Interaktion wurde zum Beispiel für das CMV (Gough *et al.* 1999), das *Rice black streaked dwarf virus* (RBSDV) (Bai *et al.* 2001) und das *Banana streak virus* (BSV) gezeigt (Chua *et al.* 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden beide *Phage Display* Technologien eingesetzt und infiziertes Pflanzenmaterial mit identifizierten Phagen untersucht.

Die ersten Versuche beinhalteten dabei die Verwendung der *Phage Display Peptide* Bibliotheken zum Nachweis von exprimierten Hüllproteinen von Pflanzenviren und von gereinigtem TMV. Das Ziel war nicht nur die Identifizierung der bindenden Peptidsequenzen der Bibliotheken, diese sollten zusätzlich noch in weiteren Versuchen mutiert und teilweise auch in andere „*antibody mimics*“ überführt werden, um genauere Aussagen zu den Bindungseigenschaften der Aminosäuresequenzen geben zu können. Interessant ist dabei zum Beispiel, wie stark die Bindung von der Position des Peptides innerhalb des Fusionsproteins (N-terminal, C-terminal oder innerhalb des umgebenden Proteins wie bei den *complementarity determining regions* (CDR) von Antikörpern), von der reinen Aminosäuresequenz oder von der Struktur des Peptids (lineares 12er Peptid oder C7C-Schleife) abhängt. Eine mögliche Verstärkung der Protein-Protein-Interaktion wäre durch die oben genannten Veränderungen zusätzlich denkbar gewesen. Auch die Mutation einzelner Aminosäuren innerhalb der Sequenz hätte diesen Effekt haben können, dies zeigt zum Beispiel die bekannte Entwicklung des *Strep*-tags zum *Strep*-tag II (Schmidt *et al.* 1996). Als alternativer „*antibody mimic*“ für die Überführung der Sequenzen wäre unter anderem die 10. Domäne des Fibronectin Typ III möglich gewesen (Garcia-Ibilcieta *et al.* 2008).

In dem folgenden Kapitel werden die Ergebnisse des Biopanning der *Ph.D.*TM *Phage Display Libraries* gezeigt und diskutiert.

4.1 Das Biopanning der Ph.D.TM Phage Display Libraries

Für das Biopanning mit den Ph.D.TM Phage Display Libraries wurden Hüllproteine der Viren, die in Bakterien exprimiert wurden, und eine Reinigung von TMV aus *N. benthamiana* als Zielmoleküle verwendet. Das CbMV wurde zu diesem Zeitpunkt noch nicht untersucht. Die exprimierten Hüllproteine von CMV, PPV, TMV und TSWV (PVY wurde nicht untersucht) wurden in einem ELISA durch Virus spezifische polyklonale Antikörper nachgewiesen, dabei variierte die Intensität des Signals jedoch relativ stark (siehe Abbildung 3.2-2). Der Unterschied in den Signalstärken im Vergleich zu den Nachweisen in infiziertem Pflanzenmaterial, die eindeutige positive Ergebnisse ergaben (Kapitel 3.1), können dabei durch die unterschiedlichen Konformationen beziehungsweise Strukturen erklärt werden. Die Antikörper erkennen Epitope der Virionen, die in dieser Form nicht zwangsläufig bei den einzelnen exprimierten Hüllproteinen vorliegen müssen. Diese Problematik galt es auch im Hinblick auf das Screening zu beachten. Einzelne positiv bindende Phagen entsprechen einem monoklonalen Binder, der möglicherweise in keine Interaktion zu kompletten Virionen tritt. Die ersten Ergebnisse der Biopannings I und II waren in der Form schlecht zu interpretieren (zum Beispiel Abbildung 3.4-1 oder Abbildung 3.4-2). Da die Negativkontrollen (Blocklösung in Plastikoberfläche) zu eindeutigen positiven Signalen in den jeweiligen ELISAs führten, waren die nachgewiesenen positiven Interaktionen mit dem jeweiligen *target* nicht aussagekräftig. Es zeigt sich dabei ein grundsätzliches Problem beziehungsweise eine Eigenart der Phage Display Technologie. Obwohl in der Literatur viele erfolgreiche Screenings und gut bindende Liganden beschrieben werden, gibt es auch mehrdeutige Ergebnisse, wie zum Beispiel die oben im Text beschriebenen Interaktionen. Es können Phagen ohne eine spezifische Affinität gegenüber dem Zielmolekül gewonnen werden. Die Mehrheit der in den Bibliotheken vorliegenden Phagen wird weder an das Zielmolekül noch an Bestandteile des Screeningsystems binden, während Phagen mit einer geringen Bindeaffinität durch die vielen Waschschrte entfernt werden. Neben den nicht zwangsläufig auftretenden spezifisch bindenden Phagen, sammeln sich in den Eluatn noch zusätzliche unspezifisch bindende Phagenklone an. Phagen können möglicherweise in hohen Konzentrationen vorliegen, die an andere Komponenten des Screeningsystems binden. Das können zum Beispiel die Oberflächen der Reaktionsmedien (Mikrotiterplatten, Plastikugeln), Bestandteile der Blocklösungen, der „*capturing* Reagenzien“ (zum Beispiel Streptavidin, Biotin, „*capture antibody*“) sowie Verunreinigungen innerhalb der Probe sein (Vodnik *et al.* 2011). Dabei werden diese sogenannten „*target-unrelated phages or peptides*“ (TUPs) (Menendez & Scott 2005) nicht nur durch die beschriebenen fehlerhaften Selektionsprozesse bevorzugt, sondern teilweise auch durch Vorteile in der Vermehrungsrate. Eine erhöhte

Infektionsrate beziehungsweise Leistungsfähigkeit kann dabei durch die Fusionspeptide selbst oder durch Mutationen innerhalb des Phagengenoms ausgelöst werden (Brammer *et al.* 2008). Problematisch wird es dann, wenn diese Phagen nicht als falsch positive Ergebnisse identifiziert, sondern den bindenden Klonen zugezählt werden (Vodnik *et al.* 2011). Bedingt durch die in Biopannings häufig verwendete Immobilisation des Zielmoleküls in Mikrotiterplatten, ist die Wahl des Plattentyps von großer Bedeutung. Schon Adey konnte 1995 zeigen, dass ein Plastik bindender Phage selbst bei der Zugabe einer Blocklösung mit der Plastikoberfläche interagieren konnte (Adey *et al.* 1995). Ein ähnliches Problem zeigte sich in dieser Arbeit. Die in dem Biopanningverfahren (Kapitel 3.4.1 und 3.4.2) verwendete Kombination aus Mikrotiterplatte und Blocklösung (PS, Microlon, „*med-binding*“ und Ovalbumin in PBS) vermochte eine Interaktion der Phagen mit der Plastikoberfläche nicht zu verhindern und das, obwohl die Mikrotiterplatten mit Ovalbumin in der Blocklösung bei dem Standardnachweis von Pflanzenviren innerhalb der Arbeitsgruppe erfolgreich verwendet wurden. Interessant ist dabei auch das Ergebnis in Abbildung 3.4-3, in der deutlich wird, dass auch Phagen mit spezifischen zielgerichteten Sequenzen (K4-Phage gegen Streptavidin, (Lunder *et al.* 2008)) bei einer unvollständigen Blockung der Plastikoberfläche wohl mit dieser interagieren und somit später nachgewiesen werden können. Sobald die Kombination verändert wurde (F96 MAXISORB NUNC IMMUNO PLATE von Nunc und Milchpulver in PBS), konnte die Interaktion vermieden werden. Hier zeigt sich, dass praktisch jedes Protein zu einem gewissen Grad unspezifisch und nichtkovalent an Plastik binden kann (Vodnik *et al.* 2011). Je nach Plastikart können Proteine dabei sogar teilweise denaturieren, wie es zum Beispiel mit BSA gezeigt werden konnte (Filisko *et al.* 1986). Dies führt zu Konformationsänderungen, die natürlich einen Einfluss auf die Struktur der Epitope haben können. Zusätzlich zu der Bindung an die Plastikoberfläche war bei der zu Anfang gewählten Methode und den resultierenden Ergebnissen auch eine Bindung an das Ovalbumin (Blocklösung) denkbar. Nach einer Sequenzierung ausgewählter Klone und einem Vergleich mit verschiedenen von Vodnik *et al.* in 2011 aus unterschiedlichen Literaturstellen zusammengetragenen Sequenzen von bestätigten oder vermuteten plastikbindenden Motiven innerhalb der Peptidsequenzen zeigte sich relativ schnell, dass viele Klone dieser Arbeit ähnliche Motive aufwiesen. Dabei wurden unter anderem die Motive „WHXW“, „WXXW“ und „WHW“ als schon bekannte oder potentielle „Plastikbinder“ erwähnt (Vodnik *et al.* 2011). Einige davon fanden sich in ähnlicher Form in vielen Phagenklonen wieder, zum Beispiel in TMV Ph.D.TM-12, Klon 4 (WHWAPYFPWPVA) oder TMV Ph.D.TM-12, Klon 2 (WHPTLNPYMREP). Nach einem Vergleich mit den vorliegenden Sequenzen wurden für weitere Versuche Phagenklone ohne diese Motive

ausgewählt und mit der neuen Methode verwendet. Um generelle Aussagen zu dem System treffen zu können, wurden weitere Versuche zunächst nur mit den gegen das TMV gescreenten Phagen und dem gereinigten TMV durchgeführt. Im Gegensatz zu den exprimierten Hüllproteinen lagen hier direkt Virionen vor. Es wurden Phagen mit den Fusionssequenzen „DWAQLTQRWYLR“, die neben den wahrscheinlichen „Plastikbindern“ mehrfach in den Eluaten auftraten, ausgewählt. Obwohl erste Versuche positive Ergebnisse und eine eindeutige Reaktion in einem ELISA mit gereinigtem TMV *Ohio V* zeigten (siehe Abbildung 3.4-4), war der Nachweis aus infiziertem Pflanzenmaterial nicht möglich (siehe Abbildung 3.4-5). Es lag eine eindeutige Interaktion mit Pflanzenmaterial vor. Da die Anzahl der möglicherweise positiven Phagenklone in den Eluaten durch die Vermehrung von „Plastikbindern“ wahrscheinlich schon eingeschränkt war, wurde im Folgenden ein weiteres zusätzliches Biopanning durchgeführt. Die in Kapitel 3.4.3 gezeigten Ergebnisse wurden mit der angepassten Methode erworben. Es wurde schnell deutlich, dass die Interaktionen in den Negativkontrollen mit der Plastikoberfläche oder der Blocklösung dadurch größtenteils verhindert werden konnten (siehe Abbildung 3.4-6 bis Abbildung 3.4-8). Im Folgenden wurden einige im Screening erfolgreich bindende Phagen ausgewählt und untersucht, ob ein positiver Nachweis in einem ELISA mit infiziertem und gesundem Pflanzenmaterial möglich war. Es zeigten sich dabei aber wieder Reaktionen mit gesundem Pflanzenmaterial. Für genauere Untersuchungen der unspezifischen Reaktionen wurden die Peptide „DWAQLTQRWYLR“, „LWGWYGA“ und „WHPTLNPYMREP“ mit ihren Linkersequenzen in den M13K07 Phagen überführt, der im Gegensatz zum ursprünglichen Vektor noch ein Gen für eine Kanamycinresistenz aufweist und die Selektion der mit den Phagen infizierten Bakterien somit vereinfachte. Veränderungen der Inkubationszeiten, des pH-Wertes, der Blocklösung, der Konzentrationen verschiedener Arbeitslösungen, der unterschiedlichen Verdünnungen der Phagen und der Reaktionslösungen führten jedoch zu keiner nennenswerten Reduktion der Reaktion in den Negativkontrollen mit dem gesunden Pflanzenmaterial. Diese variierte zusätzlich noch in Abhängigkeit vom eingesetzten Pflanzenmaterial unterschiedlicher Pflanzensorten relativ stark voneinander (siehe Abbildung 3.4-9). Bei diesen Versuchen zeigte der Wildtypphage keine oder im Fall von *C. quinoa* nur eine geringe Reaktion auf das Pflanzenmaterial. Grundsätzlich gilt dabei für Phagen, dass sie in der Natur auch in und an Pflanzen vorkommen. So wurde unter anderem die Stärke der Anpassung von Bakteriophagen an ihre Wirtsbakterien in Blättern der Rosskastanie untersucht (Koskella *et al.* 2011). Wie Phagen dabei in die Phyllosphäre der jeweiligen Pflanzen eindringen, ist nicht komplett geklärt. So gab es 2003 Erklärungsansätze von Gill & Abedon, dass die Phagen schon bei der Keimung

der Pflanzen vorliegen würden und somit ein normaler Bestandteil der Pflanzenflora wären. Denkbar wäre aber auch, dass sich Phagen über die Phyllosphären in Kontakt stehender Pflanzen verbreiten könnten (Gill & Abedon 2003). In wie fern sie dabei mit pflanzeigenen Bestandteilen interagieren ist in Gänze noch nicht bekannt. Da in dieser Arbeit kaum Interaktionen des Wildtypphagen (siehe Abbildung 3.4-9) mit dem Pflanzenmaterial auftraten, scheint hier ein Problem mit dem Fusionsteil der pIII-Proteine vorzuliegen. In einem weiteren Versuchsteil wurde ein möglicher Einfluss der Linkersequenz auf die unspezifische Reaktion untersucht. Dieser konnte jedoch nicht bestätigt werden (Abbildung 3.4-10). Es zeigte sich dabei zusätzlich, dass nicht jede Peptidsequenz zwangsläufig zu einer Interaktion mit dem Pflanzensaft führt. In diesem Versuch konnte keine unspezifische Reaktion des K4-Phagen gezeigt werden. Darüber hinaus wird das Zielmolekül (Streptavidin) aber auch von diesem Phagen nach einer nachträglichen Zugabe im Pflanzenmaterial nicht erkannt. In einem abschließenden Versuchsteil wurde das TMV mit einer Butanol/Chloroform Fällung aus dem Pflanzenmaterial gereinigt und gleich behandeltes gesundes Pflanzenmaterial als Kontrolle verwendet (siehe Abbildung 3.4-11). Es zeigten sich erstmals Unterschiede in den Signalstärken, bei denen die Proben der infizierten Pflanzen stärkere Signale aufwiesen. Jedoch kam es auch in diesen Versuchen zu unspezifischen Interaktionen mit gesundem Pflanzenmaterial. Es wurde deutlich, dass der gewollte spezifische Nachweis von Pflanzenviren mit „*antibody mimics*“ aus Peptidbibliotheken so nicht durchführbar war. Selbst bei einer eindeutigen Reaktion mit spezifischen Epitopen der Zielmoleküle ist eine Interaktion mit anderen Proteinen oder Bestandteilen des Pflanzensaftes möglich.

Da die Peptide normalerweise nur sehr kleine Interaktionsoberflächen der jeweiligen Proteine erkennen, ist es vorstellbar, dass sogar konservierte *hot-spot* Regionen in diskontinuierlichen Epitopen für eine positive Erkennung ausreichen (Vodnik *et al.* 2011). Somit liegen womöglich zu viele potentielle Epitope im Pflanzensaft vor, um den kurzen Peptiden eine eindeutige Bestimmung ermöglichen zu können. Als mögliches Beispiel für solche Fälle kann die Peptidsequenz „LPLTPLP“ aufgeführt werden. In diversen Experimenten wurde diese als funktionierendes Bindungspeptid in einer Ph.D.-7TM Bibliothek identifiziert. Interessant ist dabei jedoch das jeweilige Ziel. So wurde zum Beispiel die Interaktion mit Skelettmuskelzellen (Heemskerk *et al.* 2012) und mit Herzmuskelzellen (Nicol *et al.* 2009) gezeigt. Es gelang aber auch, die Spezifität gegenüber Gehirnzellen (Smith *et al.* 2002) fluorometrisch nachzuweisen. Zusätzlich bindet das Peptid zum Beispiel an die *Aminoacyl-tRNA Site* von bakterieller 16S ribosomaler RNA (Li *et al.* 2009) und das Prion-Protein (Mangels 2008). Von dieser Art Peptiden mit unterschiedlichen Interaktionszielen gibt es dabei mehrere, wie zum Beispiel die

Sequenz „HAIYPRH“ oder „SVSVGMKPSRP“, beide wieder aus Peptidbibliotheken. Von dem Peptid „HAIYPRH“ ist unter anderem bekannt, dass es spezifisch mit immobilisiertem Zn^{2+} (Brammer *et al.* 2008), mit einem monoklonalen Antikörper gegen das *Hepatitis E virus* (Gu *et al.* 2004) und dem Druckerpapier von Hammermill® reagiert (Cunningham *et al.* 2010). Das Peptid wurde in der Form auch noch in anderen Arbeiten gefunden (zum Beispiel in (Maruta *et al.* 2003, Rahim *et al.* 2003, Serizawa *et al.* 2007)), jedoch fällt es ähnlich wie bei dem „LPLTPLP“-Peptid schwer, nur von einem TUP zu sprechen, da die Studien unterschiedliche Komponenten und Systeme verwendeten und einige Interaktionen deutlich zeigen konnten. Noch interessanter wird es bei dem Peptid „SVSVGMKPSRP“. Mit ihm wurde die Bindung an (HIV-1) Vif Proteine (Yang *et al.* 2003) und DNA (Wölcke & Weinhold 2001) im ELISA gezeigt. Wu identifizierte die Sequenz als eine von zehn hochaffinen Peptiden, die ein Epitop des *Japanese encephalitis virus* (JEV) imitierten und zeigte dies in kompetitiven ELISA, „*plaque neutralization inhibitions*“ und der Interaktion mit JEV neutralisierenden Antikörpern in Mäusen (Wu & Lin 2001). Gleichzeitig wurde die Sequenz jedoch als möglicher TUP interpretiert (Kolb & Boiziau 2005, Shtatland *et al.* 2007). Je nach Experiment ist es auch nicht überraschend, dass Phagen mit einer durch ihr Fusionsprotein erhöhten Vermehrungsrate in vielen Versuchen als unerwünscht gelten, in einigen aber vielleicht einen essentiellen Durchbruch erlauben. Im Gegensatz zu den meisten Peptiden haben sie ihre biologische Aktivität schon gezeigt. Es ist dann auch wenig verwunderlich, dass sich zum Beispiel das Peptid „HAIYPRH“ schon im Pflanzenvirussektor wiederfindet. Schon 1998 wurde es bei der Identifizierung von Epitopen des CMV in einem Biopanning mit gegen CMV gerichteten Antikörpern nachgewiesen (He *et al.* 1998). Jedoch konnten Peptid-Aptamere auch schon erfolgreich in transgenen Pflanzen exprimiert werden und nachweislich eine Resistenz gegenüber unterschiedlichen Pflanzenviren auslösen (Rudolph *et al.* 2003, Reyes *et al.* 2013).

Zusammengefasst und auf diese Arbeit mit Pflanzenmaterial bezogen, wird deutlich, dass keine hundertprozentigen Aussagen zu den Bindungsaffinitäten getroffen werden können. Die in dieser Arbeit sequenzierten Peptide waren dabei nach einem Vergleich mit der Datenbank *PepBank* (<http://pepbank.mgh.harvard.edu/>) insofern einzigartig, als dass sie in dieser Form noch nicht publiziert wurden. *PepBank* hat dabei einen Zugriff auf verschiedene Quellen, wie MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*), ASPD (*Artificial Selected Proteins/Peptides Database*) und UniProt (*Universal Protein Resource*). Es werden aber auch manuell PDF-Dateien durchsucht (Shtatland *et al.* 2007). In Bezug auf die ursprüngliche Fragestellung, ob sich die Peptide für den Nachweis von Pflanzenviren in Pflanzen eignen, lässt sich jedoch festhalten, dass sie nicht nur in dieser Arbeit selektiv als TUP

agieren und somit in der Form nicht zu verwenden sind. Dabei ist es unerheblich, ob die Peptide unspezifisch oder spezifisch mit dem Pflanzenmaterial interagieren. Wie im obigen Text gezeigt wurde, können die Bindungen kaum vorhergesagt werden und beziehen sich teilweise nur auf kleinste Motive innerhalb der kompletten Sequenz (zum Beispiel „WHW“ für eine Interaktion mit Plastik). Eine mögliche andere Herangehensweise für die Nutzung von Peptiden als „*antibody mimics*“ wäre die Verwendung von schon bekannten Motiven, die zum Beispiel für die Interaktion von Virusproteinen untereinander oder mit dem Vektor notwendig sind und möglicherweise weniger unspezifische Reaktion im Pflanzenmaterial aufweisen. Die bekannte Interaktion von Aminosäuremotiven des HC-Pro (PTK-Motiv und KITC-Motiv) mit Motiven des Hüllproteins (DAG-Motiv) bei Potyviren oder die spätere Rezeptorbindung im Stylet der Blattläuse ((Raccah *et al.* 2001) nach (Drews *et al.* 2004)) wären dafür Beispiele. Aber auch Pflanzenvirushüllproteine, die am Phagen präsentiert werden und Bindungen mit dem Kapsid der Viren eingehen, wären denkbar. Diese Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Hüllproteinen konnten für das PPV zum Beispiel schon in Pflanze durch die Verwendung eines mRFP-basierten bimolekularen Fluoreszenzkomplementationssystems gezeigt werden (Zilian & Maiss 2011).

4.2 Das Biopanning der scFv *Phage Display Libraries*

Nachdem das Biopanning mit den Ph.D.TM *Phage Display Libraries* nicht den erwünschten Erfolg brachte, wurden scFv *Phage Display Libraries* verwendet. Für das Biopanning mit den Bibliotheken Tomlinson I und J wurden die in Bakterien exprimierte Hüllproteine von CMV, PVY und TMV sowie eine Reinigung von TMV aus *N. benthamiana* als Ziele verwendet. Da die Proteinausbeute der pQE_30 Vektoren zu gering war, wurden die Hüllproteingene vorher in den pRSET A Vektor kloniert. Mit diesem war eine Expression der CPs von CbMV, PPV und TSWV nicht möglich (siehe Abbildung 3.2-3). Grundsätzlich gibt es dabei verschiedene mögliche Erklärungen für das Fehlen der Expression beziehungsweise für eine zu niedrige Expression der Proteine. So können die Proteine zum Beispiel toxisch für die Bakterien sein, fehlerhafte DNA-Sequenzen vorliegen oder die „codon usage“ nicht angepasst worden sein (Rosano & Ceccarelli 2014). In dieser Arbeit wurde die „codon usage“ jedoch vorher an den Expressionsstamm adaptiert und die Expressionsvektoren nach der Klonierung durch eine anschließende Sequenzierung überprüft, so dass diese Fehlerquelle ausgeschlossen werden kann. Interessant ist dabei auch, dass die PPV- und TSWV-CPs im pQE-Vektor exprimiert werden konnten und sich auch in einem ELISA nachweisen ließen (siehe Abbildung 3.2-1 und Abbildung 3.2-2). Dies war, obwohl die identische Hüllprotein-DNA-Sequenz aus den pQE-Vektoren verwendet wurde, bei der Expression der pRSET A Vektoren nicht der Fall. Ob das auf methodische Probleme oder spezielle nicht exprimierende Einzelklone zurückzuführen war, wurde nicht geklärt.

Nach der Expression in den pRSET A Vektoren wurden die exprimierte Hüllproteine wieder auf ihre immunogenen Eigenschaften in einem ELISA mit den vorliegenden Antikörpern überprüft. Während das TMV-CP nicht nachgewiesen werden konnte, reagierten das CMV-CP und das PVY-CP und lieferten eindeutige Signale (siehe Abbildung 3.2-4). Für das TMV-CP gilt dabei wieder, dass die benötigten Epitope, mit denen die polyklonalen anti-TMV Antikörper reagieren können, offensichtlich nicht vorlagen. Ein erster Versuch mit zufällig ausgewählten und gegen das TMV-CP beziehungsweise TMV *Ohio V* gescreenten Phagenklonen zeigte dabei interessante Veränderungen im Vergleich zu den Peptid-Phagen der vorherigen Kapitel. In Abbildung 3.5-1 kann deutlich veranschaulicht werden, dass keine unspezifische Reaktion mit dem Pflanzensaft vorliegt. Jedoch zeigten nur die gegen das CP gepannten Phagen TMV_CP_1_J und TMV_CP_3_J überhaupt eine Interaktion mit dem eigentlichen Zielmolekül. Der nächste Versuch mit weiteren Phagen bestätigte das Vorhandensein von einzelnen bindenden scFvs (Abbildung 3.5-2), diese Bindung konnte jedoch im Folgenden größtenteils nicht verifiziert werden (Abbildung 3.5-3). Abschließend

wurde der Phagenklon TMV_CP_1_J für den Nachweis von gereinigtem TMV *Vulgare* eingesetzt (Abbildung 3.5-4). In dem entsprechenden ELISA zeigte sich aber nur eine Spezifität gegenüber dem exprimierten TMV-CP und nicht den vollständigen Virionen. Da sich bei diesen Versuchen kein positiver Binder finden ließ, wurden die anderen Eluate nicht weiter untersucht.

Um die Anzahl der möglichen mit Pflanzenmaterial unspezifisch reagierenden Phagen zu minimieren, wurde ein weiteres Biopanning mit einer alternativen Methode durchgeführt. Da ein zusätzliches mögliches Problem die unterschiedlichen Konformationen der synthetischen Hüllproteine und ihrer Epitope im Vergleich zu den nativen Epitopen am Virion sein konnte, war das Ziel dabei, Pflanzenviren im Pflanzensaft in einem Biopanning anzubieten, um die Epitope so naturgetreu wie möglich vorliegen zu haben. Durch die vollständige Struktur des Virions sollte im Vergleich zu den exprimierten Hüllproteinen zusätzlich eine Anreicherung der möglichen Epitope stattfinden. In Kooperation mit Prof. Dr. Stefan Dübel und Prof. Dr. Michael Hust aus dem Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Biotechnologie an der Technischen Universität Braunschweig wurden für das Biopanning die gemischten scFv-Bibliotheken HAL9/10 (Kuegler *et al.* 2015) gegen die in Bakterien mit dem pRSET A Vektor exprimierten Hüllproteine von PVY und TMV sowie das infizierte Pflanzenmaterial der sechs Viren und ihren spezifischen Antikörpern eingesetzt (siehe Tabelle 3.6-1). Dabei beruhen die Bibliotheken auf dem verbesserten pHAL30 Phagemid, der die Präsentation einer hohen Anzahl an funktionalen Antikörperfragmenten auf der Phagenoberfläche bei gleichbleibender guter Expression der späteren löslichen Antikörper erlaubt. Die eigentlichen Bibliotheken HAL9/HAL10 wurden aus Blutproben von 98 nichtimmunisierten menschlichen Spendern (kaukasischer, afrikanischer, indischer und chinesischer Herkunft) im pHAL30 Vektor erstellt und haben eine theoretische Diversität von 1.5×10^{10} unabhängigen Klonen (Kuegler *et al.* 2015). Verwendet wurden diese Bibliotheken HAL9/10, da sie einige einzigartige Eigenschaften im Vergleich zu anderen Bibliotheken aufweisen. So haben sie zum Beispiel eine leicht erhöhte maximale Diversität im Vergleich zu den McCafferty Bibliotheken, sie enthalten mehr Lambda V-Gene und haben längere CDR-H3 im Vergleich zu den Pfizer Bibliotheken und zeigen eine höhere Diversität der CDR-H3 als Ylanthia. Innerhalb kurzer Zeit konnten mit den HAL9/10 Bibliotheken über 800 Antikörper gegen mehr als 100 Zielmoleküle identifiziert werden (Kuegler *et al.* 2015).

