

Expression von anti-HIV-1 Antikörper-ELP-Fusionen

in *Nicotiana tabacum*

- Biochemische und funktionelle Charakterisierung -

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Doreen M. Floß
geboren am 26. Juni 1979 in Plauen

Gutachter/in:

1. PD Dr. habil. Udo Conrad
2. Prof. Dr. Werner Roos
3. Prof. Dr. Inge Broer

Halle (Saale), 30. Juni 2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014137

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014137>]

*Die Spielregeln des Lebens verlangen von uns
nicht, dass wir um jeden Preis siegen, wohl aber,
dass wir den Kampf niemals aufgeben.*

Dr. med. et Dr. phil. Viktor Frankl (1905 - 1997)

INHALTSVERZEICHNIS
Abkürzungsverzeichnis**Tabellen & Abbildungen**

I	Einleitung	1
I.1	Pflanzliche Produktion pharmazeutisch relevanter Proteine	1
I.2	Ansätze zur Behandlung des Humanen Immundefizienzvirus (HIV)	6
I.3	Fusionsproteine mit elastinähnlichen Polypeptiden	14
I.4	Zielstellung der Arbeit	16
II	Material und Methoden	17
II.1	Material	17
II.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
II.1.2	Medien und Antibiotika	17
II.1.3	Plasmide	19
II.1.4	Oligonucleotide	20
II.1.5	Bakterienstämme	21
II.1.6	Pflanzenmaterial	22
II.1.7	Antikörper und Antigene	23
II.2	Methoden	24
II.2.1	Molekularbiologische Arbeiten	24
II.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA	24
II.2.1.2	Präparation von genomischer DNA	24
II.2.1.3	Agarosegelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten	24
II.2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
II.2.1.5	Restriktionsspaltung von DNA	26
II.2.1.6	Dephosphorylierung	26
II.2.1.7	Ligation von DNA	26
II.2.1.8	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	26
II.2.2	Transformationstechniken	27
II.2.2.1	Transformation von Bakterien	27
II.2.2.2	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	27
II.2.3	Arbeiten mit Pflanzen	28
II.2.3.1	Segregationsanalyse	28
II.2.3.2	Kreuzung	29
II.2.3.3	Regeneration doppelhaploider Pflanzen	29
II.2.4	Proteinbiochemische Arbeiten	30
II.2.4.1	Herstellung pflanzlicher Proteinextrakte	30
II.2.4.2	Quantifizierung von Proteinen	31
II.2.4.3	SDS-PAGE und Western Blot	31
II.2.4.4	Färbung von Proteinen	32

II.2.4.5	ELISA - <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	32
II.2.4.6	Affinitätsreinigung	34
II.2.4.7	ITC - <i>inverse transition cycling</i>	34
II.2.4.8	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse	35
II.2.4.9	Massenspektrometrie	37
II.2.5	Sonstige Methoden	37
II.2.5.1	HIV-Neutralisationstest	37
II.2.5.2	Elektronenmikroskopie	38
III	Ergebnisse	40
III.1	Konstruktion der Kassetten für die pflanzliche Expression	40
III.1.1	Plasmide für die ubiquitäre Expression der Immunglobulingene	40
III.1.2	Plasmide für die samenspezifische Expression der Immunglobulingene	42
III.2	Expression der Immunglobulingene in <i>Nicotiana tabacum</i>	43
III.2.1	Transiente Expression in Tabakblättern	43
III.2.2	Stabile Expression der Immunglobulingene in Tabak	46
III.3	Expression von Antikörpern und ELP-Fusionsproteinen in <i>Nicotiana tabacum</i>	49
III.4	Erzeugung von homozygoten, antikörperexprimierenden Tabaklinien	57
III.4.1	Identifikation homozygoter Tabaklinien nach Segregationsanalyse	58
III.4.2	Regeneration doppelhaploider Tabakpflanzen	60
III.5	Charakterisierung der rekombinanten Antikörper-ELP-Fusionen	66
III.5.1	Strukturelle Charakterisierung	67
III.5.1.1	Zusammenlagerung der einzelnen Antikörperketten zu kompletten Immunglobulin G-Molekülen	67
III.5.1.2	Analyse der N-Glycane an den schweren Antikörperketten und ELP-Fusionsproteinen	68
III.5.2	Funktionelle Charakterisierung	71
III.5.2.1	Nachweis der Antigenbindung der in Tabak exprimierten 2F5 Antikörper mit ELISA	71
III.5.2.2	Funktionelle Charakterisierung der 2F5 Antikörper mit Biacore	72
III.5.2.3	Funktionelle Charakterisierung der 2G12 Antikörper mit Biacore	77
III.5.2.4	<i>In vitro</i> HIV-Neutralisationsfähigkeit der rekombinanten Antikörper	81
III.6	Immunlokalisierung rekombinanter Antikörper und ELP-Fusionen in Samen transgener Tabakpflanzen	83
III.7	Anreicherung rekombinanter Antikörper-ELP-Fusionen aus Blattextrakten mit <i>inverse transition cycling</i>	86
IV	Diskussion	91
V	Zusammenfassung/Summary	114
VI	Literatur	116
VII	Anhang	133

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Chemikalien (z. B. NaCl), Enzymbezeichnungen (z. B. *Taq*), Länder (u. a. USA, BRD), Antikörper (z. B. 2F5, 2G12, MAK33), Maßeinheiten (z. B. m, s, bar) sowie Puffer und Medien, die im Text näher erläutert werden, befinden sich nicht im Abkürzungsverzeichnis. Für ein besseres Verständnis werden aus dem Englischen und dem Latein übernommene Begriffe nicht übersetzt und in der Arbeit kursiv hervorgehoben.

Einbuchstaben-Aminosäure code

Neutrale Aminosäuren

A	Alanin
G	Glycin
I	Isoleucin
L	Leucin
F	Phenylalanin
P	Prolin
W	Tryptophan
V	Valin

Polare Aminosäuren

N	Asparagin
C	Cystein
Q	Glutamin
M	Methionin
S	Serin
T	Threonin
Y	Tyrosin

Basische Aminosäuren

R	Arginin
H	Histidin
K	Lysin

Saure Aminosäuren

D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure

Nucleobasen

a	Adenin
c	Cytosin
g	Guanin
t	Thymin

Abkürzungen

A	absolute Aktivität
Abb.	Abbildung
<i>ad</i>	lat. »zu«
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Cytotoxizität
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure
At	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BiP	engl. <i>binding immunoglobulin protein</i> , Chaperon
bp	Basenpaare
BY2	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bright Yellow-2
bzw.	beziehungsweise
C1	Komponente des Komplementsystems
C1q	Subkomponente von C1
ca.	circa
CaMV 35S	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> 35S-Promotor
Carb	Carbenicillin
Carb ₅₀	50 mg/l Carbenicillin
CCR5	Chemokinrezeptor
CD	engl. <i>cluster for differentiation</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CDR	engl. <i>complementary determining region</i> (CDR1, CDR2, CDR3)
Cef	Cefotaxim
CFR	engl. <i>circulating recombinant form</i>
C _H	konstanter Teil der schweren Antikörperkette (C _H 1 - C _H 3 bzw. C _H 4)
CHO	engl. <i>Chinese hamster ovary</i>
C _L	konstanter Teil der leichten Antikörperkette
c-myc	AS 408 - 439 des humanen Proto-Oncogens p62
CPV	<i>Canine Parvovirus</i>

CT	engl. <i>complex type</i>	GST	Glutathion-S-Transferase
cv.	Sorte (engl. <i>cultivar</i>)	H / HC	schwere Kette eines Antikörpers
CV-N	Cyanovirin-N	H ₂ O _d	deionisiertes Wasser
CXCR4	Chemokinrezeptor	H ₂ O _{dd}	doppelt deionisiertes Wasser
DH	doppelhaploid	HAART	hoch aktive antiretrovirale Therapie
DNA	Deoxyribonucleinsäure	HEK 293	humane Zelllinie, engl. <i>human embryonic kidney cells</i>
dNTPs	Deoxynucleosidtriphosphate, Gemisch aus Deoxyadenosintriphosphat (dATP), Deoxycytidintriphosphat (dCTP), Deoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Deoxythymidintriphosphat (dTTP)	hGH	humanes Wachstumshormon
DPT	Diphtherie-Pertussis-Tetanus	HIV	Humanes Immundefizienzvirus
EGF-R	Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors	HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus Typ 1
ELISA	enzymgekoppelter Immunsorptions-test	HIV-2	Humanes Immundefizienzvirus Typ 2
ELP	elastinähnliches Polypeptid	HIVIG	hyperimmunes anti-HIV Immunglobulin
engl.	englisch	HIV-1 RF	HIV-1 Laborstamm
Env	Transmembranglycoproteine	HRGP	engl. <i>hydroxyproline rich glycoprotein</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum	HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
<i>et al.</i>	lat. »und andere« (<i>et alii</i>)	HTLV	humane T-Zell-Leukämie-Viren
F ₁	erste Filialgeneration	IC ₅₀	inhibitorische Konzentration um 50% des Viruswachstums <i>in vitro</i> zu blockieren
F ₂	zweite Filialgeneration	IgA	Immunglobulin A
F ₃	dritte Filialgeneration	IgA ₁	Immunglobulin A Subklasse 1
Fab	antigenbindender Teil eines Antikörpers; V _L -, C _L -, V _H - und C _H 1- Domäne (nach Papainspaltung)	IgD	Immunglobulin D
F(ab') ₂	V _L -, C _L -, V _H - und C _H 1-Domäne beider Antikörperarme und einige AS, die Fab nicht besitzt (nach Pepsinspaltung)	IgE	Immunglobulin E
Fc	engl. <i>fragment crystallizable</i> , C _H 2- und C _H 3-Domänen eines Antikörpers (nach Papainspaltung des IgG)	IgG	Immunglobulin G
FcγR	Fc-Rezeptor	IgG ₁	Immunglobulin G Subklasse 1
FcγRI	Fc-Rezeptor (CD64)	IgG ₃	Immunglobulin G Subklasse 3
FcγRII	Fc-Rezeptor (CD32)	IgM	Immunglobulin M
FcγRIII	Fc-Rezeptor (CD16)	II	Integraseinhibitoren
FDA	<i>U. S. Food and Drug Administration</i>	IL4	Interleukin 4
FI	Fusionsinhibitoren	IL6	Interleukin 6
Fuc	Fucose	IL10	Interleukin 10
Fuz	Fuzeon [®]	<i>in vitro</i>	lat. »im Glas«
g	Erdbeschleunigung	<i>in vivo</i>	lat. »im Leben«
Gag	Gag-Vorläuferprotein (Viruskern und -matrix)	ITC	engl. <i>inverse transition cycling</i>
Gal	Galactose	Kan	Kanamycin
ggf.	gegebenfalls	Kan ₅₀	50 mg/l Kanamycin
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin	Kan ^R	Kanamycinresistenz
gp	Glycoprotein	K _D	Dissoziationskonstante
gp41	Glycoprotein 41	k _{off}	<i>off rate</i> Konstante (Dissoziationsrate)
gp120	Glycoprotein 120	k _{on}	<i>on rate</i> Konstante (Assoziationsrate)
gp160	Vorstufenglycoprotein (gp120/gp41)	L / LC	leichte Kette eines Antikörpers
GRID	<i>Gay Related Immune Deficiency Syndrome</i>	lat.	lateinisch
		LC-ESI-MS	Elektrospray-Ionisations- Flüssigkeitschromatographie- Massenspektrometrie
		LeB4	Legumin B4
		Man	Mannose
		MaSp2	Tragfadenseidenprotein
		mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
		MW	Molekulargewicht
		MWCO	engl. <i>molecular weight cut off</i>

