

# **Immuntoxinproduktion in Pflanzen**

**Eine innovative Methode zur Herstellung neuartiger**

**Therapeutika gegen das Hodgkin Lymphom**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Diplom-Biologin Stefanie Becker

aus Trier

Bonn 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Heide Schnabl  
2. Referent: Prof. Dr. Diedrik Menzel  
Tag der Promotion: 16.08.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2006

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	S. 8
Aminosäuren und Basen.....	S. 9
Abbildungsverzeichnis.....	S. 10
Tabellenverzeichnis .....	S. 12
1. Einleitung.....	S. 13
1.1 Das Hodgkin Lymphom.....	S. 13
1.1.1 Klassifizierung.....	S. 13
1.1.2 Entstehung.....	S. 14
1.1.3 Krankheitsverlauf.....	S. 15
1.1.4 Therapie.....	S. 16
1.2 Immuntoxine.....	S. 16
1.2.1 Spezifität.....	S. 17
1.2.2 Penetrationsvermögen.....	S. 18
1.2.3 Immunogenität.....	S. 20
1.2.4 Toxische Nebenwirkungen.....	S. 20
1.3 Immuntoxine gegen das Hodgkin Lymphom.....	S. 21
1.3.1 Zielantigene und Bindedomänen.....	S. 21
1.3.1.1 CD30 und Ki-4.....	S. 21
1.3.1.2 CD25 und RFT5.....	S. 22
1.3.2 Toxindomänen.....	S. 23
1.3.2.1 Ricin.....	S. 23
1.3.2.2 Angiogenin.....	S. 26
1.3.2.3 Granzym B.....	S. 27
1.4 Expression in Pflanzen.....	S. 29
1.4.1 Vorteile und Nachteile.....	S. 29
1.4.2 Design einer Expressionskassette.....	S. 31
1.4.3 Gentransfer in die Pflanze.....	S. 32
1.4.4 Wahl des Expressionssystems.....	S. 34
1.4.4.1 Tabak.....	S. 35
1.4.4.2 Wasserlinsengewächse.....	S. 35
1.5 Ziele der Arbeit.....	S. 37
2. Material und Methoden.....	S. 38
2.1 Material.....	S. 38
2.1.1 Bakterienstämme und pflanzliches Material.....	S. 38
2.1.2 Plasmide.....	S. 38
2.1.3 PCR-Primer.....	S. 40
2.1.4 Geräte.....	S. 41
2.1.5 Chemikalien und Kits .....	S. 43

2.1.6 Kulturmedien.....	S. 46
2.2 Kultivierung und Lagerung von biologischem Material.....	S. 47
2.2.1. Bakterien .....	S. 47
2.2.1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	S. 48
2.2.1.1.1 Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	S. 48
2.2.1.1.2 Kompetente <i>Escherichia coli</i> .....	S. 48
2.2.1.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	S. 48
2.2.1.2.1 Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	S. 48
2.2.1.2.2 Kompetente <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	S. 49
2.2.2 Pflanzen.....	S. 49
2.2.2.1 <i>Nicotiana tabacum</i> .....	S. 49
2.2.2.2 <i>Wolffia australiana</i> und <i>Wolffia brasiliensis</i> .....	S. 50
2.3 Herstellung transgener Organismen.....	S. 51
2.3.1 Bakterien.....	S. 51
2.3.1.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	S. 51
2.3.1.2 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	S. 51
2.3.2 Pflanzen.....	S. 52
2.3.2.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelte Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> .....	S. 52
2.3.2.2 Transformation von <i>Wolffia brasiliensis</i> mittels Injektion von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	S. 52
2.3.2.3 Transformation von <i>Wolffia australiana</i> mittels Vakuuminfiltration von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	S. 53
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	S. 53
2.4.1 DNA-Isolationen.....	S. 53
2.4.1.1 Plasmid-Präparation aus <i>Escherichia coli</i> .....	S. 54
2.4.1.1.1 Plasmid-Präparation aus <i>Escherichia coli</i> .....	S. 54
2.4.1.1.2 Plasmid-Präparation aus <i>Escherichia coli</i> .....	S. 54
2.4.1.2 DNA-Isolation aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	S. 54
2.4.1.3 DNA-Isolation aus <i>Nicotiana tabacum</i> .....	S. 55
2.4.2 RNA-Isolationen.....	S. 55
2.4.2.1 mRNA-Isolation aus <i>Nicotiana tabacum</i> .....	S. 55
2.4.2.2 RNA-Isolation aus <i>Wolffia australiana</i> und <i>Wolffia brasiliensis</i> .....	S. 55
2.4.3 PCR .....	S. 56
2.4.4 Reverse Transkription.....	S. 56
2.4.5 DNA-Fällung.....	S. 56
2.4.6 Restriktion.....	S. 57
2.4.7 Dephosphorylierung.. .....	S. 57
2.4.8 Klenow Fill-In.....	S. 57
2.4.9 Ligation.....	S. 57

2.4.10 Agarose-Gelelektrophorese.....	S. 58
2.4.11 Gelextraktion..	S. 58
2.4.12 Southern Blot.....	S. 58
2.4.13 Sondenherstellung und Hybridisierung.....	S. 59
2.4.14 Signalgeneration.....	S. 59
2.4.15 Sequenzierung .....	S. 59
2.5 Proteinbiochemische Methoden.....	S. 60
2.5.1 Protein-Isolation aus <i>Nicotiana tabacum</i> .....	S. 60
2.5.1.1 Protein-Isolation aus <i>Nicotiana tabacum</i> .....	S. 60
2.5.1.2 Protein-Isolation aus <i>Nicotiana tabacum</i> .....	S. 60
2.5.2 Proteinaufreinigung mittels IMAC.....	S. 61
2.5.2.1 Proteinaufreinigung mittels IMAC.....	S. 61
2.5.2.2 Proteinaufreinigung mittels IMAC.....	S. 61
2.5.3 Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	S. 61
2.5.4 Proteinfällung.....	S. 62
2.5.5 SDS-PAGE.....	S. 62
2.5.6 Silberfärbung.....	S. 63
2.5.7 Dot Blot.....	S. 63
2.5.8 Western Blot.....	S. 63
2.5.9 Färbung mit Ponceau S.....	S. 63
2.5.10 Hybridisierung.....	S. 64
2.5.11 Signalgeneration .....	S. 64
3. Ergebnis.....	S. 65
3.1 Herstellung der Plasmide.....	S. 65
3.1.1 Konstruktion der Immuntoxininfusionsgene.....	S. 65
3.1.1.1 Backbone: L-LT1-e.....	S. 67
3.1.1.2 Plasmid mit dem Immuntoxininfusionsgen für Angiogenin-Ki-4(scFv): Ang-Ki-4.....	S. 69
3.1.1.3 Plasmid mit dem Immuntoxininfusionsgen für Granzym B-Ki-4(scFv): Gb-Ki-4.....	S. 70
3.1.1.4 Plasmid mit dem Immuntoxininfusionsgen für Ki-4(scFv)-Angiogenin: Ki-4-Ang.....	S. 71
3.1.1.5 Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Angiogenin- RFT5(scFv)(-KDEL): Ang-RFT5 und ARK.....	S. 72
3.1.1.6 Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Granzym B-RFT5(scFv)(-KDEL): Gb-RFT5 und GRK.....	S. 74
3.1.1.7 Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für RFT5(scFv)- Angiogenin(-KDEL): RFT5-Ang und RAK.....	S. 76
3.1.1.8 Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für RFT5(scFv)-Granzym B(-KDEL): RFT5-Gb und RGK.....	S. 78

3.1.2 Herstellung der Kassettenvektoren.....	S. 80
3.1.2.1 Binäres Plasmid, 1. Modifikation: pPAMm1.....	S. 80
3.1.2.2 Binäres Plasmid, 2. Modifikation: pPAMm2.....	S. 82
3.1.2.3 Binäre Kassettenplasmide (mit <i>Xba</i> I-Schnittstelle): pPAMBTX und pPAMTBX.....	S. 82
3.1.2.4 Binäre Kassettenplasmide: pPAMBT und pPAMTB.....	S. 84
3.1.3 Herstellung binärer Plasmide mit Immuntoxingenen.....	S. 85
3.1.3.1 Binäre Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Angiogenin- RFT5(scFv)(-KDEL): pPAMAR und pPAMARK.....	S. 85
3.1.3.2 Binäre Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Angiogenin- Ki-4(scFv)(-KDEL): pPAMAK und pPAMAKK.....	S. 86
3.1.3.3 Binäre Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Granzym B- RFT5(scFv)(-KDEL): pPAMGR und pPAMGRK.....	S. 88
3.1.3.4 Binäre Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Granzym B- Ki-4(scFv)(-KDEL): pPAMGK und pPAMGKK.....	S. 89
3.1.3.5 Binäre Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für RFT5(scFv)- Angiogenin(-KDEL): pPAMRA und pPAMRAK.....	S. 90
3.1.3.6 Binäre Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Ki-4(scFv)- Angiogenin(-KDEL): pPAMKA und pPAMKAK.....	S. 91
3.1.3.7 Binäre Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für RFT5(scFv)- Granzym B(-KDEL): pPAMRG und pPAMRGK.....	S. 93
3.1.3.8 Binäre Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Ki-4(scFv)- Granzym B(-KDEL): pPAMKG und pPAMKGGK.....	S. 94
3.1.3.9 Binäres Plasmid mit Immuntoxininfusionsgen für Signalpeptid-Angiogenin- RFT5(scFv)-KDEL: pPAMSARK.....	S. 95
3.1.3.10 Binäres Plasmid mit Immuntoxininfusionsgen für Signalpeptid-RFT5(scFv)- Granzym B-KDEL: pPAMSRGK.....	S. 97
3.1.3.11 Binäres Plasmid mit Immuntoxininfusionsgen für Signalpeptid-RFT5(scFv)- RTA-N97A-KDEL: pPAMSRRK.....	S. 99
3.1.4 Übersicht über die hergestellten Plasmide.....	S. 100
3.2 Herstellung und Nachweis transgener <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	S. 103
3.2.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mit pPAMSRGK.....	S. 103
3.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mit pPAMSRRK.....	S. 104
3.2.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mit pPAMSARK.....	S. 104
3.3 Herstellung und Nachweis transgener <i>Nicotiana tabacum</i> .....	S. 106
3.3.1 Wachstum auf Selektionsmedium.....	S. 106
3.3.2 Anzucht einer F <sub>1</sub> -Generation.....	S. 108
3.3.3 Nachweis des Immuntoxininfusionsgens.....	S. 110
3.3.3.1 Nachweis auf DNA-Ebene.....	S. 110
3.3.3.2 Nachweis auf mRNA-Ebene.....	S. 113

3.3.4 Nachweis des Immuntoxins.....	S. 115
3.3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen .....	S. 116
3.3.4.2 SDS-PAGE.....	S. 120
3.3.4.3 Blots.....	S. 121
3.3.5 Übersicht über die Ergebnisse in <i>Nicotiana tabacum</i> .....	S. 124
3.4 Herstellung und Nachweis transgener <i>Wolffia spec.</i> .....	S. 124
3.4.1 Erstellung eines Selektionsprotokolls.....	S. 125
3.4.2 Transformationen.....	S. 130
3.4.2.1 Transgene <i>Wolffia brasiliensis</i> durch Injektion von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	S. 130
3.4.2.2 Transgene <i>Wolffia australiana</i> durch Infiltration von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	S. 131
4. Diskussion.....	S. 133
4.1 Immuntoxine.....	S. 133
4.2 Expressionssystem.....	S. 135
4.3 Transformationsmethoden.....	S. 137
4.4 Expressionskassetten.....	S. 141
4.5 Arbeiten mit Bakterien.....	S. 145
4.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....	S. 145
4.5.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	S. 146
4.6 Arbeiten mit Pflanzen.....	S. 148
4.6.1 <i>Nicotiana tabacum</i> .....	S. 148
4.6.2 <i>Wolffia australiana</i> und <i>Wolffia brasiliensis</i> .....	S. 154
4.7 Ausblick.....	S. 156
5. Zusammenfassung.....	S. 158
6. Anhänge.....	S. 159
6.1 Klonierungsfragmente.....	S. 159
6.1.1 RFT5(scFv).....	S. 159
6.1.2 Ki-4(scFv).....	S. 159
6.1.3 Angiogenin.....	S. 160
6.1.4 Granzym B.....	S. 160
6.1.5 RTA-N97A.....	S. 161
6.1.6 Signalpeptid $\alpha$ -Amylase-Inhibitor ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) .....	S. 161
6.2 Plasmide zur Klonierung.....	S. 161
6.2.1 pSecTag2 A.....	S. 161
6.2.2 pPAM.....	S. 163
6.3 Plasmide dieser Arbeit.....	S. 165
6.3.1 Ki-4-Ang, K-GbII, RFT5-Ang, RAK, RFT5-Gb, RGK.....	S. 165
6.3.2 Ang-Ki-4, Gb-Ki-4, Ang-RFT5, ARK, Gb-RFT5, GRK .....	S. 166
6.3.3 pPAMKsGFP.....	S. 167

6.3.4 pPAMm1, pPAMm2.....	S. 168
6.3.5 pPAMBTX, pPAMBT, pPAMTBX, pPAMTB.....	S. 169
6.3.6 pPAMAR, pPAMARK, pPAMAK, pPAMAKK, pPAMGR, pPAMGRK, pPAMGK, pPAMGKK, pPAMSARK.....	S. 169
6.3.7 pPAMRA, pPAMRAK, pPAMKA, pPAMKAK, pPAMRG, pPAMRGK, pPAMKG, pPAMKGG, pPAMSRGK, pPAMSRRK.....	S. 169
Literaturverzeichnis.....	S. 170
Danksagung.....	S. 194
Lebenslauf.....	S. 195



## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
<i>A.</i>	<i>Agrobacterium</i>
A. demin.	aqua demineralized
Abb.	Abbildung
AIDS	acquired immuno deficiency syndrome
AMV	avian myeloblastosis virus
APS	ammonium persulfate
BAP	benzyl-amino-purine
BAT3	human leukocyte antigen-B associated transcript 3
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BGH	bovine growth hormone
bla	beta-lactamase
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumine
bzw.	beziehungsweise
CAD	caspase activated desoxyribonuclease
CaMV	cauliflower mosaic virus
CD	cluster of differentiation
CD30L	cluster of differentiation 30 ligand
cDNA	copy desoxy ribonucleic acid
CDR	complementarity deterring region
CH	Schweiz
cHL	classical Hodgkin's lymphoma
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
CMV	cytomegalo virus
CP	coat protein
CTAB	cetyl trimethyl ammonium bromide
CTF-131	carboxyterminal fragment of BAT3 with 131 amino acids
cv.	cultivar
D	Deutschland
Da	Dalton
dgA	deglycosylated ricin-A
DK	Dänemark
DNA	desoxy ribonucleic acid
dNTP	desoxy nucleotide triphosphate
DPPI	dipeptidyl peptidase I
dsFv	disulfide stabilized fragment variable
DTT	dithio threitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EBV	Epstein-Barr virus
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMBL- EBI	European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute
ER	endoplasmic reticulum
ERAD	endoplasmic reticulum-associated degradation
ETA	<i>Pseudomonas</i> exotoxin A
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule

Fab	fragment antigen binding
<i>g</i>	gravitation constant
GFP	green fluorescent protein
GM <sup>r</sup>	gentamycin resistance
GST	glutathione-S-transferase
GVDH	graft-versus-host disease
H	Hodgkin
HAMA	human anti mouse antibody
HARA	human anti ricin antibody
HATA	human anti toxin antibody
HCG	human choriongonadotropine
HIV	human immunodeficiency virus
IAA	indolyl-3-acetic acid
ICAD	inhibitor of caspase activated desoxyribonuclease
IgG	immuno globuline G
IGKL	immuno globuline kappa leader
IL2	interleukin 2
IL2R	interleukin 2 receptor
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
IMBIO	Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen
J	Japan
JAK	Janus kinase
KanR	kanamycin resistance
kb	kilo base pair
KM <sup>r</sup>	kanamycin resistance
L&H	lymphocytic & histiocytic
LB	Luria & Bertani
LB	left border
LCK	lymphocyte specific protein tyrosine kinase
LD	lymphocyte depletion
LR	lymphocyte-rich
MC	mixed cellularity
MES	morpholino ethane sulfonic acid
MHC	major histcompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	Murashige & Skook
<i>N.</i>	<i>Nicotiana</i>
NAA	naphtyl acetic acid
NBT	nitro blue tetrazolium
NFκB	nuclear factor κB
NL	Niederlande
NLPHL	nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma
NOS	nopaline synthase
nptII	neomycin phosphotransferase
NS	nodular sclerosis
NTA	nitrioltriacetic acid
OCS	octopine synthase

OD	optical density
ori	origin of replication
P	promotor
p. A.	pro analysis
pA	polyadenylation sequence
PAGE	polyacrylamide gelelectrophoresis
PAM	pulse amplitude measurement
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline tween
PCR	polymerase chain reaction
PEG	poly ethylene glycol
PDI	protein disulfide isomerase
pH	pondus hydrogenii
PVPP	poly vinyl polypyrrolidone
RAMOS	respiration activity monitoring system
RB	right border
REAL	Revised European-American Lymphoma
RI	RNase inhibitor
Rif <sup>r</sup>	rifampicin resistance
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RS	Reed-Sternberg
RT	room temperature
RTA	ricin toxin A
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
RubisCo	ribulose biphosphate carboxylase / oxygenase
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule
S	Schweden
sCD30	soluble cluster of differentiation 30
scFv	single chain Fragment variable
SDS	sodium dodecyl sulfate
SH	Schenk & Hildebrandt

SHI	shoot induction
SM <sup>r</sup>	streptomycin resistance
Smac	second mitochondria derived activator of caspase
SP	Signalpeptid
SSC	sodium saline citrate
STAT	signal transducer and activator of transcription
SV	simian virus
SYK	spleen tyrosine kinase
Tab.	Tabelle
TACE	tumor necrosis factor alpha converting enzyme
TAE	tris acetate ethylene diamine tetraacetic acid
TBE	tris borate ethylene diamine tetraacetic acid
TEMED	tetramethyl ethylene diamine
Ti	tumor inducing
TNF	tumor necrosis factor
TrxR	thioredoxin reductase
u	unit
UK	united kingdom
USA	united states of America
UV	ultra violet
v	volume
w	weight
<i>W.</i>	<i>Wolffia</i>
WHO	World Health Organization
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid
YEB	yeast extract broth

## Aminosäuren und Basen

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

Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Histologisches Bild des klassischen Hodgkin Lymphom	S. 14
Abb. 2	Schematische Darstellung eines Immuntoxins	S. 16
Abb. 3	Schematische Darstellung der Wirkungsweise eines Immuntoxins	S. 17
Abb. 4	Immunglobulin G und seine Derivate	S. 19
Abb. 5	Interleukin-2-Rezeptor	S. 22
Abb. 6	Aufnahme und Wirkungsweise von Ricin	S. 24
Abb. 7	Schematische Darstellung einiger durch Granzym B ausgelöster Signale	S. 28
Abb. 8	Schnittstellenmuster im K-GbII	S. 66
Abb. 9	Schnittstellenmuster im L-LT2-KIII	S. 66
Abb. 10	Kontrollschnitte der Plasmide K-GbII, K-Ang-MHII und L-LT1-KIII	S. 67
Abb. 11	Kontrollschnitte von m22-RTA-N97A	S. 67
Abb. 12	Klonierung von L-LT1-e	S. 68
Abb. 13	Kontrollschnitte von L-LT1-e	S. 68
Abb. 14	Klonierung von Ang-Ki-4	S. 69
Abb. 15	Kontrollschnitte von Ang-Ki-4	S. 69
Abb. 16	Klonierung von Gb-Ki-4	S. 70
Abb. 17	Kontrollschnitte von Gb-Ki-4	S. 70
Abb. 18	Klonierung von Ki-4-Ang	S. 71
Abb. 19	Kontrollschnitte von Ki-4-Ang	S. 71
Abb. 20	Klonierung von Ang-RFT5 und ARK	S. 72
Abb. 21	Kontrollschnitte von Ang-RFT5	S. 73
Abb. 22	Nachweis von ARK	S. 73
Abb. 23	Klonierung von Gb-RFT5 und GRK	S. 74
Abb. 24	Kontrollschnitte von Gb-RFT5	S. 75
Abb. 25	Nachweis von GRK	S. 75
Abb. 26	Klonierung von RFT5-Ang und RAK	S. 76
Abb. 27	Kontrollschnitte von RFT5-Ang	S. 77
Abb. 28	Kontrollschnitte von RAK	S. 77
Abb. 29	Klonierung von RFT5-Gb und RGK	S. 78
Abb. 30	Kontrollschnitte von RFT5-Gb	S. 79
Abb. 31	Kontrollschnitte von RGK	S. 79
Abb. 32	Kontrollschnitte von pPAMKsGFP	S. 80
Abb. 33	Klonierung von pPAMm1	S. 81
Abb. 34	Kontrollschnitte von pPAMm1	S. 81
Abb. 35	Klonierung von pPAMm2	S. 82
Abb. 36	Kontrollschnitte von pPAMm2	S. 82
Abb. 37	Klonierung von pPAMBTX und pPAMTBX	S. 83
Abb. 38	Kontrollschnitte von pPAMBTX und pPAMTBX	S. 84
Abb. 39	Klonierung von pPAMBT und pPAMTB	S. 84
Abb. 40	Kontrollschnitte von pPAMBT und pPAMTB	S. 85
Abb. 41	Klonierung von pPAMAR und pPAMARK	S. 86
Abb. 42	Kontrollschnitte von pPAMAR und pPAMARK	S. 86
Abb. 43	Klonierung von pPAMAK und pPAMAKK	S. 87
Abb. 44	Kontrollschnitte von pPAMAK und pPAMAKK	S. 87
Abb. 45	Klonierung von pPAMGR und pPAMGRK	S. 88
Abb. 46	Kontrollschnitte von pPAMGR und pPAMGRK	S. 88
Abb. 47	Klonierung von pPAMGK und pPAMGKK	S. 89
Abb. 48	Kontrollschnitte von pPAMGK und pPAMGKK	S. 90

Abb. 49	Klonierung von pPAMRA und pPAMRAK	S. 90
Abb. 50	Kontrollschnitte von pPAMRA und pPAMRAK	S. 91
Abb. 51	Klonierung von pPAMKA und pPAMKAK	S. 92
Abb. 52	Kontrollschnitte pPAMKA und pPAMKAK	S. 92
Abb. 53	Klonierung von pPAMRG und pPAMRGK	S. 93
Abb. 54	Kontrollschnitte von pPAMRG und pPAMRGK	S. 93
Abb. 55	Klonierung von pPAMKG und pPAMKKGK	S. 94
Abb. 56	Kontrollschnitte von pPAMKG und pPAMKKGK	S. 95
Abb. 57	Klonierung von pPAMSARK	S. 95
Abb. 58	Kontrollschnitte von pPAMSARK	S. 96
Abb. 59	Klonierung von pPAMSRGK	S. 97
Abb. 60	Kontrollschnitte von pPAMSRGK	S. 98
Abb. 61	Klonierung von pPAMSRRK	S. 99
Abb. 62	Kontrollschnitte von pPAMSRRK	S. 100
Abb. 63	Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen	S. 100
Abb. 64	Binäre Plasmide ohne Immuntoxininfusionsgene	S. 101
Abb. 65	Binäre Plasmide mit Fusionsgenen, die für Immuntoxine mit der Toxindomäne am N-Terminus codieren	S. 101
Abb. 66	Binäre Plasmide mit Fusionsgenen, die für Immuntoxine mit der Bindedomäne am N-Terminus codieren	S. 102
Abb. 67	Binäre Plasmide mit Fusionsgenen, an deren 5'-Ende sich die Sequenz für ein Signalpeptid zur ER-Lokalisation befindet	S. 102
Abb. 68	In-Cell-PCR von <i>A. tumefaciens</i> mit pPAMSRGK	S. 103
Abb. 69	In-Cell-PCR von <i>A. tumefaciens</i> mit pPAMSRRK	S. 104
Abb. 70	In-Cell-PCR von <i>A. tumefaciens</i> mit pPAMSARK	S. 105
Abb. 71	Southern Blot der DNA von <i>A. tumefaciens</i> GV3101 mit pPAMSARK	S. 105
Abb. 72	Anzucht von transgener <i>N. tabacum</i>	S. 107
Abb. 73	Gewinnung von Samen aus <i>N. tabacum</i>	S. 107
Abb. 74	Keimung von Samen auf MS-Festmedium	S. 108
Abb. 75	Graphische Darstellung der Keimungsraten	S. 109
Abb. 76	Wachstum der F <sub>1</sub> -Generation auf MS-Festmedium mit Kanamycin (100 mg/l)	S. 110
Abb. 77	PCR zum Nachweis des Immuntoxins in <i>N. tabacum</i> (F <sub>0</sub> -Generation)	S. 111
Abb. 78	Southern Blot der DNA von transgenen <i>N. tabacum</i>	S. 112
Abb. 79	PCRs zum Nachweis des Immuntoxins in <i>N. tabacum</i> (F <sub>1</sub> -Generation)	S. 113
Abb. 80	Nachweis auf mRNA-Ebene in der F <sub>0</sub> -Generation	S. 114
Abb. 81	Nachweis auf mRNA-Ebene in der F <sub>1</sub> -Generation	S. 115
Abb. 82	Eichungen der Bradfordmessung	S. 116
Abb. 83	Proteinkonzentrationen in den fraktionierten Eluaten der Tabakpflanzen der F <sub>0</sub> -Generation	S. 118
Abb. 84	Proteinkonzentrationen in den Fraktionen der Tabakpflanzen der F <sub>1</sub> -Generation	S. 119
Abb. 85	SDS-PAGE in der F <sub>0</sub> -Generation	S. 121
Abb. 86	SDS-PAGE in der F <sub>1</sub> -Generation	S. 121
Abb. 87	Dot Blot nach Hybridisierung mit Penta-His Antibody (Primärantikörper) und Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase Conjugate (Sekundärantikörper) und anschließender Färbung mit NBT / BCIP	S. 122
Abb. 88	Western Blot	S. 123
Abb. 89	Fluorometrische Messungen von mit Kanamycin behandelten <i>W. australiana</i>	S. 125
Abb. 90	Fluorometrische Messungen von mit Paromomycin behandelten <i>W. australiana</i>	S. 126
Abb. 91	Fluorometrische Messungen von mit G-418 behandelten <i>W. australiana</i>	S. 126
Abb. 92	Behandlung von <i>W. australiana</i> mit Kanamycin im Starklicht (6400 lux)	S. 127

Abb. 93	Behandlung von <i>W. australiana</i> mit Paromomycin im Starklicht (6400 lux)	S. 128
Abb. 94	Behandlung von <i>W. australiana</i> mit G-418 im Starklicht (6400 lux)	S. 128
Abb. 95	Behandlung von <i>W. australiana</i> mit Paromomycin im Starklicht (6400 lux)	S. 129
Abb. 96	Behandlung von <i>W. australiana</i> mit G-418 im Starklicht (6400 lux)	S. 130
Abb. 97	Selektion	S. 131
Abb. 98	PCR zum Nachweis der Transkription des Immuntoxingens mit den Primern Lfor und KDELrev	S. 132
Abb. 99	PCRs auf geextrahierte Banden einer PCR mit den Primern Lfor, KDELrev mit den Primern	S. 132

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Stadieneinteilung des Hodgkin Lymphoms	S. 15
Tab. 2	Organismen	S. 38
Tab. 3	Plasmide	S. 38
Tab. 4	binäre Plasmide	S. 39
Tab. 5	PCR-Primer	S. 40
Tab. 6	Geräte	S. 41
Tab. 7	Chemikalien und Kits	S. 43
Tab. 8	Keimungsraten	S. 109
Tab. 9	Eichungen der Bradfordmessung mit BSA	S. 116
Tab. 10	Bestimmung der Interaktion der verwendeten Puffer mit dem Bradford-Reagenz	S. 117
Tab. 11	Proteinkonzentrationen in den Fraktionen der Tabakpflanzen aus der F <sub>0</sub> -Generation in mg/l	S. 117
Tab. 12	Proteinkonzentrationen in den Fraktionen der Tabakpflanzen aus der F <sub>1</sub> -Generation in mg/l	S. 119
Tab. 13	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Tabak	S. 124

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Hodgkin Lymphom

Das Hodgkin Lymphom, auch Morbus Hodgkin oder Lymphgranulomatose genannt, ist eine maligne Erkrankung des Lymphsystems. Sie ist benannt nach dem englischen Arzt Thomas Hodgkin, der die Krankheit erstmals beschrieb (Hodgkin, 1832).

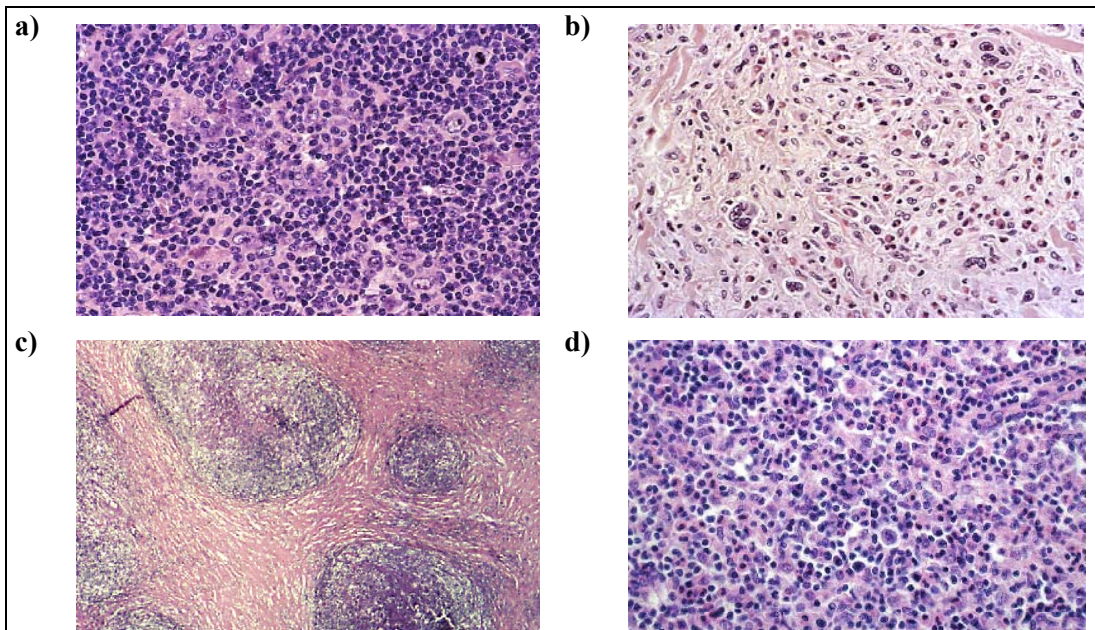
Klinisch manifestiert sich das Hodgkin Lymphom zumeist durch schmerzlos vergrößerte Lymphknoten. Typischerweise finden sich diese im Zervikalbereich (60 %), im Mediastinum (30 %), in den Achselhöhlen (20 %), der Inguinalregion (15 %) oder im Abdomen (15 %) (Rüffer & Diehl, 2002). In fortgeschrittenen Stadien können auch Milz, Knochenmark, Leber oder Lunge befallen sein (Sieber *et al.*, 2003). Bei etwa einem Drittel der Patienten können B-Symptome wie Fieber, Leistungsabfall, Nachtschweiß, Gewichtsverlust und Juckreiz beobachtet werden (Rüffer & Diehl, 2002).

In Deutschland wird die Inzidenz mit etwa drei Erkrankungen pro  $10^5$  Einwohner und Jahr angegeben (Sieber *et al.*, 2003). Die Altersverteilung entspricht einer bimodalen Kurve mit den höchsten Raten im Alter von 15 - 40 und über 55 Jahren (Whelan & Ferlay, 1992).

#### 1.1.1 Klassifizierung

Aufgrund der vielfältigen Symptomatik des Hodgkin Lymphoms war es nötig, verschiedene Formen in einer allgemein gültigen Einteilung zu definieren. Die Grundlage für die heute verwendete Einteilung bildet eine Klassifizierung aus dem Jahr 1966, welche aufgrund morphologischer Charakteristika vier Subtypen voneinander unterschied (Lukes & Butler, 1966). Diese wurde im Jahr 1994 durch die REAL (Revised European-American Lymphoma)-Klassifizierung (Harris *et al.*, 1994) und im Jahr 1999 durch die Klassifizierung der WHO (World Health Organization) (Harris *et al.*, 1999) erweitert. Seitdem werden zwei Hauptgruppen unterschieden: das nodulär lymphocytenprädominierende Hodgkin Lymphom (NLPHL) und das klassische Hodgkin Lymphom (cHL), welches sich in die lymphocytenreiche (LR), die lymphocytenarme (LD), die nodulär sklerosierende (NS) und die gemischtzellige Form (MC) aufspaltet. Das NLPHL macht nur etwa 5 % aller auftretenden Fälle aus, die übrigen 95 % entfallen auf die klassische Form (Gandhi *et al.*, 2004).

Histologisch zeichnen sich die klassischen Hodgkin Lymphome durch das Vorkommen multinukleärer Riesenzellen, den Reed-Sternberg (RS)-Zellen (Reed, 1902; Sternberg, 1898) oder deren mononukleärer Variante, den Hodgkin (H)-Zellen, aus (siehe Abb. 1). Diese machen oft nur bis zu 2 % der Tumormasse aus und sind von so genannten Bystander-Zellen wie Lymphocyten, Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulocyten und Fibroblasten umgeben (Kadin, 1994). Den Lymphomen des NLPHL fehlen die RS- und die H-Zellen, stattdessen treten hier so genannte lymphocytäre und histiocytäre (L&H) Zellen auf (Re *et al.*, 2005b).

**Abb. 1****Histologisches Bild des klassischen Hodgkin Lymphom**

(mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. A. Engert)

- a) lymphocytenreiche Form (LR cHL)      b) lymphocytenarme Form (LD cHL)**  
**c) nodulär sklerosierende Form (NS cHL)      d) gemischtzellige Form (MC cHL)**

**1.1.2 Entstehung**

Hodgkin Lymphome entwickeln sich aus B-Lymphocyten (Küppers, 1994). Die L&H-Zellen des NLPHL weisen eine Vielzahl genereller B-Zell-Marker auf, während die RS- und H-Zellen des cHL nur in Ausnahmefällen B-Zell-spezifische Gene exprimieren (Re *et al.*, 2005a). Hier finden sich charakteristischerweise die Oberflächenmarker CD15, CD25, CD30, CD40, CD54, CD70, CD71, CD80, CD86 und MHC II (Gruss & Kadin, 1996). Ein einzigartiges Zeichen der RS- und H-Zellen ist die konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) (Bargou *et al.*, 1997), welcher als wichtiges Überlebenssignal in den Zellen fungiert. So entstehen Zellen, welche einer negativen Selektion in den Lymphknoten durch ihren apoptose-resistenten Phänotyp entkommen (Re *et al.*, 2005c).

Bei der Entstehung der Lymphome des cHL scheinen unterschiedliche Faktoren eine Rolle zu spielen:

- Gonosomal vererbte oder hormonelle Faktoren:

Männer sind häufiger von der Krankheit betroffen als Frauen (Rüffer & Diehl, 2002).

- Genetische Faktoren:

Die Inzidenz des Hodgkin Lymphoms ist stark rassenabhängig. So ist die zuvor beschriebene bimodale Altersverteilung nur unter den Weißen in Europa und Nordamerika zu finden. Bei Patienten anderer Abstammung ist der Peak für Erkrankungen im Alter von 15 - 40 Jahren nur marginal vorhanden oder fehlt ganz (Meyer *et al.*, 2004). Auch zeigt sich ein familiär gehäuftes Auftreten der Krankheit (Sieber *et al.*, 2003).

- Epstein-Barr-Virus:

Etwa 30 % - 50 % aller Fälle des cHL in Europa und Nordamerika sind mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV), dem Erreger der infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber), assoziiert (Gandhi *et al.*, 2004). In Entwicklungsländern findet sich das Virus sogar in bis zu 96 % aller untersuchten Fälle (Sieber *et al.*, 2003). Die mittlere Zeit zwischen einer Erkrankung mit infektiöser Mononukleose und dem Auftreten des Hodgkin Lymphoms beträgt vier Jahre (Gandhi *et al.*, 2004).

- Immundefekte:

Hodgkin Lymphome treten vermehrt bei immundefizienten Patienten auf, die zum Beispiel durch eine vorangegangene Chemotherapie oder durch das erworbene Immunschwäche-Syndrom (AIDS) geschwächt sind (Freedman & Nadler, 1998). Die Inzidenz bei mit dem menschlichen Immundefizienz-Virus (HIV) infizierten Patienten ist etwa um das Drei- bis Zehnfache erhöht (Meyer *et al.*, 2004).

Über die Entstehung der L&H-Zellen des NLPHL ist weit weniger bekannt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass ein grundsätzlich anderer pathogener Mechanismus zugrunde liegt, als für die RS- und H-Zellen des cHL postuliert wird (Sieber *et al.*, 2003).

### 1.1.3 Krankheitsverlauf

Die Ausbreitung des Hodgkin Lymphoms im Organismus ist im Allgemeinen vorhersagbar. Zumeist werden als Erstes die Lymphknoten befallen. Später findet eine Streuung auf Milz und Leber und schließlich auf das Knochenmark und andere extranodale Organe statt (Ping Lu, 2005). Die Basis für eine Klassifizierung des Verlaufs bietet die so genannte Rye-Klassifizierung (Rosenberg, 1966), welche im Ann-Arbor-System (Carbone *et al.*, 1971) überarbeitet wurde. Sie gliedert den Verlauf in vier Stadien (I - IV) (siehe Tab. 1).

<b>Tab. 1</b>	
<b>Stadieneinteilung des Hodgkin Lymphoms</b>	
<b>Stadium</b>	<b>Befall</b>
<b>I</b>	eine Lymphknotenregion oder ein extranodaler Herd
<b>II</b>	zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Zwerchfellseite
<b>III</b>	zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells
<b>IV</b>	disseminierter Befall extralymphatischer Organe mit oder ohne Befall der Lymphknoten

Das Auftreten von B-Symptomen wird durch den Zusatz ‚B‘ an die Nummer des Stadiums vermerkt, das Fehlen derselben durch den Zusatz ‚A‘. Sind zusätzlich extranodale Gewebe befallen, wird der Zusatz ‚E‘ angefügt. Eine weitere Unterteilung dieser Klassifizierung bietet die Cotswolds Revision, welche die vier Stadien je nach befallenen Geweben in weitere Subklassen aufteilt (Lister *et al.*, 1989).



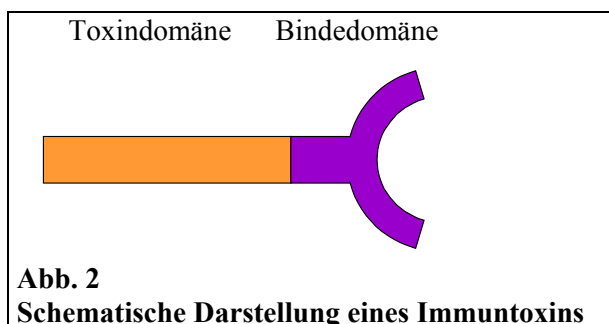
### 1.1.4 Therapie

Hodgkin Lymphome werden klassischerweise mit Strahlentherapie, Chemotherapie oder einer Kombination derselben therapiert. Die Heilungschancen liegen über 80 % (Meyer *et al.*, 2004). Bei Patienten der Stadien I und II können sogar über 95 % erfolgreich therapiert werden (Cheson, 2004). In fortgeschrittenen Stadien kommt es jedoch in 30 % - 50 % der Fälle zu einem Rezidiv (Valagussa, 1993). Rückfallpatienten sind weit schwieriger zu therapieren und können nur in weniger als 30 % aller Fälle dauerhaft geheilt werden (Borchmann *et al.*, 2005). Ursache ist die hohe Resistenz derjenigen Tumorzellen, die eine Standardtherapie überlebt haben (Barth *et al.*, 2000b).

Auch die Nebenwirkungen der klassischen Therapieansätze sind nicht zu vernachlässigen. Für an Hodgkin Lymphom erkrankte Patienten ist heutzutage die Wahrscheinlichkeit höher, an akuten oder Spätfolgen der Therapie zu sterben als an der Krankheit selbst (Re *et al.*, 2005b). So gilt es, alternative Behandlungsmöglichkeiten zu finden, die die hohen Heilungsraten erhalten, aber zeitgleich deren Nebenwirkungen reduzieren. Da Rezidive nur selten dauerhaft geheilt werden können, sollte das Auftreten derselben möglichst verhindert werden. Ein vielversprechender Ansatz liegt in der Immuntherapie mit Antikörpern oder Immuntoxinen (siehe 1.2).

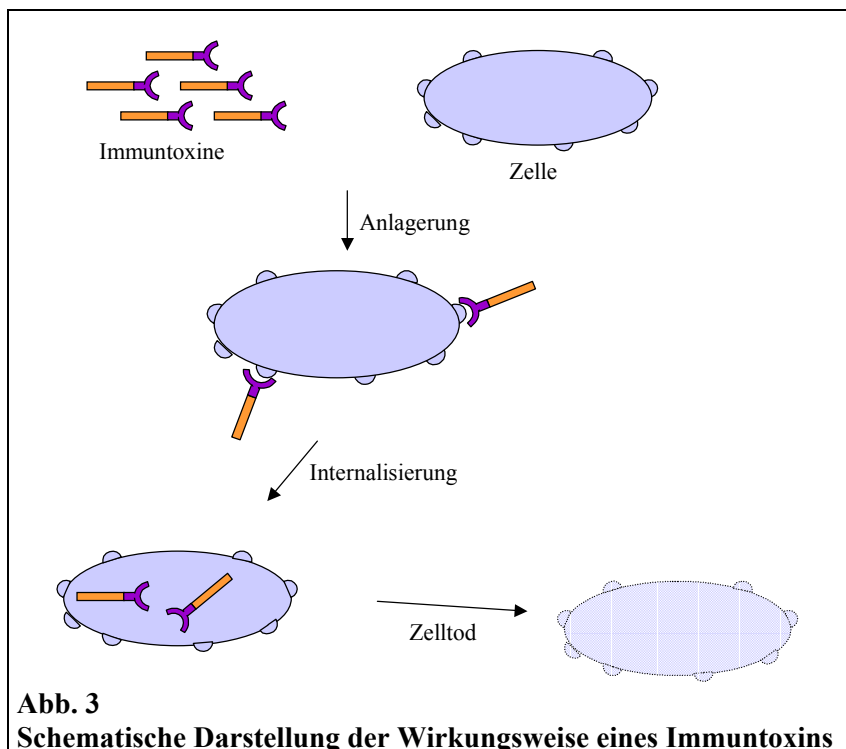
## 1.2 Immuntoxine

Immuntoxine (siehe Abb. 2) entstehen durch Kopplung einer Bindungsstruktur an eine toxische Komponente (Kreitman, 1999). Die Bindedomäne wird meist durch einen Antikörper oder einen Teil desselben repräsentiert, es kommen aber auch Wachstumsfaktoren oder Interleukine zum Einsatz (Kreitman & Pastan, 1994b). Als Toxine werden zumeist pflanzliche oder bakterielle Gifte eingesetzt (Schnell *et al.*, 2002a). Immuntoxine stellen somit Moleküle dar, die eine hohe Spezifität mit cytotoxischer Potenz verbinden. Auf diese Weise entstehen effizient wirksame Zellgifte, durch die entartete Zellen spezifisch zerstört werden können, gesunde Zellen jedoch verschont bleiben (Brinkmann *et al.*, 2001).



Immuntoxine werden in erster Linie in der Therapie von Krebserkrankungen verwendet (Silverstein, 2004). Weitere Anwendungsbereiche liegen in der Therapie des erworbenen Immunschwäche-Syndroms (AIDS) (Till *et al.*, 1989), Graft-Versus-Host Disease (GVHD) (Filipovitch *et al.*, 1987) und der Behandlung bei Organtransplantationen (Kahan *et al.*, 1999).

Durch entsprechende Bindungsdomänen werden antigene Strukturen auf den Oberflächen der Zielzellen erkannt. Die Toxindomäne ruft nach einer Internalisierung schließlich das Absterben dieser Zellen hervor (siehe Abb. 3) (FitzGerald *et al.*, 2004).



Bereits im Jahr 1906 postulierte Paul Ehrlich das Prinzip einer gezielten Elimination von Tumorzellen durch „Zauberkekeln“ (Ehrlich, 1906). Das weltweit erste Immuntoxin wurde dann im Jahr 1970 mittels chemischer Kopplung polyklonaler Antikörper an Diphtherie-Toxin synthetisiert (Moolten & Cooperband, 1970).

In der praktischen Anwendung von Immuntoxinen zeigten sich jedoch schon bald ein Reihe von Problemen: die Spezifität, das Penetrationsvermögen in den Tumor, die Immunogenität und die toxischen Nebenwirkungen (Silverstein, 2004). Bis heute sind in diesen Bereichen viele Fortschritte erzielt worden, welche Immuntoxine zu wirkungsvollen Therapeutika werden lassen (siehe 1.2.1 - 1.2.4).

### 1.2.1 Spezifität

Spezifische Behandlungen sind nur dann möglich, wenn das gewählte Zielantigen überwiegend auf den Zielzellen vorkommt und nicht auf wichtigen Organen oder Stammzellen exponiert wird. Spezifische Marker sind jedoch höchst selten. Im Normalfall sind sie auch auf gesunden Zellen präsent (Niv *et al.*, 2001). Hier gilt es Oberflächenmarker zu finden, die in den Zielzellen eine hohe und homogene Expressionsrate aufweisen, jedoch auf möglichst wenigen anderen Zellen zu finden sind und dort nur in geringer Anzahl (Niv *et al.*, 2001). Lassen sich mehrere solcher Marker auf den Zielzellen finden, so bietet sich die Gabe eines Cocktails zweier oder mehrerer gegen verschiedene Antigene gerichteter Immuntoxine an. Dies führt zu besseren Effekten als die

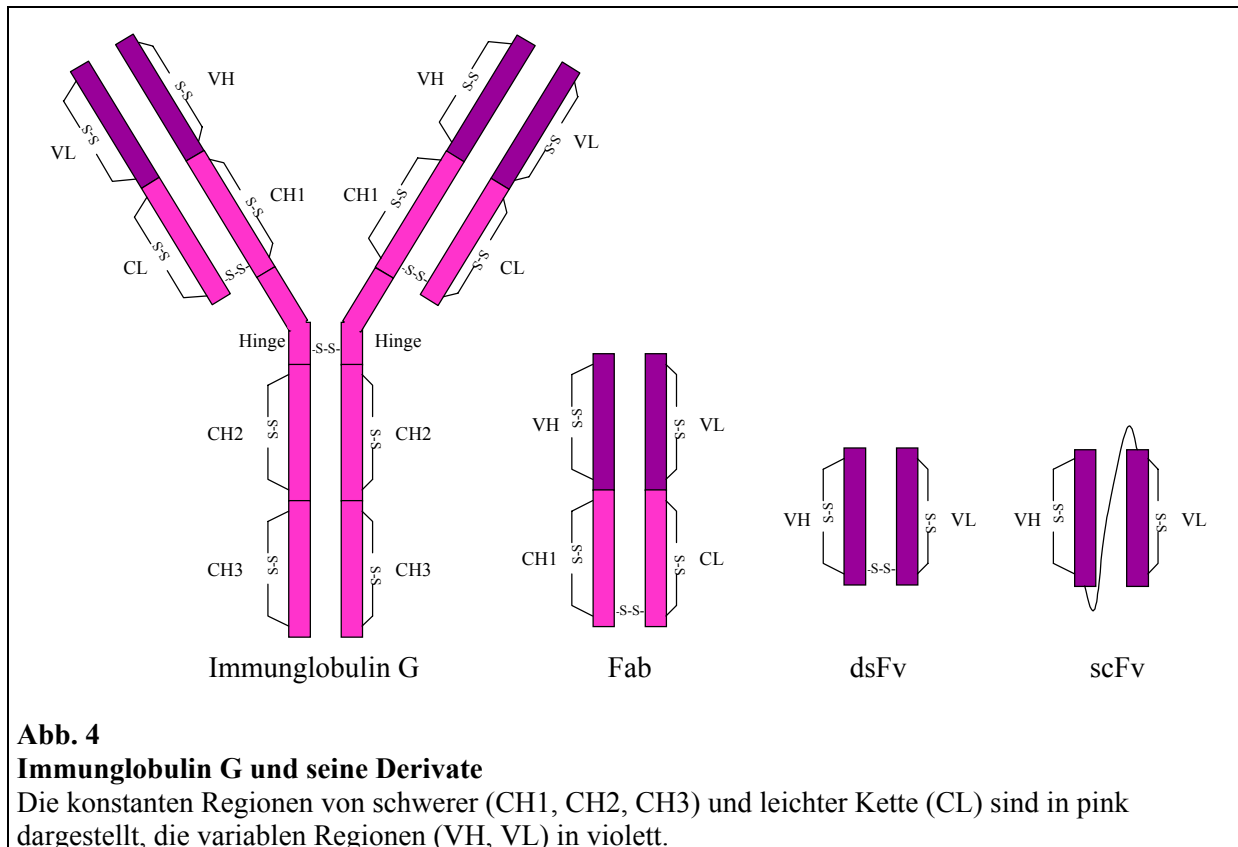
Verwendung eines einzelnen Immuntoxins (Engert *et al.*, 1995). Die verwendeten Bindedomänen der Immuntoxine sollten spezifisch an die gewählte Zielantigene binden. Unspezifische Bindungen an andere Oberflächenstrukturen können zum ungewollten Vergiften gesunder Zellen führen und müssen vermieden werden (Niv *et al.*, 2001).

Stets muss abgewägt werden, inwiefern eine Schädigung gesunder Zellen tolerierbar ist. So ist beispielsweise ein Abtöten von Lymphocyten vertretbar, da diese kontinuierlich vom Knochenmark nachgebildet werden. Bei Schädigung anderer Zelltypen wie etwa Nervenzellen, die sich nur sehr langsam oder gar nicht regenerieren können, sollte auf eine Behandlung mit entsprechenden Immuntoxinen verzichtet werden (Vitetta & Thorpe, 1991).

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Wahl des Zielantigens ist, dass dieses internalisiert werden muss. Nur so kann ein Transport des Immuntoxins in das Cytosol gewährleistet werden, welcher für die Wirksamkeit der Toxindomäne Voraussetzung ist (Niv *et al.*, 2001). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Cytotoxizität von Immuntoxinen mit der Rate ihrer Internalisierung korreliert (Wargalla & Reisfeld, 1989).

### 1.2.2 Penetrationsvermögen

Damit Immuntoxine ihre volle Kraft entfalten können, muss eine gute Erreichbarkeit der malignen Zellen gewährleistet sein. Aufgrund der Größe der ersten Generation von Immuntoxinen war deren Zugänglichkeit zu den Zielzellen jedoch stark limitiert (Niv *et al.*, 2001). Ein wirkungsvoller Ansatz lag in einer Reduzierung der Größe des als Bindedomäne verwendeten Antikörpers. Statt ganzer Immunglobuline G (IgG) (siehe Abb. 4) wurden Fragmente derselben verwendet (Niv *et al.*, 2001). Ein erster Schritt war die Verwendung von Fab (Fragment antigen binding), welche aus einem Teil der schweren Kette (CH1 und VH) und der gesamten leichten Kette des IgG (CL und VL) bestehen (Hayden *et al.*, 1997) (siehe Abb. 4). In den folgenden Jahren kamen noch weiter verkleinerte Fragmente, die nur noch aus den variablen, antigenbindenden Strukturen des IgG (VH und VL) bestehen, zum Einsatz. Hier wird zwischen dsFv (disulfide stabilized Fragment variable) und scFv (single chain Fragment variable) unterschieden (siehe Abb. 4). Beim dsFv liegen zwei Polypeptidketten vor, die über eine Disulfidbrücke miteinander kovalent verbunden sind (Reiter, 1996). Beim scFv schließlich sind diese Polypeptidketten über einen Peptidlinker direkt miteinander verknüpft und bilden ein einziges Protein (Bird *et al.*, 1988). Dieser Linker kann unterschiedlich in Länge und Sequenz sein (Hayden *et al.*, 1997), häufig wird jedoch ein flexibler (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-Linker (Huston *et al.*, 1988) verwendet.



Bindedomäne und Toxindomäne wurden klassischerweise chemisch gekoppelt. Die Produkte solcher Kopplungen waren jedoch oft inhomogen und beinhalteten normalerweise Moleküle, deren Binde- und Toxindomänen an ungünstigen Positionen verknüpft waren. Dies wirkte sich negativ auf die Effektivität des Immuntoxins aus (Barth *et al.*, 1998a).

Die Verwendung eines scFv eröffnete die Möglichkeit der Synthese rekombinanter Immuntoxine. Hier können Bindedomäne und Toxindomäne schon auf genetischer Ebene zusammengefügt und als Fusionsprotein exprimiert werden. Auf diese Weise ist der Erhalt homogener definierter und kleinerer Moleküle möglich (Kreitman, 1999). Diese sind zudem leicht zu modifizieren und ökonomisch zu produzieren (Barth *et al.*, 2000a). Der scFv kann in diesen Fusionsproteinen sowohl am N-Terminus als auch C-Terminus liegen (Hayden *et al.*, 1997). Auch wenn Immuntoxine mit einem scFv auf diese Weise relativ einfach herzustellen sind, gibt es einige Limitationen. Sie sind im Vergleich zu den Immuntoxinen, die ein komplettes IgG oder ein Fab enthalten, oft instabil (Bera & Pastan, 1998). Auch Immuntoxine mit dsFv als Bindedomäne sind durch die stabilisierende Disulfidbrücke stabiler als jene mit scFv (Niv *et al.*, 2001). Zusätzlich haben Toxine mit scFv oder dsFv eine im Vergleich zu größeren Immuntoxinen wesentlich kürzere Halbwertszeit im Blutkreislauf (Bera & Pastan, 1998). Dennoch ist es möglich, hocheffiziente Immuntoxine unter Verwendung von scFv herzustellen (Niv *et al.*, 2001).

Trotz der so erreichten Verkleinerung der Immuntoxine eignen sich feste Tumore durch das Vorkommen von Tight Junctions, einer heterogenen Blutzufuhr und hohem interstitiellen Druck nur schlecht für eine Therapie mit Immuntoxinen (Jain, 1996). Bei der Therapie von hämatologischen und lymphatischen Tumoren bergen Immuntoxine jedoch ein großes Potenzial (Klimka *et al.*, 1999).

### 1.2.3 Immunogenität

Die Anwendungsmöglichkeiten von Immuntoxinen werden häufig durch ihre Immunogenität limitiert (Hayden *et al.*, 1997). Als Bindedomänen werden häufig murine Antikörper oder Fragmente derselben verwendet, und als Toxindomänen kommen Gifte aus Bakterien oder Pflanzen zum Einsatz (Schnell *et al.*, 2002a). Bei wiederholter Gabe von Immuntoxinen erschwert die Bildung menschlicher Anti-Maus-Antikörper (HAMA) und menschlicher Anti-Toxin-Antikörper (HATA) die Effizienz der Therapie (Silverstein, 2004).

Da Patienten, die mit Immuntoxinen behandelt werden, aber oftmals immunsupprimiert sind, ist eine solche Therapie in einigen Fällen dennoch vielversprechend (Payne, 2003). Nichtsdestotrotz besteht an dieser Stelle ein Verbesserungsbedarf. Eine einfache Methode ist die zusätzliche Behandlung mit immunsuppressiven Agenzien (Frankel, 2004). Auch kann die Stärke der menschlichen Immunantwort durch eine Verringerung der Größe des Immuntoxins reduziert werden. Die Verwendung von dsFv oder scFv statt ganzer IgG bringt somit auch hier eine Verbesserung (Niv *et al.*, 2001). Sehr Erfolg versprechend ist eine Humanisierung der Immuntoxine (Rybak *et al.*, 1992). Hier werden humane oder humanisierte Binde- und Toxindomänen verwendet, welche keine oder eine weit geringere Immunantwort im menschlichen Körper hervorrufen. Bindedomänen können zum Beispiel aus einem natürlich vorkommenden humanen Liganden bestehen (Barth *et al.*, 1998b). Weitere Möglichkeiten liegen in der Verwendung muriner Antikörper, in denen einzelne Aminosäuren ausgetauscht wurden, oder der Synthese komplett humaner Antikörper (Payne, 2003). Im Bereich der Toxindomäne können humane Toxine statt bakterieller oder pflanzlicher verwendet werden. Aber auch in den Toxinen anderer Herkunft könnte eventuell durch den gezielten Austausch einzelner Aminosäuren die menschliche Immunantwort verringert werden. So sind im häufig verwendeten Ricin Toxin A (RTA) (siehe 1.3.2.1) bereits Epitope bekannt, welche vornehmliches Ziel der neutralisierenden Immunantwort sind (Castelletti *et al.*, 2004).

### 1.2.4 Toxische Nebenwirkungen

Die Behandlung mit Immuntoxinen kann toxische Nebenwirkungen hervorrufen, die limitierend auf die verabreichte Dosis wirken können. Hier ist vor allem das Vascular Leak Syndrom (VLS) zu nennen. Dieses manifestiert sich in erhöhter Ausschüttung von Albumin und anderen Proteinen, Retention von Wasser in peripheren Geweben und Gewichtszunahme. Außerdem kann es zur Bildung von Lungenödemen führen (Vitetta & Thorpe, 1991). Verantwortlich ist ein strukturelles Motiv, welches in verschiedenen Toxinen vorkommt. Die Aminosäuresequenz (x)Asp(y), wobei (x) Leu, Ile, Gly oder Val entspricht und (y) Val, Leu oder Ser, ist verantwortlich für diesen Effekt (Baluna *et al.*, 1999). Eine Eliminierung dieses Motivs führt zu Immuntoxinen, die kein VLS hervorrufen (Smallshaw *et al.*, 2003).

## 1.3 Immuntoxine gegen das Hodgkin Lymphom

Die Tumoren des Hodgkin Lymphoms sind gut vaskularisiert und die Anzahl der verstreut liegenden H- bzw. RS-Zellen (siehe 1.1.1) ist nur gering. Sie bieten somit ein ideales Ziel für eine Therapie mit Immuntoxinen (Engert *et al.*, 1997).

Die Oberflächenmarker CD25 und CD30 sind auf den H- und RS-Zellen stark überexprimiert, während sie ansonsten nur in geringem Maße auf aktivierten Lymphocyten vorkommen (Stein *et al.*, 1989). Sie können somit als Zielantigene für eine effiziente Therapie des Hodgkin Lymphoms mit Immuntoxinen verwendet werden (Borchmann *et al.*, 2005).

### 1.3.1 Zielantigene und Bindedomänen

#### 1.3.1.1 CD30 und Ki-4

CD30 ist ein membranverankerter Rezeptor und gehört zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) (Dürkop *et al.*, 1992). Sein natürlicher Bindungspartner im menschlichen Organismus ist der CD30-Ligand (CD30L). Das System von CD30 / CD30L kann sowohl als positiver als auch als negativer Wachstumsregulator fungieren. Häufig findet eine Induktion von Apoptose statt. In Anwesenheit von NF $\kappa$ B, welches im cHL konstitutiv aktiviert ist (siehe 1.1.2), wird jedoch Proliferation induziert (Granados & Hwang, 2004).

CD30 hat ein Molekulargewicht von etwa 120 kDa. Durch das so genannte Shedding kann eine lösliche Form (sCD30) mit einem Gewicht von etwa 85 kDa abgespalten werden (Younes & Kadin, 2003). Eine solche Abspaltung löslicher Ektodomänen ist bei verschiedensten Membranproteinen zu finden. Sie wird durch Antikörperbindung induziert und von Metalloproteasen katalysiert (Matthey *et al.*, 2004). Bei CD30 ist diese Protease das TNF- $\alpha$ -konvertierende Enzym (TACE) (Hansen *et al.*, 2000). In an Hodgkin Lymphom erkrankten Patienten ist die Konzentration von sCD30 im Serum erhöht und kann mit der Schwere des Krankheitsverlaufs korreliert werden (Nadali *et al.*, 1997).

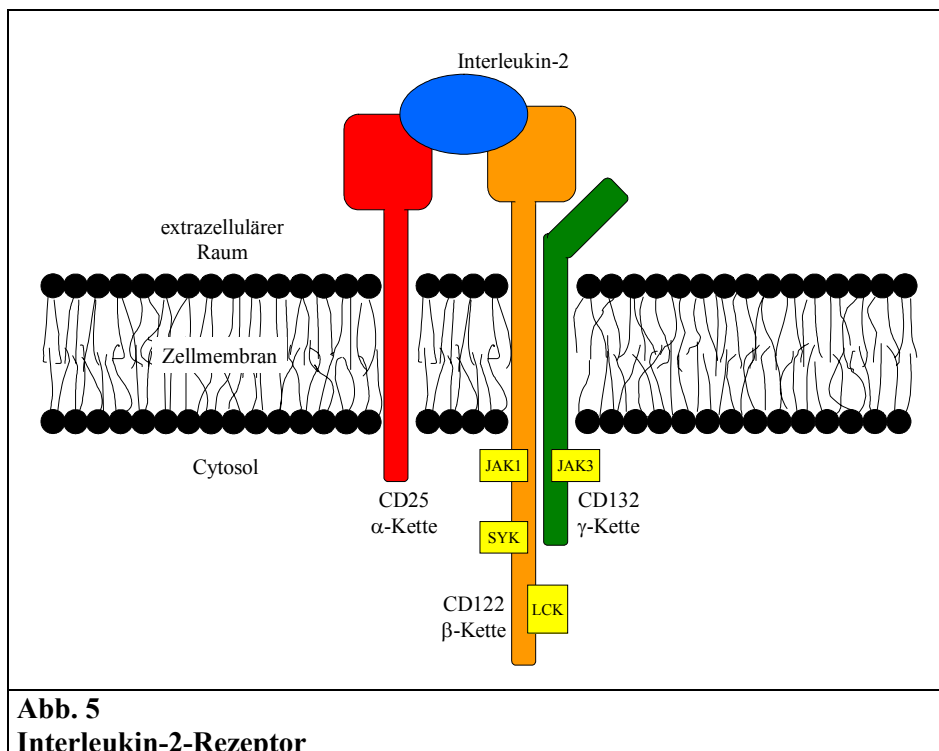
Durch das Shedding schützen sich die Zielzellen vor einer durch Antikörperbindung hervorgerufenen Immunreaktion (Matthey *et al.*, 2004). Dies ist bei einer Behandlung mit Immuntoxinen unerwünscht. Hier gibt es zwei mögliche Strategien, das Shedding zu verhindern. Einmal können Inhibitoren für die Metalloproteasen verwendet werden, zum anderen können Antikörper generiert werden, die das Shedding verhindern (Matthey *et al.*, 2004).

Ki-4 ist ein spezifischer muriner Antikörper gegen CD30, welcher das Shedding verhindert (Horn-Lohrens *et al.*, 1995). Es wird vermutet, dass dies durch Bindung an eine shedding-relevante Erkennungsstelle geschieht (Matthey *et al.*, 2004). Ein Konstrukt aus Ki-4 und deglycosyliertem Ricin Toxin A (dgA) (siehe 1.3.2.1) zeigte spezifische Effizienz *in vitro* und *in vivo* (Schnell *et al.*, 1995). Erste klinische Studien wurden mit diesem Immuntoxin durchgeführt und zeigten moderate Effizienz in Patienten mit refraktärem Hodgkin Lymphom (Schnell *et al.*, 2002b).

Aus Ki-4 konnte unter Verwendung eines  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ -Linkers (Huston *et al.*, 1988) ein scFv hergestellt werden, welcher vergleichbare Bindungseigenschaften wie das komplette IgG aufweist (Klimka *et al.*, 1999). Dieser eignet sich besonders zur Herstellung spezifischer und effizienter Immuntoxine. Ein Immuntoxin bestehend aus Ki-4(scFv) und einer Deletionsmutante von *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA') zeigte vielversprechende Ergebnisse *in vitro* (Klimka *et al.*, 1999) und *in vivo* (Barth *et al.*, 2000b).

### 1.3.1.2 CD25 und RFT5

CD25, auch als Tac bekannt, bildet die  $\alpha$ -Kette des humanen Interleukin-2-Rezeptors (IL2R) (Morris & Waldmann, 2000). Dieser Rezeptor kann in drei unterschiedlichen Formen vorliegen. Die  $\alpha$ -Kette alleine bildet einen niedrig affinen Rezeptor, ein Dimer aus  $\beta$ -Kette und  $\gamma$ -Kette eine intermediäre Form und ein Trimer aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette schließlich den hochaffinen Rezeptor (Church, 2003). Alle drei Proteine des Rezeptors sind Transmembranproteine (siehe Abb. 5). Die  $\alpha$ -Kette (CD25) hat ein Molekulargewicht von 55 kDa (Leonard *et al.*, 1984), die  $\beta$ -Kette (CD122) ein Gewicht von 75 kDa (Tsudo *et al.*, 1986) und die  $\gamma$ -Kette (CD132) ein Gewicht von 64 kDa (Takeshita *et al.*, 1992). CD122 ist nicht nur Bestandteil des IL2R, sondern ist auch am Aufbau des Interleukin-15-Rezeptors (IL15R) beteiligt (Bamford *et al.*, 1994). CD132 ist Teil von mindestens sechs weiteren Cytokin-Rezeptoren und wird deshalb auch „common receptor“  $\gamma_c$  genannt (Leonard *et al.*, 1994). CD25 liegt ausschließlich im IL2R vor und scheint somit der Schlüssel zur Spezifität dieses Rezeptors zu sein (Church, 2003).



**Abb. 5**  
**Interleukin-2-Rezeptor**

Der natürliche Ligand des IL2R im menschlichen Organismus ist das Interleukin-2 (IL2) (Morgan *et al.*, 1976). Dieses bindet zunächst an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, gefolgt von einer Trimerisierung mit der  $\gamma$ -Kette, um intrazelluläre Signalmechanismen zu aktivieren (Church, 2003). Der IL2R selbst hat keinerlei intrinsische Enzymaktivität, sondern vermittelt seine Signale über verschiedene Kinasen wie LCK (lymphocytenspezifische Protein-Tyrosin Kinase), SYK (Milz-Tyrosin Kinase) (Zhou *et al.*, 2000) oder den JAK (Janus Kinase)-STAT (Signal Transducer und Aktivator der Transkription)-Signalweg (Johnston *et al.*, 1994). So kann durch das System IL2 / IL2R Zellteilung induziert werden (Church, 2003).

Auch CD25 kann durch Shedding eine lösliche Form bilden. Das resultierende Protein ist 45 kDa schwer und wird als sIL2R $\alpha$  oder sTac bezeichnet (Junghans *et al.*, 1996). Seine Konzentration im Serum ist proportional zur Expression des CD25 auf der Zelloberfläche (Morris & Waldmann, 2000). In Patienten mit Hodgkin Lymphom ist diese Konzentration im Vergleich zu gesunden Personen erhöht und steht in Beziehung zum Ausmaß der Erkrankung (Ambrosetti *et al.*, 1993). Ein Grund für diese Überexpression könnte in der konstitutiven Aktivierung von NF $\kappa$ B im Hodgkin Lymphom liegen, welches als Enhancer für die Expression von CD25 fungiert (Gomez *et al.*, 1997).

RFT5 ist ein muriner Antikörper, der spezifisch gegen CD25 gerichtet ist (Engert *et al.*, 1991). Ein Immuntoxin mit Kopplung desselben an die deglykosylierte A-Kette des Ricins (dgA) (siehe 1.3.2.1) zeigte eindrucksvolle Ergebnisse *in vitro* und *in vivo* (Engert *et al.*, 1991). Klinische Studien mit diesem Immuntoxin bewirkten moderate Effekte in den behandelten Patienten (Engert *et al.*, 1997).

Unter Verwendung eines (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>4</sub>-Linkers (Huston *et al.*, 1988) konnte ein scFv hergestellt werden (Barth *et al.*, 1998a). Ein Immuntoxin desselben mit einer Deletionsmutante von *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA') zeigte spezifische Bindeeigenschaften und Toxizität *in vitro* (Barth *et al.*, 1998a) und *in vivo* (Barth *et al.*, 2000a).

## 1.3.2 Toxindomänen

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Gene dreier verschiedener Toxine an die Gene für Ki-4(scFv) und RFT5(scFv) angefügt. Die Wirkungsweise dieser Toxine und ihre Verwendung in Immuntoxinen wird nun näher erläutert.

### 1.3.2.1 Ricin

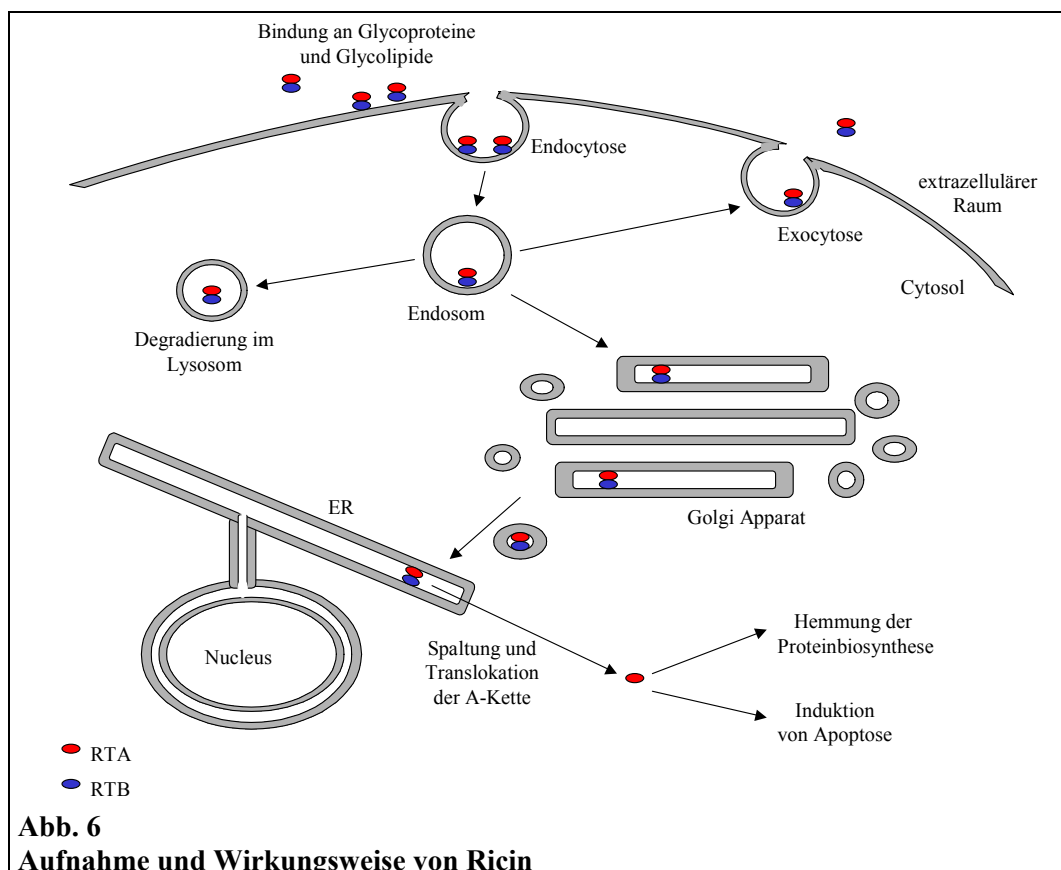
Ricin wurde erstmals im Jahr 1888 als ein toxisches Protein aus den Samen von *Ricinus communis* (Ricinus) beschrieben (Stillmark, 1888). Es wird in den Zellen des Endosperms reifender Samen synthetisiert und dort in der Vakuole gelagert (Tulley & Beavers, 1976). Nach Keimung der Samen wird es rasch degradiert und ist bereits ein paar Tage nach der Keimung vollständig aus der jungen Pflanze verschwunden (Lord & Roberts, 1996).



Ricin gehört zu den giftigsten bekannten Substanzen. So kann bereits der Verzehr von nur zwei Bohnen zum Tode führen (Audi *et al.*, 2005). Wird Ricin durch Inhalation oder Injektion aufgenommen, liegt die letale Dosis bei nur 1 µg - 10 µg Ricin pro kg Körpergewicht (Franz & Jaax, 1997). Diese hohe Toxizität macht aus Ricin eine attraktive Waffe in der biologischen Kriegsführung und im Bioterrorismus (Audi *et al.*, 2005).

Rizinus-Samen schützen sich selbst vor dieser Toxizität, indem sie zunächst ein nicht toxisches Vorläuferpeptid synthetisieren, das Pre-Pro-Ricin. Die N-terminale Pre-Sequenz wird nach Lokalisierung im ER abgespalten. Nun werden Glykosylierungen und fünf Disulfidbrücken eingefügt (Lord, 1985). Dann wird das entstandene Pro-Ricin in die Vakuole transportiert, in der zwölf Aminosäuren aus der Mitte des Proteins herausgeschnitten werden (Lord & Roberts, 1996). Das gereifte und nun toxische Ricin kann in der Vakuole keinen Schaden anrichten. Es besteht jetzt aus zwei verschiedenen Polypeptidketten (A-Kette und B-Kette), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Refsnes *et al.*, 1974). Die Ricin Toxin A-Kette (RTA) hat ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa, die Ricin Toxin B-Kette (RTB) ein Gewicht von etwa 32 kDa (Olsnes, 2003).

RTB hat zwei funktionale Bindedomänen für Galactose (Rutenber *et al.*, 1987). Neben Galactoseresten kann aber auch N-Acetylgalactosamin gebunden werden (Sphyris *et al.*, 1995). So bindet Ricin über seine B-Kette an Glycoproteine und an Glycolipide, die entsprechende Zuckerreste tragen (Olsnes, 2003). Menschliche Zellen besitzen folglich eine Vielzahl möglicher Bindestellen (Sandvig *et al.*, 1976). Nach einer Bindung wird Ricin durch Endocytose von den Zielzellen aufgenommen (siehe Abb. 6).



Ein Teil des aufgenommenen Ricins wird direkt zur Zelloberfläche zurück transportiert, ein anderer Teil gelangt in die Lysosomen, wo es degradiert wird (Olsnes, 2003). Nur ein kleiner Teil des endocytisierten Ricins läuft rückwärts durch den sekretorischen Weg zum Golgi-Apparat und schließlich ins Endoplasmatische Retikulum (ER), wo die A-Kette über die Membran des ER ins Cytosol translociert wird (Sandvig *et al.*, 2002). Vor dieser Translokation muß die Disulfidbrücke zwischen RTA und RTB gespalten und die A-Kette freigesetzt werden. Eine Beteiligung der beiden Enzyme Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und Thioredoxin-Reduktase (TrxR) an dieser Reaktion ist äußerst wahrscheinlich (Bellisola *et al.*, 2004).

Es wird angenommen, dass die freigesetzte RTA einen Weg zur Qualitätskontrolle namens Endoplasmatisches-Retikulum-assoziierte Protein-Degradierung (ERAD) missbraucht und das ER durch den Proteinkanal Sec61 verlässt (Roberts & Smith, 2004). Über diesen Weg werden normalerweise fehlgefaltete Proteine aus dem ER ausgeschleust, im Cytosol ubiquitiniert und schließlich in Proteasomen abgebaut (Di Cola *et al.*, 2005). Die Ubiquitinisierung der fehlerhaften Proteine findet an Lysinresten statt. RTA hat nur zwei Lysinreste. Durch diesen nur sehr geringen Gehalt reduziert sie die Wahrscheinlichkeit der Ubiquitinisierung und damit des Abbaus in Proteasomen (Deeks *et al.*, 2002). So gelingt es RTA, unbeschadet in das Cytosol zu gelangen (Di Cola *et al.*, 2005). Nun kann die A-Kette ihr toxisches Potenzial entfalten. Ein einziges Toxinmolekül, welches das Cytosol erreicht, kann ausreichen, eine entsprechende Zelle zu töten (Lord & Roberts, 1996).

RTA katalysiert die Abspaltung eines spezifischen Adenosinrests (A<sub>4324</sub>) der 28S rRNA und verhindert somit eine weitere Proteinsynthese (Endo *et al.*, 1987). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Ricin zusätzlich eine proapoptotische Wirkung zeigt. Das apoptotisch wirkende Enzym Caspase-3 ist ein Substrat der A-Kette (Baluna *et al.*, 2000). Nach Bindung von BAT3 (HLA-B-assoziiertes Transkript 3) an RTA (Ricin Toxin A-Kette), wird BAT3 von Caspase-3 gespalten. Das entstehende CTF-131 (Carboxyterminales Fragment von BAT3 mit 131 Aminosäureresten) induziert apoptotische morphologische Veränderungen in der Zelle (Wu *et al.*, 2004b).

Die hohe Toxizität des Ricins kann neben der Waffentechnologie auch Anwendung in der Medizin finden, wo es zu einer wirkungsvollen Toxindomäne in Immuntoxinen wird. Die natürlich vorkommende Bindedomäne RTB wird hier durch eine spezifische Bindedomäne ersetzt. Eine Vielzahl verschiedener Immuntoxine mit RTA haben ihre Effizienz *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Olsnes, 2003). Über die letzten Jahrzehnte zeigte sich hier eine stetige Weiterentwicklung (Kreitman, 2003).

Immuntoxine mit nativer RTA haben eine relativ kurze Halbwertszeit im Blutkreislauf. Die Mannose- und Fucose-Reste der A-Kette werden von der Leber erkannt und führen zu einer Aufnahme der entsprechenden Immuntoxine in die Leber, wo sie abgebaut werden (Bourrie *et al.*, 1986). Die Verwendung einer deglykosylierten A-Kette (dgA) verringert die Aufnahme der Immuntoxine in die Leber und erhöht somit deren Halbwertszeit und Effizienz *in vivo* (Thorpe *et al.*, 1988). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, RTA mit Polyethylenglykol (PEG) zu modifizieren. Durch eine gezielte Anfügung von PEG an RTA kann die Aufnahme in die Leber

weiter verringert werden (Youn *et al.*, 2005). So kann das Potenzial der Immuntoxine durch eine Erhöhung der Halbwertszeit im Blutkreislauf erhöht werden.

Ein zweiter Nachteil, der bei Verwendung der nativen RTA entsteht, ist das Auftreten von Vascular Leak Syndrom (VLS) (siehe 1.2.4). Dieses steht mit den proapoptotischen Effekten von RTA in Verbindung (Wu *et al.*, 2004b). Durch Einfügung einer gezielten Mutation entsteht die modifizierte A-Kette RTA-N97A, welche dieses Problem eliminiert und somit kein VLS hervorruft (Smallshaw *et al.*, 2003).

Ein drittes Problem ist die Ausschüttung menschlicher Anti-Ricin-Antikörper (HARA), welche eine mehrfache Gabe eines Immuntoxins mit RTA erschweren. Hier wurden bereits Epitope entdeckt, gegen die vermehrt Antikörper gebildet werden (Castelletti *et al.*, 2004). Eine Modifikation derselben könnte die menschliche Immunantwort vermindern und so die Anwendung von Immuntoxinen mit RTA noch weiter verbessern.

### 1.3.2.2 Angiogenin

Angiogenin wurde als Mediator entdeckt, der eine Neubildung von Blutgefäßen, auch Angiogenese genannt, in festen menschlichen Tumoren induziert (Folkmann, 1974). Seine Konzentration ist in verschiedenen Tumoren erhöht, es ist jedoch auch permanent im menschlichen Blut präsent (Badet, 1998). Heute ist bekannt, dass Angiogenin auch eine Rolle bei der Bildung von neuen Blutgefäßen in der Embryogenese, der Wundheilung und im Endometrium des Uterus spielt (Matoušek, 2001). Zur Induktion der Angiogenese bindet Angiogenin hochaffin an zwei spezifische Oberflächenrezeptoren auf den Endothelzellen (Więdołcha, 1999). Einer dieser beiden gehört zur Aktin-Familie (Hu *et al.*, 1993), der andere ist ein etwa 170 kDa schweres Rezeptorprotein (Hu *et al.*, 1997).

Nach Bindung wird Angiogenin durch Endocytose in die Zelle aufgenommen (Więdołcha, 1999) und in den Nucleus transportiert (Moroianu & Riordan, 1994). Dort akkumuliert es im Nucleolus, wo es die Synthese von 45S rRNA induziert (Xu *et al.*, 2002). Der genaue Zusammenhang mit einer Neubildung von Blutgefäßen bleibt bis heute ungeklärt. Da diese Neubildung ein eher seltenes Ereignis im erwachsenen Körper ist, lässt die permanente Expression des Gens für Angiogenin im menschlichen Körper auf weitere Funktionen schließen. Es konnte gezeigt werden, dass Angiogenin bakterizide und fungizide Aktivitäten gegen Pathogene entwickelt (Hooper *et al.*, 2003). So steigt die Konzentration des Proteins im Serum auch bei Infektionen oder Entzündungen an (Ganz, 2003).

Angiogenin ist ein einzelsträngiges Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 14 kDa (Fett *et al.*, 1985). Es zeigt eine Homologie von 35 % zu humaner Pankreas-Ribonuklease, wobei das aktive Zentrum konserviert ist (Kurachi *et al.*, 1985). Angiogenin zeigt im Allgemeinen nur geringe RNase-Aktivität, erweist sich bei der Spaltung von tRNA jedoch als hocheffizient (Saxena *et al.*, 1992). Die menschlichen Endothelzellen, in welchen Angiogenin als Induktor für die

Angiogenese wirkt, schützen sich vor dieser Ribonuklease-Aktivität durch einen cytosolischen RNase Inhibitor (RI) (Matoušek, 2001).

Die Wirkungsweise des Angiogenins als RNase lässt seine bakterizide und fungizide Wirkung verstehen. Diese cytotoxische Aktivität macht es auch zu einer potenziellen Toxindomäne in der Konstruktion von Immuntoxinen. Die Tatsache, dass Angiogenin ein einzelsträngiges Protein ist, erleichtert die Produktion rekombinanter Immuntoxine erheblich. Aufgrund der recht geringen Größe des Proteins ist ein hohes Penetrationsvermögen resultierender Immuntoxine in Tumoren zu erwarten. Des Weiteren sollte die humane Herkunft des Angiogenins eine Immunantwort in mit resultierenden Immuntoxinen behandelten Patienten minimieren (Krauss *et al.*, 2005).

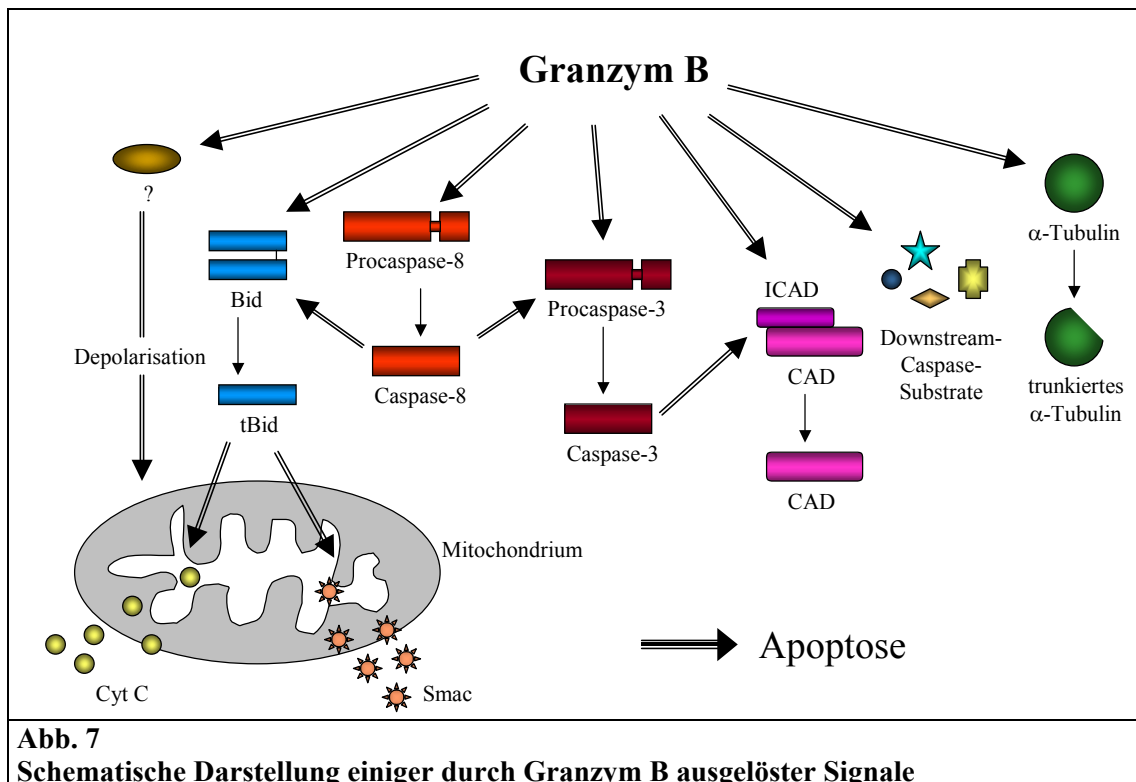
Das erste Immuntoxin unter Verwendung von Angiogenin wurde im Jahr 1992 hergestellt und zeigte Wirksamkeit *in vitro* (Rybak *et al.*, 1992). Seitdem wurden weitere Immuntoxine mit Angiogenin konstruiert (Newton *et al.*, 1996; Yoon *et al.*, 1999; Reiners *et al.*, 2004; Krauss *et al.*, 2005), unter anderem auch ein Immuntoxin gegen CD30 (Huhn *et al.*, 2001). Sie alle zeigten hohe Toxizität *in vitro*. Somit ist Angiogenin ein äußerst vielversprechender Baustein zur Konstruktion von Immuntoxinen.

### 1.3.2.3 Granzym B

Humanes Granzym B, eine etwa 27 kDa schwere Serinprotease, wurde im Jahr 1988 erstmals beschrieben (Krähenbühl, 1988). Es wird von cytotoxischen T-Lymphocyten abgegeben, um virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen abzutöten (Andrade *et al.*, 2004). Fünf verschiedene Granzyme sind im Menschen bekannt: A, B, H, M und K (Andrade *et al.*, 2004). Sie alle rufen in menschlichen Zellen Apoptose hervor, wobei Granzym B die stärkste apoptotische Wirkung zeigt (Trapani, 2001).

Granzym B wird als Pre-Pro-Protease synthetisiert. Die Pre-Sequenz wird im ER von einer Signalpeptidase abgespalten (Andrade *et al.*, 2004). Das entstehende Proenzym trägt nach erfolgter Glykosylierung Mannose-6-Phosphat-Reste, die einen Transport in die Lysosomen bewirken (Griffiths & Isaacs, 1993). Von einem Enzym namens Dipeptidyl-Peptidase I (DPPI) werden dort zwei weitere Aminosäuren vom N-Terminus des Pro-Granzym B entfernt (Pham & Ley, 1999). Die entstehende aktive Form wird nun in den Vesikeln gelagert, bis sie an Zielzellen freigesetzt wird (Andrade *et al.*, 2004).

Granzym B kann auf verschiedene Art und Weise in die Zielzellen gelangen. Ein wichtiger Weg ist die endocytotische Aufnahme nach Bindung an den kationunenabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (CI-MPR) (Motyka *et al.*, 2000). Die Freisetzung aus den endocytotischen Vesikeln erfolgt abhängig von Perforin, einem ebenfalls von cytotoxischen T-Lymphocyten sezernierten Molekül (Shi *et al.*, 1997). Es ist jedoch auch unabhängig von CI-MPR eine Aufnahme von Granzym B in die Zielzellen zu beobachten (Trapani *et al.*, 2003), was auf weitere Möglichkeiten der Aufnahme schließen lässt. Im Cytosol der Zelle angekommen, induziert Granzym B die Apoptose über verschiedene Wege (siehe Abb. 7).