Im Biopanning entsprachen die ersten Arbeitsschritte denen des DAS-ELISA zum Nachweis von Pflanzenviren aus Pflanzen. Es wurde angenommen, dass die Pflanzenviren durch ihre korrespondierenden Antikörper präsentiert wurden und somit die mögliche Bindung spezifischer Phagen erleichtert wurde. Um einen Großteil der unspezifisch reagierenden Phagen von

vornherein aus dem Screening zu entfernen, wurde in jeder Biopanningrunde eine Präinkubation der eingesetzten Bibliothek gegen gesundes Pflanzenmaterial und den jeweiligen Antikörpern durchgeführt. Für das eigentliche Biopanning wurde danach der Überstand verwendet. Es war dadurch zu erwarten, dass viele der mit Pflanzenmaterial oder dem reinen Antikörper reagierenden Phagenklone von vornherein aus dem Screening ausgeschlossen werden konnten. Unseres Wissens nach wurde diese Methode in der Form gegen Viren im kompletten Pflanzensaft in der Pflanzenvirologie noch nicht angewandt. Nach dem Biopanning wurden jeweils 92 lösliche Antikörper der jeweiligen Klone produziert und in einem ELISA gegen infiziertes und gesundes Pflanzenmaterial und den jeweiligen Antikörpern getestet. In den ELISAs mit den gegen die Potyviren (PPV und PVY) gescreenten scFvs zeigten sich nur sehr geringe Signale, dabei kam es zu keinen nennenswerten Unterschieden zwischen infiziertem und gesundem Pflanzenmaterial (siehe Abbildung 3.6-1 und Abbildung 3.6-2). Ähnliches zeigte sich für den Nachweis gegen CMV (Abbildung 3.6-3), in dem nur der Phagenklon A2 eindeutig reagierte, dies jedoch mit infiziertem und gesundem Pflanzenmaterial. Bei dem Nachweis von TMV und TSWV aus infiziertem Pflanzenmaterial zeigten sich mehrere eindeutige Reaktionen innerhalb des ELISA (Abbildung 3.6-4 und Abbildung 3.6-5). Aber auch hier gab es keine alleinige positive Reaktion mit dem infizierten Pflanzenmaterial bei keinem oder nur einem niedrigen Signal in der Negativkontrolle. Dies sprach für eine Interaktion mit Pflanzenmaterial oder dem jeweiligen Antikörper. Um einen Vergleich mit den bisherigen Methoden und der neuen Bibliothek zu haben, wurden zwei Biopannings zusätzlich gegen exprimiertes Hüllprotein durchgeführt (siehe Abbildung 3.6-7 und Abbildung 3.6-8) und wieder 92 lösliche scFv gegen infiziertes und gesundes Pflanzenmaterial getestet. Ähnlich wie in den Versuchen mit den Tomlinson Bibliotheken zeigten sich auch hier nur vereinzelte unspezifische Reaktionen, die neben dem infizierten Pflanzenmaterial auch mit den jeweiligen Kontrollen interagierten. Im Gegensatz dazu standen die Ergebnisse des Biopannings gegen CbMV (siehe Abbildung 3.6-6). Es konnten scFvs identifiziert werden, die in einem ELISA eine eindeutige Reaktion mit dem infizierten Pflanzenmaterial aufwiesen und zu keiner unspezifischen Reaktion im gesunden Pflanzenmaterial führten. Ausgewählte Klone wurden im Folgenden sequenziert und ausgewertet. Es zeigte sich, dass die Klone SH1327-A10/SH1327-D1/SH1327-F6 und SH1327-C3/SH1327-E5 jeweils identisch waren und SH1327-C9, SH1327-C10 und SH1327-G5 einzeln vorlagen. Für die weiteren Experimente wurden die ausgewählten scFvs wieder als Fusionsprotein mit dem Phagenvirion eingesetzt, um einen Vergleich zu den bisher durchgeführten Versuchen ziehen zu können. Es konnte im Folgenden deutlich gezeigt werden,

dass die Phagen eine eindeutige Reaktion mit dem infizierten Pflanzenmaterial zeigten, dieser Nachweis bisher jedoch nur funktionierte, wenn der CbMV spezifische Antikörper zusätzlich als „*Capture*“-Antikörper vorlag (siehe Abbildung 3.6-9 und Abbildung 3.6-10). Ein Nachweis aus einem *plate-trapped* ELISA, bei dem der Pflanzensaft direkt in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten gegeben wird, war nicht möglich. Dafür kann es mehrere Gründe geben. Im Gegensatz zum DAS-ELISA, dem der hier verwendete *Capture*-ELISA am meisten ähnelt, stehen beim *plate-trapped* ELISA der Pflanzensaft und die Viruspartikel in einer Konkurrenz für freie Bindestellen an der Plastikoberfläche der Mikrotiterplatten (Lima *et al.* 2012). Es wäre hierbei möglich, dass im Vergleich zu dem *Capture*-ELISA nicht genügend Pflanzenviren für einen Nachweis mit den scFvs vorlagen oder die Konzentration der Phagen zu gering war. Da die Detektion der bindenden Phagen zusätzlich bei allen Versuchen über einen pVIII spezifischen monoklonalen Antikörper erfolgte, ist es auch denkbar, dass Phagen zwar mit den Pflanzenviren interagierten, die Anzahl der dann vorliegenden Virus-Phagen-Komplexe aber aus oben genannten Gründen zu gering war, als dass ein erfolgreicher Nachweis der Phagen danach möglich gewesen wäre. Zusätzlich wäre es vorstellbar, dass die scFvs nur mit Epitopen reagierten, die durch den *Capture*-ELISA durch die Reaktion des polyklonalen gegen CbMV gerichteten Antiserums mit dem CbMV entstanden und somit nur ein Nachweis des Antikörper-CbMV-Komplexes vorlag. Dieser wäre in einem *plate-trapped* ELISA aufgrund des fehlenden Antiserums nicht vorhanden gewesen. Da eine direkte Reaktion mit den Antikörpern durch die Wahl der Negativkontrollen im Grunde vernachlässigt werden kann, müsste der *Capture*-ELISA mit einem anderen gegen CbMV gerichtetem polyklonalen Antiserum oder sogar monoklonalen Antikörpern durchgeführt werden, um diese Interaktion bestätigen oder ausschließen zu können. Dies wurde in der Arbeit nicht weiter untersucht, die weiteren Versuche wurden jeweils mit der Methode des *Capture*-ELISA durchgeführt.

Im Vergleich zu der Anzucht der Peptid-Phagen aus den Ph.D.TM *Phage Display Libraries* ist das notwendige *Rescue* der scFv-pIII Fusionsproteine durch den Einsatz eines Helferphagen relativ aufwendig. Außerdem werden im Gegensatz zu den Peptid-Phagen nicht fünf Fusionsproteine auf der Oberfläche präsentiert. Bei einer normalen Anzucht von *E. coli* mit den jeweiligen Phagemiden und der Infektion mit den Helferphagen werden die Fusionsproteine eine Poisson-Verteilung aufweisen. Nur 10 % oder weniger der Partikel werden eine der Fusionen auf ihrer Oberfläche präsentieren. Ein sehr geringer Anteil der Phagen wird zwei Fusionen aufweisen und der Rest im Normalfall nur das Wildtyp-pIII haben (Russel *et al.* 2004).

Für eine Reduzierung des Arbeitsaufwandes wäre es für spätere Verwendungszwecke optimal, wenn die scFvs in einem Phagenvektor in Bakterien vorliegen würden und direkt produziert werden könnten. Für diesen Ansatz wurden die Gene der scFvs in den M13K07 Hintergrund kloniert, so dass es auch hier zu einer Fusion zwischen dem pIII und dem scFv kam. Im Gegensatz zu den Phagemiden war ein *Rescue* nicht mehr notwendig, da alle essentiellen Proteine durch das Phagen genom exprimiert werden konnten. Zusätzlich wurden durch diese Maßnahme fünf pIII-Fusionsproteine auf der Oberfläche präsentiert. Wie in Abbildung 3.6-11 deutlich gezeigt wird, war es auch mit diesen Phagen möglich, das CbMV in infiziertem Pflanzenmaterial nachzuweisen. Der Unterschied in der Signalstärke im ELISA zu den durch ein *Rescue* produzierten Phagen kann dabei auf zwei Ursachen zurückzuführen sein. Es wäre denkbar, dass sich der spätere Titer der Phagen zwischen beiden Anzuchtmethoden relativ stark unterscheidet und bei den Phagen aus dem pHAL30 Hintergrund einfach eine höhere Konzentration an bindenden Phagen eingesetzt wurde. Da die Infektionseffektivität der M13 Phagen von der Anzahl der pIII Fusionsproteine und den Eigenschaften der präsentierten Proteine abhängt (Loset *et al.* 2008) und die modifizierten M13K07 Phagen jeweils fünf Proteine präsentierten, wurde der Titer bei diesem Versuch nicht bestimmt, da wahrscheinlich keine eindeutigen Aussagen zu der realen Anzahl an Phagen getroffen werden konnte. Um diese Probleme in späteren Versuchen zu umgehen und eine eindeutige Titration zu ermöglichen, bietet sich zum Beispiel die von Loset, Kristinsson *et al.* (2008) vorgeschlagene Methode des Trypsinverdaus an. Bei dieser Methode wird eine Proteaseschnittstelle in das Phagen genom zwischen dem pIII und dem scFv kloniert. Nach der Produktion kann ein kleiner Teil der Phagensuspension mit Trypsin inkubiert werden. Durch die Wiederherstellung des Wildtyp-pIII ist eine Titration nun möglich. In dieser Arbeit war jedoch nur von Interesse, ob sich die veränderten M13K07 zu einem Nachweis des CbMV aus Pflanzenmaterial eignen.

Weiterführend sollten die Nachweisgrenzen der Phagen bestimmt werden. Dazu wurden unterschiedliche Verdünnungen der Pflanzenproben und den pro Versuch eingesetzten Phagen jeweils in einem ELISA untersucht (siehe Abbildung 3.6-12 und Abbildung 3.6-13). Für die untersuchten Phagenklone SH1327-A10/SH1327-C3/SH1327-C9 und SH1327-C10 zeigte sich dabei, dass Phagenkonzentrationen von 10^9 cfu/Vertiefung noch bei einer Verdünnung der Standardprobe von 1:4 (entspricht einer Verdünnung des Pflanzensaftes von 1:120) zu einem erfolgreichen Nachweis von CbMV in infiziertem Pflanzenmaterial eingesetzt werden können. Bei höheren Phagenkonzentrationen verstärkt sich das Signal im ELISA ohne eine Zunahme von störenden Hintergrundsignalen in den Kontrollen. Es konnte somit gezeigt werden, dass bei einer Standardprobenaufbereitung eine Konzentration an Phagen pro Reaktion von 10^9 -

10^{10} cfu für einen Nachweis von CbMV in einem *Capture*-ELISA ausreichend war. Zusätzlich wurden die Phagenklone noch in Kreuztests auf eine mögliche Interaktion mit anderen Pflanzenviren oder Antikörpern untersucht. Dazu wurde mit CMV, PPV, PVY, TMV und TSWV infiziertes Pflanzenmaterial mit den jeweiligen Antikörpern in einem *Capture*-ELISA mit den Phagen eingesetzt (siehe Abbildung 3.6-14 und Abbildung 3.6-15). Es zeigte sich deutlich, dass keine Kreuzreaktion vorlag. Um die Spezifität innerhalb des Genus der Carmoviren zu überprüfen, können diese Tests in einem weiteren Schritt gegen verschiedene Carmoviren durchgeführt werden. Darauf wurde in dieser Arbeit verzichtet.

Wie der Boxplot (Abbildung 3.6-16) verdeutlicht, konnte über den kompletten Versuchszeitraum gezeigt werden, dass eine eindeutige Reaktion im ELISA mit infiziertem Material vorlag, während unspezifische Reaktionen mit gesundem Pflanzenmaterial nicht auftraten. Dies ist aus Nachweissicht natürlich essentiell und eine Grundvoraussetzung für den späteren Einsatz, jedoch ist es auch noch aus anderer Sicht wichtig. Da die Phagen als Einzelklone getestet und sie somit in monoklonaler Form eingesetzt wurden, muss ein spezieller von Hull erwähnter Aspekt von monoklonalen Antikörpern (MAbs) auch bei den scFvs beachtet werden. Im Normalfall besitzt ein Antigen nur eine Form von Epitop, durch das die Bindung mit dem Antikörper möglich wird. Wenn diese spezielle Domäne gleichzeitig mit einem anderen Protein geteilt wird, können signifikante Kreuzreaktion die Folge sein (Hull 2014). Obwohl der Effekt auch mit Antikörpern in polyklonalen Antiseren auftritt, ist hier die Konzentration einzelner spezifischer Antikörper im Vergleich zu einem monoklonalen Antiserum natürlich viel schwächer, die Kreuzreaktion wäre somit geringer. Das Problem der MAbs trat bei den ausgewählten scFv-Phagen nicht auf, das ursprüngliche Ziel der Arbeit konnte somit für den Nachweis von CbMV erreicht werden. Da in den Versuchen die Phagen mit den scFvs als Fusionsproteine und nicht die löslichen scFvs verwendet wurden, wird auch gezeigt, wie unwahrscheinlich es ist, dass die Phagenvirionen direkt für die unspezifische Reaktion der Peptid-Phagen verantwortlich sind.

Jedoch war der Nachweis der anderen Pflanzenviren auch mit dieser Methode soweit nicht erfolgreich. Dafür kann es unterschiedliche Gründe geben. Grundsätzlich wurde für das Biopanning eine naive Humane *phage display* Bibliothek (Kuegler *et al.* 2015) verwendet ohne spezielle Immunisierungen gegenüber Pflanzenviren. Im Gegensatz zu Bibliotheken, die aus vorher spezifisch gegen die Hüllproteine immunisierten Mäusen gewonnen wurden, wie zum Beispiel für die Identifikation von scFvs gegen das BNYVV (Jahromi *et al.* 2009), liegen in diesen Bibliotheken von vornherein wahrscheinlich weniger oder eben auch keine spezifisch bindenden scFvs vor. Ein zusätzlicher limitierender Faktor besteht darin, dass in einem Phage

Display nicht alle antigen-spezifischen Antikörper überhaupt wieder angezogen werden können (Hammers & Stanley 2014). Durch die Präinkubation gegen die polyklonalen pflanzenvirus-spezifischen Antikörper und das gesunde Pflanzenmaterial wird zusätzlich vor dem eigentlichen Biopanning ein großer Anteil der eigentlichen Bibliothek aussortiert. Da nur der Überstand abgenommen wird, werden auch potentielle Binder, die möglicherweise neben einer starken Bindung zu dem Zielmolekül im späteren Biopanning zusätzlich in sehr schwacher Interaktion zu dem Pflanzenmaterial stehen und in späteren ELISA vor der Nachweisreaktion durch die Waschschriffe aus den Negativkontrollen gelöst werden würden, entfernt, beziehungsweise die Anzahl verringert. Die theoretische Diversität der Bibliotheken von 1.5×10^{10} unabhängigen Klonen (Kuegler *et al.* 2015) wird in dieser Methode vermutlich stark reduziert und somit nicht direkt gegen die Pflanzenviren eingesetzt. Jedoch ist es gut denkbar, dass Binder gegen die anderen Pflanzenviren trotzdem in den Bibliotheken gefunden werden können und dafür nur eine größeren Anzahl von Klonen im Eluat untersucht werden müssen. Zusätzlich können viele Parameter innerhalb der Methode verbessert werden, für das Virus *Capture* in den Mikrotiterplatten könnten zum Beispiel monoklonale Antikörper verwendet werden, damit mehr freie Epitope für eine scFv-Bindung präsentiert werden können. Es könnte auch die mit Pflanzensaft inkubierte Oberfläche nach der Präinkubation gewaschen und der Überstand der Bibliothek für das Biopanning wieder zugeführt werden, um die Diversität der eingesetzten Phagen wieder zu erhöhen. In diesem Fall würde die Chance für unspezifische Reaktionen wahrscheinlich wieder gesteigert werden, mögliche scFvs, die stark an CbMV und schwach an Stoffe im Pflanzensaft binden, wären so jedoch wieder verfügbar. Ein anderer Ansatz wird von t Hoen beschrieben. Um potentiell interessante Phagen zu finden, schlägt er vor, die erste Biopanningrunde mehrmals mit einer Bibliothek durchzuführen und danach mögliche Binder zu identifizieren, um eine Überreduzierung der Bibliothek zu verhindern (t Hoen *et al.* 2012). Für diesen Ansatz wäre jedoch der Zugriff auf Methoden des *next generation sequencing* von Vorteil, um die Menge an Klonen schnell parallel auswerten zu können.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit untersucht, ob schon bekannte scFvs in die pHAL30 Vektoren überführt und mit den hier verwendeten Methoden einen Nachweis der jeweiligen Pflanzenviren erbracht werden kann (siehe Abbildung 3.6-17). Dazu wurden jeweils ein scFv gegen CMV (Koohapitagam *et al.* 2009) und PVY (Xiao *et al.* 2000) ausgewählt und als Fusionsprotein mit dem pIII in den pHAL30 Phagemiden exprimiert und angezogen. Zusätzlich wurde die ursprüngliche Linkersequenz durch den in den pHAL9/10 vorliegenden YOL-Linker ersetzt und beide scFvs in ihren Codons für die Expression in *E. coli* optimiert. Es

zeigte sich jedoch, dass ein Nachweis der Viren nicht erbracht werden konnte. Im Fall des CMV spezifischen scFv (EU589245.1) kam es zu unspezifischen Reaktionen mit einer Komponente des ELISA (zum Beispiel: Pflanzenmaterial, *capture* Antikörper, Blocklösung), während der PVY spezifische scFv (3-17) grundsätzlich zu schwachen Signalen im ELISA führte. Während er scFv 3-17 bei Xiao *et al.* (2000) in einem Westernblot mit PVY-CP reagierte und eine erhöhte Resistenz durch den scFv in transgenen Tabakpflanzen gezeigt werden konnte, wurde mit dem ursprünglichen monoklonalen Antikörper 3-17, auf dem der scFv basiert, der Nachweis gegen PVY in einem Western Blot nicht erbracht (Hewish *et al.* 1993). Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede und die geringe Interaktion in unseren Versuchen wäre zum Beispiel die Verwendung von unterschiedlichen PVY-Stämmen, die jeweils mit anderen Intensitäten mit dem Antikörper reagieren. Die Interaktion des scFv EU589245.1 mit CMV konnte erfolgreich gegen infiziertes Pflanzenmaterial in einem Western Blot gezeigt werden, außerdem wurde das Screening für die Antigen-spezifischen scFv-Phagen in einen *plate-trapped* ELISA durchgeführt (Koochapitagtam *et al.* 2009). Warum es in den *capture-Phage*-ELISA dann zu so starken Signalen in den Gesundkontrollen kam, wurde nicht geklärt.

Jedoch sind zwei ausgewählte scFvs aus unterschiedlichen Hintergründen vermutlich nicht ausreichend, um generelle Aussagen über die Möglichkeiten der Nachweise von Pflanzenviren durch beschriebene scFvs im pHAL30 Phagemid tätigen zu können.

4.3 Mögliche Vorteile im Screeningverfahren und der Produktion von scFvs gegen Pflanzenviren aus einem *Phage Display* gegenüber konventionellen Antikörpern

Häufig werden für den Nachweis von Pflanzenviren in Pflanzen eine der beiden etabliertesten Nachweismethoden (ELISA oder qPCR) eingesetzt. Im Fall des ELISA werden dafür Antiseren verwendet, bei denen grundsätzlich zwei Typen unterschieden werden müssen. Es gibt die polyklonalen Seren, die im Normalfall viele Epitope des Antigens erkennen und die monoklonalen Seren, die nur aus Antikörpern bestehen, die genau mit einem Epitop interagieren. Monoklonale Antiseren sind dabei häufig spezifischer, je nach Fragestellung kann diese Spezifität jedoch auch von Nachteil sein (Hull 2014). Bis heute werden Antiseren gegen Pflanzenviren häufig in verschiedenen Tieren produziert.

Für die eigentliche Immunisierungsreaktion gibt es dabei unterschiedliche Methoden, für die Produktion von Antikörpern gegen das *Little cherry virus 1* Hüllprotein wurden zum Beispiel partiell gereinigte Viruspartikel, rekombinante in Bakterien exprimierte Hüllproteine und ein DNA *prime-protein boost* in weiße Neuseeländer (Kaninchenrasse) injiziert (Matic *et al.* 2009). Die DNA basierte Immunisierung von weißen Neuseeländern für die Produktion von Antiseren gegen Pflanzenviren konnte dabei schon 1997 gegen PVY und TMV gezeigt werden (Hinrichs *et al.* 1997). Weitere erfolgreiche Produktionen von polyklonalen Antikörpern durch die Verwendung von rekombinanten, in Bakterien exprimierten Hüllproteinen im Pflanzenvirussektor werden zum Beispiel zum *Potato virus X* (PVX) (Cerovska *et al.* 2010), dem *Pelargonium zonate spot virus* (PZSV) (Gulati-Sakhujja *et al.* 2009) und dem *Citrus tristeza virus* (CTV) (Iracheta-Cárdenas *et al.* 2008) vorgeführt. Alle Arbeiten eint jedoch die notwendige abschließende sich teilweise wiederholende Immunisierung von Kaninchen. Je nach Methode beinhaltet dies weitere Injektionen mit dem Antigen nach der initialen Immunisierung in definierten Zeitabständen und den abschließenden Blutprobenentnahmen nach der finalen Injektion (Matic *et al.* 2009).

Den polyklonalen Antikörpern stehen die monoklonalen Antikörper gegenüber, die von einer Zelllinie produziert werden, die auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgehen. Da diese Zellen nur eine sehr begrenzte Lebensdauer haben, fusionierten Köhler und Milstein sie 1975 mit Myelomzellen einer Mauslinie und produzierten somit mehr oder weniger „unsterbliche“ Hybride (Köhler & Milstein 1975). Schon 1982 konnten erste MAbs mit dieser sogenannten Hybridom-Technik gegen TMV beschrieben werden (Dietzgen & Sander 1982). Im Laufe der Jahre wurden weitere MAbs gegen Pflanzenviren produziert und beschrieben, im Jahr 2015

zum Beispiel gegen das *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) (Li *et al.* 2015). Jedoch werden auch für diese Methoden Mäuse mit Virusreinigungen oder exprimierten Hüllproteinen immunisiert. Vorreiter für viele neue Methoden finden sich dabei im medizinischen Sektor. Für die spätere Herstellung von MAbs werden hauptsächlich Säugetierzelllinien (zum Beispiel: CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*), NS0 (stabile Maus-Myelomzelllinie) oder PERC6 Zelllinien) verwendet, da die notwendige Glycosylierung der Antikörper aufgrund der Limitationen innerhalb der Proteinfaltung in *E. coli* nur schwer realisierbar ist. In den letzten Jahrzehnten wurde der schlussendliche Ertrag aus den Zelllinien zwar erhöht, die Kosten im Vergleich zu Bakterien- und Hefezellkulturen bei der längeren Kultivierung, den teureren Medien und den höheren Anfangsinvestitionen sind jedoch weiterhin zu hoch (Lee & Jeong 2015). Um ihr kommerzielles Potential vollständig ausschöpfen zu können, müssen zukünftige Systeme die Produktionskosten von Antikörpern somit stark senken (Farid 2007).

Antiseren sind bis jetzt demnach allgemein abhängig von der Immunisierung von Labortieren und müssen im Fall der monoklonalen Antikörper in Säugetierzelllinien angezogen werden, bevor sie aufwändig und kostenintensiv gereinigt werden können. Zusätzlich müssen bei den monoklonalen Antikörpern weitere Probleme, wie eine denkbare Instabilität der aneuploiden Zelllinien (Frenzel *et al.* 2012), beachtet werden. An diesem Punkt werden mögliche Vorteile der durch Bakterien produzierten bindenden scFvs aus einem *Phage Display* deutlich sichtbar. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, können große Mengen an Molekülen mit Eigenschaften, die denen von Antikörpern ähneln, produziert werden ohne auf Tiere oder tierische Zelllinien angewiesen zu sein. Auch die hier gezeigte kürzere Zeitdauer des Screeningprozesses, sowie die relativ einfache Produktion der löslichen scFvs sind eindeutige Vorteile.

Im Gegensatz zu normalen Antikörpern können die „*antibody mimics*“ aus einem *Phage Display* gegen eine große Anzahl von nicht injizierbaren giftigen oder nichtlöslichen Zielen selektiert werden. Auch vollständige Oberflächen von zum Beispiel Pflanzen oder lebenden Bakterienzellen können als Ziel verwendet werden (Bernal & Willats 2004). Diese Eigenschaften wurden in dieser Arbeit in der Screening Methode der HAL9/10 Bibliotheken gegen das CbMV erfolgreich angewandt. Im Gegensatz zu einem umständlichen und möglicherweise nicht zielführenden aufwendigem Screening, dass zu unspezifischen Reaktionen mit dem Pflanzenmaterial führt, konnten die Pflanzenviren über die Antikörperbindung direkt im Pflanzensaft angeboten werden. Durch die Präinkubation mit den CbMV spezifischen monoklonalen Antikörpern und dem Pflanzensaft einer gesunden Kontrollpflanze konnten unspezifische Binder so schon früh aussortiert werden. Bedingt durch die Selektionsmechanismen innerhalb des Biopannings werden außerdem für die Bakterien

toxische scFvs aus dem Pool der möglichen Binder während der Anzucht der Phagen aussortiert, da die Bakterien abgetötet werden. Im Fall der scFvs konnte gezeigt werden, dass sie nach der Vermehrung in Bakterien als lösliche scFvs (siehe Abbildung 3.6-6), aber auch als Fusion mit dem Phagenvirion (zum Beispiel Abbildung 3.6-9) mit dem Ziel reagieren und zu positiven Nachweisen der Pflanzenviren in ELISAs führen.