Nef	Nef-Protein (negativer Kontrollfaktor)	Tab.	Tabelle
NNRTI	nicht nucleosidische Inhibitoren der Reversen Transkriptase	Tat	Transaktivator der Transkription
Nos	Nopalinsynthase	TCID ₅₀	engl. 50% tissue culture infective dose
<i>nptII</i>	Gen der Neomycin-Phosphotransferase II	T-DNA	Transfer-DNA
NRTI	nucleosidische Inhibitoren der Reversen Transkriptase	Tet	Tetracyclin
NS0	Mausmyelomzelllinie, engl. <i>non-Ig secreting</i>	TGEV	<i>Transmissible Gastroenteritis Virus</i>
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>	Ti-Plas mid	tumorinduzierendes Plasmid
OD ₄₅₀	optische Dichte bei 450 nm	T _m	Schmelztemperatur
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm	T _{opt}	optimale Temperatur
OD ₆₃₀	optische Dichte bei 630 nm	TSP	gesamtlösliches Protein
OMT	engl. <i>oligo-mannose type</i>	T _t	engl. <i>inverse transition temperature</i>
p7	Nucleocapsidprotein	u.	und
p17	Matrixprotein	u. a.	unter anderem
p24	Capsidprotein	USP	engl. <i>unknown seed protein</i>
PAA	Polyacrylamid	usw.	und so weiter
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	UV	ultraviolett
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	v	Volumen
pH	pH-Wert	vgl.	vergleiche
PI	Proteaseinhibitoren	V _H	variabler Teil der schweren Kette eines Antikörpers
Pkt.	Punkt	VHH	Fragment von Kamelidenantikörper, der nur aus einem Paar schwerer Ketten besteht
Pol	Pol-Vorläuferprotein (Reverse Transkriptase, Protease, Integrase)	Vif	Virioninfektiositätsfaktor
R	Signal	V _L	variabler Teil der leichten Kette eines Antikörpers
Rel/NF-κB	Transkriptionsfaktor	Vol.	Volumen
Rev	posttranskriptioneller Transaktivator	Vpr	virionassoziiertes Protein R
RHDV	<i>Rabbit Haemorrhagic Disease Virus</i>	Vpu	virales Protein U
Rif	Rifampicin	v/v	Volumen pro Volumen
Rif ₅₀	50 mg/l Rifampicin	w	Gewicht
RNA	Ribonucleinsäure	Wt	Wildtyp
RNAi	RNA-Interferenz	w/v	Gewicht pro Volumen
RT	Raumtemperatur	x	Kreuzung
SA I/II	<i>Streptococcus mutans</i> SA I/II Antigen	Xyl	Xylose
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>	z. B.	zum Beispiel
scFv	Einkettenantikörper	Zm	<i>Zea mays</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-elektrophorese	α	relative Aktivität
sgp130	lösliches Glycoprotein 130	∅	Durchmesser
SHIV	Hybridvirus bestehend aus SIV und HIV	♂ / ♀	männlich / weiblich
SIV	Affenimmundefizienzvirus	2n	diploid
SIVcpz	SIV vom Schimpansen (engl. <i>chimpanzee</i>)	® und ™	registrierte Warenzeichen/Handelsmarken
SIVsm	SIV einer Mangabenart (engl. <i>sooty mangabey</i>)	35S	CaMV 35S
SpaA	<i>Streptococcus mutans</i> A Antigen	∞	unendlich
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz	1x	einfach
ss	engl. <i>single stranded</i>	100xELP	100 Wiederholungen des Pentapeptids VPGXG
ssp.	Subspecies		
T ₀	primärtransgene Pflanze		
T ₁	Nachkomme von T ₀ -Pflanze		

TABELLEN & ABBILDUNGEN

Tabelle	Seite
Tab. II-1: Konzentrationsangaben der verwendeten Antibiotika.	19
Tab. II-2: Herkunft der verwendeten Plasmide und deren bakterielle Resistenz.	20
Tab. II-3: Sequenzen der Oligonucleotide für PCR und Sequenzierung.	21
Tab. II-4: Antikörper für Western Blot, ELISA, Biacore und Elektronenmikroskopie.	23
Tab. III-1: Konstruktion der pRTRA-Plasmide mit den Kassetten zur ubiquitären Expression.	41
Tab. III-2: Molekulargewicht der rekombinanten Immunglobuline und Antikörper-ELP-Fusionen.	46
Tab. III-3: Regeneration haploider Pflanzen aus embryogenen Pollenkulturen und deren Genom-aufdopplung.	60
Tab. III-4: Auswertung der einzelnen Experimente zur Doppelhaploiden-Technik.	63
Tab. III-5: Auftreten der OMT und CT <i>N</i> -Glycane an den schweren Ketten der 2F5 Varianten aus Tabakblättern.	70
Tab. III-6: Auftreten der OMT und CT <i>N</i> -Glycane an den schweren Ketten der 2G12 Varianten aus Tabakblättern.	71
Tab. III-7: Kinetische Konstanten der Fuzeon [®] -Bindung der 2F5 Antikörpervarianten.	75
Tab. III-8: Bestimmung der absoluten Fuzeon [®] -Aktivität der Antikörper und möglicher Verluste an Molekulargewicht.	76
Tab. III-9: Kinetische Konstanten der gp120-Bindung der 2G12 Antikörpervarianten.	80
Tab. III-10: Abschätzung der relativen Aktivität der 2G12 Antikörperpräparationen gegenüber HIV-1 _{BaL} gp120.	80
Tab. III-11: <i>In vitro</i> Aktivität der 2G12 Antikörper.	82
Tab. VII-1: Anzahl regenerierter T ₀ -Pflanzen für die Expression der Immunglobulingene.	
Tab. VII-2: Analyse der Kreuzungsprodukte.	
Abbildung	Seite
Abb. I-1: Schematische Darstellung eines Virions von HIV-1 und der Epitope neutralisierender anti-HIV-1 Antikörper am gp120/gp41-Komplex.	8
Abb. III-1: Schematische Darstellung der Kassetten für die Expression der Immunglobulingene.	42
Abb. III-2: Nachweis der transient exprimierten Immunglobulingene in Tabakblättern nach Agrobakterium-Injektion.	44
Abb. III-3: Nachweis der assemblierten Antikörpervarianten nach Agrobakterium-Injektion.	45
Abb. III-4: Nachweis der leichten und schweren Antikörperketten sowie der ELP-Fusionen in Blättern transgener Tabakpflanzen.	47
Abb. III-5: Nachweis der 2G12 Antikörperketten und ELP-Fusionen in Samen transgener Tabakpflanzen.	48
Abb. III-6: Nachweis der 2F5 Antikörperketten und ELP-Fusionen in Samen transgener Tabakpflanzen.	49
Abb. III-7: Spaltungsanalyse der Nachkommen einer ausgewählten T ₀ -Linie.	50
Abb. III-8: Kombinationsmöglichkeiten der T ₀ -Linien zur Erzeugung der verschiedenen Antikörper in der Nachkommenschaft.	51
Abb. III-9: Analyse der Kreuzungsprodukte durch <i>Sandwich</i> -ELISA.	52
Abb. III-10: Nachweis der assemblierten 2F5 Antikörper und ELP-Fusionen in Tabakblättern.	52

Abb. III-11:	Akkumulation der schweren Ketten der 2F5 Antikörpervarianten in Blättern transgener Tabakpflanzen.	53
Abb. III-12:	Semi-quantitativer Western Blot zur Bestimmung der Expressionshöhe rekombinanter 2F5 Antikörpervarianten in Tabakblättern.	54
Abb. III-13:	Analyse putativ transgener Tabakpflanzen mit samenspezifischer Expression der 2F5 Immunglobulingene.	56
Abb. III-14:	Detektion rekombinanter 2G12 Antikörper und ELP-Fusionen in transgenen Tabakpflanzen.	57
Abb. III-15:	Erzeugung von Pflanzen mit Homozygotie für zwei nicht gekoppelte Transgene.	58
Abb. III-16:	Identifikation homozygoter Linien mit Akkumulation des Antikörpers 2F5.	59
Abb. III-17:	Analyse der regenerierten doppelhaploiden Pflanzen und Nachweis der Antigenbindung der in Tabak exprimierten Antikörper.	62
Abb. III-18:	Nachweis des Gendosiseffekts bei Doppelhaploiden im Vergleich zur hemizygoten F ₁ -Pflanze durch Western Blot.	64
Abb. III-19:	Analyse der Nachkommen doppelhaploider Pflanzen.	65
Abb. III-20:	Nachweis der rekombinanten Proteine und ELP-Fusionen in Samen doppelhaploider Pflanzen.	66
Abb. III-21:	Analyse der affinitätsgereinigten Antikörpervarianten mit Coomassie® Brilliant Blue und Western Blot.	68
Abb. III-22:	Auftreten der verschiedenen N-Glycane an den schweren Ketten der 2F5 Varianten aus Tabakblättern.	69
Abb. III-23:	Auftreten der verschiedenen N-Glycane an den schweren Ketten der 2G12 Varianten aus Tabakblättern.	71
Abb. III-24:	Nachweis der Antigenbindung rekombinanter 2F5 Antikörpervarianten.	72
Abb. III-25:	Nachweis der affinitätsgereinigten 2F5 Antikörpervarianten durch Western Blot.	73
Abb. III-26:	Analyse der Fuzeon®-Assoziation und -Dissoziation mit Biacore.	74
Abb. III-27:	Analyse der Fuzeon®-Sättigung der über Protein A immobilisierten 2F5 Antikörpervarianten mit Biacore.	75
Abb. III-28:	Nachweis der Vollständigkeit der 2F5 Antikörpervarianten nach Elution von der Protein A-Oberfläche des Biacore-Sensorchips.	77
Abb. III-29:	Evaluierung der Protein A-gereinigten rekombinanten 2G12 Antikörpervarianten für Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse.	78
Abb. III-30:	Analyse der HIV-1 _{BaL} gp120-Bindung der 2G12 Antikörpervarianten mit Biacore.	79
Abb. III-31:	Vergleich der Antigenbindung rekombinanter 2F5 Antikörper.	82
Abb. III-32:	Immunlokalisierung rekombinanter 2F5 Antikörper und ELP-Fusionen in unreifen Tabaksamen.	84
Abb. III-33:	Immunlokalisierung rekombinanter 2F5 Antikörper-ELP-Fusionen in reifen Tabaksamen.	85
Abb. III-34:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Samen des Wildtyps nach Immunogold-markierung.	86
Abb. III-35:	Anreicherung rekombinanter 2F5 Antikörper-ELP-Fusionen durch <i>inverse transition cycling</i> .	87
Abb. III-36:	Nachweis der rekombinanten 2F5 Antikörper-ELP-Fusionen nach <i>inverse transition cycling</i> aus Blattextrakten.	88
Abb. III-37:	Kontrolle der Löslichkeit der 2F5 Antikörper-ELP-Fusionen nach <i>inverse transition cycling</i> .	89
Abb. IV-1:	Schematische Darstellung der Orientierung der verschiedenen 2F5 Antikörpervarianten in der Dextranmatrix des Biacore-Sensorchips.	107

- Abb. VII-1:** Schematische Darstellung des pRTRA-anti-oxa-Vektors.
- Abb. VII-2:** Schematische Darstellung des pRTRA-ELP-Vektors.
- Abb. VII-3:** Schematische Darstellung des binären Plasmids pCB301-Kan.
- Abb. VII-4:** Semi-quantitativer Western Blot zur Bestimmung der Expressionshöhe rekombinanter Antikörper in Tabaksamen.
- Abb. VII-5:** Nachweis der Protein A-gereinigten Antikörper und ELP-Fusionen mit Coomassiefärbung.
- Abb. VII-6:** Semi-quantitativer Western Blot zur Bestimmung der Konzentration affinitäts gereinigter 2G12 Antikörper.
- Abb. VII-7:** Anreicherung rekombinanter 2G12 Antikörper-ELP-Fusionen durch *inverse transition cycling*.
- Abb. VII-8:** Nachweis der rekombinanten 2G12 Antikörper-ELP-Fusionen nach *inverse transition cycling* aus Blattextrakten.
- Abb. VII-9:** Kontrolle der Löslichkeit der 2G12 Antikörper-ELP-Fusionen nach *inverse transition cycling*.
- Abb. VII-10:** Schematische Darstellung des 2F5 Antikörpers mit C-terminaler ELP-Fusion an den schweren Ketten und die veränderten Masseschwerpunkte.