Procaspase-3 (Atkinson *et al.*, 1998) und Procaspase-8 (Medema *et al.*, 1997) werden gespalten und so in ihre aktiven Formen überführt. Des Weiteren schneidet Granzym B effizient verschiedene Downstream-Caspase-Substrate (Andrade *et al.*, 1998). Der proapoptotische Faktor Bid wird sowohl durch die aktivierte Caspase-8 als auch durch Granzym B selbst mittels einer Spaltung in seine trunkierte Form tBid überführt (Barry *et al.*, 2000). Dieses lagert sich in die Mitochondrienmembran ein und induziert dort die Ausschüttung proapoptotischer Mediatoren wie Smac (second mitochondria derived activator of caspase) und Cytochrom C (Madesh *et al.*, 2002). Zusätzlich induziert Granzym B auf einem bislang ungeklärten Weg eine Depolarisation der Mitochondrien (Thomas *et al.*, 2001). Ein weiteres direktes Ziel der Wirkung von Granzym B ist der Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase (ICAD) (Thomas *et al.*, 2000). Dieser bildet mit der Caspase-aktivierten DNase (CAD) ein Heterodimer. Nach seiner Spaltung durch Granzym B oder Caspase-3 wird CAD aus diesem Dimer freigesetzt und induziert die Kondensation des Chromatins und eine Fragmentierung der DNA im Nucleus (Sharif-Askari *et al.*, 2001). Neueste Ergebnisse haben gezeigt, dass Granzym B weiterhin durch Abspaltung des C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin eine deregulierte Dynamik in der Polymerisation von Mikrotubuli hervorruft und so auch in die Organisation des Cytoskeletts eingreift (Adrain *et al.*, 2006). So zeigt sich, dass Granzym B auf verschiedenste Weise proapoptotisch wirken kann. Dies macht es zu einer idealen Toxindomäne für Immuntoxine. Selbst Tumorzellen, in denen der ein oder andere Signalweg zur Induktion von Apoptose blockiert sein mag, können mit Granzym B effizient angesteuert werden (Barry & Bleackley, 2002).

Auch Granzym B ist, genau wie Angiogenin (siehe 1.3.2.2), ein einzelsträngiges humanes Protein. Dies erlaubt eine einfache Herstellung rekombinanter Immuntoxine bei einer erwarteten geringen Immunantwort. Das erste Immuntoxin unter Verwendung von Granzym B wurde im Jahr 2003

hergestellt (Liu *et al.*, 2003). Weitere Immuntoxine folgten (Kurschus *et al.*, 2004; Dälken *et al.*, 2006). Sie alle zeigten das Potenzial zur spezifischen Induktion von Apoptose *in vitro*. Granzym B ist somit als weitere Alternative zu den häufig verwendeten bakteriellen oder pflanzlichen Toxinen anzusehen.

## 1.4 Expression in Pflanzen

### 1.4.1 Vorteile und Nachteile

Die weltweite Nachfrage nach effizienten und günstigen Medikamenten und Impfstoffen steigt ständig an, so dass die Entwicklung eines kostengünstigen Expressionssystems mit guter Produktqualität und hoher Produktionskapazität gefragt ist (Ma *et al.*, 2005a). Heutzutage werden Immuntoxine hauptsächlich in transgenen Bakterienkulturen hergestellt (Stöcker *et al.*, 2003). Diese bilden zwar ein kostengünstiges Produktionssystem, sind als Prokaryoten jedoch unfähig, posttranslationale Modifizierungen durchzuführen (Goldstein & Thomas, 2004). Zudem werden komplexe Proteine, die in Bakterien hergestellt werden, häufig falsch gefaltet und aggregieren in unlöslichen Komplexen (Inclusion Bodies) (Schillberg *et al.*, 2003). So sind in Bakterien hergestellte Immuntoxine oftmals nicht funktional (Stöcker *et al.*, 2003). Aus diesem Grunde wurden mit eukaryotischen Expressionssystemen Alternativen entwickelt. Vergleicht man diese untereinander, sprechen viele Aspekte für eine Produktion in Pflanzen.

Ein erstes alternatives Expressionssystem sind Hefen, die eine korrekte Faltung menschlicher Proteine durchführen. Auch eine Glykosylierung der Proteine findet statt, diese unterscheidet sich jedoch stark vom menschlichen Glykosylierungsmuster (Schillberg *et al.*, 2003). Ein zweites System sind Säugerzellen. Diese führen authentische posttranslationale Modifizierungen durch und synthetisieren so voll funktionale Proteine. Sie sind jedoch teuer in der Haltung und die Möglichkeiten des Scale-Up in Fermentern sind nur begrenzt (Schillberg *et al.*, 2003). Des Weiteren können diese Kulturen Humanpathogene wie HIV, Hepatitis Viren oder Prionen beherbergen, was ein beträchtliches Sicherheitsrisiko in der Verwendung von Proteinen aus diesen Zellkulturen darstellt (Teli & Timko, 2004). Es können auch komplett transgene Tiere hergestellt werden, welche das Zielprotein in das Serum oder in die Milch freisetzen (Schillberg *et al.*, 2003). Auch hier ist die Haltung sehr teuer, die Möglichkeiten zum Scale-Up sind gering und die Gefahr einer Kontamination mit Humanpathogenen ist gegeben (Schillberg *et al.*, 2003).

Eine Produktion rekombinanter Proteine in Pflanzen scheint hier die Lösung zu sein. Pflanzen benötigen keine komplexen Medien oder Nährstoffe und für Anbau und Ernte kann eine bereits existierende Infrastruktur genutzt werden (Peeters *et al.*, 2001). So können die Produktionskosten äußerst niedrig gehalten werden. Berechnungen haben ergeben, dass die Kosten einer Produktion rekombinanter Proteine in Pflanzen um das zehnfache bis 50-fache geringer sind als die der Produktion des gleichen Proteins in Bakterien oder Säugerzellen (Galeffi *et al.*, 2005). Je nach Anwendung können essbare Pflanzenteile direkt verwendet werden, was durch die Einsparung einer Downstream-Prozessierung die Kosten weiter minimiert (Teli & Timko, 2004). Zum Beispiel

können in Pflanzen produzierte Impfstoffe, die oral verabreicht werden, mucosale und humorale Immunität induzieren (Arntzen *et al.*, 2005).

Pflanzen haben die Befähigung zur korrekten Faltung und zum Zusammenbau komplexer Proteine (Teli & Timko, 2004). Zudem bieten solche Proteine eine hohe Sicherheit, da Pflanzen keine Humanpathogene beherbergen (Teli & Timko, 2004). Auch können in Pflanzen eine Reihe von Stoffen synthetisiert werden und problemlos akkumulieren, welche auf tierische Expressionssysteme toxisch wirken (Dorfmueller, 2004/2005). Das transgene Material kann langfristig in Form von Samen gelagert werden. So ist ein Scale-Up leicht und die Produktion kann rasch einer steigenden Nachfrage angepasst werden, die nur durch die Größe verfügbarer Ackerflächen limitiert ist (Teli & Timko, 2004).

In den letzten Jahrzehnten wurde die Entwicklung gentechnisch veränderter Pflanzen stark vorangetrieben. Die erste gentechnisch veränderte Pflanze wurde im Jahr 1983 hergestellt (Fraleay *et al.*, 1983), im Jahr 1989 wurde der erste Antikörper exprimiert (Hiatt *et al.*, 1989) und im Jahr 1992 der erste scFv in Pflanzen produziert (Owen *et al.*, 1992). Bei einer Produktion von humanen Proteinen in Pflanzen ist jedoch das abweichende Muster in O- und N-Glykosylierung zu beachten (Gormond & Faye, 2004). Rekombinanten Proteinen aus Pflanzen fehlen stets die terminalen Galactose- und Sialinsäurereste, welche in Säugern normalerweise vorkommen. Stattdessen weisen diese  $\alpha(1,3)$ -Fucose auf, welche in Tieren eine  $\alpha(1,6)$ -Verknüpfung hat, und  $\beta(1,2)$ -Xylose, die in Säugern gar nicht vorkommt (Ma *et al.*, 2003). Diese minimalen Unterschiede in der Glykanstruktur zwischen pflanzlichen und menschlichen Proteinen können unter Umständen die Aktivität und die Stabilität der rekombinanten Proteine im Vergleich zur nativen Form verändern (Ma *et al.*, 2003). Auch die Möglichkeit einer allergischen Antwort gegen das pflanzenspezifische Glykosylierungsmuster ist möglich. Dies ist jedoch höchst unwahrscheinlich, da der Mensch durch seine Umgebung und Nahrung täglich mit pflanzlichen Glykanresten konfrontiert wird (Ma *et al.*, 2003).

Zur weiteren Optimierung von in Pflanzen hergestellten rekombinanten Proteinen bestehen Bemühungen, das Glykosylierungsmuster in Pflanzen zu humanisieren. Die pflanzlichen Enzyme Fucosyltransferase und Xylosyltransferase können ausgeschaltet werden und durch das menschliche Enzym  $\beta(1,4)$ -Galactosyltransferase ersetzt werden. Auf diese Weise können Proteine hergestellt werden, denen die pflanzentypischen Fucose- und Xylosereste fehlen, die aber stattdessen terminale Galactosereste tragen (Bakker *et al.*, 2001). Eine Sialisierung von Proteinen in Pflanzen ist weit schwieriger und stellt eine Herausforderung für weitere Forschungsarbeiten dar, da ein Großteil der hierfür benötigten Maschinerie in Pflanzenzellen fehlt (Gormond & Faye, 2004). Die Produktion einer Vielzahl von voll funktionalen Proteinen in Pflanzen hat jedoch eindrucksvoll gezeigt, dass die Unterschiede in der posttranslationalen Modifizierung im Allgemeinen kein essenzielles Problem darstellen. So werden heutzutage neben pharmazeutisch relevanten Proteinen auch technische Proteine, industrielle Enzyme, Nahrungsergänzungsmittel und Proteinpolymere in Pflanzen hergestellt (Ma *et al.*, 2003). Diese kommerzielle Produktion rekombinanter Proteine in Pflanzen ist auch als Molecular Farming bekannt (Schillberg *et al.*, 2005).

## 1.4.2 Design einer Expressionskassette

Beim Bau einer Genkassette zur Expression in Pflanzen muss eine Vielzahl von Faktoren berücksichtigt werden. Die Wahl eines geeigneten Promotors ist essenziell, um die Expression wirkungsvoll zu steuern. Um eine dauerhaft hohe Expressionsrate zu erzielen, wird in dikotylen Pflanzen zumeist der 35S Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) gewählt (Ma *et al.*, 2003). Dieser starke und konstitutive Promotor kann durch Verdopplung einer Enhancer-Region noch weiter verstärkt werden und wird dann als 35SS Promotor bezeichnet (Kay *et al.*, 1987). In monokotylen Pflanzen zeigt der 35S Promotor jedoch geringere Aktivität, so dass sich hier die Verwendung alternativer Promotoren wie zum Beispiel dem Ubiquitin-1 Promotor aus Mais anbietet (Christensen & Quail, 1996). Aber auch die Wahl eines Promotors, der die Expression des Fremdgens auf eine umwelt-, entwicklungs- oder gewebsspezifische Weise steuert, kann von Vorteil sein.

In Blättern können zwar große Mengen an Protein produziert werden, diese sind jedoch oft instabil, so dass das geerntete Material direkt im Anschluss an die Ernte verarbeitet werden muss (Fischer *et al.*, 2004). Eine selektive Expression in Speicherorganen wie Samen kann gewünscht sein, wenn das Protein in einer haltbaren Form synthetisiert werden soll. So bleiben Antikörper, die in Samen exprimiert wurden, über einen Zeitraum von mindestens drei Jahren stabil und zeigen durch Lagerung bei Raumtemperatur keinerlei Aktivitätsverlust (Stöger *et al.*, 2000). Auch können Proteine, deren Produktion sich auf die Samen beschränkt, nicht mit dem vegetativen Wachstum der Pflanze interagieren und sie haben nur geringen Kontakt zu Herbivoren und Mikroben in der umgebenden Biosphäre (Stöger *et al.*, 2005). Eine Isolation und Aufreinigung ist vereinfacht, da Samen weniger phenolische Komponenten und eine weniger komplexe Mischung an Proteinen als Blätter enthalten (Goldstein & Thomas, 2004). Eine gezielte Expression in essbaren Pflanzenteilen kann vor allem bei der Produktion von Nahrungsergänzungsmitteln und Impfstoffen nützlich sein (Ma *et al.*, 2003). Auch kann bei Verwendung entsprechender Promotoren die Expression durch äußere Stimuli wie mechanischem Stress induziert werden. So ist es möglich, eine Expression des Fremdgens erst nach der Ernte zu induzieren (Ma *et al.*, 2003). Auf diese Weise kann ein möglicher schädlicher Einfluss des rekombinanten Proteins auf die Umwelt und die Entwicklung der Pflanze ausgeschlossen werden.

Die Wahl des Terminators hat einen eher geringen Einfluss auf die Expressionsrate. Häufig verwendete Polyadenylierungssequenzen stammen aus dem Transkript von CaMV 35S, dem *nos*-Gen von Agrobakterien und dem *ssu*-Gen der Erbse (Ma *et al.*, 2003).

Einer der wichtigsten Faktoren, der die Ausbeute an rekombinanten Proteinen beeinflusst, ist das subzelluläre Protein-Targeting (Ma *et al.*, 2003). Auch hat es Effekte auf die Faltung, die Zusammenlagerung und die posttranslationale Modifizierung (Fischer *et al.*, 2004). Dem Targeting in das richtige Kompartiment der Pflanzenzelle kommt auch eine lebenswichtige Funktion zu, falls das rekombinante Protein toxisch für die produzierende Pflanze ist (Fischer *et al.*, 2004). Ein Protein ohne jegliche Signalsequenz wird im Cytosol der Pflanzenzelle synthetisiert. Befindet sich am N-Terminus des Proteins jedoch ein Signalpeptid, wird dieses schon während der Translation in



das Lumen des ER überführt. Dort wird das Signalpeptid abgespalten, und in Abwesenheit weiterer Targeting-Informationen werden die Proteine in den Apoplasten sekretiert (Fischer *et al.*, 2004). So können Pflanzen das Zielprotein durch Rhizosekretion aus der Wurzel (Gleba *et al.*, 1999) oder durch Phyllosekretion in der Guttationsflüssigkeit (Komarnytsky *et al.*, 2000) abgeben. In Wasserpflanzen ist eine Abgabe in das umgebende Kulturmedium möglich (Gasdaska *et al.*, 2003). Durch Anheftung weiterer Sortiersignale ist das Targeting in verschiedene Zellkompartimente wie zum Beispiel in die Vakuole möglich, wo die Proteine gelagert werden können (Yoshida *et al.*, 2004). Glykosylierungen werden im ER und im Golgi-Apparat vorgenommen. So bietet sich für rekombinante Proteine, die Glykosylierungen benötigen, der sekretorische Weg an (Yoshida *et al.*, 2004). Die ersten Schritte der Glykosylierung im ER sind zwischen Pflanzen und Tieren konserviert und divergieren erst im späten Golgi-Apparat (Gormond & Faye, 2004). Eine Möglichkeit pflanzenspezifische Glykosylierungen zu vermeiden, besteht somit in der Anheftung eines KDEL-Signals, welches für die Retention des Proteins im ER sorgt (Hellwig *et al.*, 2004).

Auch die Ausbeute an Zielprotein ist stark abhängig von der Wahl des Zellkompartiments. Im ER herrscht eine oxidierende Umgebung vor, und die im Cytosol vorkommenden Proteasen sind nicht zu finden (Schillberg *et al.*, 1999). Des Weiteren besitzen Pflanzen im Lumen des ER Chaperone, die homolog zu Chaperonen aus Säugern sind (Peeters *et al.*, 2001). So bietet der sekretorische Weg eine bessere Umgebung für die Faltung, Zusammenlagerung und Stabilität rekombinanter Proteine als das Cytosol (Conrad & Fiedler, 1998). Im Vergleich zu einer cytosolischen Expression können hier mehr als tausendfache Ausbeuten an Protein erzielt werden (Schillberg *et al.*, 2005). Eine weitere Steigerung der Ausbeute um einen Faktor bis zu 100 kann durch Anfügung eines ER-Retentionssignals wie KDEL erreicht werden (Schouten *et al.*, 1996).

Affinitäts-Tags wie c-myc oder His<sub>6</sub> können an das rekombinante Protein angefügt und sowohl für eine effiziente Aufreinigung als auch zum spezifischen Nachweis des Proteins verwendet werden. Vorsicht ist jedoch geboten, denn durch die veränderte Primärstruktur des Proteins können unter Umständen auch seine Eigenschaften verändert werden (Ma *et al.*, 2003). So sollten sich solche Tags in kommerziell genutzten Proteinen nicht mehr befinden. Eine Entfernung derselben ist sowohl direkt auf genetischer Ebene als auch durch eine Behandlung des rekombinanten Proteins mit spezifischen Proteinasen, die an bestimmten Erkennungsstellen die verwendeten Tags vom Protein abschneiden können, möglich (Jenny *et al.*, 2003).

### 1.4.3 Gentransfer in die Pflanze

Es existieren verschiedenste Protokolle zur Transformation von Pflanzen (siehe 4.3), das gebräuchlichste ist die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation (Tzfira & Citovsky, 2006). Diese macht sich das gramnegative Bodenbakterium *A. tumefaciens* zu Nutze, welches von Natur aus in der Lage ist, genetisches Material zu übertragen und in das Genom des Wirtes einzubauen. Diese Fähigkeit bezieht das Bakterium auf ein Plasmid, dem so genannten Ti (tumor-induzierend)-Plasmid (van Larebeke *et al.*, 1974). Auf diesem befindet sich sowohl die

T-DNA, die in die Pflanze übertragen wird, als auch Virulenzgene (*vir*) und regulatorische Elemente, die für die Übertragung und Integration der T-DNA notwendig sind (Zupan *et al.*, 2000). Phenolische Substanzen wie Acetosyringon, die normalerweise von verwundeten Pflanzen abgegeben werden, aktivieren den Gentransfer (Stachel *et al.*, 1985). Weitere Genprodukte, sowohl aus dem Genom des Bakteriums (Ziemienowicz, 2001) als auch aus dem Genom der Pflanze (Ditt *et al.*, 2001), sind für eine effiziente Integration vonnöten. Natürlicherweise befinden sich auf der T-DNA Gene, deren Produkte das Wachstum von Wurzelhalsgallen induzieren. Des Weiteren sind Gene für Enzyme zur Synthese von Opinen vorhanden. Diese Opine können von *A. tumefaciens* katabolisiert werden. So finden sich in den Wurzelhalsgallen ideale Wachstumsbedingungen für die transformierenden Bakterien (Chilton, 1983).

Die Wirkungsweise von *A. tumefaciens* ist der einzige dokumentierte Fall einer natürlichen Genübertragung zwischen unterschiedlichen Organismenreichen in der belebten Welt (Valentine, 2003). Diese einzigartige Fähigkeit macht sich die Gentechnik zu Nutze. Die ursprünglich auf der T-DNA vorhandenen Gene können beliebig gegen andere ausgetauscht werden. Kurze Sequenzen zur Rechten und zur Linken der T-DNA, die so genannten Bordersequenzen, müssen erhalten bleiben (Valentine, 2003). Die Genübertragung beginnt stets an der Right Border und endet an der Left Border, in seltenen Fällen werden aber auch ausgehend von der Right Border kleinere oder größere Fragmente übertragen (Gelvin, 2003).

In der Gentechnik wird zumeist ein System genutzt, in dem die *vir*-Gene auf einem anderen Plasmid als die T-DNA untergebracht sind. Das Plasmid, welches die *vir*-Gene trägt, wird auch Helferplasmid genannt, das Plasmid mit der modifizierten T-DNA binäres Plasmid (Gelvin, 2003). Während in der freien Natur nur dikotyle Pflanzen von *A. tumefaciens* infiziert werden, kann das Bakterium unter Laborbedingungen DNA in eine bemerkenswert breit gefächerte Gruppe von Organismen übertragen. So können verschiedene dikotyle und monokotyle Angiospermen, Gymnospermen und verschiedene Pilze infiziert werden (Gelvin, 2003). Selbst die Transformation menschlicher Zellen ist möglich (Kunik *et al.*, 2001).

Nach Integration der Fremd-DNA in das Genom einer einzigen Pflanzenzelle können aus dieser ganze Pflanzen regenerieren (Teli & Timko, 2004). Unter Verwendung geeigneter Resistenzgene, die gleichzeitig übertragen werden, können transgene von nicht transgenen Pflanzen selektiert werden (Horsch *et al.*, 1985). Die Expression dieser Fremd-DNA wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, die zum jetzigen Stand der Forschung nicht präzise gesteuert werden können. Diese beinhalten den Ort der Integration, die Kopienzahl des Gens und das Vorkommen von Silencing (Matzke & Matzke, 1998). Die aktuelle Forschung befasst sich sowohl mit einer gezielten Integration von Fremdgenen, um Positionseffekte und Effekte unterschiedlicher Kopienzahl zu verhindern (Britt & May, 2003), als auch mit Möglichkeiten, das Silencing zu minimieren (siehe 4.3).

#### 1.4.4 Wahl des Expressionssystems

Bei der Wahl eines geeigneten Expressionssystems müssen verschiedene Parameter in Betracht gezogen werden. Wichtige Faktoren, die die Wahl der Pflanze beeinflussen, sind die Kosten von Herstellung, Scale-Up und Erhaltung des transgenen Systems, die Länge des Produktionszyklus, der Biomassenzuwachs und die Kosten von Aufreinigung, Lagerung und Verteilung des Zielproteins (Schillberg *et al.*, 2005). Noch bis vor kurzer Zeit wurden die meisten pflanzenbasierten Proteine in transgenem Tabak hergestellt und direkt aus den Blättern isoliert (Ma *et al.*, 2003). Viele Proteine werden heutzutage aber eher in Getreidesamen produziert, da durch die Akkumulation der Proteine in den trockenen Samen eine ungekühlte Langzeitaufbewahrung ohne Degradierung oder Aktivitätsverlust möglich ist (Ma *et al.*, 2003).

Der Anbau von transgenen Pflanzen im Freiland findet in der Bevölkerung jedoch oftmals keine Akzeptanz. Nicht selten werden Felder, die für die Kultivierung gentechnisch veränderter Pflanzen verwendet werden, zum Ziel für Anschläge von Gegnern der grünen Gentechnik (Goldstein & Thomas, 2004). Die Hauptgefahren im Anbau transgener Pflanzen im Freiland liegen in der Möglichkeit der Auskreuzung durch Pollenverteilung, der direkten Ausbreitung von Samen und möglichen Effekten, die rekombinante Proteine auf Herbivore, bestäubende Insekten und Mikroorganismen in der Rhizosphäre haben könnten. Auch gibt es Bedenken, dass das transgene Pflanzenmaterial ungewollt in die Nahrungskette eintreten könnte (Ma *et al.*, 2003). Des Weiteren können Produkte aus dem Freiland mit Pestiziden und Herbiziden kontaminiert sein (Doran, 2000).

So gibt es Bestrebungen, effiziente Produktionssysteme zu erschaffen, die unter Laborbedingungen gehalten werden können. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, ist die Verwendung von Pflanzenzellkulturen (Doran, 2000). Diese können dauerhaft unter definierten Bedingungen gehalten werden (Hellwig *et al.*, 2004) und sind nicht abhängig von Vegetationsperioden, Wetter, Insektenaktivität, Bodenqualität und anderen exogenen Faktoren, die die Produktausbeute und -qualität beeinflussen könnten (Doran, 2000). Eine Ernte ist in Pflanzenzellkulturen kontinuierlich möglich. Die Aufreinigung des Zielproteins ist vergleichsweise einfach, vor allem wenn es ins Medium sekretiert wird (Hellwig *et al.*, 2004). So konnte bereits ein Immuntoxin erfolgreich in Tabakzellkulturen exprimiert werden (Francisco *et al.*, 1997). Die Ausbeute an rekombinanten Proteinen aus Pflanzenzellkulturen ist jedoch signifikant geringer als die aus ganzen Pflanzen (Doran, 2000). Außerdem unterliegen Kallussuspensionskulturen dem Prozess der somaklonalen Variation (Doran, 2000). So werden in dieser Arbeit mit Tabak und Zwerglinsen ganze Pflanzen als Expressionssystem genutzt.

### 1.4.4.1 Tabak

Tabak ist ein etabliertes Modellsystem für das Molecular Farming (Fischer *et al.*, 2004). Für dieses System liegen ausgereifte Protokolle für den Gentransfer und zur Expression rekombinanter Proteine vor (Ma *et al.*, 2003). Die Biomasseproduktion ist gewaltig, pro Hektar und Jahr können bei intensiver Bebauung bis zu 170 Tonnen Frischmasse geerntet werden (Schillberg *et al.*, 2003). Eine Infrastruktur für Anbau und Ernte ist weiträumig vorhanden (Ma *et al.*, 2003). Tabak kann durch Selbstbefruchtung Samen bilden, was die Produktion stabiler Zuchtlinien ermöglicht, die als Samen verteilt und gelagert werden können (Ma *et al.*, 2005b). Die Anzahl der produzierten Samen pro Pflanzen ist sehr hoch, so dass das Potenzial zu einem schnellen Scale-Up gegeben ist (Ma *et al.*, 2003). Des Weiteren dient Tabak nicht als Nahrungsmittel, somit ist der ungewollte Eintritt einer transgenen Pflanze in die Nahrungskette hier nicht möglich (Goldstein & Thomas, 2004).

Die Nachteile des Systems liegen in der geringen Stabilität von in Blättern hergestellten Proteinen (Fischer *et al.*, 2004) und in dem relativ hohen Anteil giftiger Alkaloide wie etwa Nikotin, die während der Aufreinigung entfernt werden müssen (Ko *et al.*, 2004). Abhilfe kann hier die Verwendung von Varietäten mit niedrigem Alkaloidgehalt bringen (Ma *et al.*, 2003).

### 1.4.4.2 Wasserlinsengewächse

Wasserlinsengewächse (*Lemnaceae*) gehören zu den monokotylen Pflanzen (Landolt, 1986). Sie zeichnen sich vor allem durch ihre geringe Größe und die starke Reduktion ihrer Vegetationskörper aus. Diese sind auf Blatt und Wurzel beschränkt, in Vertretern der Gattung Zwerglinse (*Wolffia*) fehlt auch die Wurzel (Landolt, 1986). Zu dieser Gattung zählen mit einem Durchmesser von nur 0,5 mm - 2 mm die kleinsten Blütenpflanzen der Welt (White & Wise, 1998).

Durch vielerlei Eigenschaften verbinden Wasserlinsengewächse die Vorteile einer Proteinproduktion in ganzen Pflanzen mit den Vorteilen einer Produktion in Pflanzenzellkulturen. Ihre Vermehrung erfolgt nicht oder nur selten über Samen, sondern meist vegetativ durch Bildung von Tochterpflanzen (Appenroth & Augsten, 1996). So können sich Kulturen mit klonalem Charakter entwickeln, ohne dass Pollen oder Samen gebildet werden. Trotzdem muss nicht auf die genetische Stabilität ganzer Pflanzen verzichtet werden, die bei Zellkulturen zum Problem werden kann (Doran, 2000).

Der Proteingehalt in Wasserlinsengewächsen liegt sehr hoch, mitunter bei bis zu 45 % der Trockenmasse (Appenroth & Augsten, 1996). So verspricht die Produktion rekombinanter Proteine hohe Ausbeuten. Wasserlinsengewächse sind essbar, und aufgrund des Fehlens mechanischer Strukturelemente ist die gesamte Pflanze verwendbar (Augsten, 1984). So ist auch die Produktion oral zu verabreichender Stoffe denkbar. Der wohl herausragendste Vorteil einer Verwendung von Wasserlinsengewächse ist aber der immense Biomassenzuwachs. Die Verdopplungszeit beträgt unter günstigen Bedingungen nur etwa 24 Stunden (Augsten, 1984). Wasserlinsengewächse haben eine weltweite Verbreitung erfahren und stehen während der gesamten Vegetationsperiode zur

Verfügung (Augsten, 1984). So könnte dieses Produktionssystem im Freiland ohne Rücksichtnahme auf Klimazonen kontinuierlich reiche Ernten einbringen. Aber auch die Haltung unter kontrollierbaren Laborbedingungen ist möglich. Verschiedene Anzuchtprotokolle wurden bereits erstellt (Landolt & Kandeler, 1987; Friedrich, 2005), unter anderem wurde auch ein Fermenter zur dauerhaften Kultivierung von Wasserlinsengewächsen entwickelt (Rechmann, 2004). Hier bieten sich vor allem Wasserlinsengewächse der Gattung Zwerglinse (*Wolffia*) an. Diese sind im Gegensatz zu vielen Vertretern der Gattung Wasserlinse (*Lemna*) in der Lage, submers zu leben (Landolt, 1986), und sie sind durch ihre kugelige Form unempfindlicher gegenüber mechanischer Beanspruchung in einem Fermenter (Friedrich, 2005). Um die Kosten der Downstream-Prozessierung zu minimieren, ist unter Laborbedingungen eine Sekretion des Zielproteins in das umgebende Medium möglich (Gasdaska *et al.*, 2003). Aus diesen Gründen scheinen Zwerglinsen ein geradezu ideales Produktionssystem für rekombinante Proteine zu sein. Die Transformation von Wasserlinsengewächsen gestaltet sich jedoch schwieriger als bei vielen anderen Pflanzen wie zum Beispiel Tabak. Ein effizientes Transformations- und Selektionsprotokoll für die Wasserlinsen *Lemna gibba* und *Lemna minor* konnte dennoch erstellt werden (Yamamoto *et al.*, 2001). In ihnen wurden bereits verschiedene therapeutisch relevante Proteine wie Antikörper oder Fab-Fragmente synthetisiert (Gasdaska *et al.*, 2003). Auch für Zwerglinsen sind erfolgreiche Ergebnisse in der transienten Transformation sowohl durch Particle Bombardment (Kruse *et al.*, 2002) als auch durch Infiltration (Boehm *et al.*, 2001) oder Injektion (Boehm, unpublizierte Daten) von transgenen *A. tumefaciens* erzielt worden. Neueren Daten zufolge ist die Infiltration von *A. tumefaciens* das Erfolg versprechendste Transformationsprotokoll (Friedrich, 2005). Durch weitere Optimierungen des Protokolls (siehe 4.3) konnten transiente Transformationsraten von bis zu 79 % erreicht werden (Edler, unpublizierte Daten).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Ganze Pflanzen wurden bislang nicht als Expressionssystem für Immuntoxine eingesetzt. Daher ist die Effizienz in Pflanzen produzierter Immuntoxine nicht vorhersehbar. Um verschiedene solcher Immuntoxine produzieren zu können, deren Wirksamkeit getestet werden könnte, sollte in dieser Arbeit ein Kassettensystem erstellt werden, in welchem die Gene für die einzelnen Domänen leicht ausgetauscht werden können. Anschließend sollten erstmals transgene Pflanzen hergestellt werden, welche Immuntoxingene exprimieren. In diesen sollte das eingebrachte Fremdgen und seine Expression nachgewiesen werden. Die genauen Ziele waren im Einzelnen:

- die Konstruktion verschiedener Genkonstrukte unter Einbeziehung der Gene für die Bindedomänen Ki-4(scFv) (siehe 1.3.1.1) oder RFT5(scFv) (siehe 1.3.1.2) und für die Toxine Angiogenin (siehe 1.3.2.2), Granzym B (siehe 1.3.2.3) oder RTA-N97A (siehe 1.3.2.1), welche durch Restriktionsschnittstellen voneinander getrennt sind
- die Herstellung von Expressionskassetten in einem binären Plasmid für *A. tumefaciens*, in denen Promotoren, Terminatoren und Zielgene von Restriktionsschnittstellen eingerahmt sind
- die Einfügung von Restriktionsschnittstellen zum möglichen Anfügen von Sequenzen für N- oder C-terminal gelegene Polypeptide
- das Anfügen der Sequenzen für die Tags His<sub>6</sub> und c-myc zur einfachen Aufreinigung und zum Nachweis, welche je von Restriktionsschnittstellen eingerahmt sind
- das Anfügen der Sequenz für das ER-Lokalisationssignals des  $\alpha$ -Amylase-Inhibitors aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) an das 3'-Ende einiger Genkonstrukte
- die Anfügung einer Sequenz, die für die Aminosäuresequenz KDEL codiert, an das 3'-Ende einiger Genkonstrukte
- die Herstellung transgener *N. tabacum*, *W. australiana* und *W. brasiliensis* mittels *A. tumefaciens*-vermittelter Transformation
- der Nachweis der Immuntoxingene und deren Expression in den Pflanzen
- die Aufreinigung und der Nachweis der in den Pflanzen produzierten Immuntoxine.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme und pflanzliches Material

Alle verwendeten Organismen sind im Folgenden aufgeführt (siehe Tab. 2).

Tab. 2 Organismen	
Organismus	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> JM110	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	Ooms <i>et al.</i> , 1982
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	van Larebeke <i>et al.</i> , 1974
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Petit Havana SR1	Maliga <i>et al.</i> , 1973
<i>Wolffia brasiliensis</i>	Prof. Dr. E. Landolt
<i>Wolffia australiana</i>	Prof. Dr. E. Landolt

Kontaktadresse: Prof. Dr. Elias Landolt: ETH Zürich, Zürichbergerstraße 38, 8044 Zürich (CH)

#### 2.1.2 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und daraus konstruierte Derivate sind im Folgenden aufgeführt (siehe Tab. 3 und Tab. 4). Die beiden Plasmide m22-RTA-N97A und pBM1.RFT5 tragen das Resistenzgen *KanR* zur Selektion in Bakterien, alle übrigen Plasmide beinhalten das Resistenzgen *bla*. In den binären Plasmiden (siehe Tab. 4) liegt auf der T-DNA zusätzlich das Resistenzgen *nptII* zur Selektion in Pflanzen vor.

Tab. 3 Plasmide		
Plasmid	Insert	Herkunft
Ang-Ki-4	IGKL - Angiogenin - Ki-4(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.1.2
Ang-RFT5	IGKL - Angiogenin - RFT5(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.1.5
ARK	IGKL - Angiogenin - RFT5(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.1.5
Gb-Ki-4	IGKL - Granzym B - Ki-4(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.1.3
Gb-RFT5	IGKL - Granzym B - RFT5(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.1.6
GRK	IGKL - Granzym B - RFT5(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.1.6
K-Ang-MHII	IGKL - Ki-4(scFv) - Angiogenin - c-myc - His <sub>6</sub>	PD Dr. Dr. S. Barth
K-GbII	IGKL - Ki-4(scFv) - Granzym B - c-myc - His <sub>6</sub>	PD Dr. Dr. S. Barth
Ki-4-Ang	IGKL - Ki-4(scFv) - Angiogenin - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.1.4
L-LT1-e	IGKL - LT1 - Ki-4(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.1.1
L-LT1-KIII	IGKL - LT1 - Ki-4(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub>	PD Dr. Dr. S. Barth
m22-RTA-N97A	RTA-N97A	PD Dr. Dr. S. Barth
pBM1.RFT5	His <sub>6</sub> - RFT5(scFv) - ETA	PD Dr. Dr. S. Barth
pTP2	SP	Dr. R. Boehm
RAK	IGKL - RFT5(scFv) - Angiogenin - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.1.7
RFT5-Ang	IGKL - RFT5(scFv) - Angiogenin - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.1.7
RFT5-Gb	IGKL - RFT5(scFv) - Granzym B - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.1.8
RGK	IGKL - RFT5(scFv) - Granzym B - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.1.8

<b>Tab. 4 binäre Plasmide</b>		
<b>binäres Plasmid</b>	<b>Insert</b>	<b>Herkunft</b>
pPAMAK	Angiogenin - Ki-4(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.3.2
pPAMAKK	Angiogenin - Ki-4(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.3.2
pPAMAR	Angiogenin - RFT5(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.3.1
pPAMARK	Angiogenin - RFT5(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.3.1
pPAMBT	-	siehe 3.1.2.4
pPAMBTX	-	siehe 3.1.2.3
pPAMGK	Granzym B - Ki-4(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.3.4
pPAMGKK	Granzym B - Ki-4(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.3.4
pPAMGR	Granzym B - RFT5(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.3.3
pPAMGRK	Granzym B - RFT5(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.3.3
pPAMKA	Ki-4(scFv) - Angiogenin - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.3.6
pPAMKAK	Ki-4(scFv) - Angiogenin - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.3.6
pPAMKG	Ki-4(scFv) - Granzym B - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.3.8
pPAMK GK	Ki-4(scFv) - Granzym B - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.3.8
pPAMKsGFP	GFP	PD Dr. Dr. S. Barth
pPAMm1	-	siehe 3.1.2.1
pPAMm2	-	siehe 3.1.2.2
pPAMRA	RFT5(scFv) - Angiogenin - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.3.5
pPAMRAK	RFT5(scFv) - Angiogenin - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.3.5
pPAMRG	RFT5(scFv) - Granzym B - c-myc - His <sub>6</sub>	siehe 3.1.3.7
pPAMRGK	RFT5(scFv) - Granzym B - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.3.7
pPAMSARK	SP - Angiogenin - RFT5(scFv) - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.3.9
pPAMSRGK	SP - RFT5(scFv) - Granzym B - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.3.10
pPAMSRRK	SP - RFT5(scFv) - RTA-N97A - c-myc - His <sub>6</sub> - KDEL	siehe 3.1.3.11
pPAMTB	-	siehe 3.1.2.4
pPAMTBX	-	siehe 3.1.2.3

Kontaktadressen: PD Dr. Dr. Stefan Barth: Fraunhofer IME, Worringerweg 1, 52074 Aachen (D)  
 Dr. Robert Boehm: Universität Bonn IMBIO, Karlrobert-Kreiten-Straße 13,  
 53115 Bonn (D)



### 2.1.3 PCR-Primer

Die folgenden Primer wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit verwendet (siehe Tab. 5). Mit Ausnahme von XhoFor wurden alle Primer von MWG-Biotech AG, Ebersberg (D) bezogen. Der Primer XhoFor stammte von Qiagen, Hilden (D).

<b>Tab. 5 PCR-Primer</b>	
<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>
actfor	5' - AAA ATG GCA GAC GGT GAG G - 3'
actrev	5' - GAC TTC AGG GCA TCG GAA ACG T - 3'
Ang-SOE-for	5' - CCA GGT TCC ACT GGT CAG GAT AAC TCC AGG TAC - 3'
Angio-rev	5' - CAG CTA GTT TGG ATC CCG - 3'
KDELrev	5' - TTC TCA CAG CTC ATC CTT - 3'
Lfor	5' - TAC GAC TAG TAT GAT CAT GGC TTC CTC C - 3'
Mamfor	5' - TCC AAC CAC CAT GGC TGC - 3'
Mamrev	5' - ATT CCA GAA TTC TCA CAG CTC ATC CTT ATG ATG ATG ATG ATG ATG GTC GAC - 3'
Oligio(dT)18	5' - TTT TTT TTT TTT TTT TTT - 3'
pA35Sfor2	5' - CAA GTC TCG AGA TCT AGA ATT CGT CCG CAA AAA TCA CCA GTC TCT C - 3'
pA35Srev2	5' - CAT TAG CGG CCG CGG TAC CCC GGT CAC TGG ATT TTG G - 3'
picAfor	5' - ATG CGC ATG AGG CTC GTC TTC GAG - 3'
picAback	5' - GAC GCA ACG CAT CCT CGA TCA GCT - 3'
Ricinfor	5' - GCT GGA GCT CAA ACG TCT CGA GCA CAT ATT CCC CAA - 3'
RicinBamHIrev	5' - CGA AAG GGA TCC AAA CTG TGA CGA TGG - 3'
rbcfor	5' - CTG GAT TCA AAG CTG GTG TTA AA - 3'
rbcbac	5' - CAT TTG CAA GCT TCA CGG ATA AT - 3'
rbc- <i>W.bra</i> -rev	5' - CAT TTG GCA GCT TCA CGG ATA AC - 3'
Sfifor2	5' - GGT AAG TCG ACA CTA GTA TGG TGG CCC AGC CGG CCA ACT AGA ATT CGT CCG C - 3'
SLrev2	5' - TTA GGG CCG GCT GGG CCA ATG AGT TTG CGT GGC TG - 3'
ttfor	5' - AAC CTG CGT GCA ATC CAT CTT G - 3'
ttrev3	5' - CCT CCA CCG CGG TGG CGG CC - 3'
Xhofor	5' - GGT AAG TCG ACA CTA GTG TAT GCT CGA GAG GAT GAA TTC GTC CGC - 3'
XLrev	5' - TTA GCT CGA GTG AGT TTG CGT GGC TG - 3'

## 2.1.4 Geräte

<b>Tab. 6 Geräte</b>	
<b>Autoklav</b>	
Laboratory Vertical Steam Sterilizer	Tuttnauer, Breda (NL)
<b>Binokular</b>	
Model MMN-1	Olympus, Tokyo (J)
<b>Blotting-Apparatur</b>	
The Bandit™ Tank Elektroblotting System VEP-2	Owl Separation Systems, Portsmouth (USA)
<b>Brutschrank</b>	
Einbautrockenschrank ET 6130	Heraeus, Düsseldorf (D)
<b>Demineralisierungsanlage</b>	
Elect	ELGA LabWater, Celle (D)
<b>Einschweißgerät</b>	
FS 400	Petra-Electric, Burgau (D)
<b>ELISA-Reader</b>	
Sunrise Remote	Tecan, Crailsheim (D)
<b>Fluorometer</b>	
PAM-2000	Heinz Walz GmbH, Effeltrich (D)
<b>Gasbrenner</b>	
Gasprofi 2	WLD-Tec, Göttingen (D)
Flameboy sensor	Tecnomara AG, Wallisellen (CH)
<b>Gelkammer</b>	
Gel Electrophoresis Apparatus GNA-1000	Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
Sub-Cell® Model 192 Agarose Gel Electrophoresis Systems	Biorad, Hercules (USA)
Mini Protean II	Biorad, Hercules (USA)
<b>Hybridisierungsschrank</b>	
Universal-Hybridisierungsschrank BFD	WTB-Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen (D)
<b>Injektionsanlage</b>	
Cell Tram Oil	Eppendorf, Hamburg (D)
<b>Magnetrührer</b>	
RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen (D)
MR 3000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach (D)
MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach (D)
<b>Mikrowellenherd</b>	
Micromat	AEG, Nürnberg (D)
<b>Mixer</b>	
Typ 240	Krupps, Solingen (D)
<b>Photometer</b>	
UV mini 1240 Spectrophotometer	Shimadzu, Duisburg (D)
<b>Phytoschrank</b>	
Licht-Thermostat Typ 1201	RUMED Rubarth Apparate GmbH, Laatzen (D)
Percival Scientific CU-3G L5/D	CLF Laborgeräte GmbH, Emersacker (D)
Phytokammer	York, Mannheim (D)
<b>pH-Meter</b>	
inoLab pH Level 1	WTW GmbH, Weilheim (D)

<b>Rotlichtlampe</b>	
PF712E	Philips, Hamburg (D)
<b>Schlauchpumpe</b>	
Peristaltic Pump P-3	Pharmacia, Uppsala (S)
323 U	Watson-Marlow, Rommerskirchen (D)
<b>Schüttler</b>	
KS 125 basic	IKA Labortechnik, Staufen (D)
Kombination Certomat <sup>®</sup> R + Certomat <sup>®</sup> HK	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
The Belly Dancer	Stovall Life Science Incorporated, Greensboro (USA)
BFR 25	Grant Boekel, Cambridge (UK)
<b>Spannungsquelle</b>	
Model 1000/500 Power Supply	Biorad, Hercules (USA)
Power Pac 300	Biorad, Hercules (USA)
Electrophoresis Power Supply – EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
Electrophoresis Power Supply – EPS 200	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
<b>Sterilbank</b>	
Holten Safe 2010 / Maxi Safe 2010	Heto-Holten A/S, Allerød (DK)
HF 72	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim (D)
<b>Thermocycler</b>	
iCycler	Biorad, Hercules (USA)
Genius Model FGN02TD	Techne, Cambridge (UK)
<b>UV-Lampe</b>	
UV-Kontaktlampe Chroma 43	Kurt Migge GmbH Laborbedarf, Heidelberg (D)
V02 8970	Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée (Frankreich)
<b>Vakuumpumpe</b>	
Membran-Vakuumpumpe ME 4 R	Vacuubrand GmbH + Co, Wertheim (D)
<b>Vortexer</b>	
Vortex-Genie	Bender & Hobein AG, Zürich (CH)
REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach (D)
<b>Waagen</b>	
PG 503-S DeltaRange <sup>®</sup>	Mettler Toledo, Greifensee (CH)
Elektronische Präzisionswaage KERN 770/GS/GJ	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Albstadt (D)
<b>Wasserbad</b>	
Typ 3047	Köttermann Labortechnik, Uetze-Hänigsen (D)
Typ 1092	GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH), Burgwedel (D)
Kombination Lauda MAG + Lauda T	Lauda, Lauda-Königshofen (D)
TS2 Temperierbad	IKA Labortechnik, Staufen (D)
<b>Zentrifuge</b>	
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg (D)
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg (D)
Tischkühlzentrifuge 1K15	Sigma, Osterode (D)
Biofuge 22R	Heraeus-Sepatech, Düsseldorf (D)
Biofuge 13	Heraeus-Sepatech, Düsseldorf (D)
L7 Ultracentrifuge	Beckmann, Krefeld (D)
Optima™ L-90K Ultracentrifuge	Beckmann-Coulter, Krefeld (D)

## 2.1.5 Chemikalien und Kits

<b>Tab. 7 Chemikalien und Kits</b>	
2-Log DNA Ladder	New England Biolabs, Hitchin (UK)
2-Mercaptoethanol	Sigma, München (D) / Merck, Darmstadt (D)
Acetosyringon (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon)	Acros, Geel (B)
Acrylamid 4X	Serva, Heidelberg (D)
Acrylamid-Lösung 30 %	AppliChem, Darmstadt (D)
Ameisensäure	VWR, Darmstadt (D)
Ammoniumnitrat	Merck, Darmstadt (D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg (D)
Amphotericin B	Duchefa, Haarlem (NL)
Ampicillin Natriumsalz	Duchefa, Haarlem (NL) / Roth, Karlsruhe (D)
Anti-Mouse IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate	Sigma, München (D)
<i>Apa</i> I + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Bacto Pepton	Difco, Kansas City (USA)
Bacto Trypton	Difco, Kansas City (USA)
Bactoagar	Difco, Kansas City (USA)
<i>Bam</i> HI + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
BAP (Benzylaminopurin)	Serva, Heidelberg (D)
BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat)	Roth, Karlsruhe (D)
<i>Bcu</i> I + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Beef-Extrakt	Difco, Kansas City (USA)
Bisacrylamid	Appligene, Illkirch Graffenstaden (F)
Borsäure	Sigma, München (D)
<i>Bpu</i> 1102I + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Bromphenolblau	Biorad, Hercules (USA)
BSA (Albumin Fraktion V)	AppliChem, Darmstadt (D)
<i>Bsr</i> BRI + Puffer	Promega, Mannheim (D)
Calciumdichlorid	Merck, Darmstadt (D)
Calciumdinitrat	Merck, Darmstadt (D)
Carbenicillin Dinatriumsalz	Duchefa, Haarlem (NL) / Serva, Heidelberg (D)
Cefotaxim Natriumsalz	Duchefa, Haarlem (NL)
Chloroform	Merck, Darmstadt (D)
CIAP (Kälberdarm-Alkalische Phosphatase) + Puffer	Amersham Pharmacia, Uppsala (S)
Complete, EDTA-free	Roche, Mannheim (D)
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg (D)
CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)	Merck, Darmstadt (D)
Deep Vent + Puffer	New England Biolabs, Hitchin (UK)
Dextransulfat Natriumsalz	Amersham Pharmacia, Uppsala (S)
Dikaliumcarbonat	AppliChem, Darmstadt (D)
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe (D)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (D)
Dinatriummolybdat	Merck, Darmstadt (D)
dNTPs (Sequencing Grade Solution dNTP's)	Amersham Pharmacia, Uppsala (S)
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem, Darmstadt (D)
ECL Detection Reagents	Amersham Pharmacia, Uppsala (S)
<i>Eco</i> 32I + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
<i>Eco</i> RI + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
E-Gb-H22	Bettina Stahnke

Eisensulfat	Merck, Darmstadt (D)
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt (D)
Ethanol (p. A.)	AppliChem, Darmstadt (D) / Roth, Karlsruhe (D)
Ethanol (vergällt)	AppliChem, Darmstadt (D)
Ethidiumbromid wässrige Lösung 1 % (w/v)	Serva, Heidelberg (D)
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche, Mannheim (D)
Formaldehyd 37 % (w/v)	AppliChem, Darmstadt (D)
G-418 Disulfat	Duchefa, Haarlem (NL)
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Gentamycin Sulfat	Duchefa, Haarlem (NL)
Glucose	Merck, Darmstadt (D)
Glycerin	Roth, Karlsruhe (D)
Glycin	Merck, Darmstadt (D)
Hefe-Extrakt	Merck, Darmstadt (D)
<i>Hind</i> III	Amersham Pharmacia, Uppsala (S)
Imidazol	Sigma, München (D)
Isoamylalkohol	Sigma, Darmstadt (D)
Isopropanol	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumacetat	AppliChem, Darmstadt (D)
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt (D)
Kanamycin Monosulfat	Duchefa, Haarlem (NL)
Klenow DNA Polymerase I + Puffer	USB, Cleveland (USA)
Kobaltnitrat	Merck, Darmstadt (D)
Kokosnusswasser	Sigma, München (D)
<i>Kpn</i> I + Puffer	Amersham Pharmacia, Uppsala (S)
Kupfersulfat	Fluka, Buchs (CH)
Low Melting Agarose	Duchefa, Haarlem (NL)
Macerozyme R-10	Merck, Darmstadt (D)
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt (D)
Mangandichlorid	Merck, Darmstadt (D)
MES (Morpholinoethansulfonsäure)	Duchefa, Haarlem (NL)
Methanol	J. T. Baker, Phillipsburg (USA)
Microagar	Duchefa, Haarlem (NL) / Difco, Kansas City (USA)
<i>Mss</i> I + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Multi-Tag-Marker	Roche, Mannheim (D)
Murashige & Skoog Medium Basale Salzmixtur	Duchefa, Haarlem (NL)
NAA (Naphtylelessigsäure)	Sigma, München (D)
Natriumacetat	Sigma, München (D)
Natriumascorbat	Sigma, München (D)
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Natriumcitrat	Sigma, München (D)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (D)
NatriumEDTA	Roth, Karlsruhe (D) / AppliChem, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid	J. T. Baker, Phillipsburg (USA) / Merck, Darmstadt (D)
Natriumhypochloritlösung	Hedinger, Dortmund (D)
Natriumthiosulfat	Sigma, München (D)
NBT (Nitroblau Tetrazolium)	Roth, Karlsruhe (D)
<i>Nco</i> I + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)

Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden (D)
Ni-NTA Spin Kit	Qiagen, Hilden (D)
<i>NotI</i> + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Nucleospin® RNA Plant	Macherey & Nagel, Düren (D)
Ofloxacin	ICN, Irvine (USA)
Oligotex Direct mRNA Mini Kit	Qiagen, Hilden (D)
Paromomycin Sulfat	Duchefa, Haarlem (NL)
Penicillin G Natriumsalz	Duchefa, Haarlem (NL)
Penta-His Antibody	Qiagen, Hilden (D)
Phosphorsäure	AppliChem, Darmstadt (D)
Piperacillin Natriumsalz	Fluka, Buchs (CH)
Plantagar	Duchefa, Haarlem (NL)
Ponceau S	Merck, Darmstadt (D)
Protein MW Marker	Peqlab, Erlangen (D)
<i>PstI</i> + Puffer	Boehringer, Mannheim (D)
PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon)	Sigma, München (D)
QIAprep® Miniprep Kit	Qiagen, Hilden (D)
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden (D)
Quickligase + Puffer	New England Biolabs, Hitchin (UK)
Random Prime Labelling System, Version II	Amersham Pharmacia, Uppsala (S)
Range Mix DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen (D)
RiboLock Ribonuclease Inhibitor	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Rifampicin	Duchefa, Haarlem (NL)
RNase A	AppliChem, Darmstadt (D)
Röntgen-Entwickler (GBX developer and replenisher)	Kodak, Stuttgart (D)
Röntgen-Fixierer (GBX fixer and replenisher)	Kodak, Stuttgart (D)
Rovral	Aventis, Frankfurt (D)
Saccharose	Duchefa, Haarlem (NL)
<i>SacI</i> + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
<i>SalI</i> + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Salzsäure	Merck, Darmstadt (D)
Schenk & Hildebrandt Medium Basale Salzmixtur	Duchefa, Haarlem (NL)
Schenk & Hildebrandt Vitaminmixtur	Duchefa, Haarlem (NL)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt (D) / Sigma, München (D)
Sensiscript RT-Kit	Qiagen, Hilden (D)
<i>SfiI</i> + Puffer	Amersham Pharmacia, Uppsala (S)
Silbernitrat	Duchefa, Haarlem (NL)
Streptomycin	Merck, Darmstadt (D)
T4 Ligase + Puffer	USB, Cleveland (USA)
Taq + Puffer	QBiogene, Heidelberg (D) / MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
TEMED (Tetramethyl-Ethylendiamin)	Biorad, Hercules (USA)
Ticarcillin / Clavulansäure 15:1	Duchefa, Haarlem (NL)
Tris	Duchefa, Haarlem (NL)
Tween 20	ICN, Irvine (USA)
Universal Agarose	Peqlab, Erlangen (D)
Vancomycin HCl	Duchefa, Haarlem (NL)
<i>XbaI</i> + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
<i>XhoI</i> + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Zinksulfat	Merck, Darmstadt (D)

Kontaktadresse: Bettina Stahnke: RWTH Aachen, Worringerweg 1, 52074 Aachen (D)

## 2.1.6 Kulturmedien

Detection Medium (nach Friedrich, 2005):

15 g/l Bacto Pepton  
3 g/l Hefe-Extrakt  
0,5 g/l NaCl  
5 g/l Glucose  
40 mg/l  $K_2HPO_4$   
50 mg NaEDTA  
20 mg/l KOH  
20 mg/l  $NH_4NO_3$   
35,2 mg/l  $Ca(NO_3)_2 \times 4 H_2O$   
50 mg/l  $MgSO_4 \times 7 H_2O$   
1,79 mg/l  $MnCl_2 \times 4 H_2O$   
6,59 mg/l  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$   
0,395 mg/l  $CuSO_4 \times 5 H_2O$   
1,42 mg/l  $H_3BO_3$   
2,52 mg/l  $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$   
0,02 mg/l  $Co(NO_3)_2 \times 6 H_2O$   
2,49 mg/l  $FeSO_4 \times 7 H_2O$   
(10 g Microagar für Festmedium)  
pH 7,0  
autoklavieren (20 min, 121 °C)

LB-Medium (nach Sambrook & Russell, 2001):

10 g/l Bacto Trypton  
5 g/l Hefe-Extrakt  
10 g/l NaCl  
(15 g/l Bactoagar für Festmedium)  
pH 7,0  
autoklavieren (20 min, 121 °C)

MS-Medium (nach Murashige & Skoog, 1962):

4,3 g/l Murashige & Skoog Medium Basale Salzmixtur  
30 g/l Saccharose  
(10 g/l Plantagar für Festmedium)  
pH 5,7  
autoklavieren (20 min, 121 °C)

SH-Medium (nach Schenk & Hildebrandt, 1971):

3,2 g/l Schenk & Hildebrandt Basale Salzmixtur  
(7 g/l Microagar für Festmedium)  
pH 6,0  
autoklavieren (20 min, 121 °C)  
1 g/l Schenk & Hildebrandt Vitaminmischung (sterilfiltriert)

SHI-Medium (nach Horsch *et al.*, 1985):

- 4,3 g/l Murashige & Skoog Medium Basale Salzmixtur
- 30 g/l Saccharose
- 0,5 g/l MES
- (10 g/l Plantagar für Festmedium)
- pH 5,7
- autoklavieren (20 min, 121 °C)
- +1 mg/l BAP (sterilfiltriert)
- +0,1 mg/l NA(sterilfiltriert)

YEB-Medium (nach Vervliet *et al.*, 1975):

- 5 g/l Beef-Extrakt
- 1 g/l Hefe-Extrakt
- 5 g/l Bacto Pepton
- 5 g/l Saccharose
- (15 g/l Bactoagar für Festmedium)
- pH 7,2 bzw. pH 5,6
- autoklavieren (20 min, 121 °C)
- + 5 ml/l 1 M MgSO<sub>4</sub> (sterilfiltriert)

## 2.2 Kultivierung und Lagerung von biologischem Material

### 2.2.1 Bakterien

Die Anzucht und Lagerung von Bakterien erfolgte stets unter aeroben, sterilen Bedingungen. Flüssigkulturen wurden in dem entsprechendem Medium (siehe 2.2.1.1 bzw. 2.2.1.2) auf einem Rundschtüttler bei 200 rpm vermehrt. Zur Anzucht von Bakterien in 5 ml Medienvolumen wurden 15 ml-Falcontubes verwendet, größere Volumina wurden in mit Aluminiumfolie verschlossenen Erlenmeyerkolben kultiviert. Kulturen auf Festmedium wurden in Petrischalen im Brutschrank gehalten. Lichtverhältnisse wurden bei der Anzucht nicht eingestellt. So wurden die Bakterien in Brutschränken ständiger Dunkelheit ausgesetzt, wohingegen Bakterien auf dem Rundschtüttler dem normalen Tageszeitenwechsel bzw. elektrischem Licht ausgesetzt waren.

Bakterien auf Festmedium konnten in mit Parafilm (Pechiney, Chicago (USA)) verschlossenen Petrischalen bei 4 °C einige Wochen gelagert und als Ausgangsmaterial zur Anzucht in Flüssigmedien verwendet werden. Längerfristige Lagerung lebensfähiger Bakterien erfolgte in Glycerinstock-Kulturen, die neben dem Anzuchtmedium auch 40 % (v/v) Glycerin enthielten. Zur Herstellung wurden entsprechende Bakterien in 5 ml-Flüssigkulturen angezogen. Nach Ernte der Bakterien durch Zentrifugation (15 min, 3220 x g, RT) wurde das Pellet in 250 µl Flüssigmedium und 250 µl Glycerin 80 % (v/v) resuspendiert. Diese Stockkulturen wurden bei -80 °C aufbewahrt.



### 2.2.1.1 *Escherichia coli*

#### 2.2.1.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

(nach Sambrook & Russell, 2001)

*E. coli* wurden in LB-Medium (siehe 2.1.6) bei 37 °C kultiviert. Die Anzucht transgener Bakterien erfolgte stets mit Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums zur Selektion. Bakterien, deren Plasmide *KanR* als bakterielles Resistenzgen enthielten, wurden mit Kanamycin (100 mg/l) angezogen. Solche, deren Plasmide *bla* als bakterielles Resistenzgen enthielten, wurden mit Ampicillin (100 mg/l) versetzt. Eine Vermehrungszeit von 12 h - 15 h reichte aus, um eine ausreichende Zelldichte in einer Flüssigkultur bzw. Kolonien auf Festmedium zu erhalten.

#### 2.2.1.1.2 Kompetente *Escherichia coli*

(nach Cohen *et al.* 1972)

*E. coli* wurden in einer 5 ml-Flüssigkultur über Nacht angezogen (siehe 2.2.1.1.1). Aus dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag eine 50 ml-Flüssigkultur so beimpft, dass eine Zelldichte von etwa  $0,5 \times 10^8$  Zellen / ml vorlag. Dies entsprach einer OD bei 600 nm von 0,1. Nun wurde so lange auf dem Rundschtüttler inkubiert, bis eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^8$  Zellen / ml erreicht war, was einer OD bei 600 nm von 0,5 entsprach. Die Bakterien wurden sodann auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation (15 min,  $3220 \times g$ , 4 °C) geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml eiskaltem 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert und einige Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut unter den gleichen Bedingungen wie zuvor (15 min,  $3220 \times g$ , 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde in 2 ml 0,1 M  $\text{CaCl}_2 + 10\%$  (v/v) Glycerin aufgenommen und zu je 200 µl in Eppendorf-Caps aliquotiert. Die nun kompetenten *E. coli* wurden bei -80 °C gelagert.

### 2.2.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*

#### 2.2.1.2.1 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

(nach Holsters *et al.*, 1978)

Zur Anzucht von *A. tumefaciens* wurde standardmäßig YEB-Medium pH 7,2 (siehe 2.1.6) bei 28 °C verwendet. Auch hier wurden Antibiotika zur Selektion verwendet. Rifampicin (50 mg/l) wurde stets zugegeben, da die verwendeten Stämme LBA4404 und GV3101 eine genomisch codierte Resistenz ( $\text{Rif}^r$ ) gegen dieses Antibiotikum besitzen (Hellens *et al.*, 2000). Zusätzlich musste auf das Helferplasmid und das binäre Plasmid selektiert werden. Der Stamm GV3101 enthielt das Helferplasmid pMP90RK mit den Resistenzgenen  $\text{GM}^r$  und  $\text{KM}^r$  (Koncz & Schell, 1986). Selektiert wurde hier durch Zugabe von Kanamycin (100 mg/l) für  $\text{KM}^r$  und Gentamycin (50 mg/l) für  $\text{GM}^r$ . Der Stamm LBA4404 enthielt das Helferplasmid pAL4404 mit dem Resistenzgen  $\text{SM}^r$  (Ooms *et al.*, 1982) Eine Selektion fand durch Zugabe von Streptomycin

(50 mg/l) statt. Alle verwendeten binären Plasmide trugen das Resistenzgen *bla* (siehe 2.1.2), auf welches durch Zugabe von Ampicillin (100 mg/l) oder Carbenicillin (100 mg/l) selektiert wurde.

Bei *A. tumefaciens* variierte die Vermehrungsrate sehr stark. Nach 2 d - 5 d wurden eine ausreichende Zelldichte in einer Flüssigkultur bzw. Kolonien auf Festmedium erhalten.

Wurden *A. tumefaciens* zur Pflanzentransformation angezogen, dann wurde YEB-Medium pH 5,6 verwendet, da eine Absenkung des pH-Werts zu besseren Transformationseffizienzen führt (Stachel *et al.*, 1986; Vernade *et al.*, 1988). Des Weiteren wurde Acetosyringon in den Konzentrationen 20 µM bzw. 200 µM zugegeben (siehe 2.3.2).

#### **2.2.1.2.2 Kompetente *Agrobacterium tumefaciens***

(nach Höfgen *et al.* 1988)

*A. tumefaciens* wurden in einer 5 ml-Flüssigkultur angezogen (siehe 2.2.1.2.1). Aus dieser Vorkultur wurde eine 50 ml-Flüssigkultur so beimpft, dass eine Zelldichte von etwa  $0,5 \times 10^8$  -  $1 \times 10^8$  Zellen / ml vorlag. Dies entsprach einer OD bei 600 nm von 0,1 - 0,2. Nun wurde so lange auf dem Rundschtüttler inkubiert, bis eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^8$  -  $5 \times 10^8$  Zellen / ml erreicht war, was einer OD bei 600 nm von 0,5 - 1 entsprach. Die Bakterien wurden auf Eis gekühlt und dann durch Zentrifugation (15 min,  $3220 \times g$ , 4 °C) geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 1 ml eiskaltem 20 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 100 µl in Eppendorf-Caps aliquotiert. Die nun kompetenten *A. tumefaciens* wurden bei -80 °C gelagert.

### **2.2.2 Pflanzen**

#### **2.2.2.1 *Nicotiana tabacum***

(nach Kang & Yang, 2004)

Die Samen von *N. tabacum* wurden vor der Aussaat sterilisiert. Dies geschah durch Zugabe von 1 ml gesättigter Natriumhypochloritlösung und Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Samen dreimal mit je 1 ml sterilem A. demin. gewaschen. *N. tabacum* wurde dann steril auf MS-Festmedium (siehe 2.1.6) bei 23 °C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h Helligkeit (3500 lux) und 8 h Dunkelheit angezogen.

Transgene Pflanzen mit dem pflanzlichen Resistenzgen *nptII* wurden mit Kanamycin (100 mg/l bzw. 200 mg/l) oder G-418 (50 mg/l) im Medium selektiert. Mit *A. tumefaciens* transformierte Pflanzen wurden zunächst auf Medium mit zusätzlicher Applikation von Cefotaxim (250 mg/l) zur Abtötung der Bakterien angezogen. Herangewachsene Pflanzen wurden unsteril in Blumentöpfe mit Blumenerde getopft und bei 23 °C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h Helligkeit (2000 lux) und 8 h Dunkelheit weiterkultiviert. Hier konnte keine weitere Selektion mittels Antibiotikum erfolgen.

Zur Gewinnung von Samen wurden die Blüten mit Papiertüten abgedeckt. So konnte eine Fremdbestäubung verhindert werden. Nach Reifung der Samen in der Kapsel, konnten diese gesammelt und trocken gelagert werden.

Kalli von *N. tabacum* wurden auf SHI-Festmedium (siehe 2.1.6) bei 23 °C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h Helligkeit (3500 lux) und 8 h Dunkelheit kultiviert. Aus einem Kallus regenerierte Triebe konnten steril mit einem Skalpell abgeschnitten und zur Bewurzelung auf MS-Festmedium überführt werden.

### 2.2.2.2 *Wolffia australiana* und *Wolffia brasiliensis*

(nach Friedrich, 2005)

Die Zwerglinsen *W. australiana* und *W. brasiliensis* wurden in SH-Medium (siehe 2.1.6) bei 23 °C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 h Helligkeit (3500 lux) und 8 h Dunkelheit kultiviert. Je nach Pflanzenzahl wurden Sechs-Well-Platten oder Erlenmeyerkolben verschiedener Größe verwendet: Sechs-Well-Platten mit 10 ml SH-Medium pro Well, 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 50 ml SH-Medium, 250 ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml SH-Medium oder 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 200 ml SH-Medium. Wurde die Pflanzendichte in einer Kultur zu hoch, wurde diese auf ein größeres Medienvolumen umgesetzt oder auf mehrere Ansätze aufgeteilt. Unabhängig von der Kulturdichte mussten alle Pflanzen in regelmäßigen Abständen (14 d - 28 d) auf frisches Medium umgesetzt werden.

Vollständig sterile *W. australiana* und *W. brasiliensis* konnten nicht generiert werden, da sich Bakterien in den Pflanzen befanden, die mit keinen bekannten Mitteln entfernt werden konnten (Hetzl, 2005). Oberflächensterile Pflanzen konnten jedoch durch Zugabe verschiedener Antibiotika erzeugt werden. Zunächst erfolgte die Applikation von Penicillin (100 mg/l) und Ampicillin (100 mg/l). Konnten die Zwerglinsen so dekontaminiert werden, wurden die Pflanzen auf Medium ohne Antibiotika weiterkultiviert. Führte diese Gabe aber nicht zum Erfolg, wurden nacheinander Vancomycin (100 mg/l) und Ticarcillin / Clavulansäure (15:1) (100 mg/l), dann Ofloxacin (150 mg/l) und schließlich Piperacillin (150 mg/l) zugegeben. Stets wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen kontrolliert, ob die Gabe eines Antibiotikums oder einer Antibiotikakombination zur Dekontamination geführt hatte. Dies erfolgte durch visuelle Ermittlung einer Trübung des SH-Mediums und in unsicheren Fällen zusätzlich durch Ausstrich des fraglichen SH-Mediums auf Detection-Festmedium (siehe 2.1.6), auf dem Kontaminanten wachsen konnten. Konnten keine Kontaminationen festgestellt werden, so wurden die oberflächensterilen Pflanzen auf Medium ohne Antibiotikum kultiviert. Eventuell auftretende Kontaminationen durch Pilze wurden mit Amphotericin B (150 mg/l) oder Rovral (100 mg/l) bekämpft. Pflanzen, die mit diesen Mitteln nicht oberflächensterilisierbar waren, wurden nicht verwendet.

Eine Kontrolle der Vitalität von Zwerglinsen konnte mit Hilfe des Fluorometers PAM-2000 durchgeführt werden. Dieser überprüfte die Intaktheit der Elektronentransportkette von Photosystem II auf Photosystem I und drückte dies als Yield aus (Schreiber *et al.*, 1994). Bei

vitalen Pflanzen lag der Yield etwa bei 0,7 und konnte bei sterbenden Kulturen bis 0 sinken (Friedrich, 2005).

Oberflächensterile *W. australiana* wurden neben den soeben beschriebenen Flüssigkulturen auch in Petrischalen auf SH-Festmedium mit einem Zusatz von 20 g/l Saccharose bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 h Helligkeit (3500 lux) und 8 h Dunkelheit kultiviert. Transgene Pflanzen, die das Gen *nptII* trugen, konnten durch Zugabe von Kanamycin, G-418 oder Paromomycin selektiert werden (siehe 3.4.1).

## 2.3 Herstellung transgener Organismen

Alle Transformationen wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilem Material vorgenommen. Eine Ausnahme bilden die Transformationen von *W. australiana* bzw. *W. brasiliensis* (siehe 2.3.2.3 und 2.3.2.2). Hier lagen lediglich oberflächensterile Pflanzen vor (siehe 2.2.2.2).

### 2.3.1 Bakterien

#### 2.3.1.1 Transformation von *Escherichia coli*

(nach Cohen *et al.* 1972)

Bei -80 °C aufbewahrte kompetente *E. coli* (siehe 2.2.1.1.2) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Bis zu 1 µg des einzubringenden Plasmids oder ein Ligationsansatz (siehe 2.4.9) wurde zu den Bakterien gegeben. Nun wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert und dann zur eigentlichen Transformation durch einen Hitzeschock im Wasserbad für 2 min auf 42 °C erwärmt. Anschließend wurden die Bakterien zur Regeneration 10 min bei Raumtemperatur belassen. Dann wurde 1 ml LB-Flüssigmedium zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert und der Ansatz schließlich zur Selektion auf antibiotikumhaltigem LB-Festmedium ausplattiert. Nach Bebrütung über Nacht konnten transformierte Bakterien sichtbare Kolonien bilden.

Bei Verwendung eines Ligationsansatzes zur Transformation wurde stets der Stamm DH5α verwendet. Da dieser jedoch DNA methyliert, musste für manche Versuche der Stamm JM110 verwendet werden, der keine Methylierungen an DNA vornimmt (dam<sup>-</sup> und dcm<sup>-</sup>). So wurden Plasmide, die mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym *BsrBRI* geschnitten werden sollten (siehe 2.4.6), zuvor nach *E. coli* JM110 transformiert.

#### 2.3.1.2 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

(nach Höfgen *et al.* 1988)

Bei -80 °C aufbewahrte kompetente *A. tumefaciens* (siehe 2.2.1.2.2) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zu den Bakterien wurde etwa 1 µg Plasmid gegeben. Die Mischung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend im Wasserbad für 5 min bei 37 °C aufgetaut. Nach Zugabe

von 1 ml YEB-Flüssigmedium wurde 2 h - 4 h auf dem Schüttler bei 28 °C und 80 rpm inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation (30 s, 20800 x g, RT) geerntet und in etwa 100 µl Medium auf antibiotikumhaltiges YEB-Festmedium ausgestrichen. Nach Bebrütung über 2 d - 5 d konnten transformierte Bakterien sichtbare Kolonien bilden.

## 2.3.2 Pflanzen

### 2.3.2.1 *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation von *Nicotiana tabacum*

(nach Horsch *et al.* 1985)

Transgene *A. tumefaciens* wurden in 5 ml-Flüssigkulturen mit Zugabe von 20 µM Acetosyringon über 2 d - 5 d vermehrt (siehe 2.2.1.2.1). Aus diesen Vorkulturen wurden 50 ml-Flüssigkulturen bei pH 5,6 mit Zugabe von 200 µM Acetosyringon so beimpft, dass eine Zelldichte von etwa  $0,5 \times 10^8$  -  $0,5 \times 10^8$  Zellen/ml vorlag. Dies entsprach einer OD bei 600 nm von 0,1 - 0,2. Sie wurden so lange kultiviert, bis eine Zelldichte von etwa  $4 \times 10^8$  Zellen/ml erreicht war. Dies entsprach einer OD bei 600 nm von 0,8. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation (15 min, 3220 x g, RT) geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml MS-Medium (siehe 2.1.6) resuspendiert und die Suspension in eine Petrischale gegossen.

Blätter von *N. tabacum* wurden in etwa 1 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und 2 min mit der *A. tumefaciens*-Suspension bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Blattstücke mit der Unterseite nach unten auf SHI-Festmedium (siehe 2.1.6) ausgelegt und zwei Tage lang bei 23 °C in einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h Helligkeit (3500 lux) und 8 h Dunkelheit mit den *A. tumefaciens* kokultiviert. Anschließend wurden die Blattstücke zur Abtötung der Bakterien und gleichzeitiger Selektion des Tabaks auf antibiotikumhaltiges SHI-Festmedium (SHI-Medium (siehe 2.1.6) + 250 µg/ml Cefotaxim + 100 µg/ml Kanamycin) überführt. Hier wurde so lange kultiviert, bis Kallusbildung und schließlich Pflanzenregeneration erfolgte.

Kleine regenerierte Pflänzchen wurden schließlich auf antibiotikumhaltiges MS-Festmedium (MS-Medium (siehe 2.1.6) + 250 µg/ml Cefotaxim + 100 µg/ml Kanamycin) umgesetzt. Hier erfolgten dann Bewurzelung und Wachstum.

### 2.3.2.2 Transformation von *Wolffia brasiliensis* mittels Injektion von *Agrobacterium tumefaciens*

(nach Boehm, persönliche Mitteilung)

Kontaktadresse: Dr. Robert Boehm: Universität Bonn IMBIO, Karlrobert-Kreiten-Straße 13, 53115 Bonn (D)

Transgene *A. tumefaciens* wurden in 5 ml-Flüssigkulturen mit 20 µM Acetosyringon angezogen (siehe 2.2.1.2.1). Geerntet wurden die Bakterien durch Zentrifugation (15 min, 3220 x g, RT). Danach wurden die Zellen in 0,5 ml SH-Medium (siehe 2.1.6) mit 200 µM Acetosyringon

aufgenommen. Diese Suspension wurde 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde sie auf 500 µl so mit Injektionsmedium (SH-Medium (siehe 2.1.6), 200 µM Acetosyringon, 5 µM NAA, 0,2 µM BAP, 100 ml/l Kokosnusswasser, 0,5 % (w/v) Macerozyme R-10) verdünnt, dass eine Endkonzentration von  $4 \times 10^8$  Zellen / ml vorlag. Dies entsprach einer OD bei 600 nm von 0,8.

Die Pflanzen wurden steril von SH-Flüssigmedium entnommen und in kleinen Häufchen in Petrischalen ausgelegt. Diese wurden dann in 50 µl Einbettungsmedium (SH-Medium (siehe 2.1.6), 1,75 % (w/v) Low-Melting Agarose) aufgenommen. Die *A. tumefaciens*-Suspension wurde mit einer Füllkapillare luftblasenfrei in eine sterile Injektionskapillare gefüllt. Diese wurde in die Halterung der Injektionsanlage gedreht. Unter dem Binokular konnten dann die eingebetteten Zwerglinsen angestochen und mit der *A. tumefaciens*-Suspension geflutet werden.

Die Cokultivierung erfolgte über drei Tage bei 23 °C in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 h Helligkeit (3500 lux) und 8 h Dunkelheit auf SH-NAA-ACS-Platten (SH-Medium + 5 µM NAA + 200 µM Acetosyringon, 5 g/l Microagar). Anschließend wurden die *W. brasiliensis* in SH-Flüssigmedium mit 250 µg/ml Cefotaxim und 50 µg/ml Penicillin umgesetzt.

### **2.3.2.3 Transformation von *Wolffia australiana* mittels Vakuuminfiltration von *Agrobacterium tumefaciens***

(nach Boehm *et al.*, 2001, Hetzel, 2005)

Transgene *A. tumefaciens* wurden in 5 ml-Flüssigkulturen unter Zusatz von Acetosyringon (20 µM) angezogen (siehe 2.2.1.2.1). Mit 1 ml dieser Vorkulturen wurden dann erneut 5 ml-Flüssigkulturen beimpft, diesmal bei pH 5,6 und unter Zugabe von 200 µM Acetosyringon, und für etwa 20 h bis 24 h weiterkultiviert. Diese Kulturen wurden in 10 ml-Erlenmeyerkolben gegeben. *W. australiana* wurden zugegeben, bis die Oberfläche der Suspension bedeckt war. Dann wurde dreimal für 6 min bei einem Druck von etwa 10 kPa infiltriert. Dabei wurden die Versuchsansätze auf dem Magnetrührer bei 100 rpm durchmischt. Abgesunkene Pflanzen wurden mit einer Pipette unter Verwendung von abgeschnittenen Pipettenspitzen entnommen. Diese Pflanzen wurden nun auf unterschiedliche Art und Weise weiterkultiviert. Hier wurden SH-Flüssigmedium, SH-Festmedium mit Zusatz von 20 g/l Saccharose und SH-Festmedium mit Zusatz von 200 mM Acetosyringon verwendet (siehe 3.4.2.2).

## **2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1 DNA-Isolationen**

Zur DNA-Isolation verwendete Pipettenspitzen, Eppendorf-Caps und Lösungen wurden vor Gebrauch für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Eine Ausnahme bilden die Bestandteile verwendeter Kits (siehe 2.4.1.1.2), die bereits in gebrauchsfertigem Zustand geliefert wurden.

### 2.4.1.1 Plasmid-Präparation aus *Escherichia coli*

Zur Präparation von Plasmiden aus *E. coli* wurde standardmäßig das Protokoll nach Birnboim & Doly (siehe 2.4.1.1.1) verwendet. Ausnahmen bildeten Isolationen, die zur Sequenzierung eingesetzt wurden. Hier war eine höhere Reinheit der Probe erforderlich, so dass eine Säulenaufreinigung mit einem Kit (siehe 2.4.1.1.2) gewählt wurde.

#### 2.4.1.1.1 Plasmid-Präparation aus *Escherichia coli*

(nach Birnboim & Doly, 1979)

Die Bakterien wurden in 5 ml-Flüssigkulturen über Nacht vermehrt. Am nächsten Tag wurden sie durch Zentrifugation (15 min, 3220 x g, RT) geerntet und in 200 µl TE (50 mM Tris, 10 mM NaEDTA pH 7,5) resuspendiert. Zusätzlich wurden 2 µl RNase A-Lösung (10 g/l in 10 mM Kaliumacetat, 100 mM Tris / HCl, pH 7,4) zugegeben. Dann wurden 400 µl NaOH / SDS (0,2 M NaOH, 10 mg/l SDS) hinzugefügt, invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300 µl kalte KAc-COOH-Lösung (3 M Kaliumacetat, 1,8 M Ameisensäure) zugegeben, kräftig geschüttelt und 5 min auf Eis gekühlt.

Nach Zentrifugation (5 min, 20800 x g, RT) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Cap überführt. Zum Fällern der DNA wurden 400 µl Isopropanol zugegeben, invertiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 20800 x g, RT). Zum Waschen des DNA-Pellets wurden nach Abnahme des Isopropanols 50 µl Ethanol (p. A.) 70 % (v/v) zugegeben und erneut zentrifugiert (3 min, 20800 x g, RT). Anschließend wurde das Pellet luftgetrocknet und in 20 µl A. demin. rehydratisiert.

#### 2.4.1.1.2 Plasmid-Präparation aus *Escherichia coli*

(mit QIAprep® Miniprep Kit. Qiagen, Hilden (D))

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 2.4.1.2 DNA-Isolation aus *Agrobacterium tumefaciens*

(nach Birnboim & Doly, 1979)

Hier wurde das gleiche Protokoll wie zur Plasmid-Präparation aus *E. coli* verwendet (siehe 2.4.1.1.1). Bei der Präparation von DNA aus *A. tumefaciens* lieferte diese Methode jedoch nicht ausschließlich Plasmid sondern auch genomische DNA.

### 2.4.1.3 DNA-Isolation aus *Nicotiana tabacum*

(nach Murray & Thompson, 1980)

Etwa 10 cm<sup>2</sup> eines Blatts von *N. tabacum* wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert. Es erfolgte die Zugabe von 900 µl auf 70 °C erwärmten Extraktionspuffer (100 mM Tris / HCl pH 8,0, 20 mM NaEDTA, 1,4 M NaCl, 35 g/l CTAB, 2,5 ml/l 2-Mercaptoethanol (frisch zugeben)). Dann wurde für 5 min bei 70 °C inkubiert, gefolgt von 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 20800 x g, RT) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Cap überführt. Dort wurden 900 µl Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24 : 1) zugegeben, geschüttelt und erneut zentrifugiert (15 min, 20800 x g, RT). Die obere wässrige Phase wurde sodann in ein neues Eppendorf-Cap überführt, und 550 µl eiskalter Isopropanol und 80 µl 3 M Natriumacetat pH 5,3 wurden zugegeben. Der Ansatz wurde mehrere Male invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (20 min, 20800 x g, 4 °C) gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal durch Zugabe von 250 µl Ethanol (p. A.) 70 % (v/v), Zentrifugation (3 min, 20800 x g, RT) und Verwerfung des Überstands gewaschen. Schließlich wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl A. demin. resuspendiert.

### 2.4.2 RNA-Isolationen

Zur RNA-Isolation verwendete Pipettenspitzen, Eppendorf-Caps und Lösungen wurden vor Gebrauch für 1 h bei 121 °C autoklaviert. Eine Ausnahme bilden die Bestandteile der Kits, die bereits in gebrauchsfertigem Zustand geliefert wurden.

#### 2.4.2.1 mRNA-Isolation aus *Nicotiana tabacum*

(mit Oligotex Direct mRNA Mini Kit. Qiagen, Hilden (D))

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Pro Ansatz wurden 20 µl Oligotex-Suspension verwendet.

#### 2.4.2.2 RNA-Isolation aus *Wolffia australiana* und *Wolffia brasiliensis*

(mit Nucleospin® RNA Plant. Macherey & Nagel, Düren (D))

Die Zwerglinsen wurden bei Raumtemperatur mit einem Homogenisator zerdrückt, danach erfolgte die Durchführung nach Angaben des Herstellers.



### 2.4.3 PCR

(nach Mullis *et al.*, 1986)

Die durchgeführten PCRs zur Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgten je nach Template und Primern mit unterschiedlichen Programmen. Gemeinsam war allen ein initialer Denaturierungsschritt für 5 min, die Anzahl von 40 Zyklen bestehend aus Denaturierungs-, Annealing- und Extension-Phasen und ein terminaler Extensionschritt von 10 min. Die Denaturierungstemperatur lag stets bei 95 °C, die Extension-Temperatur stets bei 72 °C. Als Annealing-Temperatur wurde standardmäßig 60 °C gewählt, diese wurde jedoch bei verschiedenen PCRs variiert. Die Dauer der einzelnen Phasen lag, sofern nicht anders erwähnt, standardmäßig bei 1 min, musste jedoch für verschiedene Ansätze neu optimiert werden. Nach Ablauf des Programms wurden die Ansätze auf 4 °C abgekühlt.

Es fanden verschiedene Polymerasen Verwendung. Sollte das entstandene PCR-Produkt für Klonierungen verwendet werden, so wurde Deep Vent, eine hitzestabile Polymerase mit 3'-5'-Exonuclease-Funktion (Korrekturlesefunktion), verwendet. Von dieser wurden pro Ansatz 1 u (entspricht 0,5 µl) eingesetzt. Sollte die PCR nur einem Nachweis dienen, wurde, sofern nicht anders erwähnt, Taq verwendet. Von dieser wurden pro Ansatz 1 u (entspricht 0,2 µl) eingesetzt.

Die Ansatzgröße lag stets bei 20 µl. Die Primerkonzentration betrug je 1 pmol/µl, die dNTP-Konzentration lag bei 0,15 mM. Die Template-Menge belief sich auf etwa 0,1 ng - 1 ng für Plasmid-DNA oder kleinere DNA-Fragmente. Bei genomischer DNA wurden etwa 10 ng - 50 ng verwendet. Statt präparierter DNA konnten in einer so genannten In-Cell-PCR auch ganze Bakterien als Template eingesetzt werden. Diese wurden mittels eines Zahnstochers oder einer Pipettenspitze in den Ansatz überführt.

### 2.4.4 Reverse Transkription

Es wurden im Verlauf dieser Arbeit zwei verschiedene Kits nach Herstellerangaben verwendet:

1. First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV). Roche, Mannheim (D)
2. Sensiscript RT Kit. Qiagen, Hilden (D). Hier wurden zusätzlich je x u (0,5 µl) RiboLock Ribonuclease Inhibitor zum Ansatz gegeben.

### 2.4.5 DNA-Fällung

(nach Sambrook & Russell, 2001)

Zur Gewinnung trockener DNA-Pellets oder zur Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen wurde die DNA gefällt. Dies geschah durch Zugabe des zweifachen Probenvolumens an Ethanol (p. A.) und 1/10 des Probenvolumens an Kaliumacetatlösung (3 M, pH 4,8) und anschließender Zentrifugation (60 min, 20800 x g, 4 °C). Das erhaltene Pellet wurde an der Luft getrocknet und

konnte trocken bei 4 °C verwahrt werden oder in der gewünschten Menge H<sub>2</sub>O resuspendiert werden.

#### **2.4.6 Restriktion**

(nach Brown, 1995)

Zu der DNA wurden Restriktionsenzyme und ein entsprechender 10 x Puffer gegeben, eventuell mit A. demin. aufgefüllt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Je nach verwendeten Enzymen und DNA-Mengen wurden 5 u - 20 u Enzym eingesetzt und für 1 h - 15 h inkubiert. Die verwendeten DNA-Mengen lagen zwischen 50 ng und 5 µg. Die Ansatzgrößen wurden zwischen 10 µl und 40 µl gewählt. Bei Restriktionen mit verschiedenen Enzymen zur gleichen Zeit wurde ein für alle verwendeten Enzyme geeigneter Puffer verwendet.

#### **2.4.7 Dephosphorylierung**

(nach Sambrook & Russell, 2001)

In Klonierungen verwendete Plasmide wurden dephosphoryliert, wenn sie nach erfolgter Öffnung durch Restriktionsenzyme (siehe 2.4.6) zur Selbstligation kompatible Sticky Ends besaßen. Hierfür wurden 20 u - 40 u CIAP pro Mikrogramm Plasmid zu entsprechendem Puffer und Plasmid gegeben und eventuell mit A. demin. aufgefüllt. Die Dephosphorylierung erfolgte 1 h bei 37 °C.

#### **2.4.8 Klenow Fill-In**

(nach Sambrook & Russell, 2001)

Zum Auffüllen von Sticky Ends vom 5'-Ende zum 3'-Ende wurde ein Klenow Fill-In durchgeführt. Hier wurden etwa 4 u Klenow DNA Polymerase I pro Mikrogramm Plasmid verwendet. Zusätzlich wurden dNTPs in einer Endkonzentration von 0,15 mM zugegeben. Nun wurde für 15 min bei 30 °C inkubiert, anschließend wurde das Enzym für 10 min bei 75 °C inaktiviert.

#### **2.4.9 Ligation**

(nach Sambrook & Russell, 2001)

Geschnittenes Plasmid und geschnittenes Insert (siehe 2.4.6) mit Blunt Ends oder kompatiblen Sticky Ends wurden zusammengegeben. Typischerweise wurde etwa 10 ng - 20 ng Plasmid-DNA verwendet. Die Molarität des Inserts sollte die des Plasmids um etwa das Vierfache übersteigen. Bei einer Selbstligation wurde keine Insert-DNA verwendet. Etwa 5 u der T4-Ligase pro 10 ng Plasmid und entsprechender Puffer wurden zugegeben. Eventuell wurde das Volumen mit

A. demin. aufgefüllt. Typische Ansatzgrößen lagen bei 10 µl oder 20 µl. Ligiert wurde für etwa 2 h bei Raumtemperatur oder 10 h bei 16 °C. Bei Verwendung der Quickligase genügte eine Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur.

#### **2.4.10 Agarose-Gelelektrophorese**

(nach Sambrook & Russell, 2001)

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde Universal Agarose (8 g/l für größere DNA-Fragmente ab 300 bp und 20 g/l für kleinere DNA-Fragmente unter 300 bp) in TAE (100 mM Tris, 100 mM Essigsäure, 1 mM NatriumEDTA) in einem Mikrowellenherd bis zur Auflösung erhitzt und in einen vorbereiteten Gelschlitten mit Taschenkamm gegossen. Das Gel wurde bei Raumtemperatur erkalten lassen und der Kamm entfernt. Es wurde danach in eine Gelkammer gebracht und mit TAE überschichtet. Sollte später ein Southern Blot (siehe 2.4.11) durchgeführt werden, wurde statt des TAE TBE (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM NaEDTA, pH 8,0) verwendet.