Da sich die positiv bindenden Phagen ohne wahrnehmbare Probleme vermehren konnten, sind spätere Massenproduktionen in Bakterien im Normalfall möglich. In dieser Arbeit konnte dazu gezeigt werden, dass abhängig von der angewendeten Methode und dem verwendeten Phagemid zwischen dem Animpfen des Mediums mit der Bakterienkultur und dem Einsatz in einem ELISA keine 24 Stunden liegen. Bis zu diesem Zeitpunkt können die Bakterien als Dauerkulturen bei -80 °C gelagert werden und stehen dem Anwender situationell schnell zur Verfügung. Sie können aus dem jeweiligen Medium relativ einfach gefällt und in PBS aufgenommen werden und sind darüber hinaus über mehrere Monate stabil.

Ein weiterer Vorteil einmal identifizierter scFvs besteht zusätzlich in der Möglichkeit, sie in Pflanzen zu exprimieren, um durch eine Interaktion mit den Antigenen eine Virusresistenz zu etablieren. Im Vergleich zu vollständigen Antikörpern sind scFvs dabei häufig einfacher in Pflanzen zu exprimieren (Conrad & Manteuffel 2001, Giritch *et al.* 2006). Die eigentliche Reaktion mit dem Antigen in Pflanzenzellen ist dann abhängig von dem anvisierten Epitop und der Funktionsweise. Somit würde natürlich nicht jeder scFv zwingend in Pflanze zu einer Resistenz führen, dieser Vorgang konnte jedoch für einige scFvs schon gezeigt werden, wie zum Beispiel bei: (Tavladoraki *et al.* 1993, Aebig *et al.* 2006, Gargouri-Bouzid *et al.* 2006, Nolke *et al.* 2009, Safarnejad *et al.* 2009, Cervera *et al.* 2010).

4.4 Zusammenfassung/Ausblick

Die Grundlage jeglicher virologischer Arbeiten ist die Identifikation der vorliegenden Viren. Im einfachen Nachweissektor sollten die Methoden für diese Nachweise einfach zu bedienen sein und in standardisierten Verfahren verwendet werden können. Sie müssen eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit aufweisen, schnell zu etablieren sein, und eine gewisse Robustheit in ihrer Anwendung zeigen (Torrance & Jones 1981, Boonham *et al.* 2014).

In dieser Arbeit wurde sich für die Untersuchung einer Nachweismethode von Pflanzenviren aus Pflanzenmaterial entschieden, bei der die virusspezifischen Antikörper eines ELISA durch „*antibody mimics*“ aus einer Phagenbibliothek ersetzt werden. Mit dieser Methode sollten die oben genannten Vorteile mit weiteren positiven Aspekten des ELISA, wie die relativ günstigen Gerätschaften und Reagenzien für die Durchführung einer Routinetestung, verbunden werden. Gleichzeitig sollte eine Schwäche, nämlich die Abhängigkeit von kostenintensiv hergestelltem hochwertigem Antiserum, verringert werden. Dazu wurden Biopannings von vier verschiedenen Phagenbibliotheken gegen exprimierte Hüllproteine, Virusreinigungen und im Fall der pHAL9/10 Bibliotheken (Kuegler *et al.* 2015) zusätzlich in einer neuen Methode direkt gegen infiziertes Pflanzenmaterial durchgeführt. Wie in den Ergebnissen dargestellt, gelang danach ein Nachweis in infiziertem Pflanzenmaterial nur gegenüber dem CbMV. Mögliche Gründe für die Misserfolge in den anderen Nachweisverfahren werden in der obigen Diskussion aufgeführt. Nichtsdestotrotz war es möglich, mit der neuen Methode die Anzahl der unspezifisch bindenden Phagen direkt im Screening zu senken und positiv bindende „*antibody mimics*“ zu identifizieren. Da ein Großteil der Phagen aus der Bibliothek wahrscheinlich in der Präinkubation verloren geht, wäre eine Untersuchung einer größeren Anzahl von Phagenklonen, als es in dieser Arbeit durchgeführt wurde, im finalen Eluat möglicherweise notwendig, um die potentiellen Binder identifizieren zu können.

Es werden zusätzliche Schritte notwendig sein, um die genaue Sensitivität und Spezifität der „*antibody mimics*“ bestimmen zu können, diese Studie gibt jedoch einen guten Hinweis, wie wertvoll „*antibody mimics*“ aus einer Phagenbibliothek für die Nachweisverfahren von Pflanzenviren aus Pflanzen sein können.

5 VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile dieser Arbeit wurden in Zeitschriften publiziert und auf Tagungen in Form von Posterpräsentationen und Vorträgen veröffentlicht. Weitere Publikationen in internationalen Zeitschriften sind geplant. Die Veröffentlichungen sind nachstehend in chronologischer Reihenfolge aufgeführt.

1. Klinkenbuss, D., Maiss, E. (2013). "Detection of Tobacco mosaic virus with antibody mimics based on M13 phages." DGG-Proceedings, Vol. 3, May 2013, No. 2, p. 1-5. DOI: 10.5288/dgg-pr-03-02-dk-2013.
2. Klinkenbuss, D., Maiss, E. (2013). "Detection of Tobacco mosaic virus (TMV) with an antibody mimic derived from a phage library." 48. Gartenbauwissenschaftliche Jahrestagung, 27.02. - 02.03.2013, Kompetenzzentrum Gartenbau, Bonn.
3. Klinkenbuss, D., Maiss, E. (2013). "Detection of Tobacco mosaic virus (TMV) with antibody mimics derived from a phage library." 45. Jahrestreffen des DPG Arbeitskreises "Viruskrankheiten der Pflanzen", 14.10. - 15.10.2013, Julius Kühn-Institut, Braunschweig.
4. Klinkenbuss, D., Maiss, E. (2014). "Detektion des Tabakmosaikvirus mit Antikörper-Mimics aus Phagen Bibliotheken." 59. Deutsche Pflanzenschutztagung, 23.09. – 26.09.2014, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
5. Klinkenbuss, D., Maiss, E. (2015). „Nachweis von Pflanzenviren mit „Antikörper-Mimics“ aus Phagen Bibliotheken.“ 50. Gartenbauwissenschaftliche Jahrestagung und Internationales WeGa-Symposium, 24.02. - 28.02.2015, TU München und HS Weihenstephan-Triesdorf, Freising-Weihenstephan

6 LITERATURVERZEICHNIS

Adey, N. B., Mataragnon, A. H., Rider, J. E., Carter, J. M. und Kay, B. K. (1995). "Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries." Gene **156**(1): 27-31.

Aebig, J., Albert, H., Zhu, B., Hu, J. und Hsu, H. (2006). "Cloning and construction of single-chain variable fragments (scFv) to Cucumber mosaic virus and production of transgenic plants." Acta horticulturae **722**: 129.

Anderer, F. A., Uhlig, H., Weber, E. und Schramm, G. (1960). "Primary structure of the protein of tobacco mosaic virus." Nature **186**: 922-925.

Asano, S., Higashitani, A. und Horiuchi, K. (1999). "Filamentous phage replication initiator protein gpII forms a covalent complex with the 5' end of the nick it introduced." Nucleic Acids Res **27**(8): 1882-1889.

Ashelford, K. E., Day, M. J. und Fry, J. C. (2003). "Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil." Appl Environ Microbiol **69**(1): 285-289.

Bai, F., Town, T., Pradhan, D., Cox, J., Ledizet, M., Anderson, J. F., Flavell, R. A., Krueger, J. K., Koski, R. A. und Fikrig, E. (2007). "Antiviral peptides targeting the west nile virus envelope protein." J Virol **81**(4): 2047-2055.

Bai, F., Zhang, H., Yan, J., Qu, Z., Xu, J., Wen, J., Ye, M. und Shen, D. (2001). "Selection of phage-display peptides that bind specifically to the outer coat protein of Rice black streaked dwarf virus." Acta Virol **46**(2): 85-90.

Baltimore, D. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses." Nature **226**(5252): 1209-1211.

Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. und Silverman, G. J. (2004). Phage display: a laboratory manual, CSHL Press.

Barbas, C. F., Kang, A. S., Lerner, R. A. und Benkovic, S. J. (1991). "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site." Proc Natl Acad Sci **88**(18): 7978-7982.

- Beck, E., Sommer, R., Auerswald, E., Kurz, C., Zink, B., Osterburg, G., Schaller, H., Sugimoto, K., Sugisaki, H. und Okamoto, T. (1978). "Nucleotide sequence of bacteriophage fd DNA." Nucleic Acids Res **5**(12): 4495-4504.
- Beck, E. und Zink, B. (1981). "Nucleotide sequence and genome organisation of filamentous bacteriophages f1 and fd." Gene **16**(1): 35-58.
- Beijerinck, M. W. (1898). "Über ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter." Versl. Gewone Vergad. Wis. Natuurkd. Afd., K. Akad. Wet. Amsterdam **7**: 229-235.
- Bennett, N. J. und Rakonjac, J. (2006). "Unlocking of the filamentous bacteriophage virion during infection is mediated by the C domain of pIII." J Mol Biol **356**(2): 266-273.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. und Stryer, L. (2012). Biochemistry. New York, W.H. Freeman.
- Bernal, A. J. und Willats, W. G. (2004). "Plant science in the age of phage." Trends Plant Sci **9**(10): 465-468.
- Best, R. J. (1937). "Artificially prepared visible paracrystalline fibres of tobacco mosaic virus nucleoprotein." Nature (London) **140**: 547-548.
- Blanchard, C. L., Boyce, P. M. und Anderson, B. J. (1996). "Cucumber mosaic virus RNA 5 is a mixed population derived from the conserved 3'-terminal regions of genomic RNAs 2 and 3." Virology **217**(2): 598-601.
- Boccard, F. und Baulcombe, D. (1993). "Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus." Virology **193**(2): 563-578.
- Boeke, J. D., Model, P. und Zinder, N. D. (1982). "Effects of bacteriophage f1 gene III protein on the host cell membrane." Mol Gen Genet **186**(2): 185-192.
- Boonham, N. und Barker, I. (1998). "Strain specific recombinant antibodies to potato virus Y potyvirus." J Virol Methods **74**(2): 193-199.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J. und Mumford, R. (2014). "Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing." Virus Res **186**: 20-31.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**(1): 248-254.
- Brammer, L. A., Bolduc, B., Kass, J. L., Felice, K. M., Noren, C. J. und Hall, M. F. (2008). "A target-unrelated peptide in an M13 phage display library traced to an advantageous mutation in the gene II ribosome-binding site." Anal Biochem **373**(1): 88-98.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W. und Baulcombe, D. C. (1998). "Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*." EMBO J **17**(22): 6739-6746.
- Brissette, R. und Goldstein, N. (2007). The Use of Phage Display Peptide Libraries for Basic and Translational Research. Cancer Genomics and Proteomics. P. Fisher, Humana Press. **383**: 203-213.
- Büttner und Maiss in Poehling, H.-M. und Verreet, J.-A. (2013). Lehrbuch der Phytomedizin. Stuttgart, Ulmer Eugen Verlag.
- Cabezas, S., Rojas, G., Pavon, A., Alvarez, M., Pupo, M., Guillen, G. und Guzman, M. G. (2008). "Selection of phage-displayed human antibody fragments on Dengue virus particles captured by a monoclonal antibody: application to the four serotypes." J Virol Methods **147**(2): 235-243.
- Calder, V. L. und Ingerfeld, M. (1990). "The roles of the cylindrical inclusion protein of a potyvirus in the induction of vesicles and in cell-to-cell spread." J Struct Biol **105**(1): 62-66.
- Carrington, J. C., Cary, S., Parks, T. und Dougherty, W. (1989). "A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome." EMBO J **8**(2): 365.
- Castel, G., Chtéoui, M., Heyd, B. und Tordo, N. (2011). "Phage display of combinatorial peptide libraries: application to antiviral research." Molecules **16**(5): 3499-3518.
- Cerovska, N., Moravec, T., Plchova, H., Hoffmeisterova, H., Folwarczna, J. und Dedic, P. (2010). "Production of Polyclonal Antibodies to Potato virus X Using Recombinant Coat Protein." Journal of Phytopathology **158**(1): 66-68.

- Cervera, M., Esteban, O., Gil, M., Gorris, M. T., Martinez, M. C., Pena, L. und Cambra, M. (2010). "Transgenic expression in citrus of single-chain antibody fragments specific to Citrus tristeza virus confers virus resistance." Transgenic Res **19**(6): 1001-1015.
- Chester, K. S. (1935). "A Serological of the Absolute Concentration of Tobacco Mosaic Virus." Science **82**(2114): 17.
- Chester, K. S. (1936). "Separation and analysis of virus strains by means of precipitin tests." Phytopathology **26**: 778-785.
- Chua, K., Noor, S. M., Yee, T. S. und Othman, R. Y. (2007). "Biopanning for banana streak virus binding peptide by Phage display peptide library." J Biol Sci **7**(8): 1382-1387.
- Chung, B. Y.-W., Miller, W. A., Atkins, J. F. und Firth, A. E. (2008). "An overlapping essential gene in the Potyviridae." Proc Natl Acad Sci **105**(15): 5897-5902.
- Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. und Winter, G. (1991). "Making antibody fragments using phage display libraries." Nature **325**: 624-628.
- Click, E. M. und Webster, R. E. (1997). "Filamentous phage infection: required interactions with the TolA protein." J Bacteriol **179**(20): 6464-6471.
- Conrad, U. und Manteuffel, R. (2001). "Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells." Trends Plant Sci **6**(9): 399-402.
- Crick, F. H. und Watson, J. D. (1956). "Structure of small viruses." Nature **177**(4506): 473-475.
- Cunningham, S. D., Lowe, D. J., O'Brien, J. P., Wang, H. und Wilkins, A. E. (2010). Nylon binding peptides and methods of use, Google Patents.
- d'Herelle, F., Malone, R. H. und Lahiri, M. N. (1930). "Studies on Asiatic cholera." Indian Medical Research Memoirs(Memoir 14).
- d'Hérelle, F. und Smith, G. H. (1926). The bacteriophage and its behavior, Am Assoc Immnol.
- d'Herelle, F. (1917). "An invisible microbe that is antagonistic to the dysentery bacillus." Comptes rendus Acad. Sci. Paris **165**: 373-375.

- Davis, N. G., Boeke, J. D. und Model, P. (1985). "Fine structure of a membrane anchor domain." J Mol Biol **181**(1): 111-121.
- Davis, N. G. und Model, P. (1985). "An artificial anchor domain: hydrophobicity suffices to stop transfer." Cell **41**(2): 607-614.
- Day, L. A. und Berkowitz, S. A. (1977). "The number of nucleotides and the density and refractive index increments of fd virus DNA." J Mol Biol **116**(3): 603-606.
- Dietzgen, R. und Sander, E. (1982). "Monoclonal antibodies against a plant virus." Arch Virol **74**(2-3): 197-204.
- Ding, S.-W., Anderson, B. J., Haase, H. R. und Symons, R. H. (1994). "New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome." Virology **198**(2): 593-601.
- Dotto, G. P. und Zinder, N. D. (1983). "The morphogenetic signal of bacteriophage f1." Virology **130**(1): 252-256.
- Dougherty, W. G. und Carrington, J. C. (1988). "Expression and function of potyviral gene products." Annu Rev Phytopathol **26**(1): 123-143.
- Dougherty, W. G., Cary, S. M. und Parks, T. D. (1989). "Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: a model." Virology **171**(2): 356-364.
- Dougherty, W. G., Parks, T. D., Cary, S. M., Bazan, J. F. und Fletterick, R. J. (1989). "Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-kDa proteinase." Virology **172**(1): 302-310.
- Drews, G., Adam, G. und Heinze, C. (2004). Molekulare Pflanzenvirologie, Springer Verlag Berlin-Heidelberg.
- Dubos, R. J. (1958). "Tulipomania and the concept of disease." Trans N Y Acad Sci **20**(8): 785-786.
- Edwardson, J., Purcifull, D. und Christie, R. (1968). "Structure of cytoplasmic inclusions in plants infected with rod-shaped viruses." Virology **34**(2): 250-263.
- Endemann, H. und Model, P. (1995). "Location of filamentous phage minor coat proteins in phage and in infected cells." J Mol Biol **250**(4): 496-506.

Farid, S. S. (2007). "Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **848**(1): 8-18.

Filisko, F. E., Malladi, D. und Barenberg, S. (1986). "Character of adsorbed bovine serum albumin from adsorption enthalpies." Biomaterials **7**(5): 348-353.

Franconi, R., Roggero, P., Pirazzi, P., Arias, F. J., Desiderio, A., Bitti, O., Pashkoulov, D., Mattei, B., Bracci, L. und Masenga, V. (1999). "Functional expression in bacteria and plants of an scFv antibody fragment against tospoviruses." Immunotechnology **4**(3): 189-201.

Frenzel, A., Frode, D., Meyer, T., Schirrmann, T. und Hust, M. (2012). "Generating recombinant antibodies for research, diagnostics and therapy using phage display." Curr Biotechnol **1**(1): 33-41.

Fukushi, T. (1940). "Further studies on the dwarf disease of rice plant." J. Fac. Agric. Hokkaido Univ. **45**: 83-154.

Garcia-Ibilcieta, D., Bokov, M., Cherkasov, V., Sveshnikov, P. und Hanson, S. F. (2008). "Simple method for production of randomized human tenth fibronectin domain III libraries for use in combinatorial screening procedures." Biotechniques **44**(4): 559-562.

García, J. A., Riechmann, J. L. und Laín, S. (1989b). "Artificial cleavage site recognized by plum pox potyvirus protease in Escherichia coli." J Virol **63**(6): 2457-2460.

García, J. A., Riechmann, J. L. und Laín, S. (1989c). "Proteolytic activity of the plum pox potyvirus NI a-like protein in Escherichia coli." Virology **170**(2): 362-369.

García, J. A., Riechmann, J. L., Martín, M. T. und Laín, S. (1989a). "Proteolytic activity of the plum pox potyvirus NI a-protein on excess of natural and artificial substrates in Escherichia coli." FEBS Lett **257**(2): 269-273.

Gargouri-Bouزيد, R., Jaoua, L., Rouis, S., Saidi, M. N., Bouaziz, D. und Ellouz, R. (2006). "PVY-resistant transgenic potato plants expressing an anti-NIa protein scFv antibody." Mol Biotechnol **33**(2): 133-140.

Gibson, D. G. (2009). "Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides." Nucleic Acids Res **37**(20): 6984-6990.

- Gildow, F. E., Shah, D. A., Sackett, W. M., Butzler, T., Nault, B. A. und Fleischer, S. J. (2008). "Transmission efficiency of Cucumber mosaic virus by aphids associated with virus epidemics in snap bean." Phytopathology **98**(11): 1233-1241.
- Gill, J. und Abedon, S. T. (2003). "Bacteriophage ecology and plants." APSnet Feature.
- Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., van Eldik, G., Botterman, J., Klimyuk, V. und Gleba, Y. (2006). "Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors." Proc Natl Acad Sci **103**(40): 14701-14706.
- Gooding Jr, G. V. und Hebert, T. T. (1967). "A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities." Phytopathology **57**(11): 1285-1285.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P. und Blinov, V. M. (1988). "A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination." FEBS Lett **235**(1): 16-24.
- Gough, K. C., Cockburn, W. und Whitlam, G. C. (1999). "Selection of phage-display peptides that bind to cucumber mosaic virus coat protein." J Virol Methods **79**(2): 169-180.
- Grangeon, R., Jiang, J., Wan, J., Agbeci, M., Zheng, H. und Laliberté, J.-F. (2013). "6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection." Front Microbiol **4**.
- Grant, R. A., Lin, T.-C., Webster, R. E. und Konigsberg, W. (1980). "Structure of filamentous bacteriophage: isolation, characterization, and localization of the minor coat proteins and orientation of the DNA." Prog Clin Biol Res **64**: 413-428.
- Gu, Y., Zhang, J., Wang, Y.-B., Li, S.-W., Yang, H.-J., Luo, W.-X. und Xia, N.-S. (2004). "Selection of a peptide mimicking neutralization epitope of hepatitis E virus with phage peptide display technology." World J Gastroenterol **10**(11): 1583-1588.
- Gulati-Sakhuja, A. und Liu, H. Y. (2010). "Complete nucleotide sequence and genome organization of Calibrachoa mottle virus (CbMV)--a new species in the genus Carmovirus of the family Tombusviridae." Virus Res **147**(2): 216-223.
- Gulati-Sakhuja, A., Sears, J. L., Nunez, A. und Liu, H. Y. (2009). "Production of polyclonal antibodies against Pelargonium zonate spot virus coat protein expressed in Escherichia coli and application for immunodiagnosis." J Virol Methods **160**(1-2): 29-37.

Guy-Caffey, J. K., Rapoza, M. P., Jolley, K. A. und Webster, R. E. (1992). "Membrane localization and topology of a viral assembly protein." J Bacteriol **174**(8): 2460-2465.

Habili, N. und Francki, R. (1974). "Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses: I. Physical and chemical properties." Virology **57**(2): 392-401.

Habili, N. und Symons, R. H. (1989). "Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases." Nucleic Acids Res **17**(23): 9543-9555.

Haigh, N. G. und Webster, R. E. (1998). "The major coat protein of filamentous bacteriophage f1 specifically pairs in the bacterial cytoplasmic membrane." J Mol Biol **279**(1): 19-29.

Hall, P. R., Hjelle, B., Njus, H., Ye, C., Bondu-Hawkins, V., Brown, D. C., Kilpatrick, K. A. und Larson, R. S. (2009). "Phage display selection of cyclic peptides that inhibit Andes virus infection." J Virol **83**(17): 8965-8969.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A. und von Tiedemann, A. (2007). Phytomedizin: Grundwissen Bachelor. Stuttgart, Ulmer UTB.

Hammers, C. M. und Stanley, J. R. (2014). "Antibody phage display: technique and applications." J Invest Dermatol **134**(2): e17.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.

Hankin, E. (1896). "L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera." Ann. Inst. Pasteur **10**: 511.

Harper, K., Kerschbaumer, R., Ziegler, A., Macintosh, S., Cowan, G., Himmler, G., Mayo, M. und Torrance, L. (1997). "A scFv-alkaline phosphatase fusion protein which detects potato leafroll luteovirus in plant extracts by ELISA." J Virol Methods **63**(1): 237-242.

Hatfull, G. F. (2008). "Bacteriophage genomics." Curr Opin Microbiol **11**(5): 447-453.

He, X., Liu, S. und Perry, K. L. (1998). "Identification of epitopes in cucumber mosaic virus using a phage-displayed random peptide library." J Gen Virol **79**(12): 3145-3153.

- Heemskerk, J. A., Van Deutekom, J. C. T., Van Kuik-Romeijn, P. und Platenburg, G. J. (2012). Molecules for targeting compounds to various selected organs or tissues, Google Patents.
- Hewish, D. R., Xiao, X. W., Mishra, A., Gough, K. H. und Shukla, D. D. (1993). "Characterisation and epitope analysis of monoclonal antibodies to virions of clover yellow vein and Johnsongrass mosaic potyviruses." Arch Virol **133**(1-2): 127-141.
- Higashitani, A., Higashitani, N. und Horiuchi, K. (1997). "Minus-strand origin of filamentous phage versus transcriptional promoters in recognition of RNA polymerase." Proc Natl Acad Sci **94**(7): 2909-2914.
- Hill, D. F. und Petersen, G. B. (1982). "Nucleotide sequence of bacteriophage f1 DNA." J Virol **44**(1): 32-46.
- Hinrichs, J., Berger, S. und Shaw, J. G. (1997). "Induction of antibodies to plant viral proteins by DNA-based immunization." J Virol Methods **66**(2): 195-202.
- Hodgman, T. (1988). "A new superfamily of replicative proteins." Nature **333**: 578.
- Hoffmann-Berling, H. und Marvin, D. (1963). "A Fibrous DNA Phage (fd) and a Spherical RNA Phage (fr) Specific for Male Strains of E coli." Z. Naturforsch. B **18**(11): 884-893.
- Hofschneider, P. H. (1963). "Untersuchungen über „kleine“ E. coli K 12 Bakteriophagen." Z. Naturforsch. B **18**(3): 203-210.
- Holmes, F. O. (1929). "Local lesions in tobacco mosaic." Bot. Gaz. **87**: 39-55.
- Holzem, A., Nahrung, J. M. und Fischer, R. (2001). "Rapid identification of a tobacco mosaic virus epitope by using a coat protein gene-fragment-pVIII fusion library." J Gen Virol **82**(Pt 1): 9-15.
- Horiuchi, K. (1980). "Origin of DNA replication of bacteriophage f1 as the signal for termination." Proc Natl Acad Sci **77**(9): 5226-5229.
- Houbiers, M. C., Spruijt, R. B., Demel, R. A., Hemminga, M. A. und Wolfs, C. J. (2001). "Spontaneous insertion of gene 9 minor coat protein of bacteriophage M13 in model membranes." BBA-Biomembranes **1511**(2): 309-316.

Huang, Q., Baum, L. und Fu, W. L. (2010). "Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis." Clin Lab **56**(3-4): 149-152.

Hull, R. (2014). Plant virology (5th Revised edition), Academic Press Inc.

Hust, M., Maiss, E., Jacobsen, H.-J. und Reinard, T. (2002). "The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease." J Virol Methods **106**(2): 225-233.

Iracheta-Cárdenas, M., Sandoval-Alejos, B., Román-Calderón, M., Manjunath, K., Lee, R. und Rocha-Peña, M. (2008). "Production of polyclonal antibodies to the recombinant coat protein of Citrus tristeza virus and their effectiveness for virus detection." J Phytopathol **156**(4): 243-250.

Ivanowski, D. (1892). "Concerning the mosaic disease of the tobacco plant." St. Petersburg Acad Imp Scie Bul **35**: 60-67.

Jahromi, Z. M., Salmanian, A. H., Rastgoo, N. und Arbabi, M. (2009). "Isolation of BNYVV coat protein-specific single chain Fv from a mouse phage library antibody." Hybridoma (Larchmt) **28**(5): 305-313.