I Einleitung

Zwei wichtige Entdeckungen des 20. Jahrhunderts legten die Grundsteine für die Pflanzenbiotechnologie: (1) Die Fähigkeit des gram-negativen Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* zum natürlichen Gentransfer und (2) die Regeneration intakter Pflanzen aus einzelnen Zellen.

Beim Agrobakterium-vermittelten Gentransfer wird ein Teil der genetischen Information der Pathogene während der Infektion in das Genom der Wirtszelle überführt (Van Larebeke *et al.*, 1974). Zusammen mit der Regeneration aus Einzelzellen ermöglicht dies die Erzeugung transgener Pflanzen mit der stabilen Expression eines Fremdgens (Transgens, Barton *et al.*, 1983). Die biolistische Transformation (Übersicht bei Altpeter *et al.*, 2005) und der Agrobakterium-vermittelte Gentransfer (Übersicht bei Tzfira & Citovsky, 2006) sind die am häufigsten verwendeten Methoden zur Erzeugung gentechnisch veränderter Pflanzen.

Die Veränderung des pflanzlichen Genoms eröffnete die Möglichkeit, zellbiologisch relevante Fragen durch ektopische Expression oder Repression zu beantworten. Die Funktion eines ausgewählten Gens kann beispielsweise mit der RNAi-Technologie untersucht werden (Übersicht bei Small, 2007). Pflanzen können nach Integration bestimmter RNAi-Konstrukte auch neue Eigenschaften erhalten (Übersicht bei Mansoor *et al.*, 2006). Für die *in vitro* Untersuchung eines Enzyms, Metaboliten oder anderer Proteine findet die Immunmodulation Anwendung (Übersichten bei De Jaeger *et al.*, 2000 und Conrad & Manteuffel, 2001). Die Expression ausgewählter Transgene kann die Resistenz der regenerierten Pflanzen gegenüber Viruserkrankungen (Boonrod *et al.*, 2004; Akad *et al.*, 2007), Insekten (Guo *et al.*, 2007; Moon *et al.*, 2007), phytopathogenen Pilzen (Imani *et al.*, 2006; Jayaraj & Punja, 2007) sowie Herbiziden (Almquist *et al.*, 2004; Mulwa *et al.*, 2007) steigern. Eine Qualitätsverbesserung von Nutzpflanzen wurde ebenfalls gezeigt (Fox, 1994; Übersichten bei Botella-Pavia & Rodriguez-Concepcion, 2006 und Goedeke *et al.*, 2007).

I.1 Pflanzliche Produktion pharmazeutisch relevanter Proteine

Bereits seit Anfang der 1990er Jahre werden verstärkt transgene Pflanzen zur Produktion ökonomisch relevanter Polypeptide eingesetzt (*molecular farming*). Neben der Herstellung technischer Proteine (Übersicht bei Scheller & Conrad, 2005) werden ebenfalls Polypeptide für pharmazeutische Zwecke in pflanzlichen Systemen exprimiert (*molecular pharming*, Übersichten bei Fischer *et al.*, 2004; Goldstein & Thomas, 2004; Twyman *et al.*, 2005; Vitale & Pedrazzini, 2005 sowie Boehm, 2007).

Die Nachfrage nach Antikörpern für diagnostische sowie therapeutische Zwecke, nach Vakzinen (Impfstoffen) und anderen pharmazeutischen Polypeptiden (z. B. Enzyme, Hormone), nahm in den letzten Jahren deutlich zu und es wird mit einem 10-fachen Anstieg der Produktion dieser Proteine in Fermentersystemen in den kommenden zehn Jahren gerechnet (Übersicht bei Twyman *et al.*, 2005). Insgesamt erhielten 31 therapeutische

Proteine im Zeitraum von 2003 bis 2006 die Marktzulassung. Diese werden überwiegend in *Escherichia coli* oder in Säugerzellen hergestellt (Übersicht bei Walsh, 2006). Nachteile von tierischen bzw. humanen Zellkulturen liegen vor allem in einem hohen technischen und ökonomischen Produktionsaufwand. Neben Pflanzen oder Pflanzenzellkulturen sind Hefen, filamentöse Pilze (Übersicht bei Gerngross, 2004), transgene Tiere (Übersicht bei Keefer, 2004) oder Insektenzellen (Übersicht bei Ikonomou *et al.*, 2003) alternative Herstellungssysteme mit eukaryotischer posttranslationaler Modifizierung der rekombinanten Proteine.

Im Vergleich zur Herstellung von rekombinanten Proteinen in Bakterien (u. a. *E. coli*) oder Säugerzellen (z. B. CHO-Zellen, engl. *Chinese hamster ovary* und NS0-Myelomzellen) bieten Pflanzen Vorteile hinsichtlich Wirtschaftlichkeit, Produktionsumfang, Sicherheit und posttranslationaler Modifizierung (Übersichten bei Giddings, 2001 und Teli & Timko, 2004). Verschiedene pflanzliche Systeme wurden zur Produktion rekombinanter Proteine beschrieben (Übersichten bei Twyman *et al.*, 2003 und Fischer & Schillberg, 2004). Durch gezielte Wahl des Promotors können die gewünschten Polypeptide in verschiedenen Pflanzenorganen selektiv exprimiert werden. Besonders die Speicherorgane der Pflanze sind hierbei von Interesse. Ein Vorteil der samenspezifischen Expression besteht in der Akkumulation der rekombinanten Proteine in einem relativ kleinen Volumen. Die verminderte Degradation der Polypeptide in Samen sowie die einfache Lagerung und Verarbeitung des getrockneten Materials führten zur Etablierung von samenbasierten Produktionsplattformen in Getreiden, Leguminosen und Ölsaaten (Übersicht bei Stoger *et al.*, 2005a).

Pflanzliche Expressionssysteme werden u. a. nach Zielkompartiment des Transgens (Kern- oder Chloroplastentransformation), Gentransfermethode [direkter (z. B. biolistisch) und Agrobakterium-vermittelter Gentransfer], nach Stabilität der Transformation (transient oder stabil) und Zelltypspezifität unterteilt. Nachfolgend sind die wichtigsten Systeme zur pflanzlichen Produktion rekombinanter Proteine aufgeführt: (a) Pflanzen mit stabiler Expression des Transgens (Übersicht bei Fischer & Schillberg, 2004), (b) transiente Expression unter Verwendung von pflanzenpathogenen Viren (Übersicht bei Porta & Lomonosoff, 2002) oder Agrobakterium-Infiltration (Übersicht bei Fischer *et al.*, 1999c), (c) Expression in Chloroplasten (Übersicht bei Bock, 2006), (d) Rhizosekretion der gewünschten Proteine (Übersicht bei Gleba *et al.*, 1999) und (e) Expression in Pflanzenzellkulturen (Übersicht bei Fischer *et al.*, 1999a). Vor- und Nachteile der verschiedenen Expressionssysteme sowie der Pflanzenspecies zur Produktion von pharmazeutischen Proteinen werden ausführlich in der Literatur diskutiert (Übersichten bei Ma *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2004; Kamenarova *et al.*, 2005 und Twyman *et al.*, 2005). Hierzu zählen die Gesamtkosten des Produktionsprozesses, die benötigte Zeit für die Herstellung des Proteins, die Qualität des Endprodukts, posttranslationale Modifizierungen der rekombinanten Polypeptide und potenzielle Kontaminationsgefahren bei dem verwendeten Expressionssystem.

Fünfzehn Jahre nach ersten Veröffentlichungen zu stabil transformierten Pflanzen (Fraley *et al.*, 1983; Horsch *et al.*, 1984) wurde die Nutzung transgener Pflanzen zur Produktion ökonomisch relevanter Polypeptide erfolgreich demonstriert (Kusnadi *et al.*, 1998). Die pflanzliche Expression des ersten Proteins für eine pharmazeutische Anwendung gelang bereits im Jahr 1986. Barta *et al.* (1986) produzierten das humane Wachstumshormon (hGH) als Fusion mit dem Enzym Nopalinsynthase (Nos) in transgenen Tabakpflanzen und Sonnenblumenkalluskulturen. Die Anzahl der rekombinanten Proteine (z. B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Enzyme) aus Pflanzen für pharmazeutische Anwendungen stieg seitdem stetig an (Übersicht bei Nugent & Joyce, 2005). Mehr als 100 therapeutische und diagnostische rekombinante Antikörper sowie Vakzine wurden bisher in pflanzlichen Systemen produziert (Übersicht bei Twyman *et al.*, 2005). Bis heute erhielten lediglich Avidin (Hood *et al.*, 1997), β -Glucuronidase (Witcher *et al.*, 1998), Trypsin (Woodard *et al.*, 2003) und ein Vakzin für die Veterinärmedizin (Übersicht bei Walsh, 2006) die Marktzulassung. Im Hinblick auf die Herstellung von Vakzinen in Pflanzen war die Patentierung der pflanzlichen Produktion des *Streptococcus mutans* A Antigens (SpaA) in Tabak der Ausgangspunkt (Curtiss & Cardineau, 1990). In den nachfolgenden Jahren konnten mehrere Antigene für humane und tierische Anwendungen in transgenen Pflanzen oder pflanzlichen Zellkulturen exprimiert werden (Übersichten bei Streatfield & Howard, 2003; Streatfield, 2005; Twyman *et al.*, 2005; Joensuu, 2006 und Floss *et al.*, 2007). Ausgewählte Beispiele zur Anwendung für humanmedizinische Zwecke werden im Folgenden kurz erläutert.

Die Infektionskrankheit SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) trat 2003 in 29 Ländern auf und verursachte weltweit über 700 Todesfälle (<http://www.who.int/csr/sars/en/>). Vakzine gegen diesen Erreger (Coronavirus) wurden erfolgreich in Tabak, Tomate und Salat hergestellt (Pogrebnyak *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Gegen Pockenviren, sogenannte Vaccinaviren, wird bis heute ein Lebendimpfstoff eingesetzt. Die meisten Länder, u. a. auch Deutschland, hoben in den 1970er Jahren die Pockenimpfpflicht auf. Zur Produktion eines Vakzins, das im Gegensatz zum herkömmlichen Impfstoff deutlich geringere Nebenwirkungen besitzt, wurde eine immunogene Domäne des Vaccinavirus in verschiedenen pflanzlichen Systemen exprimiert (Golovkin *et al.*, 2007).