DNA-Proben wurden je mit mindestens 20 % (v/v) Probenpuffer (0,5 g/l Bromphenolblau, 300 ml/l Glycerin) zur Beschwerung versehen. Diese wurden nun in die Taschen des Agarosegels aufgetragen und bei 90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Bei genomischer DNA wurde nur eine Spannung von etwa 20 V angelegt, um so eine bessere Auftrennung zu erreichen. Auf mindestens eine Bahn des Gels wurde stets ein Größenstandard aufgetragen.

Sollte über das Gel nicht nur die Größe der DNA-Fragmente sondern auch deren Konzentration abgeschätzt werden, so wurde ein Größenstandard mit definierten DNA-Konzentrationen pro Bande (Range Mix DNA Leiter) verwendet. Durch Vergleich der Bandenintensitäten konnte so die Konzentration der DNA in der Probe ermittelt werden.

Nach dem Lauf wurde das Gel der Kammer entnommen und für etwa 15 min in ethidiumbromidhaltigem (0,001 % (w/v)) TAE bzw. TBE gefärbt. Anschließend konnten die DNA-Fragmente unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm betrachtet werden.

#### **2.4.11 Gelextraktion**

(mit Qiaquick Gel Extraktion Kit. Qiagen, Hilden (D))

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Elution von der Säule wurde stets A. demin verwendet.

#### **2.4.12 Southern Blot**

(nach Southern *et al.*, 1975)

Zunächst erfolgte die Denaturierung in einem Agarosegel (siehe 2.4.10) befindlicher doppelsträngiger DNA-Fragmente durch zweimal zwanzigminütiges Einlegen des Gels in

Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH). Danach wurde das Gel mit A. demin. gewaschen und zweimal 20 Minuten mit Neutralisierungslösung (3 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl, pH 7,5) behandelt. Nun wurde noch einmal mit A. demin. gewaschen. Das auf diese Weise vorbehandelte Gel konnte nun für den Blot verwendet werden.

Hierzu wurde über eine Schale, die mit 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat) befüllt war, eine Plastikleiste gelegt. Über diese wurden zwei in 20 x SSC getränkte Streifen Whatman 3M-Papier (Whatman, Brentford (UK)) in Breite des Gels gelegt, so dass deren Enden in die Lösung hineinragten. Auf diese Streifen wurde das vorbereitete Gel gelegt. Direkt darüber wurde eine Nylonmembran Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia, Uppsala (S)) der gleichen Größe platziert, die zuvor mit 2 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M Natriumcitrat) befeuchtet worden waren. Um die Membran herum wurde der Aufbau mit handelsüblicher Frischhaltefolie abgedichtet. Über die Membran wurden noch zwei weitere in 20 x SSC getränkte Stücke Whatman 3M-Papier (Whatman, Brentford (UK)) gelegt. Der gesamte Aufbau musste komplett luftblasenfrei erfolgen. Über diesen Aufbau wurde eine ca. 5 cm dicke Schicht saugfähiger Papierhandtücher gelegt, die mit Objekten von 1 kg - 2 kg Masse beschwert wurde. Nach einer Inkubation für 12 h - 16 h wurde die Membran entnommen und getrocknet. Die nun auf ihr befindliche DNA wurde durch beidseitige Bestrahlung der Membran mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm für 1 min fixiert.

#### **2.4.13 Sondenherstellung und Hybridisierung**

(mit Random Prime Labelling System Version II. Amersham Pharmacia, Uppsala (S))

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### **2.4.14 Signalgeneration**

(mit ECL Detection Reagents. Amersham Pharmacia, Uppsala (S))

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Belichtung wurde Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL (Amersham Pharmacia, Uppsala (S)) benutzt. Die Entwicklung des Films erfolgte unter Rotlicht durch Baden in Röntgen-Entwickler, anschließendes Baden in Röntgen-Fixierer und abschließendes Waschen in Leitungswasser.

#### **2.4.15 Sequenzierung**

Sequenzierungen wurden von MWG-Biotech AG, Ebersberg (D) durchgeführt.

## 2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1 Protein-Isolation aus *Nicotiana tabacum*

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Protokolle angewendet. Tabakpflanzen der F<sub>0</sub>-Generation wurden mit dem Protokoll unter 2.5.1.1 aufgearbeitet, Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation mit dem Protokoll unter 2.5.1.2.

#### 2.5.1.1 Protein-Isolation aus *Nicotiana tabacum*

(nach Sack, persönliche Mitteilung)

Kontaktadresse: Markus Sack: RWTH Aachen, Worringerweg 1, 52074 Aachen (D)

Zunächst wurde der Extraktionspuffer (5 mM 2-Mercaptoethanol, 25 mM Natriumascorbat, 1 % (w/v) PVPP in PBS (137 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)) angesetzt, den man vor Benutzung zum Quellen des PVPP mehrere Stunden bei 4 °C rühren musste. Nun wurden etwa 20 g - 40 g Blattmaterial von *N. tabacum* geerntet und in einen Mixer gegeben. Pro Gramm Frischgewicht wurden mindestens 2 ml Extraktionspuffer zugegeben und bei 4 °C zerkleinert. Der so gewonnene Rohextrakt wurde durch Miracloth (Calbiochem, La Jolla (USA)) abfiltriert und in einer Ultrazentrifuge abzentrifugiert (40 min, 21143 x g, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und NaCl zu einer Endkonzentration von 0,5 M und Imidazol zu einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben. Zusätzlich wurde der pH-Wert auf etwa 8,25 erhöht. Der Extrakt wurde bei 4 °C für 1 h mit etwa 100 rpm gerührt und anschließend der pH-Wert noch einmal auf 8,25 nachkorrigiert. Dann wurde wieder in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (40 min, 21143 x g, 4 °C). Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter abgegossen und stets sofort einer Aufreinigung mittels IMAC (siehe 2.5.2) unterzogen.

#### 2.5.1.2 Protein-Isolation aus *Nicotiana tabacum*

(Eigenentwicklung)

Etwa 0,5 g – 1 g Blattmaterial von *N. tabacum* wurden geerntet und in ein 15 ml-Falcontube überführt. In dieses wurden etwa 15 Wolframkugeln (Tungsten Carbide Beads 3 mm. Qiagen, Hilden (D)) zugegeben. Nun wurde mit flüssigem Stickstoff gekühlt und die Blätter auf dem Vortexer pulverisiert. Die Proteine wurden in 2 ml Extraktionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8,0) gelöst und in ein Eppendorf-Cap überführt. Dort wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 20800 x g, 4 °C) und der klare Überstand in ein neues Eppendorf-Cap überführt.

## 2.5.2 Proteinaufreinigung mittels IMAC

Auch hier wurden im Verlauf der Arbeit zwei verschiedene Protokolle angewendet. Das Protokoll unter 2.5.2.1 schloss sich an eine Protein-Isolation nach dem Protokoll unter 2.5.1.1. an. Das Protokoll unter 2.5.2.2 kam nach einer Protein-Isolation nach dem Protokoll unter 2.5.1.2 zum Einsatz.

### 2.5.2.1 Proteinaufreinigung mittels IMAC

(nach Sack, persönliche Mitteilung)

Kontaktadresse: Markus Sack: RWTH Aachen, Worringerweg 1, 52074 Aachen (D)

Alle Arbeiten zur Proteinaufreinigung fanden bei 4 °C statt. Der Proteinrohextrakt (siehe 2.5.1) wurde auf einem Magnetrührer bei 200 rpm durch Anlegen eines Vakuums für 10 min entgast. In eine Säule (Polypropylene Column (1-ml). Qiagen, Hilden (D)) wurden 500 µl Ni-NTA Agarose gegeben. Diese wurde mit 10 ml Waschpuffer (5 mM Imidazol in PBS (137 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 8) äquilibriert. Nun konnte der entgaste Extrakt auf die Säule aufgetragen werden. Eine Flussrate von 1 ml/min - 4 ml/min wurde eingestellt und der gewonnene Extrakt über 15 h - 20 h mehrfach durch die Säule gepumpt. Anschließend wurden unspezifisch gebundene Proteine mit 10 ml Waschpuffer von der Säule gewaschen. Nun wurden die auf der Säule befindlichen Proteine fraktioniert eluiert. Hier wurden stets je 3 ml von fünf Elutionspuffern (x mM Imidazol, 1 Tablette Complete, EDTA-free auf 50 ml in PBS (137 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)) mit steigender Imidazolkonzentration (50 mM Imidazol, pH 8,0 / 100 mM Imidazol, pH 8,0 / 200 mM Imidazol, pH 8,0 / 400 mM Imidazol, pH 8,0 / 500 mM Imidazol, pH 6,0) aufgetragen und in Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen. Insgesamt wurden somit pro Pflanze 15 Fraktionen erhalten.

### 2.5.2.2 Proteinaufreinigung mittels IMAC

(mit Ni-NTA Spin Kit. Qiagen, Hilden (D))

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Hier wurde das Rezept für eine denaturierende Aufreinigung gewählt.

## 2.5.3 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

(nach Bradford, 1987)

In Mikrotiterplatten wurden je 20 µl zu messender Probe mit 100 µl Bradford-Reagenz (100 mg/l Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 % (v/v) Ethanol, 8,5 % (v/v) Phosphorsäure) versehen. Die Ansätze wurden 5 min im Dunkeln inkubiert und schließlich im ELISA-Reader bei

595 nm vermessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Vergleich mit einer mit unterschiedlichen Konzentrationen von BSA (0 mg/l - 100 mg/l) erstellten Eichreihe.

#### 2.5.4 Proteinfällung

(nach England & Seifter, 1990)

Zur Konzentrierung von Proteinextrakten wurden die Proteine gefällt und in einem geringeren Flüssigkeitsvolumen resuspendiert. Hierzu wurden sie mit dem zweifachen Probenvolumen an Ethanol (p. A.) versehen und 14 h - 20 h bei -20 °C inkubiert. Dann wurden die Proteine durch Zentrifugation (30 min - 60 min, 20800 x g, 4 °C) gefällt, der Überstand abgegossen und das Pellet an der Luft getrocknet. Schließlich wurde dieses im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 2.5.5 SDS-PAGE

(nach Shapiro *et al.*, 1967)

Die Herstellung von SDS-Gelen erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Verwendet wurden 12,5-prozentige Gele. Hier mussten 2,5 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (Acrylamid 300 g/l, Bisacrylamid 1,5 g/l), 1500 µl 1,5 M Tris pH 8,8, 2 ml H<sub>2</sub>O, 60 µl SDS 10 % (w/v), 60 µl APS 10 % (w/v) und 6 µl TEMED zusammengegeben werden. Sofort nach der Zugabe von TEMED wurde gemischt, die Lösung in die Gelkammer gegeben und mit Isopropanol überschichtet.

Nach etwa 15 min - 20 min war das Trenngel polymerisiert, das Isopropanol wurde mit H<sub>2</sub>O abgewaschen und das Trenngel getrocknet. Nun konnte das Sammelgel appliziert werden. Hier wurden 333 µl Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (Acrylamid 300 g/l, Bisacrylamid 15 g/l), 625 µl 0,5 M Tris pH 6,6, 1,5 ml H<sub>2</sub>O, 25 µl SDS 10 % (w/v), 25 µl APS 10 % (w/v) und 2,5 µl TEMED zusammengegeben, gemischt, auf das Trenngel gegeben und ein Taschenkamm eingeführt. Nach weiteren 15 min - 20 min war auch das Sammelgel polymerisiert. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit Laufpuffer (14,4 g/l Glycin, 3 g/l Tris, 1 g/l SDS) gespült. Sodann wurden die Gele in die Laufkammer überführt und mit Laufpuffer überschichtet.

Die Proteinproben wurden mit mindestens 20 % (v/v) Laemli-Puffer (8 g/l Bromphenolblau, 20 g/l SDS, 100 ml/l Glycerin in 62,5 mM Tris pH 6,6) und 10 % (v/v) 0,5 M DTT versehen und 5 min bei 100 °C im Wasserbad gekocht. Die so vorbereiteten Proben konnten nun auf das Gel aufgetragen werden. Stets wurde auf eine Bahn auch ein Größenstandard aufgetragen. Sollte das Gel geblottet werden (siehe 2.5.8), wurde der Multi-Tag-Marker als Größenstandard verwendet.

Die Proben wurden bei einer Stromstärke von 25 mA aufgetrennt, bis die blau gefärbte Lauffront am Ende des Gels angekommen war. Direkt im Anschluss erfolgten entweder eine Silberfärbung (siehe 2.5.6) oder ein Western Blot (siehe 2.5.8).

### 2.5.6 Silberfärbung

(nach O'Connell & Stults, 1997)

Zunächst wurden die in einem SDS-Gel befindlichen Proteine durch dreimal 30 min Inkubation in Fixierer (300 ml/l Ethanol, 100 ml/l Essigsäure) im Gel verankert. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe für je 10 min auf einem Rundschüttler, der erste in 20 % (v/v) Ethanol, der zweite in H<sub>2</sub>O. Nun wurden 50 ml Sensitivierungslösung (0,2 g/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zugegeben und für 1 min inkubiert. Nach zwei Waschschriffen mit H<sub>2</sub>O für je 20 s, fand die eigentliche Färbung durch Zugabe von 30 ml Silbernitratlösung (1 g/l AgNO<sub>3</sub>) statt. Nach Inkubation für 30 min auf einem Rundschüttler wurde das Gel für 10 s in H<sub>2</sub>O gewaschen. Dann wurde so lange mit 50 ml Entwickler (0,7 ml/l 37 % (w/v) Formaldehyd, 30 g/l K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 mg/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inkubiert, bis Banden gut sichtbar wurden. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von Stopplösung (50 g/l Tris, 25 ml/l Essigsäure) beendet.

### 2.5.7 Dot Blot

(nach Sambrook & Russell, 2001)

Je 2 µl - 4 µl Proteinextrakt wurden auf eine Nylonmembran Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia, Uppsala (S)) aufgetragen.

### 2.5.8 Western Blot

(nach Gershoni & Palade, 1982)

Proteine konnten nach einer Auftrennung durch SDS-PAGE (siehe 2.5.5) mittels Western Blot auf eine Nylonmembran Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia, Uppsala (S)) übertragen werden. Hier wurden zunächst Whatman 3M-Papier (Whatman, Brentford (UK)), SDS-Gel und Membran in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 200 ml/l Methanol, pH 8,3) äquilibriert. Dann erfolgte ein luftblasenfreier Aufbau von zwei Lagen Whatman 3M-Papier, SDS-Gel, Membran und zwei weiteren Lagen Whatman 3M-Papier. Dieser Aufbau wurde in den Tank einer Blotting-Apparatur gebracht, welcher mit Transferpuffer befüllt wurde. Eine Spannung von 100 V wurde für etwa 1 h so angelegt, dass das Gel auf Seite der Kathode und die Membran auf Seite der Anode lagen. Die Effizienz des Blots konnte im Anschluss durch Färbung mit Ponceau S (siehe 2.5.9) ermittelt werden.

### 2.5.9 Färbung mit Ponceau S

(nach Salinovitch & Montelaro, 1986)

Nach einem erfolgreichen Western Blot konnten die Proteine auf der Membran mittels Färbung mit Ponceau S reversibel angefärbt werden. Zunächst wurde die Membran für 5 min in Methanol



inkubiert. Dann wurde sie für 5 min in Färbelösung (5 g/l Ponceau S, 10 ml/l Essigsäure) eingelegt. Nach anschließendem Waschen in H<sub>2</sub>O waren Proteine durch eine rote Färbung nachweisbar. Durch Waschen in PBS (137 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) konnte die Membran wieder entfärbt und schließlich zur Hybridisierung (siehe 2.5.10) verwendet werden.

### 2.5.10 Hybridisierung

(nach Huhn, persönliche Mitteilung)

Kontaktadresse: Dr. Michael Huhn: Fraunhofer IME, Worringerweg 1, 52074 Aachen (D)

Die Membranen aus einem Dot Blot (siehe 2.5.7) oder einem Western Blot (siehe 2.5.8) wurden durch Inkubation für mindestens 1 h in PBST (137 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 ml/l Tween 20) mit 20 mg/l BSA geblockt. Nach zweimaligen Waschen in PBST und folgendem Waschen in PBS (137 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) für je 10 min auf dem Rundschüttler erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers (2,5 µl Penta-His Antibody in 5 ml PBST + 2 % (w/v) BSA) und luftblasenfreies Einschweißen in einen handelsüblichen Gefrierbeutel. Nun wurde für 2 h auf einem Kippschüttler inkubiert, hierbei wurde der eingeschweißte Blot öfters umgedreht.

Anschließend wurde die Membran erneut zweimal in PBST und folgend einmal in PBS für je 10 min auf dem Rundschüttler gewaschen. Danach wurde der Sekundärantikörper (2,5 µl Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase Conjugate in 5 ml PBST + 2 % (w/v) BSA) zugegeben und der Ansatz wurde luftblasenfrei in einen handelsüblichen Gefrierbeutel eingeschweißt. Nun erfolgte eine Inkubation für 1 h auf einem Kippschüttler. Auch hier wurde der eingeschweißte Blot öfters umgedreht. Wieder wurde zweimal in PBST und folgend einmal in PBS für je 10 min auf dem Rundschüttler gewaschen. Direkt im Anschluss erfolgte stets die Signalgeneration (siehe 2.5.11)

### 2.5.11 Signalgeneration

(nach Blake *et al.*, 1984)

Im Anschluß an die Hybridisierung (siehe 2.5.10) wurden die Membranen in AP-Puffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,6) äquilibriert. Dann wurden die Membranen in AP-Puffer mit NBT-Lösung (33,3 g/l NBT in Dimethylformamid) und BCIP-Lösung (16,5 g/l BCIP in Dimethylformamid) überführt. Hier wurden pro cm<sup>2</sup> Membran etwa 200 µl AP-Puffer und je 2 µl NBT-Lösung und BCIP-Lösung verwendet. Nach einer Inkubation im Dunkeln für 10 min - 20 min konnte an mit Sekundärantikörper markierten Stellen eine Blaufärbung beobachtet werden. Die Reaktion konnte durch kurzes Waschen in A. demin. abgestoppt werden.

### 3. Ergebnis

#### 3.1 Herstellung der Plasmide

Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene Immuntoxininfusionsgene hergestellt (siehe 3.1.1). Sollten diese Genkonstrukte in Pflanzen exprimiert werden, so war es nötig, sie flankiert von geeignetem Promotor und Terminator in die Pflanze einzubringen. Als Methode wurde die Transformation mit *A. tumefaciens* gewählt. So mussten die erstellten Immuntoxininfusionsgene in ein binäres Plasmid eingebracht werden, aus dem sie von den Bakterien in die Pflanze übertragen werden konnten (siehe 1.4.3). Um zu gewährleisten, dass jede zur Expression relevante Komponente bei Bedarf durch Restriktion ausgetauscht werden kann, wurden Kassettensysteme erstellt (siehe 3.1.2). In diese wurden die verschiedenen Immuntoxininfusionsgene integriert (siehe 3.1.3).

Während der Klonierungsarbeiten wurden durch Restriktionen (siehe 2.4.6) oder PCRs (siehe 2.4.3) die gewünschten Fragmente aus bereits vorliegenden Plasmiden entnommen und in ebenfalls mittels Restriktionen (siehe 2.4.6) geöffnete Plasmide durch Ligation (siehe 2.4.9) eingefügt. In Klammern sind bei den Restriktionen jeweils die entstandenen Fragmentgrößen angegeben. Die zur Klonierung verwendeten Fragmente sind unterstrichen.

*E. coli* DH5 $\alpha$  wurde mit den neu hergestellten Plasmiden transformiert (siehe 2.3.1.1). Aus resultierenden Klonen wurden die Plasmide isoliert (siehe 2.4.1.1) und durch geeignete Restriktionen (siehe 2.4.6) überprüft. Betrug die Abweichung des Restriktionsmusters im Vergleich zu dem Plasmid, aus dessen Backbone das neue hergestellt wurde, nur wenige Basen, war eine eindeutige Unterscheidung durch eine Restriktionsanalyse allein nicht möglich. In diesen Fällen (siehe 3.1.1.5 & 3.1.1.6) wurde zusätzlich eine PCR (siehe 2.4.3) zum Nachweis durchgeführt (siehe 4.5.1). Sollten für weitere Klonierungsschritte Schnittstellen genutzt werden, deren Enzyme methylierungssensitiv sind und deren Schnittstellen in *E. coli* DH5 $\alpha$  methyliert vorlagen, wurden entsprechende Plasmide in *E. coli* JM110 transformiert (siehe 4.5.1).

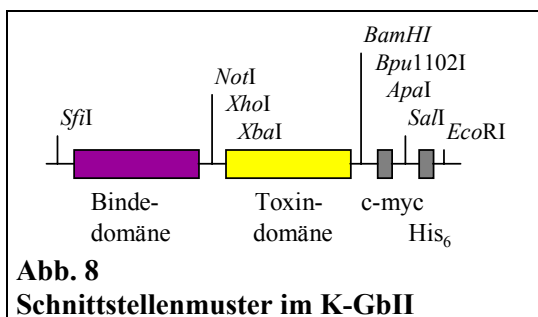
Bereiche neu hergestellter Plasmide, die über PCR generiert wurden, wurden stets auch sequenziert (siehe 4.4). Die Bakterien, deren Plasmide verifiziert wurden, wurden als Glycerinstocks aufbewahrt (siehe 2.2.1). Die Sequenzen der einzelnen Plasmiden sind im Anhang dargestellt (siehe 6). Eine Übersicht über die Gene und Regionen aller hergestellten Plasmide wird im Kapitel 3.1.4 gegeben.

##### 3.1.1 Konstruktion der Immuntoxininfusionsgene

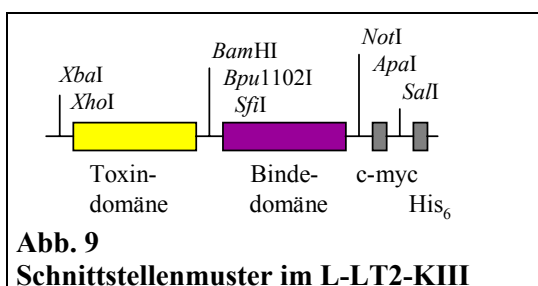
Zu Beginn dieser Arbeit lagen verschiedene Plasmide als Ausgangsmaterial zur Konstruktion der Immuntoxininfusionsgene vor. Verwendung als Toxindomäne fanden Angiogenin (siehe 1.3.2.1) und Granzym B (siehe 1.3.2.2). Als Bindedomäne wurden RFT5(scFv) (siehe 1.3.1.2) und Ki-4(scFv) (siehe 1.3.1.1) verwendet. Es wurden jeweils sowohl Konstrukte zur Codierung von Immuntoxinen mit der Toxindomäne am N-Terminus und der Bindedomäne am C-Terminus, als

auch Konstrukte in umgekehrter Orientierung erstellt (siehe 4.4). In weiteren Plasmiden wurde zur Herstellung ER-lokalisierter Proteine die Sequenz für ein KDEL-Signal an das 3'-Ende der Immuntoxininfusionsgene angefügt (siehe 1.4.2).

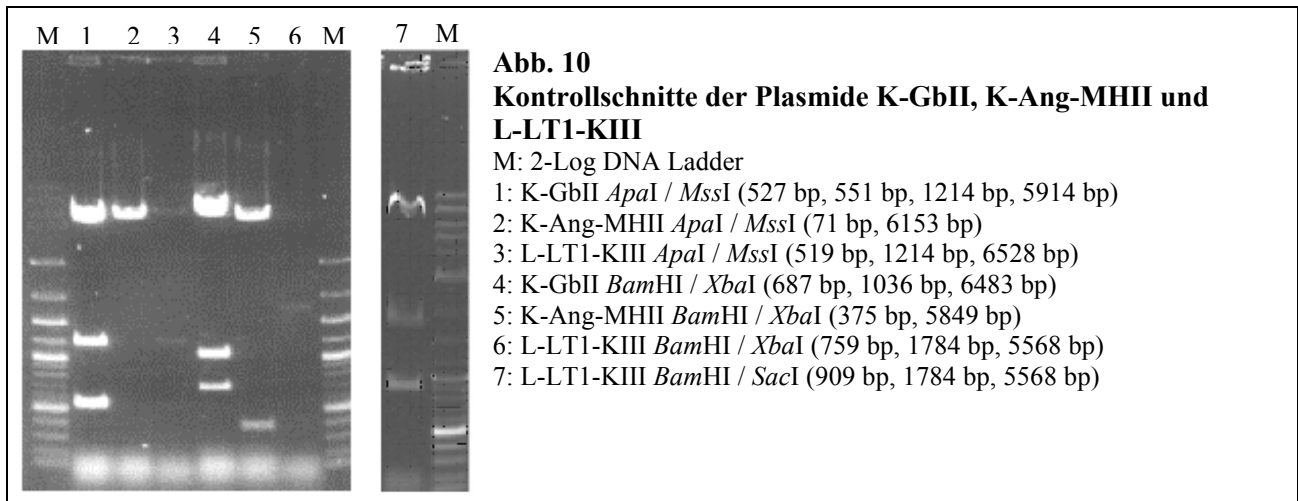
Das Plasmid pBM1.RFT5 (siehe 2.1.2) wurde zur Isolation des Gens für RFT5(scFv) verwendet (siehe 6.1.1). Aus dem Plasmid pTP2 (siehe 2.1.2) konnte das Gen für das Signalpeptid zur ER-Lokalisation der  $\alpha$ -Amylase aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) (siehe 6.1.6) amplifiziert werden. Das Plasmid m22-RTA-N97A (siehe 2.1.2) trägt das Gen für das Toxin RTA-N97A (siehe 6.1.5). Die Plasmide K-Ang-MHII, K-GbII und L-LT1-KIII sind Derivate des Plasmids pSecTag2 A (siehe 6.2.1). K-Ang-MHII (siehe 2.1.2) wurde als Quelle für das Gen für Angiogenin (siehe 6.1.3) genutzt. Das Plasmid K-GbII (siehe 2.1.2) wurde als Ressource für die Gene von Ki-4(scFv) (siehe 6.1.2) und Granzym B (siehe 6.1.4) gewählt. Des Weiteren wurden die Sequenzen für die vorhandenen Tags (His<sub>6</sub>, c-myc) genutzt und allen hergestellten Konstrukten am 3'-Ende angefügt. Das Schnittstellenmuster des Plasmids wurde zur Herstellung weiterer Plasmide genutzt. Auf der Basis dieses Backbones entstanden alle Fusionsgene, die für Immuntoxine mit der Bindedomäne am N-Terminus codieren (siehe Abb. 8)



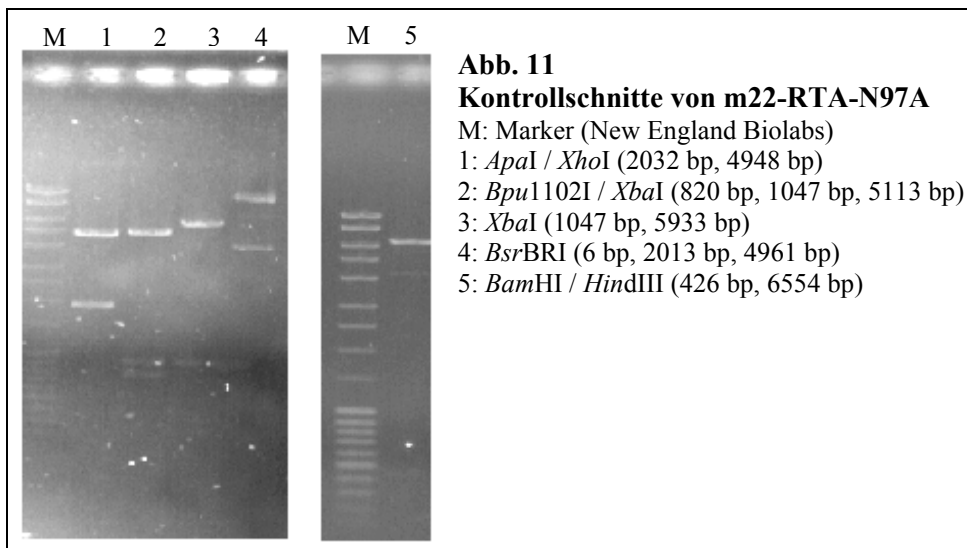
L-LT1-KIII (siehe 2.1.2) wurde aufgrund der Anordnung der Schnittstellen zur Herstellung der Fusionsgene gewählt, die für Immuntoxine mit der Toxin-domäne am N-Terminus codieren. Es fehlte allerdings im Vergleich zu der Anordnung des K-GbII die abschließende *EcoRI*-Schnittstelle (siehe Abb. 9).



Die Plasmide pTP2 und pBM1.RFT5 wurden bereits zuvor (Becker, 2001) genutzt und vor Gebrauch nicht weiter verifiziert. Die übrigen Plasmide wurden zunächst durch verschiedene Restriktionen überprüft. K-GbII, L-LT1-KIII und K-Ang-MHII wurden mit *BamHI* / *XbaI* und *ApaI* / *MssI* geschnitten. L-LT1-KIII wurde zusätzlich mit *BamHI* / *SacI* verdaut. Alle Schnitte zeigten das erwartete Bandenmuster (siehe Abb. 10).



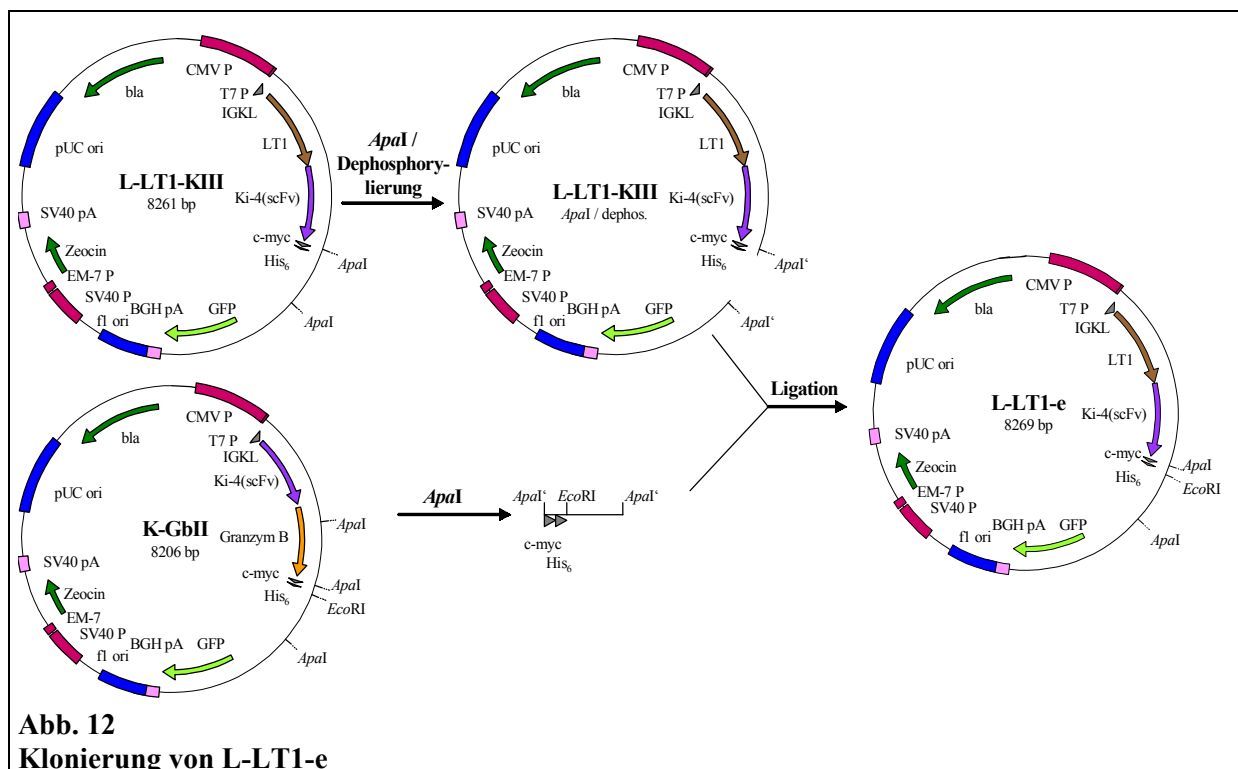
Das Plasmid m22-RTA-N97A wurde durch Restriktionen mit *BsrBRI*, *Bpu1102I* / *XbaI*, *BamHI* / *HindIII*, *XbaI* und *ApaI* / *XhoI* überprüft. Hier ergab sich ein uneinheitliches Bild (siehe Abb. 11). Die Schnitte mit *BamHI* / *HindIII* und *ApaI* / *XhoI* lieferten Fragmente der richtigen Größe, auch wenn beim Schnitt mit *BamHI* / *HindIII* zusätzliche Banden bei etwa 1,8 kb und 4,2 kb zu sehen waren. Die übrigen Schnitte ergaben teilweise Banden der falschen Größe. Beim Doppelverdau mit *Bpu1102I* / *XbaI* lag die Bande bei 820 bp jedoch vor. Diese entsprach genau dem Gen für RTA-N97A. Trotz nicht erwarteter Bandenaufteilung, die auf unstimmgige Sequenzdaten zurückzuführen waren, konnte so das Fragment des Gens für RTA-N97A isoliert werden (siehe 4.4).



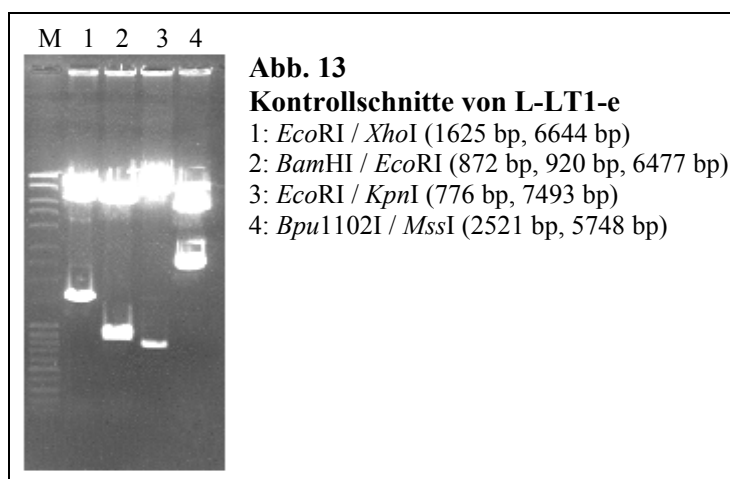
### 3.1.1.1 Backbone: L-LT1-e

Mit dem Plasmid L-LT1-e wurde der Backbone für Plasmide, die das Gen für die Bindedomäne am 5'-Ende tragen, fertiggestellt. Hier wurde im L-LT1-KIII eine *EcoRI*-Schnittstelle hinter die Sequenz für das His<sub>6</sub>-Tag gebracht. So konnten die Immuntoxininfusionsgene auch an dieser Stelle analog zu denen im K-GbII, der als Backbone für die Plasmide mit dem Gen für die Toxindomäne

am 5'-Ende fungierte, herausgeschnitten werden. Um dies zu erreichen, wurden L-LT1-KIII und K-GbII je mit *ApaI* (L-LT1-KIII: 519 bp, 7742 bp / K-GbII: 527 bp, 551 bp, 7128 bp) geschnitten. So entstand in beiden Fällen ein Fragment, welches die Tags und Teile des Terminators beinhaltet, und eines aus dem Rest des Plasmids. In dem Fragment mit den Tags aus dem K-GbII befand sich jedoch bereits die *EcoRI*-Schnittstelle. So wurde durch Ligation dieses Fragments mit dem mit *ApaI* geschnittenen Rest des L-LT1-KIII eine *EcoRI*-Schnittstelle eingefügt (siehe Abb. 12). Hier war es wichtig, dass der mit *ApaI* aufgeschnittene L-LT1-KIII zuvor dephosphoryliert worden war (siehe 2.4.7). Auf diese Weise konnte eine Selbstligation verhindert werden.

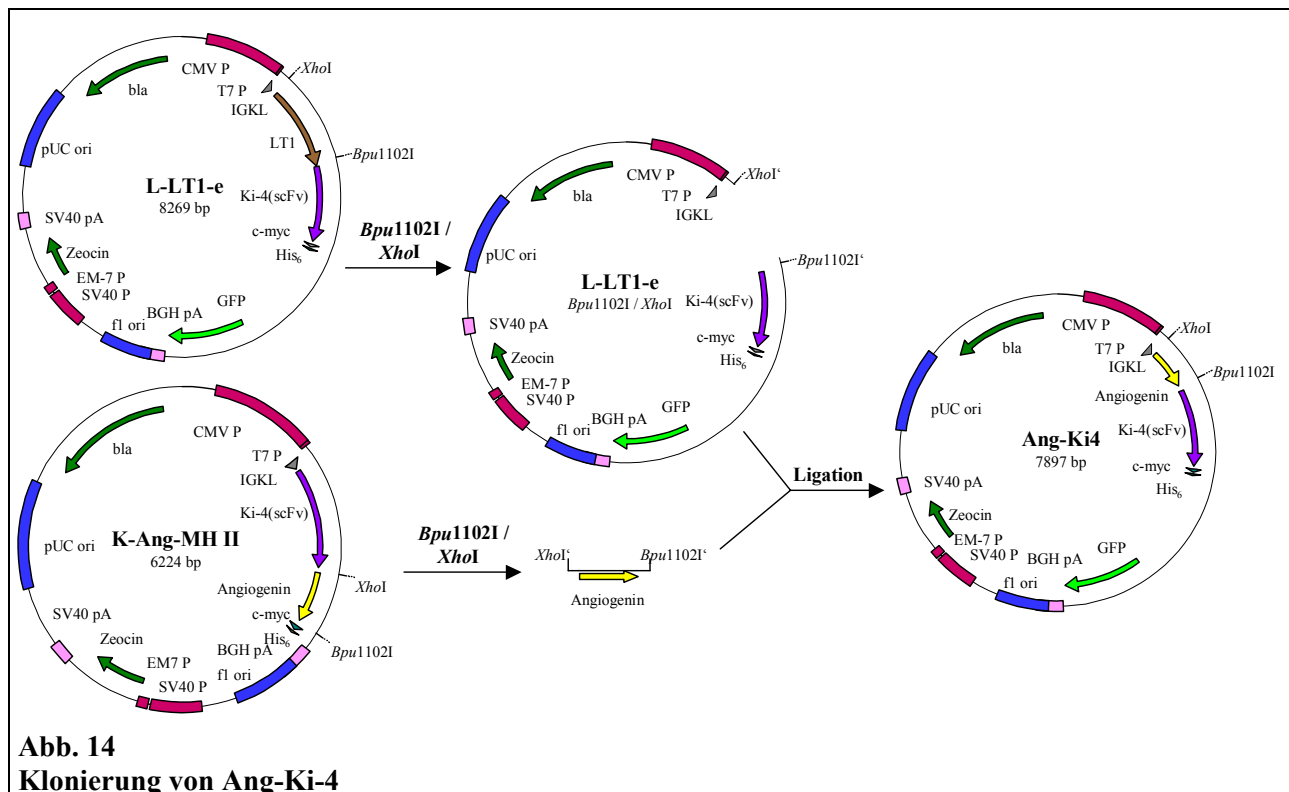


Das Plasmid wurde mittels Restriktionen überprüft. Es kamen *EcoRI* / *XhoI*, *EcoRI* / *BamHI*, *EcoRI* / *KpnI* und *Bpu1102I* / *MssI* zum Einsatz. Alle Schnitte erzeugten das richtige Bandenmuster (siehe Abb. 13).

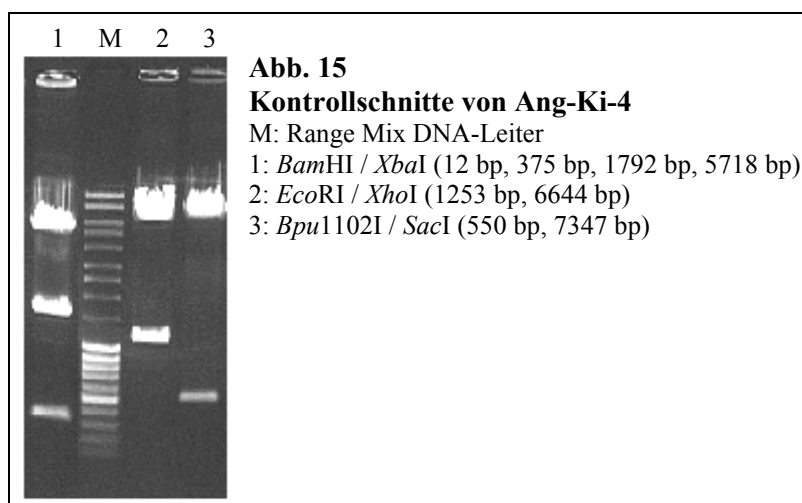


### 3.1.1.2 Plasmid mit dem Immuntoxininfusionsgen für Angiogenin-Ki-4(scFv): Ang-Ki-4

Bei der Herstellung des Ang-Ki-4 wurde aus L-LT1-e mittels *Bpu1102I* / *XhoI* (766 bp, 7503 bp) das Gen für LT1 entfernt. Dieses wurde durch das mit *Bpu1102I* / *XhoI* (394 bp, 5830 bp) aus K-Ang-MHII herausgeschnittene Gen für Angiogenin ersetzt (siehe Abb. 14).

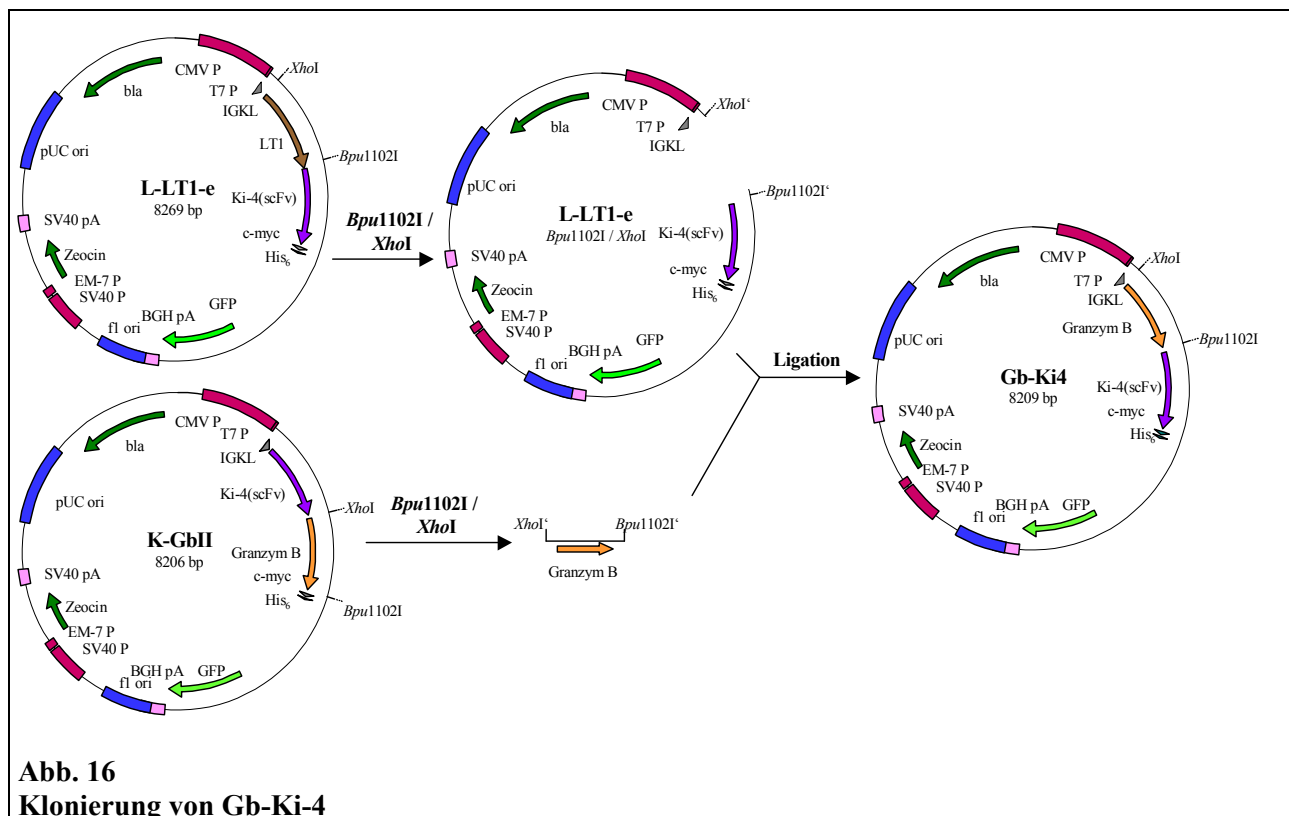


Durch Restriktionen der aus verschiedenen Klonen isolierten Plasmide mit *BamHI* / *XbaI*, *Bpu1102I* / *SacI* und *EcoRI* / *XhoI* konnte ein positiver Klon für weitere Arbeiten identifiziert werden (siehe Abb. 15).

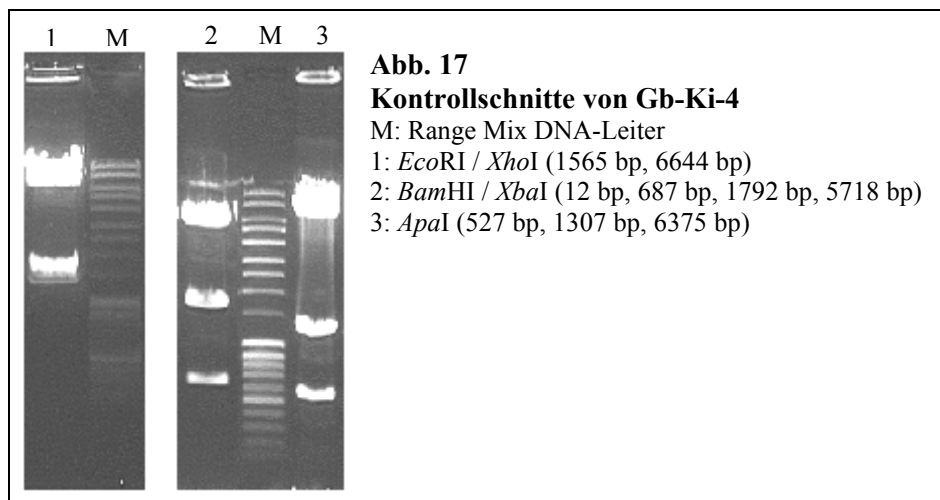


### 3.1.1.3 Plasmid mit dem Immuntoxininfusionsgen für Granzym B-Ki-4(scFv): Gb-Ki-4

Zur Herstellung des Gb-Ki-4 wurde das Gen für LT1 im L-LT1-e durch das Gen für Granzym B ersetzt. Dies geschah durch Ligation des großen Fragments von L-LT1-e *Bpu1102I* / *XhoI* (766 bp, 7503 bp) mit dem kleinen Fragment von K-GbII *Bpu1102I* / *XhoI* (706 bp, 7500 bp) (siehe Abb. 16).

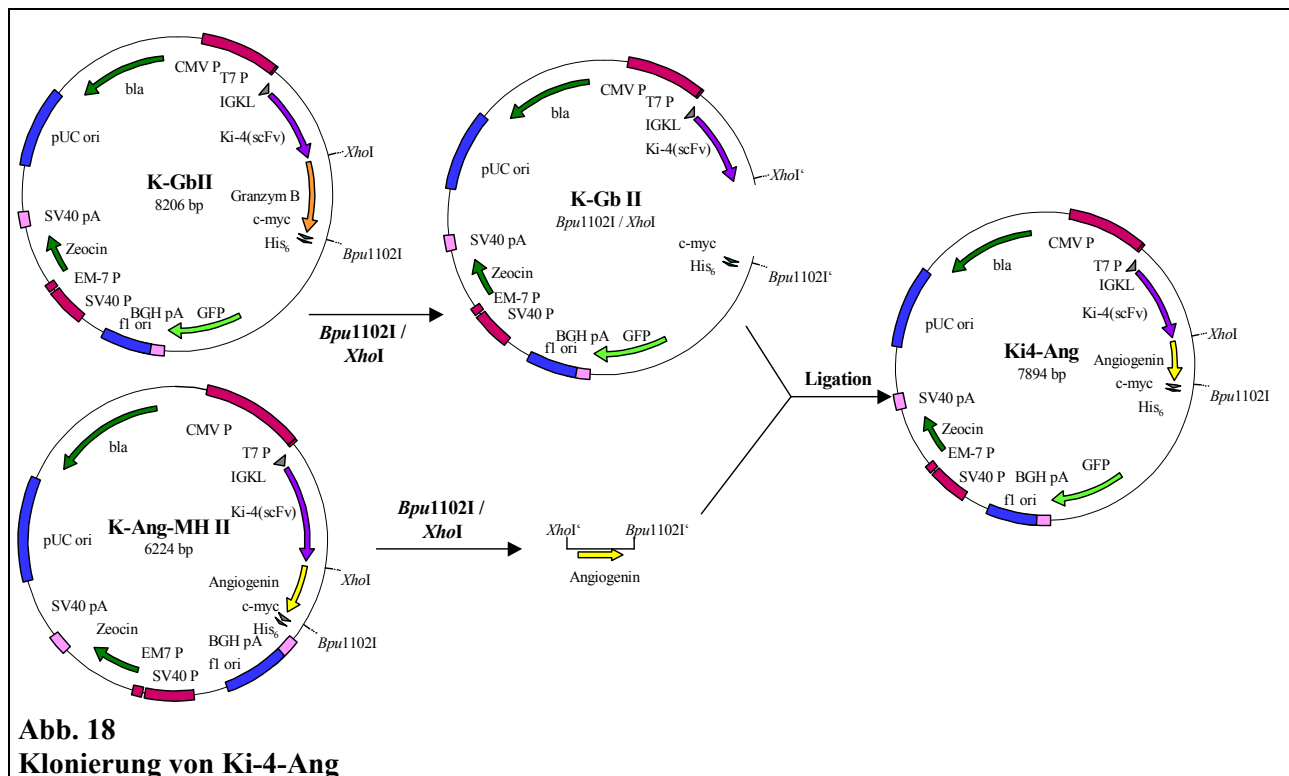


Die Plasmide verschiedener Klone wurden mittels Restriktionen mit *BamHI* / *XbaI*, *ApaI* und *EcoRI* / *XhoI* überprüft. Ein Klon konnte so bestätigt werden (siehe Abb. 17).

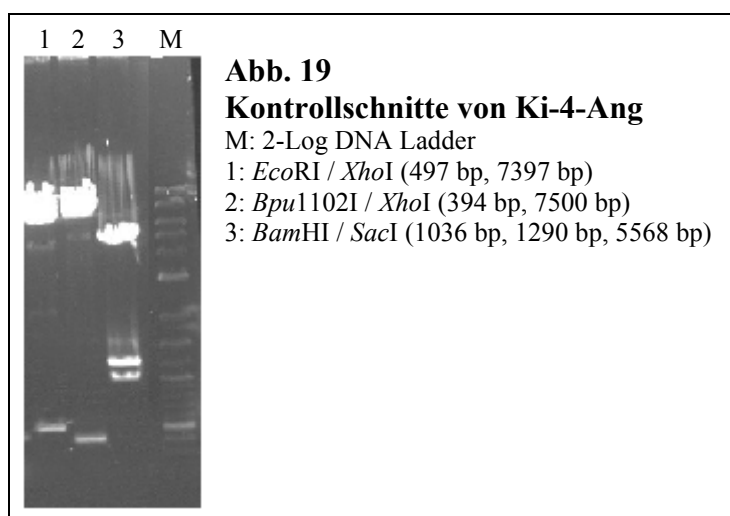


### 3.1.1.4 Plasmid mit dem Immuntoxininfusionsgen für Ki-4(scFv)-Angiogenin: Ki-4-Ang

Zur Herstellung von Ki-4-Ang wurde das Gen für Angiogenin aus dem K-Ang-MHII mit *Bpu1102I* / *XhoI* (394 bp, 5830 bp) herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Bpu1102I* / *XhoI* (706 bp, 7500 bp) geschnittenen K-GbII ligiert (siehe Abb. 18).



Die Plasmide der entstandenen Klone wurden einer Restriktionsanalyse mit *EcoRI* / *XhoI*, *BamHI* / *SacI* und *Bpu1102I* / *XhoI* unterzogen. Auch hier wurde das erwartete Bandenmuster erzielt (siehe Abb. 19).

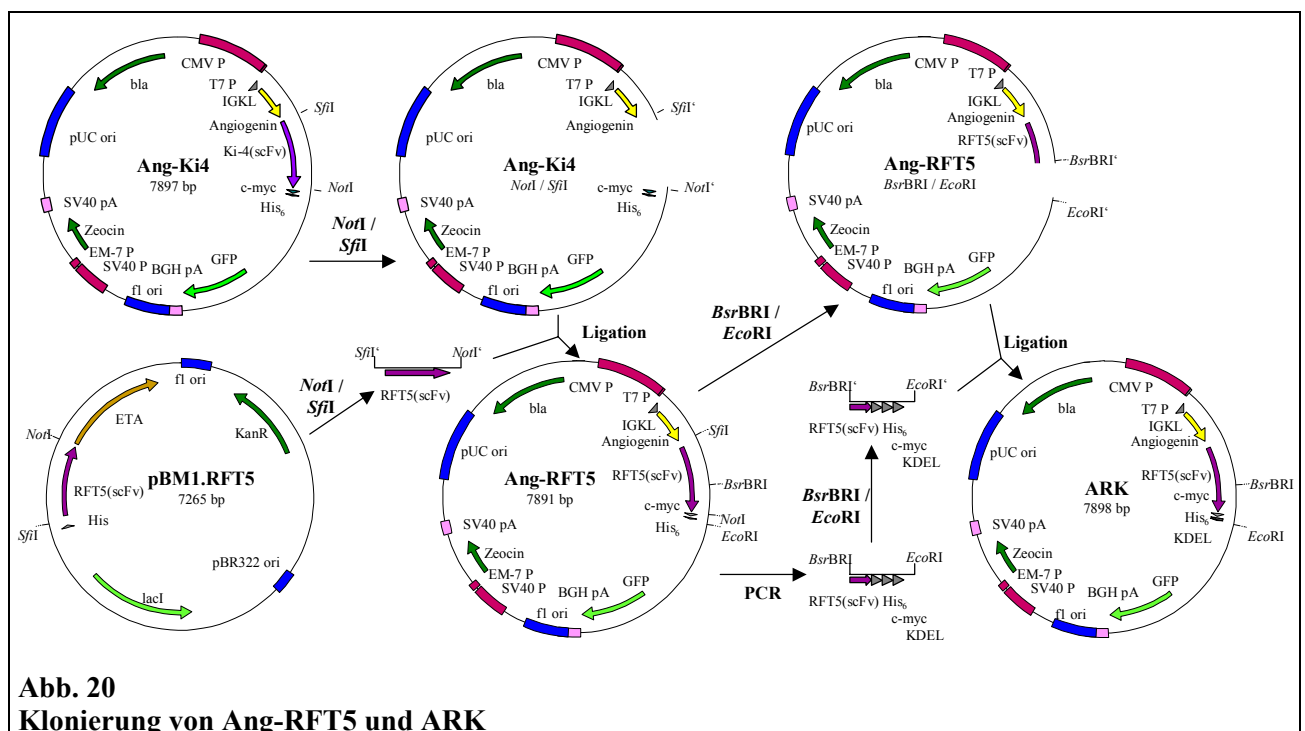




### 3.1.1.5 Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Angiogenin-RFT5(scFv)(-KDEL): Ang-RFT5 und ARK

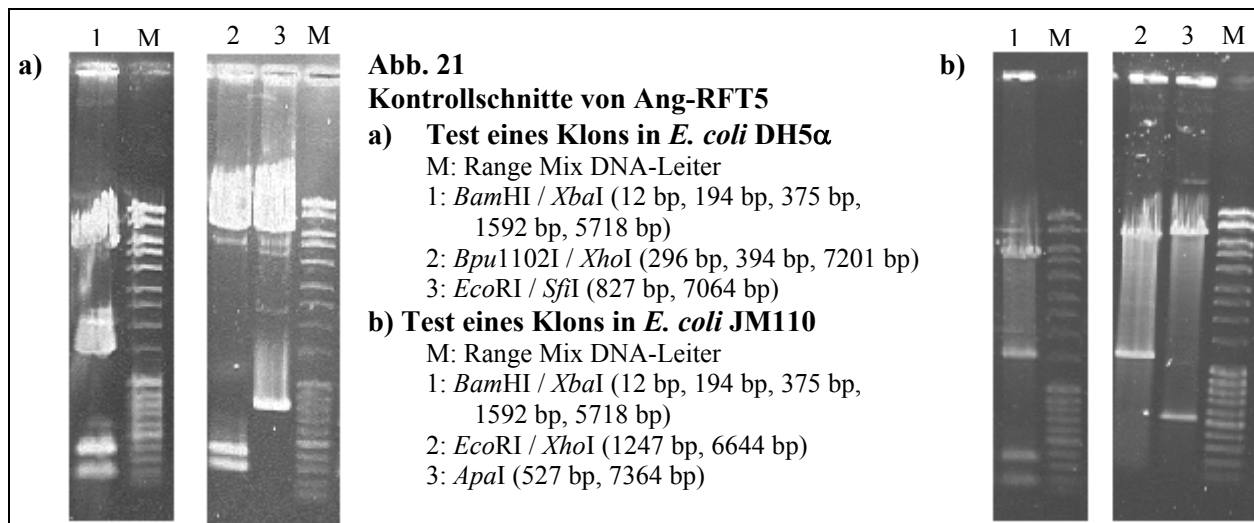
Zur Herstellung von Ang-RFT5 wurde das Gen für RFT5(scFv) mit *NotI* / *SfiI* (736 bp, 6529 bp) aus pBM1.RFT5 herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *NotI* / *SfiI* (742 bp, 7155 bp) geschnittenen Ang-Ki-4 ligiert (siehe 20).

Das Plasmid ARK enthält im Vergleich zum Ang-RFT5 die Sequenz für ein KDEL-Signal am 3'-Ende des Immuntoxininfusionsgens. Die entsprechenden Basen wurden über PCR eingefügt. Als Template diente hier der zuvor hergestellte Ang-RFT5. Es wurde das Standard-PCR-Programm (siehe 2.4.3) mit den Primern Mamfor und Mamrev benutzt. Das entstandene PCR-Produkt war 406 bp lang und beinhaltete einen Teil des Gens für RFT5(scFv), die Sequenzen für das c-myc- und das His<sub>6</sub>-Tag und die neu eingebrachte Sequenz für das KDEL-Signal. Es wurde mit *BsrBRI* / *EcoRI* (11 bp, 38 bp, 357 bp) geschnitten und in den ebenfalls mit *BsrBRI* / *EcoRI* (356 bp, 7535 bp) geschnittenen Ang-RFT5 ligiert (siehe Abb. 20).

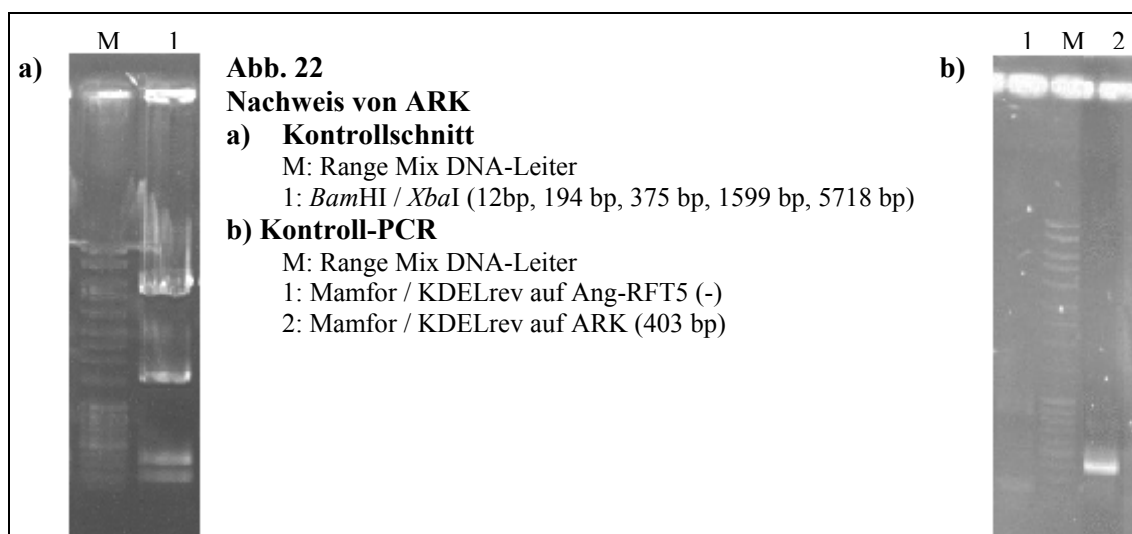


Die Plasmide von verschiedenen Klonen, die durch Transformation mit Ang-RFT5 generiert wurden, wurden mittels Restriktionen mit *BamHI* / *XbaI*, *Bpu1102I* / *XhoI* und *EcoRI* / *SfiI* überprüft. Das Plasmid konnte so bestätigt werden (siehe Abb. 21).

Zur Herstellung von ARK wurde die *BsrBRI*-Schnittstelle benötigt. Damit diese genutzt werden konnte, durfte diese nicht methyliert vorliegen. So wurde mit aus *E. coli* DH5 $\alpha$  isoliertem Ang-RFT5 zusätzlich *E. coli* JM110 transformiert (siehe 4.5.1). Das Plasmid wurde mittels Restriktionsanalyse mit *BamHI* / *XbaI*, *ApaI* und *EcoRI* / *XhoI* überprüft und konnte bestätigt werden (siehe Abb. 21).



Bei einer Restriktion der Plasmide verschiedener Klone, die mit ARK transformiert worden waren, wiesen diese beim Schnitt mit *Bam*HI / *Xba*I das richtige Bandenmuster auf. Da sich hier aber die Fragmentgrößen im Vergleich zu denen, die beim Schnitt von Ang-RFT5 entstanden, kaum unterschieden, war hier eine eindeutige Identifikation durch eine Restriktionsanalyse nicht erreichbar (siehe 4.5.1). Es musste ein zusätzlicher Nachweis durch eine PCR erbracht werden. Hier wurde das Standard-PCR-Programm mit einer Annealing-Temperatur von 48 °C und den Primern Mamfor und KDELrev verwendet. Obwohl diese PCR nur dem Nachweis galt, wurde die Polymerase Deep Vent verwendet (siehe 4.5.1). Die erwartete Bandengröße bei ARK lag bei 403 bp. Bei Ang-RFT5 wurde im Vergleich keine Bande erwartet, da es für den Primer KDELrev dort keinen komplementären Bereich gab. Trotzdem traten bei dieser PCR auch schwache Banden auf, die allerdings bei andern Größen lagen und auf unspezifische Primerbindungen zurückzuführen waren (siehe 4.5.1). Bei ARK wurde aber eine eindeutige Bande bei der richtigen Größe erzielt (siehe Abb. 22).



Schließlich wurde der über PCR hergestellte Teil des Plasmids sequenziert. Es wurden folgende zwei Sequenzabweichungen im Bereich des Gens für RFT5(scFv) gefunden (siehe 6.1.1):

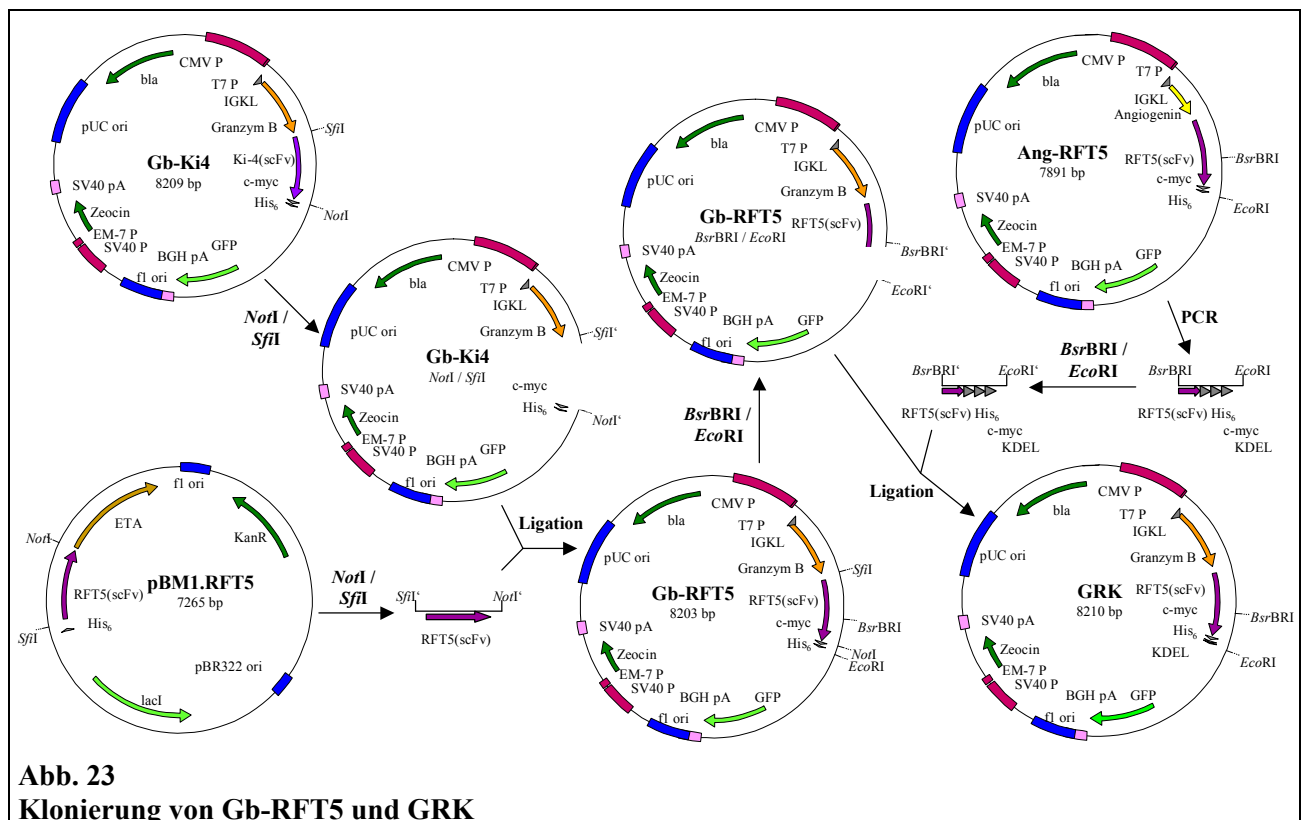
- bp 708: G statt C (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- nach bp 690: Insertion GGAGGG (hier werden die Aminosäuren GlyGly eingefügt)

Da diese Abweichungen sowohl in mehreren unabhängig voneinander hergestellten Plasmiden, als auch bei der Herstellung der Plasmide GRK (siehe 3.1.1.6), RAK (siehe 3.1.1.7) und RGK (siehe 3.1.1.8) auftraten, wurde angenommen, dass sie bereits im Template vorlagen (siehe 4.4).

### 3.1.1.6 Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Granzym B-RFT5(scFv)(-KDEL): Gb-RFT5 und GRK

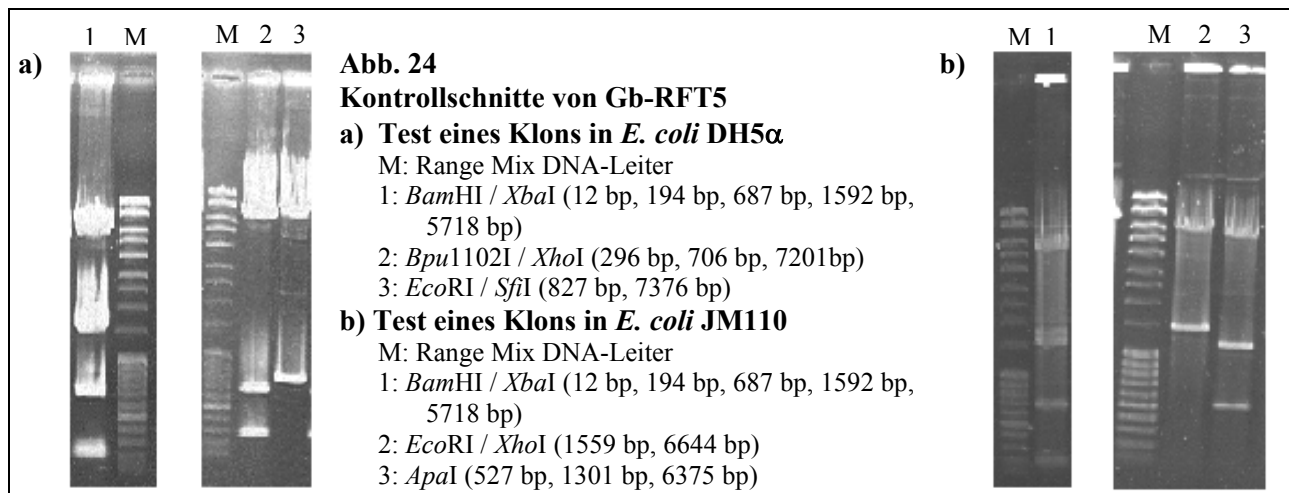
Bei der Herstellung von Gb-RFT5 wurde in Gb-Ki-4 das Gen für Ki-4(scFv) durch das Gen für RFT5(scFv) ersetzt. Dies wurde durch Ligation des großen Fragments von Gb-Ki-4 *NotI* / *SfiI* (742 bp, 7467 bp) mit dem kleinen Fragment von pPBM1.RFT5 *NotI* / *SfiI* (736 bp, 6529 bp) erreicht (siehe Abb. 23).

Das Plasmid GRK hat im Vergleich zu Gb-RFT5 die Sequenz für ein KDEL-Signal am 3'-Ende des Immuntoxininfusionsgens. Zur Herstellung konnte das gleiche mit *BsrBRI* / *EcoRI* (11 bp, 38 bp, 357 bp) geschnittene PCR-Produkt genutzt werden, welches auch zur Herstellung von ARK verwendet wurde (siehe 3.1.1.5). Dieses wurde in den mit *BsrBRI* / *EcoRI* (356 bp, 7847 bp) geschnittenen Gb-RFT5 ligiert (siehe Abb. 23).

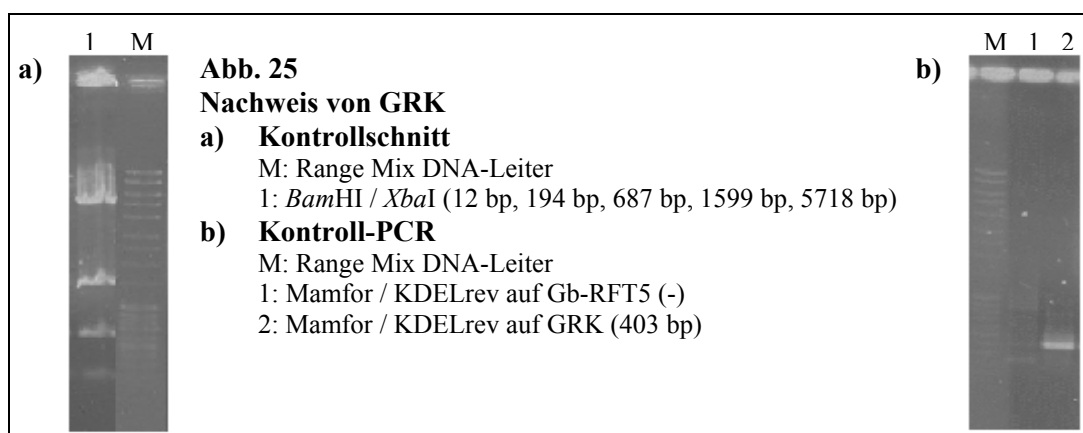


Nach der Transformation mit Gb-RFT5 wurden die Plasmide von verschiedenen Klonen Restriktionsanalysen mit *BamHI* / *XbaI*, *Bpu1102I* / *XhoI* und *EcoRI* / *SfiI* unterzogen. Es zeigte

sich das erwartete Bandenmuster (siehe Abb. 24). *E. coli* JM110 wurden mit dem entsprechenden Plasmid transformiert, da die *Bsr*BRI-Schnittstelle zur Herstellung von GRK nicht methyliert sein durfte. Hier wurden die Plasmide von mehreren Klonen durch Restriktionen *Bam*HI / *Xba*I, *Eco*RI / *Xho*I und *Apa*I überprüft. Das Plasmid eines Klons konnte so verifiziert werden (siehe Abb. 24).



Nach einer Transformation mit GRK wurden die Plasmide von mehreren Klonen durch einen Kontrollschnitt mit *Bam*HI / *Xba*I getestet (siehe Abb. 25). Hier zeigte sich das richtige Bandenmuster. Da aber der Unterschied der Fragmentgrößen im Vergleich zu Gb-RFT5 sehr gering war, musste ein zusätzlicher Nachweis über PCR erfolgen (siehe 4.5.1). Hier wurden die Primer Mamfor und KDELrev im Standard-PCR-Programm (siehe 2.4.3) verwendet. Die Polymerase war Deep Vent, obwohl sie hier nur zum Nachweis verwendet wurde (siehe 4.5.1). Die erwartete Bandengröße bei GRK lag bei 403 bp. Bei Gb-RFT5 wurde im Vergleich keine Bande erwartet, da dort kein komplementärer Bereich für den Primer KDELrev vorlag. Das Plasmid GRK wies die richtige Bande in großer Intensität auf (siehe Abb. 25). Gb-RFT5 zeigte im Vergleich nur schwache Banden unterschiedlicher Größe (siehe Abb. 25), die auf unspezifische Primerbindungen zurückzuführen waren (siehe 4.5.1).



Schließlich wurde der über PCR generierte Teil des Plasmids sequenziert. Hier wurden die folgenden zwei Abweichungen zu der Referenzsequenz im Bereich des Gens für RFT5(scFv) gefunden (siehe 6.1.1):

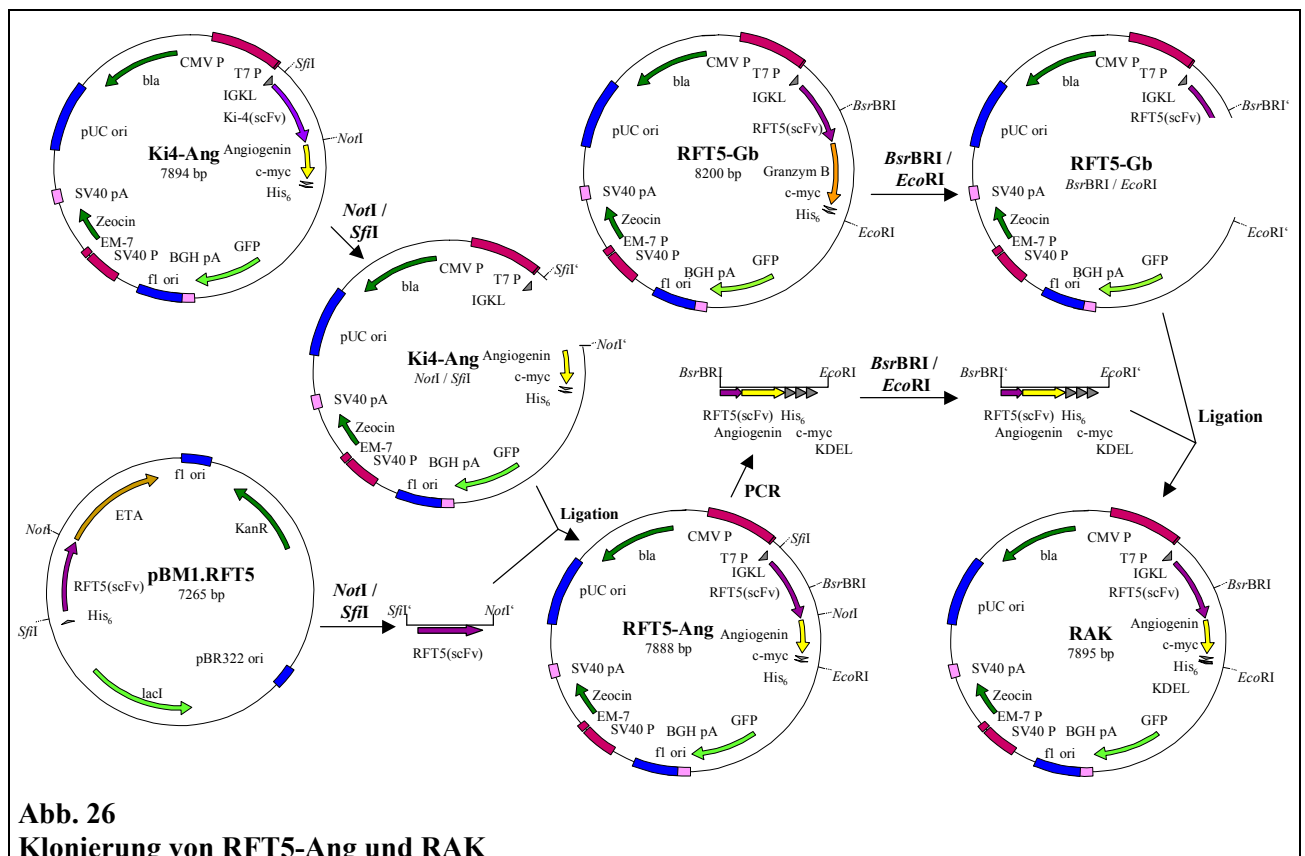
- bp 708: G statt C (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- nach bp 690: Insertion GGAGGG (hier werden die Aminosäuren GlyGly eingefügt)

Dies waren die gleichen Sequenzabweichungen, wie sie auch in den Plasmiden ARK (siehe 3.1.1.5), RAK (siehe 3.1.1.7) und RGK (siehe 3.1.1.8) auftraten (siehe 4.4).

### 3.1.1.7 Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für RFT5(scFv)-Angiogenin(-KDEL): RFT5-Ang und RAK

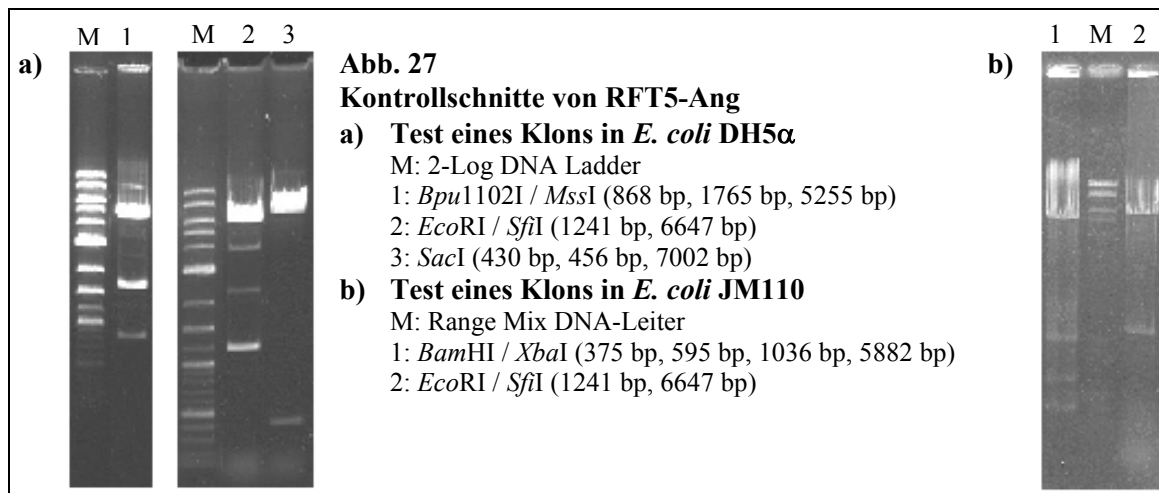
Zum Erhalt von RFT5-Ang wurde das Gen für Ki-4(scFv) mit *NotI* / *SfiI* (742 bp, 7152 bp) aus Ki-4-Ang herausgeschnitten und durch das ebenfalls mit *NotI* / *SfiI* (736 bp, 6529 bp) aus pBM1.RFT5 herausgeschnittenen Gen für RFT5(scFv) ersetzt (siehe Abb. 26).

Beim Plasmid RAK ist an das Immuntoxininfusionsgen aus dem Plasmid RFT5-Ang die Sequenz für ein KDEL-Signal an das 3'-Ende angefügt worden. Dies geschah über Amplifikation von Teilen des Gens für RFT5(scFv), des Gens für Angiogenin, des c-myc- und des His<sub>6</sub>-Tags unter Einfügung der zwölf für das KDEL-Signal benötigten Basen mittels PCR. Für die PCR wurden die Primer Mamfor und Mamrev verwendet, als Template diente RFT5-Ang. Es wurde das Standardprogramm (siehe 2.4.3) mit einer Annealing-Temperatur von 65 °C benutzt. Die Größe des PCR-Produkts lag wie erwartet bei 820 bp. Die Enden wurden mit *BsrBRI* / *EcoRI* (11 bp, 38 bp, 771 bp) abgeschnitten. Das entstandene Fragment wurde in den ebenfalls mit *BsrBRI* / *EcoRI* (1082 bp, 7118 bp) geschnittenen RFT5-Gb eingefügt (siehe Abb. 26).

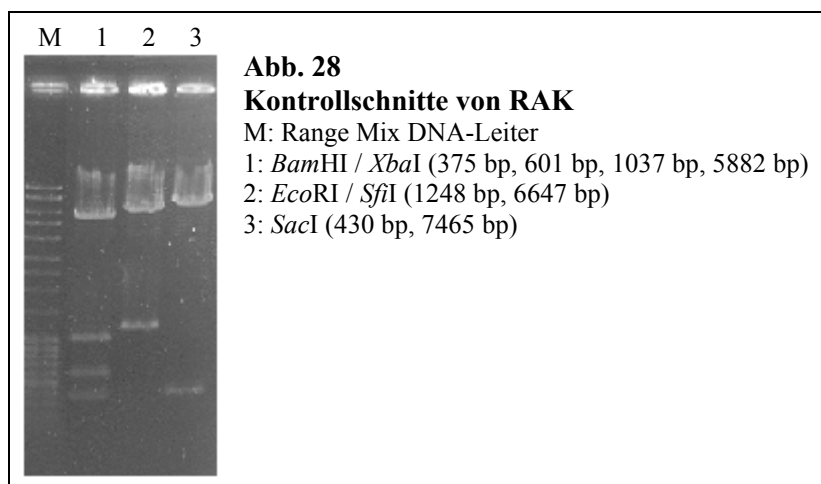


**Abb. 26**  
Klonierung von RFT5-Ang und RAK

Das Plasmid RFT5-Ang wurde nach Transformation durch Schnitte mit *Bpu*1102I / *Mss*I, *Sac*I und *Eco*RI / *Sfi*I bestätigt (siehe Abb. 27). Entsprechendes Plasmid wurde zusätzlich nach *E. coli* JM110 gebracht, da auch hier die *Bsr*BRI-Schnittstelle zur Herstellung von RGK (siehe 3.1.1.8) nicht methyliert sein durfte. Hier wurde das Plasmid eines Klon durch Schnitte mit *Bam*HI / *Xba*I und *Eco*RI / *Sfi*I verifiziert (siehe Abb. 27).



Nach Transformation mit RAK wurden die Plasmide von verschiedenen Klonen mittels Restriktionen mit *Bam*HI / *Xba*I, *Eco*RI / *Sfi*I und *Sac*I überprüft. Auch hier zeigten sich die erwarteten Banden (siehe Abb. 28).



Anschließend wurde der über PCR hergestellte Teil im Plasmid RAK sequenziert. Hier fanden sich folgende Abweichungen im Vergleich zur Referenzsequenz des RFT5(scFv) (siehe 6.1.1):

- bp 708: G statt C (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- nach bp 690: Insertion GGAGGG (hier werden die Aminosäuren GlyGly eingefügt)

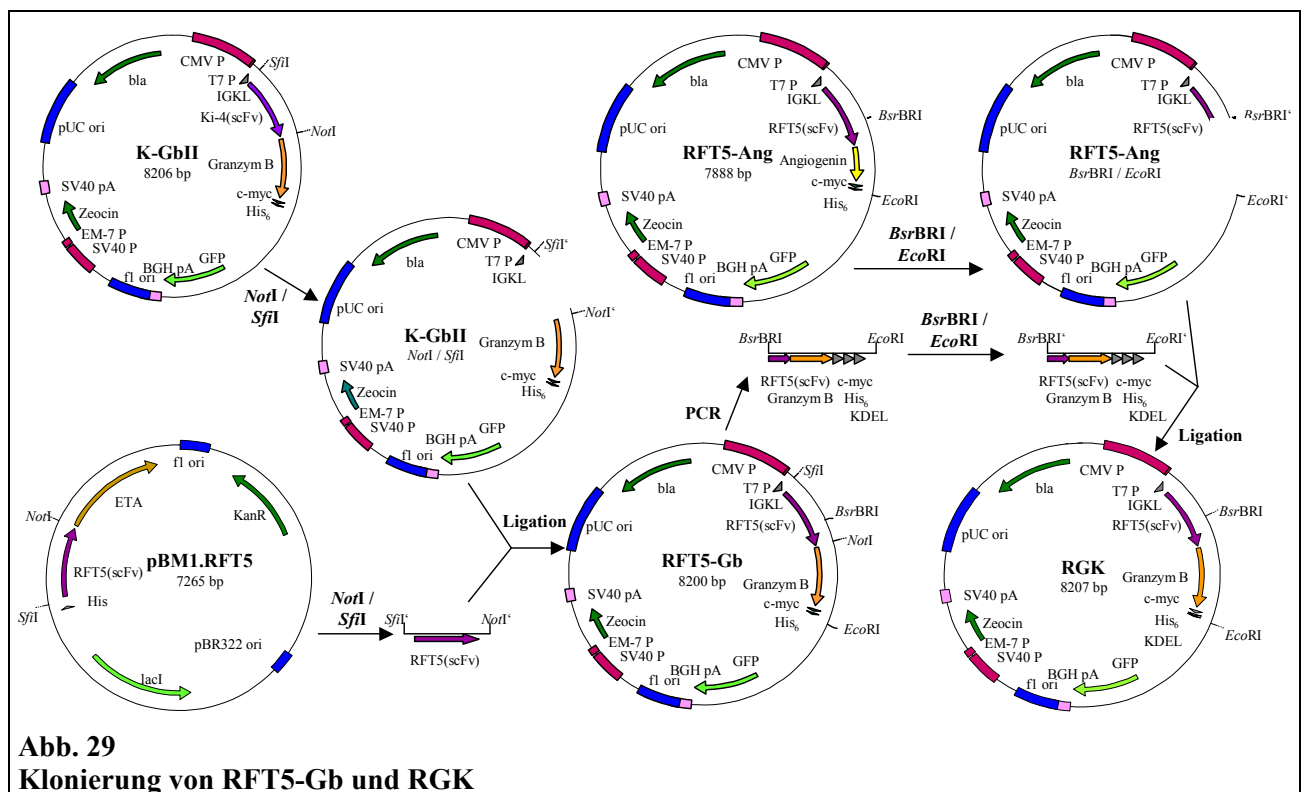
Neben diesen Abweichungen, die denen bei ARK (siehe 3.1.1.5), GRK (siehe 3.1.1.6) und RGK (siehe 3.1.1.8) entsprachen, wurde eine weitere im Bereich des Gens für Angiogenin gefunden (siehe 6.1.3):

- bp 321: C statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)

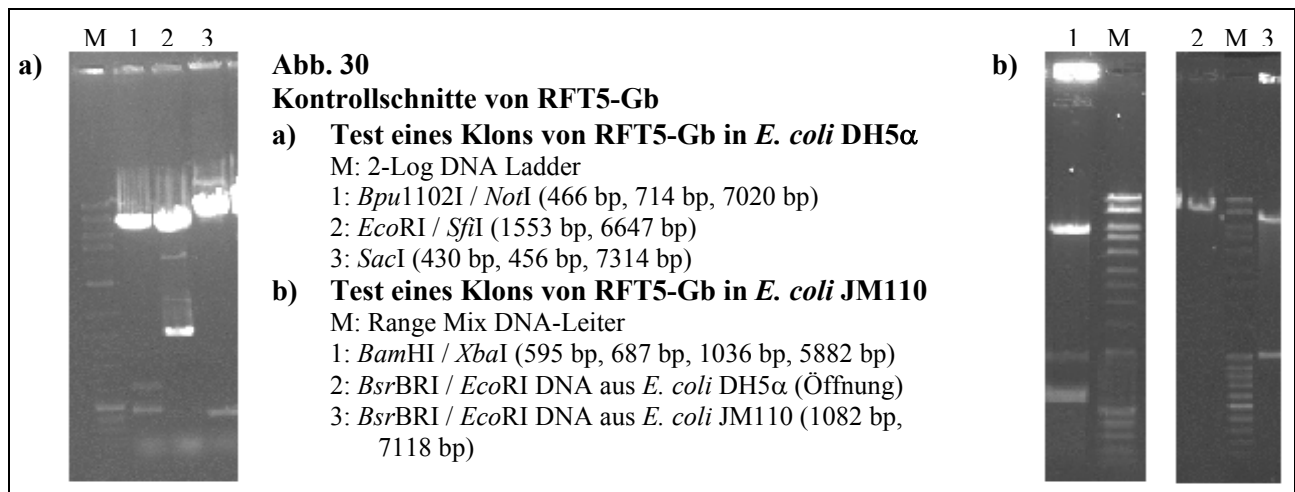
### 3.1.1.8 Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für RFT5(scFv)-Granzym B(-KDEL): RFT5-Gb und RGK

Zur Herstellung von RFT5-Gb musste das Gen für RFT5(scFv) aus pBM1.RFT5 mittels eines Schnitts mit *NotI* / *SfiI* (736 bp, 6529 bp) entnommen werden und in den ebenso mit *NotI* / *SfiI* (742 bp, 7464 bp) geschnittenen K-GbII ligiert werden (siehe Abb. 29).