Jakab, G., Droz, E., Brigneti, G., Baulcombe, D. und Malno, P. (1997). "Infectious in vivo and in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y." J Gen Mol Virol **78**(12): 3141-3145.

King, A. M., Adams, M. J. und Lefkowitz, E. J. (2011). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier.

Klaus, S., Krüger, D. H. und Meyer, J. (1992). Bakterienviren, Fischer.

Köhler, G. und Milstein, C. (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-497.

Kolb, G. und Boiziau, C. (2005). "Selection by phage display of peptides targeting the HIV-1 TAR element." RNA biology **2**(1): 28-33.

- Koohapitagtam, M., Rungpragayphan, S. und Hongprayoon, R. (2009). "Construction of Single-Chain Variable Fragment (scFv) Specific to Cucumber Mosaic Virus by Phage Display Technology." Kasetsart J (Nat Sci) **43**: 330-338.
- Koskella, B., Thompson, J. N., Preston, G. M. und Buckling, A. (2011). "Local biotic environment shapes the spatial scale of bacteriophage adaptation to bacteria." Amer Nat **177**(4): 440-451.
- Kuegler, J., Wilke, S., Meier, D., Tomszak, F., Frenzel, A., Schirrmann, T., Dubel, S., Garritsen, H., Hock, B., Toleikis, L., Schutte, M. und Hust, M. (2015). "Generation and analysis of the improved human HAL9/10 antibody phage display libraries." BMC Biotechnol **15**: 10.
- Kuhn, A. und Wickner, W. (1985). "Conserved residues of the leader peptide are essential for cleavage by leader peptidase." J Biol Chem **260**(29): 15914-15918.
- Kutter, E. und Sulakvelidze, A. (2004). Bacteriophages: biology and applications, CRC Press.
- Langenberg, W. G. (1993). "Structural proteins of three viruses in the Potyviridae adhere only to their homologous cylindrical inclusions in mixed infections." J Struct Biol **110**(3): 188-195.
- Lartey, R. T., Voss, T. C. und Melcher, U. (1996). "Tobamovirus evolution: gene overlaps, recombination, and taxonomic implications." Mol Biol Evol **13**(10): 1327-1338.
- Lawrence, J. (1714). The Clergyman's Recreation. London, B. Lintott.
- Lee, Y. J. und Jeong, K. J. (2015). "Challenges to production of antibodies in bacteria and yeast." J Biosci Bioeng **120**(5): 483-490.
- Li, H. W., Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X., Ji, L. H., Wong, S. M. und Ding, S. W. (1999). "Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism." EMBO J **18**(10): 2683-2691.
- Li, M., Duc, A. C., Klosi, E., Pattabiraman, S., Spaller, M. R. und Chow, C. S. (2009). "Selection of peptides that target the aminoacyl-tRNA site of bacterial 16S ribosomal RNA." Biochemistry **48**(35): 8299-8311.
- Li, N., Chen, Z., Liu, Y., Liu, Y., Zhou, X. und Wu, J. (2015). "Development of monoclonal antibodies and serological assays specific for Barley yellow dwarf virus GAV strain." Virologia **12**(1): 136.

- Lima, J. A. A., Nascimento, A. K. Q., Radaelli, P. und Purcifull, D. E. (2012). "Serology applied to plant virology." Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases. Rijeka Croácia. InTech: 71-94.
- Liu, H.-Y., Sears, J. L. und Morrison, R. H. (2003). "Isolation and characterization of a carmo-like virus from *Calibrachoa* plants." Plant Dis **87**(2): 167-171.
- Liu, H., Zheng, X., Shi, X., Yu, L., Jia, P., Wang, J., He, J., Lan, W. und Wu, Z. (2014). "Selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against infectious haematopoietic necrosis virus from mouse phage display library." J Virol Methods **205**: 61-67.
- Liu, H., Zheng, X., Zhang, F., Yu, L., Zhang, X., Dai, H., Hua, Q., Shi, X., Lan, W., Jia, P., Yuan, L. und Liu, H. (2013). "Selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against spring viraemia of carp virus from mouse phage display library." J Virol Methods **194**(1-2): 178-184.
- Loeb, T. (1960). "Isolation of a bacteriophage specific for the F plus and Hfr mating types of *Escherichia coli* K-12." Science **131**(3404): 932-933.
- Lopez, J. und Webster, R. E. (1983). "Morphogenesis of filamentous bacteriophage f1: orientation of extrusion and production of polyphage." Virology **127**(1): 177-193.
- Loset, G. A., Kristinsson, S. G. und Sandlie, I. (2008). "Reliable titration of filamentous bacteriophages independent of pIII fusion moiety and genome size by using trypsin to restore wild-type pIII phenotype." Biotechniques **44**(4): 551-554.
- Lot, H. und Kaper, J. (1976). "Further studies on the RNA component distribution among the nucleoproteins of cucumber mosaic virus." Virology **74**(1): 223-226.
- Lunder, M., Bratkovic, T., Anderluh, G., Strukelj, B. und Kreft, S. (2008). "Affinity ranking of phage-displayed peptides: Enzyme-linked immunosorbent assay versus surface plasmon resonance." Acta Chimica Slovenica **55**(1): 233-235.
- Maheshwari, Y., Verma, H. N., Jain, R. K. und Mandal, B. (2015). "Engineered Antibody Fragments for Immunodiagnosis of Papaya ringspot virus." Mol Biotechnol **57**(7): 644-652.
- Mangels, C. (2008). "Komplexe des Prion Proteins mit anti-prion wirksamen Substanzen."

- Maruta, F., Parker, A. L., Fisher, K. D., Murray, P. G., Kerr†, D. J. und Seymour, L. W. (2003). "Use of a phage display library to identify oligopeptides binding to the luminal surface of polarized endothelium by ex vivo perfusion of human umbilical veins." J Drug Target **11**(1): 53-59.
- Marvin, D., Welsh, L., Symmons, M., Scott, W. und Straus, S. (2006). "Molecular structure of fd (f1, M13) filamentous bacteriophage refined with respect to X-ray fibre diffraction and solid-state NMR data supports specific models of phage assembly at the bacterial membrane." J Mol Biol **355**(2): 294-309.
- Marvin, D. A. (1990). "Model-building studies of Inovirus: genetic variations on a geometric theme." International Journal of Biological Macromolecules **12**(2): 125-138.
- Matic, S., Minafra, A., Boscia, D., da Cunha, A. T. und Martelli, G. P. (2009). "Production of antibodies to Little cherry virus 1 coat protein by DNA prime and protein boost immunization." J Virol Methods **155**(1): 72-76.
- Matthews, R. E. F. und Hull, R. (2002). Matthews' plant virology (Fourth Edition). San Diego, Academic Press.
- Mayer, A. (1886). "Ueber die Mosaikkrankheit des Tabaks." Landw. Vers. Sta **32**: 451-467.
- Menendez, A. und Scott, J. K. (2005). "The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies." Anal Biochem **336**(2): 145-157.
- Menzel, W., Jelkmann, W. und Maiss, E. (2002). "Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control." J Virol Methods **99**(1-2): 81-92.
- Michel, B. und Zinder, N. D. (1989). "Translational repression in bacteriophage f1: characterization of the gene V protein target on the gene II mRNA." Proc Natl Acad Sci **86**(11): 4002-4006.
- Nagler, C., Nagler, G. und Kuhn, A. (2007). "Cysteine residues in the transmembrane regions of M13 procoat protein suggest that oligomeric coat proteins assemble onto phage progeny." J Bacteriol **189**(7): 2897-2905.

- Nicol, C. G., Denby, L., Lopez-Franco, O., Masson, R., Halliday, C. A., Nicklin, S. A., Kritz, A., Work, L. M. und Baker, A. H. (2009). "Use of in vivo phage display to engineer novel adenoviruses for targeted delivery to the cardiac vasculature." FEBS Lett **583**(12): 2100-2107.
- Ning, Y., Lun-Guang, Y., Zhang, X.-M., Tai-Lin, G. und Yun-Chao, K. (2007). "Screening for Peptides of Antirotavirus by Phage-displayed Technique." Chin J Biotechnol **23**(3): 403-408.
- Nissim, A., Hoogenboom, H. R., Tomlinson, I., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D. und Winter, G. (1994). "Antibody fragments from a single pot'phage display library as immunochemical reagents." EMBO J **13**(3): 692.
- Nolke, G., Cobanov, P., Uhde-Holzem, K., Reustle, G., Fischer, R. und Schillberg, S. (2009). "Grapevine fanleaf virus (GFLV)-specific antibodies confer GFLV and Arabis mosaic virus (ArMV) resistance in *Nicotiana benthamiana*." Mol Plant Pathol **10**(1): 41-49.
- Oh, M.-y., Joo, H.-y., Hur, B.-u., Jeong, Y.-h. und Cha, S.-h. (2007). "Enhancing phage display of antibody fragments using gIII-amber suppression." Gene **386**(1): 81-89.
- Otulak, K. und Garbaczewska, G. (2012). "Cytopathological Potato virus Y structures during Solanaceous plants infection." Micron **43**(7): 839-850.
- Palukaitis, P. und García-Arenal, F. (2003). "Cucumoviruses." Adv Virus Res **62**: 241-323.
- Palukaitis, P., Roossinck, M. J., Dietzgen, R. G. und Francki, R. (1992). "Cucumber mosaic virus." Adv Virus Res **41**: 281.
- Papavoine, C. H., Christiaans, B. E., Folmer, R. H., Konings, R. N. und Hilbers, C. W. (1998). "Solution structure of the M13 major coat protein in detergent micelles: a basis for a model of phage assembly involving specific residues." J Mol Biol **282**(2): 401-419.
- Parmley, S. F. und Smith, G. P. (1988). "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes." Gene **73**(2): 305-318.
- Peng, B., Chen, H., Tan, Y., Jin, M., Chen, H. und Guo, A. (2006). "Identification of one peptide which inhibited infectivity of avian infectious bronchitis virus in vitro." Science in China Series C **49**(2): 158-163.
- Pennazio, S. (2010). "A history of virus diseases of plants: from the beginning to 1950." Riv Biol **103**(2-3): 209-235.

- Poungpair, O., Bangphoomi, K., Chaowalit, P., Sawasdee, N., Saokaew, N., Choowongkomon, K., Chaicumpa, W. und Yenchitsomanus, P. T. (2014). "Generation of human single-chain variable fragment antibodies specific to dengue virus non-structural protein 1 that interfere with the virus infectious cycle." MAbs **6**(2): 474-482.
- Racchah, B., Galon, A. und Eastop, V. (2001). Molecular basis of vector transmission: Potyviruses. In: Harris K. F., Smith O. P., Duffus J. E. (eds) Virus-insect-plant interactions, Academic Press.
- Rahim, A., Coutelle, C. und Harbottle, R. (2003). "High-throughput PyrosequencingTM of a phage display library for the identification of enriched target-specific peptides." Biotechniques **35**(2): 317-325.
- Rajamäki, M.-L. und Valkonen, J. P. (2002). "Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves." Mol Plant Microbe In **15**(2): 138-149.
- Rakonjac, J., Bennett, N. J., Spagnuolo, J., Gagic, D. und Russel, M. (2011). "Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications." Curr Issues Mol Biol **13**(2): 51-76.
- Rakonjac, J., Feng, J.-n. und Model, P. (1999). "Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a two-step mechanism involving a short C-terminal fragment of pIII." J Mol Biol **289**(5): 1253-1265.
- Rakonjac, J. und Model, P. (1998). "Roles of pIII in filamentous phage assembly." J Mol Biol **282**(1): 25-41.
- Ramanujam, P., Tan, W. S., Nathan, S. und Yusoff, K. (2002). "Novel peptides that inhibit the propagation of Newcastle disease virus." Arch Virol **147**(5): 981-993.
- Rapoza, M. P. und Webster, R. E. (1995). "The products of gene I and the overlapping in-frame gene XI are required for filamentous phage assembly." J Mol Biol **248**(3): 627-638.
- Rasched, I. und Oberer, E. (1986). "Ff coliphages: structural and functional relationships." Microbiol rev **50**(4): 401.
- Restrepo-Hartwig, M. A. und Carrington, J. C. (1994). "The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication." J Virol **68**(4): 2388-2397.

- Reyes, M. I., Nash, T. E., Dallas, M. M., Ascencio-Ibáñez, J. T. und Hanley-Bowdoin, L. (2013). "Peptide aptamers that bind to geminivirus replication proteins confer a resistance phenotype to tomato yellow leaf curl virus and tomato mottle virus infection in tomato." J Virol **87**(17): 9691-9706.
- Rice, S. A., Tan, C. H., Mikkelsen, P. J., Kung, V., Woo, J., Tay, M., Hauser, A., McDougald, D., Webb, J. S. und Kjelleberg, S. (2009). "The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage." ISME J **3**(3): 271-282.
- Rosano, G. L. und Ceccarelli, E. A. (2014). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges." Front Microbio **5**.
- Rott, M. E. und Jelkmann, W. (2001). "Detection and Partial Characterization of a Second Closterovirus Associated with Little Cherry Disease, Little cherry virus-2." Phytopathology **91**(3): 261-267.
- Rozanov, M. N., Koonin, E. V. und Gorbalenya, A. E. (1992). "Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses." J Gen Virol **73**(Pt 8): 2129-2134.
- Rudolph, C., Schreier, P. H. und Uhrig, J. F. (2003). "Peptide-mediated broad-spectrum plant resistance to tospoviruses." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4429-4434.
- Russel, M., Linderoth, N. A. und Šali, A. (1997). "Filamentous phage assembly: variation on a protein export theme." Gene **192**(1): 23-32.
- Russel, M., Lowman, H. B. und Clackson, T. (2004). "Introduction to phage biology and phage display." Phage Display: A practical approach: 1-26.
- Russel, M. und Model, P. (1982). "Filamentous phage pre-coat is an integral membrane protein: analysis by a new method of membrane preparation." Cell **28**(1): 177-184.
- Russel, M. und Model, P. (1989). "Genetic analysis of the filamentous bacteriophage packaging signal and of the proteins that interact with it." J Virol **63**(8): 3284-3295.
- Russel, M. und Model, P. (2006). Filamentous phages. In The Bacteriophages (Second Edition), New York, Oxford University Press, Inc.

- Safarnejad, M. R., Fischer, R. und Commandeur, U. (2009). "Recombinant-antibody-mediated resistance against Tomato yellow leaf curl virus in *Nicotiana benthamiana*." Arch Virol **154**(3): 457-467.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.
- Saldarelli, P., Keller, H., Dell'Orco, M., Schots, A., Elicio, V. und Minafra, A. (2005). "Isolation of recombinant antibodies (scFvs) to grapevine virus B." J Virol Methods **124**(1-2): 191-195.
- Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G. J. und Dalbey, R. E. (2000). "YidC mediates membrane protein insertion in bacteria." Nature **406**(6796): 637-641.
- Sarabipour, S., King, C. und Hristova, K. (2014). "Uninduced high-yield bacterial expression of fluorescent proteins." Anal Biochem **449**: 155-157.
- Saunders, K., Bedford, I. D., Yahara, T. und Stanley, J. (2003). "Aetiology: The earliest recorded plant virus disease." Nature **422**(6934): 831.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E. und Carrington, J. C. (1997). "Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein." EMBO J **16**(13): 4049-4059.
- Schaller, H., Voss, H. und Gucker, S. (1969). "Structure of the DNA of bacteriophage fd: II. Isolation and characterization of a DNA fraction with double strand-like properties." J Mol Biol **44**(3): 445-458.
- Schmidt, T. G., Koepke, J., Frank, R. und Skerra, A. (1996). "Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin." J Mol Biol **255**(5): 753-766.
- Scholthof, K.-B. G., Shaw, J. G. und Zaitlin, M. (1999). Tobacco mosaic virus : one hundred years of contributions to virology. St. Paul, Minn., APS Press.
- Scholthof, K. B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C. und Foster, G. D. (2011). "Top 10 plant viruses in molecular plant pathology." Mol Plant Pathol **12**(9): 938-954.

Schwartz, F. M. und Zinder, N. D. (1968). "Morphological changes in *Escherichia coli* infected with the DNA bacteriophage f1." *Virology* **34**(2): 352-355.

Schwinghamer, M. W. und Symons, R. H. (1975). "Fractionation of cucumber mosaic virus RNA and its translation in a wheat embryo cell-free system." *Virology* **63**(1): 252-262.

Scott, J. K. und Smith, G. P. (1990). "Searching for peptide ligands with an epitope library." *Science* **249**(4967): 386-390.

Serizawa, T., Sawada, T. und Kitayama, T. (2007). "Peptide Motifs That Recognize Differences in Polymer-Film Surfaces." *Angew Chem* **119**(5): 737-740.

Shtatland, T., Guettler, D., Kossodo, M., Pivovarov, M. und Weissleder, R. (2007). "PepBank- a database of peptides based on sequence text mining and public peptide data sources." *BMC Bioinformatics* **8**(1): 280.

Smith, B. F., Samoilova, T. I. und Baker, H. J. (2002). Methods and compositions for targeting compounds to the central nervous system, Google Patents.

Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* **228**(4705): 1315-1317.

Smith, K. M. (1931). "On the composite nature of certain potato virus diseases of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators and selective methods of transmission." *Proc. R. Soc. Lond. B* **109**(762): 251-267.

Soards, A. J., Murphy, A. M., Palukaitis, P. und Carr, J. P. (2002). "Virulence and differential local and systemic spread of Cucumber mosaic virus in tobacco are affected by the CMV 2b protein." *Mol Plant Microbe In* **15**(7): 647-653.

Sorel, M., Garcia, J. und German-Retana, S. (2014). "The Potyviridae cylindrical inclusion helicase: a key multipartner and multifunctional protein." *Mol Plant Microbe In* **27**(3): 215-226.

Stanley, W. M. (1935). "Isolation of a Crystalline Protein Possessing the Properties of Tobacco-Mosaic Virus." *Science* **81**(2113): 644-645.

Stanley, W. M. und Loring, H. S. (1936). "The Isolation of Crystalline Tobacco Mosaic Virus Protein from Diseased Tomato Plants." *Science* **83**(2143): 85.

Stiegler, N., Dalbey, R. E. und Kuhn, A. (2011). "M13 procoat protein insertion into YidC and SecYEG proteoliposomes and liposomes." J Mol Bio **406**(3): 362-370.

Summers, W. C. (2001). "Bacteriophage therapy." Annu Rev Microbiol **55**(1): 437-451.

Suttle, C. A. (2005). "Viruses in the sea." Nature **437**(7057): 356-361.

Hoehn, P. A., Jirka, S. M., Ten Broeke, B. R., Schultes, E. A., Aguilera, B., Pang, K. H., Heemskerk, H., Aartsma-Rus, A., van Ommen, G. J. und den Dunnen, J. T. (2012). "Phage display screening without repetitious selection rounds." Anal Biochem **421**(2): 622-631.

Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A. und Galeffi, P. (1993). "Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack." Nature **366**(6454): 469-472.

Temin, H. M. und Mizutani, S. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus." Nature **226**(5252): 1211-1213.

Tidona, C. A. und Darai, G. (2002). The Springer Index of Viruses. Berlin Heidelberg New York, Springer.

Torrance, L. und Jones, R. (1981). "Recent developments in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses." Plant Path **30**(1): 1-24.

van Wezenbeek, P. M., Hulsebos, T. J. und Schoenmakers, J. G. (1980). "Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd." Gene **11**(1): 129-148.

Vlatakis, G., Andersson, L. I., Müller, R. und Mosbach, K. (1993). "Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting." Nature **361**(6413): 645-647.

Vodnik, M., Zager, U., Strukelj, B. und Lunder, M. (2011). "Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack." Molecules **16**(1): 790-817.

Vos, W. L., Nazarov, P. V., Koehorst, R. B., Spruijt, R. B. und Hemminga, M. A. (2009). "From 'I' to 'L' and back again: the odyssey of membrane-bound M13 protein." TIBS **34**(5): 249-255.

Webster, R. E. und Cashman, J. S. (1973). "Abortive infection of *Escherichia coli* with the bacteriophage f1: Cytoplasmic membrane proteins and the f1 DNA-gene 5 protein complex." *Virology* **55**(1): 20-38.

Webster, R. E., Grant, R. A. und Hamilton, L. A. (1981). "Orientation of the DNA in the filamentous bacteriophage f1." *J Mol Bio* **152**(2): 357-374.

Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K. D., Zhou, X., Carrington, J. C. und Wang, A. (2010). "Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO." *PLoS Pathog* **6**(6): e1000962-e1000962.

Wickner, W. (1975). "Asymmetric orientation of a phage coat protein in cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**(12): 4749-4753.

Witz, J. und Brown, F. (2001). "Structural dynamics, an intrinsic property of viral capsids." *Arch Virol* **146**(12): 2263-2274.

Wölcke, J. und Weinhold, E. (2001). "A DNA-binding peptide from a phage display library." *Nucleos Nucleot Nucl* **20**(4-7): 1239-1241.

Wommack, K. E. und Colwell, R. R. (2000). "Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems." *Microbiol Mol Biol R* **64**(1): 69-114.

Wu, S.-C. und Lin, C.-W. (2001). "Neutralizing peptide ligands selected from phage-displayed libraries mimic the conformational epitope on domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein." *Virus Res* **76**(1): 59-69.

Xiao, X. W., Chu, P. W., Frenkel, M. J., Tabe, L. M., Shukla, D. D., Hanna, P. J., Higgins, T. J., 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**(4): 421-431.

Yang, B., Gao, L., Li, L., Lu, Z., Fan, X., Patel, C. A., Pomerantz, R. J., DuBois, G. C. und Zhang, H. (2003). "Potent suppression of viral infectivity by the peptides that inhibit multimerization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vif proteins." *J Biol Chem* **278**(8): 6596-6602.

YanHong, Q., DongMei, L., Tao, Z. und ZaiFeng, F. (2009). "Immuno-localization of the CI protein of Sugarcane mosaic virus in the phloem cells of maize." Acta Phytophylacica Sin **36**(3): 234-238.

Yen, T. B. und Webster, R. E. (1982). "Translational control of bacteriophage f1 gene II and gene X proteins by gene V protein." Cell **29**(2): 337-345.

Yi, G., Qian, J., Wang, Z. und Qi, Y. (2003). "A phage-displayed peptide can inhibit infection by white spot syndrome virus of shrimp." J. Gen. Virol. **84**(9): 2545-2553.

Zenkin, N., Naryshkina, T., Kuznedelov, K. und Severinov, K. (2006). "The mechanism of DNA replication primer synthesis by RNA polymerase." Nature **439**(7076): 617-620.

Ziegler, A., Torrance, L., Macintosh, S. M., Cowan, G. H. und Mayo, M. A. (1995). "Cucumber mosaic cucumovirus antibodies from a synthetic phage display library." Virology **214**(1): 235-238.

Zilian, E. und Maiss, E. (2011). "Detection of plum pox potyviral protein–protein interactions in planta using an optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system." J Gen Virol **92**(12): 2711-2723.

Internetquellen (letztmaliger Zugriff: 2015)

1. <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>
2. <http://www.jcat.de/>
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. <http://pepbank.mgh.harvard.edu>
5. <http://viralzone.expasy.org>

7 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Maiß möchte ich besonders danken, da er mir das Thema der Dissertation anvertraute und mich jederzeit mit großem Engagement unterstützte. Dabei stand er mit Rat zur Seite, war immer erreichbar und ermutigte mich zu der Durchführung von weiteren Ideen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer für die bereitwillige Übernahme des Ko-Referates.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Poehling bedanke ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit am Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme und für den Vorsitz in der Promotionskommission.

Außerdem danke ich den Mitarbeitern des Instituts, die mir bei der Lösung meiner Probleme halfen. Hier sollten die Mitarbeiter der „Pflanzenvirologie“ besonders herausgestellt werden, da nicht nur viele praktische und fachliche Fragen in diesem Kreis gelöst werden konnten, sondern häufig auch Themen außerhalb der Virologie von Interesse waren. Namentlich herausgestellt werden sollten dabei im Folgenden Till Lesker, Niklas Bald, Hanna Rose, Hamza Mohammad, Kaja Schieck und Jessica Schimmel. Nicht unerwähnt sollten in diesem Zusammenhang die sogenannten „Halbvirologen“ Yvonne Koleczek, Myriam Declercq und Johanna Knopp bleiben.

Ebenso bedanke ich mich bei unserer Technischen Assistentin Jutta Zimmermann neben der fachlichen Arbeit für die interessanten Diskussionen und Gespräche, die nicht selten das Thema Pflanzenvirologie verließen.

Aber auch den Gärtnern des Instituts, Hans-Joachim Seelbinder und Seraphine Herrmann möchte ich auf diesem Weg für ihre Unterstützung danken.

Für die mannigfaltigen Anregungen und Vorschläge bei der Verfassung dieser Dissertation möchte ich mich neben Niklas, Hanna und Jessica auch bei Mario Hasler, Philip Brinkmann, Stefan Melbaum und Johanna Murr bedanken.

Nachdem sich doch einige Probleme während der Arbeit zeigten, machten erst Prof. Dr. Stefan Dübel, Prof. Dr. Michael Hust und Saskia Helmsing vom Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Biotechnologie der Universität Braunschweig ein erfolgreiches Gelingen möglich. Ich möchte hier insbesondere auf die Bereitstellung der scFv-Bibliotheken HAL9 und HAL10, den wissenschaftlichen Input und den Informationsaustausch verweisen.

Auch der Graduiertenakademie und insbesondere Frau Dr. Meike Huntebrinker schulde ich Dank, da das Abschluss-Stipendium der Universität die Beendigung der Dissertation erleichterte.

Zu guter Letzt dürfen natürlich auch meine Eltern nicht unerwähnt bleiben, die mich über den gesamten Zeitraum unterstützten.

Vielen Dank

Dieses Forschungsprojekt wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) und der Länder Niedersachsen, Brandenburg und Bayern innerhalb des BMBF-AgroClustEr: WeGa - Kompetenznetz Gartenbau (0315542A) gefördert.