Letztendlich steht die Herstellung eines Vakzins mit mehreren Komponenten gegen verschiedene Pathogene im Mittelpunkt der gesamten Impfstoffentwicklung (Yu & Langridge, 2001). Ein Beispiel dafür ist der zur Grundimmunisierung und Auffrischimpfung verwendete DPT-Impfstoff gegen Diphtherie, Keuchhusten (Pertussis) und Tetanus. Entgiftete Toxine von *Corynebacterium diphtheriae* und *Clostridium tetani* sowie abgetötete *Bordetella pertussis* Bakterien sind Bestandteile des handelsüblichen Impfstoffs. Der Einsatz einer azellulären Pertussiskomponente, anstelle der kompletten Keuchhustenerreger, verbesserte entscheidend die Verträglichkeit des Präparats. Impfstoffe, bestehend aus gereinigten Proteinen der entsprechenden Pathogene, garantieren aufgrund ihrer Herstellung

und einer exakt definierten Konzentration ein erhöhtes Maß an Sicherheit bei ihrer Verwendung. Die Produktion eines DPT-Vakzins zusammengesetzt aus Epitopen der Toxine von *C. diphtheriae*, *B. pertussis* und *C. tetani* in transgenen Tomaten ist ein Ansatz für diese Strategie (Soria-Guerra *et al.*, 2007). Trotz der vielen Antigene, die für humanmedizinische Zwecke in Pflanzen exprimiert werden, wurden lediglich vier Vakzine im Rahmen von klinischen Studien geprüft (Übersicht bei Ma *et al.*, 2005b). Im Januar 2006 erhielt DowAgroScience (Indianapolis, IN, USA) die erste Zulassung für ein in Pflanzen produziertes Vakzin (Übersicht bei Walsh, 2006). Dieser in Pflanzenzellkulturen hergestellte Impfstoff ist gegen die Newcastle-Krankheit bei Vögeln gerichtet. Eine industrielle Produktion erfolgte jedoch bis heute nicht, da die anfallenden Kosten der Herstellung (Fermentation) noch immer zu hoch sind.

Neben Impfstoffen werden auch Antikörper oder Antikörperfragmente in Pflanzen produziert. Die spezifische Antigenbindung erlaubt eine vielfältige diagnostische und therapeutische Anwendung rekombinanter Immunglobuline. Eine erfolgreiche Expression humaner Antikörper in transgenen Pflanzen wurde erstmals 1988 im Rahmen einer Dissertation beschrieben (During, 1988; During *et al.*, 1990) und von Hiatt *et al.* (1989) bestätigt. Neben kompletten IgG- und IgA-Molekülen (Übersichten bei Ko & Koprowski, 2005 und Wycoff, 2005) wurden ebenfalls Fab-Fragmente (Peeters *et al.*, 2001; De Wilde *et al.*, 2002), Einkettenantikörper (scFv, De Jaeger *et al.*, 2002; Galeffi *et al.*, 2006), bispezifische scFv (Fischer *et al.*, 1999b), Diabodies (Vaquero *et al.*, 2002), Antikörperfusionsmoleküle (Spiegel *et al.*, 1999; Monger *et al.*, 2006; Scheller *et al.*, 2006; Van Droogenbroeck *et al.*, 2007) und Kameliden VHH-Antikörper (Ismaili *et al.*, 2007) in Pflanzen produziert. Umfassende Übersichten zu rekombinanten Antikörpern aus Pflanzen liefern Gomord *et al.* (2004), Stoger *et al.* (2005b) und Twyman *et al.* (2005).

Über 400 Immunglobuline werden zurzeit in klinischen Studien untersucht (Albrecht & DeNardo, 2006), aber lediglich zwei Vertreter stammen aus Pflanzen (Übersichten bei Ma *et al.*, 2005a und Ma *et al.*, 2005b). (1) Large Scale Biology Corp (Vacaville, CA, USA) produzierte mehrere Einkettenantikörper unter Verwendung eines viralen, transienten Systems in Tabak gegen Non-Hodgkin-Lymphome (McCormick *et al.*, 1999). (2) Ein weiteres Beispiel ist CaroRxTM (Planet Biotechnology, Hayward, CA, USA), ein IgA/G-Molekül gegen den Karieserreger *Streptococcus mutans* (Ma *et al.*, 1998).

Antikörper (Cetuximab, Nimotuzumab) gegen den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-R, engl. *epidermal growth factor receptor*), deren Homologe aus Säugerzellkulturen bereits verfügbar sind (Übersicht bei Reichert & Valge-Archer, 2007), wurden ebenfalls in pflanzlichen Systemen hergestellt (Ludwig *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2005).

Unterschiede in der posttranslationalen Modifizierung (u. a. Phosphorylierung, Acetylierung, Glycosylierung, Methylierung) von Polypeptiden aus verschiedenen Produktionssystemen können für die Sicherheit therapeutisch verwendeter Proteine von großer Bedeutung sein

(Übersicht bei Walsh & Jefferis, 2006). Im Hinblick auf Effektorfunktionen (ADCC, engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity*, Komplementaktivierung) und Antikörperstabilität (Halbwertszeit) spielt die Glycosylierung eine entscheidende Rolle (Übersicht bei Wright & Morrison, 1997). Zwei verschiedene Typen dieser posttranslationalen Modifizierung sind bekannt: *O*-Glycosylierung und *N*-Glycosylierung. Bei der erstgenannten werden Oligosaccharide vorwiegend an Serin- oder Threoninreste gebunden (Übersicht bei Van den Steen *et al.*, 1998). Allerdings ist über diese Modifizierung bei rekombinanten Proteinen aus Pflanzen relativ wenig bekannt (Übersichten bei Faye *et al.*, 2005 und Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007). Karnoup *et al.* (2005) untersuchten die *O*-Glycosylierung von zwei in Mais exprimierten humanen IgA₁-Molekülen und beschrieben erstmals die Hydroxylierung von Prolinresten innerhalb einer kurzen Aminosäuresequenz der *hinge* Region bei diesen rekombinanten Immunglobulinen. An den entstandenen Hydroxyprolinresten lagerten sich Arabinosereste an (Arabinosylierung). Die *O*-Glycosylierung von Hydroxyprolin und daraus resultierende HRGPs (engl. *hydroxyproline rich glycoprotein*) sind einzigartig in Pflanzen. HRGPs befinden sich in der Zellwand oder an der Außenseite der Plasmamembran und bilden die Mehrheit der pflanzlichen Oberflächenglycoproteine.

Die *N*-Glycosylierung der Proteine erfolgt in zwei Zellkompartimenten. Sie beginnt im Endoplasmatischen Reticulum (ER) und endet im Golgi-Apparat (Übersichten bei Helenius & Aebi, 2001 und Gomord *et al.*, 2005). Oligosaccharide werden bei diesem Vorgang an das Asparagin der AS-Sequenz N-X-T/S (X = jede AS außer Prolin) gebunden. Immunglobulin G-Moleküle besitzen *N*-Glycane in der konstanten Region der schweren Ketten (C_H2-Domäne). Während des Transports des Proteins durch ER und Golgi-Apparat wird der angefügte Zuckerrest (*N-linked core oligosaccharide*) durch Entfernen von terminalen Glucose- und Mannoseresten verändert, die sogenannten oligo-mannosidischen *N*-Glycane (OMT, engl. *oligo-mannose type*) entstehen. Im Golgi-Apparat können neue Zuckerreste angefügt werden und *N*-Glycane des komplexen Typs (CT, engl. *complex type*) bilden sich (Übersicht bei Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007). OMT *N*-Glycane bestehen aus fünf bis neun Mannoseresten (Man5 - Man9) und sind bei Glycoproteinen von Pflanzen oder Säugern identisch. Pflanzliche CT *N*-Glycane sind durch $\beta(1,2)$ -Xylose- und $\alpha(1,3)$ -Fucosereste gekennzeichnet. Letztere sind in Säugern über 1,6-glycosidische Bindung am proximalen *N*-Acetylglucosamin gebunden. Terminale $\beta(1,4)$ -Galactose- oder Sialinsäurereste sind bei pflanzlichen CT *N*-Glycanen nicht vorhanden, sondern eine spezielle Glycosylierung, die als Lewis A-Formation bezeichnet wird. β -Galactose und α -Fucose werden hierbei an das terminale *N*-Acetylglucosamin gebunden (1,3- bzw. 1,4-glycosidische Bindung, Übersicht bei Lerouge *et al.*, 1998). Die Lewis A-Formation, $\beta(1,2)$ -Xylose- und $\alpha(1,3)$ -Fucosereste sind in einigen Labortieren immunogen und könnten somit auch die Bildung spezifischer Antikörper in Menschen auslösen (Bardor *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2006; Übersicht bei Altmann, 2007).

Faye *et al.* (1993) und Bardor *et al.* (2003) detektierten spezifische Antikörper gegen $\alpha(1,3)$ -Fucosereste nach Immunisierung von Labortieren (Kaninchen, Ratten, C57BL/6 Mäuse) mit pflanzlichen Glycoproteinen (Meerrettichperoxidase bzw. β -Fructosidase). Die Bildung dieser spezifischen Antikörper wird jedoch kontrovers diskutiert, da nach Injektion von Meerrettichperoxidase und rekombinanten IgG (Guy's 13, Ma *et al.*, 1994) aus Pflanzen in BALB/c Mäuse keine glycoproteinspezifischen Antikörper nachgewiesen wurden (Chargelegue *et al.*, 2000). Weiterhin erhielten Jin *et al.* (2006) nach der Immunisierung von Kaninchen (Meerrettichperoxidase, glycanmodifizierte Transferrine) spezifische IgGs gegen *N*-Glycane mit Fucose- oder Xyloseresten. Diese Antikörper konnten bei C57BL/6 Mäusen ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Auch die vaginale Anwendung eines in Pflanzen produzierten Antikörpers mit komplexen *N*-Glycanen induzierte keine negativen Effekte bei Mäusen (Zeitlin *et al.*, 1998).

Die Fragen hinsichtlich der Bildung von Antikörpern gegen spezielle *N*-Glycane gelten jedoch auch für herkömmliche Zellkultursysteme. Zuckerreste nicht humanen Ursprungs konnten bei Antikörpern aus CHO-Zellen identifiziert werden und führten zu unerwünschten Nebenwirkungen in Menschen (Übersicht bei Gomord *et al.*, 2004). Für eine parenterale Anwendung (unter Umgehung des Magen-Darm-Trakts) von pflanzlich exprimierten, pharmazeutischen Proteinen bei Menschen sind *N*-Glycanstrukturen, die denen der Säuger ähneln, vorteilhaft. Die Retention rekombinanter Antikörper im pflanzlichen ER verhindert die Bildung der immunogenen $\beta(1,2)$ -Xylose- und $\alpha(1,3)$ -Fucosereste und somit die Entstehung von CT *N*-Glycanen (Sriraman *et al.*, 2004; Petruccelli *et al.*, 2006). Glycosyltransferasen pflanzlicher Expressionssysteme können mittels *knock out*- oder RNAi-Ansätzen inhibiert werden (Koprivova *et al.*, 2004; Strasser *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 2006; Downing *et al.*, 2006; Weise *et al.*, 2007). Dadurch wird das Anfügen immunogener Zuckerreste verhindert. Die Expression ausgewählter Glycosyltransferasen von Säugern in Pflanzen oder Pflanzenzellen führte zu *N*-Glycanen mit $\beta(1,4)$ -Galactoseresten an den rekombinanten Proteinen, die in diesen veränderten Systemen produziert wurden (Bakker *et al.*, 2001; Misaki *et al.*, 2003; Bakker *et al.*, 2006; Fujiyama *et al.*, 2007).