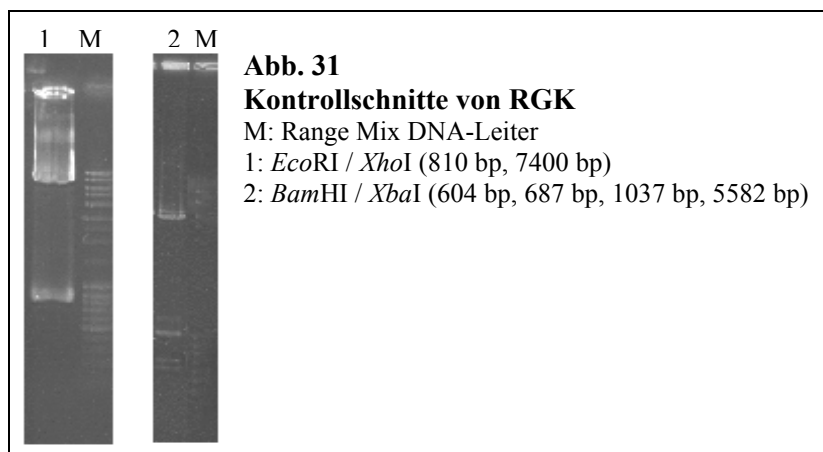
Das Plasmid RGK trägt im Vergleich zum RFT5-Gb die Sequenz für ein KDEL-Signal am 3'-Ende des Immuntoxininfusionsgens. Dieses wurde durch eine PCR im Standardprogramm angefügt (siehe 2.4.3). Die Annealing-Temperatur lag bei 65 °C. Als Template diente der zuvor hergestellte RFT5-Gb, als Primer wurden Mamfor und Mamrev verwendet. Das PCR-Produkt war 1132 bp lang und beinhaltete Teile des Gens für RFT5(scFv), das Gen für Granzym B, das c-myc- und das His<sub>6</sub>-Tag sowie die neu eingefügten Basen, die für das KDEL-Signal codierten. Es wurde mit *BsrBRI* / *EcoRI* (11 bp, 38 bp, 1083 bp) geschnitten und in den ebenfalls mit *BsrBRI* / *EcoRI* (770 bp, 7118 bp) geschnittenen RFT5-Ang kloniert (siehe Abb. 29).



Das Plasmid RFT5-Gb wurde mittels Restriktionen mit *SacI*, *EcoRI* / *SfiI* und *Bpu1102I* / *NotI* überprüft. Es ergab sich das erwartete Bandenmuster (siehe Abb. 30). Das entsprechende Plasmid wurde dann zusätzlich in *E. coli* JM110 eingebracht, damit zur Herstellung von RAK (siehe 3.1.1.7) die *BsrBRI*-Schnittstelle nicht methyliert vorlag. Die Plasmide von verschiedenen Klonen wurden durch Restriktionen mit *BsrBRI* / *EcoRI* und *BamHI* / *XbaI* getestet. Ein Klon konnte auf diese Weise verifiziert werden (siehe Abb. 30).



Nachdem RFT5-Ang in *E. coli* JM110 vorlag, konnte das Plasmid RGK hergestellt werden. Das Plasmid wurde nach der Transformation mittels Restriktionen mit *Bam*HI / *Xba*I und *Eco*RI / *Xho*I kontrolliert. Es zeigten sich die erwarteten Banden (siehe Abb. 31).



Der über PCR amplifizierte Bereich im RGK wurde sequenziert. Es traten die folgenden Sequenzabweichungen im Bereich des Gens für RFT5(scFv) auf:

- bp 708: G statt C (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- nach bp 690: Insertion GGAGGG (hier werden die Aminosäuren GlyGly eingefügt)

Hier traten neben diesen Abweichungen, die auch schon bei ARK, GRK und RAK festzustellen waren (siehe 3.1.1.5 – 3.1.1.7), fünf weitere im Bereich des Gens für Granzym B auf (siehe 6.1.4).

- bp 17: A statt T (Änderung der Aminosäuresequenz: Glu statt Val)
- bp 50: T statt A (Änderung der Aminosäuresequenz: Phe statt Tyr)
- bp 408: C statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 500: C statt T (Änderung der Aminosäuresequenz: Ser statt Leu)
- bp 578: A statt C (Änderung der Aminosäuresequenz: Asp statt Ala)

Vier dieser Sequenzabweichungen wirkten sich auf der Aminosäureebene aus. Da sich diese Abweichungen aber in mehreren sequenzierten Plasmiden aus unterschiedlichen Versuchsansätzen wiederholten, konnte davon ausgegangen werden, dass diese bereits in der als Template benutzen DNA vorlagen (siehe 4.4).



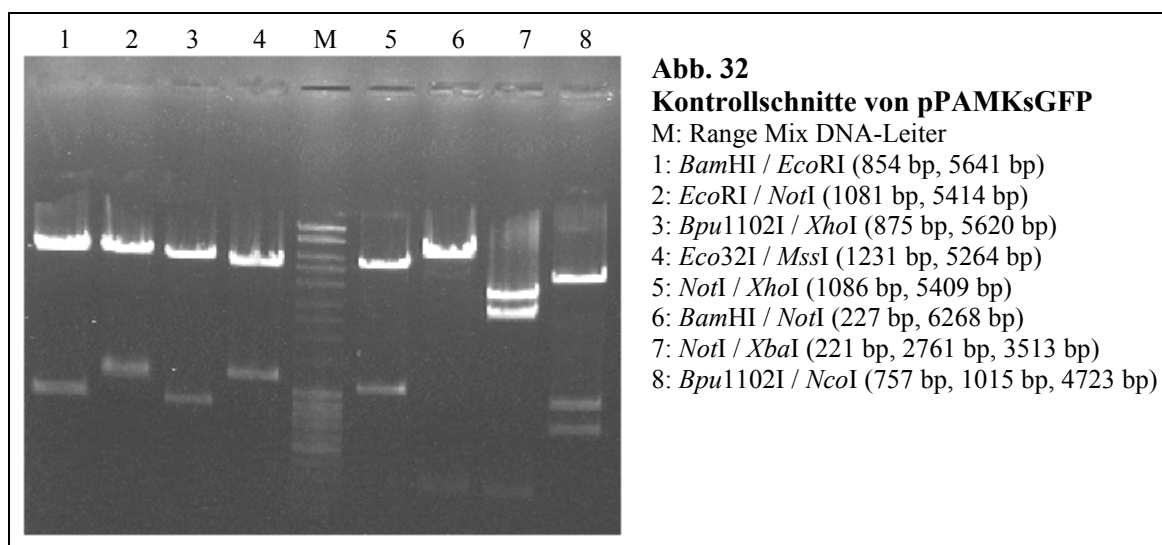
### 3.1.2 Herstellung der Kassettenvektoren

Nicht nur innerhalb der Immuntoxininfusionsgene sollte es möglich sein, die einzelnen Komponenten durch Restriktionen auszutauschen. Auch die flankierenden Sequenzen wie Promotor und Terminator sollten bei Bedarf ausgetauscht werden können. Des Weiteren sollte es möglich sein, an das 5'-Ende der Immuntoxininfusionsgene die Sequenzen für verschiedene Signalpeptide zur Lokalisation in unterschiedlichen Zellkompartimenten anfügen zu können. Wurde hier nichts angefügt, musste sich an dieser Stelle stattdessen das Startcodon ATG befinden. So wurden mit den Plasmiden pPAMBT und pPAMTB zwei solche Kassettenvektoren hergestellt (siehe 3.1.2.4). In ihnen lagen final folgende Aufbauten vor:

pPAMBT: *AscI* – Promotor – *BcuI* – ATG (kann durch die Sequenz für ein Signalpeptid ersetzt werden) – *SfiI* – (hier kann ein Fusionsgen für ein Immuntoxin mit der Bindedomäne am N-Terminus eingefügt werden) – *EcoRI* – Terminator – *KpnI*

pPAMTB: *AscI* – Promotor – *BcuI* – ATG (kann durch die Sequenz für ein Signalpeptid ersetzt werden) – *XhoI* – (hier kann ein Fusionsgen für ein Immuntoxin mit der Toxindomäne am N-Terminus eingefügt werden) – *EcoRI* – Terminator – *KpnI*.

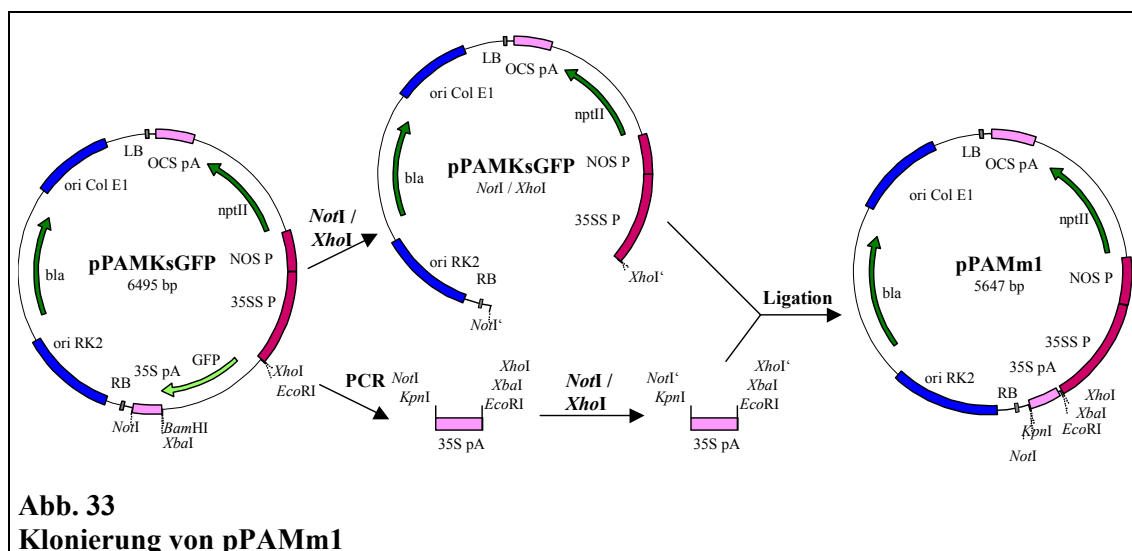
Als Ausgangsmaterial wurde das binäre Plasmid pPAMKsGFP (siehe 6.3.3) gewählt. Zur Überprüfung dieses Plasmids wurden verschiedene Kontrollschnitte durchgeführt. Es kamen *BamHI* / *EcoRI*, *EcoRI* / *NotI*, *Bpu1102I* / *XhoI*, *Eco32I* / *MssI*, *NotI* / *XhoI*, *BamHI* / *NotI*, *NotI* / *XbaI* und *Bpu1102I* / *NcoI* zum Einsatz. Bei allen Schnitten zeigte sich das erwartete Bandenmuster (siehe Abb. 32).



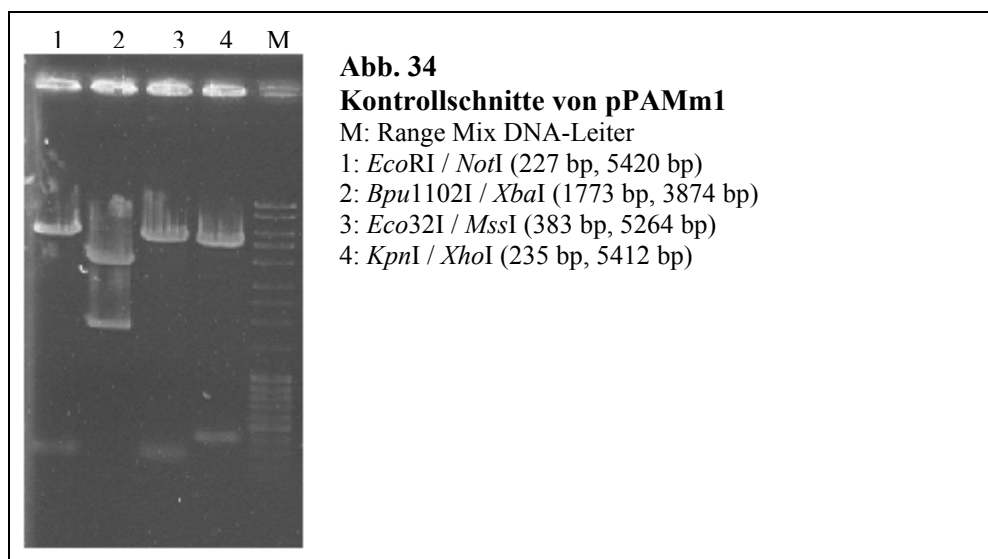
#### 3.1.2.1 Binäres Plasmid, 1. Modifikation: pPAMm1

Zunächst wurde aus dem vorliegenden Plasmid pPAMKsGFP das GFP-Gen entfernt. Außerdem sollte eine *KpnI*-Schnittstelle hinter den Terminator eingebracht werden. Die *BamHI*-Schnittstelle vor dem Terminator wurde entfernt, da diese Schnittstelle bereits in den Immuntoxininfusionsgenen

zum Austausch einzelner Komponenten vorlag (siehe 3.1.1). Dieses wurde in einem einzigen Schritt mittels PCR verwirklicht. Der Terminator pA35S wurde vervielfältigt, die *KpnI*-Schnittstelle mittels des Primers pA35Srev2 eingefügt und die *BamHI*-Schnittstelle vor dem Terminator mittels des Primers pA35Sfor2 entfernt. Es wurde das Standard-PCR-Programm (siehe 2.4.3) verwendet. Das entstandene PCR-Produkt der Größe von 255 bp wurde mit *NotI* / *XhoI* (6 bp, 11 bp, 238 bp) geschnitten und in den ebenfalls mit *NotI* / *XhoI* (1086 bp, 5409 bp) geschnittenen pPAMKsGFP kloniert (siehe Abb. 33).

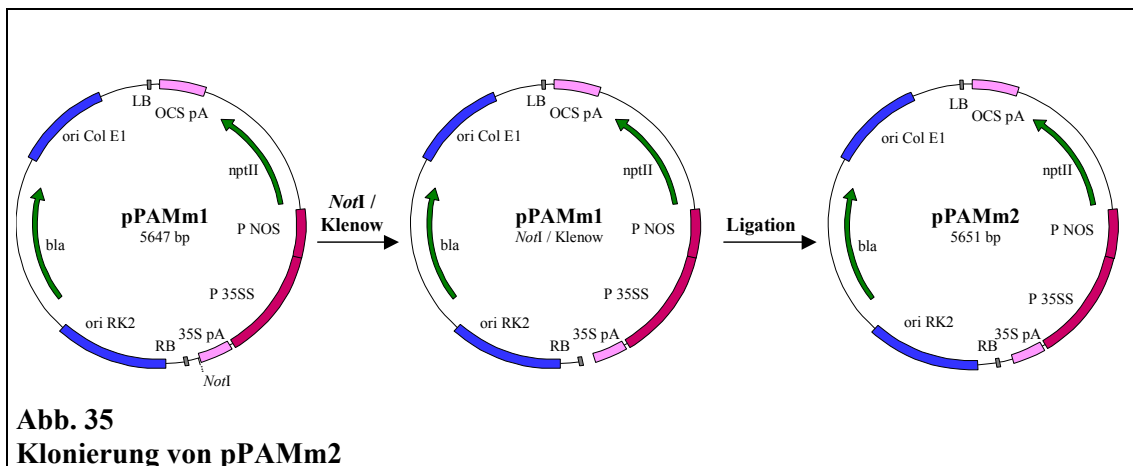


Das Plasmid pPAMm1 wurde nach der Transformation mittels Kontrollschnitten mit *EcoRI* / *NotI*, *Bpu1102I* / *XbaI*, *Eco32I* / *MssI* und *KpnI* / *XhoI* überprüft. Die erwarteten Banden lagen vor (siehe Abb. 34). Beim Schnitt mit *XbaI* konnte jedoch nur an einer der beiden im Plasmid vorhandenen *XbaI*-Schnittstellen geschnitten werden, da die andere in *E. coli* DH5 $\alpha$  methyliert vorlag (siehe 4.5.1).

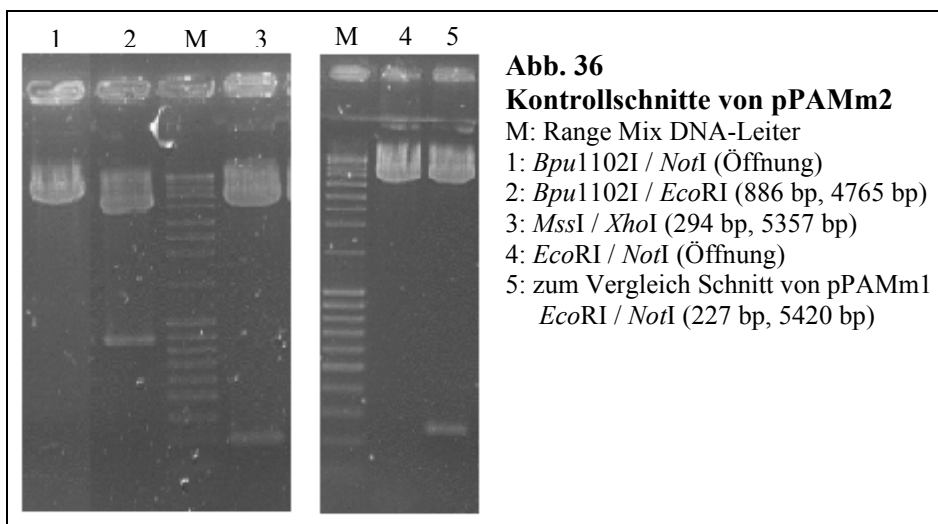


### 3.1.2.2 Binäres Plasmid, 2. Modifikation: pPAMm2

Das Restriktionsenzym *NotI* soll im weiteren Verlauf zu Klonierungszwecken verwendet werden (siehe 3.1.3). Aus diesem Grunde musste die sich im Plasmid pPAMm1 befindliche *NotI*-Schnittstelle entfernt werden. Um dies zu erreichen, wurde das Plasmid pPAMm1 mit *NotI* geschnitten. Die in der DNA entstandenen überhängenden Enden wurden durch einen Klenow-Fill-In (siehe 2.4.8) aufgefüllt. Anschließend wurde das Plasmid mittels Blunt-End-Ligation wieder zusammengesetzt (siehe Abb. 35).



Die Identität des Plasmids pPAMm2 wurde nach der Transformation durch Kontrollschnitte mit *Bpu1102I / NotI*, *Bpu1102I / EcoRI*, *MssI / XhoI* und *EcoRI / NotI* nachgewiesen (siehe Abb. 36).

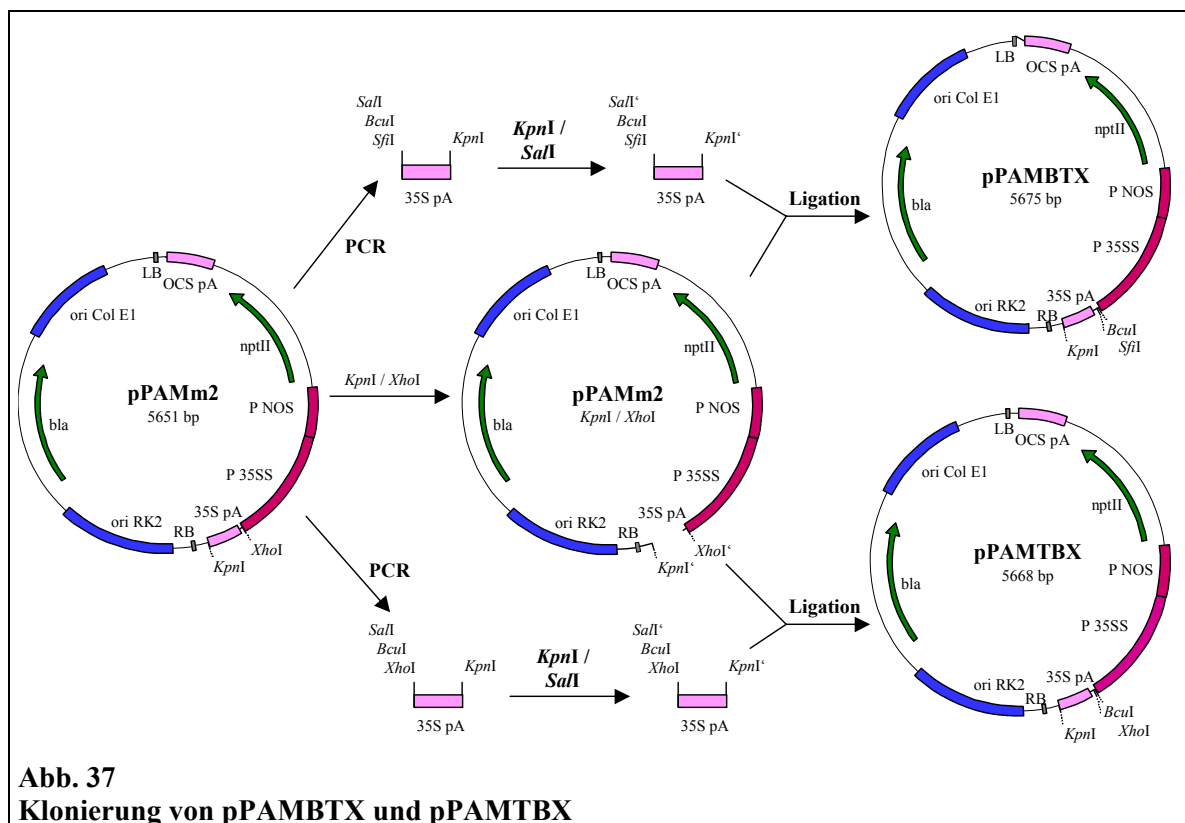


### 3.1.2.3 Binäre Kassettenplasmide (mit *XbaI*-Schnittstelle): pPAMBTX und pPAMTBX

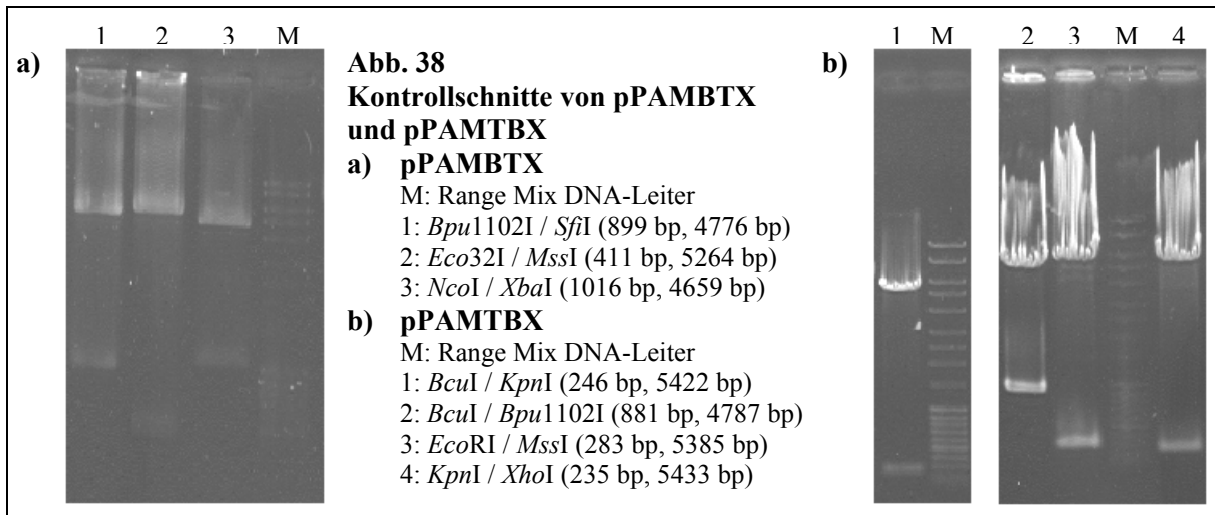
In den Plasmiden pPAMBTX und pPAMTBX wurden die Kassettensysteme fertig gestellt. Es wurden wieder verschiedene Schnittstellen durch PCR eingefügt. Zur Herstellung des Plasmids pPAMBTX wurde der Terminator aus pPAMm2 mit den Primern Sfifor2 und pA35rev2 bei einer

Annealing-Temperatur von 50 °C amplifiziert. Abweichend zum Standard-PCR-Programm (siehe 2.4.3) wurde hier eine Annealing-Zeit von 90 s und eine Extension-Zeit von 30 s gewählt. Das entstandene PCR-Produkt war 279 bp lang und wies statt der zuvor vorhandenen *XhoI*-Schnittstelle am 5'-Ende nun die Schnittstellenfolge 5'-*SalI* - *BcuI* - *SfiI* - 3' auf.

Analog wurde zur Herstellung des Plasmids pPAMTBX der Terminator aus pPAMm2 mit den Primern XhoFor und pA35rev2 amplifiziert. Hier wurde das Standard-PCR-Programm (siehe 2.4.3) gewählt. Das entstandene PCR-Produkt war 272 bp lang und wies am 5'-Ende die Schnittstellenfolge 5'-*SalI* - *BcuI* - *XhoI* - 3' auf. Nun wurden beide Fragmente mit *KpnI* / *SalI* (PCR-Fragment zur Herstellung von pPAMBTX: 6 bp, 14 bp, 259 bp; PCR-Fragment zur Herstellung von pPAMTBX: 6 bp, 14 bp, 252 bp) geschnitten und in den mit *KpnI* / *XhoI* (235 bp, 5416 bp) geschnittenen pPAMm2 ligiert (siehe Abb. 37). Hier wurde sich zu Nutze gemacht, dass *SalI* und *XhoI* in der DNA die gleichen überhängenden Enden erzeugen. So konnte eine Ligation erfolgen, ohne dass in den Plasmiden pPAMBTX und pPAMTBX eine Schnittstelle zurückblieb.

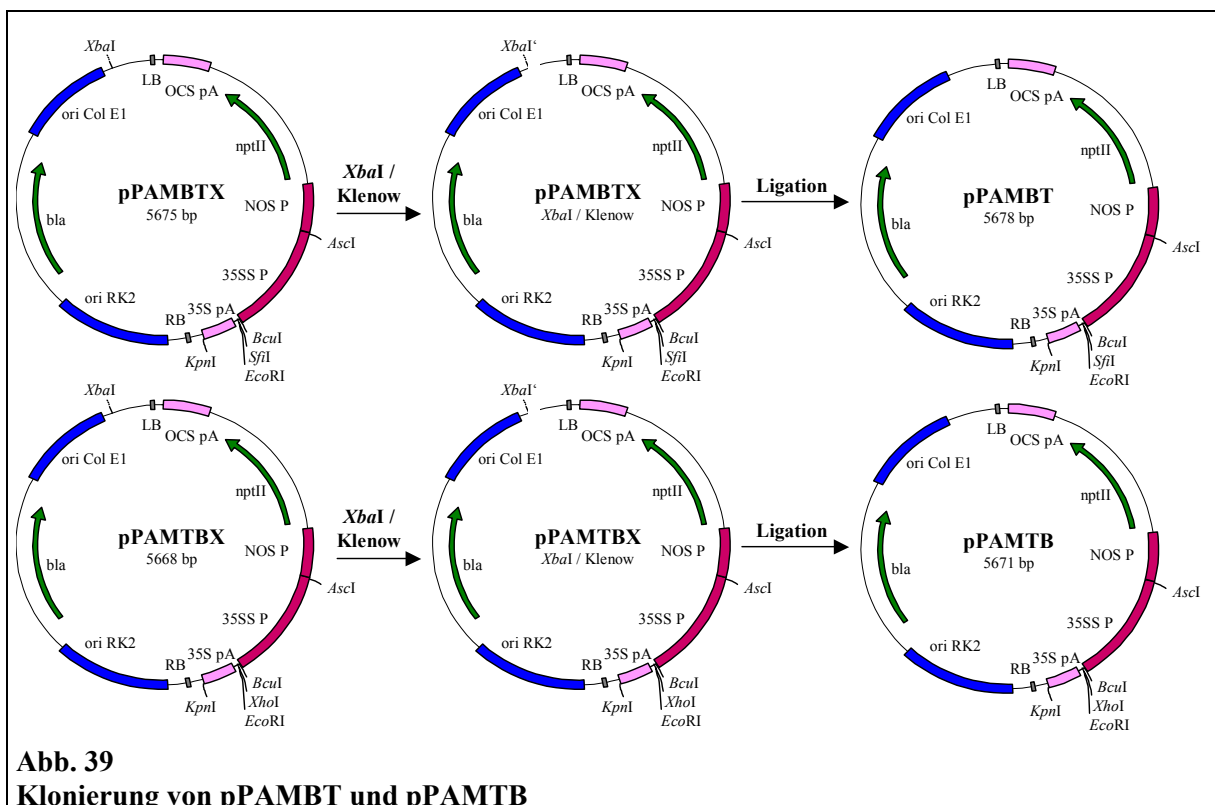


Die Plasmide wurden über Schnitte verifiziert. Bei pPAMBTX kamen hier *Bpu1102I* / *SfiI*, *Eco32I* / *MssI* und *NcoI* / *XbaI* zum Einsatz (siehe Abb. 38). Das Plasmid pPAMTBX wurde mit *BcuI* / *KpnI*, *BcuI* / *Bpu1102I*, *EcoRI* / *MssI* und *KpnI* / *XhoI* geschnitten (siehe Abb. 38).

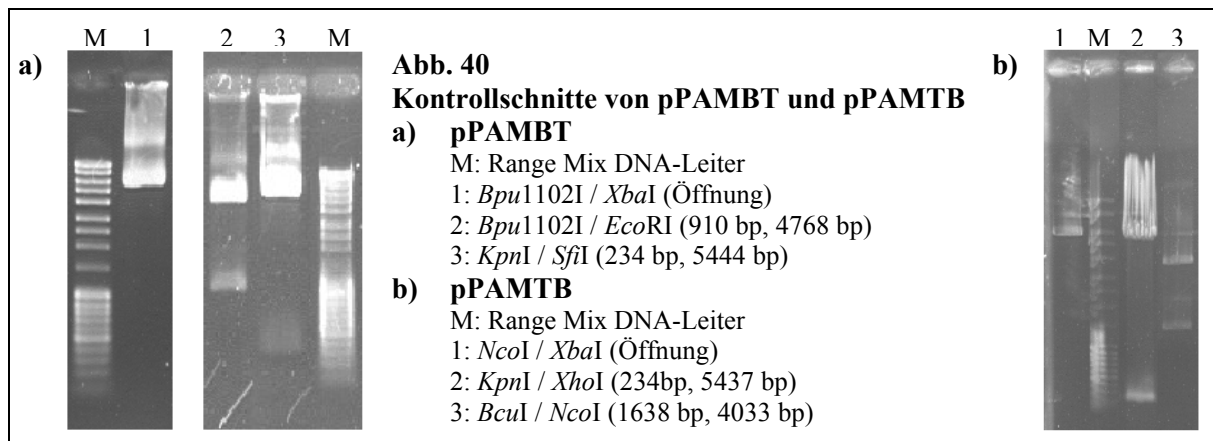


### 3.1.2.4 Binäre Kassettenplasmide: pPAMBT und pPAMTB

Zur Herstellung von pPAMBT und pPAMTB wurde in den Plasmiden pPAMBTX und pPAMTBX nun jeweils die *Xba*I-Schnittstelle entfernt (siehe Abb. 39). Dies geschah durch Restriktion mit *Xba*I, Klenow-Fill-In (siehe 2.4.8) und anschließender Blunt-End-Ligation (siehe 2.4.9).



Die Plasmide wurden mittels Restriktionsanalysen verifiziert. Das Plasmid pPAMBT wurde hier mit *Bpu*1102I / *Xba*I, *Bpu*1102I / *Eco*RI und *Kpn*I / *Sfi*I geschnitten, pPAMTB mit *Nco*I / *Xba*I, *Kpn*I / *Xho*I und *Bcu*I / *Nco*I (siehe Abb. 40).



Der Bereich des Terminators pA35S und der Bereich über die entfernte *XbaI*-Schnittstelle hinweg wurden sequenziert. Folgende Sequenzabweichung trat in beiden Plasmiden im Terminator pA35S (siehe 6.3.3) auf:

- bp 13: A fehlt

Da diese Deletion in beiden Plasmiden auftrat, war davon auszugehen, dass sie bereits im Template vorlag (siehe 4.4).

### 3.1.3 Herstellung binärer Plasmide mit Immuntoxingenen

Im Folgenden wurden die erstellten Immuntoxininfusionsgene (siehe 3.1.1) in die binären Plasmide pPAMBT und pPAMTB integriert. Des Weiteren wurden auch Plasmide hergestellt, die für Immuntoxine mit Ki-4(scFv) als Bindedomäne codieren und die die Sequenz für ein KDEL-Signal am 3'-Ende des Immuntoxininfusionsgens tragen.

In zwei der Plasmide wurde vor das Immuntoxininfusionsgen die Sequenz für ein Signalpeptid zur Lokalisation im ER vorangestellt (siehe 3.1.3.9, 3.1.3.10). Ein weiteres Plasmid mit Signalpeptid wurde unter Verwendung des Toxins RTA-N97A (siehe 1.3.2.3) erstellt (siehe 3.1.3.11).

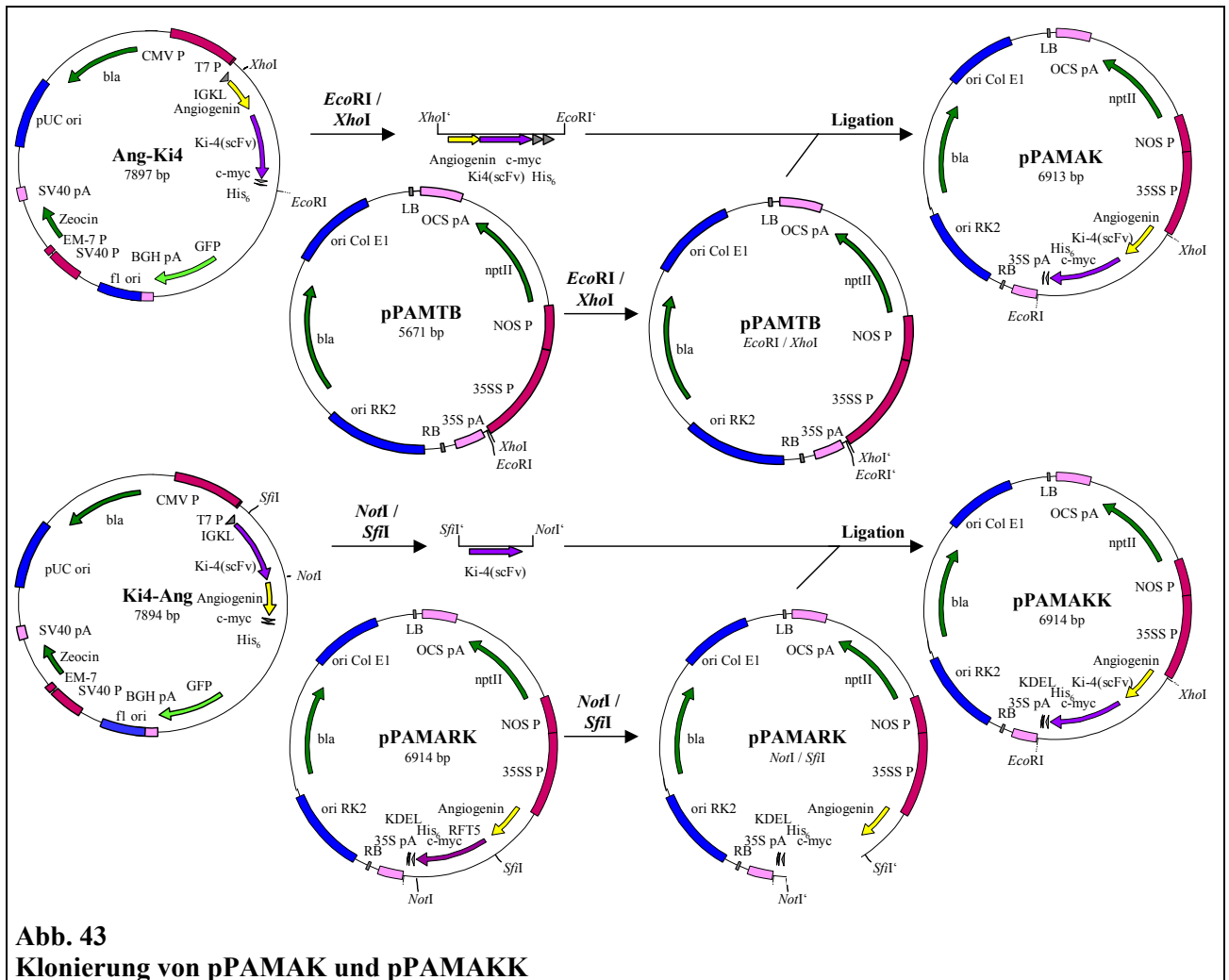
#### 3.1.3.1 Binäre Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Angiogenin-RFT5(scFv)(-KDEL): pPAMAR und pPAMARK

Das Plasmid pPAMAR ist ein binäres Plasmid, welches ein Fusionsgen enthält, das für ein Immuntoxin mit Angiogenin am N-Terminus und RFT5(scFv) am C-Terminus codiert. Zur Herstellung wurde das große Fragment von pPAMTB *EcoRI* / *XhoI* (11 bp, 5660 bp) mit dem kleinen Fragment von Ang-RFT5 *EcoRI* / *XhoI* (1247 bp, 6644 bp) ligiert (siehe Abb. 41).

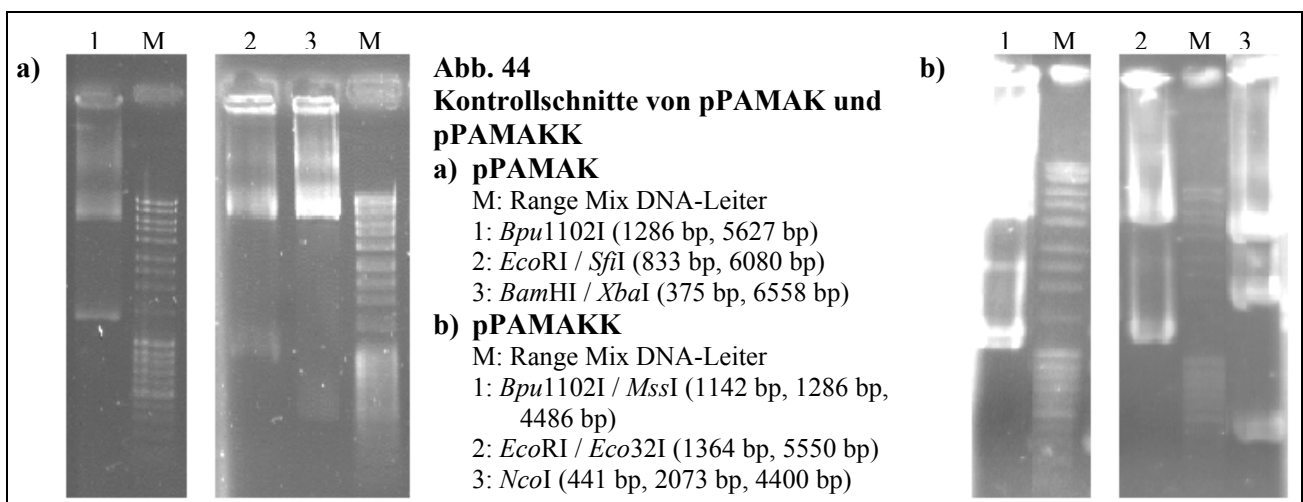
Im Plasmid pPAMARK ist zusätzlich die Sequenz für ein KDEL-Signal am 3'-Ende des Immuntoxininfusionsgens enthalten. Dies wurde durch eine Ligation des großen Fragments von pPAMTB *EcoRI* / *XhoI* (11 bp, 5660 bp) mit dem kleinen Fragment von ARK *EcoRI* / *XhoI* (1254 bp, 6644 bp) erreicht (siehe Abb. 41).



mit *NotI* / *SfiI* (742 bp, 6172 bp) herausgeschnitten und gegen das Gen für Ki-4(scFv) aus ebenfalls mit *NotI* / *SfiI* (742 bp, 7152 bp) geschnittenem Ki-4-Ang ausgetauscht (siehe Abb. 43).



Das Plasmid pPAMAK wurde mittels Kontrollschnitten mit *Bpu1102I*, *EcoRI* / *SfiI* und *BamHI* / *XbaI*, das Plasmid pPAMAKK mit Kontrollschnitten mit *Bpu1102I* / *MssI*, *EcoRI* / *Eco32I* und *NcoI* verifiziert (siehe Abb. 44).

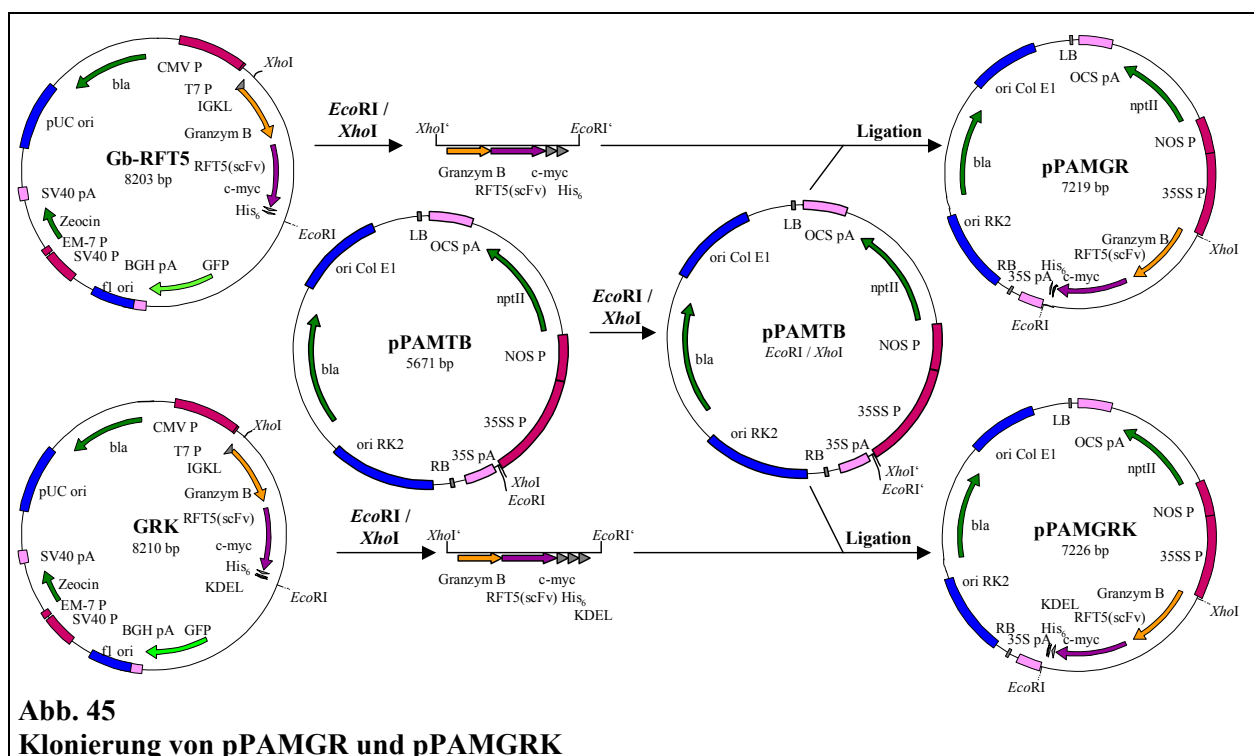




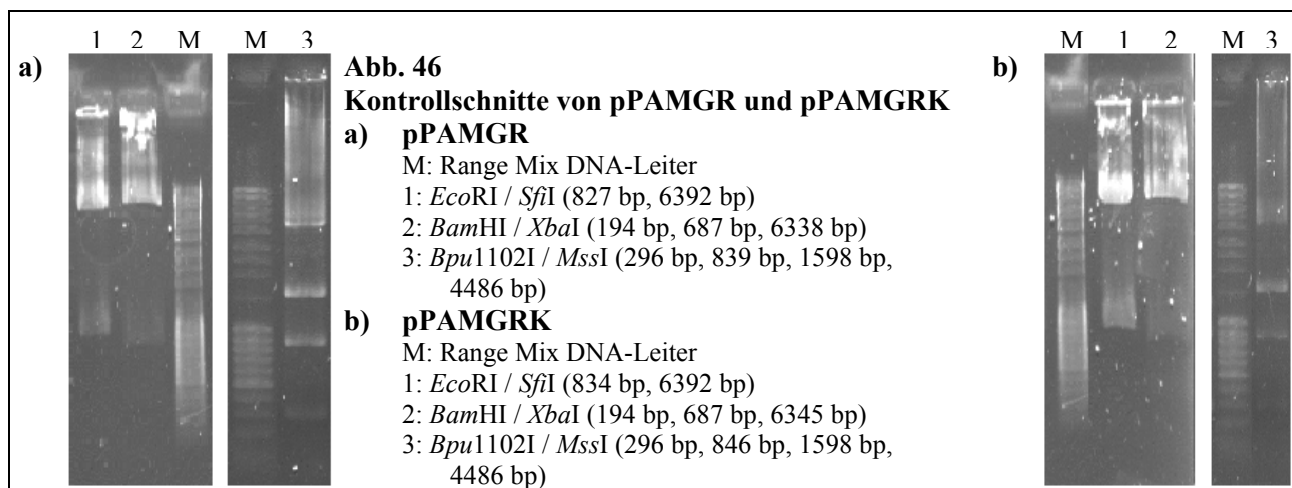
### 3.1.3.3 Binäre Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Granzym B-RFT5(scFv)(-KDEL): pPAMGR und pPAMGRK

Zur Herstellung des Plasmids pPAMGR wurde das Immuntoxininfusionsgen mittels *EcoRI* / *XhoI* (1559 bp, 6644 bp) aus dem Gb-RFT5 herausgeschnitten und in den mit *EcoRI* / *XhoI* (11 bp, 5660 bp) geöffneten pPAMTB ligiert (siehe Abb. 45).

Das Plasmid pPAMGRK enthält zusätzlich die Sequenz für ein KDEL-Signal am 3'-Ende des Immuntoxininfusionsgens. Es wurde durch Ligation von mit *EcoRI* / *XhoI* geöffnetem pPAMTB (11 bp, 5660 bp) mit dem durch *EcoRI* / *XhoI* (1566 bp, 6644 bp) aus GRK herausgeschnittenen Immuntoxininfusionsgen hergestellt (siehe Abb. 45).



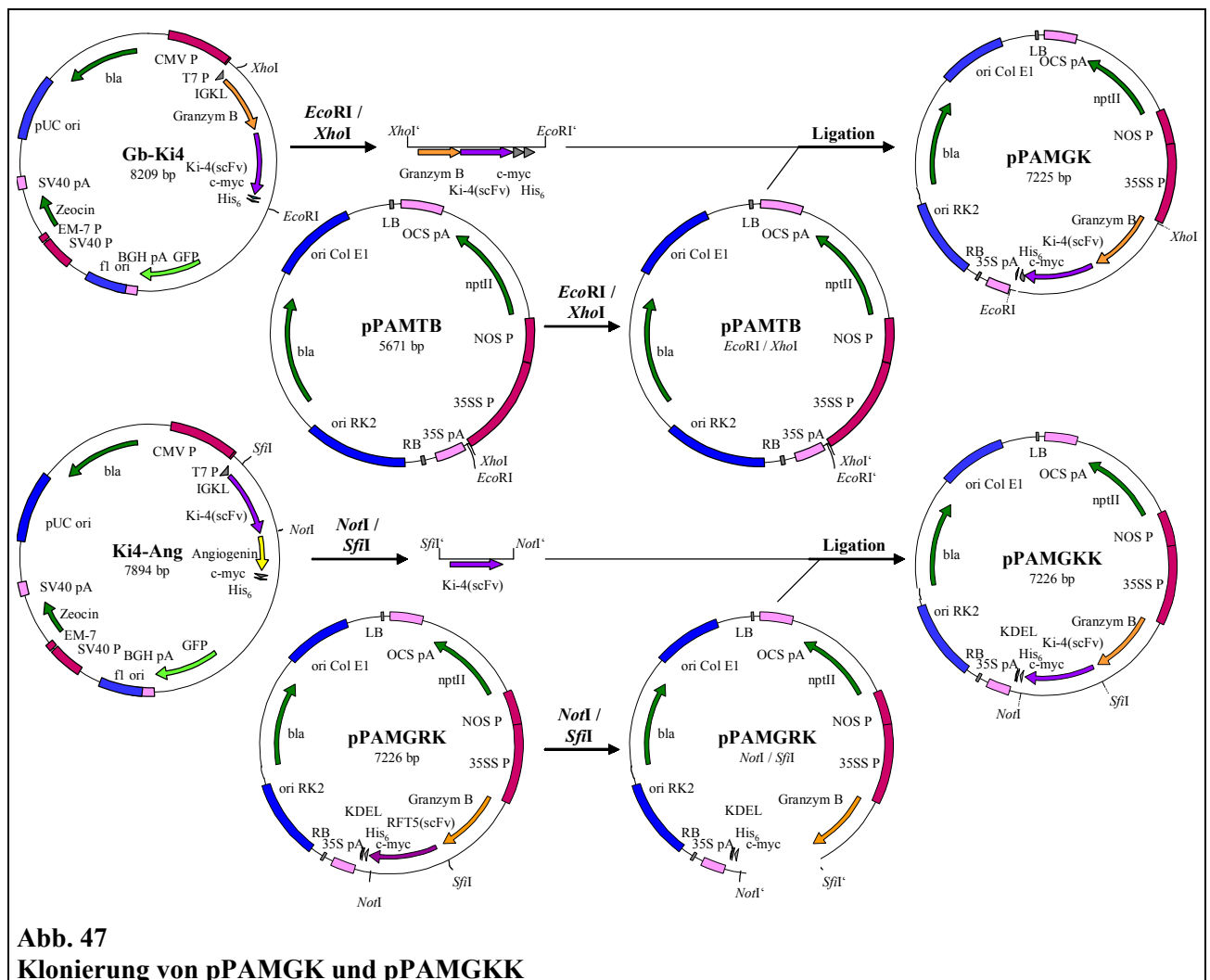
Der Nachweis für die Identität der Plasmide wurde durch Kontrollschnitte mit *EcoRI* / *SfiI*, *BamHI* / *XbaI* und *Bpu1102I* / *MssI* bei pPAMGR und *Bpu1102I*, *EcoRI* / *SfiI*, *BamHI* / *XbaI* und *Bpu1102I* / *MssI* bei pPAMGRK erbracht (siehe Abb. 46).



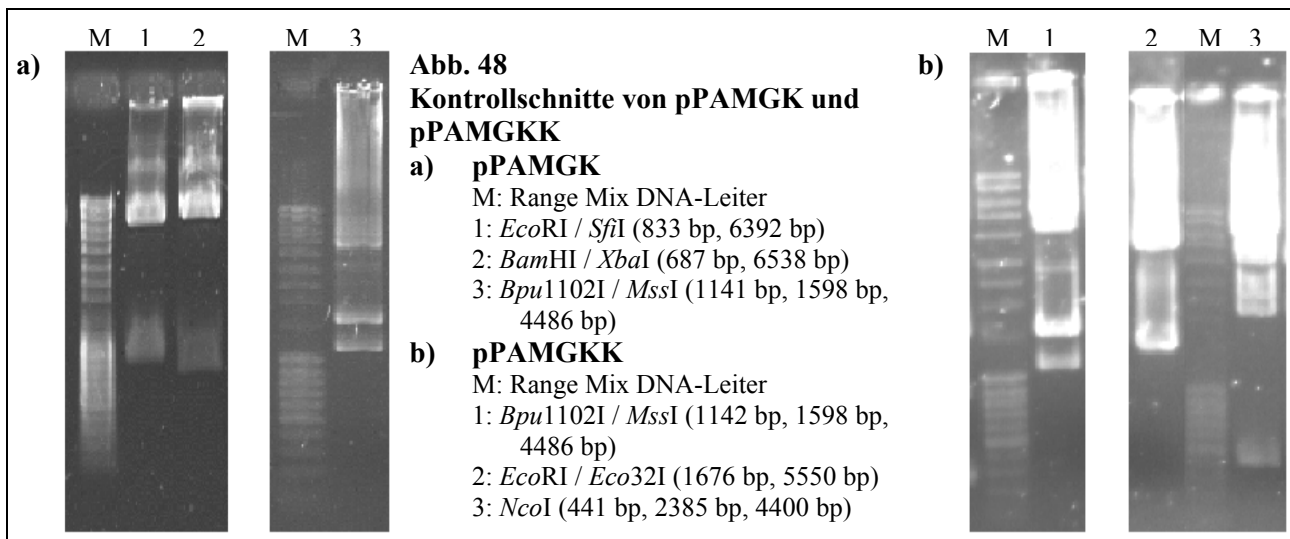
### 3.1.3.4 Binäre Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Granzym B-Ki-4(scFv)(-KDEL): pPAMGK und pPAMGKK

Das Plasmid pPAMGK enthält das Gen für Granzym B am 5'-Ende und das Gen für Ki-4(scFv) am 3'-Ende des für das Immuntoxin codierenden Bereichs. Zur Herstellung wurde mit *EcoRI* / *XhoI* geöffnetes pPAMTB (11 bp, 5660 bp) mit dem kleinen Fragment von Gb-Ki-4 *EcoRI* / *XhoI* (1565 bp, 6644 bp) ligiert (siehe Abb. 47).

Das Plasmid pPAMGKK wurde durch eine Ligation des großen Fragments von pPAMGRK *NotI* / *SfiI* (742 bp, 6484 bp) mit dem kleinen Fragment von Ki-4-Ang *NotI* / *SfiI* (742 bp, 7152 bp) hergestellt (siehe Abb. 47).

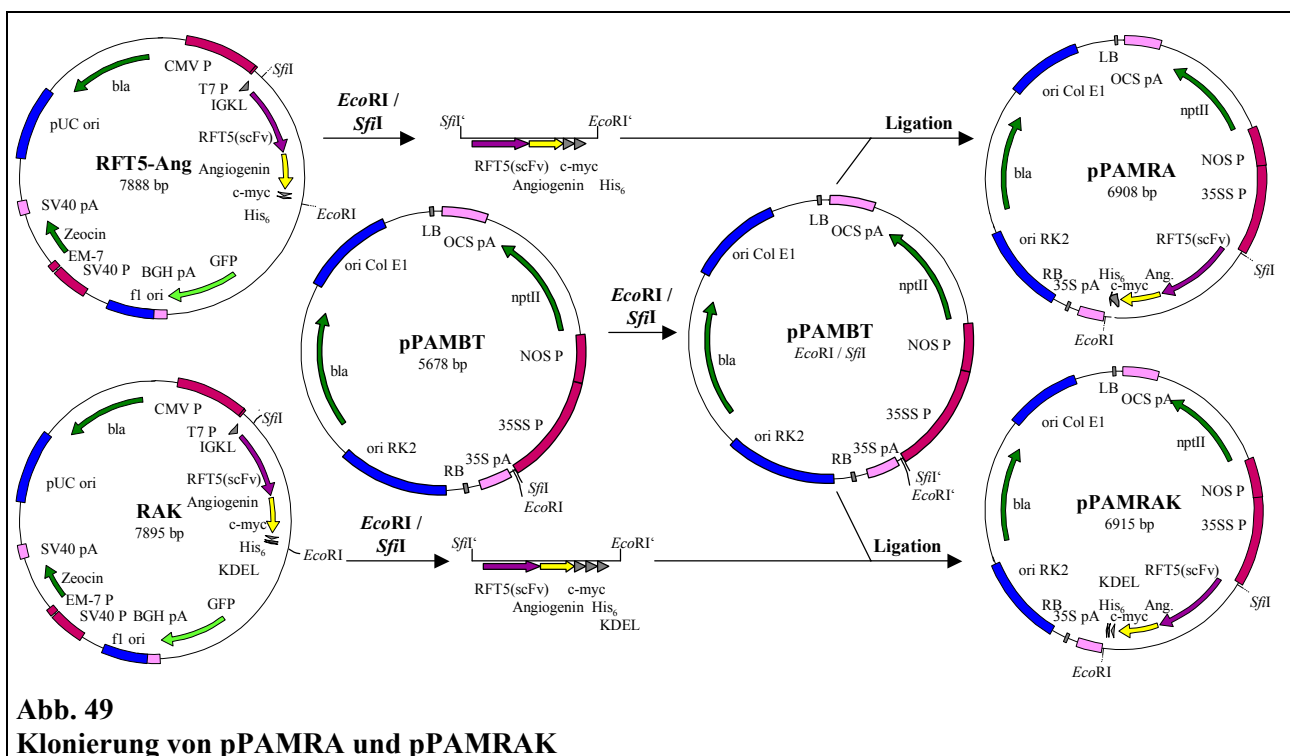


Das Plasmid pPAMGK wurde mit Kontrollschnitten mit *EcoRI* / *SfiI*, *BamHI* / *XbaI* und *Bpu1102I* / *MssI* nachgewiesen (siehe Abb. 48). Das Plasmid pPAMGKK wurde durch Schnitte mit *Bpu1102I* / *MssI*, *EcoRI* / *Eco32I* und *NcoI* verifiziert (siehe Abb. 48).

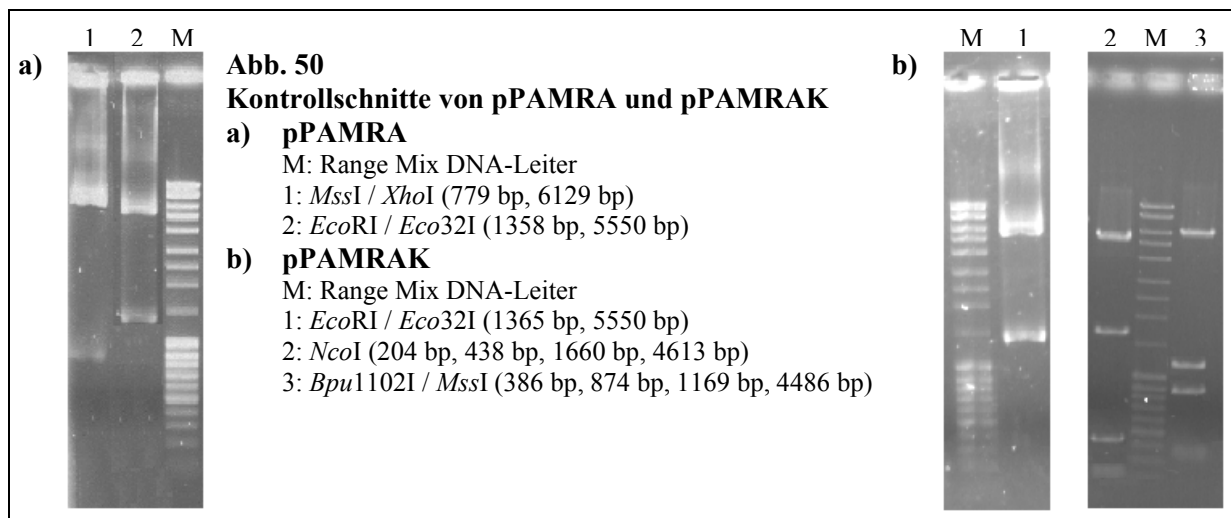


### 3.1.3.5 Binäre Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für RFT5(scFv)-Angiogenin(-KDEL): pPAMRA und pPAMRAK

Im Plasmid pPAMRA liegt das Fusionsgen für ein Immuntoxin aus RFT5(scFv) und Angiogenin vor. Es wurde durch Ligation von mit *EcoRI* / *SfiI* (11 bp, 5667 bp) geöffneten pPAMBT mit dem kleinen Fragment von RFT5-Ang *EcoRI* / *SfiI* (1241 bp, 6647 bp) hergestellt (siehe Abb. 49). Zur Herstellung von pPAMRAK wurde der mit *EcoRI* / *SfiI* (11 bp, 5667 bp) geöffnete pPAMBT mit dem kleinen Fragment von RAK *EcoRI* / *SfiI* (1248 bp, 6647 bp) ligiert (siehe Abb. 49).



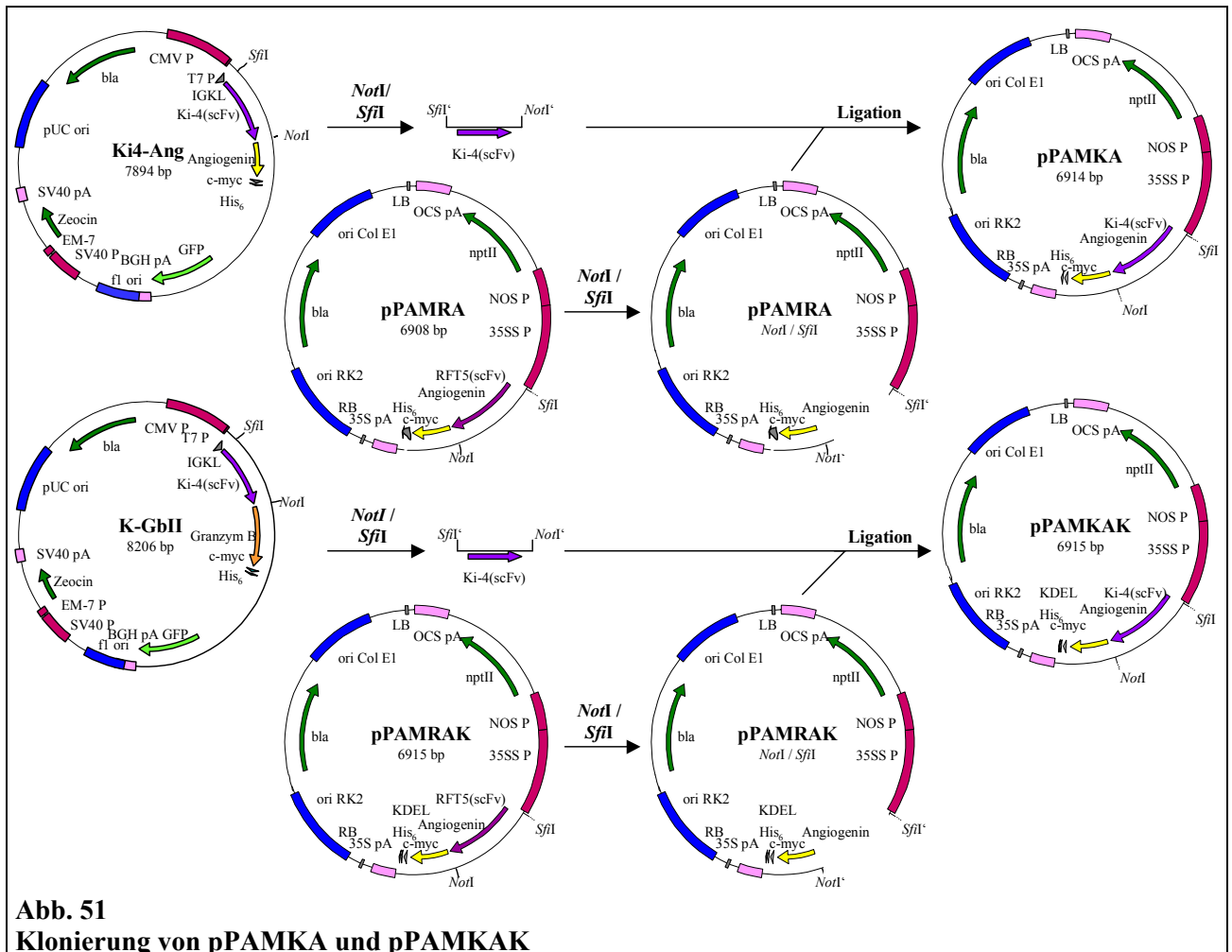
Die Plasmide pPAMRA und pPAMRAK wurden durch Kontrollschnitte nachgewiesen. Das Plasmid pPAMRA wurde mit *MssI* / *XhoI* und *EcoRI* / *Eco32I* geschnitten (siehe Abb. 50), das Plasmid pPAMRAK mit *EcoRI* / *Eco32I*, *NcoI* und *Bpu1102I* / *MssI* (siehe Abb. 50).



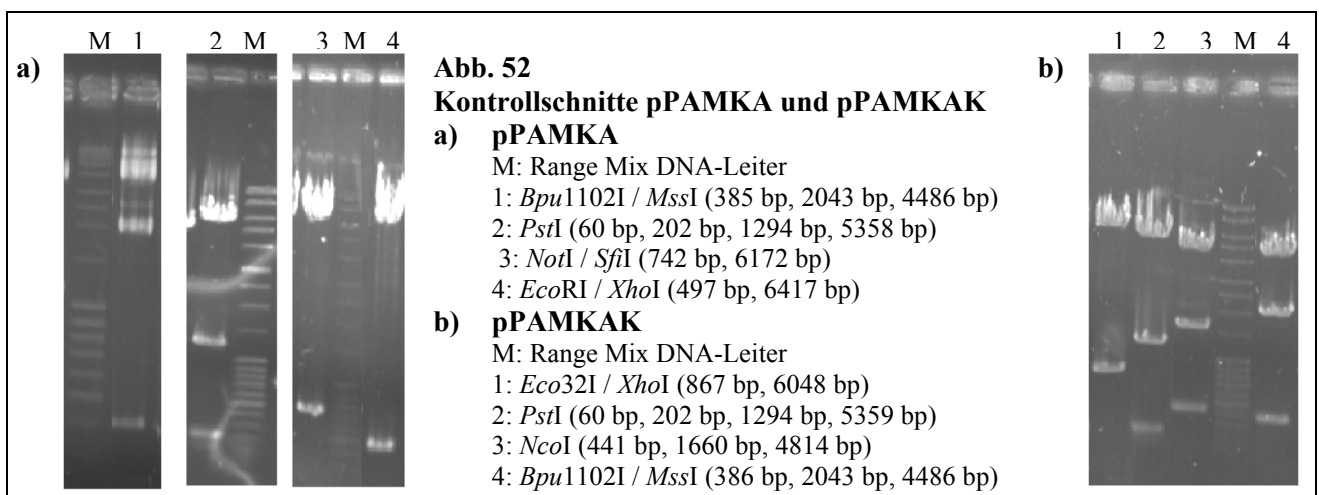
### 3.1.3.6 Binäre Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen für Ki-4(scFv)-Angiogenin(-KDEL): pPAMKA und pPAMKAK

Das Plasmid pPAMKA wurde durch den Austausch des Gens für RFT5(scFv) aus dem pPAMRA gegen das Gen für Ki-4(scFv) aus Ki-4-Ang hergestellt. Das Gen für RFT5(scFv) wurde aus pPAMRA mittels *NotI* / *SfiI* (736 bp, 6172 bp) herausgeschnitten und durch das mit *NotI* / *SfiI* (742 bp, 7152 bp) aus Ki-4-Ang ausgeschnittene Gen für Ki-4(scFv) ersetzt (siehe Abb. 51).

Das Plasmid pPAMKAK wurde durch Ligation des großen Fragments von pPAMRAK *NotI* / *SfiI* (742 bp, 6173 bp) mit dem kleinen Fragment von K-GbII *NotI* / *SfiI* (742 bp, 7464 bp) hergestellt (siehe Abb. 51).



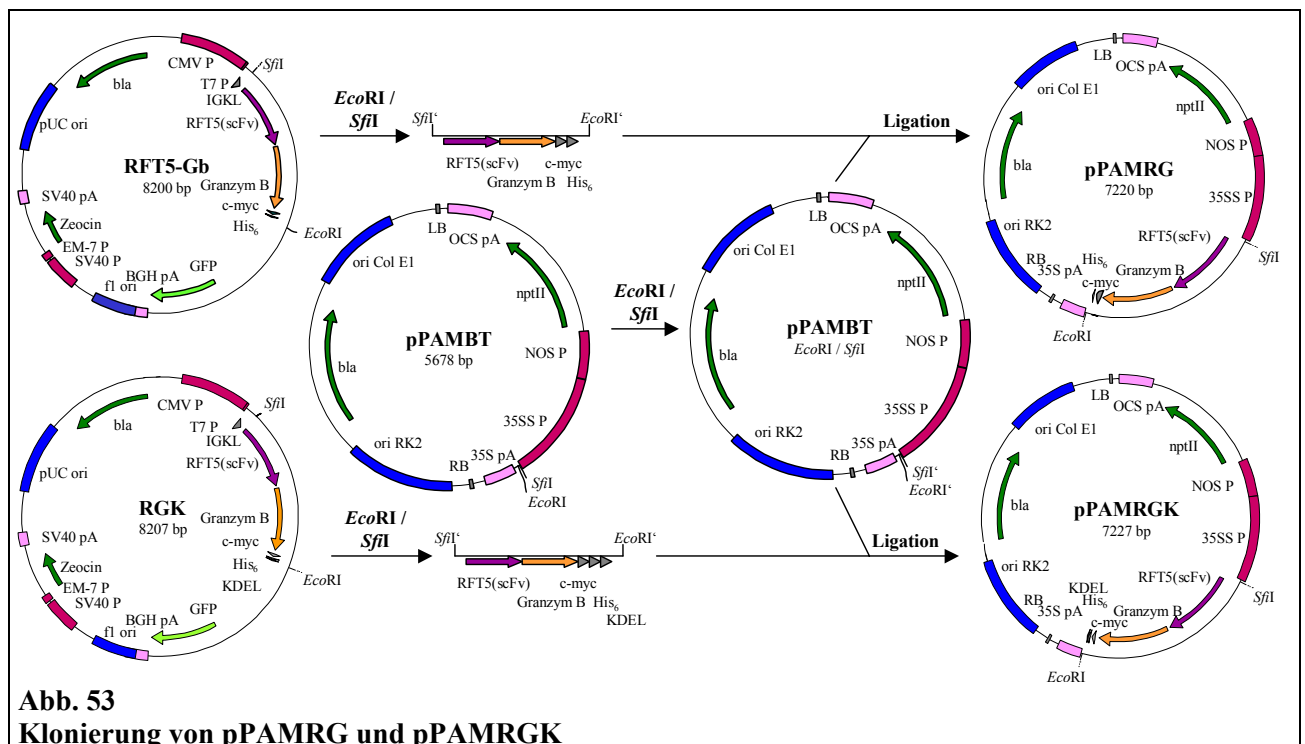
Das Plasmid pPAMKA wurde durch Kontrollschnitte mit *Bpu1102I* / *MssI*, *PstI*, *NotI* / *SfiI* und *EcoRI* / *XhoI* nachgewiesen (siehe Abb. 52). Das Plasmid pPAMKAK wurde durch Kontrollschnitte mit *Eco32I* / *XhoI*, *PstI*, *NcoI* und *Bpu1102I* / *MssI* verifiziert (siehe Abb. 52).



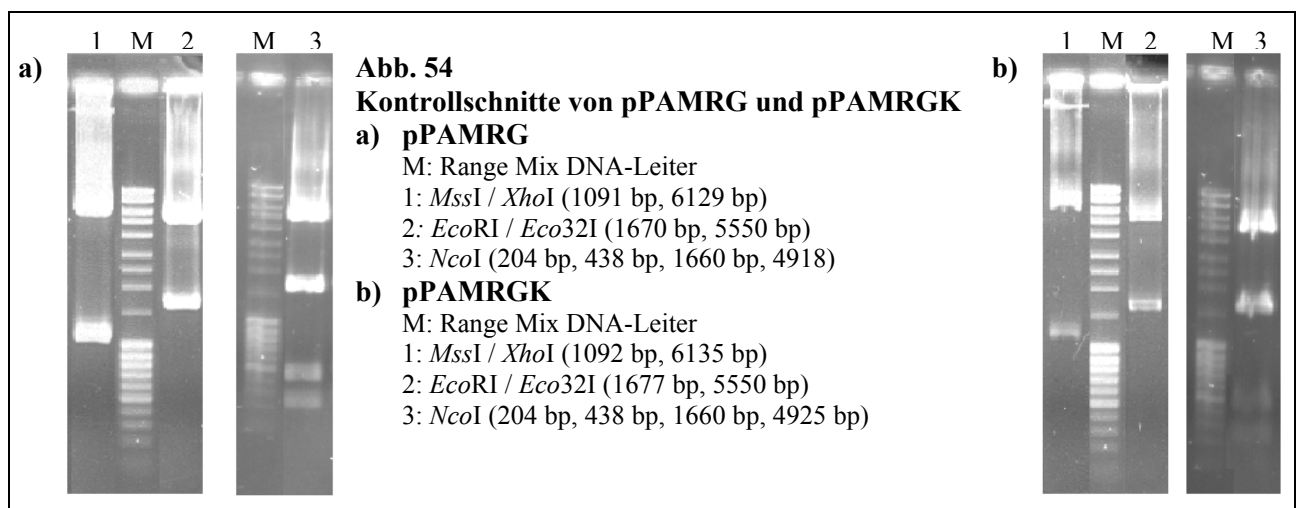
### 3.1.3.7 Binäre Plasmide mit Immuntoxinfusionsgenen für RFT5(scFv)-Granzym B(-KDEL): pPAMRG und pPAMRGK

Im pPAMRG liegen die Gene für RFT5(scFv) und Granzym B hintereinander. Zur Herstellung wurde das große Fragment von pPAMBT *EcoRI* / *SfiI* (11 bp, 5667 bp) mit dem kleinen Fragment von RFT5-Gb *EcoRI* / *SfiI* (1553 bp, 6647 bp) ligiert (siehe Abb. 53).

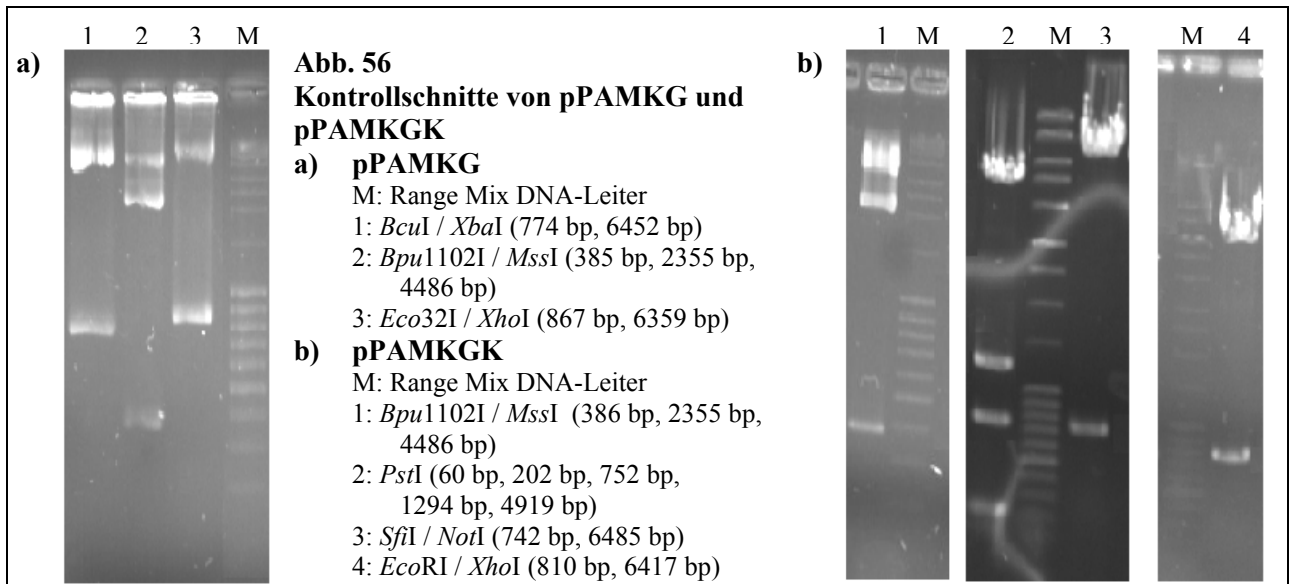
Das Plasmid pPAMRGK enthält zusätzlich die Sequenz für ein KDEL-Signal und wurde durch Ligation von mit *EcoRI* / *SfiI* (11 bp, 5667 bp) geöffnetem pPAMBT mit dem kleinen Fragment von RGK *EcoRI* / *SfiI* (1560 bp, 6647 bp) hergestellt (siehe Abb. 53).



Die Identität von pPAMRG konnte durch Kontrollschnitte mit *MssI* / *XhoI*, *EcoRI* / *Eco32I* und *NcoI*, die von pPAMRGK durch Kontrollschnitte mit *MssI* / *XhoI*, *EcoRI* / *Eco32I* und *NcoI* nachgewiesen werden (siehe Abb. 54).

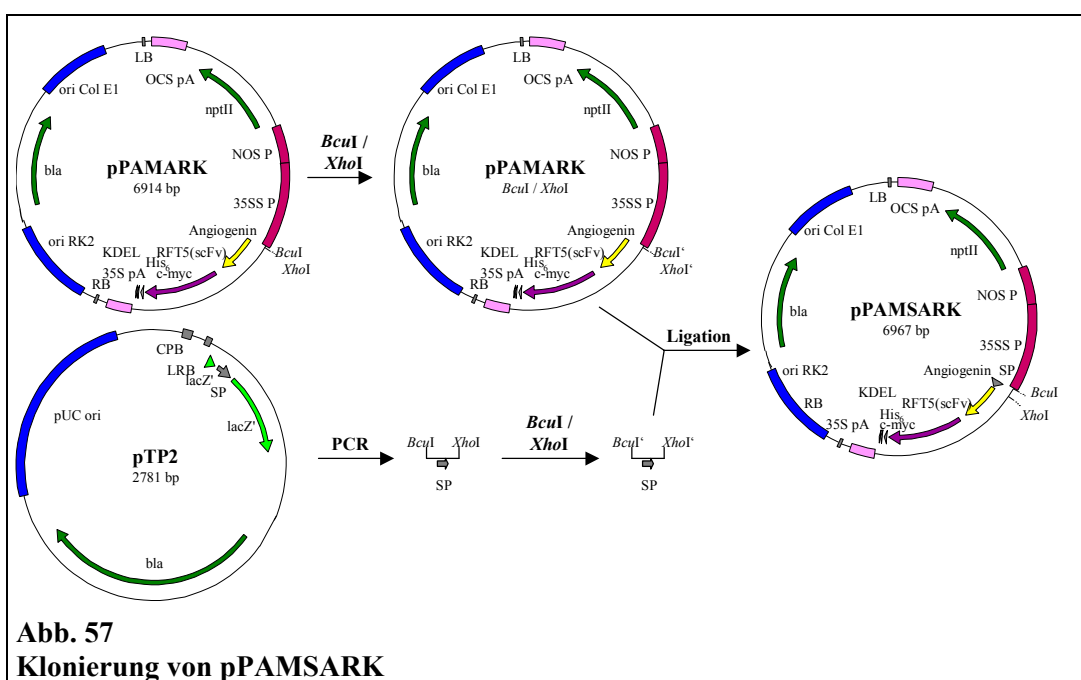






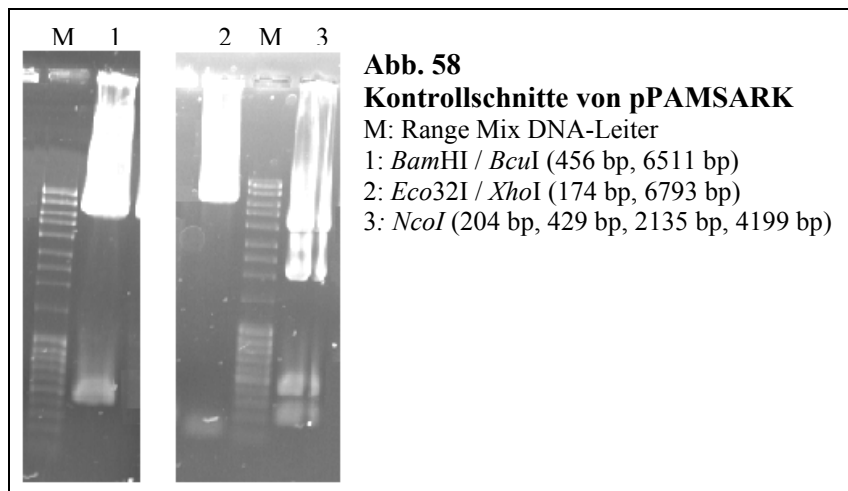
### 3.1.3.9 Binäres Plasmid mit Immuntoxininfusionsgen für Signalpeptid-Angiogenin-RFT5(scFv)-KDEL: pPAMSARK

Das Plasmid pPAMSARK wurde aus dem Plasmid pPAMARK hergestellt, indem an das 5'-Ende des Immuntoxininfusionsgens die Sequenz eines Signalpeptids angefügt wurde (siehe 1.4.2). Zunächst mussten die Schnittstellen von *BcuI* und *XhoI* vor bzw. hinter das Gen für Signalpeptid eingebracht werden. Dies geschah durch eine PCR, als Template diente hier das Plasmid pTP2. Es wurde das Standard-PCR-Programm mit den Primern Lfor und XLrev verwendet. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 89 bp. Die Enden wurde mit *BcuI* / *XhoI* (5 bp, 9 bp, 75 bp) abgeschnitten. Das gewonnene Fragment wurde mit dem großen Fragment von pPAMARK *BcuI* / *XhoI* (11 bp, 6903 bp) ligiert (siehe Abb. 57).





Die Identität des Plasmids wurde durch Schnitte mit *Bam*HI / *Bcu*I, *Eco*32I / *Xho*I und *Nco*I nachgewiesen (siehe Abb. 58).



Der Bereich des Immuntoxininfusionsgens inklusive des Promotors und des Terminators im Plasmid wurde sequenziert (siehe 4.4).

Die Sequenzierung zu Beginn des Promotors war nicht auswertbar, so dass im Promotor erst ab bp 210 Daten vorlagen. Es zeigten sich die folgenden Abweichungen (siehe 6.3.3):

- bp 279: A fehlt
- bp 499: A fehlt

Im Bereich des Gens für Angiogenin trat folgende Sequenzabweichung auf:

- bp 321 C statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)

In der Sequenz für RFT5(scFv) waren folgende Abweichungen zur Referenzsequenz zu finden (siehe 6.1.1):

- bp 13: C statt G (Änderung der Aminosäuresequenz: Gln statt Glu)
- bp 16: C statt G (Änderung der Aminosäuresequenz: Gln statt Glu)
- bp 21: T statt A (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 342: C statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 348 A statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 351: T statt C (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 354: A statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 363: A statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 366: C statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 369: A statt C (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 378: T statt C (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 382: T statt G (zusammen mit bp 383 Änderung der Aminosäuresequenz: Ser statt Gly)
- bp 383: C statt G (zusammen mit bp 382 Änderung der Aminosäuresequenz: Ser statt Gly)
- bp 391 - bp 402: GGCGGATCGCAAATTGTT statt TCTGACATCCAG (Änderung der Aminosäuresequenz: GlyGlySerGlnIleVal statt SerAspIleGln)
- bp 405: C statt G (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 418: G statt A (zusammen mit bp 420 Änderung der Aminosäuresequenz: Ala statt Thr)

- bp 420: A statt C (zusammen mit bp 418 Änderung der Aminosäuresequenz: Ala statt Thr)
- nach bp 690: Insertion GGAGGG (hier werden die Aminosäuren GlyGly eingefügt)
- bp 708: G statt C (keine Änderung der Aminosäuresequenz)

In den Bereichen, die für Signalpeptid und Tags codieren, traten keine Abweichungen auf.

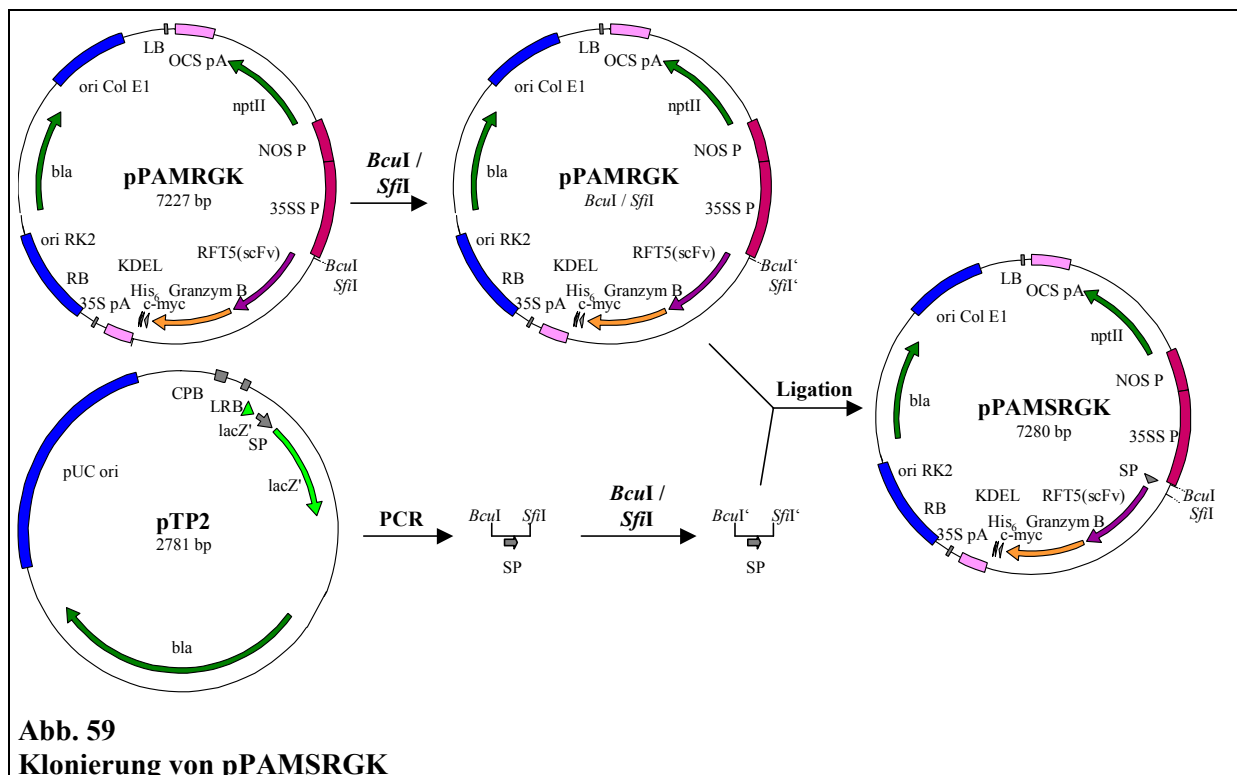
Im Terminator fand sich die folgende Deletion (siehe 6.3.3):

- bp 13: A fehlt

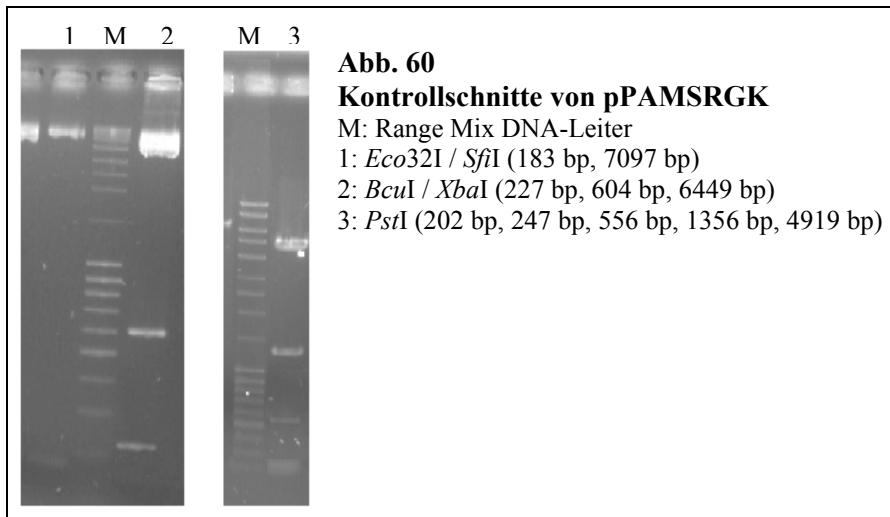
Entsprechende Sequenzabweichungen fanden sich auch bei der Sequenzierung von pPAMSRGK (siehe 3.1.3.10). Das Auftreten der gleichen Abweichungen in unabhängig voneinander hergestellten Plasmiden ließ darauf schließen, dass diese Abweichungen bereits in den Templates vorlagen (siehe 4.4).