8 ANHANG

8.1 Aufbau der Plasmide und Phagemide: Sequenzen und Klonierungsstrategien

8.1.1 Aufbau der Expressionsvektoren

pQE-30, pQE-31, and pQE-32 Vectors

Positions of elements in bases	pQE-30	pQE-31	pQE-32
Vector size (bp)	3461	3463	3462
Start of numbering at XhoI (CTCGAG)	1-6	1-6	1-6
T5 promoter/lac operator element	7-87	7-87	7-87
T5 transcription start	61	61	61
6xHis-tag coding sequence	127-144	127-144	127-144
Multiple cloning site	145-192	147-194	146-193
Lambda t ₀ transcriptional termination region	208-302	210-304	209-303
rrnB T1 transcriptional termination region	1064-1162	1066-1164	1065-1163
ColE1 origin of replication	1638	1640	1639
β-lactamase coding sequence	3256-2396	3258-2398	3257-2397

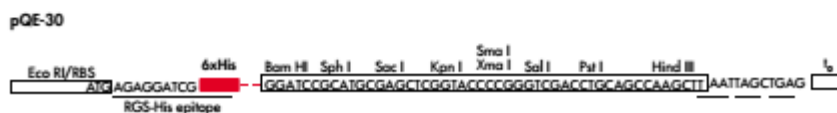
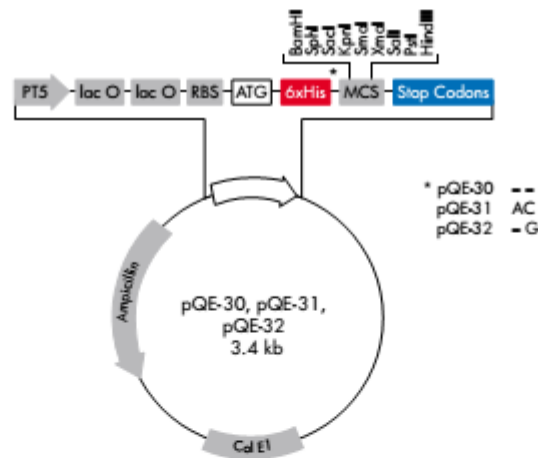


Abbildung 8.1-1 Aufbau des Expressionsvektors pQE_30

In der obigen Abbildung ist der Aufbau des Expressionsvektors pQE_30 gezeigt. Die Hüllproteinsequenzen der einzelnen Viren wurden durch die PCR mit Restriktionsschnittstellen versehen und dann in die MCS kloniert. Aus dem Handbuch: "The QIAexpressionist™: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins" von Qiagen.

Tabelle 8.1-1 PCR-Programme zur Amplifikation der Hüllproteinfragmente für die pQE_30 Vektoren

Zusammensetzung	CMV	PPV	PVY	TMV	TSVW
Oligonukleotid 1	1 µl 2876	1 µl 2880	1 µl 2878	1 µl 2882	1 µl 2885
Oligonukleotid 2	1 µl 2877	1 µl 2881	1 µl 2945	1 µl 2883	1 µl 2884
10 x Phusion Flash MM	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
H ₂ O _{bidest}	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl
Ausgangsplasmid	1 µl cDNA	1 µl p2161	1 µl p1415	1 µl p1922	1 µl p3363
Programm PCR	CMV	PPV	PVY	TMV	TSVW
1. Primäre Denaturierung	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s
2. Denaturierung	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s
3. Primer-Anlagerung	59 °C / 5 s	63 °C / 5 s	55 °C / 5 s	56 °C / 5 s	55 °C / 5 s
4. Elongation	72 °C / 20 s	72 °C / 20 s	72 °C / 20 s	72 °C / 20 s	72 °C / 20 s
Wiederholung Schritt 2-4	30 x	30 x	30 x	30 x	30 x
5. Finale Elongation	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min
6. Lagerung	10 °C / ∞	10 °C / ∞	10 °C / ∞	10 °C / ∞	10 °C / ∞

Die Oligonukleotide werden als 10 µM Ansatz verwendet, die Plasmide jeweils 1:20 in H₂O_{bidest} verdünnt eingesetzt. Das CMV-CP wurde aus einer Gesamtnukleinsäureextraktion einer mit CMV infizierten Pflanze in cDNA umgeschrieben und danach amplifiziert. Für die verschiedenen Oligonukleotide siehe Kapitel 2.1.10, für die Plasmide siehe Kapitel 2.1.13. Vor dem Restriktionsverdau werden die Fragmente mit BioLine gereinigt.

Tabelle 8.1-2 Restriktionsverdau der Fragmente aus Tabelle 8.1-1 und der pQE_30 Vektoren.

Name	Spaltung	Puffer/Handling
TMV_CP	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Hind</i> III (30 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
PVY_CP	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Hind</i> III (30 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
PPV_CP	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Hind</i> III (30 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
TSWV_CP	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Hind</i> III (30 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
CMV_CP	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Pst</i> I (10 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
pQE_30	<i>Bam</i> HI (20 U) / <i>Hind</i> III (30 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
pQE_30	<i>Bam</i> HI (20 U) / <i>Pst</i> I (20 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C

Nach der Phosphorylierung werden die Hüllproteinfragmente in die geöffneten pQE-30 Vektoren ligiert und die Plasmide danach transformiert.

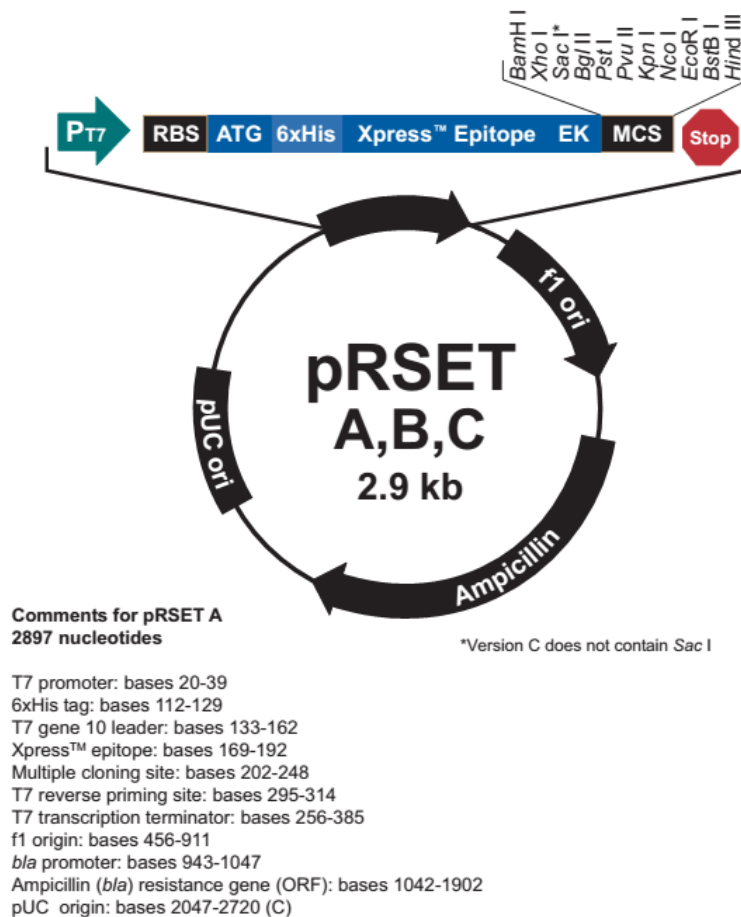


Abbildung 8.1-2 Aufbau des Expressionsvektors pRSET A, B, C

In der obigen Abbildung ist der Aufbau der Expressionsvektoren pRSET A, B, C gezeigt. Aus dem Handbuch: „pRSET A, B, and C For high-level expression of recombinant proteins in *E. coli*“ von Invitrogen

Die Hüllproteinsequenz des CbMV wurde durch die PCR mit Restriktionsschnittstellen versehen und dann in die MCS kloniert. Die Hüllproteinsequenzen der anderen Viren wurden aus den pQE_30 Vektoren mit den jeweiligen Restriktionsschnittstellen amplifiziert.

Tabelle 8.1-3 PCR-Programme zur Amplifikation der Hüllproteinfragmente für die pRSET A Vektoren

Zusammensetzung	CbMV	CMV	PPV	PVY	TMV	TSVW
Oligonukleotid 1	1 µl 4207	1 µl 2953	1 µl 2953	1 µl 2953	1 µl 2953	1 µl 2953
Oligonukleotid 2	1 µl 4208	1 µl 2954	1 µl 2954	1 µl 2954	1 µl 2954	1 µl 2954
10 x Phusion Flash MM	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
H ₂ O _{bidest}	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl
Ausgangsplasmid	1 µl p2448	1 µl p2307	1 µl p2305	1 µl p2304	1 µl p2303	1 µl p2306
Programm PCR	CbMV	CMV	PPV	PVY	TMV	TSVW
1. Primäre Denaturierung	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s
2. Denaturierung	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s
3. Primer-Anlagerung	58 °C / 5 s	58 °C / 5 s	58 °C / 5 s	58 °C / 5 s	58 °C / 5 s	58 °C / 5 s
4. Elongation	72 °C / 20 s	72 °C / 20 s	72 °C / 20 s	72 °C / 20 s	72 °C / 20 s	72 °C / 20 s
Wiederholung Schritt 2-4	29 x	29 x	29 x	29 x	29 x	29 x
5. Finale Elongation	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min
6. Lagerung	10 °C / ∞	10 °C / ∞	10 °C / ∞	10 °C / ∞	10 °C / ∞	10 °C / ∞

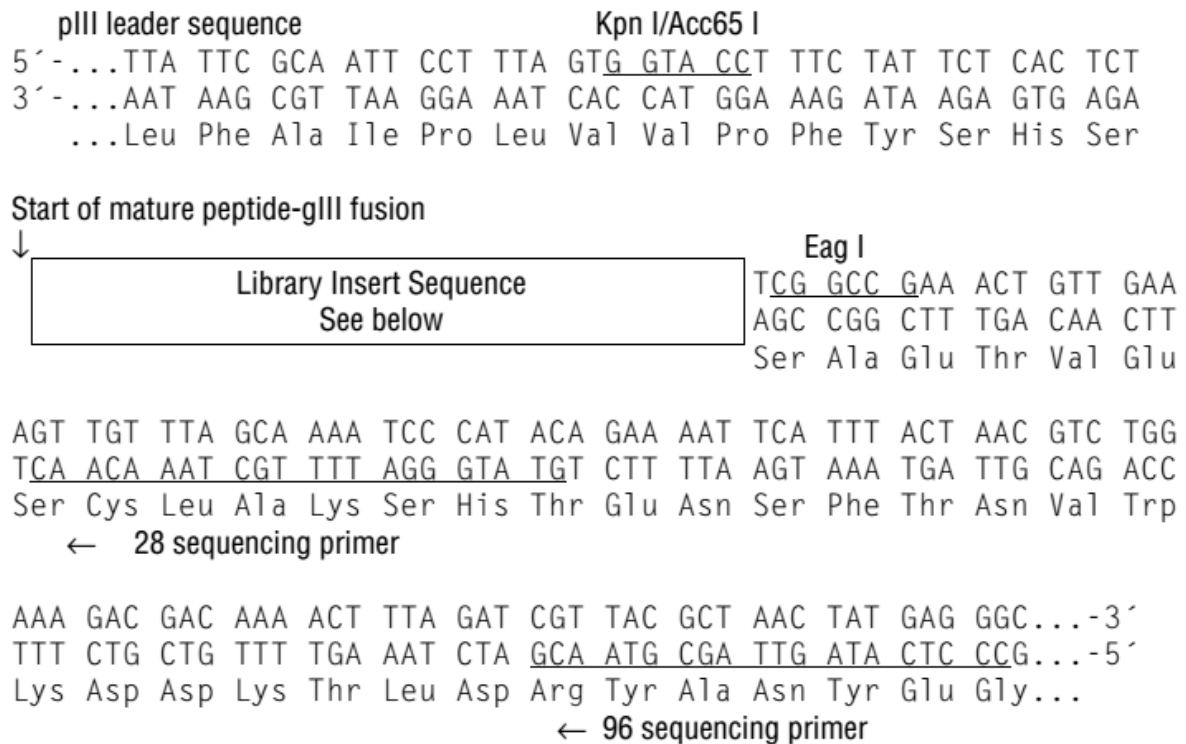
Die Oligonukleotide werden als 10 µM Ansatz verwendet, die Plasmide jeweils 1:20 in H₂O_{bidest} verdünnt eingesetzt. Für die verschiedenen Oligonukleotide siehe Kapitel 2.1.10, für die Plasmide siehe Kapitel 2.1.13. Vor dem Restriktionsverdau werden die Fragmente mit BioLine gereinigt.

Tabelle 8.1-4 Restriktionsverdau der Fragmente aus Tabelle 8.1.-3 und der pRSET Vektoren.

Name	Spaltung	Puffer/Handling
TMV_CP	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Hind</i> III (30 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
PVY_CP	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Hind</i> III (30 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
PPV_CP	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Hind</i> III (30 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
TSWV_CP	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Hind</i> III (30 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
CMV_CP	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Pst</i> I (10 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
CbMV_CP	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Eco</i> RI (10 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
pRSET A	<i>Bam</i> HI (20 U) / <i>Hind</i> III (30 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
pRSET A	<i>Bam</i> HI (20 U) / <i>Pst</i> I (20 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
pRSET A	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Eco</i> RI (10 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C

Nach der Phosphorylierung werden die Hüllproteinfragmente in die geöffneten pRSET A Vektoren ligiert und die Plasmide danach transformiert.

8.1.2 Aufbau der *random peptide library-gIII* Fusionen der *Ph.D.TM Phage Display Libraries*



Library Insert Sequences

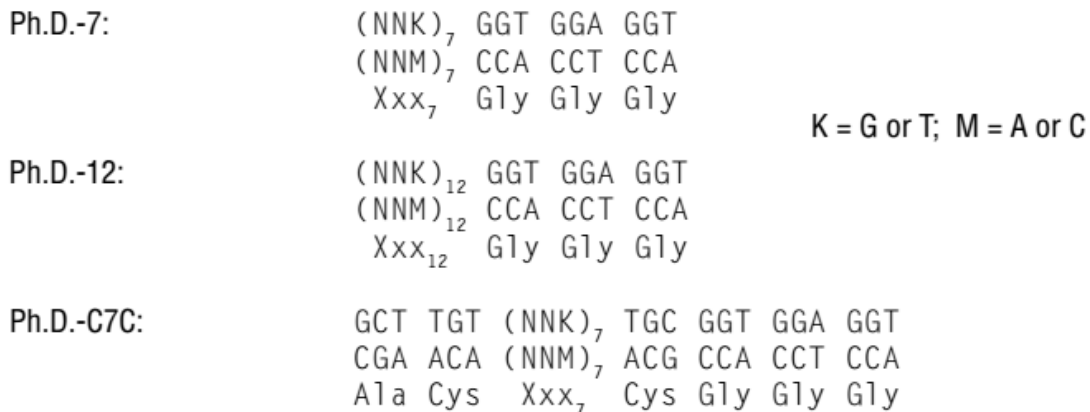


Abbildung 8.1-3 Sequenz der *random peptide library-pIII* Fusionen der *Ph.D.TM Phage Display Libraries*

Jede Bibliothek wird mit einer N-terminalen Signalsequenz, die nach der Sekretion entfernt wird (siehe Pfeil), exprimiert. Als Resultat befinden sich die zufälligen Peptide direkt am N-terminus des Hauptproteins. (Aus: *Ph.D.TM Phage Display Libraries: Instruction manual*).

Tabelle 8.1-5 Der Überblick über die DNA und Proteinsequenz ausgewählter Klone im Biopanning I

Klon Nr.	Proteinsequenz	DNA-Sequenz
CMV Ph.D. TM -12, Klon 1	HMWTLKEWRWKP	CATATGTGGACGCTTAAGGAGTGGCGGTGGAAGCCT
CMV Ph.D. TM -12, Klon 2	HMWTLKEWRWKP	CATATGTGGACGCTTAAGGAGTGGCGGTGGAAGCCT
CMV Ph.D. TM -12, Klon 3	HLKYPLYMWLNP	CATTTGAAGTATCCGCTGTATATGTGGCTTAATCCG
CMV Ph.D. TM -12, Klon 4	HYTGNWGFWPGR	CATTATACGGGAATTGGGGGTTTTGGCCGGGTCGT
CMV Ph.D. TM -12, Klon 5	APHKNPALSALL	GCTCCGCATAAGAATCCTGCGCTTCTGCTCTTCTG

Tabelle 8.1-6 Der Überblick über die DNA und Proteinsequenz ausgewählter Klone im Biopanning II

Klon Nr.	Proteinsequenz	DNA-Sequenz
TMV Ph.D. TM -12, Klon 1	DWAQLTQRWYLR	GATTGGGCGCAGCTGACTCAGCGGTGGTATCTGCGT
TMV Ph.D. TM -12, Klon 2	WHPTLNPYMREP	TGGCATCCGACTCTTAATCCTTATATGAGGGAGCCG
TMV Ph.D. TM -12, Klon 3	DWAQLTQRWYLR	GATTGGGCGCAGCTGACTCAGCGGTGGTATCTGCGT
TMV Ph.D. TM -12, Klon 4	WHWAPYFPWPVA	TGGCATTGGGCGCCGATTTTCCGTGGCCTGTTGCT
TMV Ph.D. TM -12, Klon 5	DWAQLTQRWYLR	GATTGGGCGCAGCTGACTCAGCGGTGGTATCTGCGT
TMV Ph.D. TM -12, Klon 6	WHWAPYFPWPVA	TGGCATTGGGCGCCGATTTTCCGTGGCCTGTTGCT
TMV Ph.D. TM -12, Klon 7	WHWAPYFPWPVA	TGGCATTGGGCGCCGATTTTCCGTGGCCTGTTGCT
TMV Ph.D. TM -12, Klon 8	HGRHFEFWPTGS	CATGGTCGTCATTTTGGCTACTGGTTCT
TMV Ph.D. TM -12, Klon 9	WYPWSTTWAPPA	TGGTATCCTTGGTTCGACTACGTGGGCTCCTCCTGCG
TMV Ph.D. TM -12, Klon 10	WHWAPLFSVACC	TGGCATTGGGCGCCGCTATTTTCCGTGGCCTGTTGCT

Tabelle 8.1-7 Der Überblick über die DNA und Proteinsequenz ausgewählter Klone im Biopanning III

Klon Nr.	Proteinsequenz	DNA-Sequenz
PPV Ph.D. TM -12, Klon 6	TTHLHYRAHLHR	ACTACGCATCTGCATTATCGTGCTCATCTTCATCGG
PPV Ph.D. TM -12, Klon 7	HYKHLHSLHTRT	CATTATAAGCATTTCATTCTTCATACGCGTACT
PPV Ph.D. TM -12, Klon 8	TTHLHYRAHLHR	ACTACGCATCTGCATTATCGTGCTCATCTTCATCGG
PPV Ph.D. TM -12, Klon 10	TTHLHYRAHLHR	ACTACGCATCTGCATTATCGTGCTCATCTTCATCGG
PVY Ph.D. TM -7, Klon 4	NRWHHLE	AATCGGTGGCATCATCTGGAG
PVY Ph.D. TM -7, Klon 10	ASSICMS	GCTAGTAGTATTTGTATGTGC
PVY Ph.D. TM -12, Klon 4	WQFHFGTPIRHT	TGGCAGTTTCATTTTGGGACTCCGATTCGGCATAACG
PVY Ph.D. TM -12, Klon 5	WQFHFGTPIRHT	TGGCAGTTTCATTTTGGGACTCCGATTCGGCATAACG
PVY Ph.D. TM -12, Klon 8	HWQSHSQRYPT	CATTGGTGGCAGTCGCATTTCGAGAGGTATCCTACG
TMV Ph.D. TM -7, Klon 2	LWGWYGA	TTGTGGGGTTGGTATGGTGCT
TMV Ph.D. TM -7, Klon 3	LWGWYGA	TTGTGGGGTTGGTATGGTGCT
TMV Ph.D. TM -7, Klon 8	LWGWYGA	TTGTGGGGTTGGTATGGTGCT
TMV Ph.D. TM -7, Klon 10	LWGWYGA	TTGTGGGGTTGGTATGGTGCT
TMV Ph.D. TM -12, Klon 5	WHPTLNPYMREP	TGGCATCCGACTCTTAATCCTTATATGAGGGAGCCG
TMV Ph.D. TM -12, Klon 7	WHPTLNPYMREP	TGGCATCCGACTCTTAATCCTTATATGAGGGAGCCG
TMV Ph.D. TM -12, Klon 8	WHPTLNPYMREP	TGGCATCCGACTCTTAATCCTTATATGAGGGAGCCG
TMV Ph.D. TM -7, V	LWGWYGA	TTGTGGGGTTGGTATGGTGCT
TMV Ph.D. TM -7, IX	LWGWYGA	TTGTGGGGTTGGTATGGTGCT
TMV Ph.D. TM -12, XV	NPHDFSHFPHVR	AATCCTCATGATTTTTCGCATTTTCTCATGTGAGG

Tabelle 8.1-8 PCR-Programme zur Amplifikation der spezifischen M13K07-Peptidphagen

Zusammensetzung	K4-Phage	M13K07TMV1	M13K07TMVC1	M13K07TMV2
Oligonukleotid 1	1 µl 3371	1 µl 3489	1 µl 3662	1 µl 3664
Oligonukleotid 2	1 µl 3372	1 µl 3490	1 µl 3663	1 µl 3665
10 x Phusion Flash MM	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
H ₂ O _{bidest}	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl
Ausgangsplasmid	1 µl p2340	1 µl p2340	1 µl p2340	1 µl p2340
Programm PCR	K4-Phage	M13K07TMV1	M13K07TMVC1	M13K07TMV2
1. Primäre Denaturierung	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s
2. Denaturierung	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s
3. Primer-Anlagerung	55 °C / 5 s	55 °C / 5 s	55 °C / 5 s	55 °C / 5 s
4. Elongation	72 °C / 120 s	72 °C / 120 s	72 °C / 120 s	72 °C / 120 s
Wiederholung Schritt 2-4	24 x	24 x	24 x	24 x
5. Finale Elongation	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min
6. Lagerung	10 °C / ∞	10 °C / ∞	10 °C / ∞	10 °C / ∞

Die Oligonukleotide werden als 10 µM Ansatz verwendet, die Plasmide jeweils 1:20 in H₂O_{bidest} verdünnt eingesetzt. Für die verschiedenen Oligonukleotide siehe Kapitel 2.1.10, für die Plasmide siehe Kapitel 2.1.13. Nach der Phosphorylierung wird das Fragment ligiert und danach transformiert.

Tabelle 8.1-9 PCR-Programm 1 zur Amplifikation der spezifischen M13K07-scFv-Phagen mittels Gibson Assembly

Zusammensetzung 1.	M13K07CbMV_ C9	M13K07CbMV_ C10	M13K07CbMV_ A10	M13K07CbMV_ C3
Oligonukleotid 1	1 µl 4407	1 µl 4407	1 µl 4407	1 µl 4407
Oligonukleotid 2	1 µl 4408	1 µl 4408	1 µl 4408	1 µl 4408
10 x Phusion Flash MM	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
H ₂ O _{bidest}	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl
Ausgangsplasmid	1 µl p2609	1 µl p2610	1 µl p2611	1 µl p2612
Programm PCR 1.	M13K07CbMV_ C9	M13K07CbMV_ C10	M13K07CbMV_ A10	M13K07CbMV_ C3
1. Primäre Denaturierung	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s
2. Denaturierung	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s
3. Primer-Anlagerung	55 °C / 5 s	55 °C / 5 s	55 °C / 5 s	55 °C / 5 s
4. Elongation	72 °C / 120 s	72 °C / 120 s	72 °C / 120 s	72 °C / 120 s
Wiederholung Schritt 2-4	29 x	29 x	29 x	29 x
5. Finale Elongation	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min
6. Lagerung	10 °C / ∞	10 °C / ∞	10 °C / ∞	10 °C / ∞

Tabelle 8.1-10 PCR-Programm 2 zur Amplifikation der spezifischen M13K07-scFv-Phagen mittels Gibson Assembly

Zusammensetzung 2.	Vorbereitung des M13K07-Hintergrunds
Oligonukleotid 1	1 µl 4405
Oligonukleotid 2	1 µl 4406
10 x Phusion Flash MM	20 µl
H ₂ O _{bidest}	17 µl
Ausgangsplasmid	1 µl p2340
Programm PCR 2.	Vorbereitung des M13K07-Hintergrunds
1. Primäre Denaturierung	98 °C / 10 s
2. Denaturierung	98 °C / 5 s
3. Primer-Anlagerung	55 °C / 5 s
4. Elongation	72 °C / 150 s
Wiederholung Schritt 2-4	29 x
5. Finale Elongation	72 °C / 5 min
6. Lagerung	10 °C / ∞

Die Oligonukleotide werden als 10 µM Ansatz verwendet. Für die verschiedenen Oligonukleotide siehe Kapitel 2.1.10, für die Plasmide siehe Kapitel 2.1.13. Die Fragmente werden mit SureClean gereinigt und danach das Fragment aus der PCR 2 (3 µl) mit jeweils

einem Fragment aus PCR 1 (7 µl) in einem Gibson-Assembly eingesetzt und danach transformiert.