Trotz der erfolgreichen Produktion pharmazeutischer Proteine in Pflanzen wird eine Anwendung der grünen Biotechnologie kontrovers diskutiert. Das Hauptargument der Gegner liegt in einem möglichen Eintrag transgenen Materials in die Nahrungskette. Die Nutzung von Pflanzen, die nicht Bestandteil der Nahrungs- und Futtermittelherstellung sind, u. a. *Nicotiana* ssp., *Arabidopsis* oder Moos, aber auch *in vitro* Kulturen, bietet Sicherheit im Hinblick auf eine ungewollte Verbreitung des genetisch veränderten Materials.

I.2 Ansätze zur Behandlung des Humanen Immundefizienzvirus (HIV)

Die öffentliche Auseinandersetzung mit diesem Erreger, der bis heute mehrere Millionen Menschen infizierte, begann am 5. Juni 1981 mit einem Bericht im Mitteilungsblatt des CDC (*Center for Disease Control and Prevention*, Gottlieb *et al.*, 1981a). Die Autoren schilderten

den Gesundheitszustand fünf homosexueller Männer im Alter von 29 - 36 Jahren, bei denen neben dem Pathogen *Pneumocystis carinii* weitere Krankheitserreger nachgewiesen wurden. Ein detaillierter Zeitschriftenartikel folgte sechs Monate später (Gottlieb *et al.*, 1981b). Innerhalb kürzester Zeit ereigneten sich weitere Infektionen und bereits nach wenigen Monaten konnte von einer Epidemie gesprochen werden (Übersicht bei Sepkowitz, 2001). Da die Krankheit zuerst bei Homosexuellen auftrat, wurde sie als GRID (*Gay Related Immune Deficiency Syndrome*) bezeichnet. Der Begriff AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) fand 1982 erstmals Verwendung (CDC, 1982). 1983 konnte der Erreger dieser Erkrankung, ein Retrovirus der HTLV-Gruppe (**h**umane **T**-Zell-**L**eukämie-**V**iren), isoliert werden (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1983). Drei Jahre später erfolgte die Bezeichnung des Pathogens als *Human Immunodeficiency Virus* (HIV, Übersichten bei Coffin *et al.*, 1986 und CDC, 1986). Allerdings konnte mit der Identifizierung des HI-Virus in AIDS Patienten aus Westafrika ein weiteres Retrovirus nachgewiesen werden (Clavel *et al.*, 1986), das aufgrund der Unterschiede zu dem bereits bekannten HI-Virus (HIV-1) die Bezeichnung HIV-2 (*Human Immunodeficiency Virus type 2*) erhielt. Beide Varianten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Genomorganisation und Phylogenie.

HIV-1 teilt sich in die drei Untergruppen M (engl. *major*), O (engl. *outlier*) und N (engl. *non-M* oder *non-O*, Übersicht bei Hahn *et al.*, 2000), wobei die M-Gruppe am weitesten verbreitet und für 99% aller Infektionen verantwortlich ist (Übersicht bei Moore *et al.*, 2001). Sie wird zusätzlich in die Subtypen A bis K gegliedert, die ein regionales Auftreten zeigen (B: Europa, Amerika, Australien; C: Afrika, Indien; A und D: Zentral- u. Ostafrika). Weltweit führen die Subtypen A und C zu den meisten HIV-Infektionen. Durch Rekombinationen zwischen den einzelnen Subtypen entstehen stetig neue Formen, sogenannte CFRs (engl. *circulating recombinant forms*) und erschweren eine Klassifikation der HIV-Subtypen. Bei HIV-2 wurden sechs verschiedene Subtypen (A - F) identifiziert (Übersicht bei Hahn *et al.*, 2000).

Ursachen für die HI-Viruserkrankung waren zwei Affenviren, SIVcpz (engl. *chimpanzees*, HIV-1) und SIVsm (engl. *sooty mangabeys*, HIV-2), die auch Menschen infizierten (Übersicht bei Hahn *et al.*, 2000). Insgesamt konnten 26 Viruserkrankungen (SIV, *Simian Immunodeficiency Virus*) bei verschiedenen Affenspecies in Afrika identifiziert werden (Übersicht bei Hahn *et al.*, 2000). Eine weitere Übertragung von Affenviren auf den Menschen ist daher möglich und verstärkt, zusammen mit der stetigen Evolution von HIV, die Nachfrage nach effizienten Bekämpfungsstrategien für diese weltweit bedeutende Erkrankung.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Doktorarbeit beziehe ich mich auf HIV-1 und verwende zur Vereinfachung den Term „**HIV**“.

HIV ist ein (+) Einzelstrang RNA-Virus (ss) und gehört zur Familie der Retroviren (Übersicht bei Modrow *et al.*, 2003). Das Genom der Retroviren codiert drei Hauptproteine, Gag (Capsid), Pol (Enzyme für Virusreplikation und -integration) und Env (Glycoproteine der

Virushülle). Zusätzlich besitzt das HI-Virus sechs akzessorische Gene (*Vif*, *Vpu*, *Vpr*, *Tat*, *Rev*, *Nef*) für vorwiegend regulatorische Funktionen. Ein Virion (Abb. I-1A) besteht aus zwei identischen Kopien der (+) ssRNA, die im Komplex mit Nucleocapsidproteinen (p7) vorliegen. Die viralen Enzyme Integrase, Protease und Reverse Transkriptase befinden sich innerhalb des Viruscapsids, das aus dem Protein p24 besteht. Die Hülle des Viruspartikels ist eine Lipiddoppelmembran, die während der Replikation von der Plasmamembran der Wirtszelle gebildet wird und an deren Innenseite die Matrixproteine (p17) lokalisiert sind. Wesentliche Bestandteile der Virushülle entstammen somit von der Wirtsplasmamembran oder sind virale Glycoproteine, die bei der Anheftung des Virus an der Wirtszelle von Bedeutung sind. Die Nomenklatur dieser Glycoproteine (gp) erfolgt nach deren Molekulargewicht, gp41 und gp120. Glycoprotein 41 ist ein Transmembranprotein, während gp120 kovalent mit diesem verbunden ist und sich auf der äußeren Seite befindet. Gp120 umfasst fünf variable (V1 - V5) und fünf konservierte (C1 - C5) Regionen. Beide Glycoproteine werden als Vorstufenglycoprotein gp160 (gp120/gp41-Komplex) im ER synthetisiert, über die Golgi-Partikel zur Zelloberfläche transportiert und nach Spaltung in gp120 und gp41 in Form von Trimeren in die Virushülle eingebaut (Übersicht bei Wyatt & Sodroski, 1998).

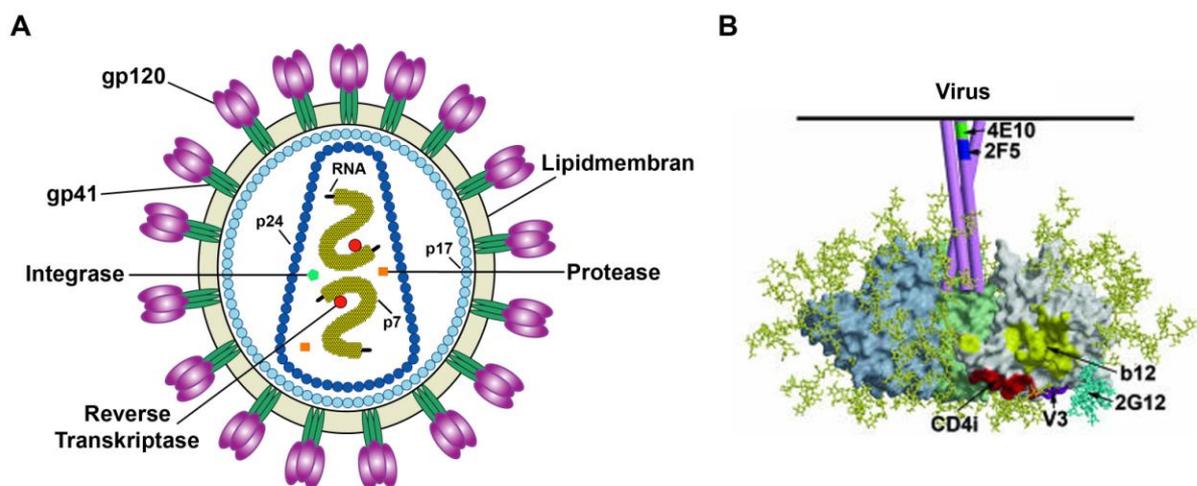


Abb. I-1: Schematische Darstellung eines Virions von HIV-1 und der Epitope neutralisierender anti-HIV-1 Antikörper am gp120/gp41-Komplex. **A:** Aufbau des Humanen Immundefizienzvirus Typ 1. gp120: externe Oberflächenglycoproteine; gp41: transmembrane Oberflächenglycoproteine; RNA: Ribonucleinsäure; p17: Matrixproteine; p7: Nucleocapsidproteine; p24: Capsidproteine (nach www.niaid.nih.gov/factsheets/howhiv.htm). **B:** Glycoproteinkomplex auf der Virussoberfläche von HIV-1/SIV. Die drei Monomere von gp120 sind grau, hellgrün und hellblau dargestellt. Gp41 ist schematisch mit drei violetten Röhren abgebildet. Die Kohlenhydratketten am gp120 sind gelb und die Mannosereste, mit denen der Antikörper 2G12 interagiert, erscheinen in türkis. 4E10, 2F5: neutralisierende Antikörper deren Epitope innerhalb von gp41 lokalisiert sind; b12: Antikörper, der die CD4-Bindestelle des Virions erkennt; V3: Antikörper, die an die nicht glycosylierte V3-Domäne binden (u. a. 447-52D); CD4i: CD4 induzierte Antikörper, erkennen die Bindestelle des Co-Rezeptors am gp120 (nach Burton *et al.*, 2005).

Die Übertragung des Virus erfolgt durch den Kontakt mit Körperflüssigkeiten (Blut, Sperma, Vaginalsekret oder Muttermilch) HIV-positiver Personen. Beim Infektionsprozess bindet das Virion über gp120 an den CD4-Rezeptor (engl. *cluster of differentiation*), der sich auf der Oberfläche der Wirtszelle befindet. Dieser Rezeptor ist auf CD4-tragenden T-Lymphozyten,

Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen vorhanden. Gp120 ändert daraufhin seine Konformation und kann an den CCR5 und/oder CXCR4 Co-Rezeptor binden (Übersicht bei Wyatt & Sodroski, 1998). HIV kann anhand des verwendeten Co-Rezeptors, der zur Familie der Chemokine zählt, in drei Varianten unterteilt werden: R5 (Bindung von CCR5), X4 (Bindung von CXCR4) oder R5X4 (Bindung von CCR5 oder CXCR4). Personen mit Homozygotie hinsichtlich einer nicht funktionellen Variante des Co-Rezeptors CCR5 sind gegenüber dem Virus weitgehend resistent (Liu *et al.*, 1996). Eine Infektion kann aber dennoch durch Stämme, die den CXCR4 Co-Rezeptor nutzen, erfolgen (Übersicht bei Suresh & Wanchu, 2006).