### 3.1.3.10 Binäres Plasmid mit Immuntoxininfusionsgen für Signalpeptid-RFT5(scFv)-Granzym B-KDEL: pPAMSRGK

Bei der Herstellung des Plasmids pPAMSRGK wurde die Sequenz für das Signalpeptid in pPAMRGK kloniert. Das Signalpeptid wurde aus dem pTP2 mit den Primer Lfor und SLrev2 mit dem Standard-PCR-Programm (siehe 2.4.3) amplifiziert. Das PCR-Produkt war 89 bp groß. Die Enden wurden mit *BcuI* / *SfiI* (5 bp, 9 bp, 84 bp) abgeschnitten und die verbleibende DNA in den ebenfalls mit *BcuI* / *SfiI* (18 bp, 7209 bp) geschnittenen pPAMRGK ligiert (siehe Abb. 59).



Das Plasmid wurde durch eine Restriktionsanalyse mit *Eco32I* / *SfiI*, *BcuI* / *XbaI* und *PstI* verifiziert (siehe Abb. 60).



Im Plasmid pPAMSRGK wurde das Immuntoxininfusionsgen samt zugehörigem Promotor und Terminator sequenziert (siehe 4.4).

Folgende Deletionen wurden im Promotor festgestellt (siehe 6.3.3):

- bp 4: C fehlt
- bp 172: A fehlt
- bp 279: A fehlt
- bp 499: A fehlt

Im Bereich des Gens für RFT5(scFv) wurden folgende Abweichungen festgestellt (siehe 6.1.1):

- bp 13: C statt G (Änderung der Aminosäuresequenz: Gln statt Glu)
- bp 16: C statt G (Änderung der Aminosäuresequenz: Gln statt Glu)
- bp 21: T statt A (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 342: C statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 348 A statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 351: T statt C (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 354: A statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 363: A statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 366: C statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 369: A statt C (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 378: T statt C (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 382: T statt G (zusammen bp 383 Änderung der Aminosäuresequenz: Ser statt Gly)
- bp 383: C statt G (zusammen bp 382 Änderung der Aminosäuresequenz: Ser statt Gly)
- bp 391 - bp 402: GGCGGATCGCAAATTGTT statt TCTGACATCCAG (Änderung der Aminosäuresequenz: GlyGlySerGlnIleVal statt SerAspIleGln)
- bp 405: C statt G (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 418: G statt A (zusammen bp 420 Änderung der Aminosäuresequenz: Ala statt Thr)
- bp 420: A statt C (zusammen bp 418 Änderung der Aminosäuresequenz: Ala statt Thr)
- nach bp 690: Insertion GGAGGG (hier werden die Aminosäuren GlyGly eingefügt)
- bp 708: G statt C (keine Änderung der Aminosäuresequenz)

Im Gen des Granzym B waren die folgenden Abweichungen zu finden (siehe 6.1.4):

- bp 17: A statt T (Änderung in der Aminosäuresequenz: Glu statt Val)
- bp 50: T statt A (Änderung in der Aminosäuresequenz: Phe statt Tyr)
- bp 408: C statt T (keine Änderung der Aminosäuresequenz)
- bp 500: C statt T (Änderung in der Aminosäuresequenz: Ser statt Leu)
- bp 578: A statt C (Änderung in der Aminosäuresequenz: Asp statt Ala)

In den Bereichen, die für Signalpeptid und Tags codieren traten keine Sequenzabweichungen auf.

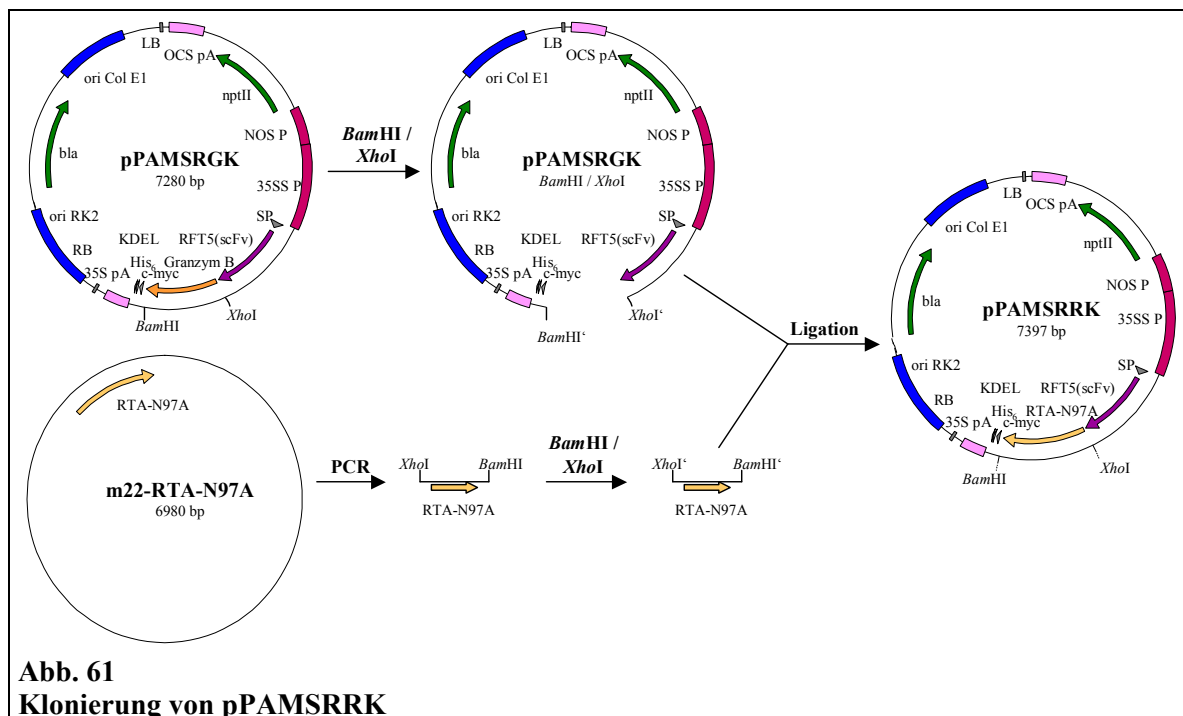
Im Terminator fand sich folgende Deletion (siehe 6.3.3):

- bp 13: A fehlt

Die entsprechenden Sequenzabweichungen lagen auch im pPAMSARK vor (siehe 3.1.3.9), so dass vom Vorkommen derselben in den Templates auszugehen war (siehe 4.4)

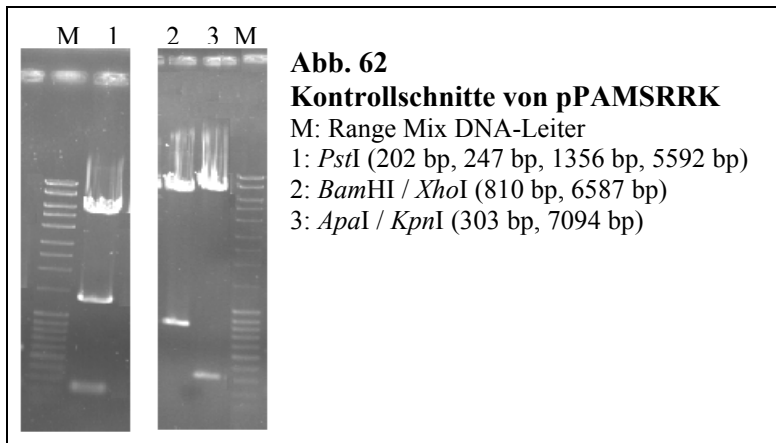
### 3.1.3.11 Binäres Plasmid mit Immuntoxininfusionsgen für Signalpeptid-RFT5(scFv)-RTA-N97A-KDEL: pPAMSRRK

Mit dem Plasmid pPAMSRRK wurde ein Plasmid unter Verwendung des Toxins aus Ricinus (*Ricinus communis*) hergestellt. Hier wurde das Gen für RTA-N97A mit den Primern Ricinfor und RicinBamHIrev aus m22-RTA-N97A unter Verwendung des Standard-PCR-Programms (siehe 2.4.3) amplifiziert und dabei mit Schnittstellen versehen. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 838 bp und wurde mit *Bam*HI / *Xho*I (11 bp, 17 bp, 810 bp) geschnitten. Das große Fragment wurde mit dem großen Fragment von pPAMSRGK *Bam*HI / *Xho*I (693 bp, 6587 bp) ligiert (siehe Abb. 61).



**Abb. 61**  
Klonierung von pPAMSRRK

Die Identität des Plasmids wurde durch Kontrollschnitte mit *Pst*I, *Bam*HI / *Xho*I und *Apa*I / *Kpn*I nachgewiesen (siehe Abb. 62).

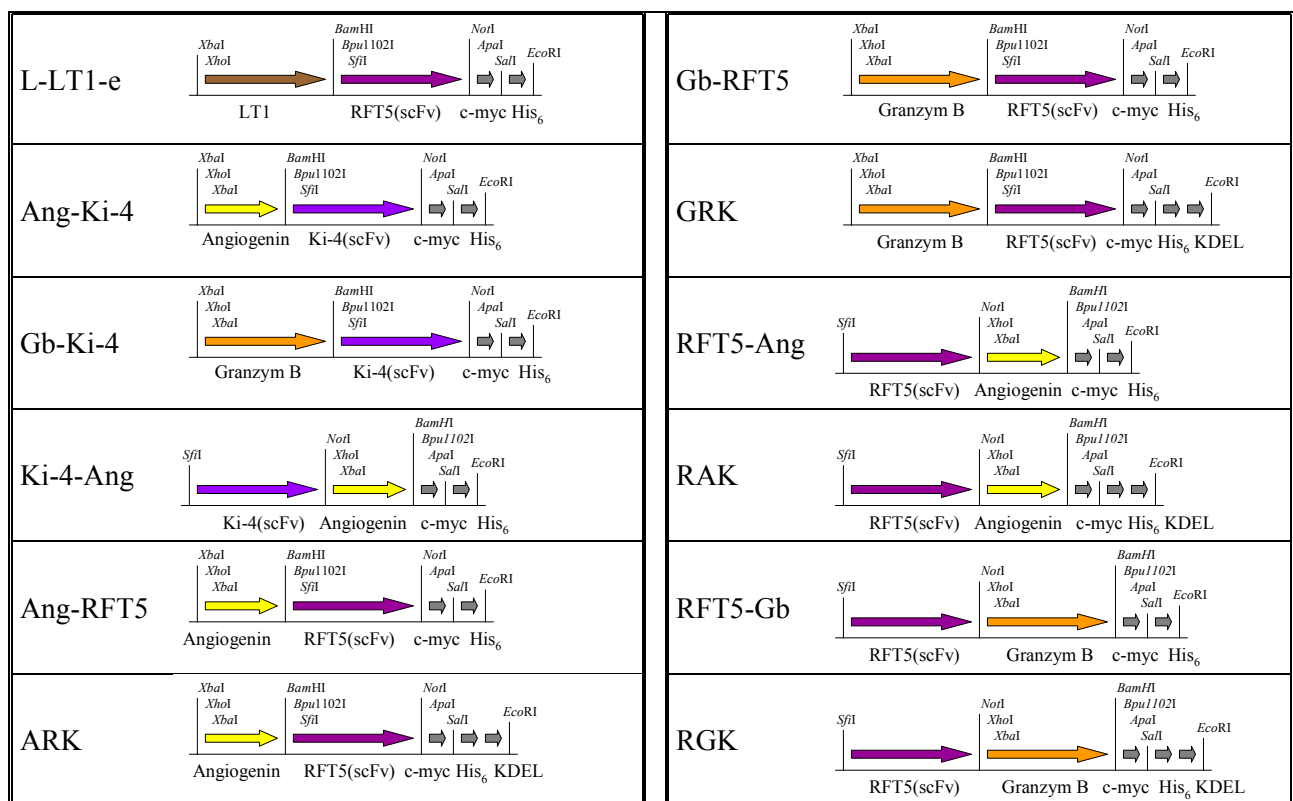


Der Bereich des Gens für RTA-N97A wurde sequenziert (siehe 6.1.5). Es wurde die folgende Abweichung zur Referenzsequenz gefunden (siehe 4.4):

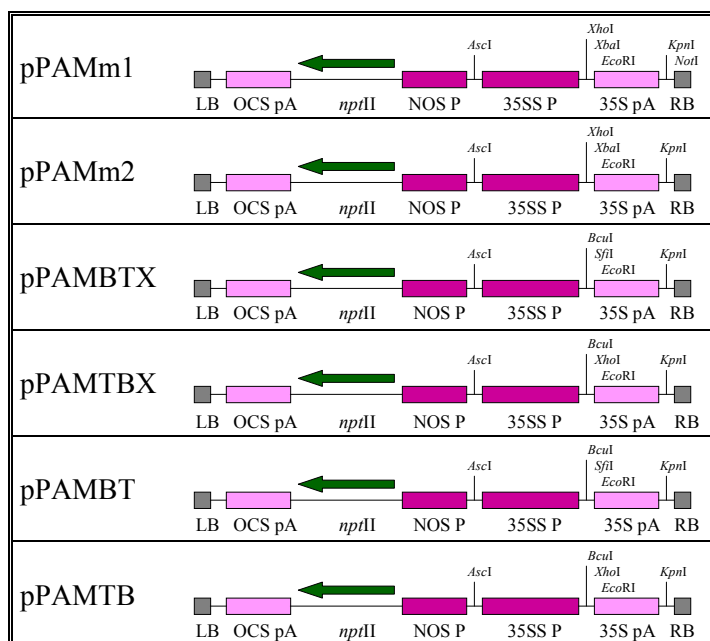
- bp 414: T statt G (Änderung der Aminosäuresequenz: Asp statt Glu)

### 3.1.4 Übersicht über die hergestellten Plasmide

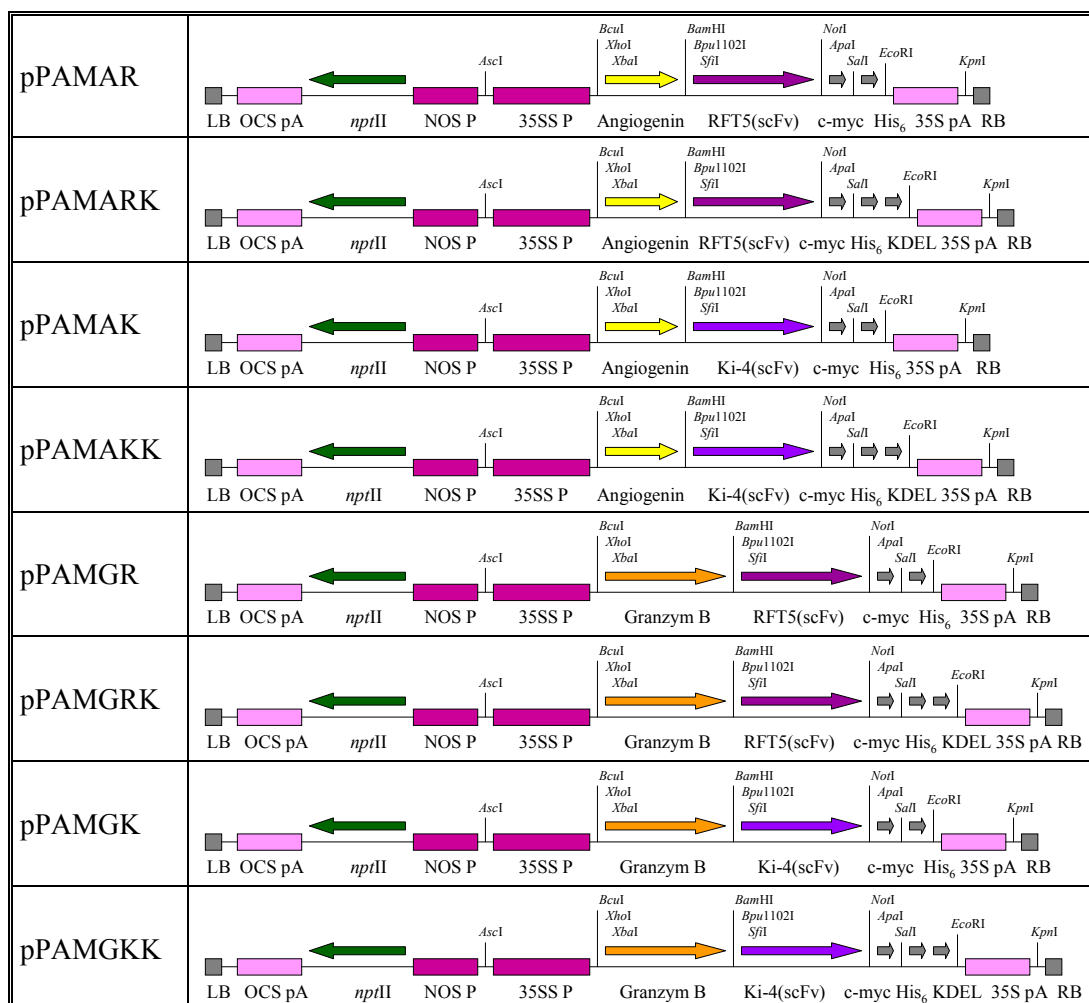
Mit Herstellung der diversen Plasmide konnten die ersten Hauptziele der Arbeit (siehe 1.5) erreicht werden. Im Folgenden werden diese Plasmide übersichtlich aufgelistet (siehe Abb. 63 - Abb. 67). Handelt es sich um binäre Plasmide, so wird der Bereich der T-DNA explizit angegeben. Bei den anderen Plasmiden wird stets der für die Klonierungen der Immuntoxininfusionsgene relevante Bereich gezeigt.



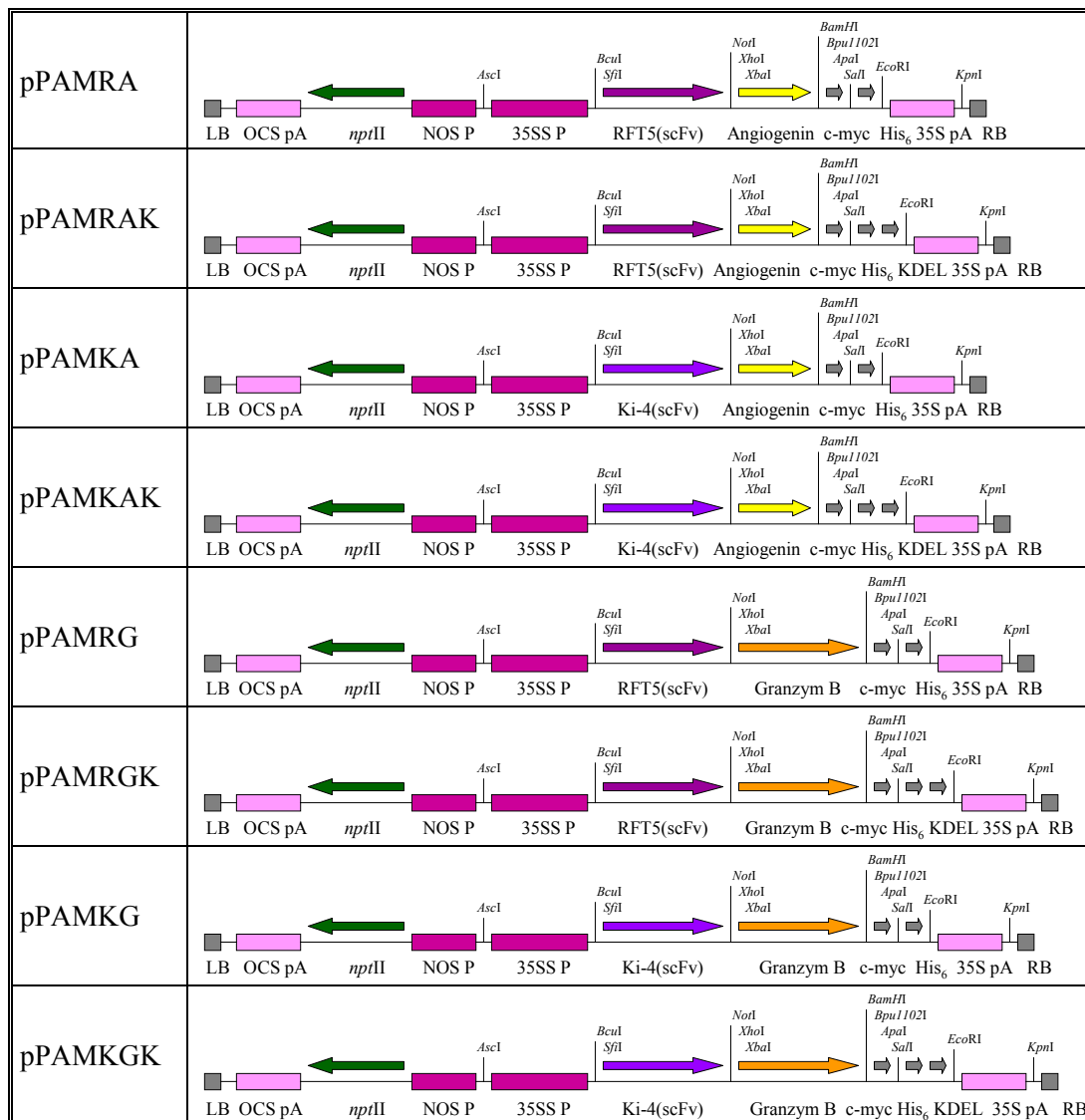
**Abb. 63**  
**Plasmide mit Immuntoxininfusionsgenen**



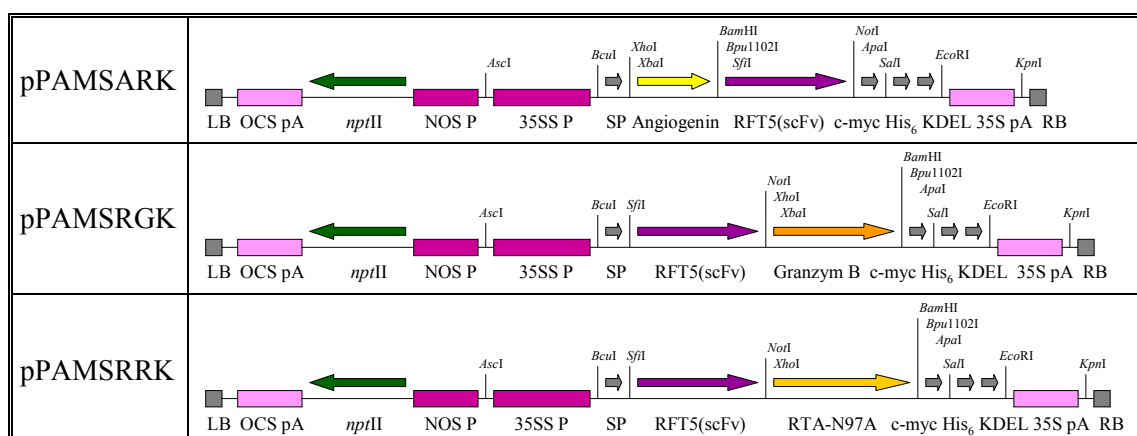
**Abb. 64**  
Binäre Plasmide ohne Immuntoxininfusionsgene



**Abb. 65**  
Binäre Plasmide mit Fusionsgenen, die für Immuntoxine mit der Toxindomäne am N-Terminus codieren



**Abb. 66**  
**Binäre Plasmide mit Fusionsgenen, die für Immuntoxine mit der Bindedomäne am N-Terminus codieren**



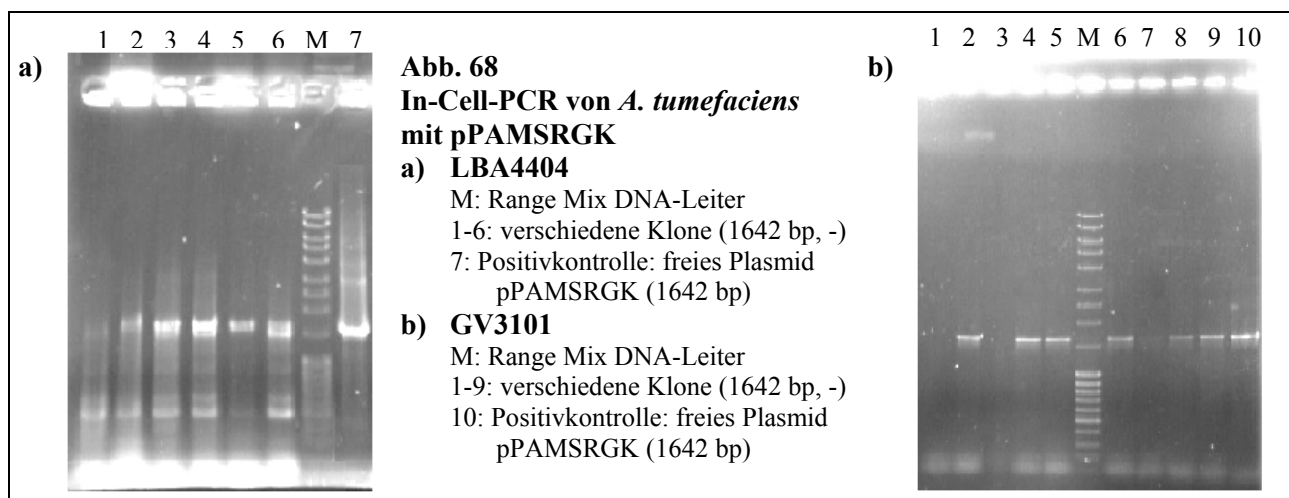
**Abb. 67**  
**Binäre Plasmide mit Fusionsgenen, an deren 5'-Ende sich die Sequenz für ein Signalpeptid zur ER-Lokalisation befindet**

## 3.2 Herstellung und Nachweis transgener *Agrobacterium tumefaciens*

Die zuvor hergestellten Plasmide (siehe 3.1) mussten, bevor eine Pflanzentransformation erfolgen konnte, in *A. tumefaciens* eingebracht werden. In der vorliegenden Arbeit fanden die Stämme LBA4404 und GV3101 Verwendung (siehe 2.1.1). Diese wurden mit den zuvor aus *E. coli* DH5 $\alpha$  isolierten (siehe 2.4.1.1) Plasmiden pPAMSARK (siehe 3.1.3.9), pPAMSRGK (siehe 3.1.3.10) und pPAMSRRK (siehe 3.1.3.11) transformiert (siehe 2.3.1.2). Dies gestaltete sich als schwierig, da häufig entweder ein Bakterienrasen auf den Selektionsplatten wuchs, oder aber kein Klon zu sehen war (siehe 4.5.2).

### 3.2.1 *Agrobacterium tumefaciens* mit pPAMSRGK

*A. tumefaciens* wurden mit dem Plasmid pPAMSRGK (siehe 3.1.3.10) transformiert (siehe 2.3.1.2). Einzelne Klone konnten sowohl im Stamm LBA4404 als auch im Stamm GV3101 generiert werden. Sechs Klone in *A. tumefaciens* LBA4404 und neun Klone in *A. tumefaciens* GV3101 wurden einer In-Cell-PCR mit den Primern Lfor und KDELrev unterzogen. Es kam das Standard-PCR-Programm (siehe 2.4.3) zum Einsatz. Die erwartete Bandengröße lag bei 1642 bp und wurde in allen getesteten Klonen von *A. tumefaciens* LBA4404 und in sieben Klonen von *A. tumefaciens* GV3101 erzielt (siehe Abb. 68).

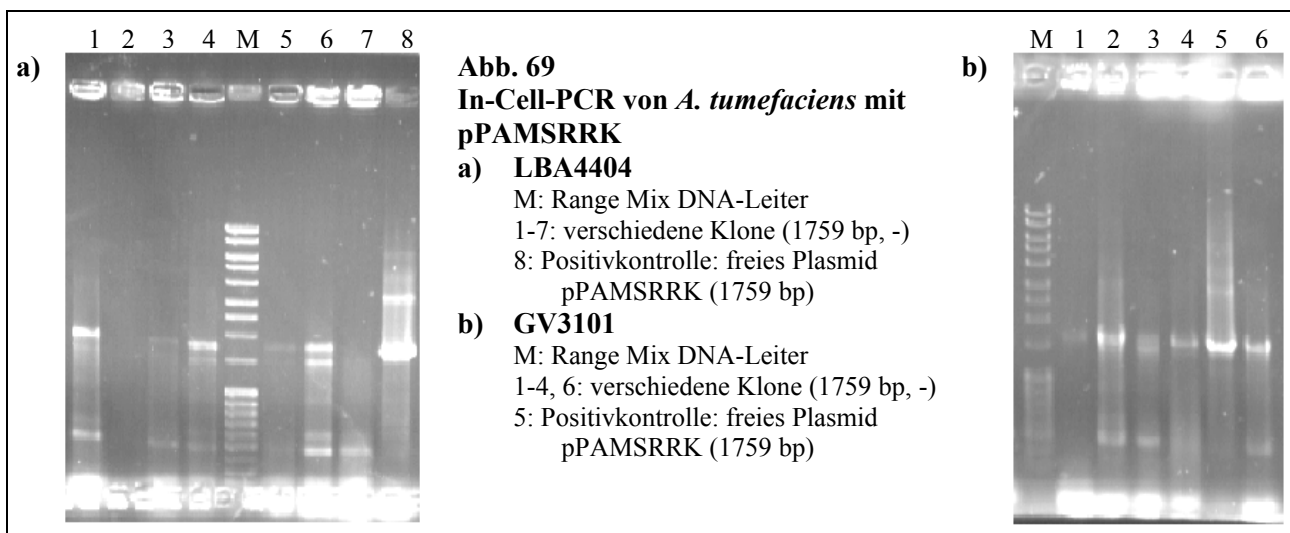


Keiner dieser Klone konnte in Flüssigmedium angezogen werden. Nach 24 Tagen wurde auf die transgenen Klone von *A. tumefaciens* LBA4404 die In-Cell-PCR mit den Primern Lfor und KDELrev wiederholt. Nach dieser Zeit konnten hier keine Banden mehr generiert werden (siehe 4.5.2). Da es auch in weiteren Versuchen der Transformation nicht möglich war, wachstumsfähige, transgene *A. tumefaciens* zu erstellen, wurde auf die Transformation mit pPAMSRGK im weiteren Verlauf verzichtet (siehe 4.5.2).



### 3.2.2 *Agrobacterium tumefaciens* mit pPAMSRRK

*A. tumefaciens* wurden mit dem Plasmid pPAMSRRK (siehe 3.1.3.11) transformiert (siehe 2.3.1.2). Sowohl im Stamm LBA4404 als auch im Stamm GV3101 konnten einzelne Klone generiert werden. Bei einer Überprüfung von sieben Klonen von *A. tumefaciens* LBA4404 und fünf Klonen von *A. tumefaciens* GV3101 mittels einer In-Cell-PCR im Standardprogramm (siehe 2.4.3) mit den Primern Lfor und KDELrev, zeigten je fünf Klone die erwarteten Banden bei 1759 bp (siehe Abb. 69).

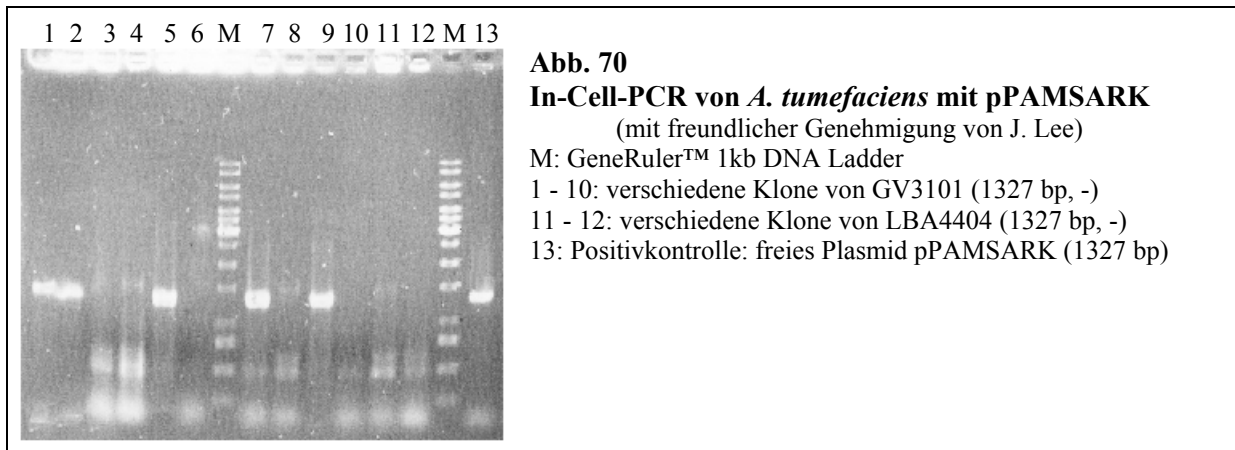


Diese positiven Klone konnten nicht in Flüssigmedium angezogen werden. Bei einer Überprüfung durch eine In-Cell-PCR etwa 23 Tage nach den positiven Ergebnissen zeigte sich bei keinem dieser Klone mehr die erwartete Bande bei 1759 bp.

Mehrere weitere Versuche wachstumsfähige, transgene *A. tumefaciens* zu erstellen, schlugen fehl. Hierbei ist ein Ansatz besonders zu erwähnen, in dem es gelang, transgene Klone von *A. tumefaciens* LBA4404 in Flüssigmedium anzuziehen, in denen zuvor eine In-Cell-PCR mit den Primern Lfor und KDELrev die gewünschte Bande ergeben hatte. Trotz mehrerer Versuche gelang es nicht, DNA aus diesen Bakterien zu isolieren (siehe 4.5.2). Bei einer Wiederholung der In-Cell-PCR eine Woche nach derjenigen, in der die positiven Ergebnisse erzielt worden waren, zeigten sich auch hier keine Banden mehr (siehe 4.5.2).

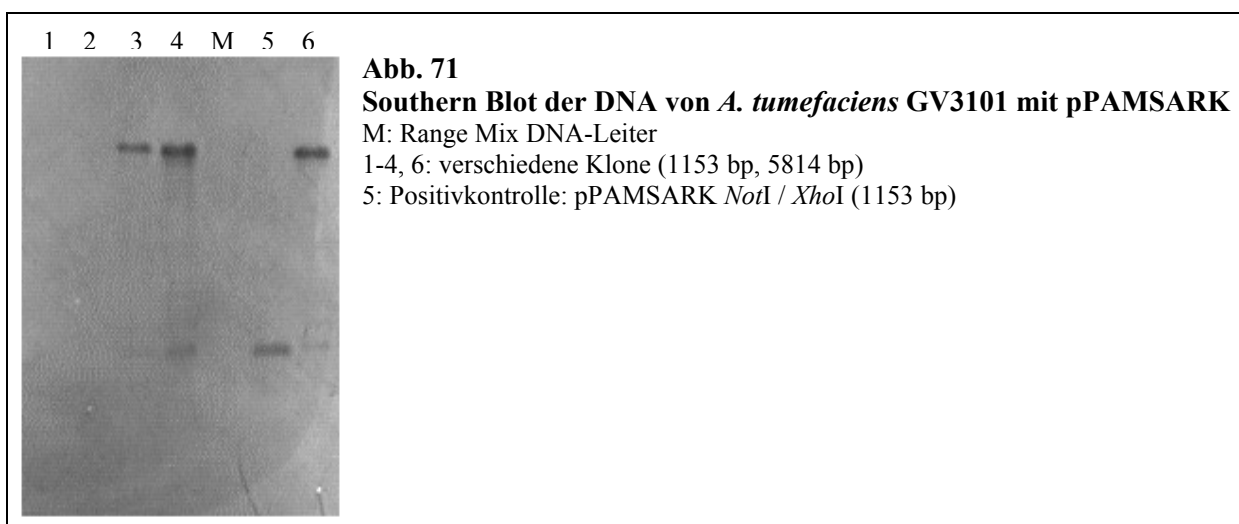
### 3.2.3 *Agrobacterium tumefaciens* mit pPAMSARK

*A. tumefaciens* wurden mit dem Plasmid pPAMSARK (siehe 3.1.3.9) transformiert (siehe 2.3.1.2). Die Transgenität dieser Klone wurde durch eine In-Cell-PCR im Standardprogramm (siehe 2.4.3) mit den Primern Lfor und KDELrev überprüft. Die erwartete Bande bei 1327 bp konnte in fünf verschiedenen Klonen bei *A. tumefaciens* GV3101 eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abb. 70). In weiteren Klonen bei *A. tumefaciens* GV3101 und bei einem Klon in *A. tumefaciens* LBA4404 erschien die erwartete Bande (siehe Abb. 70), allerdings äußerst schwach (siehe 4.5.2).



Nun sollte die DNA aus den positiven Klonen isoliert werden (siehe 2.4.1.2). Der Klon aus *A. tumefaciens* LBA4404 konnte jedoch trotz mehrfacher Versuche nicht in Flüssigmedium angezogen werden. Eine weitere In-Cell-PCR (siehe 2.4.3) etwa fünf Wochen nach der ersten positiven PCR brachte kein positives Ergebnis mehr (siehe 4.5.2). So wurde versucht, durch neue Transformationen einen transgenen Klon zu generieren. Trotz mehrfacher Versuche schlug dies fehl. So wurde im Folgenden nicht mit LBA4404 mit pPAMSARK gearbeitet (siehe 4.5.2).

Die fünf positiven Klone von *A. tumefaciens* GV3101 waren in Flüssigmedium wachstumsfähig und ihre DNA konnte isoliert werden. Zum endgültigen Nachweis, dass das PCR-Produkt dem Immuntoxin entsprach, wurde ein Southern Blot (siehe 2.4.12) mit anschließender Hybridisierung (siehe 2.4.13) und Detektion mittels ECL (siehe 2.4.14) durchgeführt (siehe 4.5.2). Die isolierte Bakterien-DNA wurde mit *NotI* / *XhoI* verdaut (siehe 2.4.6). Die Sonde wurde aus dem kleinen Fragment von pPAMSARK *NotI* / *XhoI* (1153 bp, 5814 bp) hergestellt (siehe 2.4.13). Drei der fünf getesteten Klone zeigten in diesem Blot Signale (siehe 4.5.2). Hier trat zum einen das Signal bei 1153 bp, dessen Bande durch den Schnitt mit *NotI* / *XhoI* entstanden war, auf. Zum anderen war auch ein Signal im höhermolekularen Bereich zu finden, welches auf noch ungeschnittenes Plasmid schließen ließ (siehe Abb. 71). Aus einem der Klone wurde ein Glycerinstock erstellt (siehe 2.2.1), der zu allen weiteren Transformationsversuchen verwendet wurde (siehe 3.3 - 3.4).



Letztendlich ließen sich also transgene *A. tumefaciens* herstellen, die ein normales Wachstumsverhalten zeigten und eindeutig hatten verifiziert werden können. Auf diese Weise konnte ein weiteres Teilziel dieser Arbeit (siehe 1.5) erreicht werden.

### **3.3 Herstellung und Nachweis transgener *Nicotiana tabacum***

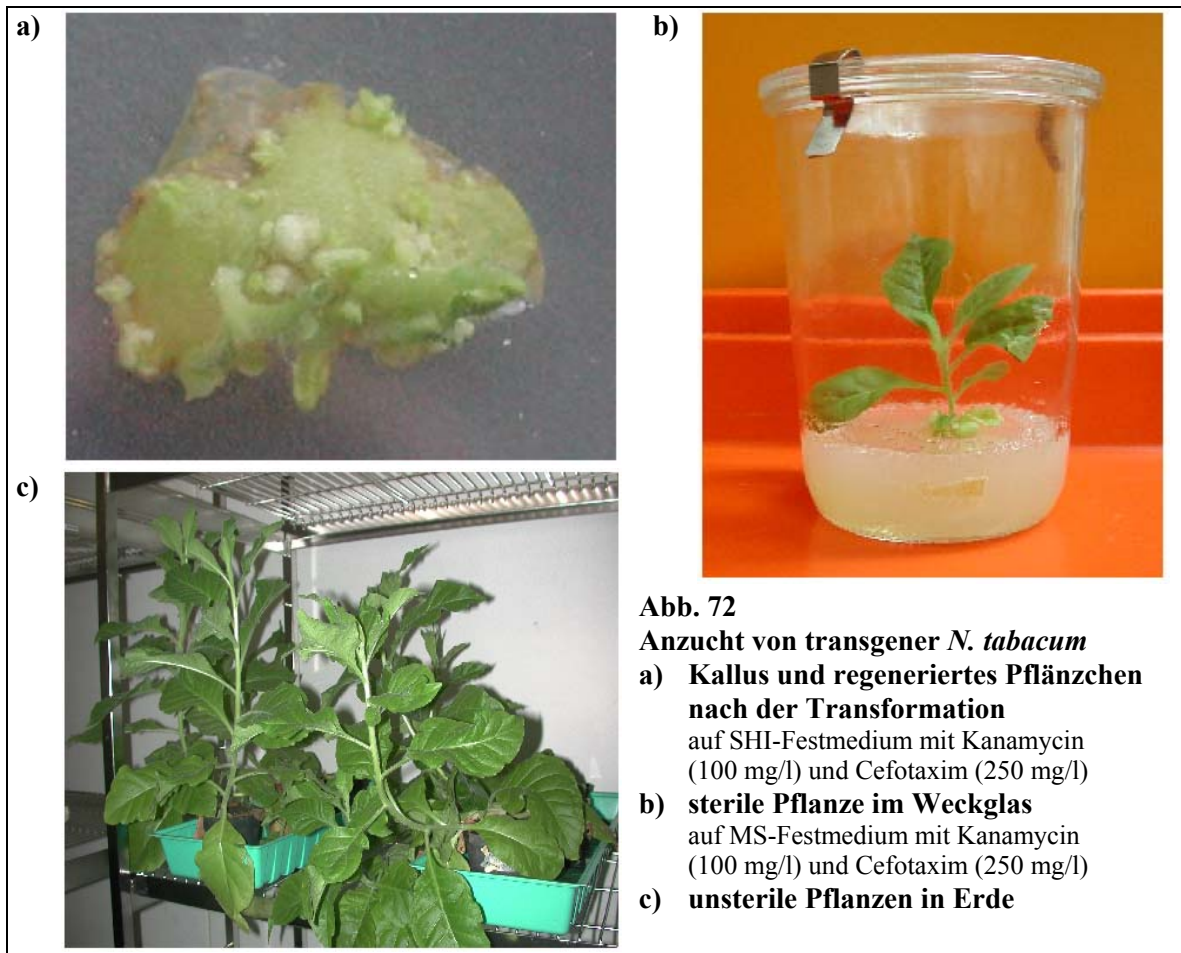
Nachdem das Plasmid pPAMSARK in *A. tumefaciens* vorlag (siehe 3.2.3), konnten mit diesen Bakterien Pflanzen transformiert werden. Als Modellpflanze wurde unter anderem *N. tabacum* (Tabak) ausgewählt (siehe 1.4.4.1). Bei der *A.-tumefaciens*-vermittelten Transformation wurde zunächst der Bereich an der Right Border mit dem Immuntoxininfusionsgen übertragen, dann der Bereich des Resistenzgens *nptII* bis zur Left Border (siehe 1.4.3). Bei vorhandener Resistenz gegen Kanamycin bzw. G-418 war somit ein zusätzliches Vorhandensein des Immuntoxininfusionsgens im Pflanzengenom äußerst wahrscheinlich (siehe 4.6.1).

So wurde als erster und einfachster Nachweis einer erfolgreichen Transformation das Wachstum der Pflanzen auf Selektionsmedium herangezogen (siehe 3.3.1). Die wachstumsfähigen Pflanzen wurden dann im Weiteren auch auf genetischer Ebene überprüft (siehe 3.3.3.1). Die Expression des Immuntoxingens wurde schließlich auf mRNA-Ebene (siehe 3.3.3.2) und durch Nachweis des Proteins selbst (siehe 3.3.4) sichergestellt.

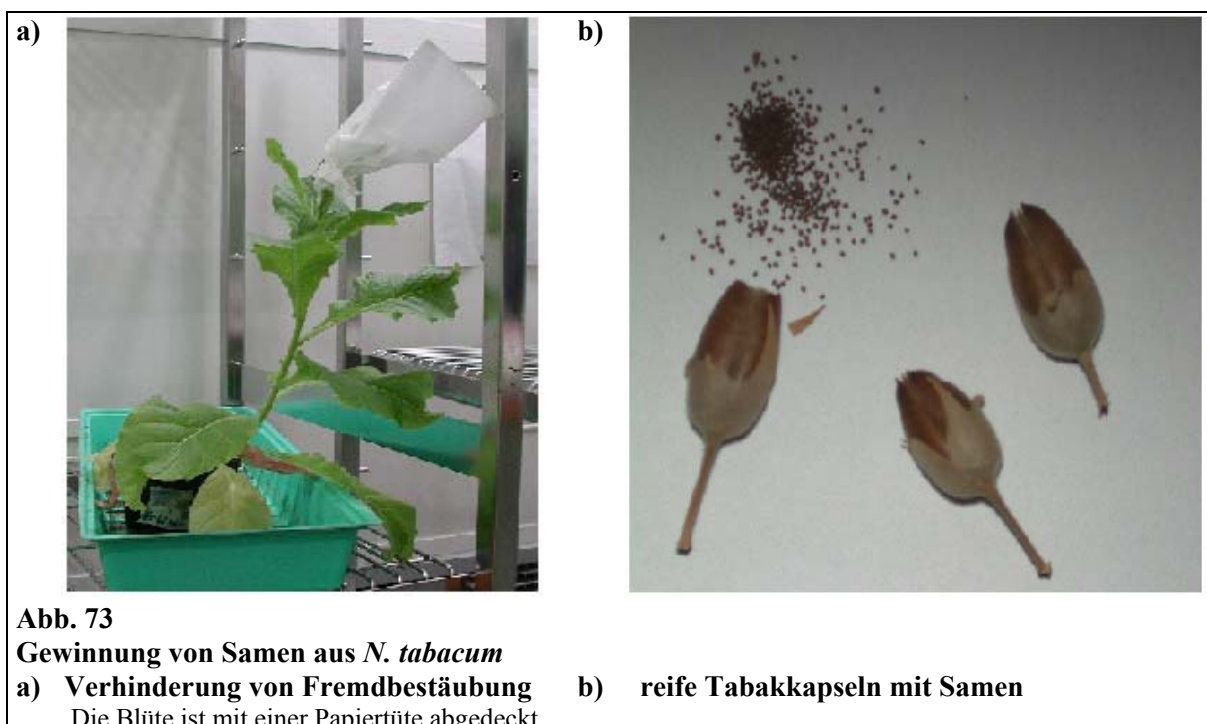
Des Weiteren wurde die Vererbung des Immuntoxingens durch Anzucht einer F<sub>1</sub>-Generation überprüft (siehe 3.3.2). Auch hier wurden Nachweise auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene unternommen (siehe 3.3.3 - 3.3.4).

#### **3.3.1 Wachstum auf Selektionsmedium**

*N. tabacum* des Stamms SR1 wurde mit *A. tumefaciens* des Stamms GV3101, die das binäre Plasmid pPAMSARK trugen, transformiert (siehe 2.3.2.3). Nach einem Monat hatten sich auf Selektionsmedium mit Kanamycin (100 mg/l) und Cefotaxim (250 mg/l) kleine Pflänzchen regeneriert (siehe Abb. 72a). Siebzehn der regenerierten Pflänzchen wurden zunächst steril in Weckgläsern auf Selektionsmedium mit Kanamycin (100 mg/l) und Cefotaxim (250 mg/l) (siehe Abb. 72b), später unsteril in Erde (siehe Abb. 72c) angezogen (siehe 2.2.2.1). Die Pflanzen zeigten im Vergleich zu einer nicht transformierten Kontrollpflanze (Pflanze 0) keinerlei Auffälligkeiten im Phänotyp.

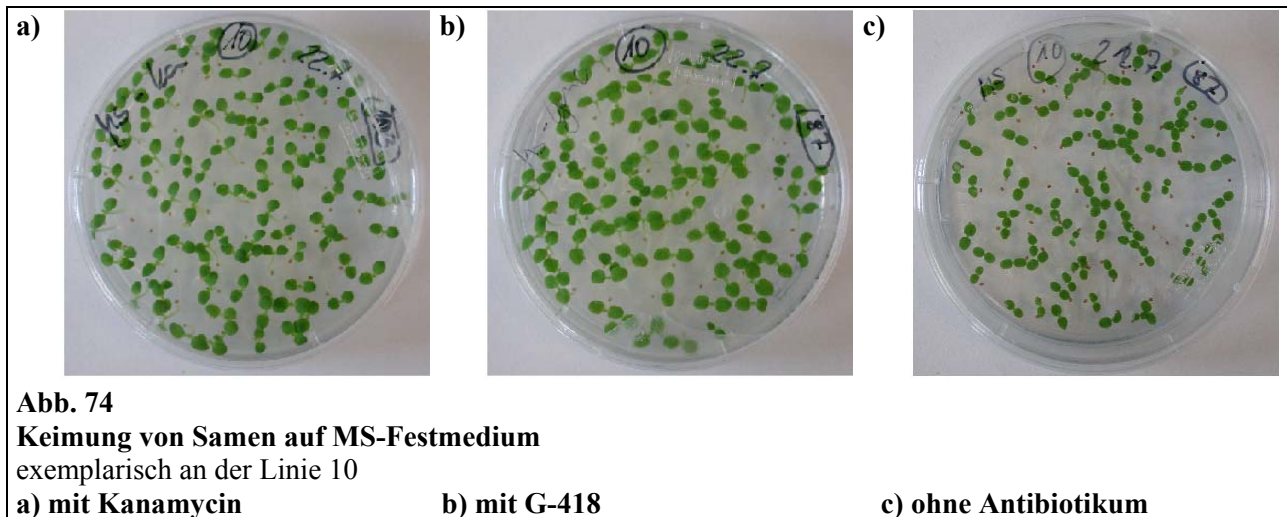


Die 17 regenerierten Tabakpflanzen wurden bis zur Fruchtreife kultiviert. Von allen Pflanzen wurden Samen gewonnen (siehe 2.2.2.1), welche aus Selbstbefruchtung hervorgegangen waren (siehe Abb. 73).



### 3.3.2 Anzucht einer F<sub>1</sub>-Generation

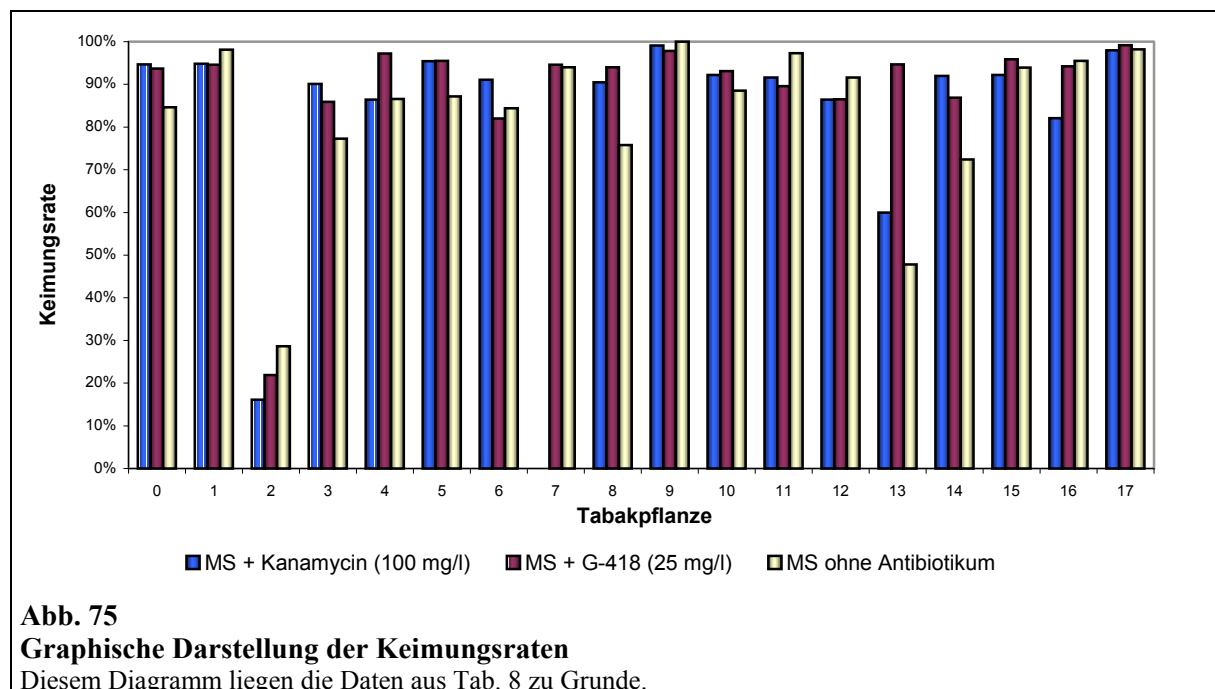
Die Samen der 17 transgenen Tabakpflanzen (Pflanzen 1 - 17) und die Samen der nicht transgenen Kontrollpflanze (Pflanze 0) wurden sterilisiert und ausgesät (siehe 2.2.2.1). Es wurden sowohl MS-Festmedium mit Kanamycin (100 mg/l) und MS-Festmedium mit G-418 (25 mg/l) als auch MS-Festmedium ohne Antibiotikum verwendet. Nach etwa zwei Wochen war ein Großteil der Samen ausgekeimt (siehe Abb. 74).



Durch Auszählung der gekeimten Pflanzen und Bildung des Quotienten durch die Anzahl der insgesamt ausgesäten Samen wurden die Keimungsraten der einzelnen Inzuchtlinien (Linien 0 - 17) ermittelt. Entgegen der Erwartung keimten die Samen etwa gleich gut auf antibiotikumhaltigen wie auf antibiotikumfreien Medium (siehe 4.6.1). Auch die Samen der nicht transgenen Kontrollpflanze keimten auf antibiotikumhaltigem Medium. Die Keimungsraten lagen zumeist in einem Bereich zwischen 80 % und 100 %. Einzig die Samen der Linie 13 mit Keimungsraten ab 47 % und die Samen der Linie 2 mit Keimungsraten zwischen 16 % und 29 % fielen deutlich aus diesem Rahmen (siehe 4.6.1). Einen Überblick über die Versuchsgröße und die exakten Ergebnisse gibt die Tabelle 8, eine graphische Darstellung liefert Abb. 75.

**Tab. 8**  
**Keimungsraten**

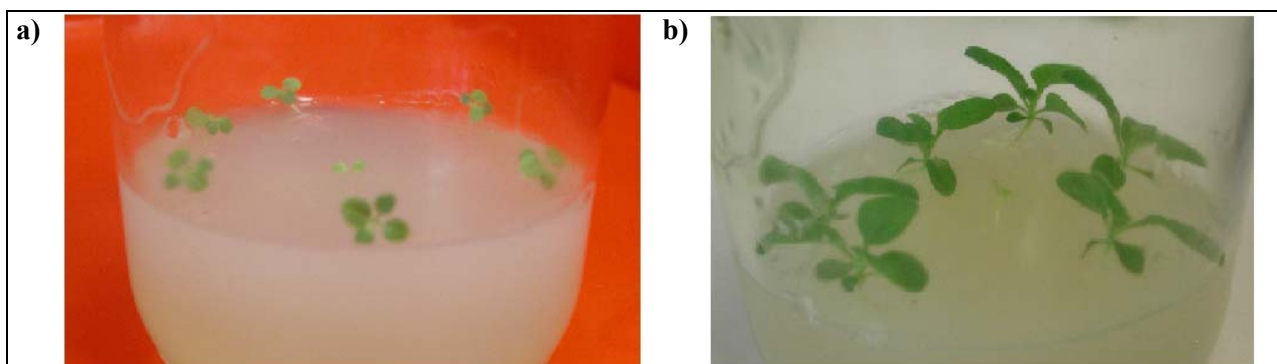
Tabakpflanze	Keimung auf MS + Kanamycin (gekeimte Pflanzen / ausgesäte Pflanzen)	Keimungsrate	Keimung auf MS + G-418 (gekeimte Pflanzen / ausgesäte Pflanzen)	Keimungsrate	Keimung auf MS (gekeimte Pflanzen / ausgesäte Pflanzen)	Keimungsrate
0	89 / 94	94,7 %	118 / 126	93,7 %	66 / 78	84,6 %
1	91 / 96	94,8 %	106 / 112	94,6 %	104 / 106	98,1 %
2	15 / 93	16,1 %	16 / 73	21,9 %	20 / 70	28,6 %
3	73 / 81	90,1 %	110 / 128	85,9 %	75 / 97	77,3 %
4	83 / 96	86,4 %	138 / 142	97,2 %	71 / 82	86,6 %
5	104 / 109	95,4 %	127 / 133	95,5 %	75 / 86	87,2 %
6	82 / 90	91,1 %	114 / 139	82,0 %	103 / 122	84,4 %
7	Ansatz verpilzt		122 / 129	94,6 %	78 / 83	94,0 %
8	67 / 74	90,5 %	79 / 84	94,0 %	47 / 62	75,8 %
9	114 / 115	99,1 %	133 / 136	97,8 %	118 / 118	100 %
10	95 / 103	92,2 %	81 / 87	93,1 %	77 / 87	88,5 %
11	131 / 143	91,6 %	120 / 134	89,6 %	109 / 112	97,3 %
12	95 / 110	86,4 %	115 / 133	86,5 %	98 / 107	91,6 %
13	78 / 130	60,0 %	125 / 132	94,7 %	65 / 136	47,8 %
14	126 / 137	92,0 %	73 / 84	86,9 %	63 / 87	72,4 %
15	154 / 167	92,2 %	116 / 121	95,9 %	123 / 131	93,9 %
16	96 / 117	82,1 %	131 / 139	94,2 %	106 / 111	95,5 %
17	144 / 147	98,0 %	127 / 128	99,2 %	168 / 171	98,2 %



Die Keimlinge wurden zunächst auf den jeweiligen Medien belassen. Nach weiteren 14 Tagen konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Pflänzchen festgestellt werden. Während einige im Wachstum stagnierten und außer den zwei Kotyledonen keine weiteren Blätter ausbildeten, war bei anderen Pflänzchen Wachstum und weitere Blattentwicklung zu beobachten. Dieses unterschiedliche Wachstum konnte jedoch nicht ausgezählt werden, da die Samen in den Petrischalen sehr dicht ausgesät worden waren und sich die jungen Pflänzchen in dieser Phase bereits gegenseitig verdeckten. Es ist aber zu bemerken, dass keiner der Keimlinge aus den Samen

der nicht transgenen Kontrollpflanze (Linie 0) auf antibiotikumhaltigem Medium weitere Blätter entwickelte. Auf nicht antibiotikumhaltigem Medium konnten sich im Vergleich die Pflänzchen weiter entwickeln.

Zur weiteren Kultivierung wurden in den 17 Inzuchtlinien je sechs der transgenen Pflänzchen, die bereits mehr als zwei Blätter besaßen, in ein Weckglas mit MS-Festmedium mit Kanamycin (100 mg/l) umgesetzt. Zum Vergleich wurde in die Mitte jedes Weckglases ein Keimling aus Samen der nicht transgenen Elternpflanze gesetzt. Dieses zeigte in keinem Fall Wachstum, sondern verblasste und starb ab. Die transgenen Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation zeigten jedoch deutliches Wachstum (siehe Abb. 76).



**Abb. 76**

**Wachstum der F<sub>1</sub>-Generation auf MS-Festmedium mit Kanamycin (100 mg/l)**

**a) frühes Stadium**

sechs transgene Pflanzen um eine nicht transgene Pflanze direkt nach dem Umsetzen in das Weckglas

**b) späteres Stadium**

sechs transgene Pflanzen um eine nicht transgene Pflanze zwei Wochen nach dem Umsetzen in das Weckglas

So wurde durch Wachstum auf Selektionsmedium der Beweis erbracht, dass das Gen *nptII* in die F<sub>1</sub>-Generation vererbt wurde. Da eine gleichzeitige Vererbung des Immuntoxininfusionsgens sehr wahrscheinlich war, war davon auszugehen, dass auch dieses in die F<sub>1</sub>-Generation vererbt wurde.

### 3.3.3 Nachweis des Immuntoxininfusionsgens

Der endgültige Nachweis, dass die auf Kanamycin bzw. G-418 wachstumsfähigen Pflanzen auch das Immuntoxinigen trugen, musste noch erfolgen. Hier wurde zum einen das Gen im Pflanzengenom auf DNA-Ebene nachgewiesen (siehe 3.3.3.1). Zum anderen wurde die Transkription des Gens auf mRNA-Ebene überprüft (siehe 3.3.3.2).

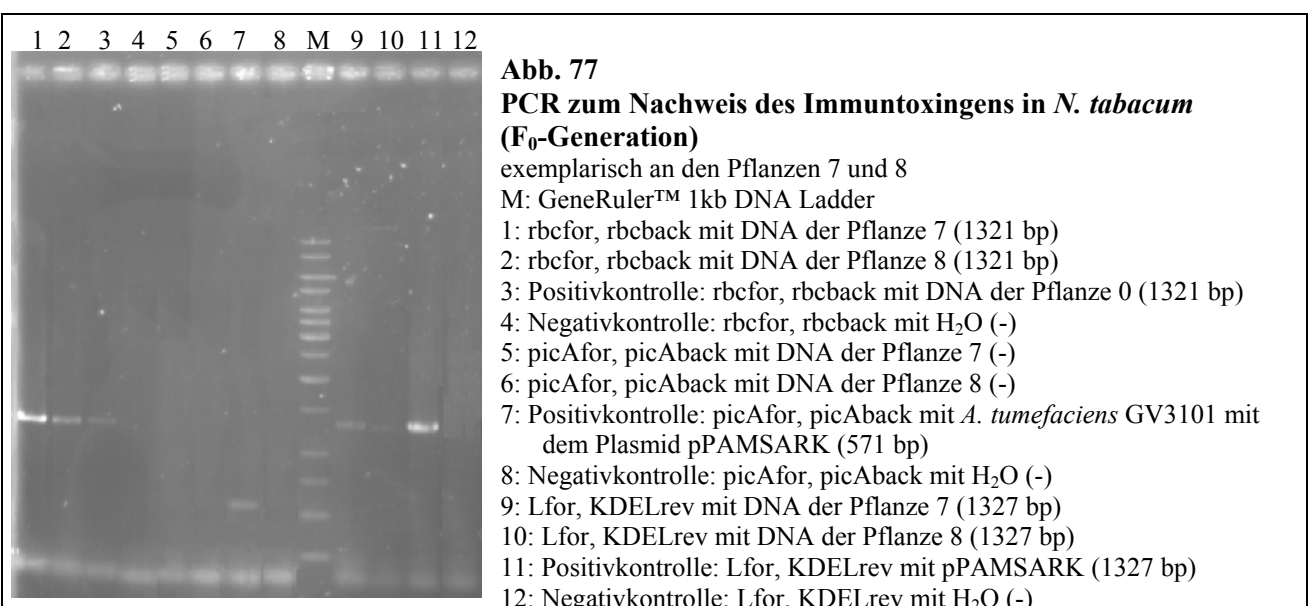
#### 3.3.3.1 Nachweis auf DNA-Ebene

Die DNA der 17 regenerierten Pflanzen der F<sub>0</sub>-Generation (Pflanzen 1 - 17) und die DNA von je zwei Pflanzen pro Linie der F<sub>1</sub>-Generation (Pflanzen 1.1 - 17.2) wurde isoliert (siehe 2.4.1.3). In den Linien 2, 6, 8 und 9 der F<sub>1</sub>-Generation wurden je drei zusätzliche Pflanzen aufgearbeitet. Ihre Eltern hatten ein positives Signal auf mRNA-Ebene aufgewiesen (siehe 3.3.3.2), weshalb ein

größeres Augenmerk auf diese vier Linien gelegt wurde (siehe 4.6.1). Zum Vergleich wurde zusätzlich die DNA der nicht transgenen Tabakpflanze (Pflanze 0) isoliert (siehe 2.4.1.3).

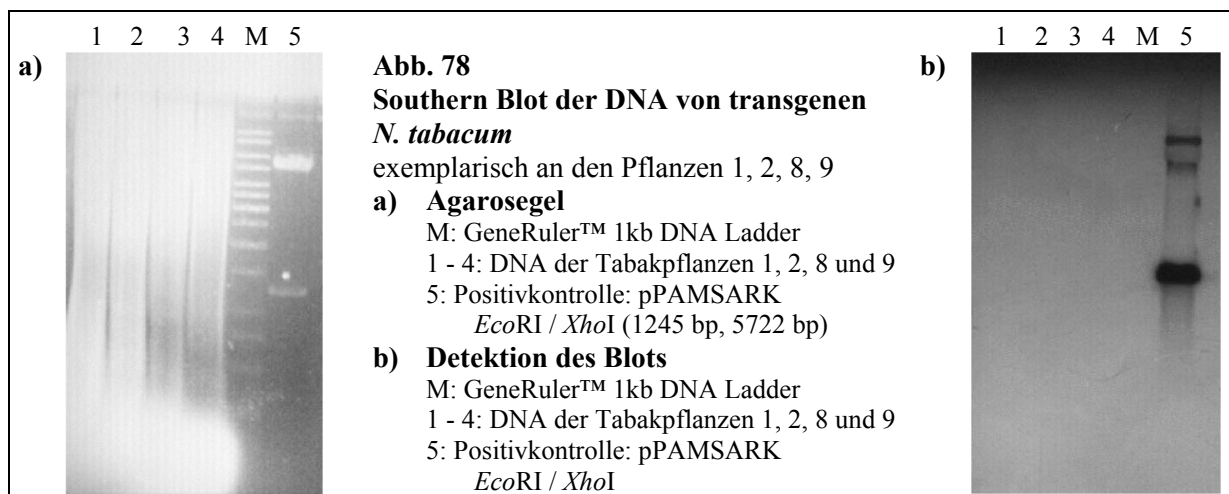
Zunächst wurde mittels einer PCR die erfolgreiche Isolation der DNA überprüft. Hier wurden die Primer rbcfor und rbcback verwendet, die einen Teil des Gen für die große Untereinheit der Ribulosebisphosphat-Carboxylase / Oxygenase (RubisCo) amplifizieren. Dieses Gen liegt in jeder Tabakpflanze im Plastom vor (Shinozaki *et al.*, 1986) und konnte somit als Positivkontrolle verwendet werden. Die PCR wurde mit einer abweichenden Annealing-Temperatur von 64 °C im Standard-PCR-Programm (siehe 2.4.3) durchgeführt und lieferte bei jeder geglückten DNA-Isolation aus den Pflanzen eine Bande bei 1321 bp. Auf diese Weise konnte in allen untersuchten Pflanzen der F<sub>0</sub>-Generation und in dem nicht transgenen Tabak ein Signal ermittelt werden (siehe Abb. 70). Eine weitere Kontrolle diente dazu, eine etwaige Kontamination mit transgenen *A. tumefaciens* in den Pflanzen auszuschließen. Hier wurde eine PCR mit den Primern picAfor und picAback durchgeführt, die im picA-Genlocus im Genom von *A. tumefaciens* binden (Rong *et al.*, 1991). Bei Anwesenheit der Bakterien lieferte diese mit einer abweichenden Annealing-Temperatur von 64 °C im Standard-PCR-Programm (siehe 2.4.3) durchgeführte PCR eine Bande bei 571 bp. Hier wurde in keiner Pflanze das Signal bei 571 bp erzielt. Einzig bei einer Kontroll-PCR mit transgenen *A. tumefaciens* GV3101, die pPAMSARK beherbergten, lag dieses vor (siehe Abb. 70). So wurde der Nachweis erbracht, dass in den Pflanzen keine Kontaminationen mit den *A. tumefaciens* vorlagen, mit denen die Pflanzen transformiert worden waren (siehe 3.3.1).

Der Test auf das Immuntoxininfusionsgen wurde mittels PCR mit den Primern Lfor und KDELrev im Standard-PCR-Programm (siehe 2.4.3) durchgeführt. Die Größe des erwarteten PCR-Fragments lag bei 1327 bp. In 13 der 18 getesteten Pflanzen (in allen Pflanzen außer 0, 3, 4, 11, 15) konnte mit den Primern Lfor und KDELrev das Signal für das Immuntoxinigen ermittelt werden (siehe Abb. 77). In der nicht transgenen Pflanze 0 war das Fehlen dieser Bande zu erwarten gewesen, in den anderen vier Pflanzen (3, 4, 11, 15) war dies eher verwunderlich, da diese ja auf Selektionsmedium wachsen konnten (siehe 4.6.1).





Da PCR-Signale theoretisch auch bei anderen Sequenzen zufällig in ähnlicher Größe entstehen könnten (siehe 4.6.1), sollte ein eindeutiger Nachweis mittels Southern Blot erfolgen. Die aus den Tabakpflanzen isolierte DNA wurde mit *EcoRI* / *XhoI* geschnitten (siehe 2.4.6) und über ein Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.4.10). Als Positivkontrolle wurde zusätzlich mit *EcoRI* / *XhoI* (1245 bp, 5722 bp) geschnittener pPAMSARK auf das Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde geblottet (siehe 2.4.12) und mit einer Sonde hybridisiert (siehe 2.4.13). Diese war zuvor aus dem kleinen Fragment von pPAMSARK *NotI* / *XhoI* (1153 bp, 5841 bp) hergestellt worden (siehe 2.4.13). Obwohl das Gel mit sehr viel DNA beladen war (siehe Abb. 71), konnte in der Detektion (siehe 2.4.14) nur die Positivkontrolle nachgewiesen werden (siehe Abb. 78).

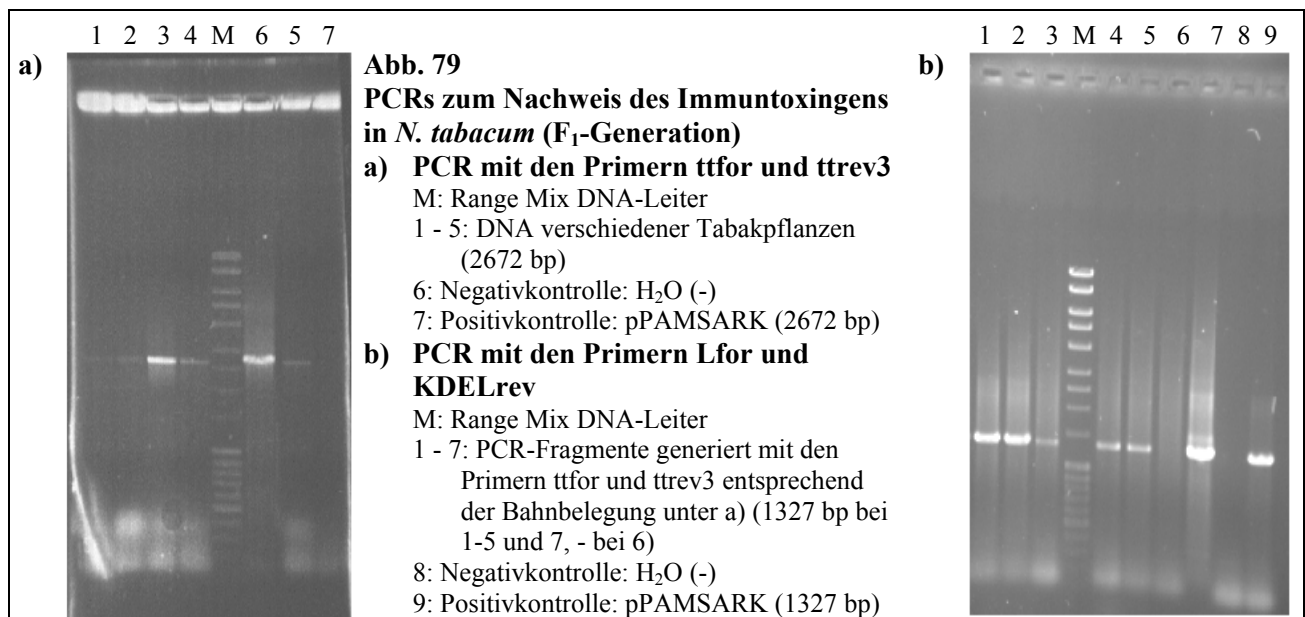


Da hier mit Hilfe des Southern Blots das Gen für das Immuntoxin nicht nachgewiesen werden konnte, musste eine andere Methode zum Nachweis gewählt werden (siehe 4.6.1). So wurden die PCR-Produkte, welche bei Verwendung der Primer Lfor und KDELrev entstanden waren, sequenziert. Auf diese Weise konnte eine zufällige Entstehung eines Fragments gleicher Länge wie das Immuntoxigen ausgeschlossen werden. Es wurden exemplarisch die PCR-Produkte von drei Tabakpflanzen (Pflanzen 2, 7 und 8) sequenziert (siehe 4.6.1). Es handelte sich stets um das Immuntoxigen. So wurde geschlossen, dass auch bei den übrigen Pflanzen die Fragmente, die bei Verwendung der Primer Lfor und KDELrev entstanden waren, dem Immuntoxigen entsprachen (siehe 4.6.1).

Auch in den Isolaten aus den Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation sollte das Immuntoxigen mit den Primern Lfor und KDELrev bei Verwendung des Standard-PCR-Programms (siehe 2.4.3) nachgewiesen werden. Hier war jedoch in keiner der untersuchten Pflanzen ein direkter Nachweis möglich. Dies stand in deutlichem Gegensatz zu den Ergebnissen in der F<sub>0</sub>-Generation, in der in den meisten Pflanzen das Signal bei 1327 bp generiert worden war.

Jedoch konnte hier die Präsenz des Immuntoxigens mittels einer Nested PCR nachgewiesen werden. Mit den Primern ttfor und ttrev3 wurden zwei Primer gewählt, die außerhalb des Immuntoxigens auf der DNA hybridisieren konnten. Hier entstand bei Verwendung des Standard-PCR-Programms (siehe 2.4.3) und einer abweichenden Annealing-Temperatur von 68 °C ein Fragment von 2672 bp (siehe Abb. 79). Dieses Fragment wurde sodann als Template für die PCR mit den Primern Lfor und KDELrev im Standard-PCR-Programm (siehe 2.4.3) verwendet. Auf

diese Weise ließ sich die Bande des Immuntoxins bei 1327 bp in allen 46 getesteten Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation mit Ausnahme der fünf Pflanzen der Linie 6 und jeweils einer der Linien 12 und 15 (siehe 4.6.1) generieren (siehe Abb. 79).



Es konnte also mit wenigen Ausnahmen gezeigt werden, dass das Immuntoxin auf die F<sub>1</sub>-Generation vererbt wurde. Dieser Nachweis gelang auch in den Pflanzenlinien (3, 4, 11 und 15), in denen in der F<sub>0</sub>-Generation kein Nachweis des Immuntoxins möglich gewesen war (siehe 4.6.1).

Auch in der F<sub>1</sub>-Generation wurden exemplarisch die PCR-Produkte dreier Pflanzen (Pflanzen 2.1, 8.1 und 9.1) sequenziert. Es handelte sich stets um das Immuntoxin. So wurde geschlossen, dass die PCR-Produkte der übrigen positiv getesteten Pflanzen auch dem Immuntoxin entsprachen (siehe 4.6.1). Allgemein ließ sich sagen, dass das Immuntoxin vererbt wurde, die DNA in der F<sub>1</sub>-Generation jedoch häufig in einem anderen Zustand als in der F<sub>0</sub>-Generation vorlag, in dem keine direkte Bindung der Primer Lfor und KDELrev möglich war (siehe 4.6.1).

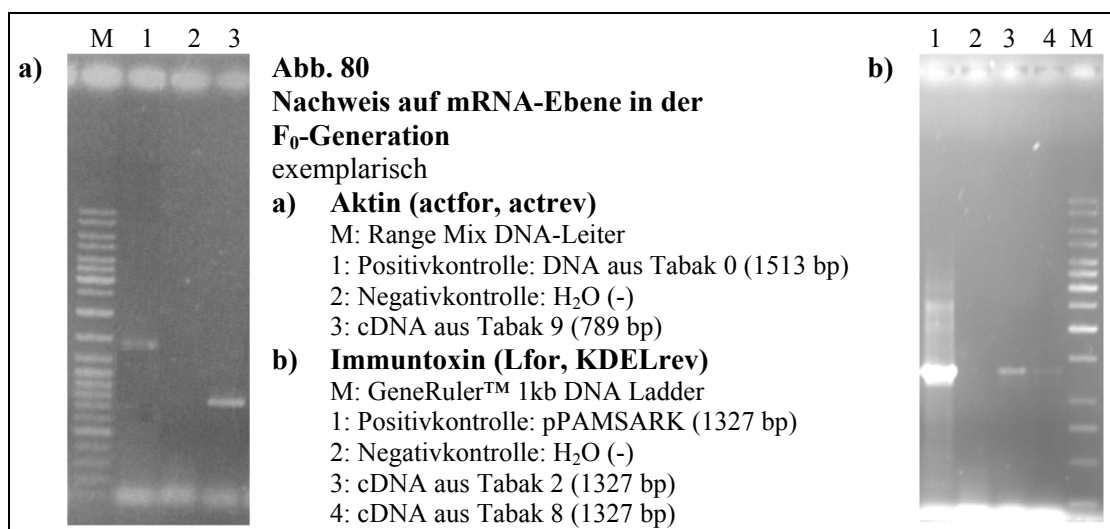
### 3.3.3.2 Nachweis auf mRNA-Ebene

Neben dem Nachweis des bloßen Vorkommens des Immuntoxininfusionsgens im Genom der Pflanzen sollte zusätzlich getestet werden, ob das Gen auch transkribiert wurde. So wurde die mRNA aus Blättern der adulten Tabakpflanzen (siehe 4.6.1) isoliert (siehe 2.4.2.1). Mittels Reverser Transkription (siehe 2.4.4) wurde diese in cDNA umgeschrieben. Das Immuntoxininfusionsgen konnte mit den Primer Lfor und KDELrev im Standard-PCR-Programm (siehe 2.4.3) bei einer Fragmentgröße von 1327 bp nachgewiesen werden.

Als Positivkontrolle wurde auf mRNA-Ebene mit dem Gen für Aktin ein Haushaltsgen gewählt (siehe 4.6.1), welches konstitutiv exprimiert wird (An *et al.*, 1996). Mit den Primern actfor und actrev wurde eine PCR im Standard-PCR-Programm (siehe 2.4.3) durchgeführt. Die erwartete Fragmentgröße lag hier bei 789 bp. Hier ließ sich auch erkennen, ob die isolierte mRNA

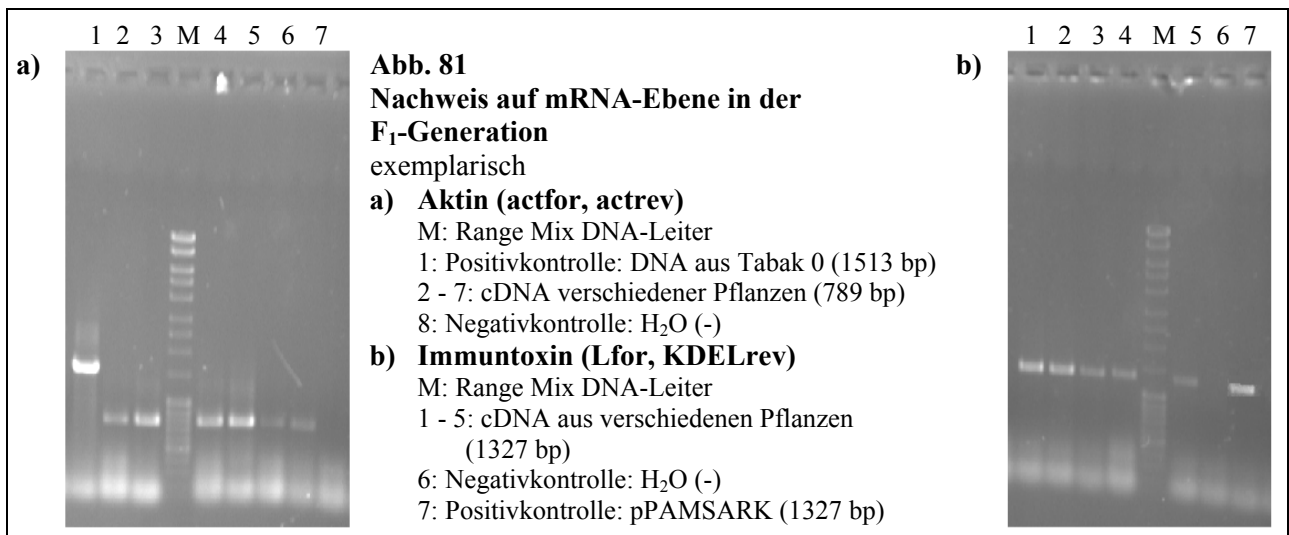
Kontaminationen mit DNA enthielt. Auf DNA-Ebene ergab sich bei dieser PCR durch das zusätzliche Vorhandensein einiger Introns im Gen für Aktin eine Fragmentgröße von 1513 bp (siehe 4.6.1).

In vier der 17 transgenen Pflanzen der  $F_0$ -Generation konnte mit den Primern Lfor und KDELrev die Transkription des Immuntoxingens nachgewiesen werden (Pflanzen 2, 6, 8 und 9). In den übrigen 13 Pflanzen und einer nicht transgenen Tabakpflanze wurde versucht, zumindest die Expression des Gens für Aktin nachzuweisen (siehe Abb. 80). Dies gelang in elf Fällen. Bei drei Pflanzen (Pflanzen 14, 15 und 16) konnte auch diese Expression nicht nachgewiesen werden. Hier war also davon auszugehen, dass entweder bei der mRNA-Isolation oder der RT-PCR Fehler aufgetreten waren. So konnten in diesen Pflanzen auch keine eindeutigen Aussagen über eine mögliche Expression des Immuntoxingens getroffen werden (siehe 4.6.1).



In der  $F_1$ -Generation wurde zunächst je eine Pflanze pro Linie bearbeitet. Das Signal auf das Gen für Aktin bei 789 bp unter Verwendung der Primer actfor und actrev konnte hier stets erzielt werden. Ein positives Signal, welches die Transkription des Immuntoxingens betraf, fand sich in den Pflanzen der Linien 5, 6, 7, 9 und 16. In den Linien 6 und 9 hatte schon in der  $F_0$ -Generation Expression nachgewiesen werden können. In den Linien 2 und 8, deren Elterpflanzen eine Transkription des Immuntoxingens aufgewiesen hatten, wurde kein Signal erzielt.

Nun wurden weitere Pflanzen der fünf Linien 5, 6, 7, 9 und 16, in denen in der  $F_1$ -Generation Expression nachgewiesen werden konnte, sowie Pflanzen der Linien 2 und 8, die in der  $F_0$ -Generation Expression gezeigt hatten, bearbeitet. In den Linien 5, 7, 9 und 16 wurde je eine weitere Pflanze untersucht. In den Linien 5 und 9 zeigte diese zweite untersuchte Pflanze keine Transkription des Immuntoxingens. In den Linien 7 und 16 konnte auch hier eine Transkription nachgewiesen werden. In der Linie 2 wurden insgesamt drei Pflanzen, in der Linie 8 vier Pflanzen bearbeitet, aber im Gegensatz zu den Pflanzen der  $F_0$ -Generation konnte hier in keiner Pflanze ein Signal auf die Expression des Immuntoxingens generiert werden. In der Linie 6 wurden insgesamt fünf Pflanzen bearbeitet. Alle zeigten das Signal der Immuntoxinexpression. Die jeweiligen Signale auf die Expression von Aktin waren in allen untersuchten Pflanzen vorhanden (siehe Abb. 81).



Die Linie 6 war demnach die einzige Linie, bei der sowohl die Pflanze der F<sub>0</sub>-Generation als auch alle untersuchten Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation ein deutliches Signal auf mRNA-Ebene ergeben hatten. Dies sprach für eine hohe Expressionsrate in den Pflanzen dieser Linie (siehe 4.6.1). Besonders zu bemerken ist, dass in der F<sub>1</sub>-Generation die Pflanzen der Linie 6 die einzigen waren, bei der bei keiner das Immuntoxigen auf DNA-Ebene (siehe 3.3.3.1) hatte nachgewiesen werden können (siehe 4.6.1).

### 3.3.4 Nachweis des Immuntoxins

Aus den 17 Tabakpflanzen der F<sub>0</sub>-Generation (Pflanzen 1 - 17) und einer nicht transgenen Kontrollpflanze (Pflanze 0) wurden nach der Samenreife die Proteine isoliert (siehe 2.5.1.1). Zur Aufreinigung des Zielproteins konnte man sich das His<sub>6</sub>-Tag des Immuntoxins zu Nutze machen, welches an eine Ni-NTA-Matrix binden kann. So wurden die Proteinextrakte der Pflanzen auf Ni-NTA-Säulchen appliziert und anschließend durch Lösungen mit steigender Imidazolkonzentration eluiert (siehe 2.5.2.1).

In der F<sub>1</sub>-Generation wurden neben einer nicht transgenen Tabakpflanze (Pflanze 0.1) je drei Pflanzen aus den Linien 2, 6, 8 und 9 (Pflanzen 2.1 - 9.3) verwendet (siehe 4.6.1), deren Elterpflanzen positive Signale auf mRNA-Ebene geliefert hatten (siehe 3.3.3.2). Es wurde ein schneller durchzuführendes Isolationsprotokoll erarbeitet (siehe 2.5.1.2), welches weniger Ausgangsmaterial benötigte. Aufgrund des geringeren Probenvolumens konnte auch die Aufreinigung mittels Ni-NTA in dieser Generation mit einem schneller durchzuführenden Protokoll (siehe 2.5.2.2) erfolgen.

### 3.3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Zunächst sollten die Proteingehalte der einzelnen Fraktionen bestimmt werden. Als Mittel der Wahl wurde hier die Konzentrationsbestimmung nach Bradford gewählt (siehe 2.5.3). Für die Bestimmungen in der  $F_0$ - bzw. in der  $F_1$ -Generation mussten einzelne Eichungen vorgenommen werden, da diese Versuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfanden. Die Eichungen der Messungen erfolgten mit BSA-Lösungen in Konzentrationen von 0 mg/l - 100 mg/l in einer Vierfachbestimmung (siehe Tab. 9). Durch lineare Regressionen wurden Trendlinien durch die Daten gelegt (siehe Abb. 82). Diese genügten für die Proteinbestimmungen in der  $F_0$ -Generation der Gleichung:  $y = 0,0036x + 0,2308$ . Für die Proteinbestimmungen in der  $F_1$ -Generation wurde die Gleichung  $y = 0,0021x + 0,253$  ermittelt.