8.1.3 Aufbau der scFv-Bibliotheken Tomlinson I und J

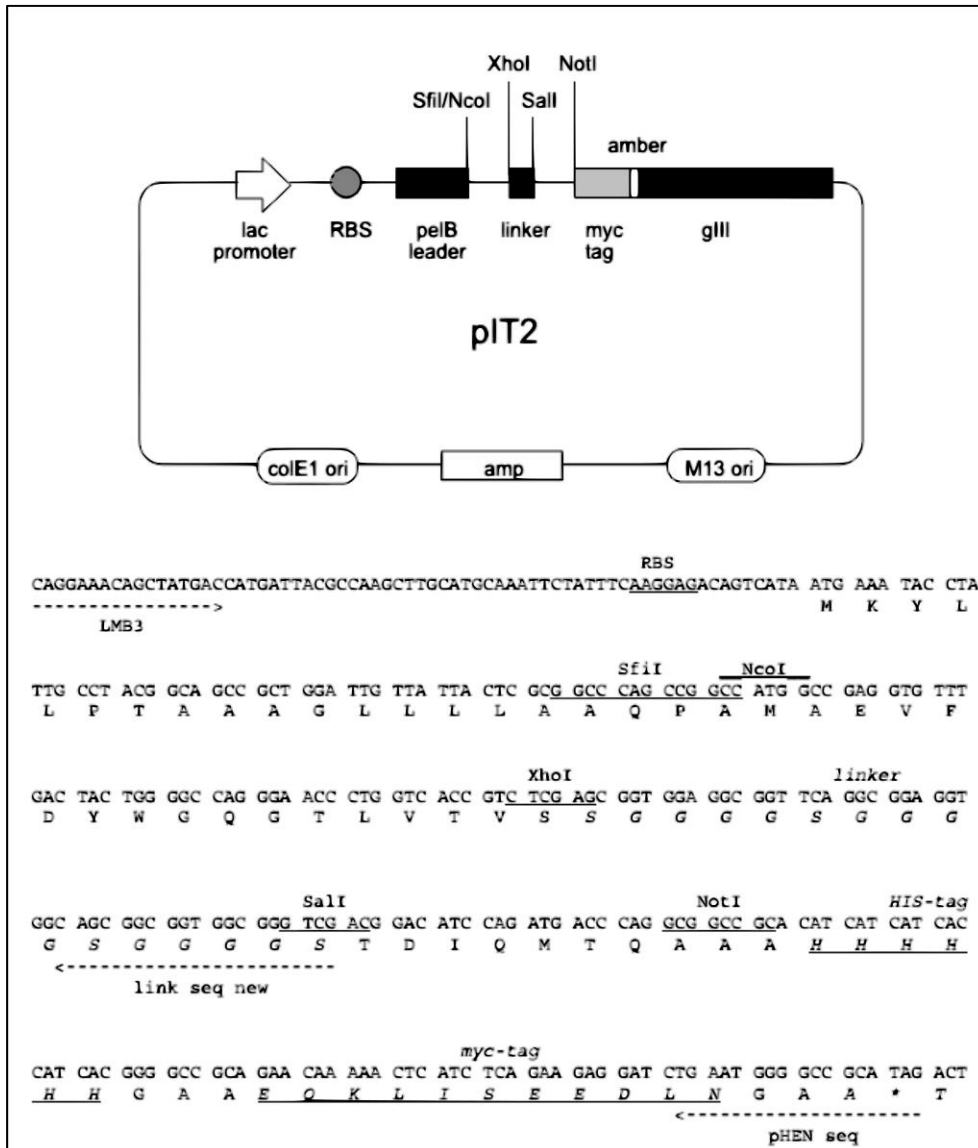


Abbildung 8.1-4 Vektorkarte und Sequenz des pIT2 Vektors

Nach: *Human Single Fold scFv Libraries I + J (Tomlinson I + J): manual.*

8.1.4 Aufbau der scFv-Bibliotheken HAL9 und HAL10

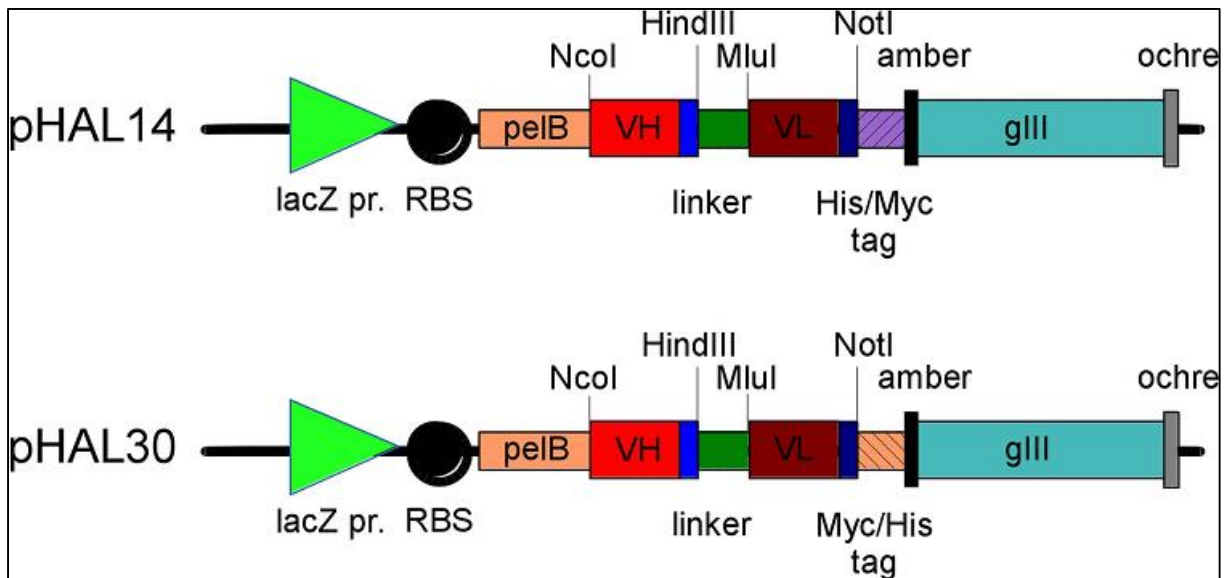


Abbildung 8.1-5 Vektorkarte der Phagemide pHAL30 und pHAL14

Nach: (Kuegler *et al.* 2015)

Für die Klonierung der scFvs EU589245.1, CMV (Koohapitagtam *et al.* 2009) und 3_17, PVY (Xiao *et al.* 2000) in den pHAL30 Hintergrund wurde die spezifische scFv-Sequenz mit dem Dienst JCAT (<http://www.jcat.de/>) einer Codonoptimierung unterzogen, spezifische Restriktionsschnittstellen für die spätere Klonierung hinzugefügt und danach von IDT in der Form eines gBlocks produziert.

Tabelle 8.1-11 PCR-Programme zur Amplifikation der gBlocks der scFvs EU589245.1 (CMV) und 3_17 (PVY)

Zusammensetzung	EU589245.1 (CMV)	3_17 (PVY)
Oligonukleotid 1	1 µl 4372	1 µl 4372
Oligonukleotid 2	1 µl 4373	1 µl 4373
10 x Phusion Flash MM	10 µl	10 µl
H ₂ O _{bidest}	7 µl	7 µl
Ausgangsplasmid	1 µl gBlock scFv_CMV (10 ng)	1 µl gBlock scFv 3_17 (10 ng)
Programm PCR	EU589245.1 (CMV)	3_17 (PVY)
1. Primäre Denaturierung	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s
2. Denaturierung	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s
3. Primer-Anlagerung	55 °C / 5 s	55 °C / 5 s
4. Elongation	72 °C / 20 s	72 °C / 20 s
Wiederholung Schritt 2-4	11 x	19 x
5. Finale Elongation	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min
6. Lagerung	10 °C / ∞	10 °C / ∞

Die Oligonukleotide werden als 10 µM Ansatz verwendet, die Plasmide jeweils 1:20 in H₂O_{bidest} verdünnt eingesetzt. Für die verschiedenen Oligonukleotide siehe Kapitel 2.1.10, für die Plasmide siehe Kapitel 2.1.13. Vor dem Restriktionsverdau werden die Fragmente mit BioLine gereinigt. Nach der Phosphorylierung wird das Fragment ligiert und danach transformiert.

Tabelle 8.1-12 Restriktionsverdau der Fragmente aus Tabelle 8.1-11 und dem Plasmid p2611

Name	Spaltung	Puffer/Handling
gBlock scFv 3-17	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Eco</i> RI (10 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
p2611	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Eco</i> RI (10 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
gBlock scFv_CMV	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Eco</i> RI (10 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C
p2611	<i>Bam</i> HI (10 U) / <i>Eco</i> RI (10 U)	FastDigest; 30 Minuten, 37 °C

Nach der Phosphorylierung werden die Hüllproteinfragmente in die geöffneten p2611 Plasmide ligiert und danach transformiert.

8.2 Teilsequenzen ausgewählter Klone

Tabelle 8.2-1 DNA-Sequenz scFv SH1327-A10 in pHAL30, *Nco*I bis Amber-Stoppcodon

GCCATGGCCCAGGTGCAACTGCAGGAGTCGGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGG
GAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATTCT
CTGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGCTAT
ATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA
CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAGTGAACAGCCCG
AGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGACTCTGGCGTCA
CTACAGTGCGAAAACGGGCAACGACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGG
TCACCGTCTCCTCGGGGAGTGCATCCGCCCAAAGCTTGAAGAAGGTGAATTTT
CAGAAGCACGCGTAAATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCTGGAGTCTC
CGGGGAAGACGGTAACCATCTCCTGCACCGGCAGCAGTGGCAGCATTGCCAGC
AACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGTGCCCCCACCCTGTGAT
CTATGAGGATAACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCAT
CGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCGCCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGA
CGAGGCTGACTACTACTGTGAGTCTTATGATAGCAGCAATGTGGTATTCGGCGG
AGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCCTCT
GTTCCCACCCTCCTCTGCGGCCGAGGTTCTGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGA
AGATCTATCCCATCATCACCATCATCATTAG

*Nco*I und Amber-Stoppcodon = unterstrichen; YOL-Epitop in rot,

Tabelle 8.2-2 DNA-Sequenz scFv SH1327-C3 in pHAL30, *NcoI* bis Amber-Stoppodon

GCCATGGCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGG
 GAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGC
 TATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTA
 TATCATATGATGGAAGTAATAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC
 ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
 GAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTGGACTGGGGATACG
 GTGCTTTTGGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGGAGTG
 CATCCGCCCCAAAGCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTACAGTCT
 GCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATC
 TCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGGAGTTATAACCTTGTCTCCTGGTAC
 CAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAATCATGATTTATGAGGGCAGTAAGCG
 GCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTC
 CCTGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTGAAGATGAGGCTGATTATTACTGCAGCTC
 ATATGCAGGCAGCAACACTTATGTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCACCGTCCT
 AGGTCAGCCCAGGGCCAACCCCACTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGCGGC
 CGCAGGTTCTGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGATCTATCCCATCATCACC
 ATCATCATTAG

NcoI und Amber-Stoppodon = unterstrichen; YOL-Epitop in rot,

Tabelle 8.2-3 DNA-Sequenz scFv SH1327-C9 in pHAL30, *NcoI* bis Amber-Stoppodon

GCCATGGCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCAAGCCTGG
 GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACATTCAGTAGCTATAG
 CATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCA
 TTAGTAGTAATAGTAATTACATATTCTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCA
 CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACTCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA
 GAGCCGAGGACGCGGCTGTGTATTACTGTGCGATTAACGAGAGAGGGCTCTAC
 TACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGGAG
 TGCATCCGCCCCAAAGCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTACAGT
 CTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGAAGAGTCGATCACCA
 TCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGCTTATAACTATGTCTCCTGGT
 ATCAACATCACCCAGGCAAAGCCCCCAAATCATGATTTATGGTGTCCGTAATC
 GGCCCTCAGGGGTTTCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCT

CCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCT
 CATATAACAAGCAGCAGCACTCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC
 CTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCGTCCTCTGCG
 GCCGCAGGTTCTGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGATCTATCCCATCATCA
 CCATCATCATTAG

NcoI und Amber-Stoppcodon = unterstrichen; YOL-Epitop in rot,

Tabelle 8.2-4 DNA-Sequenz scFv SH1327-C10 in in pHAL30, NcoI bis Amber-Stoppcodon

GCCATGGCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTC
 GGGGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAA
 CTGGTGGAGTTGGGTCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGG
 AAATCTATCATAGTGGGAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTC
 ACCATATCAGTAGACAAGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTG
 ACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCCCCAGCGGAAGGGTA
 CCAGCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGGAGTGC
 ATCCGCCCAAAGCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTATCCTATGT
 GCTGACACAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT
 CTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAACTGGTACCAGC
 AGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCT
 CAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG
 CCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGG
 ATGACAGCCTGAATGGTCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
 GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCGTCCTCTGCGGCC
 GCAGGTTCTGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGATCTATCCCATCATCACCAT
 CATCATTAG

NcoI und Amber-Stoppcodon = unterstrichen; YOL-Epitop in rot,

Tabelle 8.2-5 DNA-Sequenz pQE_TMV als Beispiel für die Klonierung in pQE_30, 6xHis bis *HindIII*

CATCACCATCACCATCACGGATCCATGTCTTATAGTATCACTACTCCATCTCAGT
 TCGTGTCTTGTTCATCAGCGTGGGCCGATCCAATAGAGTTAATTAATTTATGTA
 CTAATGCCTTAGGAAATCAGTTTCAAACACAACAAGCTCGAACTGTCGTTCAA
 GACAATTCAGTGAGGTGTGGAAACCTTCACCACAAGTAACTGTTAGGTTCCCTG
 ACAGTGACTTTAAGGTGTACAGGTACAATGCGGTATTAGACCCGCTAGTCACA
 GCACTGTTAGGTGCATTTGACACTAGAAATAGAATAATAGAAGTTGAAAATCA
 GGCGAACCCACGACTGCCGAAACGTTAGATGCTACTCGTAGAGTAGACGACG
 CAACGGTGGCCATAAGGAGCGCGATAAATAATTTAATAGTAGAATTGATCAGA
 GGAACCGGATCTTACAATCGGAGCTCTTTCGAGAGCTCTTCTGGTTTGGTTTGG
 ACCTCTAGTCCTGCAACTTGATGAAAGCTT

6xHis und *HindIII* = unterstrichen; TMV-CP = grau unterlegt.

Tabelle 8.2-6 DNA-Sequenz pRSET A_CP_TMV als Beispiel für die Klonierung in pRSET A, 6xHis bis *HindIII*

CATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGT
 CGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCGATGGGGATCCATGTCTTATAG
 TACTACTCCATCTCAGTTCGTGTCTTGTTCATCAGCGTGGGCCGATCCAATA
 GAGTTAATTAATTTATGTAATAATGCCTTAGGAAATCAGTTTCAAACACAACA
 GCTCGAACTGTCGTTCAAAGACAATTCAGTGAGGTGTGGAAACCTTCACCACA
 AGTAACTGTTAGGTTCCCTGACAGTGACTTTAAGGTGTACAGGTACAATGCGGT
 ATTAGACCCGCTAGTCACAGCACTGTTAGGTGCATTTGACACTAGAAATAGAAT
 AATAGAAGTTGAAAATCAGGCGAACCCACGACTGCCGAAACGTTAGATGCTA
 CTCGTAGAGTAGACGACGCAACGGTGGCCATAAGGAGCGCGATAAATAATTTA
 ATAGTAGAATTGATCAGAGGAACCGGATCTTACAATCGGAGCTCTTTCGAGAG
 CTCTTCTGGTTTGGTTTGGACCTCTAGTCCTGCAACTTGATGAAAGCTT

6xHis und *HindIII* = unterstrichen; TMV-CP = grau unterlegt.

Tabelle 8.2-7 DNA-Sequenz pHALscFvCMV inklusive pelB-Leader, pelB-Leader bis Amber-Stoppodon, nach der Codon-Optimierung

ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAG
CCGGCCATGGCCCAGGTTAAACTGCAGCAGTCTGGTACCGAAGTTGTAAACC
GGGTGCTTCTGTAAACTGTCTTGCAAAGCTTCTGGTTACATCTTCACCTCTTAC
GACATCGACTGGGTTTCGTCAGACCCCGGAACAGGGTCTGGAATGGATCGGTTG
GATCTTCCCGGGTGAAGGTTCTACCGAATACAACGAAAAATTCAAAGGTCGTG
CTACCCTGTCTGTTGACAAATCTTCTTCTACCGCTTACATGGAAGTACCCGTCT
GACCTCTGAAGACTCTGCTGTTTACTTCTGCGCTCGTGGTGACTACTACCGTCGT
TACTTCGACCTGTGGGGTCAGGGTACCACCGTTACCGTTTCTTCTTCAGGGAGT
GCATCCGCCCCAAAGCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGACATCGA
ACTGACCCAGTCTCCGGCTATCATGTCTGCTTCTCCGGGTGAACGTGTTACCAT
GACCTGCTCTGCTTCTTCTTCTATCCGTTACATCTACTGGTACCAGCAGAAACCG
GGTTCTTCTCCGCGTCTGCTGATCTACGACACCTCTAACGTTGCTCCGGGTGTTT
CGTTCCGTTTCTCTGGTTCTGGTTTCTGGGGTCCGTCTTACTTCTGACCATCAA
CCGTATGGAAGCTGAAGACGCTGCTACCTACTACTGCCAGGAATGGTCTGGTTA
CCCGTACACCTTCGGTGGTGGTACCAAACCTGGAAGTCAAACGTGCTGCTGCTCA
TCATCACCATCATCATTAG

pelB-Leader und Amber-Stoppodon = unterstrichen, YOL-Epitop in rot.

Tabelle 8.2-8 DNA-Sequenz pHALscFv17-3A inklusive pelB-Leader, pelB-Leader bis Amber-Stoppodon, nach der Codon-Optimierung

ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAG
CCGGCCATGGCCGACGTTTCAGCTGCAGGAATCTGGTCCGGGTCTGGTTAAACCG
TCTCAGTCTCTGTCTCTGACCTGCACCGTTACCGGTTACTCTGTTACCTCTGAAT
ACGCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTTCCCGGGTAACAACTGGAATGGCTGGGT
TACATCAACTACTCTGGTTCTACCTCTTACAACCCGTCTCTGAAATCTCGTATCT
CTATCACCCGTGACACCTCTAAAAACCAGTTCTTCCTGCAGCTGAACTCTGTTA
CCACCGAAGACACCGCTACCTACTACTGCGCTGACCGTTCTTGGTTCGCTTACT
GGGGTCAGGGTACCCTGGTTACCGTTTCTGCTTCAGGGAGTGCATCCGCCCCAA
AGCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGC GACGTTCTGATGACCCAGACC
CCGCTGTCTCTGACCGTTTCTCTGGGTGACCAGGTTTCTATCTCTTGCCGTTCTT
CTCAGTCTATCGAACACTCTAACGGTAACACCTACCTGGAATGGTACCTGCAGA
AACCGGGTCAGTCTCCGAAACTGCTGATCTACAAAGTTTCTAACCGTTTCTCTG
GTGTTCCGGACCGTTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGTACCGACTTCACCCTGAAAAT
CTCTCGTGTTGAAGCTGAAGACCTGGGTGTTTACTACTGCTTCCAGGGTTCTCA
CGTTCCGCCGACCTTCGGTGCTGGTACCAAACCTGGAACCTGAAACATCATCACCA
TCATCATTAG

pelB-Leader und Amber-Stoppodon = unterstrichen; YOL-Epitop in rot.

Tabelle 8.2-9 DNA-Sequenz M13K07CbMV_C10 als Beispiel für die Klonierung einer scFv-Sequenz aus pHAL30 in den M13K07 Hintergrund mit zusätzlichem pelB-Leader, pelB-Leader bis Anfang pIII

ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAG
CCGGCCATGGCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCC
TTCGGGGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAG
TAACTGGTGGAGTTGGGTCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTG
GGGAAATCTATCATAGTGGGAGCACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGA
GTCACCATATCAGTAGACAAGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCT
GTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCCCCAGCGGAAGG
GTACCAGCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGGA
GTGCATCCGCCCAAAGCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTATCCT
ATGTGCTGACACAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACC
ATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAACTGGTAC
CAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTC
CCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGC
ATGGGATGACAGCCTGAATGGTCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCG
TCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCGTCTCTG
CGGCCGCAGGTTCTGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGATCTATCCCATCAT
CACCATCATCATTAGGGATCCAAAGATATCAGAGCTGAAACTGTTGAA

pelB-Leader und Anfang pIII = unterstrichen; scFv bis Amberstoppcodon = grau unterlegt;

YOL-Epitop in rot.

8.3 ELISA Rohdaten

Tabelle 8.3-1 ELISA Rohdaten zu den Abbildungen 3.1-4/3.1-5/3.2-2 und 3.2-4

Abbildung 3.1-4	Infizierte Pflanze		Gesunde Pflanze	
CMV PV-0506	4,08	4,622	0,134	0,139
PPV Bul PV-0212	3,536	4,166	0,13	0,099
PVY N605	4,412	4,328	0,123	0,185
TSWV (12)	1,307	1,282	0,102	0,103
Abbildung 3.1-5	Infizierte Pflanze		Gesunde Pflanze	
TMV Vulgare PV-0107	2,201	2,114	0,102	0,109
CbMV	0,6224	0,5777	0,0897	0,1125
Abbildung 3.2-2	Spezifischer AK		Negativkontrolle	
TMV_CP	0,266	0,331	0,171	0,14
CMV_CP	0,956	0,946	0,109	0,101
PPV_CP	1,042	1,047	0,077	0,081
TSWV_CP	0,255	0,21	0,102	0,109
Abbildung 3.2-4	Spezifischer AK		Negativkontrolle	
TMV CP	0,1225	0,1324	0,0669	0,0689
CMV CP	1,007	1,1254	0,0663	0,0718
PVY CP	5,3174	5,2594	0,0838	0,0963

Tabelle 8.3-2 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-1 A und B

Abbildung 3.4-1 A	Phagen (10er Mix)	
CMV-CP (50 µg/ml)	1,041	1,031
CMV infiziertes Pflanzenmaterial	0,86	0,885
Negativkontrolle ohne CMV	0,853	0,912
Abbildung 3.4-1 B	Phagen (10er Mix)	
CMV-CP (50 µg/ml)	1	1,013
Negativkontrolle ohne CMV	1,026	1,011

Tabelle 8.3-3 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-2

Abbildung 3.4-2	Ph.D.TM-12 Phagen (12er Mix)		Ph.D.TM-C7C Phagen (12er Mix)	
TMV <i>Ohio V</i> (100 µg/ml)	0,319	0,514	0,099	0,128
Negativkontrolle ohne TMV	0,201	0,431	0,24	0,227

Tabelle 8.3-4 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-3 A und B

Abbildung 3.4-3 A	K4 Phage			
Streptavidin (100 µg/ml)	0,271		0,236	
Negativkontrolle	0,305		0,197	
Abbildung 3.4-3 B	K4 Phage		M13K07 (Kontrollphage)	
Streptavidin (100 µg/ml)	1,146	1,212	0,063	0,065
Negativkontrolle	0,049	0,085	0,05	0,048

Tabelle 8.3-5 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-4

Abbildung 3.4-4	Phagensuspension aus Phage 1/3/5			M13K07 (Kontrollphage)		
TMV <i>Ohio</i> V (100 µg/ml)	0,99	0,981	0,985	0,063	0,074	0,068
Negativkontrolle	0,113	0,118	0,135	0,09	0,079	0,103

Tabelle 8.3-6 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-5

Abbildung 3.4-5	Phagensuspension aus Phage 1/3/5		
TMV <i>Ohio</i> V (100 µg/ml)	1,363	1,361	1,364
TMV <i>Ohio</i> V infiziertes Pflanzenmaterial	1,26	1,265	1,275
Gesundes Pflanzenmaterial	1,258	1,261	1,266
Negativkontrolle	0,054	0,045	0,03

Tabelle 8.3-7 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-6

Abbildung 3.4-6	CP (50 µg/ml)		Negativkontrolle		CP (50 µg/ml)	Negativkontrolle
PPV 7, 1	0,085	0,067	PVY 7, 2	0,166	0,065	
PPV 7, 2	0,091	0,07	PVY 7, 3	0,162	0,071	
PPV 7, 3	0,081	0,072	PVY 7, 4	0,619	0,065	
PPV 7, 4	0,094	0,068	PVY 7, 5	0,24	0,079	
PPV 7, 5	0,168	0,091	PVY 7, 6	0,311	0,076	
PPV 7, 6	0,194	0,094	PVY 7, 7	0,433	0,076	
PPV 7, 7	0,083	0,093	PVY 7, 8	0,253	0,074	
PPV 7, 8	0,119	0,087	PVY 7, 9	0,242	0,088	
PPV 7, 9	0,109	0,092	PVY 7, 10	0,456	0,094	
PPV 7, 10	0,097	0,108	PVY 12, 1	0,591	0,064	
PPV 12, 1	0,083	0,055	PVY 12, 2	0,456	0,067	
PPV 12, 2	0,092	0,062	PVY 12, 3	0,439	0,067	
PPV 12, 3	0,096	0,053	PVY 12, 4	0,612	0,062	
PPV 12, 4	0,079	0,055	PVY 12, 5	0,701	0,067	
PPV 12, 5	0,133	0,061	PVY 12, 6	0,096	0,061	
PPV 12, 6	0,968	0,072	PVY 12, 7	0,349	0,059	
PPV 12, 7	0,597	0,06	PVY 12, 8	1	0,088	
PPV 12, 8	0,722	0,066	PVY 12, 9	0,337	0,093	
PPV 12, 9	0,132	0,072	PVY 12, 10	0,293	0,074	
PPV 12, 10	0,417	0,071	TMV 12, 5	1,275	0,105	
PVY 7, 1	0,183	0,064				

Tabelle 8.3-8 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-7

Abbildung 3.4-7	CP (50 µg/ml)	Negativkontrolle		CP (50 µg/ml)	Negativkontrolle
TMV 7, 1	0,11	0,054	TSWV 7, 2	0,125	0,045
TMV 7, 2	1,32	0	TSWV 7, 3	0,215	0,055
TMV 7, 3	1,34	0	TSWV 7, 4	0,072	0,051
TMV 7, 4	0,13	0,062	TSWV 7, 5	0,145	0,062
TMV 7, 5	0,12	0,055	TSWV 7, 6	0,121	0,056
TMV 7, 6	0,13	0	TSWV 7, 7	0,116	0,064
TMV 7, 7	0,14	0,073	TSWV 7, 8	0,075	0,065
TMV 7, 8	1,26	0,074	TSWV 7, 9	0,061	0,055
TMV 7, 9	0,12	0,073	TSWV 7, 10	0,136	0,057
TMV 7, 10	1,25	0,087	TSWV 12, 1	0,474	0,057
TMV 12, 1	0,119	0,046	TSWV 12, 2	0,462	0,051
TMV 12, 2	0,197	0,071	TSWV 12, 3	0	0
TMV 12, 3	0,157	0	TSWV 12, 4	0,562	0,065
TMV 12, 4	0,404	0,054	TSWV 12, 5	0,336	0,06
TMV 12, 5	0,558	0,058	TSWV 12, 6	0,472	0,068
TMV 12, 6	0,354	0,076	TSWV 12, 7	0,4	0
TMV 12, 7	0,456	0,074	TSWV 12, 8	0,084	0,055
TMV 12, 8	0,531	0,063	TSWV 12, 9	0,416	0,071
TMV 12, 9	0,128	0,067	TSWV 12, 10	0,234	0,071
TMV 12, 10	0,253	0,073			
TSWV 7, 1	0,083	0,051			