Nach Fusion des Viruspartikels mit der Wirtszelle (gp41 ist erforderlich) erfolgt die Synthese viraler DNA durch die Reverse Transkriptase. Diese wird anschließend zum Zellkern der Wirtszelle transportiert und in deren chromosomale DNA integriert (Integrase). Für die Transkription der viralen DNA und somit für die Virusreplikation sind zelluläre Faktoren, hauptsächlich Rel/NF- κ B Transkriptionsfaktoren, erforderlich. Die entstehenden Virusproteine werden durch die virale Protease in ihre funktionelle Form gebracht. Nach der Zusammenlagerung viraler RNA und viraler Proteine verlassen vollständige Viruspartikel die Wirtszelle. Eine detaillierte Beschreibung des Vorgangs der HIV-Infektion findet sich bei Alcami (2004). Ohne Unterbrechung des HIV-Lebenszyklus verteilt sich das Virus im gesamten Körper und zerstört wichtige Zellen des Immunsystems. Drei Phasen der Virusinfektion im Patienten können unterschieden werden: (1) Primärinfektion (meist grippeähnliche Erkrankung, große Virusmengen), (2) symptomfreies Latenzstadium (Nachweis von HIV-spezifischen Antikörpern, geringe Konzentration an zirkulierenden Viren) und (3) symptomatische Phase (opportunistische Infektionen, maligne Tumore, neurologische Symptome, Abfall der CD4-positiven Zellen, Defekte in der zellvermittelten Immunantwort). Die sinkende Anzahl CD4-tragender T-Zellen begünstigt in der Spätphase der Viruserkrankung Infektionen mit sekundären Pathogenen, u. a. *Candida albicans* oder *Cryptococcus neoformans*. In den meisten Fällen führt dies zum Tod der Patienten.

Etwa 33 Millionen Menschen waren 2007 mit dem HI-Virus infiziert und 2,5 Millionen starben aufgrund ihres geschwächten Immunsystems (UNAIDS, 2007). Falls bis 2010 keine effiziente Bekämpfung des Retrovirus erfolgt, wird dann weltweit mit 60 Millionen HIV-1 infizierten Personen gerechnet (Übersicht bei Haynes & Montefiori, 2006). Bis heute gibt es noch keine vollständige Heilung von AIDS. Lediglich die Virusreplikation kann mit einer Kombination verschiedener Wirkstoffe eingeschränkt werden. Diese hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART, engl. *highly active antiretroviral therapy*) wird seit über zehn Jahren bei HIV eingesetzt und verringert die Sterberate infizierter Patienten (Schneider *et al.*, 2005). Die von der FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) bewilligten HAART-Medikamente werden in fünf Klassen unterteilt: **n**icht **n**ucleosidische **I**nhibitoren der **R**eversen **T**ranskriptase (NNRTI), **n**ucleosidische **I**nhibitoren der **R**eversen **T**ranskriptase (NRTI), **P**rotease**i**nhibitoren (PI), **F**usions**i**nhibitoren (FI) und **I**ntegrase**i**nhibitoren (II,

http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/ApprovedMedstoTreatHIV_FS_en.pdf). Nachteile der Behandlung, u. a. starke Nebenwirkungen und auftretende Resistenzen des Virus gegenüber den Wirkstoffen, verstärken die Nachfrage nach weiteren therapeutischen Ansätzen für eine Behandlung der Immunschwächekrankheit.

Wie bei jedem anderen Virusbefall erfolgt auch bei HIV eine Reaktion des Immunsystems. Der Glycoproteinkomplex (gp120/gp41) auf der Oberfläche der Viruspartikel (vgl. Abb. I-1A) ist Angriffspunkt neutralisierender Antikörper und somit für eine humorale Immunantwort verantwortlich. Das Virus entwickelte jedoch verschiedene Mechanismen, die eine Bindung der gebildeten Antikörper wirkungsvoll verhindern. Hierzu zählen die Glycosylierung von gp120 (etwa 50% der molaren Masse von gp120, die V3-Domäne ist als einzige der variablen Regionen nicht glycosyliert) und somit die Maskierung bestimmter Peptidstrukturen, sowie das Vorliegen des gp120/gp41-Komplexes als Trimer und der daraus resultierende Schutz von Epitopen, die bei Monomeren einfacher zugänglich wären. Zusätzlich ändert sich während der Rezeptorbindung und des Infektionsprozesses die Konformation der Glycoproteine auf der Virusoberfläche. Dies erschwert die Bindung von Antikörpern an diese Strukturen (Übersichten bei Burton, 1997 und Burton *et al.*, 2004). Weitere Ursachen für eine verringerte Bildung von Immunglobulinen mit neutralisierender Wirkung sind die geringe Immunogenität des gp120/gp41-Komplexes, die Diversität der HIV-Isolate und die Zerstörung der für die Immunantwort essenziellen CD4-Targetzellen durch das Virus. Die virale DNA ist nach Integration in die chromosomale DNA der Wirtszelle für eine Immunreaktion außerdem nicht erreichbar und kann dort jahrelang verborgen überdauern (Provirus). Trotz der genannten umfangreichen Schutzmechanismen von HIV-1 konnten Antikörper mit einer neutralisierenden Wirkung gegen verschiedene Isolate identifiziert werden (Übersicht bei Burton *et al.*, 2005).

Die Epitope oder Proteinstrukturen, die von HIV-1 neutralisierenden Antikörpern erkannt werden, befinden sich auf der Oberfläche des Viruspartikels und könnten isoliert als immunogene Proteine zur Bildung dieser Immunglobuline eingesetzt werden (Übersichten bei Check, 2003; Burton *et al.*, 2005 und Eggink *et al.*, 2007). Peptide oder Fragmente des gp120/gp41-Komplexes können theoretisch zur Induktion neutralisierender Antikörper bei der aktiven Immunisierung verwendet werden. Ein Beispiel hierfür ist das Epitop ELDKWA des neutralisierenden Antikörpers 2F5 (Muster *et al.*, 1993). Der Einsatz dieses Peptids innerhalb eines komplexen Immunogens zur Auslösung einer humoralen Immunantwort scheiterte jedoch (Coeffier *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007). Obwohl bei verschiedenen Pathogenen Proteine identifiziert wurden, an die neutralisierende Antikörper mit hoher Effizienz binden, ist dies keine Garantie für eine effektive *in vivo* Bildung solcher Immunglobuline nach Verabreichung der synthetisch hergestellten Antigene (Übersicht bei Van Regenmortel, 1999). Ansätze für das Design eines effizienten Immunogens liefern Burton *et al.* (2004). Neben Molekülen, die dem ursprünglichen Glycoproteinotrimer auf der Virusoberfläche entsprechen, können auch veränderte Env-Moleküle, die die Epitope neutralisierender

Antikörper verbessert repräsentieren oder Produkte des Infektionsprozesses, die ein Offenlegen verdeckter Epitope auslösen, appliziert werden. Ein Beispiel hierfür wurde kürzlich veröffentlicht. Zhou *et al.* (2007) untersuchten die Bindung stabilisierter gp120-Moleküle an CD4 sowie an den Antikörper b12 (Burton *et al.*, 1994). Auf diese Weise gelang die strukturelle Definition des b12 Epitops, das ein mögliches Target der humoralen Immunantwort darstellt. Zur Induktion einer zellvermittelten Immunantwort gegen das HI-Virus wurden Gag sowie Pol aber auch akzessorische Proteine (Tat, Rev bzw. Nef) eingesetzt (Übersicht bei Robert-Guroff, 2002). Einige dieser Vertreter, HIV-1 gp120 (Bogers *et al.*, 2004), Kernprotein p24 (Perez-Filgueira *et al.*, 2004; Obregon *et al.*, 2006), Tat (Karasev *et al.*, 2005) oder Nef (Marusic *et al.*, 2007), werden bereits in pflanzlichen Systemen exprimiert. Allerdings besitzen diese rekombinanten Proteine keine Marktzulassung. Einen detaillierten Überblick über HIV-Vakzine liefern Calarota & Weiner (2003) sowie Gudmundsdotter *et al.* (2006). Da die Identifizierung eines effizienten Vakzins bis heute nicht gelang, erlangt die passive Immuntherapie, das heißt die Verabreichung von Antikörpern zur Verhinderung von Neuinfektionen, aber auch zur Reduktion des Virusgehalts bereits infizierter Patienten, erneut Bedeutung (Übersicht bei Check, 2003).

Das Prinzip der passiven Immunisierung wurde bereits 1890 unter dem Begriff „Serumtherapie“ beschrieben. Emil Behring und Shibasaburo Kitasato zeigten, dass Immunität gegen Diphtherie- sowie Tetanustoxine durch Stoffe hervorgerufen wird, die sich im Blut infizierter Tiere befinden. Sie bezeichneten diese als Antikörper. Weiterhin konnten sie eine Übertragung der Immunität durch Injektion des Serums von infizierten Tieren auf gesunde bestätigen (Behring & Kitasato, 1890). Nur wenige Jahre später entdeckte Paul Ehrlich, dass Antikörper als sogenannte *magic bullets* zur Markierung von Krebszellen dienen können (Ehrlich, 1900).

Antikörper sind wichtige Komponenten des Immunsystems. Die auftretenden Immunglobuline (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) besitzen eine Basisstruktur bestehend aus leichten (L bzw. LC, engl. *light chain*) und schweren (H bzw. HC, engl. *heavy chain*) Ketten. Diese werden wiederum in Isotypen unterteilt: L (κ , λ) sowie H (γ , μ , α , δ , ϵ). Jede Antikörperkette besitzt eine variable (V_L , V_H) und konstante Region (C_L , C_H). Der konstante Teil der schweren Kette wird nochmals gegliedert (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} bzw. C_{H4}). Innerhalb der variablen Regionen von leichten und schweren Ketten existieren drei Bereiche mit einer hohen Variabilität der AS-Sequenz. Die sogenannten CDRs (engl. *complementary determining regions*) bilden die Antigenbindestelle des Antikörpers (Paratop). Den größten Anteil der Immunglobuline im Serum bildet IgG, bestehend aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und so eine charakteristische Y-Form darstellen.

Die klassische Herstellung von polyklonalen Antikörpern erfolgt über die Immunisierung von Labortieren und Gewinnung aus deren Blutserum. 1975 entwickelten Kohler & Milstein die Hybridomtechnologie. Von einem immunisierten Labortier wird die Milz entnommen und die B-Lymphozyten werden isoliert. Anschließend erfolgt die Fusion der Lymphozyten

(Expression des Immunglobulins auf deren Oberfläche) mit einer Plasmazytomzelle. Die resultierende Hybridomzelle, die den monoklonalen Antikörper produziert, wird in Zellkultur vermehrt. Unter Verwendung rekombinanter DNA-Techniken können heute monoklonale Antikörper oder auch deren Derivate in verschiedenen Systemen hergestellt werden (Übersichten bei Kipriyanov & Le Gall, 2004; Conrad & Scheller, 2005 und Holliger & Hudson, 2005).

Eine passive Immunisierung gegen HIV kann bei Gefahr der Virusübertragung von einer infizierten Mutter auf ihr Kind oder bei der Verhinderung der Infektion bei sexuellen Kontakten angewendet werden. Der Übergang des Virus von einer HIV-positiven Mutter auf das Kind geschieht im Uterus, während des Geburtsvorgangs oder postnatal durch die Muttermilch (Übersicht bei Bulterys *et al.*, 2004). Eine Infektion über die Muttermilch erfolgt bei 100 von HIV-positiven Müttern gestillten Kindern in 8,9 Fällen (The BHITS Group, 2004). Vielversprechende Tierstudien zu dieser Problematik unterstützen antikörperbasierte Therapien zur Verhinderung der Mutter-Kind-Übertragung des Virus (Übersicht bei Safrin *et al.*, 2004).