**Tab. 9**

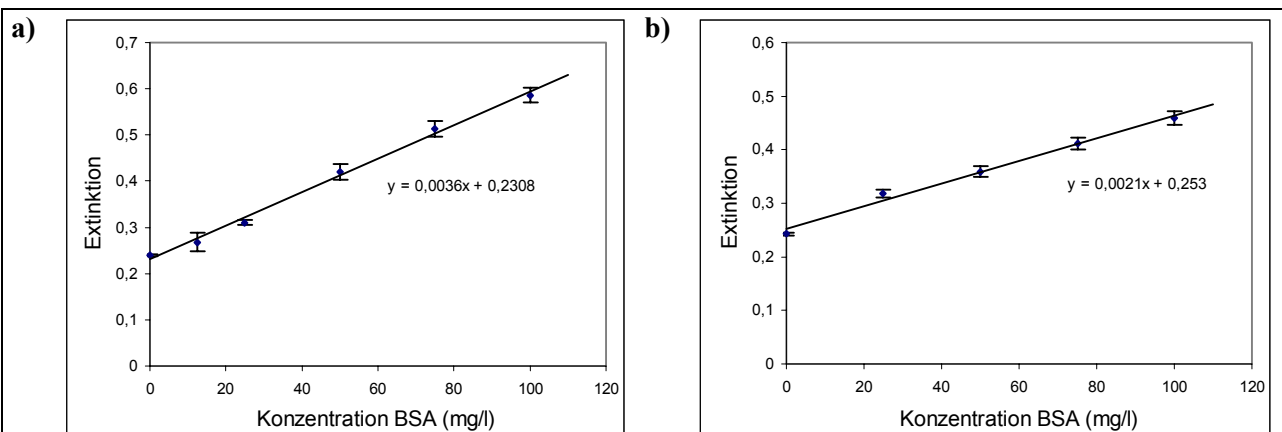
**Eichungen der Bradfordmessung mit BSA**

Angegeben sind die gemessenen Extinktionen der einzelnen Lösungen bei 595 nm, deren Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen.

<b>F<sub>0</sub>-Generation</b>	<b>Konzentration an BSA</b>					
	<b>0 mg/l</b>	<b>12,5 mg/l</b>	<b>25 mg/l</b>	<b>50 mg/l</b>	<b>75 mg/l</b>	<b>100 mg/l</b>
<b>Eichreihe 1</b>	0,241	0,254	0,305	0,409	0,499	0,580
<b>Eichreihe 2</b>	0,242	0,261	0,317	0,405	0,520	0,610
<b>Eichreihe 3</b>	0,239	0,258	0,307	0,425	0,499	0,591
<b>Eichreihe 4</b>	0,238	0,298	0,313	0,442	0,533	0,568
<b>Mittelwert</b>	0,240	0,268	0,311	0,420	0,513	0,590
<b>Standardabweichung</b>	0,002	0,020	0,006	0,017	0,017	0,020

<b>F<sub>1</sub>-Generation</b>	<b>Konzentration an BSA</b>				
	<b>0 mg/l</b>	<b>25 mg/l</b>	<b>50 mg/l</b>	<b>75 mg/l</b>	<b>100 mg/l</b>
<b>Eichreihe 1</b>	0,243	0,300	0,350	0,403	0,470
<b>Eichreihe 2</b>	0,237	0,307	0,345	0,404	0,472
<b>Eichreihe 3</b>	0,240	0,299	0,330	0,382	0,438
<b>Eichreihe 4</b>	0,243	0,318	0,359	0,411	0,459
<b>Mittelwert</b>	0,241	0,306	0,346	0,400	0,460
<b>Standardabweichung</b>	0,002	0,008	0,011	0,011	0,013



**Abb. 82**

**Eichungen der Bradfordmessung**

**a) in der  $F_0$ -Generation**

**b) in der  $F_1$ -Generation**

Diesen Graphen liegen die Daten aus Tab. 9 zu Grunde. Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichung. Die jeweiligen Trendlinien der linearen Regressionen sind im Diagramm angegeben.

Die Proteingehalte der einzelnen Fraktionen wurden nun mit Hilfe der vorliegenden Trendlinien ermittelt. Hier musste beachtet werden, dass die Puffer des Ni-NTA Spin Kits (Qiagen, Hilden (D)), welches bei der Aufreinigung der Extrakte aus der F<sub>1</sub>-Generation zum Einsatz kam, mit dem Bradford-Reagenz interagierten. Aus einer Dreifachbestimmung wurden die Mittelwerte der Extinktionen errechnet und die Differenzen zum Achsenabschnitt der mit in A. demin gelösten BSA ermittelten Eichgerade (siehe Abb. 82 b)) bestimmt (siehe Tab. 10). Diese Werte für den Äquilibrierungspuffer, den Waschpuffer bzw. den Elutionspuffer wurden stets mit den gemessenen Extinktionen der jeweiligen Proben aus Durchlauf, Waschung bzw. Elution verrechnet.

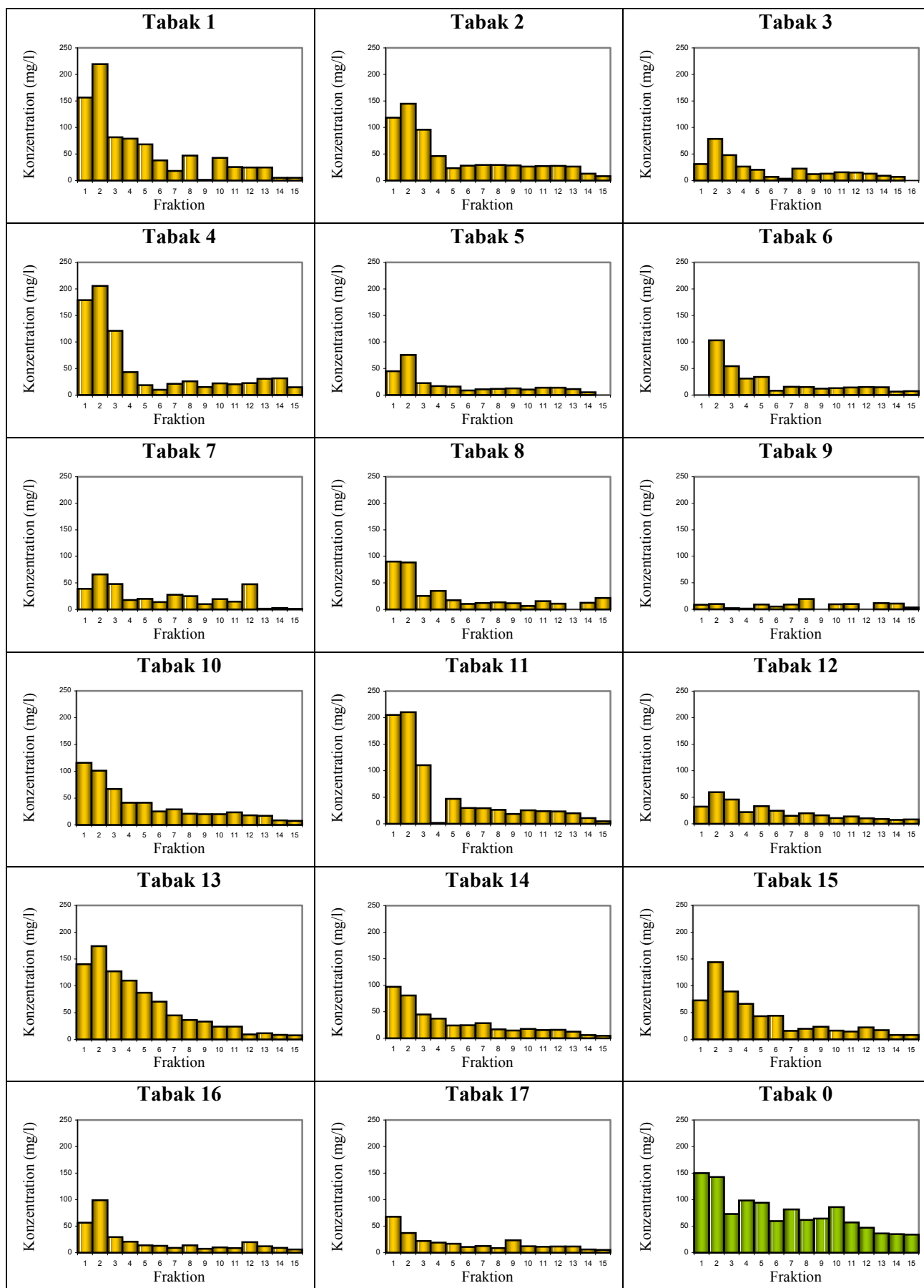
**Tab. 10**  
**Bestimmung der Interaktion der verwendeten Puffer mit dem Bradford-Reagenz**  
Angegeben sind die gemessenen Extinktionen bei 595 nm, deren Mittelwerte und die Differenzen zum Achsenabschnitt der Eichgerade.

	Äquilibrierungspuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
Messung 1	0,366	0,346	0,352
Messung 2	0,377	0,352	0,344
Messung 3	0,361	0,332	0,344
Mittelwert	0,368	0,343	0,347
Differenz zur Eichung	0,115	0,090	0,094

Eine Zusammenfassung über die Proteingehalte im Einzelnen liefern Tab. 11 und Tab. 12, eine graphische Übersicht bieten Abb. 83 und Abb. 84.

**Tab. 11**  
**Proteinkonzentrationen in den Fraktionen der Tabakpflanzen aus der F<sub>0</sub>-Generation in mg/l**  
Diesen Daten liegt eine Proteinbestimmung nach Bradford zu Grunde.  
In der ersten Fraktion von Tabak 6 und der vierten Fraktion von Tabak 11 war kein Ausgangsmaterial für eine Bestimmung vorhanden.

Tabak- pflanze	Fraktion														
	50 mM Imidazol pH 8,0			100 mM Imidazol pH 8,0			200 mM Imidazol pH 8,0			400 mM Imidazol pH 8,0			500 mM Imidazol pH 6,0		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	156,4	219,5	81,7	79,2	68,4	37,8	18,1	47,0	1,4	42,8	25,3	24,5	24,5	5,3	5,3
2	118,1	144,8	95,9	46,2	23,4	28,1	29,2	29,2	28,4	26,2	27,0	27,6	26,2	13,1	8,4
3	31,2	78,4	48,1	26,2	20,3	6,7	3,4	22,6	12,0	12,8	15,6	15,1	13,1	9,2	6,7
4	178,7	205,6	120,9	43,4	18,7	10,1	21,2	25,9	15,1	22,0	20,3	22,3	30,6	31,7	14,8
5	45,1	75,6	22,6	17,0	16,2	8,7	10,9	11,7	12,6	10,3	13,9	13,9	11,2	5,3	0
6	-	103,4	54,2	31,2	34,2	8,4	15,3	15,1	12,3	12,8	14,2	15,1	14,5	6,4	7,6
7	38,9	65,9	48,1	17,6	19,8	13,7	27,8	25,1	10,1	19,2	14,5	47,6	1,4	2,6	0,9
8	90,3	88,4	25,6	35,1	17,3	10,3	12,0	13,4	11,7	6,4	15,3	10,9	0	12,6	21,7
9	8,7	10,1	2,3	1,4	8,9	5,1	9,2	19,2	0	9,5	9,8	0	11,4	10,6	3,7
10	115,6	101,2	67,3	41,4	41,4	25,3	29,2	20,9	20,1	20,1	23,4	17,8	17,0	8,7	7,6
11	205,1	210,3	110,3	-	47,0	29,8	29,2	26,2	18,4	25,3	23,7	23,4	20,1	10,9	4,8
12	32,6	59,8	45,6	22,0	33,1	24,5	15,1	19,8	16,2	10,6	13,9	10,3	9,2	7,6	8,1
13	140,1	173,9	126,7	109,8	87,3	70,3	44,8	36,4	33,4	23,9	23,9	9,5	11,7	8,4	7,6
14	97,0	80,9	44,8	37,0	24,2	24,8	28,4	17,0	14,8	17,8	15,6	16,2	12,6	6,2	4,8
15	72,6	143,9	89,2	66,4	43,1	43,9	15,6	19,8	23,4	16,4	14,5	22,3	17,3	8,1	8,1
16	56,4	98,9	29,2	20,6	13,9	13,1	8,9	13,7	7,6	9,8	8,7	19,8	12,3	8,9	5,9
17	67,8	37,3	22,0	18,9	17,0	10,6	12,6	8,7	23,4	12,3	11,2	11,7	11,7	6,2	5,1
0	149,8	142,6	73,1	98,4	93,9	59,8	81,4	61,7	64,2	85,9	57,0	47,3	36,4	34,8	33,9

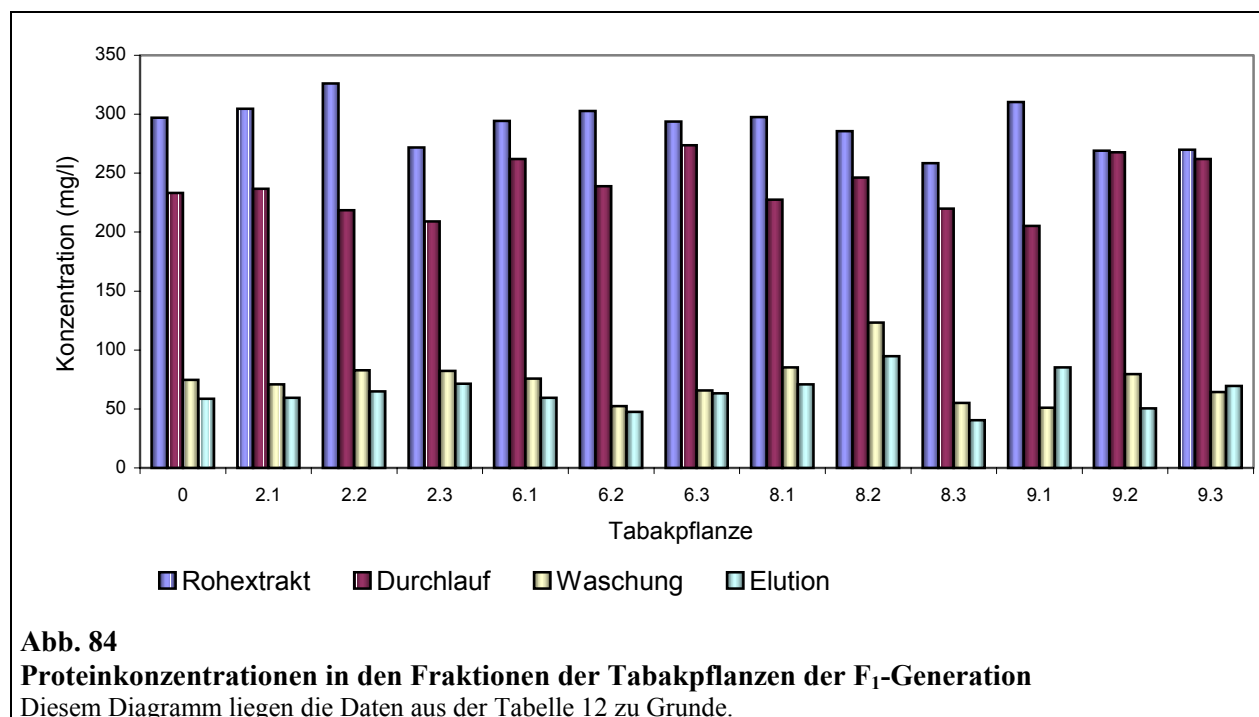


**Abb. 83**  
**Proteinkonzentrationen in den fraktionierten Eluaten der Tabakpflanzen der F<sub>0</sub>-Generation**  
 Diesen Diagrammen liegen die Daten aus der Tabelle 11 zu Grunde.

**Tab. 12**  
**Proteinkonzentrationen in den Fraktionen der Tabakpflanzen aus der F<sub>1</sub>-Generation in mg/l**

Diesen Daten liegt eine Konzentrationsbestimmung nach Bradford zu Grunde.

Fraktion			
Rohextrakt	Durchlauf	Washung	Elution
297,1	233,3	74,8	58,6
304,8	236,7	71,0	59,5
326,2	218,6	82,9	64,8
271,9	209,0	82,4	71,4
294,3	261,9	75,7	59,5
302,9	239,0	52,4	47,6
293,8	273,8	65,7	63,3
297,6	227,6	85,2	71,0
285,7	246,2	123,3	94,8
258,6	220,0	55,2	40,5
310,5	158,6	51,0	85,2
269,0	205,2	79,5	50,5
270,0	267,6	64,3	69,5



In den Eluatzen der F<sub>0</sub>-Generation lagen die Proteinkonzentrationen in den zu Beginn von der Säule eluierten Fraktionen (1 - 3) weit höher als in den späteren (4 - 15). Bei der Tabakpflanze 9 konnte ein vergleichsweise nur sehr geringer Proteingehalt nachgewiesen werden. Hier hatte offensichtlich die Isolation der Proteine oder die Bindung derselben an die Ni-NTA-Säule nicht funktioniert (siehe 4.6.1). Die Konzentrationen in den übrigen Pflanzen zeigten in den Fraktionen 1 - 3 je nach Tabakpflanze sehr unterschiedliche Werte (siehe 4.6.1) und differierten zwischen 22,0 mg/l und 219,5 mg/l (siehe Tab. 11). In den Fraktionen 4 - 15 waren die Unterschiede nicht mehr so gravierend. Die Konzentrationen überstiegen nur selten 50 mg/l (Pflanzen 1, 13, 15, 0). Ein Großteil der an die Säule gebundenen Proteine wurde also bereits durch Imidazol in einer eher geringen Konzentration (50 mM) von der Säule eluiert (siehe 4.6.1).

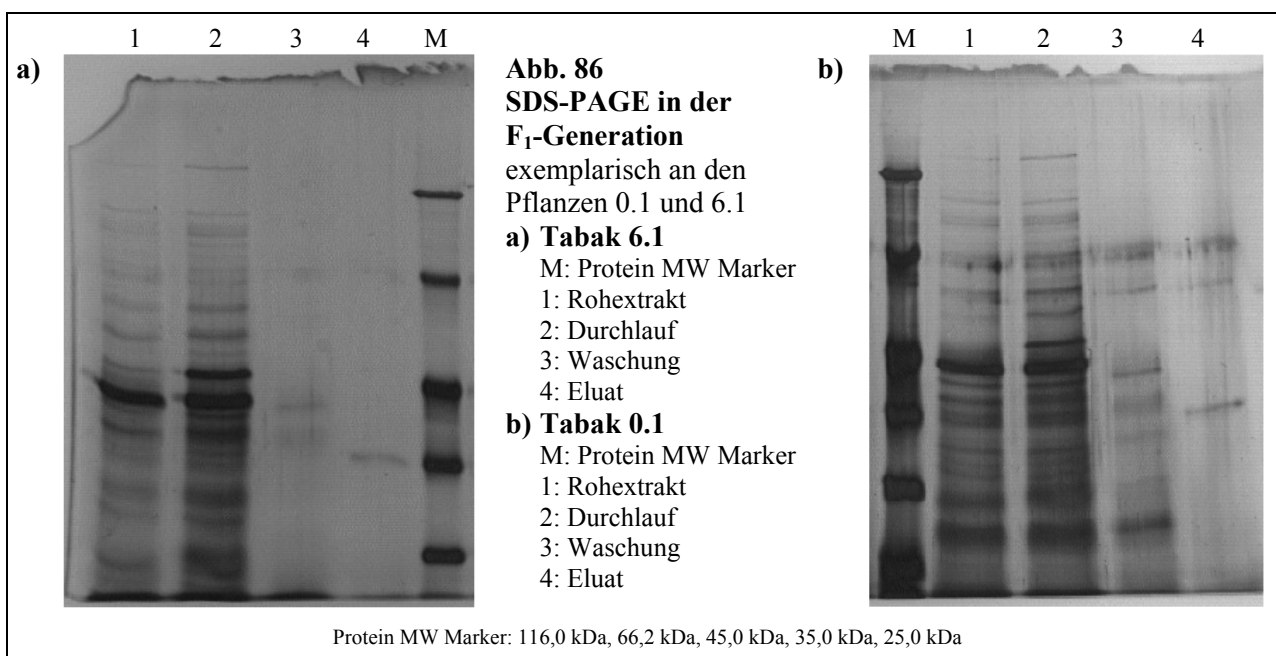
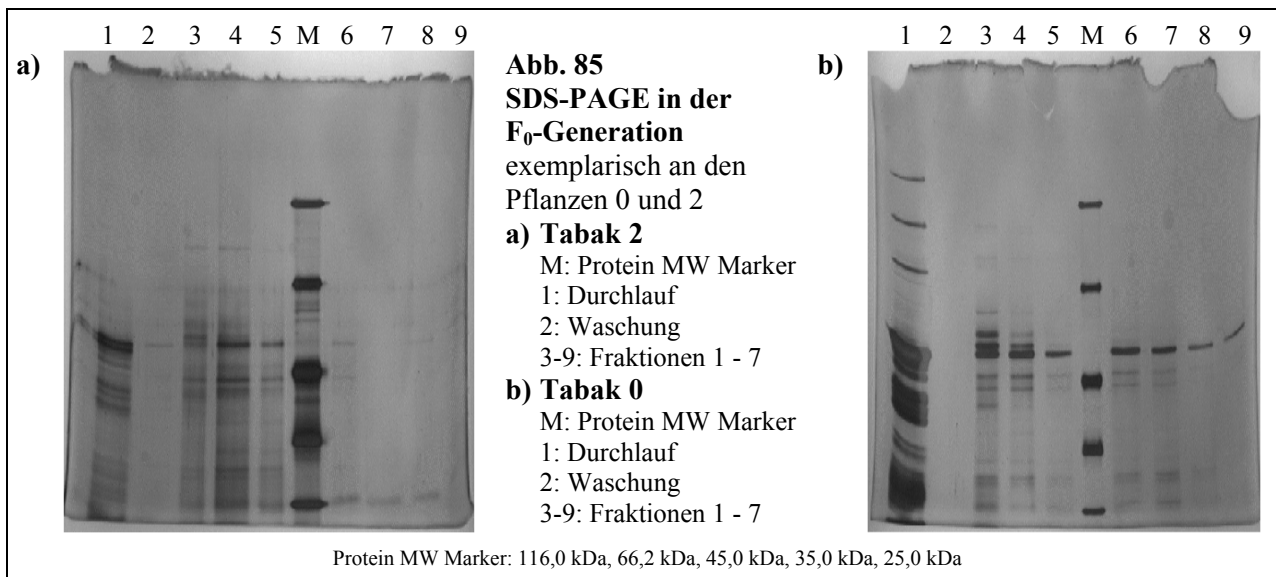


In der F<sub>1</sub>-Generation zeigten die Proteinausbeuten in allen bearbeiteten Pflanzen keine so immensen Abweichungen untereinander wie in der F<sub>0</sub>-Generation. In den Rohextrakten wurden Konzentrationen im Bereich von 270,0 mg/l - 326,2 mg/l erreicht. Die Konzentrationen im Durchlauf variierten zwischen 158,6 mg/l und 273,8 mg/l, die in der Waschung zwischen 51,0 mg/l und 123,3 mg/l. In der Elution schließlich wurden Konzentrationen von 40,5 mg/l - 84,8 mg/l erreicht. Diese lagen somit in ähnlichen Konzentrationsbereichen wie in den Fraktionen 4 - 15 der F<sub>0</sub>-Generation.

Da in den unbehandelten Tabakpflanzen kein Immuntoxin vorlag, mussten dort alle eluierten Proteine auf Wechselwirkungen der Matrix mit anderen pflanzlichen Proteinen zurückgeführt werden. Entsprechende Proteine kamen mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in den Extrakten der transgenen Pflanzen vor. So wurde mit vergleichsweise geringen Proteinkonzentrationen in den Eluatn der Kontrollpflanzen gerechnet. In der F<sub>0</sub>-Generation lagen die Proteinkonzentrationen in den Eluatn des Tabaks 0 mit 149,8 mg/l in Fraktion 1 jedoch vergleichsweise hoch (siehe Tab. 11), in der F<sub>1</sub>-Generation zeigte sich hier ein durchschnittlicher Wert von 58,6 mg/l (siehe Tab. 12). Dies waren erste Indizien für eine äußerst geringe Konzentration des Immuntoxins in den Proteinextrakten der transgenen Pflanzen (siehe 4.6.1).

### 3.3.4.2 SDS-PAGE

Das produzierte Immuntoxin hat eine Größe von etwa 45 kDa. In einer SDS-PAGE (siehe 2.5.5) wurden die Proteine der einzelnen Fraktionen aufgetrennt und auf ein Protein dieser Größe überprüft. Nach einer Silberfärbung der Gele (siehe 2.5.6) konnten in den Rohextrakten der F<sub>1</sub>-Generation und in den Durchläufen der F<sub>0</sub>- und der F<sub>1</sub>-Generation viele verschiedene Proteine detektiert werden (siehe Abb. 85 und Abb. 86). In der F<sub>0</sub>-Generation waren im Waschpuffer der Aufreinigung kaum Proteine zu finden (siehe Abb. 85), wohingegen in der F<sub>1</sub>-Generation diverse Proteine zu finden waren, hauptsächlich jedoch eines der Größe von etwa 42 kDa (siehe Abb. 86). In der F<sub>0</sub>-Generation konnte schließlich in den Elutionen die allmähliche Aufreinigung eines Proteins festgestellt werden. Dieses hatte eine Größe von etwa 50 kDa. Aber auch Proteine in anderen Größen waren zu finden (siehe Abb. 85). Unter anderem konnte eine schwache Bande im Bereich von 45 kDa festgestellt werden, welche dem Zielprotein entsprechen könnte. In der F<sub>1</sub>-Generation fand sich im Eluat hauptsächlich ein Protein in der Größe von 35 kDa (siehe Abb. 86). Sowohl in der F<sub>0</sub>- als auch in der F<sub>1</sub>-Generation zeigten sich jedoch Banden der gleichen Größen auch in den Fraktionen der nicht transgenen Tabakpflanzen 0 (siehe Abb. 85 und Abb. 86). Dies konnte als weiteres Zeichen für eine äußerst geringe Konzentration des Immuntoxins in den Eluatn gewertet werden (siehe 4.6.1).

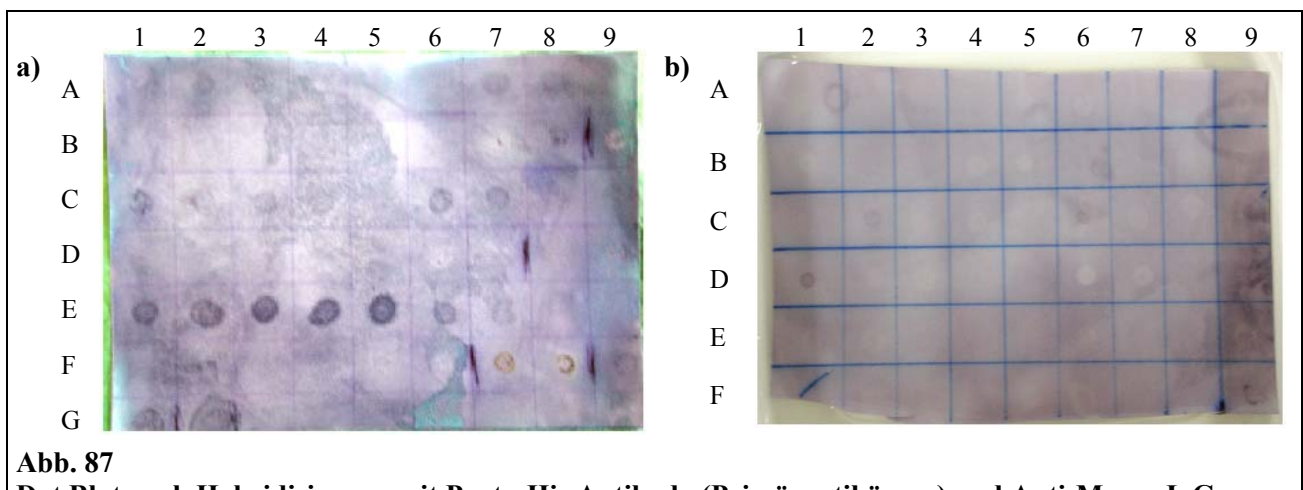


### 3.3.4.3 Blots

Auch wenn von keiner hohen Konzentration des Immuntoxins auszugehen war (siehe 3.3.4.1 - 3.3.4.2), wurde die Existenz des Zielproteins in den einzelnen Fraktionen mit verschiedenen Blots überprüft. Wie bereits zur Aufreinigung wurde sich auch hier das His<sub>6</sub>-Tag des Immuntoxins zu Nutze gemacht. Mit den einzelnen Fraktionen wurde ein Dot Blot durchgeführt (siehe 2.5.7). Als Positivkontrolle fungierten in der F<sub>0</sub>-Generation 2 µl der 6xHis Protein Ladder und in der F<sub>1</sub>-Generation 2 µl E-Gb-H22.

In der F<sub>0</sub>-Generation konnte jedoch nach Hybridisierung (siehe 2.5.10) und Färbung (siehe 2.5.11) außer in der Positivkontrolle kein Signal generiert werden. Auch dies unterstützte die Annahme, dass keine hohen Konzentrationen an Immuntoxin in den Proben vorlagen (siehe 3.3.4.1 und 3.3.4.2). So wurden je 500 µl der Fraktionen gefällt (siehe 2.5.4) und die gesamte gefällte

Proteinmenge erneut zum Dot Blot aufgetragen. Hier konnten nach einer Hybridisierung (siehe 2.5.10) und anschließender Färbung (siehe 2.5.11) Signale in Fraktionen von 13 Tabakpflanzen (Pflanzen 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17) beobachtet werden. Die Eluate der Pflanzen 6 und 13 konnten aufgrund Materialmangels nicht untersucht werden (siehe 4.6.1). Es zeigte sich, dass nicht nur in den Pflanzen mit nachweislicher Transkription (siehe 3.3.3.2), sondern auch in anderen Pflanzen eine Färbung detektiert werden konnte. In der nicht transgenen Tabakpflanze (0) konnte wie erwartet keine Färbung beobachtet werden. Die Signale im Dot Blot lagen typischerweise in den vorderen Elutionsfraktionen. Der Grad der Färbung variierte in den Pflanzen (siehe 4.6.1). Die intensivste Färbung zeigten die Fraktionen 3 - 7 des Tabaks 14 (siehe Abb. 87). In der F<sub>1</sub>-Generation konnten neben der Positivkontrolle auch Signale in den Eluaten der drei untersuchten Pflanzen der Linie 6 detektiert werden (siehe Abb. 87). In allen übrigen Fraktionen und in den zugehörigen Rohextrakten der drei Pflanzen aus Linie 6, konnte keine Färbung nachgewiesen werden (siehe 4.6.1).



**Abb. 87**

**Dot Blot nach Hybridisierung mit Penta-His Antibody (Primärantikörper) und Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase Conjugate (Sekundärantikörper) und anschließender Färbung mit NBT / BCIP**

**a) Extrakte der F<sub>0</sub>-Generation (Ausschnitt)**

A1 - B8: Tabak 8; Eluate 1 - 15, Durchlauf, Waschung  
 B9 - D7: Tabak 10; Eluate 1 - 15, Durchlauf, Waschung  
 D8 - F6: Tabak 14; Eluate 1 - 15, Durchlauf, Waschung  
 F7 - F8: Tabak 1, Eluate 2 und 4  
 F9 - G1: Tabak 15, Eluate 2 und 4  
 G2: Positivkontrolle: 6xHis Protein Ladder

**b) Extrakte der F<sub>1</sub>-Generation**

Die Fraktionen sind je in der Reihenfolge Rohextrakt, Durchlauf, Waschung, Eluat aufgetragen.

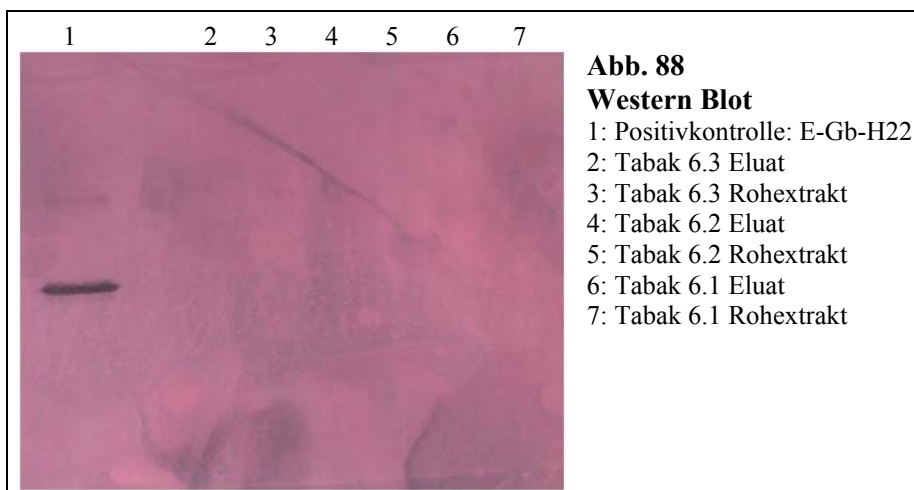
A1 - A4: Tabak 0	A5 - A8: Tabak 2.1
A9 - B3: Tabak 2.2	B4 - B7: Tabak 2.3
B8 - C2: Tabak 6.1	C3 - C6: Tabak 6.2
C7 - D1: Tabak 6.3	D2 - D5: Tabak 8.1
D6 - D9: Tabak 8.2	E1 - E4: Tabak 8.3
E5 - E8: Tabak 9.1	
E9 - F4 (F1 nicht besetzt): Tabak 9.2	
F5 - F8: Tabak 9.3	
F9: Positivkontrolle: E-Gb-H22	

Um eine Signalgenierung durch unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper ausschließen zu können, wurden neben den Dot Blots auch Western Blots (siehe 2.5.8) durchgeführt. Hier sollte die Größe des signalgebenden Fragments ersichtlich werden.

Zur Durchführung wurden in der F<sub>0</sub>-Generation je Pflanze die verbliebenen Mengen der ersten vier Fraktionen zusammengeführt und die Proteine gefällt (siehe 2.5.4). Nun folgte eine Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (siehe 2.5.5). Diese lieferte allerdings keine prägnanten Banden

(siehe 4.6.1). Da das letzte vorhandene relevante Material der F<sub>0</sub>-Generation hier verbraucht worden war, konnte ein Western Blot für diese nicht mehr durchgeführt werden.

In der F<sub>1</sub>-Generation wurden die Eluate der Pflanzen der Linie 6, die im Dot Blot ein Signal ergeben hatten (siehe Abb. 87), und die zugehörigen Rohextrakte weiter untersucht. Diese wurden mittels SDS-PAGE (siehe 2.5.5) aufgetrennt. Durch eine Färbung mit Ponceau S (siehe 2.5.9) konnte eine gute Auftrennung und ein guter Transfer der Proteine auf die Membran nachgewiesen werden. Nach der Hybridisierung (siehe 2.5.10) und der Färbung (siehe 2.5.11) konnten mit Ausnahme der Positivkontrolle keine Banden festgestellt werden (siehe Abb. 88). So konnte auf einen Abbau des im Dot Blot signalgebenden Proteins geschlossen werden (siehe 4.6.1).



Die Existenz des Zielproteins war durch die positiven Signale im Dot Blot in einigen Pflanzen sehr wahrscheinlich. Die Konzentrationen waren offensichtlich sehr gering. In der F<sub>0</sub>-Generation war nach der Konzentrierung durch die Ni-NTA-Matrix noch eine Konzentrierung durch Fällen nötig gewesen, um positive Signale generieren zu können. Leider konnten diese Signale nicht einem Protein bestimmter Größe zugeordnet werden. Der Versuch eines Western Blots mit dem konzentrierten Material der F<sub>0</sub>-Generation schlug fehl. In der F<sub>1</sub>-Generation konnte ein Western Blot erfolgreich durchgeführt werden. Hier zeigten sich jedoch mit Ausnahme der Positivkontrolle keinerlei Signale, was auf ein instabiles Protein schließen ließ (siehe 4.6.1).

### 3.3.5 Übersicht über die Ergebnisse aus *Nicotiana tabacum*

In verschiedenen Tabakpflanzen konnte das Immuntoxigen auf DNA-Ebene und mRNA-Ebene nachgewiesen werden (siehe 3.3.3). Auch war durch Dot Blots ein Nachweis des Immuntoxins auf Protein-Ebene möglich (siehe 3.3.4). So konnten weitere wichtige Ziele dieser Arbeit (siehe 1.5.) erreicht werden. Eine übersichtliche Auflistung der getesteten Pflanzen und der erhaltenen Ergebnisse bietet Tab. 13.

**Tab. 13****Zusammenfassung der Ergebnisse aus Tabak**

+: Nachweis war möglich    -: Nachweis war nicht möglich    ?: kein eindeutiges Ergebnis  
In der F<sub>1</sub>-Generation ist in Klammern die Häufigkeit des jeweiligen Ergebnisses angegeben.

F <sub>0</sub> -Generation				F <sub>1</sub> -Generation			
	DNA	mRNA	Protein		DNA	mRNA	Protein
Pflanze 1	+	-	-	Pflanzen Linie 1	+ (2 x)	-	?
Pflanze 2	+	+	+	Pflanzen Linie 2	+ (5 x)	- (3 x)	- (3 x)
Pflanze 3	-	-	+	Pflanzen Linie 3	+ (2 x)	-	?
Pflanze 4	-	-	-	Pflanzen Linie 4	+ (2 x)	-	?
Pflanze 5	+	-	+	Pflanzen Linie 5	+ (2 x)	+ (1 x); - (1 x)	?
Pflanze 6	+	+	?	Pflanzen Linie 6	- (5 x)	+ (5 x)	+ (3 x)
Pflanze 7	+	-	+	Pflanzen Linie 7	+ (2 x)	+ (2 x)	?
Pflanze 8	+	+	+	Pflanzen Linie 8	+ (5 x)	- (4 x)	- (3 x)
Pflanze 9	+	+	+	Pflanzen Linie 9	+ (5 x)	+ (1 x); - (1 x)	- (3 x)
Pflanze 10	+	-	+	Pflanzen Linie 10	+ (2 x)	-	?
Pflanze 11	-	-	+	Pflanzen Linie 11	+ (2 x)	-	?
Pflanze 12	+	-	+	Pflanzen Linie 12	+ (1 x); - (1 x)	-	?
Pflanze 13	+	-	?	Pflanzen Linie 13	+ (2 x)	-	?
Pflanze 14	+	?	+	Pflanzen Linie 14	+ (2 x)	-	?
Pflanze 15	-	?	+	Pflanzen Linie 15	+ (1 x); - (1 x)	-	?
Pflanze 16	+	?	+	Pflanzen Linie 16	+ (2 x)	+ (2 x)	?
Pflanze 17	+	-	+	Pflanzen Linie 17	+ (2 x)	-	?
Pflanze 0	-	-	-	Pflanze Linie 0	-	-	-

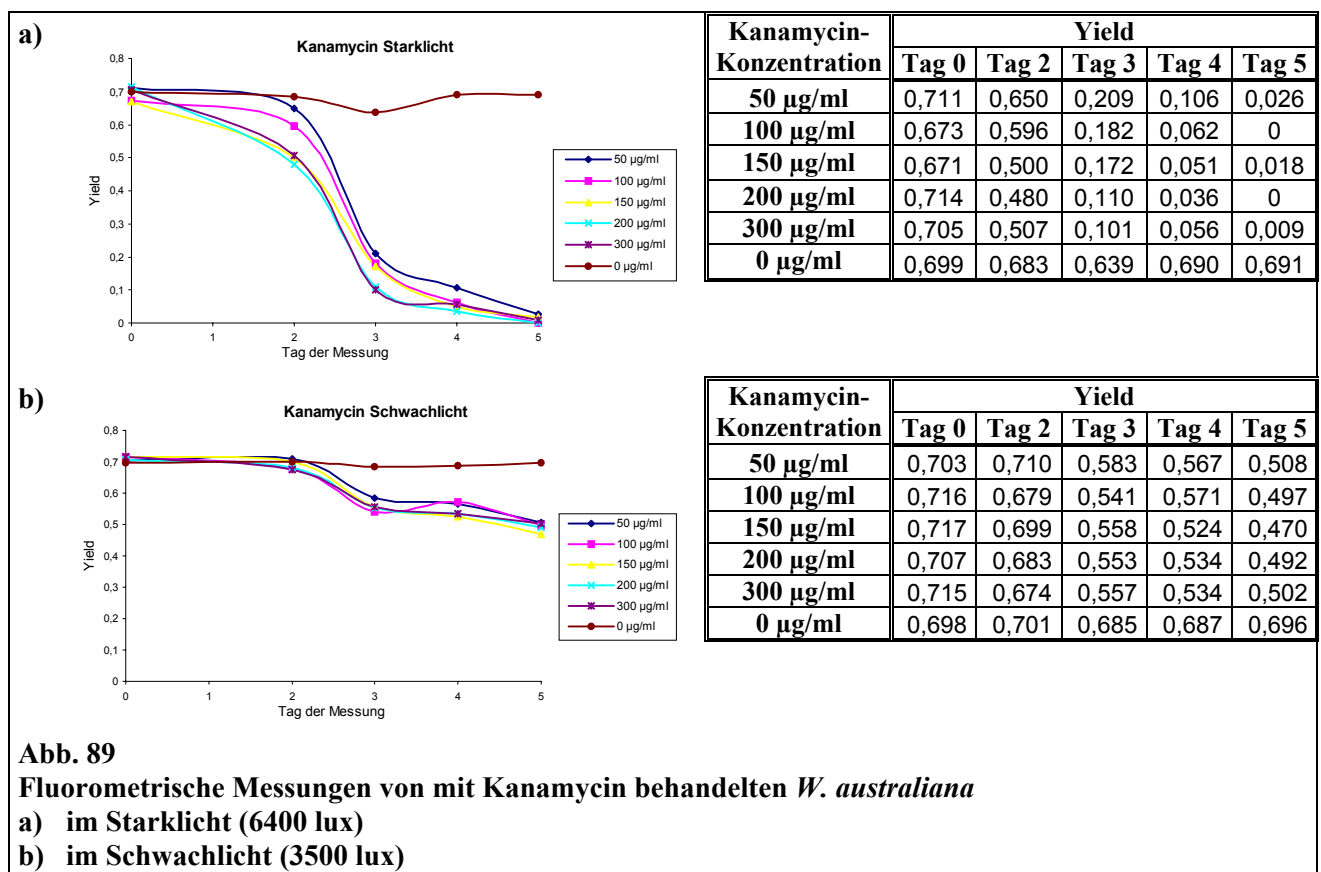
### 3.4 Herstellung und Nachweis transgener *Wolffia spec.*

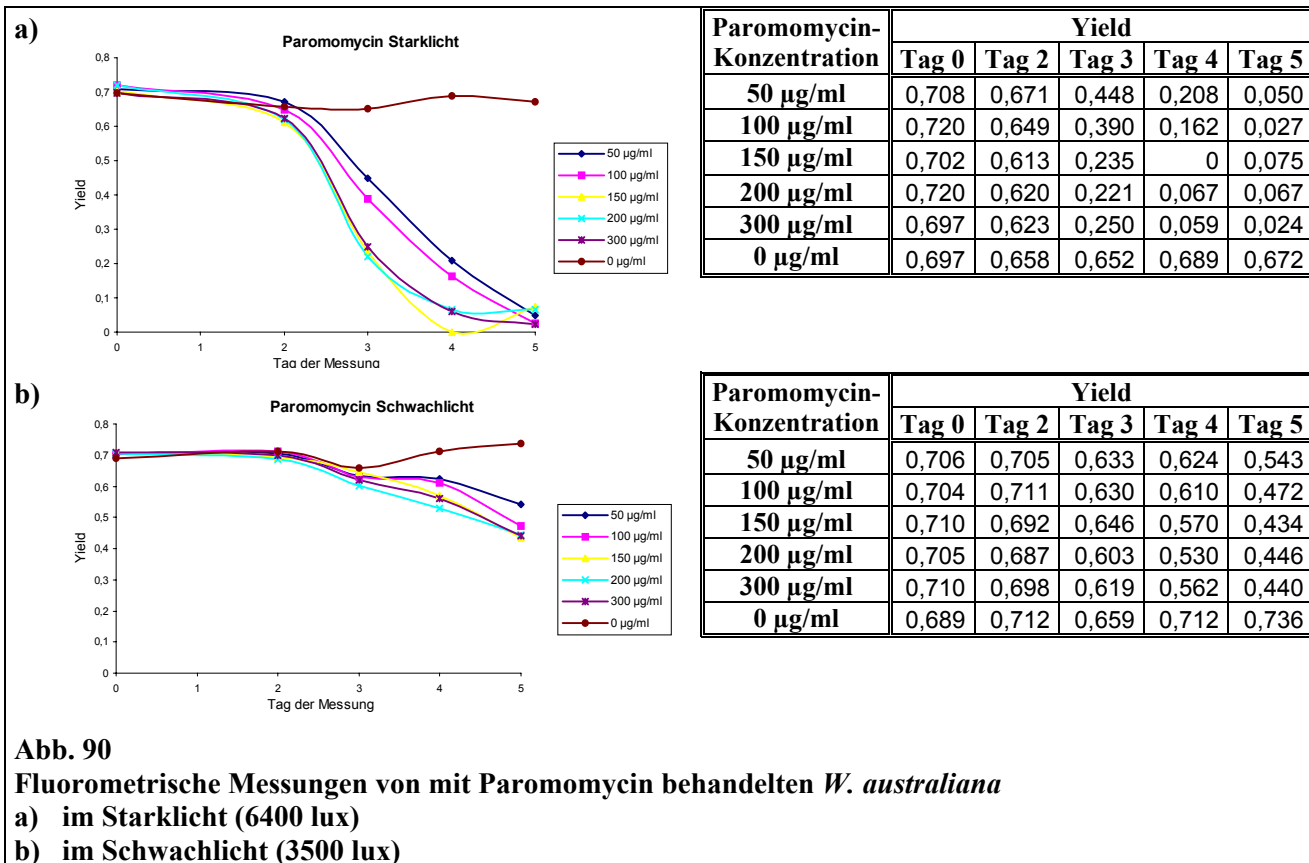
Neben der Transformation von *N. tabacum* wurden auch die Zwerglinsen *W. australiana* und *W. brasiliensis* (siehe 1.4.4.2) transformiert. Hier mussten geeignete Transformationsprotokolle gefunden werden (siehe 3.4.2). Des Weiteren war es nötig, ein Selektionsprotokoll für das Resistenzgen *nptII* in transgenen Zwerglinsen zu etablieren (siehe 3.4.1).

### 3.4.1 Erstellung eines Selektionsprotokolls

Durch eine Transformation mit den erstellten *A. tumefaciens*, die das Plasmid pPAMSARK trugen (siehe 3.2), wurde das Gen *nptII* übertragen. Dieses vermittelte eine Resistenz gegen verschiedene Antibiotika wie Kanamycin, G-418 und Paromomycin. Im Folgenden wurde ihre Wirkung auf *W. australiana* getestet. Sie wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Abb. 82 - Abb. 84) einer vitalen Kultur von *W. australiana* zugesetzt. Als Kontrolle wurden stets auch Pflanzen ohne Zusatz von Antibiotika unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

Die Pflanzen wurden in Sechs-Well-Platten in je 10 ml SH-Medium gehalten (siehe 2.2.2.2). Da bei Verwendung von Kanamycin ein Einfluss der Beleuchtungsstärke auf das Verhalten von *W. columbiana* bekannt war (Friedrich, 2005), wurden auch hier bei *W. australiana* die Versuche mit zwei unterschiedlichen Beleuchtungsstärken (3500 lux, 6400 lux) durchgeführt. Auch für die Versuche mit den Antibiotika Paromomycin und G-418 wurden diese beiden Beleuchtungsstärken gewählt. Die Vitalität der Pflanzen wurde durch fluorometrische Messungen (siehe 2.2.2.2) über fünf Tage dokumentiert. Die einzelnen Messergebnisse wurden graphisch aufgetragen und zur besseren Anschaulichkeit miteinander verbunden (siehe Abb. 89 - Abb. 91).



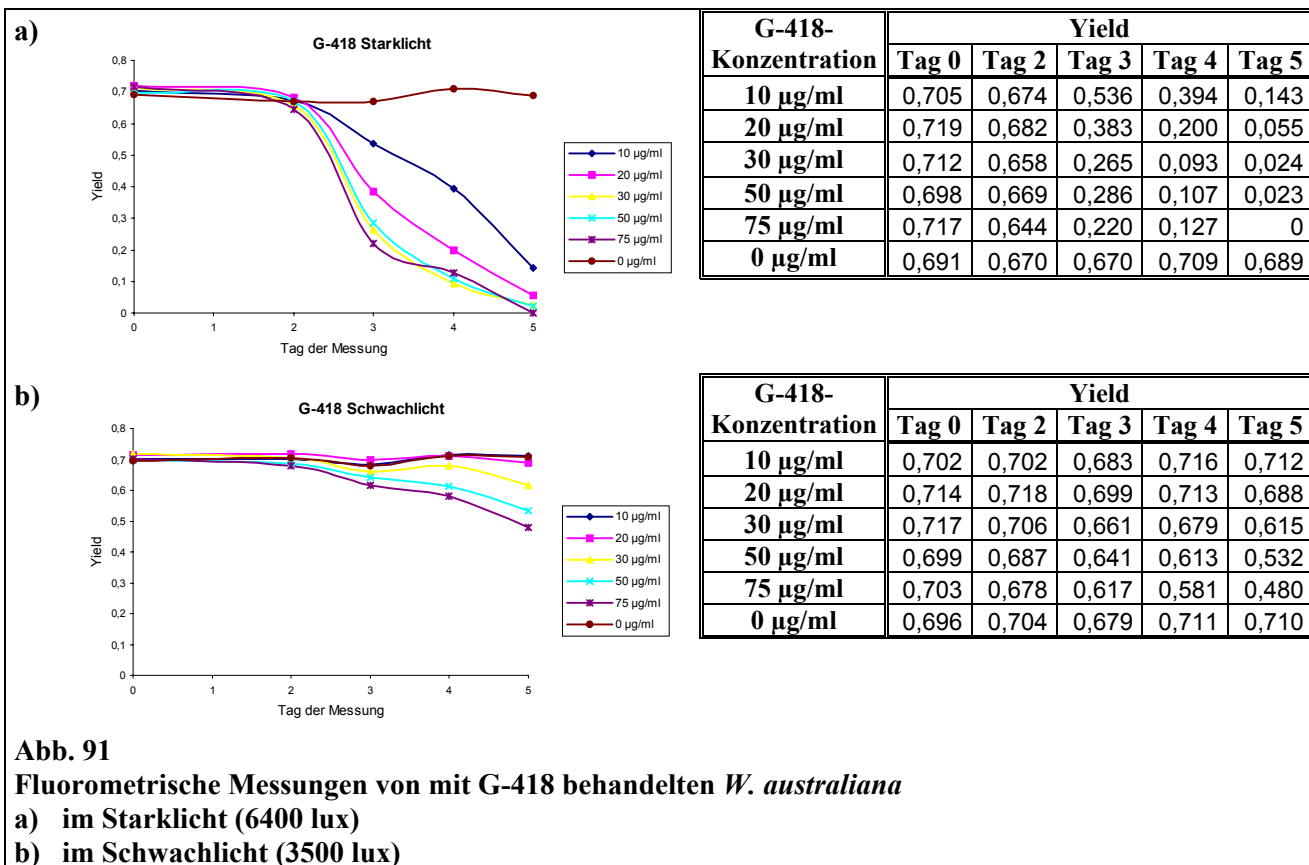


**Abb. 90**

Fluorometrische Messungen von mit Paromomycin behandelten *W. australiana*

a) im Starklicht (6400 lux)

b) im Schwachlicht (3500 lux)



**Abb. 91**

Fluorometrische Messungen von mit G-418 behandelten *W. australiana*

a) im Starklicht (6400 lux)

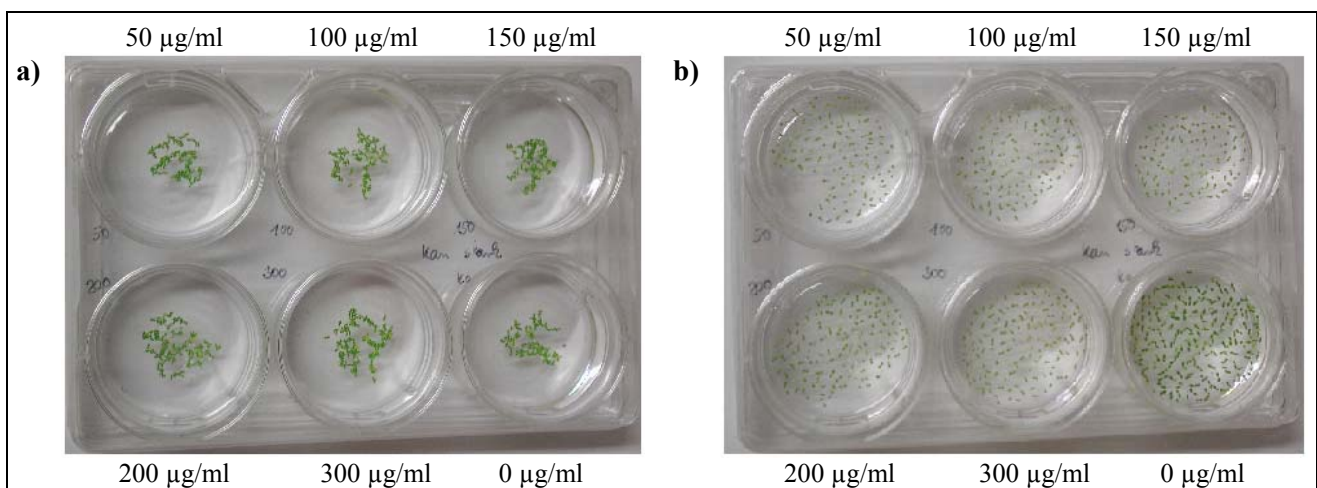
b) im Schwachlicht (3500 lux)

Die Daten zeigen deutlich, dass bei Verwendung der drei Antibiotika Kanamycin, Paromomycin und G-418 die Beleuchtungsstärke großen Einfluss auf die Vitalität der Pflanzen hatte. Im Starklicht war bei allen untersuchten Antibiotika ein baldiger Rückgang der Vitalität zu

verzeichnen, während im Schwachlicht wesentlich geringere Auswirkungen zu beobachten waren. Die Kontrollpflanzen ohne Zugabe von Antibiotika blieben in jedem Fall vital und zeigten keine nennenswerten Änderungen in ihrem Yield (siehe Abb. 89 - Abb. 91). So war eine Kultivierung unter Starklicht zur Selektion transgener Pflanzen geeignet.

Vergleicht man die gewählten Konzentrationen der Antibiotika miteinander, so unterscheiden sie sich in der Steigung der Graphen. In den Ansätzen mit höheren Antibiotikakonzentrationen wurde ein schnelleres Abfallen des Yield erreicht. Jede gewählte Konzentration reichte jedoch aus, die Pflanzen letal zu schädigen.

Um in einer Selektion transgene von nicht transgenen Pflanzen unterscheiden zu können, musste das Absterben der Pflanzen auch äußerlich nachvollziehbar sein. Bei der Behandlung mit Kanamycin bewahrten die Pflanzen über längere Zeit ihre grüne Farbe und verblassten nur langsam (siehe Abb. 92). So war eine eindeutige Unterscheidung von resistenten und nicht resistenten Pflanzen in einer vertretbaren Zeit nicht möglich. Bei Verwendung der Antibiotika Paromomycin und G-418 zeigte sich jedoch ein besseres Bild, da hier die abgestorbenen Pflanzen bereits wenige Tage nach der Behandlung weiß wurden (siehe Abb. 93 - Abb. 94). Zur Selektion waren folglich Paromomycin und G-418 besser geeignet als Kanamycin (siehe 4.6.2).



**Abb. 92**

**Behandlung von *W. australiana* mit Kanamycin im Starklicht (6400 lux)**

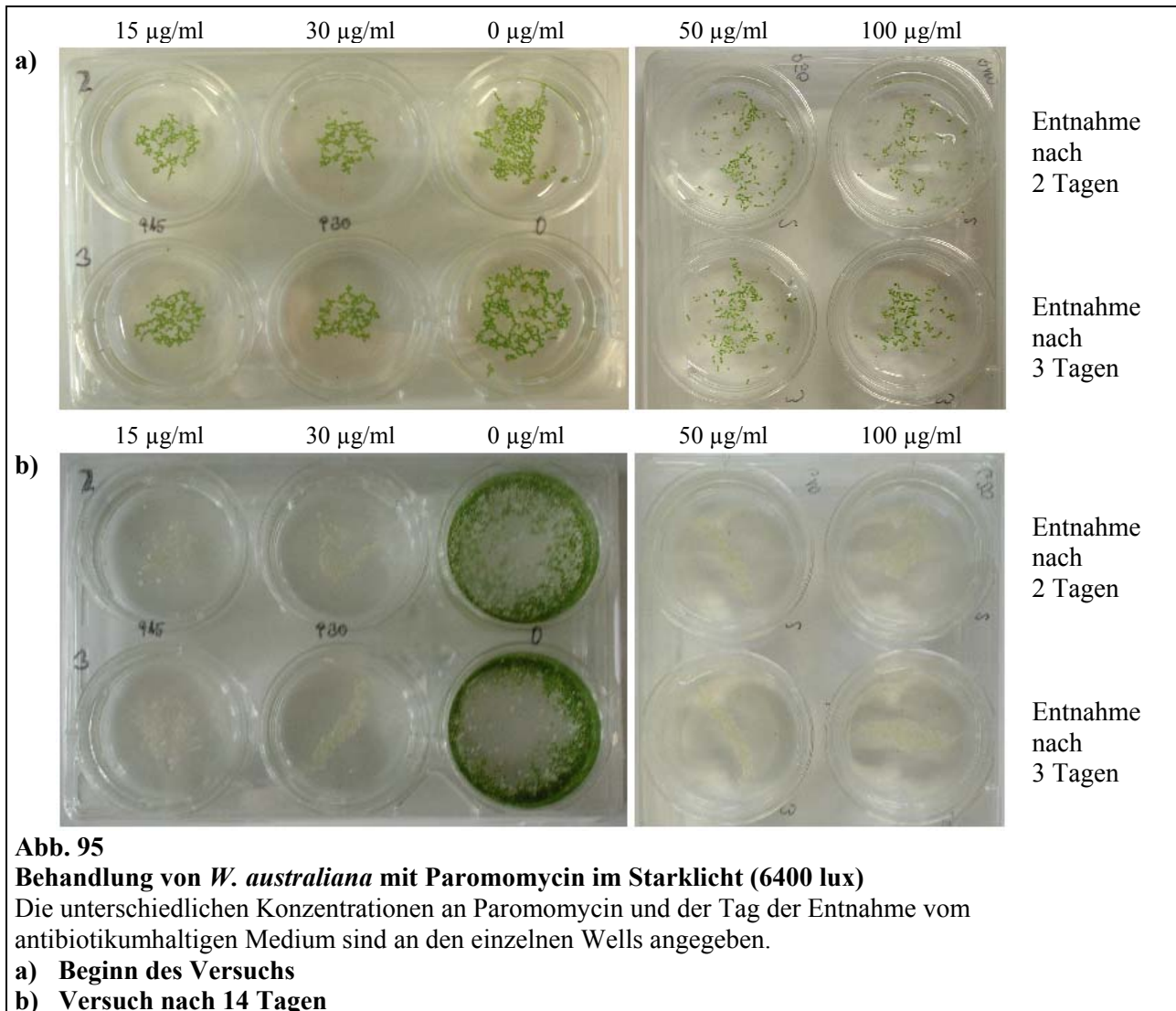
Die unterschiedlichen Konzentrationen an Kanamycin sind an den einzelnen Wells angegeben.

**a) Beginn des Versuchs**

**b) nach acht Tagen**

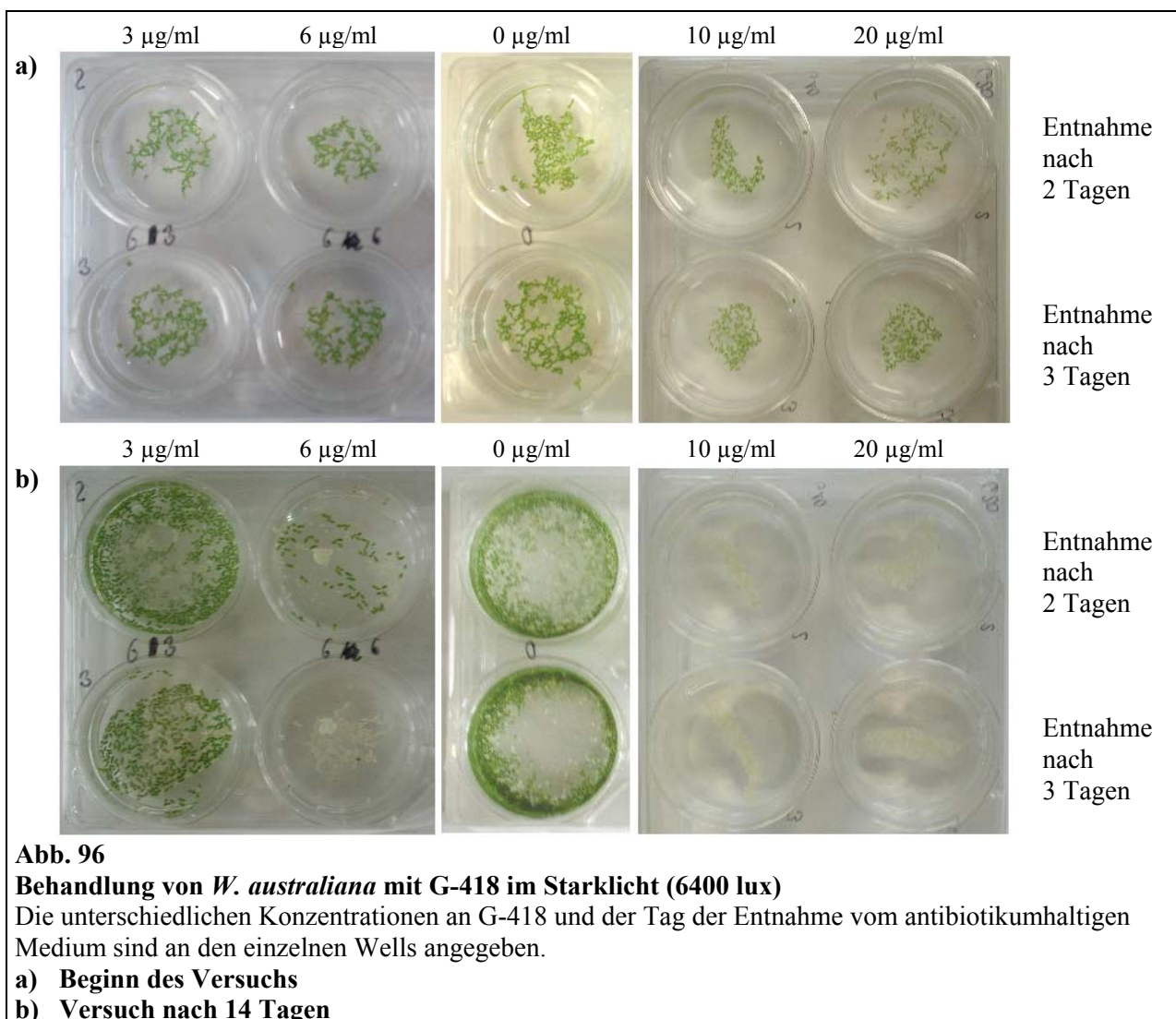






Bei der Verwendung von G-418 wurden Konzentrationen zwischen 3 µg/ml und 20 µg/ml getestet. Wieder wurden die Zwerglinsen im Starklicht gehalten und nach zwei bzw. drei Tagen auf Medium ohne Antibiotikum umgesetzt. Hier zeigten sich unterschiedliche Effekte (siehe Abb. 96). Eine Konzentration von 3 µg/ml und eine Entnahme nach zwei Tagen ließ keinen Einfluss auf die Pflanzen erkennen. Wurden die Zwerglinsen erst nach drei Tagen entnommen, zeigte sich im Vergleich ein etwas geringeres Wachstum, aber auch hier verblieb der Großteil der Pflanzen vital und vegetativ vermehrungsfähig. Bei der Zugabe von 6 µg/ml G-418 ging das Wachstum bei Entnahme am zweiten Tag noch weiter zurück. Außerdem waren nach 14 Tagen etwa die Hälfte aller Pflanzen weiß und abgestorben. Wurden hier die Pflanzen erst am dritten Tag entnommen, blieb ein Wachstum aus und nach 14 Tagen verblieben nur noch zwei grüne Pflanzen im Well. Wurden schließlich Konzentration von 10 µg/ml oder 20 µg/ml verwendet, verblassten sowohl bei einer Entnahme nach zwei Tagen wie auch nach drei Tagen alle Pflanzen.

Auch G-418 war somit für eine Selektion von Zwerglinsen geeignet. Hier hatte eine Grenzkonzentration von 10 µg/ml ermittelt werden können, welche bei einer Entnahme der Pflanzen nach zwei Tagen zum Abtöten der Kultur nötig war. Dies wurde im Weiteren als Richtwert genommen und in folgenden Selektionen (siehe 3.4.2) verwendet.

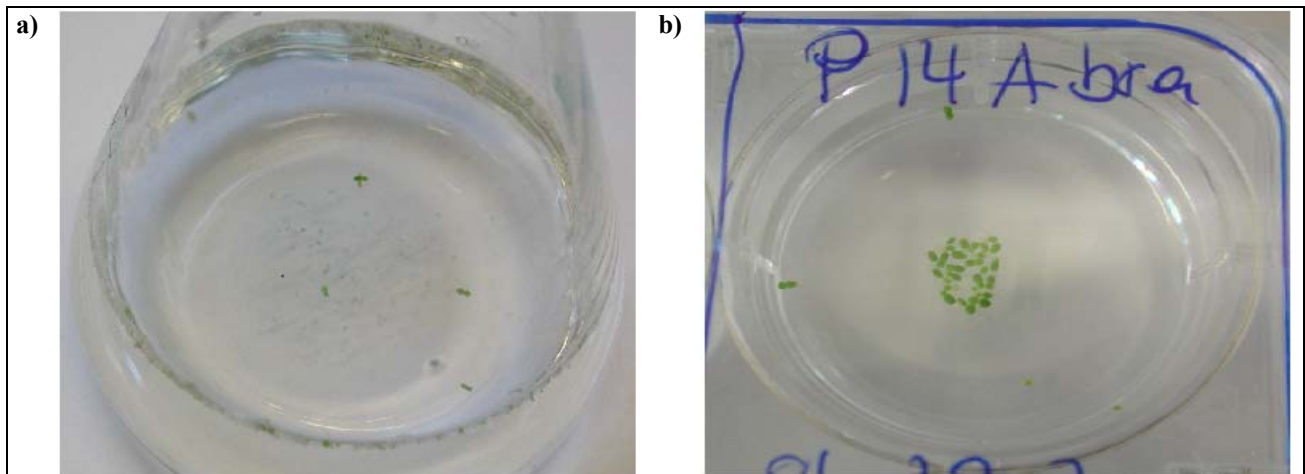


### 3.4.2 Transformationen

#### 3.4.2.1 Transgene *Wolffia brasiliensis* durch Injektion von *Agrobacterium tumefaciens*

In 60 Zwerglinsen der Art *W. brasiliensis* wurden *A. tumefaciens* des Stamms GV3101, die das Plasmid pPAMSARK trugen, injiziert (siehe 2.3.2.1). Diese Pflanzen zeigten in der weiteren Kultivierung (siehe 2.2.2.2) ein vergleichsweise geringes Wachstum. Nach einem Zeitraum von vier Monaten wurden diese Pflanzen in sechs verschiedenen Erlenmeyerkolben einer Selektion unterzogen. Hier wurden die an *W. australiana* ermittelten Daten (siehe 3.4.1) verwendet und die Pflanzen zur Selektion in Medium mit G-418 in einer Konzentration von 10 µg/ml über zwei Tage kultiviert. Anschließend wurden die Pflanzen alle zwei Tage auf frisches Medium ohne Antibiotikum umgesetzt. Bereits nach zehn Tagen war ein Großteil der Pflanzen verblasst, einige wenige unterlagen jedoch keiner Chlorose (siehe Abb. 97). Diese mutmaßlich transgenen

Zwerglinsen wurden aus den Ansätzen isoliert und auf Medium mit kleinerem Volumen weiter kultiviert (siehe 2.2.2.2).



**Abb. 97**

**Selektion**

**a) Kultur vor der Isolation:**

Der Hauptanteil der Zwerglinsen ist weiß und abgestorben, wenige grüne haben überlebt.

**b) Kultur nach der Isolation:**

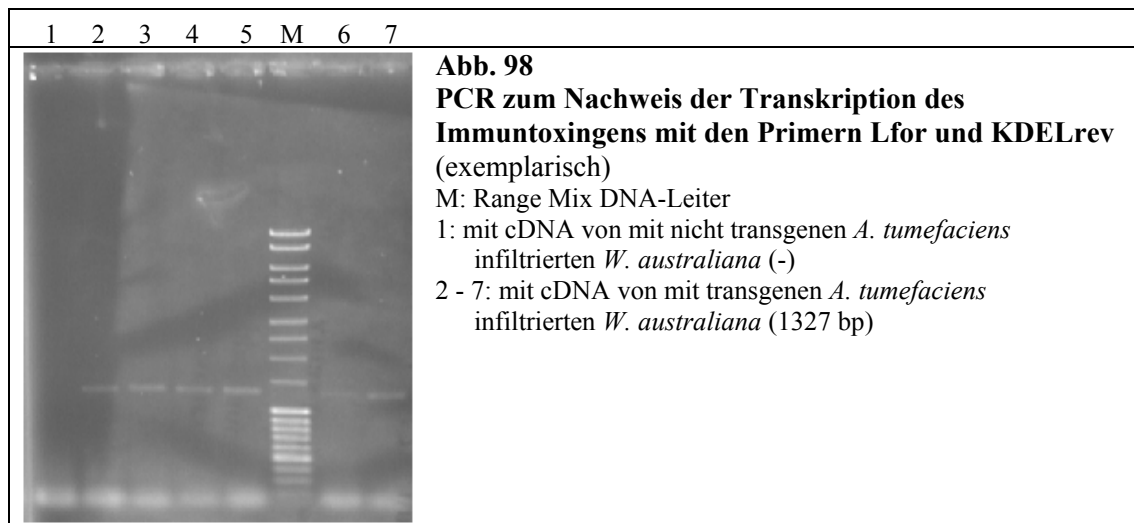
Die vitalen grünen Zwerglinsen wurden in frisches Medium überführt.

Aus je zwei Pflanzen von drei dieser Kulturen wurde nun zum Nachweis einer Expression des Immuntoxins die RNA isoliert (siehe 2.4.2.2). Nach Reverser Transkription (siehe 2.4.4) und anschließender PCR (siehe 2.4.3) mit den Primern Lfor und oligo(dT)18 konnten keine Banden generiert werden. Die übrigen Pflanzen der Kulturen starben nach einiger Zeit ab, so dass der Nachweis der Transkription des Immuntoxins hier trotz zuvor geglückter Selektion ausblieb (siehe 4.6.2).

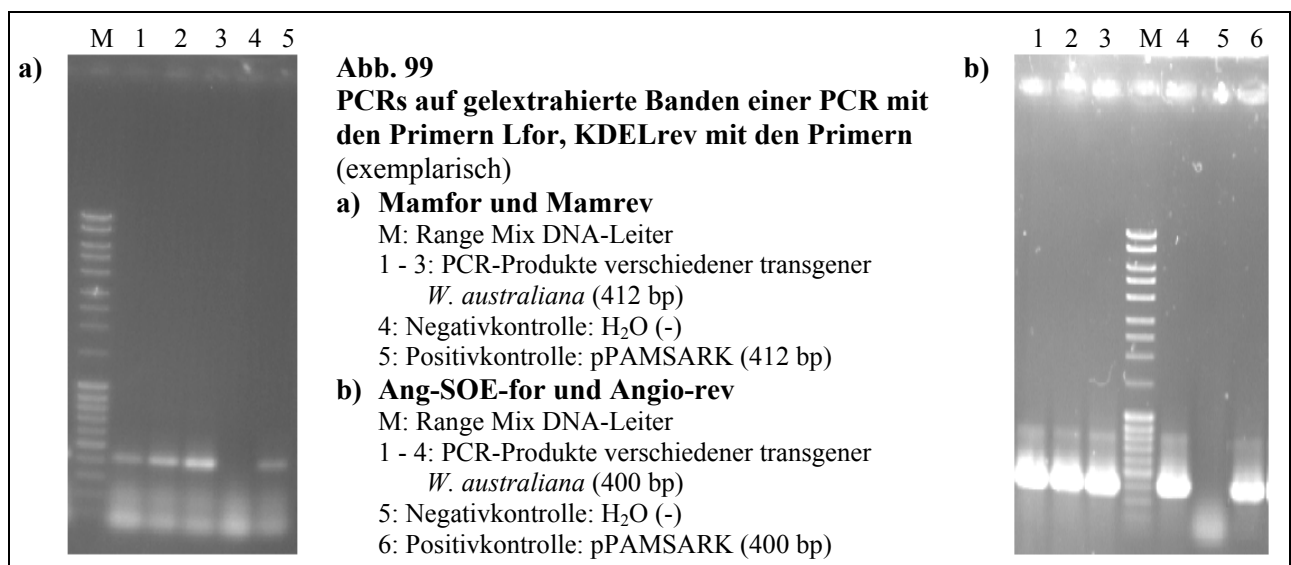
### 3.4.2.2 Transgene *Wolffia australiana* durch Infiltration von *Agrobacterium tumefaciens*

Zwerglinsen der Art *W. australiana* wurden mit *A. tumefaciens* des Stamms GV3101, die das Plasmid pPAMSARK trugen, infiltriert (siehe 2.3.2.2). Kontrollpflanzen wurden zeitgleich mit nicht transgenen *A. tumefaciens* des Stamms GV3101 behandelt. Nach erfolgter Infiltration wurden verschiedene Methoden der Weiterkultivierung getestet. Ein Teil der Pflanzen wurde in SH-Flüssigmedium kultiviert. Ein anderer Teil wurde auf SH-Festmedium mit Zusatz von 20 g/l Saccharose gehalten. Eine dritte Teilmenge wurde nach der Infiltration auf SH-Festmedium mit Zusatz von 200 mM Acetosyringon ausgebracht. Nach 3 d - 5 d wurde aus den Zwerglinsen die RNA isoliert (siehe 2.4.2.2). Nach Reverser Transkription (siehe 2.4.4) mit dem Primer Oligo(dT)18 und PCR (siehe 2.4.3) mit den Primern Lfor und KDELrev konnten Signale bei 1327 bp generiert werden (siehe Abb. 98). Dies gelang jedoch nur bei den Pflanzen, die auf SH-Festmedium mit Zusatz von 200 mM Acetosyringon kultiviert worden waren. Somit sollte dieses Protokoll in weiteren Versuchen verwendet werden. Eine PCR (siehe 2.4.3) mit den Primern

Lfor und KDELrev direkt auf die isolierte RNA lieferte in keinem Fall Banden, so dass eine Kontamination der isolierten RNA mit DNA ausgeschlossen werden konnte (siehe 4.6.2).



Auf diese Weise konnte in acht von neun unabhängigen Infiltrationen die Transkription des Immuntoxingens festgestellt werden. Zum Nachweis, dass die erzeugten Banden nicht nur zufällige Produkte in der richtigen Größe waren, wurden diese aus dem Agarosegel extrahiert (siehe 2.4.11) und als Template für weitere PCRs (siehe 2.4.3) mit den im Immuntoxingen hybridisierenden Primern Mamfor, Mamrev bzw. Ang-SOE-for, Angio-rev verwendet. Hier zeigten sich stets die Banden bei den richtigen Größen von 412 bp bzw. 400 bp (siehe Abb. 99).



Erstmalig wurde ein Nachweis für die Transkription eines Immuntoxingens in *W. australiana* erbracht. So konnte auch das letzte Ziel dieser Arbeit (siehe 1.5) erreicht werden. Dies kann als Grundsteinlegung für das Projektziel, eine Immuntoxinproduktion in Zwerglinsen, gewertet werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Immuntoxine

Obwohl durch den kombinierten Einsatz von Chemotherapie und Strahlentherapie ein Großteil der an Hodgkin Lymphom erkrankten Patienten erfolgreich therapiert werden kann, erleiden 30 % - 50 % der Patienten in fortgeschrittenen Stadien ein Rezidiv und versterben größtenteils an ihrer Erkrankung. Es konnte dokumentiert werden, dass residuelle Tumorzellen die Standardtherapie überleben und die Ursache für diese Rezidive darstellen können (Wolf *et al.*, 1996). Eine spezifische Immuntherapie nach einer Standardtherapie könnte somit eine minimale Resterkrankung erfolgreich eliminieren und dadurch die Chance auf ein tumorfreies Überleben von Patienten mit Hodgkin Lymphom deutlich steigern. So bergen Immuntoxine das Potenzial zur Rettung vieler Menschenleben.

In dieser Arbeit wurden Immuntoxine mit murinen scFv gegen die im Hodgkin Lymphom überexprimierten CD25 und CD30 verwendet. CD25 ist neben den Reed-Sternberg-Zellen des Hodgkin Lymphoms auch in hohen Kopienzahlen bei hämatopoetischen und Autoimmunerkrankungen zu finden (Kreitman & Pastan, 1994a). CD30 ist auch auf einigen Formen des Non-Hodgkin-Lymphoms, embryonalen Karzinomen, malignen Melanomen und mesenchymalen Tumoren in erhöhter Zahl vorhanden (Gruss & Dower, 1995). Auch auf HIV-infizierten T-Helfer-Lymphocyten kann eine Überexpression von CD30 nachgewiesen werden (Romagnani *et al.*, 1996). So bieten die in dieser Arbeit verwendeten Immuntoxine ein breites Anwendungsspektrum, und eine Nutzung in der Therapie weiterer Erkrankungen neben dem Hodgkin Lymphom ist möglich.

Die Verwendung muriner scFv kann jedoch Probleme beinhalten. Durch die Bildung humaner Anti-Maus-Antikörper (HAMA) kann die Applikation resultierender Immuntoxine limitiert sein (siehe 1.2.3). Um jedoch auch Patienten mit gesundem Immunsystem eine erfolgreiche Behandlung mit Immuntoxinen zu ermöglichen, können in einer Vorbehandlung immunsuppressive Agenzien Verwendung finden (Frankel, 2004). Eine weitere Alternative liegt in der Verwendung von Bindedomänen, die aufgrund niedriger Immunogenität in breiter Anwendung über mehrere Zyklen eingesetzt werden könnten.

Humanisierte Antikörper können auf verschiedene Art und Weise hergestellt werden. Murine V-Gene können an humane konstante Immunglobulinregionen fusioniert werden und so chimäre Antikörper bilden (Morrison *et al.*, 1984). Beim CDR-Grafting werden murine komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR) in das Leseraster humaner Immunglobulin-Gene eingefügt (Jones *et al.*, 1986). Auch können Mäuse hergestellt werden, deren endogene HC- und LC-Gene durch menschliche ersetzt wurden (Green *et al.*, 1994). Eine letzte Möglichkeit bildet die Selektion von Bakteriophagen mit humanen Bindungsstrukturen (Marks *et al.*, 1991). Auf diese Weise wurde von dem in dieser Arbeit verwendeten murinen Ki-4(scFv) bereits eine humanisierte Form hergestellt (Klimka *et al.*, 2000). Auch die Verwendung humaner Liganden wie etwa dem CD30-Liganden (CD30L) statt muriner Antikörper kann zur Minimierung einer Immunantwort führen. In einer am IMBIO durchgeführten Diplomarbeit sollten aus diesem Grunde die Gene für RFT5(scFv) bzw.

Ki-4(scFv) in den in dieser Arbeit hergestellten Konstrukten durch das Gen für den CD30L ersetzt werden (Stahnke, 2004). Diese Arbeiten konnten jedoch bislang nicht erfolgreich abgeschlossen werden.

Als Toxindomänen wurden in der vorliegenden Arbeit Ricin Toxin A, Angiogenin und Granzym B verwendet. Durch die pflanzliche Herkunft des Ricin Toxin A ist in höheren Pflanzen von einer Synthese effizient wirksamer Proteine mit nativem Glykosylierungsmuster auszugehen. Die Verwendung der Mutante RTA-N97A ermöglicht die Eliminierung des in der Applikation von auf RTA basierenden Immuntoxinen oft dosislimitierenden Vascular Leak Syndroms (Smallshaw *et al.*, 2003). Dennoch kann nach wiederholter Gabe entsprechender Immuntoxine die Bildung humaner Anti-Ricin-Antikörper (HARA) die Wirkung der Immuntoxine limitieren. Die Epitope des RTA, gegen die diese Antikörper hauptsächlich gerichtet sind, sind jedoch bekannt (Castelletti *et al.*, 2004) und könnten in zukünftigen Forschungsarbeiten durch gezielte Mutationen eliminiert werden. Auf diese Weise könnte die Bildung von HARA in den Patienten minimiert und die Effizienz auf RTA beruhender Immuntoxine weiter erhöht werden.

Ein neueres Problem in der Verwendung auf Ricin Toxin A beruhender Immuntoxine liegt im Einsatz von Ricin in der Waffentechnologie (siehe 1.3.2.1). Zum Schutz gegen diese Bedrohung wurde im Verlauf der letzten Jahre ein Impfstoff entwickelt (Smallshaw *et al.*, 2005). Dieser Impfstoff, namentlich RiVax, zeigte in einer ersten klinischen Studie vielversprechende Ergebnisse (Vitetta *et al.*, 2006). Sollte dieser Impfstoff künftig in einer flächendeckenden Immunisierung eingesetzt werden, ist die Bildung von HARA in den geimpften Personen gewollt. Diese könnten dann nicht durch Immuntoxine mit RTA als Toxindomäne therapiert werden.

Die Verwendung humaner Toxine wie Angiogenin oder Granzym B verspricht eine sehr geringe Immunantwort in den Patienten und somit die Möglichkeit einer langfristigen Therapie. Hier könnten sich jedoch eventuell Probleme durch die vom tierischen Muster abweichende Glykosylierung bei einer Expression in Pflanzen ergeben, welche die Funktionalität, die Immunogenität und die Lebensdauer der resultierenden Proteine beeinflussen könnte. Mit Immuntoxinen, die Angiogenin oder Granzym B beinhalten, liegen bislang keine Daten zu Versuchen *in vivo* vor. So sind verschiedene Nebenwirkungen bei einer Applikation derselben nicht auszuschließen. Im Besonderen bei der Verwendung von Angiogenin als Toxindomäne sind unter Umständen schwerwiegende Effekte zu erwarten. Da Angiogenin die Bildung neuer Blutgefäße induziert, könnte diese Eigenschaft auch entsprechenden Immuntoxinen innewohnen. Dies könnte gerade in der Krebstherapie fatal sein, da Angiogenin so zu einer besseren Vaskularisierung von Tumoren führen könnte. Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass durch eine Inhibierung von Angiogenin Krebspatienten erfolgreich behandelt werden können. So eignen sich auch Anti-Angiogenin-Agenzien zur Therapie von Krebserkrankungen (Olson *et al.*, 1995). Die Therapie des Hodgkin Lymphoms mit Immuntoxinen, die Angiogenin als Toxindomäne beinhalten, stellt folglich eine große Herausforderung dar.

Zur Suche nach Verbesserungsmöglichkeiten von Immuntoxinen gehört auch stets die Suche nach weiteren spezifischen Oberflächenantigenen. Nach Identifikation derselben müssen passende Bindestrukturen gefunden werden. Eine sehr effiziente Methode neue humane Antikörper zu

generieren steht durch das Phage-Display-System zur Verfügung (Huls *et al.*, 1999). So können durch Verwendung von Bindestrukturen gegen unterschiedliche Oberflächenantigene Cocktails von Immuntoxinen hergestellt werden, welche eine höhere Wirkungseffizienz in der Behandlung von Krankheiten versprechen (Engert *et al.*, 1995). Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit von Immuntoxinen liegt in der Verwendung neuartiger Toxindomänen mit geringeren Nebenwirkungen. Auch eine Weiterentwicklung im Sinne einer Wirksamkeit an der Zielzelle ohne die Voraussetzung einer Internalisierung oder eine mögliche Vervielfältigung des Eingangssignals, um einen maximalen Anteil an Tumorzellen zu eliminieren, ist denkbar.

## 4.2 Expressionssystem

Pflanzen sind ein kostengünstiges und effizientes System zur Produktion therapeutisch wirksamer Proteine (siehe 1.4). Die Synthese toxisch wirkender Stoffe wie Immuntoxine stellt jedoch eine große Herausforderung dar. So ist zu erklären, dass bis heute neben der vorliegenden Arbeit keine weitere Veröffentlichung die Expression von Immuntoxingenen in ganzen Pflanzen zeigen konnte. Als pflanzliche Expressionssysteme fanden der Tabak *Nicotiana tabacum* und die Zwerglinsen *Wolffia australiana* und *Wolffia brasiliensis* Verwendung. Tabak versprach aufgrund etablierter Anzucht-, Transformations- und Selektionsprotokolle eine einfache Handhabung und schnelle Erfolge. So konnten verschiedene transgene Tabaklinien erzeugt und die Expression der Immuntoxingene über beide untersuchten Generationen nachgewiesen werden (siehe 3.3). Aufgrund einer ganzen Reihe herausragender Parameter (siehe 1.4.4.2) versprechen Zwerglinsen eine optimale Eignung zur Produktion von Immuntoxinen und sollten als alternatives Expressionssystem für Fremdgene etabliert werden. Aus verschiedenen getesteten *Wolffia*-Arten wurden *W. australiana* und *W. brasiliensis* aufgrund ihrer Eignung als Laborkulturen ausgewählt (Friedrich, 2005).

An verschiedenen Protokollen zur Transformation von *Wolffia* wird am IMBIO geforscht (siehe 4.3). Für den Erhalt homogen transgener Pflanzen ist es Voraussetzung, dass aus einer einzelnen transgenen Zelle eine vollständig transgene Pflanze entstehen kann. Um dieses Ziel zu erreichen, werden häufig kallöse Gewebe oder Protoplasten transformiert. Protokolle zur Herstellung von Kalli verschiedener Wasserlinsengewächse der Gattungen *Lemna* und *Spirodela* bestehen bereits (Moon & Stomp, 1997; Stefaniak *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004). Ein reproduzierbares Protokoll zur Generierung kallöser Strukturen aus Pflanzen der Gattung *Wolffia* konnte bislang jedoch nicht etabliert werden, auch wenn erste Erfolg versprechende Ergebnisse erzielt wurden (Friedrich, 2005; Brodt, unpublizierte Daten). Auch die Methode der Protoplastierung liefert in Pflanzen der Gattung *Wolffia* nur ungenügende Ergebnisse. Das größte Potenzial liegt in Pflanzen der Art *W. neglecta*, jedoch zeigten auch die hier generierbaren Protoplasten keine lange Überlebens- oder Regenerationsfähigkeit und eignen sich somit nicht zur Herstellung transgener Pflanzen (Heister, unpublizierte Daten).



So müssen bislang ganze Pflanzen zu Transformationszwecken eingesetzt werden. Dies birgt jedoch einige Probleme. Bei erfolgreicher Transformation entstehen stets chimäre Pflanzen, da nur ein Teil der Zellen einer Pflanze transformiert wird. In diesen kann das eingebrachte Fremdgen in unterschiedlicher Kopienzahl und an verschiedenen Genloci vorliegen. Es muss folglich versucht werden, gezielt meristematische Zellen zu transformieren (siehe 4.3). Nach der Generierung von Tochterfronds über mehrere Generationen hinweg, können so unter Umständen Pflanzen erzeugt werden, die aus einer einzigen transformierten Zelle hervorgegangen und somit homogen transgen sind.

Ein weiteres Problem bei der Verwendung ganzer Zwerglinsen zur Transformation ist ihre fehlende Sterilität. Auch wenn die Pflanzen oberflächensteril gehalten werden können, ohne dass eine Kontamination im umgebenden Medium detektierbar wäre, befinden sich im Inneren der Pflanze stets verschiedene Mikroorganismen. Eine Reduzierung derselben ist durch Infiltration verschiedener Antibiotika möglich, eine vollständige Sterilität ist jedoch nicht zu erreichen (Hetzel, 2005). Auch ist stets eine steigende Sensitivität der Pflanzen bei steigender Sterilität zu beobachten, was eine symbiotische Vergesellschaftung mit den Mikroorganismen nahe legt. So scheint der Erhalt auch endogen steriler *Wolffia* nicht möglich zu sein. Dennoch konnten im Verlauf dieser Arbeit wiederholt Nachweise über eine erfolgreiche Transformation und eine anschließende Expression eines Immuntoxingens in Zwerglinsen erbracht werden (siehe 3.4). Folglich scheinen die kontaminierenden Mikroorganismen kein Hinderungsgrund zur Verwendung von Zwerglinsen als Expressionssystem zu sein.