Tabelle 8.3-9 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-8

Abbildung 3.4-8	TMV Ohio V (50 µg/ml)	Negativkontrolle		TMV Ohio V (50 µg/ml)	Negativkontrolle
TMV 12, I	0,591	0,059	TMV 7, I	0	0,05
TMV 12, II	0,352	0,055	TMV 7, II	0	0,049
TMV 12, III	0,465	0,05	TMV 7, III	0,054	0,052
TMV 12, IV	0,317	0,051	TMV 7, IV	0,061	0,179
TMV 12, V	0,83	0,051	TMV 7, V	0,399	0,092
TMV 12, VI	0,997	0,053	TMV 7, VI	0	0
TMV 12, VII	1	0,051	TMV 7, VII	0,055	0,049
TMV 12, VIII	1	0,055	TMV 7, VIII	0,053	0,158
TMV 12, IX	0,349	0,099	TMV 7, IX	0	0,079
TMV 12, X	0,272	0,055	TMV 7, X	0,03	0,031
TMV 12, XI	0,449	0,056	TMV 7, XI	0	0,049
TMV 12, XII	1	0,057	TMV 7, XII	0	0,054
TMV 12, XIII	0,44	0,052	TMV 7, XIII	0,055	0,058
TMV 12, XIV	0,214	0,053			
TMV 12, XV	1	0,058			
TMV 12, XVI	0,399	0,057			

Tabelle 8.3-10 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-9

Abbildung 3.4-9	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>Xanthi</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Kontrolle
M13K07 TMVC1	1,47	1,37	1,56	1,50	0,32	0,07
M13K07 TMV2	0,83	0,34	0,51	0,07	0,08	0,06
M13K07	0,07	0,24	0,08	0,07	0,07	0,06

Tabelle 8.3-11 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-10

Abbildung 3.4-10	Streptavidin (83 µg/ml)		Gesundes Pflanzenmaterial + Streptavidin (83 µg/ml)			
K4-Phage	0,3844	0,52	0,056	0,0571	0,0568	0,0577

Tabelle 8.3-12 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.4-11

Abbildung 3.4-11	TMV <i>Ohio V</i> aufgereinigt	TMV <i>Vulgare</i> aufgereinigt	Gesunde Pflanze aufgereinigt			
M13K07 TMVC1	1,222	1,216	1,386	1,369	1,051	1,021
TMV Ph.D. TM -12, VI	0,063	0,062	0,055	0,055	0,05	0,053
TMV Ph.D. TM -12, XV	0,516	0,545	0,425	0,452	0,19	0,194

Tabelle 8.3-13 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.5.1

Abbildung 3.5-1	TMV <i>Ohio V</i> (100 µg/ml)	TMV CP <i>Vulgare</i> (50 µg/ml)	Gesundes Pflanzenmaterial	Blockkontrolle
TMV_Ohio V_1_i	0,0832	0,062	0,06	0,05
TMV_Ohio V_2_i	0,089	0,059	0,06	0,06
TMV_Ohio V_3_i	0,0847	0,0609	0,06	0,07
TMV_Ohio V_4_i	0,094	0,062	0,06	0,07
TMV_Ohio V_5_i	0,08	0,0641	0,06	0,06
TMV_Ohio V_6_i	0,094	0,062	0,05	0,06
TMV_Ohio V_7_i	0,08	0,0581	0,05	0,05
TMV_CP_1_J	0,1	0,6081	0,07	0,05
TMV_CP_2_J	0,1	0,0951	0,06	0,05
TMV_CP_3_J	0,098	0,2235	0,08	0,06

Tabelle 8.3-14 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.5.2

Abbildung 3.5-2	TMV <i>Ohio V</i> (100 µg/ml)	TMV CP <i>Vulgare</i> (50 µg/ml)	Gesundes Pflanzenmaterial
TMV_Ohio V_1_J	0,13		0,089
TMV_Ohio V_2_J	0,23		0,09
TMV_Ohio V_3_J	0,2		0,08
TMV_Ohio V_4_J	0,34		0,12
TMV_Ohio V_5_J	0,133		0,06
TMV_Ohio V_6_J	0,132		0,06
TMV_Ohio V_7_J	0,133		0,07
TMV_Ohio V_8_J	0,126		0,07
TMV_Ohio V_9_J	0,152		0,07
TMV_Ohio V_10_J	0,155		0,14
TMV_CP_4_J		0,3	0,23
TMV_CP_5_J		0,21	0,1
TMV_CP_6_J		0,1	0,11
TMV_CP_1_i		0,12	0,06
TMV_CP_2_i		0,1	0,06
TMV_CP_3_i		0,1	0,07
TMV_CP_4_i		0,09	0,06
TMV_CP_5_i		0,11	0,07
TMV_CP_6_i		0,14	0,06
TMV_CP_7_i		0,11	0,08

Tabelle 8.3-15 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.5.3

Abbildung 3.5-3	TMV <i>Ohio V</i> (100 µg/ml)		TMV CP <i>Vulgare</i> (50 µg/ml)		Gesundes Pflanzenmaterial	
TMV_CP_1_J			1,19	1,2	0,19	0,18
TMV_CP_5_J			0,6085	0,6057	0,5027	0,5157
TMV_CP_1_i			0,0766	0,0763	0,0893	0,0637
TMV_CP_5_i			0,0616	0,0575	0,0637	0,053
TMV_CP_6_i			0,0673	0,0894	0,0853	0,0855
TMV_Ohio V_1_J	0,1109	0,1026			0,0673	0,0564
TMV_Ohio V_2_J	0,1051	0,101			0,1159	0,1155
TMV_Ohio V_4_J	0,1216	0,139			0,3392	0,3511

Tabelle 8.3-16 ELISA Rohdaten zur Abbildung 3.5.4

Abbildung 3.5-4	TMV_CP <i>Vulgare</i> (50 µg/ml)		Aufgereinigtes TMV <i>Vulgare</i>		Gesundes Pflanzenmaterial	
TMV_CP_1_J	0,2954	0,3115	0,1388	0,1237	0,1388	0,1237

Tabelle 8.3-17 ELISA Rohdaten zu den Abbildungen 3.6-1 – 3.6-3

	Capture Ak + PPV (PV-0212) infiziertes P.	Capture Ak + nicht infiziertes P.	Capture Ak + PVY (N605) infiziertes P.	Capture Ak + nicht Infiziertes P.	Capture Ak + CMV (PV-0506) infiziertes P.	Capture Ak + nicht infiziertes P.
A1	0,05	0,05	0,03	0,034	0,04	0,042
A2	0,048	0	0,035	0,034	0,482	0,495
A3	0,046	0,049	0,034	0,03	0,023	0,023
A4	0,045	0,047	0,031	0,032	0,022	0,021
A5	0,046	0,048	0,033	0,032	0,02	0,021
A6	0,04	0,044	0,032	0,03	0,024	0,025
A7	0,128	0,146	0,026	0,043	0,012	0,017
A8	0,041	0,043	0,03	0,036	0,02	0,024
A9	0,036	0,039	0,06	0,031	0,013	0,016
A10	0,042	0,041	0,028	0,027	0,053	0,079
A11	0,04	0,031	0,025	0,026	0,012	0,017
A12	0,039	0,033	0,026	0,029	0,009	0,015
B1	0,074	0,084	0,051	0,046	0,024	0,024
B2	0,047	0,043	0,037	0,039	0,022	0,024
B3	0,092	0,087	0,033	0,032	0,024	0,027
B4	0,043	0,042	0,035	0,033	0,023	0,03
B5	0,233	0,159	0,034	0,033	0,022	0,026
B6	0,071	0,078	0,034	0,033	0,041	0,072
B7	0,042	0,04	0,033	0,039	0,022	0,022
B8	0,059	0,059	0,032	0,041	0,025	0,025
B9	0,04	0,038	0,054	0,027	0,017	0,02
B10	0,042	0,04	0,029	0,031	0,017	0,019
B11	0,041	0,036	0,028	0,026	0,028	0,026
B12	0,038	0,032	0,028	0,032	0,064	0,103
C1	0,049	0,043	0,075	0,034	0,023	0,02
C2	0,073	0,058	0,034	0,038	0,066	0,075
C3	0,048	0,049	0,034	0,011	0,02	0,02
C4	0,047	0,048	0,035	0,034	0,024	0,026
C5	0,195	0,151	0,033	0,031	0,022	0,023
C6	0,044	0,045	0,041	0,039	0,022	0,024
C7	0,042	0,041	0,028	0,037	0,021	0,019
C8	0,045	0,045	0,029	0,038	0,022	0,02
C9	0,049	0,046	0,052	0,033	0,021	0,019
C10	0,043	0,039	0,03	0,03	0,017	0,014
C11	0,048	0,044	0,027	0,022	0,029	0,04
C12	0,037	0,03	0,027	0,028	0,009	0,007
D1	0,046	0,047	0,035	0,034	0,028	0,032
D2	0,112	0,085	0,04	0,039	0,023	0,025
D3	0,046	0,049	0,036	0,034	0,024	0,028
D4	0,054	0,052	0,034	0,033	0,035	0,045
D5	0,052	0,051	0,034	0,033	0,022	0,023

D6	0,08	0,078	0,038	0,036	0,021	0,02
D7	0,047	0,047	0,029	0,043	0,019	0,018
D8	0,05	0,048	0,035	0,043	0,025	0,02
D9	0,057	0,051	0,057	0,033	0,023	0,018
D10	0,047	0,039	0,03	0,029	0,018	0,015
D11	0,048	0,042	0,036	0,03	0,015	0,013
D12	0,042	0,036	0,028	0,03	0,012	0,012
E1	0,045	0,041	0,037	0,032	0,023	0,02
E2	0,062	0,037	0,049	0,044	0,064	0,071
E3	0,07	0,056	0,035	0,004	0,022	0,022
E4	0,072	0,059	0,037	0,034	0,15	0,229
E5	0,049	0,05	0,036	0,034	0,019	0,019
E6	0,046	0,048	0,04	0,035	0,022	0,022
E7	0,045	0,043	0,03	0,039	0,017	0,017
E8	0,043	0,045	0,034	0,039	0,021	0,019
E9	0,044	0,043	0,05	0,032	0,019	0,015
E10	0,044	0,043	0,032	0,027	0,02	0,016
E11	0,139	0,143	0,029	0,027	0,016	0,013
E12	0,044	0,039	0,085	0,033	0,055	0,078
F1	0,044	0,046	0,038	0,033	0,042	0,045
F2	0,049	0,051	0,036	0,034	0,018	0,018
F3	0,055	0,056	0,035	0,028	0,019	0,02
F4	0,046	0,053	0,036	0,035	0,021	0,02
F5	0,044	0,054	0,037	0,033	0,019	0,019
F6	0,053	0,062	0,038	0,035	0,024	0,023
F7	0,053	0,05	0,03	0,03	0,018	0,015
F8	0,106	0,16	0,036	0,031	0,025	0,031
F9	0,043	0,046	0,057	0,031	0,018	0,019
F10	0,038	0,041	0,03	0,03	0,017	0,015
F11	0,043	0,043	0,034	0,026	0,014	0,013
F12	0,038	0,038	0,041	0,041	0,019	0,021
G1	0,047	0,041	0,036	0,035	0,024	0,021
G2	0,069	0,057	0,041	0,041	0,026	0,023
G3	0,053	0,053	0,036	0,03	0,023	0,02
G4	0,132	0,153	0,038	0,037	0,049	0,067
G5	0,046	0,054	0,034	0,034	0,022	0,024
G6	0,056	0,062	0,034	0,034	0,024	0,022
G7	0,046	0,05	0,032	0,047	0,016	0,017
G8	0,082	0,093	0,056	0,039	0,025	0,023
G9	0,049	0,047	0,058	0,032	0,042	0,056
G10	0,047	0,043	0,034	0,026	0,017	0,014
G11	0,323	0,235	0,029	0,023	0,012	0,009
G12	0,036	0,029	0,029	0,025	0,011	0,009
H1	0,061	0,04	0,032	0,035	0,028	0,026
H2	0,07	0,046	0,034	0,033	0,019	0,018

H3	0,072	0,042	0,034	-0,012	0,02	0,02
H4	0,069	0,044	0,035	0,035	0,019	0,021
H5	0,084	0,054	0,034	0,035	0,019	0,021
H6	0,075	0,049	0,036	0,037	0,02	0,021
H7	0,054	0,039	0,021	0,038	0,016	0,016
H8	0,057	0,041	0,037	0,034	0,03	0,02
H9	1,575	1,51	1,435	1,07	1,071	1,559
H10	0,065	0,042	0,031	0,024	0,02	0,014
H11	0,094	0,064	0,031	0,025	0,015	0,012
H12	1,397	1,379	1,632	1,219	1,544	1,549

P. = Pflanzenmaterial

Tabelle 8.3-18 ELISA Rohdaten zu den Abbildungen 3.6-4 – 3.6-6

	Capture Ak + TMV (PV-0107) infiziertes P.	Capture Ak + nicht infiziertes P.	Capture Ak + TSWV (12) infiziertes P.	Capture Ak + nicht infiziertes P.	Capture Ak + CbMV infiziertes P.	Capture Ak + nicht infiziertes P.
A1	0,02	0	0,027	0,026	0,158	0,025
A2	0,20	0,162	0,025	0,025	0,024	0,022
A3	0,02	0,02	0,026	0,023	0,139	0,099
A4	0,02	0,028	0,026	0,026	0,036	0,024
A5	0,019	0,026	0,026	0,027	0,163	0,031
A6	0,04	0,033	0,034	0,037	0,159	0,039
A7	0,014	0,02	0,017	0,019	0,026	0,018
A8	0,019	0,025	0,022	0,022	0,027	0,019
A9	0,018	0,017	0,017	0,018	0,067	0,017
A10	0,277	0,268	0,066	0,075	0,484	0,017
A11	0,013	0,014	0,067	0,064	0,015	0,013
A12	0,01	0,012	0,011	0,013	0,011	0,011
B1	0,025	0,024	0,031	0,025	0,021	0,021
B2	0,025	0,023	0,026	0,021	0,272	0,289
B3	0,025	0,028	0,029	0,028	0,085	0,068
B4	0,047	0,039	0,026	0,024	0,092	0,071
B5	0,062	0,056	0,029	0,028	0,159	0,121
B6	0,058	0,055	0,042	0,053	0,142	0,035
B7	0,02	0,021	0,037	0,039	0,13	0,075
B8	0,023	0,023	0,023	0,023	0,045	0,021
B9	0,017	0,021	0,022	0,023	0,047	0,041
B10	0,716	0,633	0,018	0,02	0,016	0,015
B11	0,056	0,058	0,741	0,711	0,126	0,03
B12	0,011	0,013	0,065	0,061	0,137	0,025
C1	0,022	0,025	0,027	0,025	0,394	0,467
C2	0,023	0,028	0,028	0,023	0,115	0,026
C3	0,02	0,023	0,027	0,023	0,486	0,023
C4	0,024	0,027	0,896	0,721	0,451	0,44

C5	0,022	0,028	0,025	0,023	0,113	0,032
C6	0,022	0,03	0,026	0,025	0,149	0,031
C7	0,02	0,026	0,751	0,836	0,07	0,053
C8	0,022	0,025	0,034	0,022	0,098	0,063
C9	0,066	0,05	0,024	0,022	0,264	0,019
C10	0,451	0,352	0,017	0,017	0,251	0,02
C11	0,048	0,039	0,024	0,028	0,183	0,167
C12	0,03	0,028	0,012	0,013	0,123	0,105
D1	0,025	0,025	0,07	0,065	0,382	0,024
D2	0,023	0,026	0,025	0,026	0,117	0,024
D3	0,022	0,029	0,023	0,026	0,021	0,02
D4	0,023	0,028	0,027	0,025	0,157	0,025
D5	1,11	1,086	0,072	0,071	0,115	0,027
D6	0,023	0,024	0,027	0,025	0,112	0,089
D7	0,022	0,024	0,023	0,027	0,106	0,029
D8	0,022	0,027	0,04	0,044	0,022	0,02
D9	0,028	0,031	0,021	0,022	0,079	0,03
D10	0,019	0,023	0,77	0,807	0,403	0,265
D11	0,038	0,035	0,051	0,058	0,08	0,08
D12	0,012	0,01	0,28	0,242	0,444	0,653
E1	0,023	0,024	0,853	0,909	0,1	0,027
E2	0,023	0,023	0,029	0,026	0,026	0,025
E3	0,024	0,026	0,025	0,029	0,025	0,024
E4	0,024	0,027	0,023	0,027	0,132	0,061
E5	0,03	0,031	0,024	0,027	0,307	0,024
E6	1,893	1,834	0,05	0,058	0,126	0,035
E7	0,018	0,019	0,018	0,022	0,026	0,019
E8	0,026	0,024	0,023	0,023	0,122	0,107
E9	0,021	0,017	0,033	0,031	0,031	0,017
E10	0,02	0,018	0,41	0,277	0,115	0,021
E11	0,019	0,016	0,028	0,031	0,381	0,12
E12	0,57	0,525	0,015	0,014	0,125	0,087
F1	1,111	1	0,025	0,026	0,022	0,026
F2	0,024	0,025	0,022	0,025	0,131	0,032
F3	0,039	0,038	0,022	0,027	0,107	0,032
F4	0,023	0,027	0,158	0,129	0,125	0,036
F5	0,022	0,027	0,027	0,032	0,173	0,134
F6	0,135	0,092	0,034	0,037	0,495	0,023
F7	0,019	0,018	0,02	0,024	0,261	0,283
F8	0,057	0,051	0,79	0,84	0,121	0,035
F9	0,022	0,026	0,125	0,133	0,029	0,019
F10	0,026	0,027	0,018	0,015	0,113	0,021
F11	0,035	0,032	0,018	0,018	0,04	0,04
F12	0,015	0,012	0,033	0,033	0,087	0,126
G1	0,024	0,027	0,027	0,025	0,06	0,026

G2	0,022	0,03	0,222	0,294	0,086	0,032
G3	0,023	0,029	0,023	0,032	0,115	0,103
G4	0,024	0,028	0,294	0,408	0,112	0,035
G5	0,026	0,024	0,029	0,03	0,181	0,028
G6	0,023	0,026	0,088	0,095	0,17	0,126
G7	0,018	0,019	0,028	0,035	0,132	0,026
G8	0,034	0,031	0,023	0,027	0,151	0,03
G9	0,017	0,018	0,018	0,022	0,14	0,126
G10	0,015	0,017	0,03	0,032	0,042	0,021
G11	0,015	0,015	0,054	0,052	0,089	0,069
G12	0,012	0,006	0,011	0,009	0,129	0,053
H1	0,031	0,03	0,066	0,04	0,101	0,03
H2	0,021	0,022	0,024	0,023	0,117	0,093
H3	0,021	0,024	0,025	0,024	0,022	0,023
H4	1,592	1,5	0,893	0,821	0,028	0,029
H5	0,022	0,027	0,026	0,026	0,031	0,034
H6	0,024	0,025	0,025	0,029	0,026	0,022
H7	0,019	0,019	0,027	0,03	0,048	0,041
H8	0,027	0,027	0,022	0,024	0,115	0,314
H9	1,539	1,421	1,755	1,629	1,476	1,462
H10	0,018	0,017	0,018	0,012	0,131	0,031
H11	0,017	0,013	0,138	0,169	0,047	0,043
H12	1,667	1,617	1,734	1,617	1,627	1,462

P.=Pflanzenmaterial

Tabelle 8.3-19 ELISA Rohdaten zu den Abbildungen 3.6-7 und 3.6-8

	Capture Ak + TMV (PV-0107) infiziertes P.	Capture Ak + nicht infiziertes P.	Capture Ak + PVY (N605) infiziertes P.	Capture Ak + nicht infiziertes P.
A1	0,008	0,007	0,02	0,043
A2	0,008	0,007	0,017	0,027
A3	0,008	0,008	0,023	0,031
A4	0,009	0,01	0,022	0,03
A5	0,799	0,798	0,872	0,805
A6	0,435	0,434	0,026	0,028
A7	0,006	0,003	0,192	0,236
A8	0,009	0,007	0,022	0,025
A9	0,006	0,003	0,913	0,714
A10	0,004	0,002	0,014	0,021
A11	0,003	0,001	0,015	0,027
A12	0,003	-0,001	0,004	0,015
B1	0,011	0,01	0,021	0,027
B2	0,01	0,009	0,016	0,029
B3	0,42	0,42	0,025	0,027

B4	0,008	0,008	0,017	0,024
B5	0,012	0,012	0,022	0,032
B6	0,228	0,227	0,144	0,166
B7	0,005	0,004	0,018	0,03
B8	0,007	0,006	0,2	0,196
B9	0,008	0,007	0,015	0,023
B10	0,22	0,218	0,016	0,023
B11	0,004	0,003	0,017	0,021
B12	0,001	-0,004	0,001	0,017
C1	0,012	0,011	0,022	0,026
C2	0,007	0,005	0,017	0,027
C3	0,009	0,009	0,02	0,035
C4	0,48	0,479	0,421	0,396
C5	0,507	0,508	0,048	0,064
C6	0,009	0,008	0,019	0,035
C7	0,006	0,005	0,026	0,034
C8	0,007	0,006	0,33	0,313
C9	0,009	0,006	0,022	0,024
C10	0,346	0,346	0,015	0,023
C11	0,373	0,371	0,485	0,394
C12	0,001	-0,005	-0,003	0,009
D1	0,838	0,836	0,025	0,028
D2	0,007	0,005	0,018	0,026
D3	0,392	0,392	0,896	0,677
D4	0,008	0,008	0,048	0,068
D5	0,01	0,01	0,024	0,034
D6	0,009	0,008	0,022	0,028
D7	0,015	0,014	0,019	0,028
D8	0,49	0,488	0,021	0,028
D9	0,361	0,358	0,012	0,018
D10	0,341	0,338	0,012	0,019
D11	0,005	0,001	0,013	0,02
D12	0,002	-0,004	0,809	0,758
E1	0,009	0,009	0,869	0,791
E2	0,008	0,007	0,021	0,027
E3	0,872	0,873	0,207	0,131
E4	0,16	0,16	0,022	0,032
E5	0,008	0,007	0,022	0,032
E6	0,031	0,03	0,028	0,034
E7	0,007	0,004	0,019	0,026
E8	0,153	0,152	0,02	0,024
E9	0,006	0,003	1	0,822
E10	0,318	0,316	0,337	0,292
E11	0,063	0,06	0,439	0,41
E12	0,164	0,16	0	0,013

F1	0,008	0,007	0,024	0,028
F2	0,008	0,007	0,486	0,372
F3	0,008	0,007	0,252	0,322
F4	0,171	0,172	0,021	0,028
F5	0,009	0,008	0,432	0,23
F6	0,384	0,385	0,209	0,199
F7	0,004	0,003	0,168	0,174
F8	0,802	0,8	0,012	0,029
F9	0,008	0,006	0,032	0,049
F10	0,005	0,003	0,014	0,019
F11	0,005	0,002	0,01	0,019
F12	0,002	-0,003	0,006	0,013
G1	0,008	0,006	0,022	0,029
G2	0,006	0,005	0,018	0,024
G3	0,008	0,007	0,021	0,029
G4	0,338	0,34	0,012	0,027
G5	0,368	0,37	0,867	0,738
G6	0,005	0,003	0,407	0,372
G7	0,005	0,002	0,015	0,021
G8	0,007	0,005	0,013	0,024
G9	0,005	0	0,013	0,016
G10	0,379	0,374	0,011	0,019
G11	0,001	-0,004	0,013	0,013
G12	-0,003	-0,01	0	0,012
H1	0,586	0,587	0,445	0,515
H2	0,007	0,007	0,021	0,023
H3	0,006	0,006	0,024	0,025
H4	0,008	0,008	0,016	0,032
H5	0,109	0,11	0,022	0,031
H6	0,005	0,003	0,023	0,03
H7	0,006	0,003	0,407	0,248
H8	0,455	0,453	0,012	0,023
H9	0,864	0,863	0,856	0,901
H10	0,002	0	0,334	0,366
H11	0	-0,002	0,015	0,019
H12	0,26	0,265	0,656	0,935

P.=Pflanzenmaterial

Tabelle 8.3-20 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-9

Abbildung 3.6-9	CbMV "Capture AK" + infiziertes Pflanzenmaterial		CbMV "Capture AK" + gesundes Pflanzenmaterial		Blockkontrolle	
	SH1327-A10	1,7218	1,743	0,0947	0,1018	0,0936
SH1327-C3	1,6659	1,605	0,0802	0,1029	0,1129	0,0892
SH1327-C9	1,7442	1,7938	0,1072	0,1071	0,1055	0,0792
SH1327-C10	1,363	1,3839	0,0754	0,0896	0,0926	0,0998

Tabelle 8.3-21 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-10

Abbildung 3.6-10	CbMV "Capture AK" + infiziertes Pflanzenmaterial		CbMV "Capture AK" + gesundes Pflanzenmaterial		Infiziertes Pflanzenmaterial		Gesundes Pflanzenmaterial	
	SH1327-A10	1,8975	1,8886	0,0686	0,0547	0,055	0,0492	0,041
SH1327-C3	1,8942	1,8762	0,0574	0,0525	0,0535	0,0536	0,0487	0,0508
SH1327-C10	1,7692	1,7321	0,048	0,0465	0,0506	0,0479	0,0467	0,0478
SH1327-C9	1,8883	1,8999	0,0557	0,0594	0,0462	0,0513	0,0502	0,0559

Tabelle 8.3-22 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-11

Abbildung 3.6-11	CbMV "Capture AK" + infiziertes Pflanzenmaterial		CbMV "Capture AK" + gesundes Pflanzenmaterial	
	SH1327-A10	1,554	1,6643	0,065
SH1327-C3	1,49	1,556	0,065	0,063
SH1327-C9	1,486	1,471	0,078	0,066
M13K07-A10	0,9774	1,0932	0,0598	0,0816
M13K07-C3	0,7	0,75	0,07	0,072
M13K07-C9	1,17	1,3	0,058	0,08

Tabelle 8.3-23 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-12

Abbildung	CbMV AK + Pflanze (inf.) Probe 1:30	CbMV AK + Pflanze (ge.) Probe 1:30	CbMV AK + Pflanze (inf.) Probe 1:60	CbMV AK + Pflanze (ge.) Probe 1:60	CbMV AK + Pflanze (inf.) Probe 1:120	CbMV AK + Pflanze (ge.) Probe 1:120												
SH1327-C3 10 ¹⁰ cfu	1,5678	1,4902	1,501	0,0636	0,066	0,0665	1,3792	1,3401	1,3386	0,046	0,0774	0,0754	1,3009	1,1133	1,0143	0,0801	0,0829	0,0829
SH1327-C3 10 ⁹ cfu	0,3663	0,4195	0,6401	0,0641	0,0627	0,0617	0,2653	0,2399	0,4197	0,066	0,0617	0,0661	0,176	0,2488	0,2119	0,0681	0,0612	0,0607
SH1327-C3 10 ⁸ cfu	0,143	0,1157	0,1219	0,0673	0,0636	0,0665	0,1014	0,1066	0,0998	0,0652	0,065	0,0713	0,0664	0,0692	0,0663	0,0665	0,0712	0,0497