In den letzten Jahren verstärkte sich die Diskussion über den Einsatz sogenannter *microbicides* zum Schutz vor HIV (Übersichten bei Stone, 2002; McGowan, 2006 und Pellett-Madan *et al.*, 2006). Dies sind Substanzgemische, die im vaginalen oder rektalen Bereich zur Verhinderung der Übertragung von sexuellen Krankheiten/Pathogenen eingesetzt werden. Untersuchungen mit vaginal applizierten HIV-neutralisierenden Antikörpern bei Affen verliefen erfolgreich (Veazey *et al.*, 2003). Der Schutz vor der vaginalen Virusübertragung war von der Dosis des eingesetzten Antikörpers abhängig. Zur Reduktion von HIV-Infektionen mit Hilfe dieser Strategie wurde die *Alliance for Microbicide Development* (www.microbicide.org) gegründet. Kombinationen von anti-HIV Antikörpern, Wirkstoffen, die eine Anheftung des Virions an die Wirtszelle verhindern (z. B. PRO 2000, Carageenan, Cellulosesulfat) und antiretroviralen Medikamenten (u. a. Tenofovir, Emtricitabin, Nevirapin) könnten effizient als *microbicides* eingesetzt werden (Übersicht bei Weber *et al.*, 2005). Eine Zusammenstellung verschiedener Substanzen für den Einsatz gegen HIV-Infektionen findet sich bei McGowan (2006) und Lederman *et al.* (2006).

Die pflanzliche Expression von Komponenten für *microbicides* rückt ebenfalls in den Blickwinkel der Biotechnologie (Übersicht bei Whaley & Zeitlin, 2005). Ein Beispiel ist Cyanovirin-N (CV-N), ein 11 kDa Protein, das aus dem Cyanobakterium (Blualge) *Nostoc ellipsosporum* isoliert wurde. Hierbei handelt es sich um ein HI-Virus inaktivierendes Protein, das an das virale gp120 bindet (Boyd *et al.*, 1997). In transgenen Pflanzen konnte funktionelles CV-N akkumuliert werden (Sexton *et al.*, 2005).

Wie bereits erwähnt, wurden in den letzten Jahren Antikörper mit einer neutralisierenden Wirkung gegenüber verschiedenen HIV-1 Isolaten beschrieben (Übersicht bei Burton *et al.*, 2005). Die Neutralisation des Virus durch diese Antikörper beruht zum einen auf der Bindung des gp120/gp41-Komplexes und somit auf einer Verhinderung der Interaktion mit dem

CD4-Rezeptor. Die Immunglobuline können aber auch erst nach Anheftung des Virus an der Wirtszelle agieren und auf diese Weise die Fusion des Virions mit der Wirtszelle inhibieren (Übersicht bei Parren & Burton, 2001). Im letztgenannten Fall erkennen die Antikörper bestimmte Epitope, deren Zugänglichkeit durch die CD4-Rezeptorbindung verbessert wurde.

Fünf HIV-1 neutralisierende Antikörper, 447-52D (Gorny *et al.*, 1992), b12 (Burton *et al.*, 1994), 2F5 (Purtscher *et al.*, 1994), 2G12 (Trkola *et al.*, 1996) und 4E10 (Stiegler *et al.*, 2001), deren Epitope sich innerhalb des gp120/gp41-Komplexes befinden, wurden charakterisiert. Eine schematische Darstellung der verschiedenen Regionen, an denen diese Immunglobuline binden, liefert Abb. I-1B. Epitope der Antikörper, die die Bindestelle des Co-Rezeptors an gp120 erkennen und als **CD4 induced antibodies** (CD4i) bezeichnet werden (Thali *et al.*, 1993), sind ebenfalls eingezeichnet. Der Antikörper b12 erfasst die CD4-Bindestelle des Viruspartikels und verhindert so die Interaktion mit diesem Rezeptor auf der Wirtszelle (Burton *et al.*, 1994). 447-52D ist gegen die nicht glycosylierte V3-Domäne von gp120 gerichtet (Gorny *et al.*, 1992). Neutralisierende Antikörper (2F5, 4E10) deren Epitope sich in der Nähe der viralen Membran am gp41 befinden, wurden ebenfalls identifiziert (Purtscher *et al.*, 1994; Stiegler *et al.*, 2001). Wie bereits erwähnt, bindet 2F5 an das lineare Epitop ELDKWA innerhalb gp41 (AS 662 - 667, Muster *et al.*, 1993). Unmittelbar benachbart befindet sich das Epitop des Antikörpers 4E10, das minimal sechs Aminosäuren (NWFNIT) umfasst (Zwick *et al.*, 2001). Eine Besonderheit ist der Antikörper 2G12. Dieser erkennt oligo-mannosidische Zuckerreste, die kovalent an gp120 gebunden sind (Sanders *et al.*, 2002; Scanlan *et al.*, 2002) und nutzt somit Komponenten, mit denen sich das Virus normalerweise gegenüber Antikörperinteraktionen schützt (Übersicht bei Johnson & Desrosiers, 2002). Weiterhin besitzt 2G12 eine einzigartige Struktur innerhalb der variablen Domänen beider schwerer Ketten, das sogenannte V_H/V_H' *interface*, und verfügt somit über eine *secondary binding site* für die Bindung von zwei weiteren Zuckermolekülen (Calarese *et al.*, 2003).

Die Antikörper 2F5 und 2G12, deren pflanzliche Expression wesentliches Thema dieser Doktorarbeit ist, wurden aus HIV-1-Patienten, die keine oder nur sehr schwache Symptome zeigten, isoliert. Durch Fusion von Lymphozyten mit der Myelomzelllinie CB-F7 konnten antikörperexprimierende Hybridomzellen erzeugt werden (Grunow *et al.*, 1988; Buchacher *et al.*, 1994). Der Antikörper 2G12 gehört zur IgG-Subklasse 1 mit leichten Ketten des κ -Typs, 2F5 hingegen zählt zu den IgG₃ (κ) Immunglobulinen (Buchacher *et al.*, 1994). Die Sequenzen der Immunglobulingene beider Antikörper wurden von Kunert *et al.* (1998) beschrieben. Da IgG₁-Moleküle eine längere Halbwertszeit als Antikörper der Subklasse IgG₃ besitzen, erfolgte ein IgG₃/IgG₁ *subclass switch* bei dem Antikörper 2F5 (Kunert *et al.*, 2000). Beide Immunglobuline werden heute routinemäßig in CHO-Zellen produziert (POLYMUN Scientific Immunbiologische Forschung GmbH, Wien, Österreich, www.polymun.at) und zeigen *in vitro* eine neutralisierende Wirkung gegenüber vielen HIV-Isolaten (Trkola *et al.*, 1995; Binley *et al.*, 2004). Die Kombination beider Antikörper mit HIVIG (**hyperimmunes**

anti-HIV Immunglobulin), das vom Plasma eines HIV-Infizierten stammt, verbesserte die *in vitro* Neutralisation mehrerer HIV-Isolate des B-Typs im Vergleich zur Wirkung einzeln verabreichter Antikörper (Mascola *et al.*, 1997). Eine passive Immunisierung von Rhesusaffen durch Applikation der einzelnen Antikörper oder Kombinationen gewährleistete einen Schutz gegenüber intravenöser (Mascola *et al.*, 1999), intravaginaler (Mascola *et al.*, 2000) und oraler Infektion (Baba *et al.*, 2000) mit dem SHI-Virus. Ebenso wurde die Infektion von neugeborenen Rhesusaffen durch postnatale Verabreichung von 2F5 und 2G12 verhindert (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2001; Ferrantelli *et al.*, 2004).

Eine Untersuchung beider Antikörper im Menschen erfolgte bereits in ersten klinischen Studien. Die Probanden zeigten keine unerwünschten Nebenwirkungen (Armbruster *et al.*, 2002). Im Plasma der untersuchten Patienten konnte eine Reduktion des HIV-Titers und der infizierten peripheren Blutzellen beobachtet werden (Stiegler *et al.*, 2002). Bei der Virusübertragung von einer Mutter auf das Kind oder nach Kontakt mit HIV-infiziertem Material ist die Injektion von 2F5 und 2G12 mit einem weiteren neutralisierenden Antikörper (4E10) eine vielversprechende Möglichkeit (Armbruster *et al.*, 2004). Eine Kombination dieser drei Antikörper wurde ebenfalls bei infizierten Patienten eingesetzt, um den Virusgehalt nach HAART-Behandlung möglichst niedrig zu halten (Trkola *et al.*, 2005). Allerdings werden *in vivo* hohe Konzentrationen an Antikörpern benötigt. Inwieweit eine antikörperbasierte Therapie zur passiven Immunisierung bei HIV realisiert werden kann, ist bis heute unklar. Gary Nabel vom *Vaccine Research Center* in Bethesda, Maryland, USA sagte hierzu (Übersicht bei Check, 2003): “*Whether we can really come up with the magic bullet is still unknown.*“

Für eine passive Immunisierung sind hohe *in vivo* Konzentrationen der neutralisierenden Antikörper notwendig. Dies wiederum implementiert eine gesteigerte Nachfrage nach diesen rekombinanten Produkten und eröffnet so neue Anreize für deren Herstellung in pflanzlichen Systemen. Die Akkumulation von funktionellen anti-HIV Antikörpern 2F5 und 2G12 in BY2 Suspensionszellkulturen bzw. in Maiskörnern wurde kürzlich gezeigt (Sack *et al.*, 2007; Rademacher *et al.*, 2008).

I.3 Fusionsproteine mit elastinähnlichen Polypeptiden

Elastinähnliche Polypeptide (ELP, engl. *elastine like polypeptide*) sind Biopolymere, deren AS-Zusammensetzung auf das Pentapeptid VPGXG zurückzuführen ist, das dem hydrophoben Bereich des Tropoelastins entstammt (Übersicht bei Urry, 1992). Die variable Aminosäure (X) kann jede beliebige außer Prolin sein. Erste Untersuchungen dieser elastinähnlichen Polypeptide sind auf Dan Urry zurückzuführen, der eine Vielzahl synthetisierte und hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften charakterisierte (Übersicht bei Urry, 1997). Rekombinante DNA-Techniken erlauben heute die Herstellung verschiedener synthetischer ELPs für spezielle Anwendungen (Meyer & Chilkoti, 2002).

ELPs sind durch einen temperaturabhängigen Phasenwechsel charakterisiert (Übersicht bei Urry, 1993). Unterhalb einer definierten Temperatur (T_t , engl. *inverse transition temperature*) und in Wasser befinden sich die Polymere unstrukturiert in Lösung. Steigt die Temperatur über T_t kommt es zur Faltung der Polypeptidketten und es entstehen intramolekulare Bindungen zwischen den unpolaren Regionen der ELPs (Übersichten bei Li *et al.*, 2001 und Li & Daggett, 2003). Die Übergangstemperatur T_t hängt von mehreren Variablen, u. a. der variablen AS (X), dem Molekulargewicht, der Konzentration der ELPs und dem pH-Wert sowie der Salzkonzentration der Lösung ab (Urry *et al.*, 1991a; Girotti *et al.*, 2004; Meyer & Chilkoti, 2004). Bereits 1999 wurde der temperaturabhängige reversible Phasenübergang bei der Entwicklung eines Reinigungsverfahrens für ELP-Fusionsproteine genutzt (Meyer & Chilkoti, 1999). Dan Meyer und Ashutosh Chilkoti isolierten rekombinante Proteine mit ELP-Fusion aus *E. coli* durch aufeinanderfolgende und sich wiederholende Aggregations-, Zentrifugations- und Lösungsschritte. Sie bezeichneten dieses Verfahren als *inverse transition cycling* (ITC). Mehrere in *E. coli* exprimierte ELP-Fusionsproteine wurden unter Anwendung dieser Methode gereinigt (Shimazu *et al.*, 2003; Trabbic-Carlson *et al.*, 2004a; Trabbic-Carlson *et al.*, 2004b; Chow *et al.*, 2006). Das temperaturabhängige Verfahren wurde zur Reinigung rekombinanter Spinnenseiden-ELP- und mini-sgp130-ELP-Fusionen aus transgenen Tabakblättern erfolgreich verwendet (Scheller *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006). Eine Kombination aus ITC und Filtertechnik ermöglicht den industriellen Einsatz dieses Verfahrens (Ge *et al.*, 2006).