Die Selektion transgener Zwerglinsen kann durch Zugabe eines Antibiotikums erfolgen. Auch hier muss beachtet werden, dass zunächst nur chimäre Pflanzen generiert werden. So sollte ein Selektionsdruck erst nach Erzeugung mehrerer Generationen angelegt werden. Dann kann bei erfolgreicher Transformation meristematischen Gewebes mit komplett transgenen Pflanzen gerechnet werden. Nach einigen Tagen unter Selektionsdruck lassen sich Pflanzen ohne Resistenzgen an einsetzender Chlorose erkennen und können aussortiert werden. In den Kulturen wirken starke allelopathische Effekte zwischen den Pflanzen. So werden auch solche Zwerglinsen, die das zur Selektion eingesetzte Antibiotikum aufgrund des auf der T-DNA befindlichen Resistenzgens überleben würden, durch Signale der anderen nicht transgenen Pflanzen abgetötet. Somit ist eine frühe Trennung transgener von nicht transgener *Wolffia* äußerst wichtig. Da die Chlorose bei der Verwendung von G-418 oder Paromomycin als Selektionsantibiotikum schneller einsetzt als bei der Zugabe von Kanamycin (siehe 3.4.1), eignen sich diese besser für eine Selektion von Zwerglinsen als Kanamycin. Aber auch bei Verwendung dieser Antibiotika setzt die Chlorose erst so spät ein, dass bei einer Kultivierung unter Selektionsdruck die Pflanzen mit Resistenzgen durch die Signale der anderen abgetötet würden, bevor eine sichtbare Verblässung eingesetzt hätte.

Eine Vereinzelung der Pflanzen vor der Selektion könnte dieses Problem lösen. Dies ist aber nicht möglich, da eine gewisse Inokulumsmenge pro Volumen bei einer Kultivierung von Zwerglinsen nicht unterschritten werden sollte (Friedrich, 2005). Möglicherweise könnten jedoch vitale Teichlinsen (*Spirodela polyrhiza*), die einer Zwerglinse (*Wolffia australiana*) zugesetzt werden,

die Funktion der üblicherweise umgebenden anderen Zwerglinsen übernehmen und vereinzelter *Wolffia* zum Wachstum verhelfen. Aktuelle Versuche am IMBIO testen die Wirksamkeit einer solchen Ammenkultur (Dresen-Scholz, unpublizierte Daten).

Da bislang eine Vereinzlung jedoch noch nicht möglich ist, müssen Möglichkeiten gefunden werden, die negativen Rückkopplungseffekte durch sterbende Pflanzen zu vermeiden. Eine einfache und effiziente Methode liegt im häufigen Medienwechsel. Hier müssen möglichst unkompliziert durchzuführende und für die Pflanzen stressfreie Protokolle gefunden werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Pflanzen stets mit kleinen Siebchen aus dem alten Medium entnommen und in neues Medium überführt. Diese Prozedur überstanden die Pflanzen ohne negative Auswirkungen auf ihre Vitalität. Aktuelle Versuche am IMBIO versuchen diesen Vorgang zu vereinfachen, indem die Pflanzen direkt in einer Siebplatte in das Medium eingetaucht werden und zusammen mit dieser schnell und einfach aus dem alten Medium entfernt und in neues Medium überführt werden können (Boehm, unpublizierte Daten).

Eine weitere Möglichkeit, die negativen Rückkopplungseffekte zu vermeiden, liegt in einer frühzeitigen Erkennung vitaler Zwerglinsen und einer Trennung derselben von den sterbenden Pflanzen. Bereits vor dem Verblässen der Pflanzen kann über das Fluorometer PAM-2000 eine Messung der Vitalität erfolgen, welche zuverlässige Daten über den Status der Kultur liefert (Friedrich, 2005). Eine andere Methode, die noch schneller Änderungen des Vitalitätsstatus der Zwerglinsen erkennen lässt, ist das Respiration Activity Monitoring System (RAMOS), welches die Sauerstofftransferrate misst (Rechmann, 2004). Beide Systeme erfassen jedoch nur den Gesamtstatus einer Kultur. Eine Aufzeichnung der Vitalität einzelner Pflanzen ist so nicht möglich, so dass letztlich die Chlorose der Pflanzen abgewartet werden muss, bevor eine Sortierung möglich ist. Abhilfe könnte das IMAGING-PAM, ein Nachfolgemodell des PAM-2000, schaffen, welches die Vitalität der einzelnen Pflanzen in einer Kultur abbilden kann. Auf diese Weise könnten sterbende Pflanzen schon vor einer einsetzenden Chlorose von den vitalen transgenen Pflanzen unterschieden und separiert werden. Nach einer erfolgreichen Transformation von *Wolffia* (siehe 4.3) kann also eine effiziente Selektion zum Erhalt homogen transgener Kulturen angeschlossen werden. Einer Nutzung von Zwerglinsen als Expressionssystem steht somit nichts mehr im Wege.

### 4.3 Transformationsmethoden

Zur Transformation von Pflanzen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Sie lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen. Die direkten Transformationsmethoden bringen die Fremd-DNA auf diversen direkten Wegen in die Pflanzenzellen, während sich die indirekten des Bakteriums *A. tumefaciens* bedienen (Rakoczy-Trojanowska, 2002). Verschiedene direkte Transformationsmethoden sind beispielsweise die Elektroporation (Fromm *et al.*, 1985), die Elektrophorese von Embryonen (Griesbach & Hammond, 1994), die Mikroinjektion (Crossway *et al.*, 1986), der Pollenschlauch-Weg, (Luo & Wa, 1988) die Siliziumcarbid-vermittelte Transformation (Kaepler *et al.*, 1990), die Behandlung mit Ultraschall (Joersbo & Brunstedt, 1990), die Liposomen-

vermittelte Transformation (Fraley & Papahadjopoulos, 1982), die Behandlung mit Laser (Weber *et al.*, 1989) und das Particle Bombardment (Klein *et al.*, 1987). Die meisten dieser Methoden werden eher selten angewendet. Niedrige Transformationsraten, hoher Arbeitsaufwand, hohe Kosten und schlechte Überlebenschancen der transformierten Pflanzenzellen sind die Ausschlusskriterien für einen Großteil der Anwendungen (Rakoczy-Trojanowska, 2002).

Das Particle Bombardment bildet hier eine Ausnahme. Bei dieser Methode werden kleine Mikrocarrier aus Wolfram oder Gold mit DNA beschichtet und mit Druck in die Pflanze geschossen (Christou, 1993). Eine Integration der DNA ins Genom oder auch ins Plastom erfolgt dann im Allgemeinen durch nicht-homologe Rekombination und kann hinsichtlich des Integrationsorts nicht gesteuert werden (Taylor & Fauquet, 2002). Der Einbau findet oft an ungünstigen Stellen statt, und es können pflanzliche Gene unterbrochen oder ein Silencing des Fremdgens begünstigt werden. Auch werden häufig mehrere Kopien des selben Gens in einer Zelle eingebracht, was zu einer verschlechterten oder gar vollständig supprimierten Genexpression in den transgenen Pflanzen führen kann (Rakoczy-Trojanowska, 2002). Folglich sind die gängigsten Methoden heutzutage die indirekten Transformationen mittels *A. tumefaciens*. Der Vorteil zeigt sich am Ort des Einbaus der Fremd-DNA. Die Insertion des transgenen Materials erfolgt ausschließlich im Genom und dort hauptsächlich in transkriptionell aktiven Regionen des pflanzlichen Genmaterials (Taylor & Fauquet, 2002). So ist eine spätere Transkription der eingebrachten Fremd-DNA wahrscheinlicher als nach Einbau in stillgelegten Bereichen des Genoms. Die Transformation findet hauptsächlich in jungen proliferierenden Zellen statt (Chumakov *et al.*, 2002). Auf diese Weise kann die gezielte Transformation meristematischen Gewebes in den Zwerglinsen (siehe 4.2) gefördert werden.

Es existieren verschiedene Protokolle zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation. Durch einfache Cokultivierung können Zellen verschiedener Gewebetypen transformiert werden (Márton *et al.*, 1979). Dies findet vorwiegend an verletzten Geweben statt. Eine Transformation kann aber auch durch eine Injektion (Boehm, unpublizierte Daten) oder eine Infiltration (Bechtold *et al.*, 1993) der Bakterien in adulte Pflanzen erreicht werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurden dikotyle Tabakzellen an den Wundrändern von Blattstücken erfolgreich durch eine Cokultivierung mit *A. tumefaciens* transformiert (siehe 3.3). Über eine Kallusphase regenerierten sich aus einzelnen Transformationsereignissen vollständig transgene Pflanzen.

In Forschungsarbeiten am IMBIO wurde die Eignung verschiedener Protokolle zur Transformation von Zwerglinsen getestet. Zur Ermittlung der einzelnen Effizienzen wurde das Markergen *uidA* verwendet, welches für das Enzym  $\beta$ -Glucoronidase codiert. Der Nachweis erfolgte durch eine histochemische Blaufärbung nach der Zugabe von 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Beta-D-Glucuronsäure (X-Gluc).

Trotz der zuvor erwähnten Vorteile einer *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation, wurde mit dem Particle Bombardment auch eine direkte Methode des Gentransfers getestet. Denn gerade bei der Transformation monokotyle Pflanzen liefern die indirekten Methoden oft nur wenig zufriedenstellende Ergebnisse (Rakoczy-Trojanowska, 2002). Durch das Bombardment konnten

Transformationsraten um 19 % erzielt werden, was die grundsätzliche Eignung dieses Systems belegte (Kruse *et al.*, 2002).

Die an den Zwerglinsen getesteten indirekten Methoden basierten auf der einfachen Cokultivierung mit *A. tumefaciens*, der Injektion der Bakterien in die Pflanzen mit einer Mikrokapillare und der Infiltration derselben unter Unterdruck. Die Cokultivierung mit *A. tumefaciens* zeigte mit Transformationsraten um 4 % nur eine geringe Effizienz. Auch wurden hier hauptsächlich Zellen des epidermalen und subepidermalen Bereichs transformiert. Die meristematischen Zonen im Inneren der Pflanzen konnten so nicht erreicht werden (Boehm *et al.*, 2001). Die Injektion war äußerst arbeits- und zeitaufwändig, so dass nur ein geringer Durchsatz zu erzielen war. Die Transformationsraten lagen hier jedoch bei etwa 50 %. Auch konnten die *A. tumefaciens* gezielt in die Meristeme der Zwerglinsen injiziert werden, wodurch der Erhalt transgener Tochterfronds begünstigt wurde (Boehm, unpublizierte Daten).

Die Transformationsraten bei einer Infiltration lagen zunächst mit etwa 15 % in schlechteren Bereichen (Boehm *et al.*, 2001). In den ersten Infiltrationsversuchen konnten jedoch nur etwa 50 % aller Pflanzen erreicht werden, was durch ein Absinken derselben im Medium erkennbar war. Zur Verbesserung der Effizienz wurde eine Vorbehandlung der Zwerglinsen durch ein Particle Bombardment mit unbeschichteten Mikrocarriern oder einem Vortexen mit Zugabe von Korund getestet. Durch die entstehenden Verletzungen sollte die anschließende Infiltration und die Transformation der einzelnen Zellen erleichtert werden, da ein besserer Zugang für die Bakterien ins Pflanzeninnere geschaffen wurde und Transformationen, wie bereits zuvor erwähnt, oft in verletzten Geweben stattfinden. Die auf diese Weise vorbehandelten Pflanzen blieben jedoch nicht lange lebensfähig (Friedrich, 2005).

Durch verschiedene Optimierungen gelang in späteren Versuchen eine Steigerung der Infiltrationseffizienz ohne Vorbehandlungen auf 90 % der Zwerglinsen (Hetzel, 2005). Mit diesen hohen Infiltrationseffizienzen sind heute Transformationsraten von über 50 % keine Seltenheit mehr und konnten bis zu 79 % gesteigert werden (Edler, unpublizierte Daten). Bei Transformationen unverletzter Pflanzen mit *A. tumefaciens* konnte ein Zusammenhang der Transformationseffizienzen mit dem Öffnungsgrad der Stomata festgestellt werden, da diese die Eintrittspforten für die Bakterien in die Pflanze darstellen (Chumakov *et al.*, 2002). Um eine weitere Steigerung der Transformationsraten zu erreichen, könnte bei der Infiltration von Zwerglinsen versucht werden, gezielt eine Öffnung der Stomata zu induzieren. Mögliche Parameter sind beispielsweise eine niedrige CO<sub>2</sub>-Konzentration (Farquhar *et al.*, 1978) oder die Zugabe von Kinetin (Incoll & Whitelam, 1977), Indolelessigsäure (Pemadasa, 1982) oder Fusicoccin, ein in Pilzen vorkommendes Terpenoid, welches eine permanente Öffnung von Stomata induziert (Turner & Graniti, 1969). Eine Beleuchtung mit Blaulicht kann ebenfalls ein Öffnen der Spaltöffnungen induzieren (Iino *et al.*, 1985). In aktuellen Versuchen am IMBIO wird dieser Effekt untersucht (Edler, unpublizierte Daten).

Weitere Optimierungen könnten durch die Wahl der *A. tumefaciens* möglich sein. Im Verlauf dieser Arbeit wurde mit den Stämmen GV3101 und LBA4404 gearbeitet. Spätere Untersuchungen zur Effektivität verschiedener Stämme in der Transformation von Zwerglinsen bescheinigten

jedoch besonders dem Stamm C58 ein großes Potenzial (Wischnewski, unpublizierte Daten). Nach neuesten Erkenntnissen können auch Bakterien anderer Genera als *Agrobacterium* Pflanzen erfolgreich transformieren, wenn sie ein Helferplasmid und ein binäres Plasmid tragen (Broothaerts *et al.*, 2005). Dies kann als Grundsteinlegung zur Verwendung alternativer Werkzeuge in der Biotechnologie angesehen werden, welche nicht absehbare Effekte auf die Transformationseffizienzen in verschiedenen Pflanzen haben könnte (Chung *et al.*, 2006).

Eine weitere Alternative zur Verbesserung der Transformationsraten ist die Generierung supervirulenter *A. tumefaciens*, die Proteine, die sich normalerweise in den Pflanzen befinden und zur Integration der T-DNA vonnöten sind, selber synthetisieren und in die Pflanzenzelle transportieren (Tzfira & Citovsky, 2006). Auch die Überexpression bestimmter Gene in den transgenen Pflanzen selbst macht diese anfälliger für eine Transformation durch *A. tumefaciens* und kann die Transformationsraten deutlich steigern (Tzfira & Citovsky, 2006). So sind weitere Verbesserungen der Transformationsraten durch diese neuartigen Optimierungsmöglichkeiten nicht ausgeschlossen.

Ein verbleibendes Problem ist die ungesteuerte Integration der T-DNA im Genom der Pflanzen. Wie auch bei den direkten Transformationsmethoden wird bei der *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation die fremde DNA normalerweise durch nicht-homologe Rekombination in das Genom integriert (Puchta & Hohn, 2005). Teilweise werden auch die Bordersequenzen der T-DNA nur schlecht prozessiert und flankierende Vektor-Regionen werden zusammen mit der T-DNA cotransferiert. Auf diese Weise kann in seltenen Fällen das komplette binäre Plasmid in das Pflanzengenom übertragen werden (Martineau *et al.*, 1994). Die Menge von fremdem Genmaterial sollte jedoch möglichst gering gehalten werden. So ist bekannt, dass an solchen Orten, wo ein gesamtes Plasmid integriert wurde, die Erkennung als Fremdmaterial und somit auch ein Silencing des Fremdgens wahrscheinlicher ist (Fu *et al.*, 2000). Eine Lösung bietet der Einbau des Gens *barnase* außerhalb der T-DNA-Bordersequenzen. Da eine Expression dieses Gens tödlich ist, werden alle Pflanzenzellen, die diese Vektorsequenzen beinhalten, getötet (Hanson *et al.*, 1999). Auch kann die Coexpression eines viralen Suppressors von RNA-Silencing die Expression eines Fremdgens auf ein Vielfaches erhöhen (Baulcombe, 2005).

Um die Rate eines gezielten Einbaus des Fremdgens zu steigern, müssen neue Strategien entwickelt werden. Aktuelle Forschungsarbeiten haben belegt, dass dies durch Überexpression des Proteins Rad54 aus Hefen in den transgenen Pflanzen zu erreichen ist (Shaked *et al.*, 2005). Die Anzahl der homologen Rekombinationsereignisse konnte so von  $10^{-4}$  -  $10^{-3}$  auf  $10^{-2}$  -  $10^{-1}$  gesteigert werden. Somit könnte in Zukunft eine gezielte Integration von Fremd-DNA durch *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation erreicht werden. Auf diese Weise wird es möglich sein, mit Hilfe indirekter Transformationsmethoden ganz gezielt Pflanzen mit hohen Expressionsraten für das eingebrachte Fremdgen zu generieren.

## 4.4 Expressionskassetten

Die Expressionskassetten dieser Arbeit beinhalten verschiedene Immuntoxininfusionsgene, die aus den Komponenten Angiogenin, Granzym B, RTA-N97A, RFT5(scFv) und Ki-4(scFv) bestehen (siehe 3.1). Es ist im Einzelnen nicht vorhersagbar, ob Immuntoxine mit der Toxindomäne am N-Terminus oder am C-Terminus wirkungsvoller sind. So existieren beispielsweise für Immuntoxine mit dem Toxin Angiogenin sowohl Hinweise darauf, dass es am C-Terminus stehen sollte (Russo *et al.*, 1996), als auch, dass es sich am N-Terminus eines Immuntoxins befinden sollte (Newton *et al.*, 1998). Um eine Überprüfung der Positionseffekte in den hergestellten Immuntoxinen zu ermöglichen, wurden stets Fusionsgene in beiden Orientierungen hergestellt (siehe 3.1.1).

Das Besondere der im Verlauf dieser Arbeit hergestellten Plasmide ist ihre Kassettenstruktur. Die einzelnen Komponenten sind schnell und einfach durch Restriktionen austauschbar. Dieser einfache Austausch wäre mit kommerziell erhältlichen Plasmiden nicht möglich gewesen. Somit brachte die Konstruktion der Kassettenplasmide pPAMBT und pPAMTB (siehe 3.1.2.4) eine wesentliche Vereinfachung. Nun können einzelne Komponenten schnell einem sich ändernden Bedarf angepasst werden. So wurden die hier konstruierten Plasmide bereits als Grundlage für Plasmide zur Expression von O-GlcNAc-Transferase (Reinders, 2005) oder dem Hüllprotein VP2 des Gumboro-Virus (Tran, unpublizierte Daten) verwendet.

Mit dem Plasmid pPAMKsGFP als Backbone wurde ein binäres *A. tumefaciens*-Plasmid gewählt, welches zur Transformation verschiedener Pflanzen verwendet werden kann. Aufgrund der Verteilung seiner Restriktionsschnittstellen eignete es sich besonders gut zur Konstruktion der Kassettenplasmide. Der starke, konstitutive Promotor 35SS P und der zugehörige Terminator 35S pA befanden sich bereits in dem Plasmid und konnten genutzt werden. Lediglich Restriktionsschnittstellen mussten flankierend eingefügt werden, so dass bei Bedarf ein Austausch dieser Elemente möglich ist. So könnten hier beispielsweise auch gewebs- oder entwicklungsspezifische Promotoren eingebracht werden. Zu einer Expression großer Mengen von Zielprotein eignet sich jedoch ein konstitutiv starker Promotor wie der 35SS P am besten. Dieser ist in dikotylen Pflanzen weit stärker aktiv als in monokotylen. Somit ist er sehr gut für eine Expression in Tabak geeignet. In den monokotylen Zwerglinsen ist mit Promotoren wie dem Ubiquitin-1 P eine höhere Expressionsrate zu erwarten (Ma *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wird im Rahmen einer aktuellen Diplomarbeit der 35SS Promotor gegen den Ubiquitin-1 Promotor ausgetauscht (Edler, unpublizierte Daten).

Vor einige Immuntoxininfusionsgene wurde die Sequenz für das Signalpeptid des  $\alpha$ -Amylase-Inhibitors der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) gesetzt, welches für eine ER-Lokalisation der entstehenden Proteine verantwortlich ist (Moreno & Chrispeels, 1989). Auf diese Weise kann in Abwesenheit weiterer Lokalisationssignale eine Sekretion der Immuntoxine in ein umgebendes Medium erreicht werden. Dies ist gerade bei der Verwendung von Zwerglinsen als Expressionssystem interessant, da so eine vereinfachte Aufreinigung des Zielproteins ohne Zerstörung der Pflanzen ermöglicht wird. Jedoch muss unter Umständen mit einer verminderten

Stabilität der Proteine, nicht zuletzt aufgrund der mit *Wolffia* vergesellschafteten Mikroorganismen (siehe 4.2), gerechnet werden. Durch diese könnte ein frühzeitiger Abbau des Zielproteins erfolgen.

Ein C-terminales KDEL-Signal bewirkt den Verbleib im ER synthetisierter Proteine in eben diesem Kompartiment. Gleichzeitig erhöht es den Proteingehalt in den Pflanzen, höchstwahrscheinlich durch den Schutz vor proteolytischem Abbau (Schouten *et al.*, 1996). Auch durch die Addition verschiedener kurzer Polypeptide an den N-Terminus von Proteinen kann deren Haltbarkeit gesteigert werden, wahrscheinlich ebenfalls durch Schutz vor proteolytischem Abbau. In vorangegangenen Studien wirkte sich beispielsweise die Fusion von Glutathion-S-Transferase (GST) oder von Hüllprotein (CP) aus dem Tabak-Mosaik-Virus positiv auf die Stabilität eines Proteins aus (Spiegel *et al.*, 1999). Die Addition eines solchen stabilisierenden Elements an die in dieser Arbeit produzierten Immuntoxine ist denkbar, impliziert aber die Änderung der Gensequenz. Aufgrund der in den Kassettenplasmiden vorhandenen Schnittstellen sind solche Änderungen jedoch stets unkompliziert und schnell möglich.

Im Verlauf dieser Arbeit sollten die in Pflanzen hergestellten Immuntoxine zunächst schnell nachgewiesen werden. Daher durften auch Affinitätstags wie das c-myc- oder das His<sub>6</sub>-Tag nicht fehlen. So konnten die Immuntoxine in den Proteinextrakten aus transgenem Tabak mit Antikörpern gegen His<sub>6</sub> in einem Dot Blot nachgewiesen werden (siehe 3.3.4.3). Werden diese Tags nicht mehr benötigt, können sie in dem vorliegenden Kassettensystem auf genetischer Ebene einfach durch entsprechende Restriktionen aus dem Gen entfernt werden. Auch die Einfügung einer Erkennungsstelle für eine spezifische Proteinase ist möglich (siehe 1.4.2). Auf diese Weise könnten die Tags zunächst zur Aufreinigung genutzt und erst anschließend entfernt werden.

Bei der Konstruktion der Expressionskassetten wurde überwiegend mit Restriktionen und Ligationen gearbeitet. Teilweise wurden aber auch bestimmte Bereiche durch eine PCR hergestellt und dann in vorhandene Plasmide ligiert. In diesen Fällen wurden die in der PCR amplifizierten Bereiche stets sequenziert, um Mutationen innerhalb der Fragmente auszuschließen, die während einer PCR leicht entstehen können. Das Auftreten von Mutationen kann durch Verwendung von Proof-Reading-Polymerasen wie beispielsweise Deep Vent minimiert werden. Proof-Reading-Polymerasen besitzen zwei aktive Zentren, eines zum Einbau eines neuen Nucleotids und ein zweites zur Überprüfung des soeben eingebauten Nucleotids. Auf diese Weise kann die Fehlerquote von etwa  $8 \times 10^{-6}$  bei Taq auf etwa  $2,7 \times 10^{-6}$  bei Deep Vent abgesenkt werden (Cline *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wurden bei PCRs zu Klonierzwecken stets Deep Vent verwendet.

Neben den in PCRs hergestellten Fragmenten wurden in den Plasmiden pPAMSARK und pPAMSRGK die zur Expression des Immuntoxins benötigten DNA-Abschnitte sequenziert. Diese Plasmide sollten vor einer Pflanzentransformation eindeutig verifiziert werden. Da während einfacher Klonierungsarbeiten über Restriktionen und Ligationen normalerweise keine Mutationen entstehen, konnte von korrekten Sequenzen ausgegangen werden. Dies war aber keineswegs der Fall. In den Plasmiden waren diverse Mutationen im Vergleich zu den als Referenz herangezogenen Veröffentlichungen (siehe 6.1) zu finden. Viele der Mutationen sind jedoch stille

Mutationen, die sich in der Aminosäuresequenz nicht auswirken. Auch existieren in verschiedenen Veröffentlichungen durchaus unterschiedliche Sequenzangaben zu dem gleichen Gen. Unter Einbeziehung der Gendatenbank von EMBL-EBI konnten so verschiedene Abweichungen von den Originalsequenzen auch in anderen Veröffentlichungen gefunden werden. Auf die einzelnen Abweichungen soll im Folgenden eingegangen werden.

Die vier im Bereich des Promotors aufgetretenen Mutationen (siehe 3.3.1.9 - 3.1.3.10) finden sich alle vier auch in dem Plasmid pTRV2 (Access-Nummer AF406991.1). In der dort angegebenen Sequenz befindet sich jedoch zusätzlich zu der in dieser Arbeit zugrunde gelegten Sequenz eine Insertion von fünf Basen. Die in dieser Arbeit verwendete Sequenz scheint somit eine Mischung der beiden Sequenzen zu sein. So ist von einer einwandfreien Funktionalität auszugehen. Die Deletion im Bereich des Terminators (siehe 3.3.1.9 - 3.3.1.10) liegt laut der Daten aus dem Plasmid pXCS-HAStrep (Access-Nummer AY457636.1) gar nicht im Terminator selbst. Laut dieser Quelle beginnt der Terminator erst bei bp 49 der in dieser Arbeit zugrunde gelegten Sequenz. Die Deletion bei bp 13 scheint also vernachlässigbar zu sein und die Funktionalität des Terminators nicht zu beeinflussen.

Auch im Bereich der Immuntoxingene traten Sequenzabweichungen auf. Im Gen für Angiogenin hat die entdeckte Mutation keinerlei Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz (siehe 3.1.3.9) und kann somit vernachlässigt werden. Zwei der fünf im Granzym B auftretenden Mutationen (siehe 3.3.1.10) sind identisch mit denen in einer anderen Veröffentlichung (Access-Nummer NM\_004131.3). Es verbleiben jedoch die Mutationen bei bp 50, bp 500 und bp 578. Diese ändern die Aminosäuresequenz, so dass ein möglicher Effekt auf die Funktionalität hier nicht auszuschließen ist. Auch für die Sequenzabweichung im Gen für RTA-N97A (siehe 3.1.3.11) konnte keine Veröffentlichung gefunden werden. So ist auch hier mit eventuellen negativen Auswirkungen auf das Genprodukt zu rechnen. Die meisten im RFT5(scFv) auftretenden Mutationen sind still und fallen somit nicht ins Gewicht (siehe 3.1.3.9 - 3.1.3.10). Nichtsdestotrotz bleiben etliche Mutationen, die eine Änderung der Aminosäuresequenz hervorrufen. In Absprache mit PD Dr. Dr. Barth (Fraunhofer IME), dem Entwickler des RFT5(scFv), wurde dieser dennoch weiter verwendet.

Es ist wahrscheinlich, dass die meisten der in dieser Arbeit aufgetretenen Mutationen bereits in den von der RWTH Aachen zur Verfügung gestellten Plasmiden vorlagen. So traten die selben Mutationen in verschiedenen voneinander unabhängigen Versuchen immer wieder auf (siehe 3.1.1.5 - 3.1.1.8). Auch stimmten die Daten über das von dort erhaltene Plasmid m22-RTA-N97A nicht mit den tatsächlichen Sequenzen überein (siehe 3.1.1). Das Gen für RTA-N97A lag in diesem Plasmid jedoch vor. So konnte letztendlich weiter gearbeitet werden, auch wenn nicht final geklärt werden konnte, welche Sequenzen dieses Gen umgaben. Da an der RWTH Aachen mit diesen Genen bereits funktionale Immuntoxine konstruiert wurden, konnte in dieser Arbeit von keinem negativen Einfluss der detektierten Sequenzabweichungen ausgegangen werden.

Unter Umständen kann die gezielte Einführung von Mutationen sogar positive Auswirkungen auf die Proteinausbeute haben. Der genetische Code ist degeneriert und verschiedene Basentriplets können für die gleiche Aminosäure codieren. Sie werden in Bakterien, Tieren und Pflanzen



unterschiedlich häufig genutzt. So liegen auch die entsprechenden tRNAs in den unterschiedlichen Organismen in verschiedenen Konzentrationen vor. Eine Codonoptimierung im Sinne einer Verwendung für Pflanzen gebräuchlicher Triplets könnte somit eine Steigerung der Translationsrate mit sich bringen (Dorfmueller, 2004/2005).

Um transgene Pflanzen und nicht transgene Pflanzen voneinander unterscheiden zu können, ist es üblich, Resistenzgene zusammen mit dem Zielgen zu transformieren. So befindet sich auf der T-DNA der verwendeten binären Plasmide zusätzlich das Gen *nptII*, dessen Genprodukt eine Resistenz gegen Kanamycin, G-418 und Paromomycin vermittelt. Die Expression wird durch den Promotor Nos P und den Terminator Ocs pA gesteuert (siehe 3.1.2 - 3.1.3). Die Präsenz solcher Resistenzgene könnte in kommerziell genutzten transgenen Pflanzen unvorhersehbare Folgen auf das Ökosystem oder die menschliche Gesundheit haben. Nach einer Freisetzung könnten Herbizid-Resistenzgene durch Auskreuzung in verschiedene Unkräuter gelangen (Dale *et al.*, 2002). Antibiotikum-Resistenzgene in Nahrungsmitteln könnten theoretisch zu einer Ausbreitung dieser Resistenzen durch Darmbakterien in menschlichen Populationen führen, auch wenn für diese These bis heute kein Nachweis erbracht werden konnte (Puchta, 2003).

Es existieren verschiedene grundsätzliche Strategien, selektierbare Markergene in transgenen Pflanzen zu vermeiden. Zum einen können transgene Pflanzen völlig ohne Gebrauch eines Markers hergestellt werden. Ein Nachweis der Transgenität kann über PCR erfolgen. Dies ist jedoch äußerst geld- und zeitaufwändig (Puchta, 2003). Statt selektierbarer können auch auf andere Art und Weise detektierbare Marker verwendet werden. So können transgene Pflanzen durch die Expression solcher Gene, wie beispielsweise dem Gen für die  $\beta$ -Glucuronidase, in einer sogenannten positiven Selektion effizient von nicht transgenen unterschieden werden (Joersbo & Okkels, 1996). Da das Fernziel jedoch in einer generellen Reduzierung transgener Sequenzen liegen sollte, ist diese Möglichkeit nicht zu favorisieren. Eine dritte Möglichkeit liegt in einer gleichzeitigen Transformation von Resistenzgen und Zielgen auf unterschiedlichen T-DNAs. Die Wahrscheinlichkeit einer Cotransformation ist sowohl bei Verwendung eines binären Plasmids mit zwei T-DNAs als auch bei Verwendung von zwei verschiedenen *A. tumefaciens* hoch (Depicker *et al.*, 1985). Die beiden Fremdgene können dann durch Kreuzung voneinander getrennt werden. Dies setzt aber fertile Pflanzen voraus und ist sehr zeitaufwändig. Als letzte Methode ist die Verwendung von selektierbaren Markergenen zu nennen, die nach einer erfolgreichen Selektion aus dem Genom entfernt werden können. Es können Rekombinasen verwendet werden, die an spezifische Erkennungsstellen binden und durch Rekombination zum Verlust des Markergens führen können. Hier sind das Cre/lox- (Dale & Ow, 1991), das FLP/*ftr*- (Lyznik *et al.*, 1993) und das R-RS-System (Onouchi *et al.*, 1995) zu nennen. Diese Systeme versprechen bei einer einfachen und schnellen Handhabung die vollständige Entfernung jeglicher Markergene aus den Pflanzen und sind somit zu favorisieren. Eines dieser Systeme könnte in die Expressionskassetten dieser Arbeit eingefügt werden, so dass das Gen für *nptII* nach erfolgreicher Selektion aus der Pflanze entfernt werden könnte (siehe 4.7).

## 4.5 Arbeiten mit Bakterien

### 4.5.1 *Escherichia coli*

Zu Klonierzwecken wurden in dieser Arbeit *E. coli* verwendet. Anzucht-, Lagerungs- und Transformationsprotokolle waren etabliert und ein Nachweis transgener Bakterien konnte schnell und zuverlässig erfolgen. So verliefen grundsätzlich alle Klonierungsarbeiten in *E. coli* unkompliziert und ohne größere Schwierigkeiten. Eine einfache Möglichkeit, transgene *E. coli* von nicht transgenen unterscheiden zu können, bot die Anzucht unter Selektionsdruck. Nach einer Transformation bildeten transgene Bakterien auf Selektionsplatten Kolonien und auch in Flüssigkulturen zeigten sie unter Selektionsdruck rasches Wachstum. Zur weiteren Untersuchung konnte mittels eines einfachen Protokolls (siehe 2.4.1.1) das Plasmid aus den *E. coli* isoliert werden. Dieses konnte dann über eine Restriktionsanalyse verifiziert werden. Die Enzyme mussten hier stets so gewählt werden, dass über das entstehende Bandenmuster eine eindeutige Unterscheidung des neu herzustellenden Plasmids von dem alten, als Ausgangsmaterial dienenden Plasmid, möglich war. Bei der Herstellung der Plasmide ARK und GRK waren solche Enzyme nicht zu finden (siehe 3.1.1.5 - 3.1.1.6). Der einzige Unterschied zu dem Ausgangsmaterial Ang-RFT5 bzw. Gb-RFT5 bestand in den zwölf Basen, die für das KDEL-Signal codieren. Diese Sequenz war zu kurz, als dass Unterschiede dieser Länge in Agarosegelen sichtbar gewesen wären. Daher wurde hier zusätzlich ein Nachweis durch eine PCR erbracht. Für solche Nachweismethoden ist die Verwendung einer Proof-Reading-Polymerase eigentlich nicht notwendig. Trotzdem wurde Deep Vent verwendet (siehe 3.1.1.5-3.1.1.6), da die PCR-Programme bereits zuvor auf dieses Enzym optimiert worden waren. Eine neuerliche Optimierung auf Taq wurde somit umgangen. In den Nachweis-PCRs hybridisierte der Primer KDELrev im Bereich des KDEL-Signals und sollte somit in den als Ausgangsmaterial dienenden Plasmiden ohne entsprechendes Signal nicht binden. Allerdings entstanden auch bei diesen Plasmiden schwache Banden, jedoch in anderen Größen als die erwartete Bande (siehe 3.1.1.5-3.1.1.6). Solche Signale, die durch unspezifische Primerbindungen zustande kommen, sind bei PCR-Analysen keine Seltenheit und können vernachlässigt werden.

Bei der Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme zum Schneiden aus *E. coli* isolierter Plasmide musste der Methylierungsgrad der DNA beachtet werden. Unterschiedliche Stämme von *E. coli*, wie auch der in dieser Arbeit standardmäßig verwendete Stamm DH5 $\alpha$ , methylieren ihre DNA an verschiedenen Basensequenzen. Manche Restriktionsenzyme reagieren sensitiv auf solche Methylierungen und können an den modifizierten Erkennungsstellen nicht schneiden (McClelland *et al.*, 1994). So musste beachtet werden, dass das Enzym *Xba*I nur eine von zwei Restriktionsschnittstellen in den Plasmiden pPAMKsGFP, pPAMm1 und pPAMm2 schneiden konnte. Auch das Enzym *Bsr*BRI ist methylierungssensitiv. Da dieses für Klonierungsarbeiten zur Herstellung der Plasmide ARK, GRK, RAK und RGK benötigt wurde (siehe 3.1.1.5 - 3.1.1.8), mussten die als Ausgangsmaterial dienenden Plasmide Ang-RFT5, Gb-RFT5, RFT5-Ang und RFT5-Gb in einem methylierungsdefizienten Stamm wie JM110 vorliegen. Aufgrund der schlechteren Transformierbarkeit wurde dieser aber nicht sofort für eine Transformation

verwendet. *E. coli* JM110 wurde erst dann zusätzlich transformiert, wenn die gewünschten Plasmide nach einer Präparation aus *E. coli* DH5 $\alpha$  in Reinform und in großen Mengen eingesetzt werden konnten.

#### 4.5.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Arbeiten mit *A. tumefaciens* wurden nur drei der hergestellten Plasmide ausgewählt, mit denen beispielhaft Pflanzen transformiert werden sollten (siehe 3.2). Diese Arbeiten verliefen jedoch weit weniger einfach und vorhersehbar als die Arbeiten mit *E. coli* (siehe 4.5.1). Oftmals konnten nach einer Transformation keine eindeutigen Kolonien erzeugt werden. Des Öfteren entstand ein Bakterienrasen, der die gesamte Platte überzog. Teilweise befanden sich auch innerhalb dieses Rasens Kolonien stärkeren Wachstums. Dies zeigte eine unzureichende Selektion an. Eine mögliche Ursache lag in degradierten Antibiotika. Da andere Platten der gleichen Chargen aber funktional waren, ist diese Möglichkeit höchst unwahrscheinlich und nahezu auszuschließen. Auch wurden mehrere Antibiotika zur Selektion eingesetzt. Rifampicin war stets im Ansatz, da *A. tumefaciens* der Stämme GV3101 und LBA4404 eine genomisch codierte Resistenz besitzen. Auch eine Selektion auf die Resistenz des Helferplasmids wurde mit Gentamycin und Kanamycin für pMP90RK bzw. Streptomycin für pAL4404 angelegt. Schließlich fand mittels Ampicillin bzw. Carbenicillin eine Selektion auf die Resistenz der binären Plasmide statt. Das Wachstum eines Bakterienrasens ließ sich so auf zwei Arten erklären. Entweder hatten die verwendeten *A. tumefaciens* im großen Maßstab eine Resistenz gegen Ampicillin bzw. Carbenicillin aufgenommen oder aber es lagen andere, mehrfach resistente Bakterien vor, die die Kulturen kontaminierten.

Trotz dieser Probleme war es möglich, nach Transformationen einzelne Kolonien zu generieren (siehe 3.2). Der Erfolg dieser Transformationen von *A. tumefaciens* wurde zunächst durch eine In-Cell-PCR mit den Primern Lfor und KDELrev nachgewiesen. Durch die Verwendung ganzer Bakterien als Template waren solche PCRs aber sehr störungsanfällig und lieferten häufig nur schwache oder gar keine Banden (siehe 3.2). Zusätzlich konnten in diesen PCR-Analysen durch unspezifische Primerbindungen verschiedene DNA-Fragmente amplifiziert werden. Je größer das eingesetzte Template war, desto höher war die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Primerbindung. So entstanden gerade bei einer In-Cell-PCR aufgrund des inhomogenen Templates oft eine Vielzahl von Banden (siehe 3.2). Aus diesem Grund konnte das Vorhandensein einer Bande der richtigen Größe nicht als einziger Nachweis dienen. Eine Restriktionsanalyse analog zum Nachweis in *E. coli* (siehe 4.5.1) konnte bei *A. tumefaciens* nicht durchgeführt werden, da eine selektive Isolation von Plasmiden hier nicht möglich war. Unter Verwendung des Protokolls zur Isolation von Plasmiden aus *E. coli* wurde bei *A. tumefaciens* zeitgleich auch genomische DNA isoliert (siehe 2.4.1.2). Ein zuverlässiger Nachweis des binären Plasmids erfolgte durch einen Southern Blot.

Es zeigten sich jedoch oft Schwierigkeiten in der Anzucht der *A. tumefaciens*. Bakterien, die auf Festmedium Kolonien bildeten, waren nicht immer befähigt, auch in Flüssigmedium zu wachsen (siehe 3.2). Dieses Phänomen zeigte sich auch in anderen am IMBIO durchgeführten Arbeiten. Es wurden gute Erfahrungen mit einer Anzucht in LB- statt YEB-Medium (Rehker, unpublizierte Daten) oder einer Anzucht ohne Rifampicin in der Flüssigkultur (Stahnke, 2004) gemacht. Im Verlauf dieser Arbeit wurde ebenfalls durch Weglassen einzelner Selektionsantibiotika versucht, ein Wachstum der entsprechenden Bakterien zu induzieren. Dies blieb jedoch ohne Erfolg. Andere Medien, wie zum Beispiel LB wurden im Verlauf dieser Arbeit nicht getestet.

Da auch keinerlei Aussagen über die Funktionalität von *A. tumefaciens* mit solch aberrantem Wachstumsverhalten getroffen werden konnten, war es zu risikoreich, mit entsprechenden Bakterien weiterzuarbeiten. Nach einiger Zeit konnte in diesen Bakterien das PCR-Signal zum Nachweis des Immuntoxingens nicht mehr generiert werden (siehe 3.2). So hatten die Bakterien nicht nur ihre Fähigkeit zum Wachstum in Flüssigkulturen verloren, sondern auch das zunächst vorhandene Signal auf das Immuntoxingen. Ihre Fähigkeit, auf Festmedium unter Selektionsdruck zu wachsen, behielten die Bakterien stets bei, und sie konnten auf neues Festmedium umgeimpft werden. Für dieses Verhalten konnte weder eine Erklärung noch eine Lösung zur Abhilfe gefunden werden. Schließlich wurden nur solche Bakterien weiter verwendet, die in YEB-Flüssigkulturen unter Selektionsdruck zu wachsen vermochten. Aber auch bei diesen zeigten sich Bakterienklone, in denen eine Isolation der DNA nicht möglich war (siehe 3.2.2). Auch die Weiterarbeit mit solchen Bakterien wäre zu unsicher gewesen, so dass entsprechende Klone verworfen wurden.

Lediglich *A. tumefaciens* des Stamms GV3101 konnten mit einem der drei bearbeiteten Plasmide (pPAMSARK) erfolgreich und dauerhaft transformiert werden (siehe 3.2). Da eine Weiterarbeit nur mit diesen normal wachstumsfähigen und nachweislich transgenen *A. tumefaciens* sinnvoll war, waren allein diese Bakterien von Interesse. Im durchgeführten Southern Blot zeigten jedoch nicht alle untersuchten Bakterienklone die richtige Bande. Eventuell gab es auch hier Bakterien, die sich des Immuntoxingens bereits wieder entledigt hatten. Auch könnte das in der In-Cell-PCR generierte Signal ein Artefakt gewesen sein, welches durch unspezifische Primerbindungen zustande gekommen war. Dies zeigte eindrucksvoll die Notwendigkeit einer solchen weiteren Überprüfung neben der PCR. Einer der Klone, der das Immuntoxingen nachweislich enthielt, wurde nun zur Transformation von Pflanzen bereitgehalten. Aufgrund der schlechten Erfahrungen, die zuvor mit den *A. tumefaciens* gemacht worden waren, wurde vor jeder Pflanzentransformation die Transgenität dieser Bakterien durch eine neue In-Cell-PCR überprüft. Diese PCR war stets erfolgreich und lieferte die Bande der gewünschten Größe. Demzufolge sind die hergestellten *A. tumefaciens* dieses Klons stabil transgen und zur Transformation von Pflanzen geeignet.

## 4.6 Arbeiten mit Pflanzen

### 4.6.1 *Nicotiana tabacum*

Zur Transformation von Tabak wurden Blattstücke von steril angezogenen Pflanzen mit transgenen *A. tumefaciens* kokultiviert (siehe 2.3.2.1). Zellen an den Wundrändern konnten transformiert werden, danach Kalli bilden und schließlich zu kleinen Pflanzen regenerieren (siehe 4.3). Die Kallusinduktion und die Regeneration liefen unter Selektionsdruck ab, so dass nur solche Pflanzen entstehen konnten, die durch die Transformation das entsprechende Resistenzgen erworben hatten. Aufgrund der Anordnung in der Expressionskassette mit dem Resistenzgen an der Left Border und dem Zielgen an der Right Border sprach dies für das zusätzliche Vorhandensein des Immuntoxingens (siehe 3.3). Wie in Bakterien auch (siehe 4.5) ist aber das alleinige Wachstum auf Selektionsmedium kein ausreichender Beweis für die Anwesenheit des Immuntoxingens. So wurde auch hier ein zusätzlicher Nachweis durch eine PCR erbracht. Eine In-Leaf-PCR analog zu einer In-Cell-PCR bei Bakterien war leider nicht funktional, so dass vor Durchführung der PCR stets eine DNA-Isolation vorgenommen werden musste. In der F<sub>0</sub>-Generation konnte mit den Primern Lfor und KDELrev in 13 von 17 unter Selektionsdruck wachsumsfähiger Pflanzen das Gen für das Immuntoxin nachgewiesen werden. In den übrigen Pflanzen war dies nicht möglich (siehe 3.3.3.1). Unter Umständen wurde in diesen trotz der gewählten Anordnung in der Expressionskassette ausschließlich das Resistenzgen in das Genom der Pflanze eingebaut. Wahrscheinlicher sind jedoch Modifizierungen der DNA im Bereich des Immuntoxingens, welche einen Nachweis durch diese PCR unmöglich machten.

Da die Pflanzen der F<sub>0</sub>-Generation direkt durch eine Transformation mit *A. tumefaciens* entstanden waren, wäre es möglich, dass sich in diesen noch transgene Bakterien befanden. Dies sollte zwar durch eine Behandlung mit Cefotaxim während der Kallusbildung und der Regeneration verhindert werden (siehe 2.3.2.1), konnte aber letztendlich nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Es musste jedoch sicher gestellt werden, dass das mit den Primern Lfor und KDELrev generierte PCR-Produkt pflanzlichen Ursprungs war. Zur Überprüfung, ob die als Template verwendete DNA mit bakterieller DNA verunreinigt war, wurden weitere PCRs durchgeführt. Hier wurden die Primer rbcfor und rbcback bzw. picAfor und picAback verwendet. Die Primer rbcfor und rbcback hybridisierten im Gen für die große Untereinheit der Ribulosebiphosphat-Carboxylase / Oxygenase (RubisCo) und sollten so in pflanzlicher DNA ein Produkt erzeugen (Shinozaki *et al.*, 1986). In den Isolaten aus allen 17 untersuchten transgenen Tabakpflanzen und dem der nicht transgenen Kontrollpflanze konnte dieses PCR-Produkt generiert werden (siehe 3.3.3.1). Die Primer picAfor und picAback hybridisierten hingegen in der DNA aus *A. tumefaciens* (Rong *et al.*, 1991). Hier sollte somit nur bei einer Kontamination mit Bakterien-DNA ein PCR-Produkt entstehen. Dieses entstand in keiner der DNA-Isolationen (siehe 3.3.3.1). Auf diese Weise konnte der Beweis erbracht werden, dass die isolierte Pflanzen-DNA nicht mit DNA aus *A. tumefaciens* verunreinigt vorlag. Somit musste das in der PCR mit den Primern Lfor und KDELrev generierte Signal pflanzlichen Ursprungs sein (siehe 3.3.3.1).

Da PCRs stets sehr störungsanfällig sind und auch durch unspezifische Primerbindungen Produkte entstehen können, reichten diese geglückten PCRs als alleiniger Nachweis nicht aus (siehe 4.5). Analog zu den Arbeiten mit *A. tumefaciens* (siehe 4.5.2) wurde ein Southern Blot durchgeführt. Dieser schlug aber auch bei Verwendung sehr großer Mengen an DNA fehl (siehe 3.3.3.1). Unter Umständen spielten auch hier Modifizierungen der DNA eine Rolle, die eine Hybridisierung der Sonde verhinderten. Eventuell war die eingesetzte Menge an DNA aber auch noch immer zu gering. Eine Alternative wäre, die eingesetzte Sonde radioaktiv zu markieren. Auf diese Weise könnte die Sensitivität des Southern Blot auf ein Vielfaches gesteigert werden (Sambrook & Russell, 2001). In dieser Arbeit wurde jedoch ein anderer Weg des Nachweises gewählt. Das mit den Primern Lfor und KDELrev entstandene PCR-Produkt wurde sequenziert und so als Immuntoxingen identifiziert. Diese Identifikationen wurden exemplarisch bei drei Pflanzen durchgeführt. Da alle diese Sequenzierungen dem gewünschten Immuntoxingen entsprachen, wurde geschlossen, dass auch in den übrigen Pflanzen, in denen das PCR-Produkt erhalten worden war, das Immuntoxingen vorlag.

In den transgenen Pflanzen konnte zusätzlich zum Vorkommen des Immuntoxingens auf DNA-Ebene die Expression dieses Fremdgens durch einen Nachweis entsprechender mRNA untersucht werden. Da mit dem 35SS P ein Promotor gewählt worden war, der in allen Gewebetypen über die gesamte Entwicklung der Pflanze aktiv ist, konnten das Gewebe und der Zeitpunkt der Präparation frei gewählt werden. So wurde in dieser Arbeit die mRNA aus Blättern adulter Pflanzen präpariert (siehe 2.4.2.1). Dies geschah durch Bindung des Poly-A-Schwanzes der mRNA an die Oligotex-Suspension des verwendeten Kits (siehe 2.4.2.1). Das Vorkommen dieses Poly-A-Schwanzes ist für eukaryotische mRNA charakteristisch (Gros *et al.*, 1961). So konnten Verunreinigungen durch DNA oder bakterielle RNA nahezu ausgeschlossen werden. Da RNA oft instabil ist und RT-PCRs störungsanfällig sind, musste ein Gen gefunden werden, welches als Positivkontrolle für die RT-PCRs fungieren konnte. Dieses sollte eine konstitutive Expression in den Blättern zeigen. Das auf DNA-Ebene als Positivkontrolle verwendete Gen für die große Untereinheit der RubisCo ist hier nicht geeignet. Dieses liegt im Plastom, so dass keine mRNA mit Poly-A-Schwanz synthetisiert wird, welche mit dem verwendeten Kit aufgereinigt werden könnte. Stattdessen wurde als Positivkontrolle das Gen für ein Aktin verwendet. Dieses wird konstitutiv exprimiert (An *et al.*, 1996). Die Expression kann jedoch durch äußere Reize beeinflusst werden. Nach einem Hitzeschock beispielsweise werden nur noch 10 % der ursprünglichen Transkriptionsrate erreicht (Volkov *et al.*, 2003). Doch auch eine herunterregulierte Expression kann durch eine RT-PCR nachgewiesen werden. Im Tabak besitzt das Gen für das Aktin ein Intron (Thangavelu *et al.*, 1993). So entstehen auf DNA- und auf mRNA-Ebene PCR-Produkte unterschiedlicher Größe und eine direkte Unterscheidung, ob DNA oder RNA vorliegt, ist möglich. Leider konnte nicht in allen untersuchten Pflanzen ein RT-PCR-Produkt für das Gen für Aktin generiert werden (siehe 3.3.3.2). Das Fehlen dieses Produkts ließ auf Fehler in der RNA-Präparation oder der RT-PCR schließen. So konnte abschließend nicht für jede der untersuchten Pflanzen eindeutig entschieden werden, ob das Immuntoxingen transkribiert wurde

oder nicht. Nichtsdestotrotz war in vier Tabakpflanzen ein Nachweis möglich. Dies sind die ersten dokumentierten Fälle der Expression eines Immuntoxingens in ganzen Pflanzen.

Um den stabilen Einbau und die Vererbung des Immuntoxingens zu testen, wurden durch Selbstbefruchtung Samen erzeugt (siehe 3.3.1). Bei einer Vererbung der Fremdgene nach den Mendelschen Gesetzen (Mendel, 1866) wurde erwartet, dass etwa drei Viertel aller Samen das Resistenzgen *nptII* trugen und somit unter Selektionsdruck keimen konnten. Diese These wurde durch Anzucht einer F<sub>1</sub>-Generation unter Selektionsdruck überprüft. Hier vermochten jedoch nahezu alle Samen zu keimen, sogar die der nicht transgenen Kontrollpflanze 0 (siehe 3.3.2). Einzig die Samen der Linie 2 zeigten ein sehr viel schlechteres Keimungsverhalten als die übrigen. Diese abweichende Fitness der Samen könnte verschiedene Gründe haben. Beispielsweise könnten die Samen dieser Pflanze zu früh geerntet worden sein, so dass einige von ihnen noch nicht komplett ausgereift waren. Ein Einfluss des Selektionsantibiotikums konnte sowohl bei der Verwendung von Kanamycin als auch bei der Verwendung von G-418 erst beim Übergang vom Zweiblatt- in das Vierblatt-Stadium beobachtet werden. Dieses Phänomen der verzögerten Selektion wurde auch in anderen Arbeiten beobachtet (Boehm, 1999). Während die Pflänzchen mit der nicht transgenen Elterpflanze restlos im Zweiblattstadium verharrten und kein weiteres Wachstum zeigten, erreichten die Pflänzchen mit transgenen Elterpflanzen zum großen Teil das Vierblattstadium. Eine Auszählung dieser Pflanzen war in dieser Arbeit leider nicht möglich (siehe 3.3.2). Dennoch kann die Selektion als geglückt bezeichnet werden. Es wurde gezeigt, dass jede transgene Elterpflanze das Resistenzgen auf einen Teil der Pflänzchen der F<sub>1</sub>-Generation vererben konnte (siehe 3.3.2). Da Resistenzgen und Immuntoxingen auf einer T-DNA lagen und sich somit höchstwahrscheinlich direkt hintereinander im Genom der transgenen Pflanzen befanden, ist eine Aufspaltung derselben unwahrscheinlich. Folglich ist mit dem Vorkommen des Immuntoxingens in den unter Selektionsdruck wachstumsfähigen Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation zu rechnen.

Ein Nachweis dieses Gens sollte wie auch schon in der F<sub>0</sub>-Generation durch eine PCR erfolgen. Hier wurden je zwei bzw. fünf Pflanzen pro Linie bearbeitet (siehe 3.3.3.1). Die Pflanzenlinien mit nachweislicher Expression in der F<sub>0</sub>-Generation waren von besonderem Interesse, da in diesen Linien das Immuntoxingen offensichtlich an einem für die Expression günstigen Ort eingebaut worden war. Die PCR mit den Primern Lfor und KDELrev führte jedoch in allen untersuchten Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation nicht zum Erfolg. In den meisten Pflanzen konnte das Immuntoxingen aber über eine Nested PCR mit den Primern ttfor und ttrev3 nachgewiesen werden. Ausnahmen waren die fünf Pflanzen der Linie 6 und je eine der Linien 12 und 15 (siehe 3.3.3.1). So konnte das Immuntoxingen in der F<sub>1</sub>-Generation auch in solchen Pflanzen nachgewiesen werden, in deren Elterpflanze der Nachweis fehlgeschlagen war. Dies bestätigte den Verdacht, dass das Immuntoxingen in allen 17 Pflanzen der F<sub>0</sub>-Generation vorgelegen hatte. Die Nested PCR war in der F<sub>0</sub>-Generation nicht durchgeführt worden. Eventuell wäre mit diesem Hilfsmittel ein Nachweis des Immuntoxingens auch in den verbliebenen vier Pflanzen der F<sub>0</sub>-Generation möglich gewesen. Die Tatsache, dass in der F<sub>1</sub>-Generation keine direkte Primerbindung der an das Immuntoxingen bindenden Primer Lfor und KDELrev möglich war, ließ auf starke Modifizierungen im Bereich dieses Gens schließen. So wurde das Immuntoxingen vererbt, lag aber in der F<sub>1</sub>-Generation

überwiegend in einem anderen Zustand vor als in der F<sub>0</sub>-Generation. Diese Modifizierungen könnten unter Umständen Konsequenzen auf eine Expression des Gens haben.

Es wurde angenommen, dass das Immuntoxingen auch in den Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation vorlag, in denen durch eine Nested PCR kein Signal generierbar war. Eventuell war in diesen auch der weiter außen liegenden Bereich so modifiziert, dass auch die Primer *ttfor* und *ttrev3* nicht binden konnten. Eine andere Alternative wäre, dass die weiter außen liegenden Bereiche, in denen *ttfor* und *ttrev3* hätten binden sollen, in dieser Pflanze nicht vorlagen, das Immuntoxingen aber doch. Da schon die F<sub>0</sub>-Generation frei von *A. tumefaciens* war, konnte auf die Kontrollen, ob die isolierte pflanzliche DNA der F<sub>1</sub>-Generation mit bakterieller DNA aus transgenen *A. tumefaciens* kontaminiert war, verzichtet werden.

Auch in den Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation wurde die Expression des Immuntoxingens auf mRNA-Ebene untersucht. Wie schon bei den Untersuchungen auf DNA-Ebene wurde ein größeres Augenmerk auf die Linien gelegt, in denen bereits in der F<sub>0</sub>-Generation eine Expression hatte nachgewiesen werden können. Da der günstige Ort des Einbaus vererbt wird, war auch in den entsprechenden Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation mit einer aktiven Expression zu rechnen. Auch hier wurde als Positivkontrolle wieder das Gen für Aktin gewählt. Eine Expression dieses Gens konnte in allen untersuchten Pflanzen nachgewiesen werden. So waren hier die RNA-Isolationen und die RT-PCRs im Gegensatz zu den Versuchen in der F<sub>0</sub>-Generation stets erfolgreich. Die Expression des Immuntoxingens konnte in Pflanzen aus fünf verschiedenen Linien nachgewiesen werden. Die Elterpflanzen von zwei dieser Linien hatten bereits eine Expression gezeigt. Die weiteren positiv getesteten Pflanzen entstammten drei Linien, die in der F<sub>0</sub>-Generation kein Signal geliefert hatten. Eine sehr starke Expression sowohl in der F<sub>0</sub>-Generation als auch in allen untersuchten Pflanzen der F<sub>1</sub>-Generation zeigten die Pflanzen der Linie 6 (siehe 3.3.3.2). Gerade diese Pflanzen hatten in der F<sub>1</sub>-Generation auf DNA-Ebene kein Signal auf das Immuntoxingen gezeigt. Eine Erklärung für diesen Sachverhalt konnte nicht gefunden werden.

Um das Immuntoxin in den transgenen Tabakpflanzen nachweisen zu können, wurden Proteinextrakte hergestellt. Durch die Verwendung des konstitutiv starken Promotors 35SS P zur Expression des Immuntoxingens sollte die Wahl des Gewebes keine Rolle spielen (siehe 3.3.3.2). Als Ausgangsmaterial wurden auch hier adulte Tabakblätter verwendet. Aufgrund der nachweisbaren Expression des Immuntoxingens in einem Teil der Pflanzen, sollte zumindest in diesen nachweisbare Mengen an Zielprotein extrahiert werden können. In der F<sub>0</sub>-Generation wurde die Fruchtreife vor der Proteinextraktion abgewartet, damit Samen zur Anzucht einer F<sub>1</sub>-Generation gewonnen werden konnten (siehe 3.3.4). Nach der Fruchtreife begannen die Pflanzen jedoch recht schnell zu welken. Bekanntermaßen sinkt der Proteingehalt in Blättern durch höhere Turnover-Raten, wenn diese seneszent werden (Teli & Timko, 2004). So wurde in der F<sub>1</sub>-Generation die Proteinisolation in früheren Entwicklungsstadien durchgeführt und auf die Erzeugung von Samen zur Anzucht einer F<sub>2</sub>-Generation verzichtet.

In der F<sub>0</sub>-Generation wurde ein sehr aufwändiges Proteinisolutions- und Aufreinigungsprotokoll verwendet, welches in der RWTH Aachen zur Aufreinigung pflanzlicher Proteine mit His<sub>6</sub>-Tag erstellt worden war (siehe 2.5.1.1). Es wurde stets Pflanzenmaterial von Pflanzen aus ähnlichen



Entwicklungszuständen (kurz nach der Fruchtreife) verwendet. Nach der Extraktion schloss sich eine Aufreinigung über Ni-NTA-Säulen an, deren Ni<sup>2+</sup>-Ionen durch die His<sub>6</sub>-Tags der Immuntoxine komplexiert werden sollten. Leider wurden in der F<sub>0</sub>-Generation die Rohextrakte nicht untersucht. Daher konnte die Möglichkeit, dass die Proteine während der Aufreinigung verloren gingen, nicht ausgeschlossen werden. Die an die Säule gebundenen Proteine wurden durch Lösungen mit ansteigenden Imidazolkonzentrationen fraktioniert eluiert (siehe 2.5.2.1). So wurden in den ersten Fraktionen schwach gebundene Proteine erwartet, die unspezifisch an die Säule gebunden hatten. Deren Menge sollte in allen untersuchten Pflanzen in ähnlichen Bereichen liegen. Es fanden sich in den Extrakten der unterschiedlichen Pflanzen jedoch sehr unterschiedliche Mengen an Protein. Diese Methode der Aufarbeitung und Aufreinigung schien also im Ganzen nicht sehr zuverlässig zu sein. In den späteren Fraktionen sollten schließlich die über ihr His<sub>6</sub>-Tag fest verbundenen Immuntoxine folgen. In diesen Fraktionen zeigten sich jedoch in allen bearbeiteten Pflanzen nur geringe Proteinkonzentrationen. Somit schien der Hauptteil der von der Ni-NTA-Säule eluierten Proteine nicht dem Immuntoxin zu entsprechen. In den späten Fraktionen der nicht transgenen Kontrollpflanze 0 wurden geringe Konzentrationen an Protein erwartet. Überraschenderweise wurden hier aber vergleichsweise hohe Proteinkonzentrationen festgestellt (siehe 3.3.4.1). Da diese Proteine nicht dem Immuntoxin entsprechen konnten, handelte es sich wahrscheinlich auch bei den aus den anderen Pflanzen aufgereinigten Proteinen überwiegend nicht um das Immuntoxin.

Nun sollte untersucht werden, welchen Aufreinigungseffekt die Ni-NTA-Säulen bewirkt hatten. Die Elutionsfraktionen verschiedener Pflanzen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. In den Elutionen konnten weit weniger Proteinbanden als im Durchlauf detektiert werden. Es zeigte sich jedoch keine Bande bei etwa 45 kDa, welche dem Immuntoxin hätte entsprechen können. Auch waren keine signifikanten Unterschiede im Bandenmuster der Fraktionen der transgenen im Vergleich zu denen der nicht transgenen Tabakpflanze zu entdecken (siehe 3.3.4.2). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass sich eine große Menge des Zielproteins aufgrund von Glykosylierungen bei einem von 45 kDa abweichenden Molekulargewicht in den Gelen befand. Dennoch sollte ein immunchemischer Nachweis erfolgen, welcher das Zielprotein auch in geringen Konzentrationen nachweisen kann. Durch das am Immuntoxin befindliche His<sub>6</sub>-Tag kann eine Detektion mit kommerziell erhältlichen Antikörpern erreicht werden. In einem Dot Blot kann so sehr schnell die Bindung dieses Antikörpers an ein oder mehrere Proteine aus den Blattextrakten nachgewiesen werden. In einem Western Blot können diese Signale Proteinen bestimmter Größe zugeordnet werden.

In der F<sub>0</sub>-Generation konnte nach erfolgter Aufreinigung durch Ni-NTA im Dot Blot zunächst kein Nachweis des Immuntoxins in den Extrakten erfolgen. Einzig nach einer weiteren Konzentrierung durch das Fällern mit Ethanol konnte in den Fraktionen einiger Pflanzen eine Blaufärbung erzielt werden. Dies gelang sogar auch in solchen Pflanzen, in denen keine mRNA für das Immuntoxin nachweisbar gewesen war. Die Extrakte mit der stärksten Blaufärbung gingen beispielsweise auf eine solche Pflanze (Pflanze 14) zurück (siehe 3.3.4.3). Mit den Extrakten der Pflanzen 6 und 13 konnte wegen Materialmangels leider kein Dot Blot durchgeführt werden (siehe

3.3.4.3). Dies ist besonders bei der Pflanze 6 sehr ärgerlich, da in dieser Linie sowohl in der F<sub>0</sub>- als auch in der F<sub>1</sub>-Generation die Expression des Immuntoxins nachgewiesen werden können. Die Kontrollpflanze 0 zeigte wie erwartet im Dot Blot kein Signal. Dies ließ darauf schließen, dass die generierten Signale tatsächlich von dem Immuntoxin herrührten und somit geringe Konzentrationen an Zielprotein in den transgenen Pflanzen vorlagen. Ein Western Blot konnte hier nicht durchgeführt werden, da die Proteinkonzentrationen in den einzelnen Proben nach der Fällung zu hoch waren. Eine Auftrennung über SDS-PAGE konnte nicht mehr erfolgen, da durch die hohe Ionenstärke der Aufbau eines elektrischen Feldes mit Leit- und Folgeionen nicht möglich war. So zeigte sich nach dem Versuch einer SDS-PAGE nur ein verschmiertes Bild (siehe 3.3.4.3). Diese Ergebnisse implizieren entweder eine äußerst schwache Proteinsynthese oder einen schnellen Abbau des Immuntoxins. Die vorliegende mRNA des Immuntoxins muss nicht auch automatisch translatiert werden. Es wäre möglich, dass trotz der detektierbaren mRNA gar kein oder nur wenig Immuntoxin synthetisiert wurde. Durch diese Art des Silencing könnte die Pflanze versuchen, sich vor der Toxizität des Immuntoxins zu schützen. Auch ein schneller Abbau des Proteins ist nicht unwahrscheinlich. Die Halbwertszeit eines Proteins in lebenden Kulturen und dessen Stabilität nach der Extraktion kann berechnet werden (Gasteiger *et al.*, 2005). Die theoretisch ermittelte Halbwertszeit für das produzierte Immuntoxin liegt in Säuger-Retikulozyten bei 5,5 h, in Hefen bei 3 min und in *E. coli* bei 2 min. Leider können keine genauen Vorhersagen über die Halbwertszeit von Proteinen in Pflanzenzellen getroffen werden. Es kann nur spekuliert werden, dass diese auch dort nicht viel höher liegt. So kann von einem recht schnellen Abbau des Proteins in den Pflanzenzellen ausgegangen werden. Der errechnete Instabilitätsindex liegt bei 45,49. Dies klassifiziert das Immuntoxin als instabil in Proteinextrakten. Folglich ist auch nach der Extraktion von einem schnellen Abbau des Proteins auszugehen.

Durch die Entwicklung eines eigenen Extraktionsprotokolls in der F<sub>1</sub>-Generation (siehe 2.5.1.2) wurde versucht, den Ablauf zu beschleunigen. Auf diese Weise sollte die mögliche Instabilität des Zielproteins nicht so sehr ins Gewicht fallen. Es stand ausschließlich Material von Pflanzen der vier transgenen Linien zur Verfügung, in denen in der F<sub>0</sub>-Generation eine nachweisliche Expression des Immuntoxins stattgefunden hatte. Von jeder dieser Linien wurden drei verschiedene Pflanzen bearbeitet. In dem zunächst durchgeführten Dot Blot konnten in den durch Ni-NTA-Säulen aufgereinigten Fraktionen der Pflanzen der Linie 6 Signale detektiert werden. Im Rohextrakt dieser Pflanzen fanden sich diese Signale nicht (siehe 3.3.4.3). Dies zeigte eindrucksvoll, dass die Aufreinigung und Konzentrierung des Zielproteins durch die Ni-NTA-Säule nötig gewesen war, um die Nachweisgrenze zu überschreiten. Im Vergleich zu den Extrakten der F<sub>0</sub>-Generation, lagen hier aber dennoch höhere Konzentrationen an Zielprotein vor, da hier eine weitere Konzentrierung durch das Fällen mit Ethanol nicht nötig gewesen war. Dies könnte zum einen in einer höheren Proteinkonzentration in den bearbeiteten Pflanzen begründet sein, denn schließlich konnte in der F<sub>0</sub>-Generation der Extrakt der Pflanze 6 nicht im Dot Blot bearbeitet werden. Ein zweiter Grund könnte in der besseren Eignung des selbst entwickelten Protokolls zur Proteinextraktion liegen. Dennoch konnte auch hier das positive Signal des Dot Blots nicht durch einen Western Blot einem Protein bestimmter Größe zugeordnet werden. So muss auch hier von

einem raschen Abbau des Proteins aufgrund fehlender Stabilität ausgegangen werden. Abhilfe könnte eine Optimierung der Lagerungsbedingungen schaffen. Für Angiogenin ist beispielsweise bekannt, dass eine Zugabe von Aprotinin dessen Stabilität erhöht (Porter *et al.*, 2001). Aus diesem Grund testen aktuelle Versuche am IMBIO einen Effekt von Aprotinin auf Immuntoxine mit Angiogenin als Toxindomäne (Friedrich, unpublizierte Daten).

#### 4.6.2 *Wolffia australiana* und *Wolffia brasiliensis*

Auch die Transgenität von Zwerglinsen kann durch Wachstum auf Selektionsmedium nachgewiesen werden. Nach Transformationen mit den in dieser Arbeit hergestellten Plasmiden sollten die Pflanzen das Resistenzgen *nptII* gegen Antibiotika wie Kanamycin, G-418 oder Paromomycin tragen. Aufgrund der primären Erzeugung von Chimären durfte der Selektionsdruck aber erst nach einiger Zeit angelegt werden (siehe 4.2). Die Konzentration des zugegebenen Antibiotikums war durch Pflanzen der Art *W. australiana* evaluiert und auf 10 µg/ml G-418 festgelegt worden. Diese Menge führte zuverlässig zum Tod aller behandelten Pflanzen (siehe 3.4.1). Es war bekannt, dass Zwerglinsen der Art *W. brasiliensis* im Allgemeinen ein im Vergleich zu *W. australiana* sensitiveres Verhalten auf äußerlich applizierten Stress zeigen (Friedrich, 2005). Daher wurde postuliert, dass auch Pflanzen der Art *W. brasiliensis* durch die Applikation von 10 µg/ml G-418 abgetötet würden. Unterschiedliche Fitnesslevels von Zwerglinsen in den Laborkulturen sind jedoch ein oft zu beobachtendes Phänomen (Friedrich, 2005). So konnte in zu späteren Zeiten am IMBIO durchgeführten Versuchen durch Zugabe von 10 µg/ml G-418 ein komplettes Absterben von Kulturen von *W. australiana* nicht mehr erreicht werden (Tran & Boehm, unpublizierte Daten).

Dennoch starben die meisten der *W. brasiliensis*, die in dieser Arbeit einer Selektion unterworfen wurden. Nur wenige verblieben grün und vital (siehe 3.4.2.1), was auf eine sehr erfolgreich verlaufene Selektion schließen ließ. Nach einiger Zeit zeigte sich jedoch, dass keine der Zwerglinsen aus der Selektion dauerhaft überleben konnte (siehe 3.4.2.1). Unter Umständen handelte es bei den zunächst verbliebenen Pflanzen um Chimären, die im Vergleich zu den nicht transgenen Pflanzen ein verzögertes Absterben zeigten. Eventuell wirkte sich aber auch das häufige Umsetzen, das während der Selektion erfolgen musste (siehe 4.2), letal aus. Interessanterweise konnte auch kein Nachweis für eine Expression des Immuntoxins erbracht werden (siehe 3.4.2.1). Auch dies könnte theoretisch in einer fehlgeschlagenen Selektion, die nicht transgene Pflanzen überleben ließ, begründet sein. Wahrscheinlicher ist jedoch ein Silencing des Fremdgens. Angiogenin könnte als RNase toxisch auf die produzierenden Zellen wirken, so dass ein Abschalten der Expression des entsprechenden Gens vorteilhaft für die Zwerglinse sein könnte. Ein Nachweis auf DNA-Ebene wäre hier interessant, da dieser im Allgemeinen auch bei Genen, die nicht exprimiert werden, möglich ist (siehe 4.6.1). In durch *A. tumefaciens* transformierten Zwerglinsen kann aber so kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden, weil sich die transgenen Bakterien auch Generationen später noch immer in den Pflanzen befinden können. Eine

Entfernung dieser Bakterien ist auch durch eine Infiltration von Antibiotika in die Zwerglinsen nicht zu erreichen (Hetzl, 2005). So kann durch die in den *A. tumefaciens* befindlichen binären Plasmide die DNA des Immuntoxingens auch in nicht transformierten Pflanzen, die transgene Bakterien beherbergen, nachgewiesen werden.

Da bei den Zwerglinsen im Gegensatz zum Tabak keine spezifische Präparation der mRNA stattgefunden hatte, sondern die gesamte RNA isoliert wurde (siehe 2.4.2.2), konnten Kontaminationen mit RNA aus Bakterien oder DNA vorliegen. Es ist bekannt dass der 35S Promotor, dessen verstärkte Form 35SS P in dieser Arbeit Verwendung fand, auch in Bakterien zu einem geringem Level an Expression führen kann (Assaad & Signer, 1990). So könnten unter Umständen auch *A. tumefaciens* das Gen für das Immuntoxin exprimieren. An RNA aus Bakterien befindet sich jedoch nie ein Poly-A-Schwanz, welcher für mRNA aus Eukaryoten charakteristisch ist (Gros *et al.*, 1961). So ist es möglich, selektiv nur die aus den Zwerglinsen stammende mRNA zu untersuchen, wenn bei der Reversen Transkription ein dort bindender Primer (Oligio(dT)18) verwendet wird. Eine mögliche Kontamination der Probe mit DNA musste durch eine PCR direkt auf die präparierte RNA ausgeschlossen werden. Hier entstand im Gegensatz zu der PCR nach erfolgter Reversen Transkription kein Signal. Eine Positivkontrolle analog zu dem Gen für Aktin im Tabak (siehe 4.6.1) wäre auch hier wünschenswert. Versuche mit den Primern actfor und actrev in *Wolffia* ein Signal zu generieren, schlugen jedoch fehl. Das Genom von Zwerglinsen ist bislang nicht sequenziert, so dass weder die Sequenz eines Aktins noch die eines anderen Haushaltgens bekannt ist. Aktuelle Versuche am IMBIO streben das Auffinden eines solchen Gens durch die Verwendung degenerierter Primer an (Brodt & Friedrich, unpublizierte Daten).

Um möglichst schnell Daten zur Expression von Immuntoxingenen in *Wolffia* generieren zu können, wurde in späteren Versuchen auf eine Selektion verzichtet (siehe 3.4.2.2). So konnte in mehreren unabhängigen Ansätzen die Expression eines Immuntoxingens in Zwerglinsen nachgewiesen werden (siehe 3.4.2.2).

Ein Nachweis über das Immuntoxins als solches wurde nicht geführt, weil stets nur wenig transgenes Material vorlag. Nachdem die Ausbeuten an Immuntoxin aus *N. tabacum* gering waren und oftmals unter der Nachweisgrenze lagen (siehe 3.3.4), konnte hier nicht mit einer nachweisbaren Menge an Zielprotein gerechnet werden. Neuere Versuche am IMBIO überprüfen diesen Sachverhalt. Auch wenn in diesen Versuchen ebenfalls eine Expression des Immuntoxingens in *W. australiana* nachgewiesen werden konnte, schlugen Nachweise der Proteine über Anti-His<sub>6</sub>-Antikörper fehl (Edler & Friedrich, unpublizierte Daten). Vermutlich lag auch in diesen Versuchen die Menge an Immuntoxin unterhalb der Nachweisgrenze (siehe 4.6.1).

## 4.7 Ausblick

Die im Laufe dieser Arbeit entwickelten Plasmide pPAMBT und pPAMTB (siehe 3.1.2.4) sind aufgrund ihrer Kassettenstruktur außerordentlich vielseitig einsetzbar. Neben den bereits erfolgten Klonierungen zur Expression von Immuntoxinen, OGT und VP2 (siehe 4.4) könnten vielerlei weitere Gene leicht und schnell in diese Plasmide integriert werden. Auch Modifikationen wie das Anfügen bestimmter Tags können aufgrund des Schnittstellenmusters äußerst leicht erfolgen. Die Plasmide bieten somit eine weit bessere Basis für Klonierungsarbeiten zur Erstellung binärer Plasmide mit dem Ziel einer späteren Pflanzentransformation als die üblichen, kommerziell erhältlichen Plasmide. So werden sie auch in einer aktuellen Forschungsarbeit als Grundlage zur Erstellung von Plasmiden, die das Gen für Adiponectin tragen (Hahn, unpublizierte Daten), genutzt. Eine zukünftige Nutzung in vielen weiteren Projekten ist durch ihre bestechend einfache Handhabung sehr wahrscheinlich.

Das System *Wolffia* konnte im Verlauf der Arbeit eindrucksvoll seine grundsätzliche Befähigung zur Expression von Immuntoxinen beweisen. Bezüglich der Transformation, der Selektion und der Proteingewinnung besteht jedoch auch weiterhin Verbesserungsbedarf. Überlebensfähige Protoplasten oder regenerierbare Kalli, die transformiert werden könnten, bräuchten einen wesentlichen Fortschritt hinsichtlich homogen transgener Pflanzen. Bei Beibehaltung der aktuellen Transformationsmethode kann durch die Veränderung verschiedener Parameter (siehe 4.3) versucht werden, die bereits sehr guten Transformationsraten (siehe 1.4.4.2) noch weiter zu verbessern. Hier spielt besonders eine effiziente Selektion, die homogen transgene Pflanzen von den chimären oder nicht transgenen Pflanzen abtrennen kann, eine große Rolle. Aufgrund der hohen Sensibilität der Zwerglinsen bezüglich allelopathisch wirkender Signale ist die Etablierung von Systemen zur frühzeitigen Erkennung, wie beispielsweise durch das IMAGING-PAM, erforderlich. Alternativ kann nach Systemen gesucht werden, die eine Vereinzelung der Pflanzen vor Applikation eines Selektionsdrucks ermöglichen (siehe 4.2).

Schließlich muss eine effiziente Aufreinigung des Zielproteins gewährleistet werden. Proteinextraktions- und Aufreinigungsprotokolle müssen für jedes Protein neu optimiert werden. Auch kann die Möglichkeit einer Sekretion des Zielproteins ins umgebende Medium in Betracht gezogen werden (siehe 4.4). Letztlich wird sich die Konkurrenzfähigkeit des Expressionssystems *Wolffia* vor allem daran zeigen, wie schnell und zu welchem Preis sich eine große Menge des funktionalen Zielproteins generieren lässt. Hier bietet ein eigens für *Wolffia australiana* entwickelter Fermenter eine gute Ausgangsbasis (Rechmann, 2004).

Als Zielproteine zur Expression in *Wolffia* dienen neben Immuntoxinen auch andere Therapeutika. Im Rahmen einer aktuellen Diplomarbeit am IMBIO sollen Antikörper gegen das humane Choriongonadotropin (HCG) in *W. australiana* exprimiert werden (Brodth, unpublizierte Daten). HCG ist ein Hormon, welches in frühen Stadien der Schwangerschaft von der Plazenta produziert wird. Es kann aber auch bei verschiedenen Formen von Krebs beobachtet werden. So existiert für Antikörper gegen dieses Hormon ein breites Anwendungsspektrum. Sie können sowohl in einem Schwangerschaftstest und in der Empfängnisverhütung, als auch in der Diagnose und der Therapie

von Krebs eingesetzt werden (Kathuria *et al.*, 2002). Des Weiteren befasst sich eine aktuelle Doktorarbeit am IMBIO derzeit mit der Produktion des viralen Hüllproteins VP2 ebenfalls in *Wolffia australiana* (Tran, unpublizierte Daten). Dieses kann zur aktiven Immunisierung von Hühnern gegen die infektiöse Bursitis verwendet werden. Eine Impfung der Tiere ist durch orale Aufnahme möglich (Wu *et al.*, 2004a), so dass eine direkte Verfütterung der Zwerglinsen angedacht ist.

In Hinblick auf den Nachweis der in dieser Arbeit synthetisierten Proteine gilt es noch weitere Optimierungsarbeit zu leisten. Alternative Nachweismethoden, zum Beispiel die Verwendung gegen andere Epitope des Immuntoxins gerichteter Antikörper oder die Durchführung eines enzymgekoppelten Immunnachweises (ELISA) könnten Erfolg versprechend sein. Da jedoch offensichtlich ein Hauptproblem in der mangelnden Stabilität des Immuntoxins liegt (siehe 4.6.1), gilt es, verbesserte Aufreinigungs- und Lagerungsprotokolle zu generieren, die einen Abbau des Proteins verhindern (siehe 4.6.1). Alternativ könnte durch Anfügung stabilisierender Tags an den N-Terminus des Proteins eine höhere Stabilität erreicht werden (siehe 4.4). Auch könnte durch eine Codonoptimierung die Translationsrate der Proteine in Pflanzen gesteigert werden (siehe 4.4). Sollen die Pflanzen in großtechnischem Rahmen genutzt werden, ist die Einfügung eines Systems zur Entfernung des Markergens wie zum Beispiel Cre/*lox* wünschenswert (siehe 4.4). Letztendlich müssen die in Pflanzen produzierten Immuntoxine ihre Funktionalität *in vitro* und *in vivo* beweisen. Auch wenn für die Zukunft viele Möglichkeiten zur weiteren Optimierung bleiben, tragen die Ergebnisse dieser Arbeit wesentlich dazu bei, eine Produktion effizienter Immuntoxine in Pflanzen zu verwirklichen.

## 5. Zusammenfassung

Immuntoxine bergen ein großes Potenzial in der Therapie des Hodgkin Lymphoms. Als Zielantigene können hier CD25 und CD30 gewählt werden, welche beide auf den entarteten Reed-Sternberg-Zellen überexprimiert werden. Die murinen Antikörper RFT5 und Ki-4 können spezifisch an diese Oberflächenmarker binden. Es wurden Fusionsgene hergestellt, die die Gene der einzelsträngigen Varianten RFT5(scFv) und Ki-4(scFv) durch Kopplung mit den Genen der Toxindomänen Angiogenin, Granzym B und RTA-N97A verbinden. Auf diese Weise wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene neue Immuntoxinfusionsgene konstruiert. Diese wurden auf genetischer Ebene in ein neu entworfenes Kassettensystem integriert. Dieses ermöglicht den einfachen Austausch aller an der Expression der Gene beteiligten Elemente und der einzelnen Genfragmente selbst. Diese Neuerung ist als wesentliche Vereinfachung für aufbauende Klonierungsarbeiten zu sehen, die eine schnelle Anpassung an wechselnde Ansprüche gewährleistet.

Um eine ökonomische Produktion von wirkungsvollen Immuntoxinen zu ermöglichen, müssen geeignete Produktionssysteme gefunden werden. Pflanzen können posttranslationale Modifizierungen an Proteinen durchführen und weisen niedrige Haltungskosten auf. Somit könnten diese ein ideales Produktionssystem darstellen. In dieser Arbeit wurde die Eignung von Tabak (*Nicotiana tabacum*) und Zwerglinsen (*Wolffia australiana* und *Wolffia brasiliensis*) zur Produktion von Immuntoxinen getestet. Mittels *A. tumefaciens*-vermittelter Transformation wurde beispielhaft ein Immuntoxin, welches für ein Fusionsprotein mit Angiogenin am N-Terminus und RFT5(scFv) am C-Terminus codiert, in die Pflanzen gebracht.

Das Gen konnte nach der Transformation im Genom mehrerer Tabakpflanzen detektiert werden. Auch eine Transkription des Immuntoxins war nachweisbar. Der stabile Einbau und die Vererbung des Fremdgens konnten durch die Erzeugung einer transgenen F<sub>1</sub>-Generation bestätigt werden. Auch hier konnte das Gen auf DNA- und mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Das Immuntoxin selbst konnte in geringen Konzentrationen im Zellextrakt gefunden werden. Es erwies sich jedoch als instabil. In den Zwerglinsen konnten bereits bestehende Transformations- und Selektionsprotokolle weiterentwickelt und optimiert werden. Auf diese Weise konnte in *Wolffia australiana* ebenfalls eine Expression des Immuntoxins nachgewiesen werden. Somit konnten im Verlauf dieser Forschungsarbeit erstmals Immuntoxingene in ganzen Pflanzen exprimiert werden. Die Daten dieser Arbeit bilden somit die Basis zu einer Etablierung dieser innovativen Produktionsmethode von Immuntoxinen.

## 6. Anhänge

Im Folgenden sind die Sequenzen der einzelnen Elemente der Immuntoxininfusionsgene aufgeführt (siehe 6.1). Des weiteren sind hier die Sequenzen der Plasmide pSecTag2 A und pPAM verzeichnet (siehe 6.2), deren Derivate für die Klonierungen verwendet wurden (siehe 3.1). Die Ableitung einiger im Verlauf dieser Arbeit hergestellter Plasmide erfolgt am Ende dieses Kapitels (siehe 6.3).