Tabelle 8.3-24 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-13

Abbildung	CbMV AK + Pflanze (inf.) Probe 1:30	CbMV AK + Pflanze (ge.) Probe 1:30	CbMV AK + Pflanze (inf.) Probe 1:60	CbMV AK + Pflanze (ge.) Probe 1:60	CbMV AK + Pflanze (inf.) Probe 1:120	CbMV AK + Pflanze (ge.) Probe 1:120												
SH1327-C9 10 ¹⁰ cfu	1,5668	1,5784	1,5434	0,0755	0,0881	0,0797	1,3069	1,3091	1,361	0,072	0,0754	0,0779	1,0942	1,1555	1,2296	0,0796	0,0748	0,0723
SH1327-C9 10 ⁹ cfu	0,9268	0,9209	1,0223	0,0645	0,0701	0,0573	0,6611	0,7336	0,7919	0,0706	0,0657	0,064	0,2605	0,3037	0,4027	0,0444	0,0433	0,0435
SH1327-C9 10 ⁸ cfu	0,2156	0,2112	0,1997	0,0634	0,0733	0,0718	0,1351	0,1531	0,1478	0,0684	0,067	0,0667	0,0829	0,0903	0,1071	0,0706	0,0687	0,0657

Tabelle 8.3-25 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-14

Abbildung 3.6-14	SH1327-C3 10 ⁹ cfu			SH1327-C9 10 ⁹ cfu		
CbMV AK + Pflanze (inf.)	0,9148	0,8736	0,8683	1,0453	1,0139	1,0247
CbMV AK + Pflanze (ge.)	0,0491	0,0551	0,057	0,0564	0,0622	0,0716
CMV AK + Pflanze (inf.)	0,0894	0,0533	0,0606	0,0524	0,0529	0,0537
CMV AK + Pflanze (ge.)	0,0558	0,0619	0,0528	0,0575	0,0615	0,0622
PPV AK + Pflanze (inf.)	0,073	0,0596	0,068	0,0546	0,0527	0,0528
PPV AK + Pflanze (ge.)	0,056	0,057	0,0559	0,0529	0,0651	0,1201
PVY AK + Pflanze (inf.)	0,077	0,0632	0,0596	0,0546	0,0527	0,0528
PVY AK + Pflanze (ge.)	0,0636	0,0613	0,0592	0,0658	0,0653	0,0659
TMV AK + Pflanze (inf.)	0,1209	0,0556	0,0506	0,0542	0,0661	0,1796
TMV AK + Pflanze (ge.)	0,0505	0,0495	0,0503	0,0579	0,0606	0,0645
TSWV AK + Pflanze (inf.)	0,1187	0,0934	0,0702	0,0681	0,1027	0,0959
TSWV AK + Pflanze (ge.)	0,0622	0,0851	0,0882	0,0731	0,1321	0,1833

Tabelle 8.3-26 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-15

Abbildung 3.6-16	SH1327-A10 10 ⁹ cfu			SH1327-C10 10 ⁹ cfu		
CbMV AK + Pflanze (inf.)	1,4079	1,3887	1,4001	1,0889	1,1246	1,089
CbMV AK + Pflanze (ge.)	0,0512	0,0527	0,0404	0,0407	0,0427	0,0437
CMV AK + Pflanze (inf.)	0,0514	0,0412	0,043	0,0444	0,0416	0,0434
CMV AK + Pflanze (ge.)	0,0422	0,0452	0,0408	0,0511	0,0451	0,0504
PPV AK + Pflanze (inf.)	0,0515	0,0447	0,0451	0,0427	0,0424	0,0449
PPV AK + Pflanze (ge.)	0,0437	0,0429	0,0437	0,0774	0,0854	0,0922
PVY AK + Pflanze (inf.)	0,1139	0,0937	0,1402	0,0715	0,0445	0,076
PVY AK + Pflanze (ge.)	0,0586	0,0527	0,0457	0,0519	0,0541	0,0777
TMV AK + Pflanze (inf.)	0,0506	0,042	0,0421	0,0454	0,0523	0,0457
TMV AK + Pflanze (ge.)	0,0438	0,0476	0,0401	0,0561	0,0527	0,0482
TSWV AK + Pflanze (inf.)	0,0466	0,0587	0,054	0,06	0,0974	0,0767
TSWV AK + Pflanze (ge.)	0,0622	0,0595	0,0575	0,0673	0,0748	0,0704

Tabelle 8.3-27 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-17

Abbildung 3.6-16	CMV spezifischer Phage			PVY spezifischer Phage		
Virus spezifischer "Capture AK" + infiziertes Pflanzenmaterial	0,8318	0,7875	0,761	0,1406	0,1271	0,1245
Virus spezifischer "Capture AK" + gesundes Pflanzenmaterial	0,7247	0,6658	0,611	0,0809	0,085	0,0883

Tabelle 8.3-28 ELISA Rohdaten zu der Abbildung 3.6-16

Versuchsnr.	Behandlung	Phagenklon	Phagenkonz.	Probenkonz.	Originalsignal	Versuchsnr.	Behandlung	Phagenklon	Phagenkonz.	Probenkonz.	Originalsignal
1	i	C3	a	f	1,775	10	i	C9	c	f	0,953
1	i	C3	a	f	1,781	10	i	C9	c	f	0,891
1	k	C3	a	f	0,072	10	i	C9	c	f	0,987
1	k	C3	a	f	0,056	10	k	C9	c	f	0,069
1	i	A10	a	f	1,728	10	k	C9	c	f	0,074
1	i	A10	a	f	1,698	10	k	C9	c	f	0,074
1	k	A10	a	f	0,059	10	i	C9	b	f	1,525
1	k	A10	a	f	0,060	10	i	C9	b	f	1,470
1	i	A10	a	f	1,935	10	i	C9	b	f	1,463
1	i	A10	a	f	1,921	10	k	C9	b	f	0,076
1	k	A10	a	f	0,060	10	k	C9	b	f	0,073
1	k	A10	a	f	0,060	10	k	C9	b	f	0,106
1	i	A10	a	f	1,935	10	i	C9	a	f	1,529
1	i	A10	a	f	1,935	10	i	C9	a	f	1,513
1	k	A10	a	f	0,057	10	i	C9	a	f	1,461
1	k	A10	a	f	0,056	10	k	C9	a	f	0,090
2	i	C10	a	f	1,364	10	k	C9	a	f	0,108
2	i	C10	a	f	1,384	10	k	C9	a	f	0,089
2	k	C10	a	f	0,075	10	i	C9	c	g	0,882
2	k	C10	a	f	0,090	10	i	C9	c	g	0,825
2	i	C3	a	f	1,666	10	i	C9	c	g	0,816
2	i	C3	a	f	1,605	10	k	C9	c	g	0,078
2	k	C3	a	f	0,080	10	k	C9	c	g	0,091
2	k	C3	a	f	0,103	10	k	C9	c	g	0,083
2	i	C9	a	f	1,744	10	i	C9	b	g	1,507
2	i	C9	a	f	1,794	10	i	C9	b	g	1,500
2	k	C9	a	f	0,107	10	i	C9	b	g	1,439

2	k	C9	a	f	0,107	10	k	C9	b	g	0,083
2	i	A10	a	f	1,722	10	k	C9	b	g	0,081
2	i	A10	a	f	1,743	10	k	C9	b	g	0,083
2	k	A10	a	f	0,095	10	i	C9	a	g	1,530
2	k	A10	a	f	0,102	10	i	C9	a	g	1,500
3	i	C10	a	f	1,434	10	i	C9	a	g	1,503
3	i	C10	a	f	1,470	10	k	C9	a	g	0,092
3	k	C10	a	f	0,071	10	k	C9	a	g	0,099
3	k	C10	a	f	0,086	10	k	C9	a	g	0,095
3	i	C3	a	f	1,841	11	i	C10	c	f	0,499
3	i	C3	a	f	1,783	11	i	C10	c	f	0,533
3	k	C3	a	f	0,075	11	i	C10	c	f	0,532
3	k	C3	a	f	0,103	11	k	C10	c	f	0,104
3	i	C9	a	f	1,987	11	k	C10	c	f	0,104
3	i	C9	a	f	2,016	11	k	C10	c	f	0,097
3	k	C9	a	f	0,104	11	i	C10	b	f	1,302
3	k	C9	a	f	0,103	11	i	C10	b	f	1,315
3	i	A10	a	f	1,981	11	i	C10	b	f	1,300
3	i	A10	a	f	1,986	11	k	C10	b	f	0,097
3	k	A10	a	f	0,090	11	k	C10	b	f	0,100
3	k	A10	a	f	0,097	11	k	C10	b	f	0,090
4	i	C10	a	f	1,250	11	i	C10	a	f	1,368
4	i	C10	a	f	1,292	11	i	C10	a	f	1,368
4	i	C10	a	f	1,437	11	i	C10	a	f	1,307
4	i	C10	a	f	1,440	11	k	C10	a	f	0,090
4	k	C10	a	f	0,071	11	k	C10	a	f	0,134
4	k	C10	a	f	0,063	11	k	C10	a	f	0,108
4	i	C3	a	f	1,546	11	i	C10	c	g	0,467
4	i	C3	a	f	1,496	11	i	C10	c	g	0,446
4	i	C3	a	f	1,519	11	i	C10	c	g	0,470

4	i	C3	a	f	1,453	11	k	C10	c	g	0,110
4	k	C3	a	f	0,078	11	k	C10	c	g	0,110
4	k	C3	a	f	0,085	11	k	C10	c	g	0,090
4	i	C9	a	f	1,622	11	i	C10	b	g	1,230
4	i	C9	a	f	1,603	11	i	C10	b	g	1,200
4	i	C9	a	f	1,631	11	i	C10	b	g	1,180
4	i	C9	a	f	1,541	11	k	C10	b	g	0,080
4	k	C9	a	f	0,072	11	k	C10	b	g	0,120
4	k	A10	a	f	0,076	11	k	C10	b	g	0,140
4	i	A10	a	f	1,679	11	i	C10	a	g	1,260
4	i	A10	a	f	1,672	11	i	C10	a	g	1,200
4	i	A10	a	f	1,633	11	i	C10	a	g	1,210
4	i	A10	a	f	1,567	11	k	C10	a	g	0,100
4	k	A10	a	f	0,093	11	k	C10	a	g	0,110
4	k	A10	a	f	0,086	11	k	C10	a	g	0,110
5	i	A10	a	f	2,085	12	i	C9	a	f	1,550
5	i	A10	a	f	2,030	12	i	C9	a	f	1,660
5	i	A10	a	f	1,850	12	k	C9	a	f	0,060
5	i	A10	a	f	1,900	12	k	C9	a	f	0,050
5	i	A10	a	f	1,840	12	i	C10	a	f	1,610
5	i	A10	a	f	1,990	12	i	C10	a	f	1,500
5	i	A10	a	f	1,910	12	k	C10	a	f	0,050
5	i	A10	a	f	1,890	12	k	C10	a	f	0,090
5	i	A10	a	f	1,810	12	i	A10	a	f	1,480
5	i	A10	a	f	1,530	12	i	A10	a	f	1,470
5	i	A10	a	f	1,570	12	k	A10	a	f	0,070
5	i	A10	a	f	1,530	12	k	A10	a	f	0,060
5	k	A10	a	f	0,080	12	i	C3	a	f	1,490
5	k	A10	a	f	0,080	12	i	C3	a	f	1,550
5	k	A10	a	f	0,080	12	k	C3	a	f	0,060

5	k	A10	a	f	0,080	12	k	C3	a	f	0,060
5	k	A10	a	f	0,090	13	i	A10	b	f	1,170
5	k	A10	a	f	0,090	13	i	A10	b	f	1,170
5	k	A10	a	f	0,060	13	i	A10	b	f	1,180
5	k	A10	a	f	0,100	13	k	A10	b	f	0,100
5	k	A10	a	f	0,090	13	k	A10	b	f	0,100
5	k	A10	a	f	0,100	13	k	A10	b	f	0,120
5	k	A10	a	f	0,060	13	i	A10	c	f	0,880
5	k	A10	a	f	0,100	13	i	A10	c	f	0,820
5	i	C10	a	f	0,750	13	i	A10	c	f	0,840
5	i	C10	a	f	0,640	13	k	A10	c	f	0,080
5	i	C10	a	f	0,740	13	k	A10	c	f	0,090
5	i	C10	a	f	0,820	13	k	A10	c	f	0,090
5	i	C10	a	f	0,600	14	i	C10	c	f	0,600
5	i	C10	a	f	0,630	14	i	C10	c	f	0,790
5	i	C10	a	f	0,640	14	i	C10	c	f	0,730
5	i	C10	a	f	0,620	14	k	C10	c	f	0,090
5	i	C10	a	f	0,330	14	k	C10	c	f	0,070
5	i	C10	a	f	0,760	14	k	C10	c	f	0,090
5	i	C10	a	f	0,610	14	i	C3	c	f	0,580
5	i	C10	a	f	0,600	14	i	C3	c	f	0,570
5	k	C10	a	f	0,080	14	i	C3	c	f	0,640
5	k	C10	a	f	0,090	14	k	C3	c	f	0,070
5	k	C10	a	f	0,090	14	k	C3	c	f	0,070
5	k	C10	a	f	0,080	14	k	C3	c	f	0,080
5	k	C10	a	f	0,080	14	i	C9	c	f	0,820
5	k	C10	a	f	0,080	14	i	C9	c	f	0,910
5	k	C10	a	f	0,090	14	i	C9	c	f	0,900
5	k	C10	a	f	0,100	14	k	C9	c	f	0,070
5	k	C10	a	f	0,080	14	k	C9	c	f	0,090

5	k	C10	a	f	0,100	14	k	C9	c	f	0,070
5	k	C10	a	f	0,090	15	i	A10	b	f	1,120
5	k	C10	a	f	0,080	15	i	A10	b	f	1,220
6	i	A10	a	f	1,520	15	i	A10	b	f	1,180
6	i	A10	a	f	1,420	15	k	A10	b	f	0,050
6	i	A10	a	f	1,320	15	k	A10	b	f	0,040
6	k	A10	a	f	0,076	15	k	A10	b	f	0,050
6	k	A10	a	f	0,097	15	i	A10	b	g	1,100
6	k	A10	a	f	0,086	15	i	A10	b	g	1,060
6	i	A10	c	f	1,500	15	i	A10	b	g	1,090
6	i	A10	c	f	1,400	15	k	A10	b	g	0,060
6	i	A10	c	f	1,440	15	k	A10	b	g	0,050
6	k	A10	c	f	0,070	15	k	A10	b	g	0,050
6	k	A10	c	f	0,090	15	i	A10	c	f	0,540
6	k	A10	c	f	0,090	15	i	A10	c	f	0,580
6	i	C10	a	f	1,130	15	i	A10	c	f	0,600
6	i	C10	a	f	1,130	15	k	A10	c	f	0,050
6	i	C10	a	f	1,100	15	k	A10	c	f	0,070
6	k	C10	a	f	0,090	15	k	A10	c	f	0,050
6	k	C10	a	f	0,110	15	i	A10	c	g	0,430
6	k	C10	a	f	0,120	15	i	A10	c	g	0,400
6	i	C10	c	f	1,430	15	i	A10	c	g	0,430
6	i	C10	c	f	1,400	15	k	A10	c	g	0,050
6	i	C10	c	f	1,360	15	k	A10	c	g	0,040
6	k	C10	c	f	0,100	15	k	A10	c	g	0,050
6	k	C10	c	f	0,100	16	i	C3	b	f	1,620
6	k	C10	c	f	0,090	16	i	C3	b	f	1,550
7	i	A10	c	f	0,899	16	i	C3	b	f	1,550
7	i	A10	c	f	0,926	16	k	C3	b	f	0,050
7	i	A10	c	f	0,898	16	k	C3	b	f	0,060

7	k	A10	c	f	0,048	16	k	C3	b	f	0,060
7	k	A10	c	f	0,043	16	i	C3	b	g	1,400
7	k	A10	c	f	0,043	16	i	C3	b	g	1,370
7	i	A10	b	f	1,380	16	i	C3	b	g	1,360
7	i	A10	b	f	1,364	16	k	C3	b	g	0,040
7	i	A10	b	f	1,323	16	k	C3	b	g	0,070
7	k	A10	b	f	0,048	16	k	C3	b	g	0,070
7	k	A10	b	f	0,052	16	i	C3	c	f	0,350
7	k	A10	b	f	0,046	16	i	C3	c	f	0,410
7	i	A10	a	f	1,261	16	i	C3	c	f	0,620
7	i	A10	a	f	1,213	16	k	C3	c	f	0,060
7	i	A10	a	f	1,302	16	k	C3	c	f	0,050
7	k	A10	a	f	0,081	16	k	C3	c	f	0,050
7	k	A10	a	f	0,054	16	i	C3	c	g	0,250
7	k	A10	a	f	0,050	16	i	C3	c	g	0,230
7	i	A10	c	g	0,830	16	i	C3	c	g	0,410
7	i	A10	c	g	0,913	16	k	C3	c	g	0,060
7	i	A10	c	g	0,861	16	k	C3	c	g	0,050
7	k	A10	c	g	0,056	16	k	C3	c	g	0,060
7	k	A10	c	g	0,046	17	i	C9	b	f	1,570
7	k	A10	c	g	0,046	17	i	C9	b	f	1,570
7	i	A10	b	g	1,243	17	i	C9	b	f	1,540
7	i	A10	b	g	1,216	17	k	C9	b	f	0,070
7	i	A10	b	g	1,205	17	k	C9	b	f	0,080
7	k	A10	b	g	0,046	17	k	C9	b	f	0,070
7	k	A10	b	g	0,048	17	i	C9	b	g	1,290
7	k	A10	b	g	0,044	17	i	C9	b	g	1,290
7	i	A10	a	g	1,196	17	i	C9	b	g	1,350
7	i	A10	a	g	1,156	17	k	C9	b	g	0,060
7	i	A10	a	g	1,142	17	k	C9	b	g	0,070

7	k	A10	a	g	0,050	17	k	C9	b	g	0,070
7	k	A10	a	g	0,048	17	i	C9	c	f	0,890
7	k	A10	a	g	0,047	17	i	C9	c	f	0,890
8	i	C3	c	f	0,482	17	i	C9	c	f	0,990
8	i	C3	c	f	0,425	17	k	C9	c	f	0,060
8	i	C3	c	f	0,369	17	k	C9	c	f	0,060
8	k	C3	c	f	0,095	17	k	C9	c	f	0,050
8	k	C3	c	f	0,100	17	i	C9	c	g	0,630
8	k	C3	c	f	0,137	17	i	C9	c	g	0,700
8	i	C3	b	f	1,224	17	i	C9	c	g	0,760
8	i	C3	b	f	1,222	17	k	C9	c	g	0,110
8	i	C3	b	f	1,241	17	k	C9	c	g	0,060
8	k	C3	b	f	0,097	17	k	C9	c	g	0,060
8	k	C3	b	f	0,098	18	i	A10	c	f	0,930
8	k	C3	b	f	0,130	18	i	A10	c	f	1,100
8	i	C3	a	f	1,376	18	i	A10	c	f	0,860
8	i	C3	a	f	1,334	18	k	A10	c	f	0,050
8	i	C3	a	f	1,320	18	k	A10	c	f	0,040
8	k	C3	a	f	0,107	18	k	A10	c	f	0,050
8	k	C3	a	f	0,128	19	i	C3	c	f	0,829
8	k	C3	a	f	0,098	19	i	C3	c	f	0,809
8	i	C3	c	g	0,342	19	i	C3	c	f	0,850
8	i	C3	c	g	0,423	19	k	C3	c	f	0,079
8	i	C3	c	g	0,422	19	k	C3	c	f	0,076
8	k	C3	c	g	0,104	19	k	C3	c	f	0,054
8	k	C3	c	g	0,100	19	i	C9	c	f	0,931
8	k	C3	c	g	0,102	19	i	C9	c	f	0,916
8	i	C3	b	g	1,065	19	i	C9	c	f	0,962
8	i	C3	b	g	1,118	19	k	C9	c	f	0,068
8	i	C3	b	g	1,151	19	k	C9	c	f	0,064

8	k	C3	b	g	0,087	19	k	C9	c	f	0,060
8	k	C3	b	g	0,099	20	i	C10	c	f	1,336
8	k	C3	b	g	0,088	20	i	C10	c	f	1,341
8	i	C3	a	g	1,294	20	i	C10	c	f	1,319
8	i	C3	a	g	1,242	20	k	C10	c	f	0,052
8	i	C3	a	g	1,197	20	k	C10	c	f	0,054
8	k	C3	a	g	0,096	20	k	C10	c	f	0,042
8	k	C3	a	g	0,097	20	i	A10	c	f	1,065
8	k	C3	a	g	0,117	20	i	A10	c	f	1,113
9	i	C9	c	f	0,848	20	i	A10	c	f	1,063
9	i	C9	c	f	0,919	20	k	A10	c	f	0,043
9	i	C9	c	f	0,861	20	k	A10	c	f	0,049
9	k	C9	c	f	0,085	20	k	A10	c	f	0,076
9	k	C9	c	f	0,081	21	i	C3	c	f	0,754
9	k	C9	c	f	0,094	21	i	C3	c	f	0,722
9	i	C9	b	f	1,507	21	i	C3	c	f	0,702
9	i	C9	b	f	1,326	21	k	C3	c	f	0,098
9	i	C9	b	f	1,378	21	k	C3	c	f	0,066
9	k	C9	b	f	0,077	21	k	C3	c	f	0,078
9	k	C9	b	f	0,074	21	i	C9	c	f	0,964
9	k	C9	b	f	0,079	21	i	C9	c	f	0,953
9	i	C9	a	f	1,500	21	i	C9	c	f	0,898
9	i	C9	a	f	1,466	21	k	C9	c	f	0,112
9	i	C9	a	f	1,449	21	k	C9	c	f	0,069
9	k	C9	a	f	0,085	21	k	C9	c	f	0,074
9	k	C9	a	f	0,078	21	i	C10	c	f	0,742
9	k	C9	a	f	0,075	21	i	C10	c	f	0,796
9	i	C9	c	g	0,857	21	i	C10	c	f	0,790
9	i	C9	c	g	0,845	21	k	C10	c	f	0,068
9	i	C9	c	g	0,848	21	k	C10	c	f	0,069

9	k	C9	c	g	0,080	21	k	C10	c	f	0,073
9	k	C9	c	g	0,080	21	i	A10	c	f	0,943
9	k	C9	c	g	0,077	21	i	A10	c	f	0,940
9	i	C9	b	g	1,377	21	i	A10	c	f	0,937
9	i	C9	b	g	1,344	21	k	A10	c	f	0,076
9	i	C9	b	g	1,372	21	k	A10	c	f	0,065
9	k	C9	b	g	0,074	21	k	A10	c	f	0,066
9	k	C9	b	g	0,079						
9	k	C9	b	g	0,078						
9	i	C9	a	g	1,392						
9	i	C9	a	g	1,422						
9	i	C9	a	g	1,389						
9	k	C9	a	g	0,079						
9	k	C9	a	g	0,075						
9	k	C9	a	g	0,077						

Für die obige Tabelle gilt: Behandlung (i = infizierter Pflanzensaft, k = gesunder Pflanzensaft), Phagenklon (A10, C3, C9, C10), Phagenkonzentration (a = unspezifische Konzentration, b = 10^{10} cfu/Vertiefung, c = 10^9 cfu/Vertiefung), Probenkonzentration (f = Pflanzenprobe 1:30 verdünnt, g = Pflanzenprobe 1:60 verdünnt))

9 Lebenslauf

ARBEITSERFAHRUNG

- 03/2016 **Disputation zum Thema „Untersuchungen zum Nachweis von Pflanzenviren mit Peptiden und Antibody Mimics aus Phagenbibliotheken“ bestanden (Note: „sehr gut“)**
- 06/2015 – 12/2015 **Abschluss-Stipendium der Graduiertenakademie der Leibniz Universität Hannover für das Promotionsstudium zum Dr. rer. Nat**
- 01/2011 – 11/2015 **Promotionsstudium zum Dr. rer. Nat**
Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Leibniz Universität Hannover: Nachweis relevanter Phytopathogene mit „antibody mimics“.

SCHUL- UND AUSBILDUNG

- WS 2008/2009 – 11/2010 **Studium Master of Science (Note: 1,7), Leibniz Universität Hannover**
*Abschlussarbeit: Charakterisierung der Tomatenmosaikvirus (ToMV) resistenten transgenen *Nicotiana benthamiana* Linie 119-12*
- WS 2005/2006 – SS 2008 **Studium Bachelor of Science (Note: 2,0), Leibniz Universität Hannover**
*Abschlussarbeit: Überprüfung des Wirtspflanzenspektrums von *Potato Virus Y* nach Agroinfektion und mechanischer Übertragung*
- 09/1998 – 07/2005 **Gymnasium, Abitur (Note: 2,2), Matthias-Claudius-Gymnasium Gehrden**

FACHVORTRÄGE AUF TAGUNGEN

- 2012: 3. WeGa-Workshop an der Humboldt Universität zu Berlin auf Deutsch
- 2013: 48. Jahrestagung Deutsche Gartenbauwissenschaftliche Gesellschaft in Bonn auf Deutsch
- 2013: 45. Tagung des Arbeitskreises „Viruskrankheiten der Pflanzen“ in Braunschweig auf Deutsch
- 2014: 59. Deutsche Pflanzenschutztagung in Freiburg auf Deutsch
- 2015: 50. Jahrestagung Deutsche Gartenbauwissenschaftliche Gesellschaft und Internationales WeGa-Symposium auf Englisch
- 2016: 48. Tagung des Arbeitskreises „Viruskrankheiten der Pflanzen“ in Hannover (Poster)

PUBLIKATIONEN

- Klinkenbuss, D. / Maiss, E. (2013): Detection of Tobacco mosaic virus with antibody mimics based on M13 phages. DGG-Proceedings, Vol. 3, May 2013, No. 2, p. 1-5. DOI: 10.5288/dgg-pr-03-02-dk-2013