### 6.1 Klonierungsfragmente

#### 6.1.1 RFT5(scFv)

(Barth *et al.*, 1998)

```

1   caggtgaagc tggaggagtc agggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc cgtgaagatg tcctgcaagg 70
    Q V K L E E S G T V L A R P G A S V K M S C K
71   cttctggcta caggtttacc aactactgga tgcactgggt aaaacagagg cctggacagg gtctagaatg 140
    A S G Y R F T N Y W M H W V K Q R P G Q G L E
141  gattgggtgtt atttatcctg gaaatagtga tactagctac aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg 210
    W I G V I Y P G N S D T S Y N Q K F K G K A K L
211  actgcagtc catccgccag cactgcctac atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcggtct 280
    T A V T S A S T A Y M E L S S L T N E D S A V
281  attactgtac aagagagggga gaaggctctg actactgggg ccaagggacc acggtcaccg tttcctctgg 350
    Y Y C T R E G E G S D Y W G Q G T T V T V S S
351  cggtgggcgg tctgggtggcg gtggctccgg cggtgggcgg tctgacatcc agctgacca gtctccaacc 420
    G G G G S G G G G S G G G G S D I Q L T Q S P T
421  accatggctg catctcccgg ggagaagatc actatcacct gcagtgccag ctcaagtata agttccaatt 490
    T M A A S P G E K I T I T C S A S S S I S S N
491  acttgcattg gtatcagcag aagccaggat tctcccctaa actcttgatt tataggactt ccaatctggc 560
    Y L H W Y Q Q K P G F S P K L L I Y R T S N L
561  ttctggagtc ccagctcgct tcagtggcag tgggtctggg acctcttact ctctcacaat tggcaccatg 630
    A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I G T M
631  gaggctgaag atgttgccac ttactactgc cagcagggta gtagtatacc gtacacgttc gggaccaagc 700
    E A E D V A T Y Y C Q Q G S S I P Y T F G T K
701  tggagctcaa a 711
    L E L K

```

#### 6.1.2 Ki-4(scFv)

(Klimka *et al.*, 1999)

```

1   caggtcaagc tgcaggagtc agggactgaa ctggcaaagc ctggggccgc agtgaagatg tcctgcaagg 70
    Q V K L Q E S G T E L A K P G A A V K M S C K
71   cttctggcta cacctttact gactactgga tgcactgggt taaacagagg cctggacagg gtctggaatg 140
    A S G Y T F T D Y W M H W V K Q R P G Q G L E
141  gattggatac attaatccta aactgctta tactgactac aatcagaaat tcaaggacaa ggccacattg 210
    W I G Y I N P N T A Y T D Y N O K F K D K A T L
211  actgcagaca aatcctccag cacagcctac atgcaactgc gcagcctgac ctctgaggat tctgcagtct 280
    T A D K S S S T A Y M Q L R S L T S E D S A V
281  attactgtgc aaaaaagaca actcagacta cgtggggggt tcctttttgg ggccaagggg ccacggtcac 350
    Y Y C A K K T T O T T W G F P F W G Q G T T V

```



351	cgtctcctca ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcggacat tgtgctgacc	420
	T V S S G G G G S G G G S G G G G S D I V L T	
421	cagtctccaa aatccatggc catgtcagtc ggagagaggg tcaccttgag ctgcaaggcc agtgagaatg	490
	Q S P K S M A M S V G E R V T L S C K A S E N	
491	tggattcttt tgtttcctgg tatcaacaga aaccaggcca gtctcctaaa ctgctgatat acggggcctc	560
	V D S F V S W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y G A	
561	caaccggtag actgggggtcc ccgatcgctt cgcaggcagt ggatctggaa gagatttcac tctgaccatc	630
	S N R Y T G V P D R F A G S G S G R D F T L T I	
631	agcagtgtgc aggctgaaga ccttgacagat tatcactgtg gacagaatta caggatcccg ctcacgttcg	700
	S S V Q A E D L A D Y H C G O N Y R Y P L T F	
701	gtgctggcac caagctggaa atcaaacgg	729
	G A G T K L E I K R	

### 6.1.3 Angiogenin

(Kurachi *et al.*, 1985)

1	caggataact ccaggtagac acacttcctg acccagcact atgatgccaa accacagggc cgggatgaca	70
	Q D N S R Y T H F L T Q H Y D A K P Q G R D D	
71	gatactgtga aagcatcatg aggagacggg gcctgacctc accctgcaaa gacatcaaca catttattca	140
	R Y C E S I M R R R G L T S P C K D I N T F I	
141	tggcaacaag cgcagcatca aggccatctg tgaaaacaag aatggaaacc ctcacagaga aaacctaaga	210
	H G N K R S I K A I C E N K N G N P H R E N L R	
211	ataagcaagt cttctttcca ggtcaccact tgcaagctac atggaggttc cccctggcct ccatgccagt	280
	I S K S S F Q V T T C K L H G G S P W P P C Q	
281	accgagccac agcgggggttc agaaacgttg ttggtgcttg tgaaaatggc ttacctgtcc acttgatca	350
	Y R A T A G F R N V V V A C E N G L P V H L D	
351	gtcaattttc cgtcgtccg	369
	Q S I F R R P	

### 6.1.4 Granzym B

(Sasportes & Tschopp, 1992)

1	atcatcgggg gacatgtggc caagccccac tccgcgccct acatggctta tcttatgatc tgggatcaga	70
	I I G G H V A K P H S R P Y M A Y L M I W D Q	
71	agtctctgaa gaggtgcggt ggcttcctga tacgagacga cttcgtgctg acagctgctc actggtgggg	140
	K S L K R C G G F L I R D D F V L T A A H C W	
141	aagctccata aatgtcacct tgggggcca caatatcaag gaacaggagc cgaccagca gtttatccct	210
	G S S I N V T L G A H N I K E Q E P T Q Q F I P	
211	tgaaaaagag ccatccccca tccagcctat aatcctaaga acttctccaa tgacatcatg ctactgcagc	280
	V K R A I P H P A Y N P K N F S N D I M L L Q	
281	tggagagaaa ggccaagcgg accagagctg tgcagcccct caggctacct agcaacaagg cccagggtgaa	350
	L E R K A K R T R A V Q P L R L P S N K A Q V	
351	gccagggcag acatgcagtg tggccggctg ggggcagacg gccccctgg gaaaacattc acacacacta	420
	K P G Q T C S V A G W G Q T A P L G K H S H T L	
421	caagaggtga agatgacagt gcaggaagat cgaaagtgcg aatctgactt acgccattat tacgacagta	490
	Q E V K M T V Q E D R K C E S D L R H Y Y D S	
491	ccattgagtt gtgcgtgggg gaccagaga ttaaaaagac ttcctttaag ggggactctg gaggcctct	560
	T I E L C V G D P E I K K T S F K G D S G G P	
561	tgtgtgtaac aagggtggccc agggcattgt ctcctatgga cgaaacaatg gcatgcctcc acgagcctgc	630
	L V C N K V A Q G I V S Y G R N N G M P P R A C	
631	accaaagtct caagctttgt aactggata aagaaaacca tgaaacgcta c	681
	T K V S S F V H W I K K T M K R Y	

## 6.1.5 RTA-N97A

(Smallshaw *et al.*, 2003)

```

1   atattcccca aacaataccc aattataaac tttaccacag cgggtgccac tgtgcaaagc tacacaaact 70
    I F P L Q Y P I I N F T T A G A T V Q S Y T N
71  ttatcagagc tgttcgcggt cgtttaacaa ctggagctga tgtgagacat gaaataccag tgttgccaaa 140
    F I R A V R G R L T T G A D V R H Q I P V L P
141 cagagttggt ttgcctataa accaacgggt tatttttagtt gaactctcaa atcatgcaga gctttctggt 210
    N R V G L P I N Q R F I L V E L S N H A E L S V
211 acattagcgc tggatgtcac caatgcatat gtggtcggct accgtgctgg aaatagcgc tatttctttc 280
    T L A L D V T N A Y V V G Y R A G N S A Y F F
281 atcctgacgc tcaggaagat gcagaagcaa tcaactcatct tttcactgat gttcaaaatc gatatacatt 350
    H P D A Q E D A E A I T H L F T D V Q N R Y T
351 cgcctttggt ggtaattatg atagacttga acaacttgct ggtaatctga gagaaaatat cgagttggga 420
    F A F G G N Y D R L E Q L A G N L R E N I E L G
421 aatggtccac tagaggagc tatctcagcg ctttattatt acagtactgg tggcactcag cttccaactc 490
    N G P L E E A I S A L Y Y Y S T G G T N L P T
491 tggctcgttc ctttataaatt tgcattcaaa tgatttcaga agcagcaaga ttccaatata ttgagggaga 560
    L A R S F I I C I N M I S E A A R F Q Y I E G
561 aatgcgcacg agaattaggt acaaccggag atctgcacca gatcctagcg taattacact tgagaatagt 630
    E M R T R I R Y N R R S A P D P S V I T L E N S
631 tgggggagac tttcaactgc aattcaagag tctaaccaag gagcctttgc tagtccaatt caactgcaaa 700
    W G R L S T A I Q E S N Q G A F A S P I Q L Q
701 gacgtaatgg ttccaaattc agtgtgtacg atgtgagtat attaatccct atcatagctc tcatggtgta 770
    R R N G S L F S V Y D V S I L I P I I A L M V
771 tagatgcgca cctccacat cgtcacagtt t
    Y R C A P P P S S Q F 801

```

## 6.1.6 Signalpeptid $\alpha$ -Amylase-Inhibitor (*Phaseolus vulgaris*)

(Hoffmann *et al.*, 1982)

```

1   atggcttccct ccaagttact ctccctagcc ctcttccttg cgcttctcag ccacgcaaac tca 63
    M A S S K L L S L A L F L A L L S H A N S

```

## 6.2 Plasmide zur Klonierung

### 6.2.1 pSecTag2 A

(Invitrogen)

```

1   gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt 70
71  aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggctcgt gagtagtgcg cgagcaaaat ttaagctaca 140
141 acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc ttagggttag gcgctttgcg ctgcttcgcg 210
211 atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc 280
281 attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg 350
351 cccaacgacc cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaaata gggactttcc 420
421 attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 490
491 aagtacgccc cctattgacg tcaatgacg taaatggccc gctggcatt atgcccagta catgacctta 560
561 tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catgggtgatg cgggtttggc 630
631 agtacatcaa tgggogtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa 700
701 tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccg cccattgacg 770
771 caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctgggtaact agagaacca 840
841 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaactatag ggagacccaa gctgggtagc caccatggag 910
    M E

```

911	acagacacac	tctgtctatg	ggtactgctg	ctctgggttc	caggttccac	tggtgacgcg	gcccagccgg	980
	T D T	L L L	W V L L	L W V	P G S	T G D A	A Q P	
981	ccaggcgcg	cgtacgaagc	ttggtaccga	gctcggatcc	actccagtg	ggtggaattc	tgcagatatic	1050
	A R R	A V R S	L V P	S S D	P L Q C	A A T	L L I	
1051	cagcacagtg	gcggccgctc	gaggagggcc	cgaaacaaaa	ctcatctcag	aagaggatct	gaatagcgcc	1120
	L S T V	A A A	R G G	P E Q K	L I S	E E D	L N S A	
1121	gtcgaccatc	atcatcatca	tcattgagtt	taaaccgcgt	gatcagcctc	gactgtgctc	tctagttgcc	1190
	V D H	H H H	H H Stop					
1191	agccatctgt	tgtttgcccc	tccccgtgc	cttccttgac	cctggaaggt	gccactccca	ctgtcctttc	1260
1261	ctaataaaa	gaggaattg	catcgcattg	cttgagttag	tgctattcta	ttctgggggg	tggggtgggg	1330
1331	caggacagca	agggggagga	ttgggaagc	aatagcaggc	atgctgggga	tgcggtgggc	tctatggctt	1400
1401	ctgaggcgga	aagaaccagc	tggggctcta	gggggtatcc	ccacgcgccc	tgtagcgcg	cattaagcgc	1470
1471	ggcgggtgtg	gtggttacgc	gcagcgtgac	cgctacactt	gccagcgcgc	tagcgcgcgc	tcctttcgct	1540
1541	ttcttccctt	cctttctcgc	cacgttcgcc	ggctttcccc	gtcaagctct	aatcggggc	atcccttag	1610
1611	ggttccgatt	tagtgcttta	cggcacctcg	accccaaaaa	acttgattag	ggtgatggtt	cacgtagtgg	1680
1681	gccatcgccc	tgatagacgg	tttttcgccc	tttgacgtt	gagtcacagt	tctttaatag	tggactcttg	1750
1751	ttccaaactg	gaacaacact	caaccctatc	tcggtctatt	cttttgattt	ataagggatt	ttggggattt	1820
1821	cggcctattg	gttaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	taacgcgaat	taattctgtg	gaatgtgtgt	1890
1891	cagttagggt	gtggaaagtc	cccaggctcc	ccaagcaggc	gaagtatgca	aagcatgcat	ctcaattagt	1960
1961	cagcaaccag	gtgtggaaag	tccccaggct	cccagcagg	cagaagtatg	caaagcatgc	atctcaatta	2030
2031	gtcagcaacc	atagtcccgc	ccctaactcc	gcccattccc	ccctaactc	cgcccagttc	cgcccattct	2100
2101	cgcccccatg	gctgactaat	tttttttatt	tatgcagagg	ccgaggccgc	ctctgcctct	gagctattcc	2170
2171	agaagttagt	aggaggcttt	tttggaggcc	taggtttttg	caaaaagctc	ccgggagctg	gtatatccat	2240
2241	tttccgatct	gatcagcagc	tgttgacaat	taatcatcgg	catagtatat	cgccatagta	taatacagaca	2310
2311	aggtgaggaa	ctaaaccatg	gccaaagttga	ccagtgcctg	tccgggtgctc	accgcgcgcg	acgtcgcgcg	2380
			M A K L	T S A	V P A L	T A R	D V A	
2381	agcggctcag	ttctggaccg	accggctcgg	gttctcccgg	gacttcgtgg	aggacgactt	cgccgggtgtg	2450
	G A V E	F W T	D G L	G F S R	D F V	E D D	F A G V	
2451	gtccgggacg	acgtgaccct	gttcatcagc	gcggtccagg	accaggtggt	gcccggacaac	accctggcct	2520
	V R D	D V T	L F I S	A V Q	D Q V	V P D N	T L A	
2521	gggtgtgggt	gcgcggcctg	gacgagctgt	acgcgcagtg	gtcggaggtc	gtgtccacga	acttccggga	2590
	W V W	V R G L	D E L	Y A E	W S E V	V S T	N F R	
2591	cgcttccggg	cgggccatga	ccgagatcgg	cgagcagccg	tgggggcccg	agttcgcctt	gcgcgaccgc	2660
	D A S G	P A M	T E I	G E Q P	W G R	E F A	L R D P	
2661	gcccggcaact	gcgtgcactt	cgtggccgag	gagcaggact	gacacgtgct	acgagatttc	gattccaccg	2730
	A G N	C V H	F V A E	E Q D Stop				
2731	ccgccttcta	tgaaggttg	ggcttcggaa	tcgttttccg	ggaocgcggc	tggatgatcc	tccagcgcgg	2800
2801	ggatctcatg	ctggagttct	tcgcccacc	caacttgttt	attgcagctt	ataatgggta	caaataaagc	2870
2871	aatagcatca	caaatttcac	aaataaagca	tttttttcac	tgcatctag	ttgtgggttg	tccaaactca	2940
2941	tcaatgtatc	ttatcatgtc	tgtataccgt	cgacctctag	ctagagcttg	gcgtaatcat	ggtcatagct	3010
3011	gtttctctgt	tgaattgtt	atccgctcac	aattccacac	aacatacag	ccggaagcat	aaagtgtaaa	3080
3081	gcctgggggtg	cctaattgag	gagctaactc	acattaattg	cgttgcgctc	actgcccgtc	ttccagtcgg	3150
3151	gaaacctgtc	gtgccagctg	cattaatgaa	tcggccaacg	cgccggggaga	ggcggtttgc	gtattgggcg	3220
3221	ctcttccgct	tcctcgtca	ctgactcgtc	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcagcggct	atcagctcac	3290
3291	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	acgcagggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	3360
3361	agcaaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	3430
3431	gcatcaciaa	aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcggtt	3500
3501	cccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgacct	tgccgcttac	cggatacctg	tccgcctttc	3570
3571	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcaat	gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	aggctcgttcg	3640
3641	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	3710
3711	cttgagtcca	accgggtaag	acacgactta	tcgacctgag	cagcagccc	tggtaacagg	attagcagag	3780
3781	cgaggtagtg	aggcgggtgct	acagagttct	tgaagtgggt	gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	3850
3851	atltggatc	tgcgctctgc	tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	3920
3921	caaaccaccg	ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	3990
3991	aagaagatcc	tttgatcttt	tctacgggggt	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacggt	aagggatttt	4060
4061	ggtcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaattaa	aatgaagttt	taaatcaatc	4130
4131	taaagtatat	atgagtaaac	ttggtctgac	agttaccaat	gcttaatcag	tgaggcacct	atctcagcga	4200
				Stop W H	K I L	S A G I	E A I	
4201	tctgtctatt	tcgttcatcc	atagttgcct	gactccccgt	cgtgtagata	actacgatac	gggagggcct	4270
	Q R N	R E D M	T A Q	S G T	T Y I V	V I R	S P K	
4271	accatctggc	cccagtgctg	caatgatacc	gcgagaccca	cgctcacccg	ctccagattt	atcagcaata	4340
	G D P G	L A A	I I G	R S G R	E G A	G S K	D A I F	
4341	aaccagccag	ccggaagggc	cgagcgcaga	agtggctcctg	caactttatc	cgctccatc	cagtctatta	4410
	W G A	P L A	S R L L	P G A	V K D	A E M W	D I L	

4411	attggttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacggttggtg ccattgctac	4480
	Q Q R S A L T L L E G T L L K R L T T A M A V	
4481	aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga	4550
	P M T T D R E D N P I A E N L E P E W R D L R T	
4551	gttacatgat cccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta	4620
	V H D G M N H L F A T L E K P G G I T T L L L	
4621	agttggccgc agtgttatca ctcatgggta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt	4690
	N A A T N D S M T I A A S C L E R V T M G D T	
4691	aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgatgagc gcgaccgagt	4760
	L H K E T V P S Y E V L D N Q S Y H I R R G L Q	
4761	tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg	4830
	E Q G A D I R S L V A G C L L V K F T S M M P	
4831	gaaaacggtc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctggtgaga tccagttcga tgtaaccac	4900
	F R E E P R F S E L I K G S N L D L E I Y G V	
4901	tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg	4970
	R A G L Q D E A D K V K V L T E P H A F V P L C	
4971	caaaatgccc caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat	5040
	F A A F F P I L A V R F H Q I S M	
5041	attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa	5110
5111	acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtc	5159

CMV Promotor: bp 209 – bp 863

T7 Promotor / Priming Site: bp 863 – bp 882

IG  $\kappa$ -chain V-J2-C signal peptide (murine): bp 905 – bp 967

c-myc epitope: bp 1082 – bp 1114

Polyhistidine Tag: bp 1127 – bp 1144

BGH reverse priming site: bp 1167 – bp 1184

BGH polyadenylation sequence: bp 1166 – bp 1380

fl origin: bp 1443 – bp 1856

SV40 promotor and origin: bp 1924 – bp 2245

EM-7 promotor: bp 2261 – bp 2327

Zeocin™ restistance gene: bp 2328 – bp 2702

SV40 polyadenylation sequence: bp 2832 – bp 2961

pUC origin: bp 3345 – bp 4018

Ampicillin resistance gene (*bla*): bp 4163 – bp 5023 (C)

## 6.2.2 pPAM

(Rademacher *et al.*, 2002)

1	atcgaattcg gcgcgcccgg gcggccgccca ccgcgggtgga gggggatcag attgtcgttt cccgccttca	70
71	gtttaaacta tcagtgttgg acaggatata ttggcgggta aacctaaagag aaaagagcgt ttattagaat	140
141	aatcggatat ttaaaagggc gtgaaaaggt ttatccggtc gtccatttgt atgtgtacat caccgacgag	210
211	caaggcaaga ccgagcgcc ttcgcgacgt caccgggctg gttgccctcg ccgctgggct ggccggccgtc	280
281	tatggccctg caaacgcgcc agaaaacgcc tcgaagccgt gtgcgagaca ccggccgccg gcggttgagg	350
351	tacctcgcgg aaaacttggc cctcactgac agatgagggg cggacgttga cacttgaggg gccgactcac	420
421	ccggcgccggc gttgacagat gaggggcagg ctcgatttct gccggcgacg tggagctggc cagcctcgca	490
491	aatcggcgaa aacgcctgat tttacgcgag tttcccacag atgatgtgga caagcctggg gataagtgcc	560
561	ctgcggtatt gacacttgag gggcgcgact actgacagat gaggggcgcg atccttgaca cttgaggggc	630
631	agagtgctga cagatgagg gcgcacctat tgacatttga ggggctgtcc acaggcagaa aatccagcat	700
701	ttgcaaggg ttcgcgccgt ttttcggcca ccgctaacct gtcttttaac ctgcttttaa accaatattt	770
771	ataaaccttg tttttaacca gggtgcgcc ctgtgcgctg gaccgcgcac gccgaagggg ggtgcccc	840

841	cttctcgaac	cctcccggcc	cgctaacgcy	ggcctcccat	ccccccaggg	gctgcgcccc	tcggccgcga	910	
911	acggcctcac	cccaaaaatg	gcagcgctgg	cagtccttgc	cattgcccggg	atcggggcag	taacgggatg	980	
981	ggcgatcagc	ccgaaagcta	ccctattttg	tttatttttc	taaatacatt	caaatatgta	tccgctcatg	1050	
1051	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	1120	
						M S I Q	H F R		
1121	tcgcccttat	tccctttttt	gcggcatttt	gccttcctgt	ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	1190	
	V A L	I P F F	A A F	C L P	V F A H	P E T	L V K		
1191	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtaaagtc	1260	
	V K D A	E D Q	L G A	R V G Y	I E L	D L N	S G K I		
1261	cttgagagtt	ttcgccccga	agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcgccg	1330	
	L E S	F R P	E E R F	P M M	S T F	K V L L	C G A		
1331	tattatcccc	tattgacgcc	gggcaagagc	aactcggctg	ccgcatacac	tattctcaga	atgacttggt	1400	
	V L S	R I D A	G Q E	Q L G	R R I H	Y S Q	N D L		
1401	tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	cagtgcgtcc	1470	
	V E Y S	P V T	E K H	L T D G	M T V	R E L	C S A A		
1471	ataacatga	gtgataacac	tgccggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	aggaccgaag	gagctaaccg	1540	
	I T M	S D N	T A A N	L L L	T T I	G G P K	E L T		
1541	cttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccttga	tcggtgggaa	ccggagctga	atgaagccat	1610	
	A F L	H N M G	D H V	T R L	D R W E	P E L	N E A		
1611	accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	tgtagcaatg	gcaacaacgt	tcgcaaaact	attaactggc	1680	
	I P N D	E R D	T T M	P V A M	A T T	L R K	L L T G		
1681	gaactactta	ctctagcttc	ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	1750	
	E L L	T L A	S R Q Q	L I D	W M E	A D K V	A G P		
1751	ttctgcgctc	ggccttccg	gctggctggg	ttattgctga	taaactctgga	gccggtgagc	gtgggtctcg	1820	
	L L R	S A L P	A G W	F I A	D K S G	A G E	R G S		
1821	cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagcctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	gacggggagt	1890	
	R G I I	A A L	G P D	G K P S	R I V	V I Y	T T G S		
1891	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	actgattaag	cattggtaac	1960	
	Q A T	M D E	R N R Q	I A E	I G A	S L I K	H W Stop		
1961	tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	2030	
2031	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	2100	
2101	gaccccgtag	aaaagatcaa	aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcy	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	2170	
2171	caaaaaaacc	accgctacca	gcggtgggtt	gtttgccgga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaaggt	2240	
2241	aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgttctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	ccaccacttc	2310	
2311	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacctc	gctctgctaa	tcctgtttacc	agtggctget	gccagtggcg	2380	
2381	ataagtcgtg	tcttaccggg	ttggactcaa	gacgatagtt	accggataag	gcgcagcggg	cgggctgaac	2450	
2451	gggggggttcg	tgcacacagc	ccagcttggg	gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	2520	
2521	ctatgagaaa	gcgccacgct	tcccgaaggg	agaaaggcgg	acaggtatcc	ggtaagcggc	agggtcggaa	2590	
2591	caggagagcg	cacgagggag	cttccagggg	gaaacgcctg	gtatctttat	agtctgtctg	ggtttcgcca	2660	
2661	cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggcccagcc	tatggaaaaa	cgccagcaac	2730	
2731	gcggcctttt	tacggttcct	ggccttttgc	tggccttttg	ctcacatgga	ctctagagga	tcacaggcag	2800	
2801	caacgctctg	tcacggttac	aatcaacatg	ctaccctccg	cgagatcatc	cgtgtttcaa	acccggcagc	2870	
2871	ttagttgccc	ttcttccgaa	tagcatcggt	aacatgagca	aagtctgccg	ccttacaacg	gctctcccgc	2940	
2941	tgacgcgctc	ccggactgat	gggctgcctg	tatcgagtgg	tgattttgtg	ccgagctgcc	ggtcggggag	3010	
3011	ctggtggctg	gctgg	tgga	ggatatattg	tggtgtaaac	aaattgacgg	ttagacaact	taataacaca	3080
3081	ttgcccagct	ttttaatg						3098	

right border: bp 89 – bp 113

RK2 origin: bp 229 – bp 937

Ampicillin resistance gene (*bla*): bp 1099 – bp 1959

colE1 origin: bp 2111 – bp 2733

left border: bp 3026 – bp 3060

## 6.3 Plasmide dieser Arbeit

### 6.3.1 Ki-4-Ang, K-GbII, RFT5-Ang, RAK, RFT5-Gb, RGK

Diese Plasmide sind Derivate des pSecTag2 A und entsprechen diesem in ihrem wesentlichen Aufbau. Im Folgenden sind die Sequenzen der Plasmide in 5'-3'-Richtung angegeben. Befinden sich diese im translatierten Bereich, so ist die Übersetzung angegeben. Das zusätzlich vorkommende Gen codiert für GFP (Grünfluoreszierendes Protein).

- Sequenz pSecTag2 A bp 1 bis bp 967 (siehe 6.2.1) -
- gcggcccagccggccatggcc -  
A A Q P A M A
- cagggtcaagctt RFT5(scFv) cgg - (siehe 6.1.1) bei RFT5-Ang, RAK, RFT5-Gb und RGK  
Q V K L R  
oder Ki-4(scFv) - (siehe 6.1.2) bei Ki-4-Ang und K-GbII
- gcggccgcaactcgagctctaga -  
A A A L E S R
- Angiogenin - (siehe 6.1.3) bei Ki-4-Ang, RFT5-Ang und RAK  
oder Granzym B - (siehe 6.1.4) bei K-GbII, RFT5-Gb und RGK
- ggatccaaactagctgagcacgaatttcgaggagggccc -  
G S K L A E H E F R G G P
- Sequenz pSecTag2 A bp 1082 bis bp 1151 - (siehe 6.2.1);  
(hier nach bp 1134 aaggatgagctg bei RAK und RGK)  
K D E L
- tgagcacgaa ttctggaatt aattcgctgt ctgaggggc cagctgttgg ggtgagtact ccctctcaaa  
agcgggcatg acttctgctg taagattgtc agtttccaaa aacgaggagg atttgatatt cacctggccc  
gcggtgatgc ctttgagggt ggccgcgtcc atctggtcag aaaagacaat cttttgttg tcaagcttga  
ggtgtggcag gcttgagatc tggccataca cttgagtgc aatgacatcc actttgcctt tctctccaca  
ggtgtccact cccaggtcca actgcaggtc gagcatgcat ctagggcggc caattccgcc cctctccctc  
cccccccct aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgtgattt  
tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccggg aacctggccc tgtcttcttg acgagcattc  
ctaggggtct tccccctctc gccaaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgct gtgaaggagg cagttcctct  
ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt tgcaggcagc ggaaccccc acctggcgac  
aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta taagatacac ctgcaaaggc ggcacaacc cagtgccacg  
ttgtgagtgt gatagtgtg gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga  
tgcccagaag gtacccatt gtatgggatc tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag  
tcgaggttaa aaaaactgtc agggcccccg aaccacgggg acgtggtttt cctttgaaaa acacgatgat  
aagcttgcca caaccggga tccaccggtc gccacc
- 1 atgg tgagcaaggc cgaggagctg ttcaccgggg 34  
M V S K G E E L F T G
- 35 tgggtgccat cctggctgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga 104  
V V P I L V E L D G D V N G H K F S V S G E G
- 105 gggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg 174  
E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W
- 175 cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc 244  
P T L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K Q
- 245 acgacttctt caagtccgcc atgccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg 314  
H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D
- 315 caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgaggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc 384  
G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G
- 385 atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaactgtc 454  
I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V
- 455 atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg 524  
Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D
- 525 cagcgtgcag ctgcgccacc actaccagca gaacaccccc atcgcgacg gccccgtgct gctgccccgac 594  
G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D
- 595 aaccactacc tgagcaccca gtccgcctg agcaaagacc ccaacgagaa gcgcatcac atggtcctgc 664  
N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V L

```

665  tggagttcgt gaccgcccgc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagtaa
      L E F V T A A G I T L G M D E L Y K Stop
                                           gttt -

```

720

- Sequenz pSecTag2 A bp 1152 bis bp 5159 (siehe 6.2.1) -

### 6.3.2 Ang-Ki-4, Gb-Ki-4, Ang-RFT5, ARK, Gb-RFT5, GRK

Diese Plasmide sind Derivate des pSecTag2 A und entsprechen diesem in ihrem wesentlichen Aufbau. Im Folgenden sind die Sequenzen der Plasmide in 5'-3'-Richtung angegeben. Befinden sich diese im translatierten Bereich, so ist die Übersetzung angegeben. Das zusätzlich vorkommende Gen codiert für GFP.

- Sequenz pSecTag2 A bp 1 bis bp 967 (siehe 6.2.1) -

```

- tctagactcgagtctaga -
  S R L E S R

```

- Angiogenin - (siehe 6.1.3) bei Ang-Ki-4, Ang-RFT5 und ARK  
oder Granzym B - (siehe 6.1.4) bei Gb-Ki-4, Gb-RFT5 und GRK

```

- ggatccaaactagctgagcacgaacgtgacgcccagccggccatggcc -
  G S K L A E H E R D A A Q P A M A

```

```

- caggtaagctt RFT5(scFv) cgg - (siehe 6.1.1) bei Ang-RFT5, ARK, Gb-RFT5 und GRK
  Q V K L R

```

oder Ki-4(scFv) - (siehe 6.1.2) bei Ang-Ki-4 und Gb-Ki-4

```

- gcggccgcagggccc -
  A A A G P

```

- Sequenz pSecTag2 A bp 1082 bis bp 1151 - (siehe 6.2.1)  
hier nach bp 1134 aaggatgagctg bei ARK und GRK

```

- tgagcacgaa ttctggaatt aattcgctgt ctgagagggc cagctgttgg ggtgagtact ccctctcaaa
  agcgggcatg acttctgcgc taagattgtc agtttccaaa aacgaggagg atttgatatt cacctggccc
  gcggtgatgc ctttaggggt ggccgcgtcc atctggtcag aaaagacaat cttttgttg tcaagcttga
  ggtgtggcag gcttgagatc tggccatata cttgagtgc aatgacatcc actttgcctt tctctccaca
  ggtgtccact cccaggcca actgcaggtc gagcatgcat ctagggcggc caattccgcc cctctccctc
  cccccccct aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgtgattt
  tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg agggcccggg aacctggccc tgtctcttg acgagcatc
  ctagggtct tcccctctc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgct gtaaggaag cagttcctct
  ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt tgcaggcagc ggaaccccc acctggcgac
  aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta taagatacac ctgcaaaggc ggcacaaccc cagtgccacg
  ttgtgagttg gatagttgtg gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga
  tgcccagaag gtacccatt gtatgggatc tgatctgggg cctcggtgca catgcttac atgtgttag
  tcgaggttaa aaaaactct agggcccccg aaccacgggg acgtggtttt ccttgaaaa acacgatgat
  aagcttgcca caaccggga tccaccggtc gccacc

```

```

1                                     atgg tgagcaaggc cgaggagctg ttcaccgggg 34
                                     M V S K G E E L F T G

```

```

35  tgggtgccat cctggctcag ctggacggcg acgtaaaccg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga 104
      V V P I L V E L D G D V N G H K F S V S G E G

```

```

105  gggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagttcatt tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg 174
      E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W

```

```

175  cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc gtgacgtgct tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc 244
      P T L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K Q

```

```

245  acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg 314
      H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D

```

```

315  caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac accctgggta accgcatcga gctgaagggc 384
      G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G

```

```

385  atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaactctt 454
      I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V

```

```

455  atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg 524
      Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D
525  cagcgtgcag ctcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcgcgacg gccccgtgct gctgcccgac 594
      G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D
595  aaccactacc tgagcaccca gtccgccttg agcaaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac atggtcctgc 664
      N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V L
665  tggagttcgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagtaa 720
      L E F V T A A G I T L G M D E L Y K Stop
                                          gttt -

```

- Sequenz pSecTag2 A bp 1152 bis bp 5159 - (siehe 6.2.1)

### 6.3.3 pPAMKsGFP

Das Plasmid ist ein Derivat des pPAM (siehe 6.2.2). Zusätzlich vorhanden sind hier:

pA OCS: bp 289 – bp 1 (C)

Kanamycin resistance gene (*nptII*): bp 795 – bp 1 (C)

NOS Promotor: bp 311 – bp 1 (C)

35SS Promotor: bp 1 – bp 699

GFP: bp 1 – bp 717

pA 35S: bp 1 – bp 218

- Sequenz pPAM bp 1 bis bp 8 - (siehe 6.2.2)

```

- 289  gtttgttatt gtggcgctct atcatagatg tcgctataaa cctattcagc acaatatatt gttttcattt 220
219  taatattgta catataagta gtaggttaca atcagtaaat tgaacggaga atattattca taaaaatacg 150
149  atagtaacgg gtgatataatt cattagaatg aaccgaaacc ggcggttaagg atctgagcta cacatgctca 80
79  ggttttttac aacgtgcaca acagaattga aagcaaatat catgcatgca taggcgtctc gcatactca 10
9  ttaaagcag
      g ggggtgggca agaactccag catgagatcc ccgctgctgga ggatcatcca gccggcgctcc
cggaaaaacga ttccgaagcc caacctttca tagaaggcgg cgggtggaatc gaaatctcgt gatggcaggt
tggcgctcgc ttggtcggtc atttcgaacc ccagagtccc gc
795  tcagaaga actcgtcaag aaggcgatag 768
      Stop F F E D L L R Y F
767  aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaaa gcacgaggaa gcggtcagcc cattcggccg 698
      A I R Q S D G A A I G Y L V L F R D A W E G G
697  caagctcttc agcaatatca cgggtagcca acgctatgtc ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc 618
      L E E A I D R T A L A I D Q Y R D A V G L R G
617  acagtcgatg aatccagaaa agcggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcatc gccatggggtc 548
      C D I F G S F R G N E V M I N P L C A D G H T V
547  acgacgagat catcgccgtc gggcatgcgc gccttgagcc tggcgaacag ttcggctggc gcgagcccct 478
      V L D D G D P M R A K L R A F L E A P A L G Q
477  gatgctcttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc gctcgatgcg 408
      H E E D L D D Q D V L G A E M R T R A R E I R
407  atgtttcgtc tgggtggtcga atgggcaggt agccggatca agcgtatgca gccgccgcat tgcatacagc 338
      H K A Q H D F P C T A P D L T H L R R M A D A M
337  atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca ggagatcctg ccccgccact tcgcccaata 268
      I S V K E A P A L H S S L L D Q G P V E G L L
267  gcagccagtc ccttcccgtc tcagtgacaa cgctcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag 198
      L W D R G A E T V V D L V A A C P V G T T A L
197  ccacgatagc cgcgctgcct cgtcctgcag ttcattcagg gcaccggaca ggtcggctctt gacaaaaaga 138
      W S L R A A E D Q L E N L A G S L D T K V F L V
137  accggggcgc cctgcgctga cagccggaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt tgtgcccagt 68
      P R G Q A S L R F V A A D S C G I T Q Q A W D

```



67	catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg cgggagaacc tgcgtgcaat ccatcttggt caatcat	1	
	Y G F L R E V W A A P S G A H L G D Q E I M		
		gcg	
	aaacgatcct catcctgtct cttgatcaga tccagattat ttgga		
311		ttgag agtgaatatg agactctaat	287
286	tggataccga ggggaattta tggaaagtca gtggagcatt tttgacaaga aatatttgc agctgatagt		217
216	gaccttaaggc gacttttgaa cgcgcaataa tggttctga cgtatgtgct tagctcatta aactccagaa		147
146	acccgcggct gagtggctcc ttcaacgttg cggttctgtc agttccaac gtaaacggc ttgtcccgcg		77
76	tcacgcggcg gggtcataac gtgactcct taattctcg ctcgatgaca gattgtcgt tcccgccttc		7
6	ggtttg		1
	ggcg cgccc		
1		ggtct cagaagacca gagggtatt gagactttc acaaaagggt aatatcgga	55
56	aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttca tcgaaaggac agtagaaaag gaagatggct		125
126	tctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt tcaagaatgc ctctaccgac agtggtocca		195
196	aagatggacc cccaccacg aggaacatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt		265
266	ggattgatgt gataacatgg tggagcacga cactctcgtc tactccaaga atatcaaga tacagtctca		335
336	gaagaccaga gggctattga gacttttcaa caaagggtaa tatcgggaaa cctcctcgga ttccattgcc		405
406	cagctatctg tcacttcacg gaaaggacag tagaaaagga agatggcttc tacaatgccc atcattgcga		475
476	taaaggaag gctatcgttc aagaatgcct ctaccgacag tgggtccaaa gatggacccc caccacgag		545
546	gaacatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga tatctccact		615
616	gacgtaagg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttctc tatataagga agttcatttc		685
686	atttggagag gacc		699
		tcgaga attctcaaca caacatatac aaaacaaacg aatctcaagc aatcaagcat	
	tctacttcta ttgcagcaat ttaaactcatt tcttttaaaag caaaagcaat tttctgaaaa ttttcacat		
	ttacgaacga tagcc		
1		atggg taaaggagaa gaacttttca ctggagtgt cccaattctt gttgaattag	55
		M G T G E E T F T G V V P I L R E L	
56	atggtgatgt taatgggac aaattttctg tcagtggaga gggatgaagg gatgcaacat acgaaaaact		125
		D G D V N G H K F S V R G E G E G D A T Y G K	
126	tacccttaaa tttatttgca ctactggaaa actacctgtt ccttggccaa cacttgtcac tactttctgt		195
		L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T T F W	
196	tatggtgtac aatgcttttc aagataccca gatcatatga agcggcacga cttcttcaag agcgcattgc		265
		Y G V Q C F S R Y P D H M K R H D F F K S A M	
266	ctgagggata cgtgcaggag aggaccatct tcttcaagga cgacgggaac tacaagacac gtgctgaagt		335
		P E G Y V Q E R P I F F K D D G N Y K T R A E	
336	caagtttgag ggagacacc tcgtcaacag gatcagctt aagggatcg atttcaagga ggacggaac		405
		V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N	
406	atcctcggcc acaagttgga atacaactac aactcccaca acgtatacat catggcagac aaacaaaaga		475
		I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K	
476	atggaatcaa agtcaacttc aaaattagac acaacattga agatggaagc gttcaattag cagaccatta		545
		N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H	
546	tcaacaaaat actccaattg gcgatggccc tgtcctttta ccagacaacc attacctgtc cacacaatct		615
		Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S	
616	gccctttcca aagatcccaa cgaaaagaga gatcacatgg tccttcttga gtttgaaca gctgctggga		685
		A L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G	
686	ttacacatgg catggatgaa ctatacaaat aa		717
		I T H G M D E L Y K Stop	
		ggatcc	
1		tc tagagtccgc aaaaatcacc agtctctctc	32
33	tacaaatcta tctctctcta tttttctcca gaataatgtg tgagtgttc ccagataagg gaattaggt		102
103	tcttatagg tttcgtcat gtgttgagca tataagaac ccttagtatg tatttgatt tgtaaaatc		172
173	ttctatacat aaaatttcta attcctaaaa ccaaatcca gtgacc		218 -

- Sequenz pPAM bp 19 bis bp 3098 - (siehe 6.2.2)

### 6.3.4 pPAMm1, pPAMm2

Diese Plasmide sind Derivate des pPAMKsGFP (siehe 6.3.3). Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

- Sequenz pPAMKsGFP bp 1- bp 2337 -
- gaattc -
- Sequenz pPAMKsGFP bp 3203 - bp 6495 (bei pPAMm2 zusätzlich - ggcc - nach bp 3418)

### 6.3.5 pPAMBTX, pPAMBT, pPAMTBX, pPAMTB

Diese Plasmide sind Derivate des pPAMm2 (siehe 6.3.4). Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

- Sequenz pPAMm2 bp 1 - bp 2336 -
- cactagtatgggtggcccagccggccaggat - bei pPAMBTX und pPAMBT  
                   M V A Q P A
- oder cactagtgtagctcgagaggat - bei pPAMTBX, pPAMTB  
                                   M L E
- Sequenz pPAMm2 bp 2343 - bp 5651 - (bei pPAMBT und pPAMTB zusätzlich - ctacg - nach bp 5335)

### 6.3.6 pPAMAR, pPAMARK, pPAMAK, pPAMAKK, pPAMGR, pPAMGRK, pPAMGK, pPAMGKK, pPAMSARK

Diese Plasmide sind Derivate des Plasmids pPAMTB. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

- Sequenz pPAMTB bp 1 - bp 2354 -  
 (bei pPAMSARK zusätzlich nach bp 2343 die Sequenz für das Signalpeptid (siehe 6.1.6),  
 dann weiter mit bp 2349)
- verschiedene Sequenzen für die Immuntoxine (siehe 6.3.2), teilweise mit Sequenz für ein KDEL-Signal -
- Sequenz pPAMTB bp 2360 - bp 5671 -

### 6.3.7 pPAMRA, pPAMRAK, pPAMKA, pPAMKAK, pPAMRG, pPAMRGK, pPAMKG, pPAMKGGK, pPAMSRGK, pPAMSRRK

Diese Plasmide sind Derivate des Plasmids pPAMBT. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

- Sequenz pPAMBT bp 1 - bp 2361  
 (bei pPAMSRGK und pPAMSRRK zusätzlich nach bp 2343 die Sequenz für das Signalpeptid (siehe 6.1.6)  
 + tt, dann weiter mit bp 2349) -
- verschiedene Sequenzen für die Immuntoxine (siehe 6.3.1), teilweise mit Sequenz für ein KDEL-Signal -  
 (bei pPAMSRRK Einfügung von Sequenz aus 6.1.5)
- Sequenz pPAMTB bp 2367 - bp 5678 -

**Literaturverzeichnis**

- Adrain C, Duriez PJ, Brumatti G, Delivani P, Martin SJ (2006): The cytotoxic lymphocyte protease, Granzyme B, targets the cytoskeleton and perturbs microtubule polymerization dynamics. *The Journal of Biological Chemistry* 281(12):8118-8125
- Ambrosetti A, Nadali G, Vinante F, Carlini S, Veneri D, Todeschini G, Morosato L, de Sabata D, Chilosi M, Maggi E, Parronchi P, Romagnani S, Semenzato G, Perona G, Pizzolo G (1993): Serum levels of soluble interleukin-2 receptor in Hodgkin disease. Relationship with clinical stage, tumor burden, and treatment outcome. *Cancer* 72(1):201-206
- An Y-Q, McDowell JM, Huang S, McKinney EC, Chambliss S, Meagher RB (1996): Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal* 10:107-121
- Andrade FS, Casciola-Rosen LA, Rosen A (2004): Granzyme B-induced cell death. *Acta Haematologica* 111:28-41
- Andrade FS, Roy D, Nicholson N, Thornberry A, Rosen A, Casciola-Rosen L (1998): Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* 8(4):451-460
- Appenroth K-J, Augsten H (1996): Wasserlinsen und ihre Nutzung. *Biologie in unserer Zeit* 26(3):187-194
- Arntzen C, Plotkin S, Dodet B (2005): Plant-derived vaccines and antibodies: potential and limitations. *Vaccine* 23:1753-1756
- Assaad FF, Signer ER (1990): Cauliflower mosaic virus P35S promotor activity in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* 223(3):517-520
- Atkinson EA, Barry M, Darmon AJ, Shostak I, Turner PC, Moyer RW, Bleackley RC (1998): Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. *The Journal of Biological Chemistry* 273:21261-21266
- Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J (2005): Ricin poisoning. A comprehensive review. *JAMA: The Journal of American Medical Association* 294(18):2342-2351
- Augsten H (1984): Lemnaceen: Aspekte ihrer Praxisrelevanz. *Biologische Rundschau* 22:225-235
- Badet J (1998): Angiogenin, a potent mediator of angiogenesis. Biological, biochemical and structural properties. *Pathologie Biologie* 47:345-351
- Bakker H, Bardor M, Molthoff JW, Gomord V, Elbers I, Stevens LH, Jordi W, Lommen A, Faye L, Lerouge P, Bosch D (2001): Galctose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98:2899-2904

- Baluna R, Rizo J, Gordon BE, Ghethie V, Vitetta ES (1999): Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 96:3957-3962
- Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, Peters C, Kurys G, Goldmann CK, Brennan J, Roessler E, Waldmann TA (1994): The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 91:4940-4944
- Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dörken B (1997): Constitutive Nuclear Factor- $\kappa$ B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *Journal of Clinical Investigation* 100(12):2961-2969
- Barry M, Bleackley RC (2002): Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews. Immunology* 2:401-409
- Barry M, Heibein JA, Pinkoski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR, Bleackley RC (2000): Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Blood* 95(11):3781-94
- Barth S, Huhn M, Matthey B, Schnell R, Tawadros S, Schinköthe T, Lorenzen J, Diehl V, Engert A (2000a): Recombinant anti-CD25 immunotoxin RFT5-ETA' demonstrates successful elimination of disseminated human Hodgkin lymphoma in SCID mice. *International Journal of Cancer* 86:718-724
- Barth S, Huhn M, Matthey B, Tawadros S, Schnell R, Schinköthe T, Diehl V, Engert A (2000b): Ki-4(scFv)-ETA', a new recombinant anti-CD30 immunotoxin with highly specific cytotoxic activity against disseminated Hodgkin tumors in SCID mice. *Blood* 95(12):3909-3914
- Barth S, Huhn M, Wels W, Diehl V, Engert A (1998a): Construction and *in vitro* evaluation of RFT5(scFv)-ETA', a new recombinant single-chain immunotoxin with specific cytotoxicity toward CD25<sup>+</sup> Hodgkin-derived cell lines. *International Journal of Molecular Medicine* 1:249-256
- Barth S, Matthey B, Huhn M, Diehl V, Engert A (1998b): CD30L-ETA': A new recombinant immunotoxin based on the CD30 ligand for possible use against human lymphoma. *Cytokines, Cellular & Molecular Therapy* 5:69-78
- Baulcombe D (2005): siRNA - the "dark matter" of genetics. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 58(1):21-33
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993): *In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants*. CR Academy of Science Paris, Life Science 316:1194-1199

- Becker S (2001): Konstruktion von Anti-cd25-scFv-Fusionsgenen und deren Expression in Wasserlinsen (*Wolffia columbiana*). Diplomarbeit, Institut für Landwirtschaftliche Botanik, Universität Bonn
- Bera TK, Pastan I (1998): Comparison of recombinant immunotoxins against Le<sup>Y</sup> antigen expressing tumor cells: Influence of affinity, size, and stability. *Bioconjugate Chemistry* 9:736-743
- Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M (1988): Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242(4877):423-426
- Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7:1513-1523
- Blake MS, Johnston LN, Russell-Jones GJ, Gotschlich EC (1984): A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Analytical Biochemistry* 136:175-179
- Boehm R (1999): Gentechnologische Beeinflussung der Shikoninbiosynthese: Expression des bakteriellen *uidA*-Gens in *Nicotiana tabacum* und *Lithospermum erythrorhizon*. Dissertation, Universität Tübingen
- Boehm R, Kruse C, Voeste S, Barth S, Schnabl H (2001): A transient transformation system for duckweed (*Wolffia columbiana*) using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Journal of applied Botany - Angewandte Botanik* 75:107-111
- Borchmann P, Schnell R, Engert A (2005): Immunotherapy of Hodgkin's lymphoma. *European Journal of Haematology* 75:159-165
- Bourrie BJP, Casellas P, Blythman HA, Jansen FK (1986): Study of the plasma clearance of antibody-ricin A-chain immunotoxins. Evidence for specific recognition sites that mediate rapid clearance of the immunotoxin. *European Journal of Biochemistry* 155:1-10
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254
- Brinkmann U, Keppler-Hafkemeyer A, Hafkemeyer P (2001): Recombinant immunotoxins for cancer therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* 1(4):693-702
- Britt AB, May GD (2003): Re-engineering plant gene targeting. *Trends in Plant Science* 8(2):90-95
- Broothaerts W, Mitchell HJ, Weir B, Kaines S, Smith LM, Yang W, Mayer JE, Roa-Rodriguez C, Jefferson RA (2005): Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433:629-633
- Brown, TA (1995): Gene cloning: an introduction. New York, Chapman & Hall

- Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M (1971): Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Research* 31:1860-1861
- Castelletti D, Fracasso G, Righetti S, Tridente G, Schnell R, Engert A, Colombatti M (2004): A dominant linear B-cell epitope of ricin A-chain is the target of a neutralizing antibody response in Hodgkin's lymphoma patients treated with an anti-CD25 immunotoxin. *Clinical and Experimental Immunology* 136:365-372
- Cheson BD (2004): What is new in lymphoma?. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 54:260-272
- Chilton M-D (1983): Genmanipulation an Pflanzen: ein Schädling als Helfer. *Spektrum der Wissenschaft* 83:36-47
- Christensen AH, Quail PH (1996): Ubiquitin promotor-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* 5:213-218
- Christou P (1993): Particle gun-mediated transformation. *Current Opinion in Biotechnology* 4:135-141
- Chumakov MI, Kurbanova IV, Solovova GK (2002): Agrobacterial transformation of uninjured plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 49(6):799-803
- Chung SM, Vaidya M, Tzfira T (2006): *Agrobacterium* is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria. *Trends in Plant Science* 11(1):1-4
- Church AC (2003): Clinical advances in therapies targeting the interleukin-2 receptor. *The Quarterly Journal of Medicine* 96:91-102
- Cline J, Braman JC, Hogrefe HH (1996): PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 24(18):3546-3551
- Cohen SN, Chang ACY, Hsa L (1972): Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 69:2110-2114.
- Conrad U, Fiedler U (1998): Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Molecular Biology* 38:101-109
- Crossway A, Oakes JW, Irvine JM, Ward B, Knauf VC, Shewmaker CK (1986): Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular and General Genetics* 202:179-185
- Dale EC, Ow DW (1991): Gene transfer with subsequential removal of the selection gene from the host genome. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 23:10558-10562

- Dale PJ, Clarke B, Fontes EMG (2002): Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotechnology* 20:567-574
- Dälken B, Giesübel U, Knauer SK, Wels WS (2006): Targeted induction of apoptosis by chimeric granzyme B fusion proteins carrying antibody and growth factor domains for cell recognition. *Cell Death and Differentiation* 13(4):576-585
- Deeks ED, Cook JP, Day PJ, Smith DC, Roberts LM, Lord JM (2002): The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochemistry* 41:3405-3413
- Depicker A, Herman L, Jacobs A, Schell J, van Montagu M (1985): Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium* / plant cell interaction. *Molecular and General Genetics* 201: 477-484
- Di Cola A, Frigerio LJ, Lord M, Roberts LM, Ceriotti A (2005): Endoplasmic reticulum-associated degradation of ricin A chain has unique and plant-specific features. *Plant Physiology* 137:287-296
- Ditt RF, Nester EW, Comai L (2001): Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98(19):10954-10959
- Doran PM (2000): Foreign protein production in plant tissue cultures. *Current Opinion in Biotechnology* 11:199-204
- Dorfmueller S (2004/2005): Molekulares Farming. Transgene Pflanzen als Arzneimittelproduzenten. *Mensch + Umwelt Spezial* 17:32-38
- Dürkop H, Latza U, Hummel M, Eitelbach F, Seed B, Stein H (1992): Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* 68:421-427
- Ehrlich P (1906): In: *Collected Studies on Immunity, Vol II*. Wiley (New York) 442-447
- Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K (1987): The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. *The Journal of Biological Chemistry* 262(12):5908-5912
- Engert A, Diehl V, Schnell R, Radszuhn A, Hatwig M-T, Drillich S, Schön G, Bohlen H, Tesch H, Hansmann M-L, Barth S, Schindler J, Ghetie V, Uhr J, Vitetta E (1997): A phase-I study of an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in patients with refractory Hodgkin's lymphoma. *Blood* 89(2):403-410
- Engert A, Gottstein C, Bohlen H, Winkler U, Schön G, Manske O, Schnell R, Diehl V, Thorpe P (1995): Cocktails of ricin A-chain immunotoxins against different antigens of Hodgkin and Sternberg-Reed cells have superior anti-tumor effects against H-RS cells *in vitro* and solid Hodgkin tumors in mice. *International Journal of Cancer* 63:304-309

- Engert A, Martin G, Amlot P, Wijdenes J, Diehl V, Thorpe P (1991): Immunotoxins constructed with anti-CD25 monoclonal antibodies and deglycosylated ricin A-chain have potent anti-tumour effects against human Hodgkin cells *in vitro* and solid Hodgkin tumours in mice. *International Journal of Cancer* 49:450-456
- Englard S, Seifter S (1990): Precipitation techniques. *Methods Enzymology* 182:285-300
- Farquhar GD, Dubbe DR, Raschke K (1978): Gain of the feedback loop involving carbon dioxide and stomata. *Plant Physiology* 62:406-412
- Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Aldermann EM, Bethune JL, Riordan JF, Vallee BL (1985): Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 24:5480-5486
- Filipovitch AH, Vallera DA, Youle RJ, Haake R, Blazar, BR, Arthur D, Neville DM, Ramsay NK, McGlave P, Kersey JH (1987): Graft-versus-host disease prevention in allogeneic bone marrow transplantation from histocompatible siblings. A pilot study using immunotoxins for T cell depletion of donor bone marrow. *Transplantation* 44:62-69
- Fischer R, Stöger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM (2004): Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology* 7:152-158
- FitzGerald DJ, Kreitman R, Wilson W, Squires D, Pastan I (2004): Recombinant immunotoxins for treating cancer. *International Journal of Medical Microbiology* 293:577-582
- Folkman J (1974): Tumor angiogenesis factor. *Cancer Research* 34:2109-2113
- Fraley R, Papahadjopoulos D (1982): Liposomes: the development of a new carrier system for introducing nucleic acid into plant and animal cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 96:171-191
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC (1983): Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 80:4803-4807
- Francisco JA, Gawlak SL, Miller M, Bathe J, Russell D, Chace D, Mixan B, Zhao L, Fell HP, Siegall CB (1997): Expression and characterization of bryodin 1 and a bryodin 1-based single-chain immunotoxin from tobacco cell culture. *Bioconjugate Chemistry* 8:708-713
- Frankel AE (2004): Reducing the immune response to immunotoxin. *Clinical Cancer Research* 10:13-15
- Franz DR, Jaax NK (1997): In: Zajtchuk R, Bellamy RF (eds). *Textbook of Military Medicine*. Office of the Surgeon General at TMM Publications, Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC. 631-642



- Freedman AS, Nadler LM (1998): Malignancies of lymphoid cells. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL (eds). Harrison's principles of internal medicine. 14th ed. New York: McGraw-Hill 695-712
- Friedrich A (2005): Untersuchungen zu Kultivierung, Transformation und Fermentation von *Wolffia spec.*. Dissertation, IMBIO, Universität Bonn
- Fromm M, Taylor LP, Walbot V (1985): Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 82(17):5824-5828
- Fu X, Fontana S, Bong BB, Tinjuangjun P, Sudhakar D, Twyman RM, Christou P, Kohli A (2000): Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. Transgenic Research 9:11-19
- Galeffi P, Lombardi A, Di Donato M, Latini A, Sperandei M, Cantale C, Giacomini P (2005): Expression of single-chain antibodies in transgenic plants. Vaccine 23:1823-1827
- Gandhi MK, Tellam JT, Khanna R (2004): Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. British Journal of Haematology 125:267-281
- Ganz T (2003): Angiogenin: an antimicrobial ribonuclease. Nature Immunology 4(3):213-214
- Gasdaska JR, Spencer D, Dickey L (2003): Advantages of therapeutic protein production in the aquatic plant *Lemna*. Bioprocessing Journal 2:49-56
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005): Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press 571-607
- Gelvin SB (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67(1):16-37
- Gershoni J, Palade G (1982): Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. Analytical Biochemistry 124:396-405
- Gleba D, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Kneer R, Poulev A, Sarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba YY, Raskin I (1999): Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 96:5973-5977
- Goldstein DA, Thomas JA (2004): Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. The Quarterly Journal of Medicine 97:705-716

- Gomez J, Garcia-Domingo D, Martinez-A C, Rebollo A (1997): Role of NF-kappaB in the control of apoptotic and proliferative responses in IL-2-resposinve T cells. *Frontiers in Bioscience: A Journal and virtual Library* 2:49-60
- Gormond V, Faye L (2004): Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 7:171-181
- Granados S, Hwang ST (2004): Roles for CD30 in the biology and treatment of CD30<sup>+</sup> lymphoproliferative diseases. *The Journal of Investigative Dermatology* 122:1345-1347
- Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, Abderrahim H, Noguchi M, Smith DH, Zeng Y, David NE, Sasai H, Garza D, Brenner DG, Hales JF, McGuinness RP, Capon DJ, Klapholz S, Jakobovits A (1994): Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nature Genetics* 7(1):13-21
- Griesbach RJ, Hammond J (1994): An improved method for transforming plants through electrophoresis. *Plant Science* 102:81-89
- Griffiths GM, Isaaz S (1993): Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *The Journal of Cell Biology* 120:885-896
- Gros F, Gilbert W, Hiatt HH, Attardi G, Spahr PF, Watson JD (1961): Molecular and biological characterization of messenger RNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative* 26:111-132.
- Gruss HJ, Dower SK (1995): The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. *Cytokines and Molecular Therapy* 1:75-105
- Gruss HJ, Kadin ME (1996): Pathophysiology of Hodgkin's disease: functional and molecular aspects. *Baillieres of Clinical Haematology* 9(3): 417-446
- Hanahan D (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166(4):557-80
- Hansen HP, Dietrich S, Kisseleva T, Mokros T, Mentlein R, Lange HH, Murphy G, Lemke H (2000): CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *Journal of Immunology* 165:6703-6709
- Hanson B, Engler D, Moy Y, Newman B, Ralston E, Gutterson N (1999): A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* 19:727-734
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD (1999): World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting - Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology* 17:3835-3849

- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink H-K, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA (1994): A revised european-american classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Stud Group. *Blood* 84(5):1361-1392
- Hayden MS, Gilliland LK, Ledbetter JA (1997): Antibody engineering. *Current Opinion in Immunology* 9:201-212
- Hellens R, Mullineaux P, Klee H (2000): A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science* 5(10):446-451
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R (2004): Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology* 22(11):1415-1422
- Hetzel C (2005): Optimierung eines Sterilisationsprotokolls für *W. australiana* unter Berücksichtigung und Charakterisierung beteiligter Mikroorganismen. Diplomarbeit, IMBIO, Universität Bonn
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989): Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342:76-78
- Hodgkin T (1832): On some morbid appearance of the absorbent glands and spleen. *Medical Chirurgical Transaction* 17:69-97
- Hoffmann LM, Ma Y, Barker RF (1982): Molecular cloning of *Phaseolus vulgaris* lectin mRNA and use of cDNA as a probe to estimate lectin transcript levels in various tissues. *Nucleic Acids Research* 10:7819-7828
- Höfgen R, Willmitzer L (1988): Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acid Research* 16:9877
- Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M, Schell J (1978): Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics* 163:181-187
- Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI (2003): Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature Immunology* 4(3):269-273
- Horn-Lohrens O, Tiemann M, Lange H, Kobarg J, Hafner M, Hansen H, Sterry W, Parwaresch RM, Lemke H (1995): Shedding of the soluble form of CD30 from the Hodgkin-analogous cell line L540 is strongly inhibited by a new CD30-specific antibody (Ki-4). *International Journal of Cancer* 60:539-544
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985): A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231

- Hu GF, Riordan JF, Vallee (1997): A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 94:2204-2209
- Hu GF, Strydom DJ, Fett JW, Riordan JF, Vallee BL (1993): Actin is a binding protein for angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 90:1217-1221
- Huhn M, Sasse S, Tur MK, Matthey B, Schinköthe T, Rybak SM, Barth S, Engert A (2001): Human angiogenin fused to human CD30 ligand (Ang-CD30L) exhibits specific cytotoxicity against CD30-positive lymphoma. *Cancer Research* 61:8737-8742
- Huls GA, Heijnen IA, Cuomo ME, Koningsberger JC, Wiegman L, Boel E, van der Vuurst de Vries AR, Loyson SA, Helfrich W, van Berge Henegouwen GP, van Meijer M, de Kruif J, Logtenberg T (1999): A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nature Biotechnology* 17:276-281
- Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Bruccoleri RE, Haber E, Crea R, Oppermann H (1988): Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 85:5879-5883
- Iino M, Ogawa T, Zeiger E (1985): Kinetic properties of blue-light response of stomata. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 82:8019-8023
- Incoll LD, Whitlam GC (1977): Effect of kinetin on stomata of grass *Antheophora pubescens* Nees. *Planta* 137:243-245
- Jain RK (1996): Delivery of molecular medicine to solid tumors. *Science* 271:1079-1080
- Jenny RJ, Mann KG, Lundblad RL (2003): A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expression and Purification* 31(1):1-11
- Joersbo M, Brunstedt J (1990): Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication. *Plant Cell Reports* 9:207-210
- Joersbo M, Okkels FT (1996): A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Reports* 16:219-221
- Johnston JA, Kawamura M, Kirken RA, Chen Y-Q, Blake TB, Shibuya K, Ortaldo JR, McVicar DW, O'Shea JJ (1994): Phosphorylation and activation of the JAK-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature* 370:151-153
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986): Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321(6069):522-525

- Junghans RP, Stone AL, Lewis MS (1996): Biophysical characterization of a recombinant soluble interleukin-2 receptor (Tac). *Journal of Biological Chemistry* 271:10453-10460
- Kadin ME (1994): Pathology of Hodgkin's disease. *Current Opinion in Oncology* 6:456-463
- Kaeppler HF, Gu W, Somers DA, Rines HW, Cockburn AF (1990): Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Reports* 9:415-418
- Kathuria S, Sriraman R, Nath R, Sack M, Pal R, Artsaenko O, Talwar GP, Fischer R, Finnern R (2002): Efficiency of plant-produced recombinant antibodies against HCG. *Human Reproduction* 17(8):2054-2061
- Kahan BD, Rajagopalan PR, Hall ML (1999): Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody. United States Simulect Renal Study Group. *Transplantation* 67(2):276-284
- Kang TJ, Yang MS (2004): Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. *BMC Biotechnology* 4:20
- Kay R, Chan A, Daly M, McPherson J (1987): Duplication of CaMV-35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236:1299-1302
- Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987): High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73
- Klimka A, Barth S, Matthey B, Roovers RC, Lemke H, Hansen H, Arends J-W, Diehl V, Hoogenboom HR, Engert A (1999): An anti-CD30 single-chain Fv selected by phage display and fused to *Pseudomonas* exotoxin A (Ki-4(scFv)-ETA') is a potent immunotoxin against a Hodgkin-derived cell line. *British Journal of Cancer* 80(8):1214-1222
- Klimka A, Matthey B, Roovers R, Barth S, Bot F, Arends JW, Engert A, Hoogenboom HR (2000): Human anti-CD30 recombinant antibodies by guided phage antibody library selection and cell panning. *British Journal of Cancer* 80(8):1214-1222
- Ko K, Wei X, Crooks PA, Koprowski H (2004): Elimination of alkaloids from plant-derived human monoclonal antibody. *Journal of Immunological Methods* 289:79-85
- Komarnytsky S, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Alam MZ, Raskin I (2000): Production of recombinant proteins in tobacco guttation fluid. *Plant Physiology* 124:927-933
- Koncz C, Schell J (1986): The promoter of T<sub>L</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and general Genetics* 204:383-396

- Krähenbühl O, Rey C, Jenne D, Lanzavecchia A, Groscurth P, Carrel S, Tschopp J (1988): Characterization of granzymes A and B isolated from granules of cloned human cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of Immunology* 141:3471-3477
- Krauss J, Arndt MAE, Vu BK, Newton DL, Rybak SM (2005): Targeting malignant B-cell lymphoma with a humanized anti-CD22 scFv-angiogenin immunoenzyme. *British Journal of Haematology* 128:602-609
- Kreitman RJ (1999): Immunotoxins in cancer therapy. *Current Opinion in Immunology* 11:570-578
- Kreitman RJ (2003): Taming ricin toxin. *Nature Biotechnology* 21:372-374
- Kreitman RJ, Pastan I (1994a): Recombinant single-chain immunotoxins against T and B cell leukemias. *Leukemia & Lymphoma* 13:1-10
- Kreitman RJ, Pastan I (1994b): Recombinant toxins. *Advances in Pharmacology* 28:193-219
- Kruse C, Boehm R, Voeste D, Barth S, Schnabl H (2002): Transient transformation of *Wolffia columbiana* by particle bombardment. *Aquatic Botany* 72:175-181
- Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C, Citovsky V (2001): Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98(4):1871-1876
- Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML (1994): Hodgkin disease: Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 91:10962-10966
- Kurachi K, Davie EW, Strydom DJ, Riordan JF, Vallee BL (1985): Sequence of the cDNA and gene for angiogenin, a human angiogenesis factor. *Biochemistry* 24(20):5494-5499
- Kurschus FC, Kleinschmidt M, Fellows E, Dornmair K, Rudolph R, Lilie H, Jenne DE (2004): Killing of target cells by redirected granzyme B in the absence of perforin. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 562:87-92
- Landolt E (1986): The family of *Lemnaceae* - a monographic study. Vol 1. Veröffentlichungen des Geobotanischen Instituts der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Stiftung Rübel, Zürich, Heft 71
- Landolt E, Kandeler R (1987): The family of *Lemnaceae* - a monographic study. Vol 2. Veröffentlichungen des Geobotanischen Instituts der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Stiftung Rübel, Zürich, Heft 95

- Leonard WJ, Depper JM, Crabtree GR, Rudikoff J, Pumphrey J, Robb RJ, Kronke M, Svetlik PB, Peffer NJ, Waldmann TA, Greene WC (1984): Molecular cloning and expression of cDNA for the human interleukin-2 receptor. *Nature* 311:626-631
- Leonard WJ, Noguchi M, Russell SM, McBride OW (1994): The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: the role of interleukin-2 receptor gamma chain as a common gamma chain, gamma c. *Immunological Reviews* 138:61-86
- Li J, Jain M, Vunsh R, Vishnevetsky J, Hania U, Flaishman M, Perl A, Edelman M (2004): Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna*. *Plant Cell Reports* 22(7):457-464
- Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, Rosenberg SA, Coltman CA, Tubiana M (1989): Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *Journal of Clinical Oncology* 7:1630-1636
- Liu Y, Cheung LH, Thorpe P, Rosenblum MG (2003): Mechanistic studies of a novel, human fusion toxin composed of vascular endothelial growth factor (VEGF)<sub>121</sub> and the serine protease granzyme B: Directed apoptotic events in vascular endothelial cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 2:949-959
- Lord JM (1985): Precursors of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. Glycosylation and processing during synthesis and intracellular transport. *European Journal of Biochemistry* 148:411-416
- Lord JM, Roberts LM (1996): The intracellular transport of ricin: why mammalian cells are killed and how *Ricinus* cells survive. *Plant Physiology and Biochemistry* 34(2):253-261
- Lukes RJ, Butler JJ (1966): The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Research* 26:1063-1083
- Luo ZX, Wa RA (1988): A simple method for the transformation of rice via pollen-tube pathway. *Plant Molecular Biology Report* 6:165-174
- Lyznik LA, Mitchell JC, Hirayama L, Hodges TK (1993): Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucleic Acids Research* 21(4):969-975
- Ma JK-C, Barros E, Bock R, Christou P, Dale PJ, Dix PJ, Fischer R, Irwin J, Mahoney R, Pezzotti M, Schillberg S, Sparrow P, Stöger E, Twyman RM, European Union Framework 6 Pharma-Planta Consortium (2005a): Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Reports*
- Ma JK-C, Drake PMW, Chargelegue D, Obregon P, Prada A (2005b): Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production. *Vaccine* 23:1814-1818
- Ma JK-C, Drake PMW, Christou P (2003): The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews. Genetics* 4:794-805

- Madesh M, Antonsson B, Srinivasula SM, Alnemri ES, Hajnoczky G (2002): Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *The Journal of Biological Chemistry* 277(7):5651-5659
- Maliga P, Sz-Breznovits A, Marton L (1973): Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nature: New Biology* 244(131):29-30
- Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G (1991): By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of Molecular Biology* 222(3):581-597
- Martineau B, Voelker TA, Sanders VA (1994): On defining T-DNA. *Plant Cell* 6:1032-1033
- Márton L, Wullems GJ, Molendijk L, Schilperoort RA (1979): *In vitro* transformation of cultured cells from *N. tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 277:129-131
- Matoušek J (2001): Ribonucleases and their antitumor activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 129:175-191
- Matthey B, Borchmann P, Schnell R, Tawadros S, Lange H, Huhn M, Klimka A, Tur MK, Barth S, Engert A, Hansen HP (2004): Metalloproteinase inhibition augments antitumor efficacy of the anti-CD30 immunotoxin Ki-3(scFv)-ETA' against human lymphomas *in vivo*. *International Journal of Cancer* 111:568-574
- Matzke AJM, Matzke MA (1998): Position effects and epigenic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* 1:142-148
- McClelland M, Nelson M, Raschke E (1994): Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Research* 22(17):3640-3659
- Medema JP, Toes RE, Scaffidi C, Zheng TS, Flavell RA, Melief CJ, Peter ME, Offringa R, Krammer PH (1997): Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *European Journal of Immunology* 27:3492-3498
- Mendel G (1866): Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereins Brünn* 4:3-47
- Meyer RM, Ambinder RF, Stroobants S (2004): Hodgkin's Lymphoma: evolving concepts with implications for practice. *American Society of Hematology* 184-202
- Moolten FL, Cooperband SR (1970): Selective destruction of target cells by diphtheria toxin conjugated to antibody directed against antigens on the cells. *Science* 169(940):68-70
- Moon HK, Stomp A-M (1997): Effects of medium components and light on callus induction, growth and frond regeneration in *Lemna gibba* (duckweed). *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant: Journal of the Tissue Culture Association* 33:20-25



- Moreno J, Chrispeels MJ (1989): A lectin gene encodes the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 86:7885-7889
- Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo RC (1976): Selective *in vitro* growth of T-lymphocytes from human bone marrow. *Science* 193:1007-1008
- Moroianu J, Riordan JF (1994): Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells: an essential step in angiogenesis. *Biochemistry* 33:12535-12539
- Morris JC, Waldmann TA (2000): Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment. *Annals of the Rheumatic Diseases* 59:109-114
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT (1984): Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 81(21):6851-6855
- Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M, Barry M, Shostak I, Sawchuk T, Holmes CF, Gauldie J, Bleackley RC (2000): Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103:491-500
- Mullis K B, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology* 51:263-273
- Murashige T , Skoog F (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Murray MG, Thompson WF (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8(19):4321-4325
- Nadali G, Vinante F, Ambrosetti A, Todeschini G, Veneri D, Zanotti R, Meneghini V, Ricetti MM, Benedetti F, Vassanelli A (1994): Serum levels of soluble CD30 are elevated in the majority of untreated patients with Hodgkin's disease and correlate with clinical features and prognosis. *Journal of Clinical Oncology* 12(4):793-797
- Newton DL, Boque L, Wlodawer A, Huang C, Rybak S (1998): Single amino acid substitutions at the N-terminus of a recombinant cytotoxic ribonuclease markedly influence biochemical and biological properties. *Biochemistry* 37:5173-5183
- Newton DL, Xue Y, Olson KA, Fett JW, Rybak SM (1996): Angiogenin single-chain immunofusions: influence of peptide linkers and spacers between fusion protein domains. *Biochemistry* 35:545-553

- Niv R, Cohen CJ, Denkberg G, Segal D, Reiter Y (2001): Antibody engineering for targeted therapy of cancer: recombinant Fv-immunotoxins. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2:19-46
- O'Connell KL, Stults JT (1997): Identification of mouse liver proteins on two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *in situ* enzymatic digests. *Electrophoresis* 18(3-4):349-359.
- Olsnes (2003): Ricin, the deadly poison of castor beans. *Bio Tech International* 15(1):20-21
- Olson KA, Fett JW, French TC, Key ME, Vallee BL (1995): Angiogenin antagonists prevent tumor growth *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 92:442-446
- Onouchi H, Nishihama R, Kudo M, Machida Y, Machida C (1995): Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* 247:653-660
- Ooms G, Hooykaas PJJ, van Veen RJM, van Beelen P, Regensburg-Tuïnk TJG, Schilperoort RA (1982): Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-Region. *Plasmid* 7:15-29
- Owen MRL, Gandecha A, Cockburn B, Whitlam G (1992): Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv Protein in transgenic tobacco. *Bio/technology* 10:790-794
- Payne G (2003): Progress in immunoconjugate cancer therapeutics. *Cancer Cell* 3:207-212
- Peeters K, De Wilde C, De Jaeger G, Angenon G, Depicker A (2001): Production of antibodies and antibody fragments in plants. *Vaccine* 19:2756-2761
- Pemadasa MA (1982): Differential abaxial and adaxial stomatal responses to indole-3-acetic acid in *Commelina communis* L. *The New Phytologist* 90:209-219
- Pham CT, Ley TJ (1999): Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 96(15):8312-8314
- Ping Lu MD (2005): Staging and classification of lymphoma. *Seminars in Nuclear Medicine* 35:160-164
- Porter AE, Auth J, Prince M, Ghidini A, Brennenman DE, Spong CY (2001): Optimization of cytokine stability in stored amniotic fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology* 185(2):459-462
- Puchta H (2003): Marker-free transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:123-134

- Puchta H, Hohn B (2005): Green light for gene targeting in plants. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 102(34):11961-11962
- Rademacher T, Häusler RE, Hirsch H.J, Zhang L, Lipka V, Weier D, Kreuzaler F, Peterhänsel C (2002): An engineered phosphoenolpyruvate carboxylase redirects carbon and nitrogen flow in transgenic potato plants. Plant Journal 32(1):25-39
- Rakoczy-Trojanowska M (2002): Alternative methods of plant transformation - a short review. Cellular & Molecular Biology Letters 7:849-858
- Re D, Küppers R, Diehl V (2005a): Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. Journal of Clinical Oncology 23(26):6379-6386
- Re D, Thomas RK, Behringer K, Diehl V (2005b): From Hodgkin disease to Hodgkin lymphoma: biologic insights and therapeutic potential. Blood 105(12):4553-4560
- Re D, Thomas RK, Zander T, Diehl V (2005c): Problems and promises of targeted therapy for Hodgkin's lymphoma. Nature Clinical Practice. Oncology 2(1):2-3
- Rechmann H (2004): Evaluierung verschiedener Wachstumsparameter zur Konstruktion eines Airlift-Fermenters für *Wolffia australiana*. Diplomarbeit, Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich
- Reed D (1902): On the pathological changes in Hodgkin's disease, with special reference to its relation to tuberculosis. Johns Hopkins Hospital Reports 10:133-196
- Refsnes K, Olsnes S, Pihl A (1974): On the toxic proteins abrin and ricin. Studies of their binding to and entry into Ehrlich ascites cells. The Journal of Biological Chemistry 249(11):3557-3562
- Reinders S (2005): Expression der rekombinanten O-GlcNAc-Transferase in pflanzlichen Systemen. Diplomarbeit, Institut für Physiologie und Anatomie der Haustiere, Universität Bonn
- Reiners KS, Hansen HP, Krüssmann A, Schön G, Csernok E, Gross WL, Engert A, Pogge von Strandmann E (2004): Selective killing of B-cell hybridomas targeting proteinase 3, Wegener's autoantigen. Immunology 112:228-236
- Reiter Y, Brinkmann U, Lee B, Pastan I (1996): Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. Nature Biotechnology 14(10):1239-1245
- Roberts LM, Smith DC (2004): Ricin: the endoplasmic reticulum connection. Toxicon 44:469-472
- Romagnani S, Annunziato F, Manetti R, Almerigogna F, Biagiotti R, Giudizi MG, Ravina A, Gianni V, Tomasevic L, Maggi E (1996): Role for CD30 in HIV expression. Immunology Letters 51:83-88

- Rong L, Karcher SJ, Gelvin SB (1991): Genetic and molecular analysis of *picA*, a plant-inducible locus on the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome. *Journal of Bacteriology* 173(16):5110-5120
- Rosenberg SA (1966): Report of the committee on the staging of Hodgkin's disease. *Cancer Research* 26:1310
- Rüffer U, Diehl V (2002): Morbus Hodgkin. Ein Ratgeber für Betroffene, Angehörige und Interessierte. In: Die blauen Ratgeber, Nr. 21
- Russo N, Nobile V, Di Donato A, Riordan JF, Vallee BL (1996): The C-terminal region of human angiogenin has a dual role in enzymatic activity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 93:3243-3247
- Rutenber E, Ready M, Robertus JD (1987): Structure and evolution of ricin B chain. *Nature* 236:624-626
- Rybak SM, Hoogenboom HR, Meade HM, Raus JCM, Schwartz D, Youle RJ (1992): Humanization of immunotoxins. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 89:3165-3169
- Salinovitch O, Montelaro RC (1986): Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 156:341-347
- Sambrook J, Russell DW (2001): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sandvig K, Grimmer S, Lauvrak SU, Torgersen ML, Skretting G, van Deurs B, Iversen TG (2002): Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells. *Histochemistry and Cell Biology* 117:131-141
- Sandvig K, Olsnes S, Pihl A (1976): Kinetics of binding of the toxic lectins ricin and abrin to surface receptors in human cells. *The Journal of biological Chemistry* 251:3977-3984
- Sasportes M, Tschopp J (1992): Means for in-vitro diagnosis of constituents of cytoplasmic granules and biological applications. Patent Number W09216644
- Saxena SK, Rybak SM, Davey RT, Youle RJ, Ackerman EJ (1992): Angiogenin is a cytotoxic, tRNA-specific ribonuclease in the RNase A superfamily. *The Journal of Biological Chemistry* 267(30):21982-21986
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1971): Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50:199-204

- Schillberg S, Fischer R, Emans N (2003): Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60:433-445
- Schillberg S, Twyman RM, Fischer R (2005): Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants – technology assessment. *Vaccine* 23:1764-1769
- Schillberg S, Zimmermann S, Voss A, Fischer R (1999): Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic Research* 8:255-263
- Schnell R, Borchmann P, Schulz H, Engert A (2002a): Current strategies of antibody-based treatment in Hodgkin's disease. *Annals of Oncology* 13(1):57-66
- Schnell R, Linnartz C, Schon G, Katouzi A, Bohlen H, Horn-Lohrens O, Parwaresch R, Diehl V, Lemke H, Engert A (1995): Development of new ricin A-chain immunotoxins with potent antitumor effects against human Hodgkin cells *in vitro* and disseminated Hodgkin tumors in SCID mice using high-affinity monoclonal antibodies directed against the CD30 antigen. *International Journal of Cancer* 63:238-244
- Schnell R, Staak O, Borchmann P, Schwartz C, Matthey B, Hansen H, Schindler J, Ghetie V, Vitetta ES, Diehl V, Engert A (2002b): A phase I study with an anti-CD30 ricin A-chain immunotoxin (Ki-4.dgA) in patients with refractory CD30<sup>+</sup> Hodgkin's and Non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical Cancer Research* 8:1779-1786
- Schouten A, Roosien J, van Engelen FA, de Jong GAM, Borst-Vrenszen AWM, Zilverentant JF, Bosch D, Stiekema WJ, Gommers FJ, Schots A, Bakker J (1996): The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 30:781-793
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1994): Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for a rapid assessment of *in vitro* photosynthesis. In: Schulze E-D, Caldwell MM (eds): *Ecophysiology of Photosynthesis* 100:49-70
- Shaked H, Melamed-Bessudo C, Levy AA (2005): High-frequency gene targeting in *Arabidopsis* plants expressing the yeast *RAD54* gene. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 102(34):12265-12269
- Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV (1967): Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 28(5):815-820
- Sharif-Askari E, Alam A, Rheaume E, Beresford PJ, Scotto C, Sharma K, Lee D, DeWolf WE, Nuttall ME, Liebermann J, Sekaly RP (2001): Direct cleavage of human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *The EMBO Journal* 20:3101-3113

- Shi L, Mai S, Israels S, Browne K, Trapani JA, Greenberg AH (1997): Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *The Journal of Experimental Medicine* 185:855-866
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M (1986): The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *The EMBO Journal* 5:2043-2049
- Sieber M, Staratschek-Jox A, Diehl V (2003): Hodgkin Lymphome. In: Hiddemann W, Bartram C, Huber H (eds): *Lehrbuch der Klinischen Onkologie*
- Silverstein AM (2004): Labeled antigens and antibodies: the evolution of magic markers and magic bullets. *Nature Immunology* 5(12):1211-1217
- Smallshaw JE, Ghetie V, Rizo J, Fulmer JR, Trahan LL, Ghetie M-A, Vitetta ES (2003): Genetic engineering of an immunotoxin to eliminate pulmonary vascular leak in mice. *Nature Biotechnology* 21(4):387-391
- Smallshaw JE, Richardson JA, Pincus SH, Schindler J, Vitetta ES (2005): Preclinical toxicity and efficacy testing of RiVax, a recombinant protein vaccine against ricin. *Vaccine* 23:4775-4784
- Southern E (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98:503-517
- Spiegel H, Schillberg S, Sack M, Holzem A, Nähring J, Monecke M, Liao Y-C, Fischer R (1999): Accumulation of antibody fusion proteins in the cytoplasm and ER of plant cells. *Plant Science* 149:63-71
- Sphyris N, Lord JM, Wales R, Roberts LM (1995): Mutational analysis of the Ricinus lectin B-chains. Galactose-binding ability of the 2 $\gamma$  subdomain of Ricinus communis agglutinin B-chain
- Stachel SE, Messens E, van Montagu M, Zambryski P (1985): Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318(19):624-629
- Stachel SE, Nester EW, Zambryski PC (1986): A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 83:379-383
- Stefaniak B, Woźny A, Budna I (2002): Callus induction and plant regeneration in *Lemna minor* L.. *Biologia Plantarum* 45(3):469-472
- Stahnke B (2004): Konstruktion verschiedener Fusionsgene zur Expression von Morbus-Hodgkin-spezifischen Immuntoxinen in Pflanzen. Diplomarbeit, IMBIO, Universität Bonn

- Stein H, Schwarting R, Dallenbach F, Dienemann D (1989): Immunology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Recent Results in Cancer Research* 117:14-26
- Sternberg C (1898): Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Zeitschrift für Heilkunde* 19:21-90
- Stillmark H (1888): Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und anderen Euphorbiaceen. Dissertation, Universität Dorpat (Estland)
- Stöcker M, Tur MK, Sasse S, Krüßmann A, Barth S, Engert A (2003): Secretion of functional anti-CD30-angiogenin immunotoxins into the supernatant of transfected 293T-cells. *Protein Expression and Purification* 28:211-219
- Stöger E, Ma JK-C, Fischer R, Christou P (2005): Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Current Opinion in Biotechnology* 16:167-173
- Stöger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, Nicholson L, Drossard J, Williams S, Keen D, Perrin Y, Christou P, Fischer R (2000): Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology* 42:583-590
- Stomp A-M (2005): The duckweeds: A valuable plant for biomonitoring. *Biotechnology Annual Review* 11:69-99
- Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, Tanaka N, Munakata H, Nakamura M, Saganura K (1992): Cloning of the  $\gamma$ -chain of the human IL-2 receptor. *Science* 257:379-382
- Taylor NJ, Fauquet CM (2002): Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology* 21(12):963-977
- Teli NP, Timko MP (2004). Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79:125-145
- Thangavelu M, Belostotsky D, Bevan MW, Flavell RB, Rogers HJ, Lonsdale DM (1993): Partial characterization of the *Nicotiana tabacum* actin gene family: Evidence for pollen specific expression of one of the gene family members. *Molecular and General Genetics* 240(2):290-295
- Thomas DA, Du C, Xu M, Wang X, Ley TJ (2000): DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* 12:621-632
- Thomas DA, Scorrano L, Putcha GV, Korsmeyer SJ, Ley TJ (2001): Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98(26):14985-14990

- Till MA, Zolla-Pazner S, Gorny MK, Patton JS, Uhr JW, Vitetta ES (1989): Human immunodeficiency virus-infected T cells and monocytes are killed by monoclonal human anti-gp41 antibodies coupled to ricin A chain. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 86:1987-1991
- Trapani JA (2001): Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biology* 2(12):reviews3014.1-3014.7
- Trapani JA, Sutton VR, Thia KY, Li YQ, Froelich CJ, Jans DA, Sandrin MS, Browne KA (2003): A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *The Journal of Cell Biology* 160:223-233
- Tsuda M, Kozak RW, Goldman CK, Waldmann TA (1986): Demonstration of a new (non-Tac) peptide that binds interleukin-2: a potential participant in a multichain interleukin-2 complex. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 83:9694-9698
- Tulley RE, Beevers H (1976): Protein bodies of castor bean endosperm. Isolation, fractionation and characterisation of protein components. *Plant Physiology* 58:710-716
- Turner NC, Graniti A (1969): Fusicoccin, a fungal toxin that opens stomata. *Nature* 223:1070-1071
- Tzfira T, Citovsky V (2006): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 17:1-8
- Valagussa P (1993): Second neoplasms following treatment of Hodgkin's disease. *Current Opinion in Oncology* 5:805-811
- Valentine L (2003): *Agrobacterium tumefaciens* and the plant: The David and Goliath of modern genetics. *Plant Physiology* 133:948-955
- van Larebeke N, Engler G, Holsters M, van den Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort RA, Schell J (1974): Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing ability. *Nature* 252:169-170
- Vernade D, Herrera-Estrella A, Wang K, van Montagu M (1988): Glycine betaine allows enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens vir* genes by acetosyringone at low pH. *Journal of Bacteriology* 170(12):5822-5829
- Vervliet G, Holsters M, Teuchy H, van Montagu M, Schell J (1975): Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *Journal of General Virology* 26:33-48
- Vitetta ES, Smallshaw JE, Coleman E, Jafri H, Foster C, Munford R (2006): A pilot clinical trial of a recombinant ricin vaccine in normal humans. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103(14):2268-2273



- Vitetta ES, Thorpe PE (1991): Immunotoxins containing ricin or its A chain. *Seminars in Cell Biology* 2:47-58
- Volkov RA, Panchuk II, Schöffl F (2003): Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. *Journal of Experimental Botany* 54(391):2343-2349
- Wargalla UC, Reisfeld RA (1989): Rate of internalization of an immunotoxin correlates with cytotoxic activity against human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 86:5146-5150
- Weber G, Monajembashi S, Wolfrum J, Greulich KO (1989): A laser microbeam as a tool to introduce genes into cells and organelles of higher plants. *Berichte der Bunsengesellschaft - Physical Chemistry* 93: 252-254
- Whelan SL, Ferlay J (1992): Cancer incidence in five continents. Age-specific and standardized incidence rates. *International Agency For Research On Cancer Scientific Publications* 178-861
- White SL, Wise RR (1998): Anatomy and ultrastructure of *Wolffia columbiana* and *Wolffia borealis*, two nonvascular aquatic angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 159(2):297-304
- Więdołcha A (1999): Following angiogenin during angiogenesis: a journey from the cell surface to the nucleolus. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 47:299-305
- Wolf J, Kapp U, Bohlen H, Kornacker M, Schoch C, Stahl B, Mucke S, von Kalle C, Fonatsch C, Schäfer HE, Hansmann ML, Diehl V (1996): Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood* 87:3418-3428
- Wu H, Singh NK, Locy RD, Scissum-Gunn K, Giambrone JJ (2004a): Immunization of chickens with VP2 protein of infectious bursal disease virus expressed in *Arabidopsis thaliana*. *Avian Diseases* 48:663-668
- Wu Y-H, Shih S-F, Lin J-Y (2004b): Ricin triggers apoptotic morphological changes through caspase-3 cleavage of BAT3. *The Journal of Biological Chemistry* 279(18):19264-19275
- Xu ZP, Tsuji T, Riordan JF, Hu GF (2002): The nuclear function of angiogenin in endothelial cells is related to rRNA production. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294(2):287-292
- Yamamoto YT, Rajbhandari N, Lin X, Bergmann BA, Nishimura Y, Stomp A-M (2001): Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant: Journal of the Tissue Culture Association* 37:349-353

- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33(1):103-19
- Yoon JM, Han SH, Kwon OB, Kim SH, Park MH, Kim BK (1999). Cloning and cytotoxicity of fusion proteins of EGF and angiogenin. *Life Sciences* 64(16):1435-1445
- Yoshida K, Matsui T, Shinmyo A (2004): The plant vesicular transport engineering for production of useful recombinant proteins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 28:167-171
- Youn YS, Na DH, Yoo SD, Song S-C, Lee KC (2005): Carbohydrate-specific polyethylene glycol-modified ricin A-chain with improved therapeutical potential. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37:1525-1533
- Younes A, Kadin ME (2003): Emerging applications of the tumor necrosis factor family of ligands and receptors in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology* 21(18):3526-3534
- Zhou Y-J, Magnuson KS, Cheng TP, Gadina M, Frucht DM, Galon J, Candotti F, Geahlen RL, Changelian PS, O'Shea JJ (2000): Hierarchy of Protein Tyrosine Kinases in Interleukin-2 (IL-2) Signaling: Activation of Syk Depends on Jak3; However, Neither Syk nor Lck Is Required for IL-2-Mediated STAT Activation. *Molecular and Cellular Biology* 20(12):4371-4380
- Ziemienowicz A (2001): Odyssey of *Agrobacterium* T-DNA. *Acta Biochimica Polonica* 48(3):623-635
- Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P (2000): The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* 23(1):11-28

## **Danksagung**

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau Prof. Dr. Heide Schnabl für die Überlassung des ebenso spannenden wie herausfordernden Themas und ihr Vertrauen in mich und meine Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Diedrik Menzel für die freundliche Übernahme des Zweitprüferamtes und Prof. Dr. Volker Knoop für seine spontane und unkomplizierte Hilfe.

Frau PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert und Herrn Prof. Dr. Jörg Höhfeld danke ich für ihre Bereitschaft zur Mitgliedschaft in der Prüfungskommission.

Mein herzlicher Dank ergeht an die Projektleiter PD Dr. Dr. Stefan Barth und Dr. Dirk Voeste für eine gute Zusammenarbeit und ihr offenes Ohr bei Problemen.

Jan Albrecht, Elisabeth Becker, Dr. Klaus Becker, Dr. Robert Boehm, Dr. Andrea Friedrich und Bettina Stahnke sei für die Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit aufs Herzlichste gedankt.

Bei allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des IMBIO möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft, die verschiedenen Denkanstöße und das nette Arbeitsklima bedanken. Es war schön mit euch!

Nicht zuletzt danke ich Josef Manner und allen Mitarbeitern des Nutzpflanzengartens für ihre Unterstützung mit Rat und Tat bei der Anzucht der Tabakpflanzen.