Für eine Steigerung der Akkumulation rekombinanter Proteine in Pflanzen werden verschiedene Fusionsstrategien eingesetzt (Hondred *et al.*, 1999; Spiegel *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2006; Obregon *et al.*, 2006). Besonders die Verwendung elastinähnlicher Polypeptide erzielte im Hinblick auf die Erhöhung des Expressionsniveaus gute Erfolge. Scheller *et al.* (2004) und Patel *et al.* (2007) wiesen eine verstärkte Akkumulation von Spinnenseiden-ELP-Fusionen in transgenen Tabakpflanzen nach. Rekombinante therapeutische Proteine wurden ebenfalls durch C-terminale ELP-Fusion vermehrt in transgenen Pflanzen exprimiert (Lin *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007). Besonders erfolgreich war die Akkumulation funktioneller Einkettenantikörper (scFv) mit 100 Wiederholungen des Pentapeptids VPGXG in Samen transgener Tabakpflanzen (Scheller *et al.*, 2006). Ein 40-facher Anstieg des Expressionsniveaus gegenüber den nicht fusionierten Antikörperfragmenten auf ca. 20% TSP wurde beobachtet.

Die einfache sowie effiziente Reinigung von ELP-Fusionen und die gesteigerte Akkumulation der rekombinanten Proteine sind Vorteile der ELP-Fusionstechnologie. Zusätzlich weisen elastinähnliche Polypeptide eine biologische Verträglichkeit bei *in vivo* Applikationen auf (Urry *et al.*, 1991b). Die Anwendung dieser synthetischen Proteine als Transportmittel für eine systemische Verteilung von Medikamenten oder zur Beschichtung bestimmter Gewebe wurde ebenfalls gezeigt (Übersichten bei Chilkoti *et al.*, 2006 und Simnick *et al.*, 2007). Kürzlich beschriebene selbstspaltende ELP *tags*, bestehend aus Wiederholungen der

Pentapeptide VPGXG fusioniert mit einem steuerbaren selbstspaltenden Intein, können zukünftig in der Bioseparation eine entscheidende Rolle spielen (Banki *et al.*, 2005).

I.4 Zielstellung der Arbeit

Antikörperbasierte Therapien sind die einzige Möglichkeit für eine unverzügliche Immunität gegenüber biologischen Schaderregern (Übersicht bei Casadevall *et al.*, 2004). Die passive Immunisierung erfordert jedoch große Mengen der rekombinanten Antikörper. Um die erhöhte Nachfrage nach diesen Produkten zu erfüllen, können Pflanzen als Expressionssysteme der pharmazeutischen Proteine eingesetzt werden (vgl. I.1). In den vergangenen Jahren wurden neben Antigenen auch Antikörper und Antikörperderivate in verschiedenen Pflanzen akkumuliert (Übersichten bei Stoger *et al.*, 2005b und Twyman *et al.*, 2005). Besonders die samenspezifische Expression ist im Hinblick auf die Stabilität der Antikörper aber auch weiterer rekombinanter Polypeptide vorteilhaft (Übersicht bei Stoger *et al.*, 2005a).

Monoklonale Antikörper, die gegen bestimmte Bereiche der Glycoproteine auf der Oberfläche des HI-Virus gerichtet sind, können zur Verhinderung einer Virusübertragung im Vaginaltrakt, zur Hemmung der Mutter-Kind-Infektion oder zur Reduktion des Virusgehalts infizierter Personen eingesetzt werden (vgl. I.2). Die pflanzliche Expression der beiden neutralisierenden anti-HIV-1 Antikörper 2F5 und 2G12 wird innerhalb des EU-Projekts „Pharma-Planta“ (www.pharmaplanta.org) angestrebt. Kürzlich wurde die Akkumulation beider Immunglobuline in verschiedenen transgenen Systemen beschrieben (Sack *et al.*, 2007; Rademacher *et al.*, 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wird erstmals die ELP-Fusionstechnologie zur Expression kompletter Antikörper in transgenen Pflanzen angewendet. Die Akkumulation von anti-HIV-1 Antikörpern, 2F5 und 2G12, soll in Blättern und Samen transgener Tabakpflanzen durch ELP-Fusion deutlich erhöht werden. Für die Erzeugung stabiler Linien mit Expression der Immunglobuline ist ein erstes Ziel dieser Arbeit die Regeneration transgener Pflanzen mit Akkumulation der einzelnen Antikörperketten. Nach Kreuzungen ausgewählter Linien sollen die rekombinanten Immunglobuline aus den resultierenden F₁-Pflanzen gereinigt, biochemisch und funktionell charakterisiert werden.

Die ELP-Fusionsstrategie bietet zusätzlich eine kostengünstige und einfache Alternative zur Reinigung der rekombinanten Proteine mittels *inverse transition cycling* (vgl. I.3). Auch dieses Verfahren soll innerhalb der vorliegenden Arbeit evaluiert werden.

Durch Kombination von pflanzlicher Produktion und ELP-Fusionstechnologie können nachgelagerte Verfahrensschritte bei der Herstellung (Verarbeitung des Pflanzenmaterials, Extraktion der Proteine, Proteingewinnung und -reinigung) pharmazeutischer Proteine vereinfacht und deren Kosten deutlich gesenkt werden. Große Mengen dieser Pharmazeutika können somit besonders für Entwicklungsländer mit einer hohen Nachfrage nach diesen Produkten, aber geringer Wirtschaftskraft, zur Verfügung gestellt werden.

II Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die benötigten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien stammen, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH + Co. (Karlsruhe, BRD), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Schütt GmbH (Göttingen, BRD) und VWR International GmbH (Darmstadt, BRD). Lösungen und Puffer wurden nach Standardprotokollen (Sambrook & Russell, 2001) in H₂O_{dd} angesetzt und bei Bedarf autoklaviert (20 min; 121°C; 2 bar). Für besondere Reagenzien werden an den jeweiligen Textstellen entsprechende Hinweise erteilt.

II.1.2 Medien und Antibiotika

Die Zusammensetzung der Nährmedien für Bakterien erfolgte nach Sambrook & Russell (2001). Alle Medien wurden sterilisiert (20 min; 121°C; 2 bar). Antibiotika (vgl. Tab. II-1) sowie weitere Reagenzien (z. B. Glucose) wurden steril filtriert (Spritzenfilter, CA-Membran, 0,20 µm, Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt, BRD) und nach dem Abkühlen auf 50°C zugegeben.

Medien zur Anzucht von Bakterien

Luria-Bertani Medium (LB)	1,0% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeeextrakt 1,0% (w/v) NaCl [1,5% (w/v) Agar]*
NZY-Medium (pH 7,5)	0,5% (w/v) NaCl 0,2% (w/v) MgSO ₄ 0,5% (w/v) Hefeeextrakt 1,0% (w/v) NZ Amine [1,5% (w/v) Agar]*
SOC-Medium	2,0% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeeextrakt 10,0 mM NaCl 2,5 mM KCl 1,0 mM MgCl ₂ ** 1,0 mM MgSO ₄ ** 2,0 mM Glucose** [1,5% (w/v) Agar]*

YEB-Medium (pH 7,0)	0,5% (w/v) Rinderextrakt 0,1% (w/v) Hefeextrakt 0,5% (w/v) Pepton 0,5% (w/v) Saccharose 2,0 mM MgSO ₄ **
---------------------	---

*Zusatz nur bei Nährmedium für Platten

**Zusatz nach dem Autoklavieren

Medien zur in vitro Kultur von Tabak

MS-Medium (pH 5,6 - 5,8)	0,44% (w/v) Murashige & Skoog-Fertigsubstanz (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) 3,0% bzw. 2,0% (w/v) Saccharose 0,05% (w/v) MES [0,9% (w/v) Agar]*
MG-Medium (pH 5,6 - 5,8)	0,44% (w/v) Murashige & Skoog-Fertigsubstanz (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) 1,6% (w/v) Glucose 0,05% (w/v) MES 0,9% (w/v) Agar

*Zusatz nur bei Nährmedium für Platten

Die Zugabe von 1,0 mg/l 6-Benzylaminopurinlösung (BAP) und 0,2 mg/l α -Naphthalenessigsäurelösung (NES) zu den Medien für die *in vitro* Kultur von Tabakpflanzen erfolgte nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen des Mediums. Beide Lösungen waren steril.

Antibiotika

Die Antibiotika wurden, falls nicht anders angegeben (Tab. II-1), als Stammlösungen in H₂O_{dd} angesetzt und steril filtriert (Spritzenfilter, CA-Membran, 0,20 μ m, Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt, BRD).

Tab. II-1: Konzentrationsangaben der verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin (Amp)	100 g/l	100 mg/l
Carbenicillin (Carb)	50 g/l	50 mg/l
Cefotaxim (Cef)	200 g/l	500 mg/l
Kanamycin (Kan)	50 g/l	50 mg/l
Rifampicin (Rif)	50 g/l*	50 mg/l
Tetracyclin (Tet)	5 g/l**	12,5 mg/l

* in DMSO, ohne Filtersterilisation

** in Ethanol, ohne Filtersterilisation

II.1.3 Plasmide

Die **pTRAk-Vektoren** von T. Rademacher (RWTH Aachen, Aachen, BRD) dienen als *templates* für die Amplifikation der Immunglobulingene.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwende ich oftmals den Term „**Gen**“, obwohl es sich ausschließlich um den codierenden Sequenzbereich eines Gens handelt.

Die Plasmide pRTRA-anti-oxa und pRTRA-ELP (beide IPK, Gatersleben, BRD) fungierten bei den Klonierungsschritten als Basisvektoren (vgl. Anhang VII.1.1 und VII.1.2). Das Plasmid **pRTRA-anti-oxa** beruht auf dem Vektor pRTRA15 (Artsaenko *et al.*, 1995), wobei die *Bam*HI-Schnittstelle nach dem *c-myc tag* (1311 bp) eliminiert wurde. Der Vektor **pRTRA-ELP** enthält die codierende Sequenz für 100 Wiederholungen des elastinähnlichen Peptids VPGXG. Die Herstellung von 100xELP mit Valin, Glycin oder Alanin als variable Aminosäure (X) wurde in Scheller *et al.* (2004) beschrieben. Sequenzen der samenspezifischen Promotoren (USP- und LeB4-Promotor) wurden den Plasmiden **pRTRA7/3-USP-anti-oxa-scFv** und **pRTRA7/3-LeB4-anti-oxa-scFv** (beide Scheller *et al.*, 2006) entnommen.

Als binärer Vektor bei der Agrobakterium-vermittelten Transformation von Tabak (vgl. II.2.2.2) wurde **pCB301-Kan** (vgl. Anhang VII.1.3) verwendet. Dieses Plasmid basiert auf pCB301 (Xiang *et al.*, 1999) und entstand durch den Transfer eines *Bgl*III/*Bam*HI-T-DNA-Fragments des binären Vektors BIN19 (Bevan, 1984).

Eine Übersicht aller verwendeten Plasmide liefert Tab. II-2.

Tab. II-2: Herkunft der verwendeten Plasmide und deren bakterielle Resistenz. L: leichte Kette; H: schwere Kette; 2F5: anti-HIV-1 Antikörper 2F5; 2G12: anti-HIV-1 Antikörper 2G12; ELP: elastinähnliches Polypeptid; anti-oxa: anti-Oxazolon Einkettenantikörper; USP: USP-Promotor; scFv: Einkettenantikörper; LeB4: LeB4-Promotor; Kan/Kan^R: Kanamycinresistenz; Amp^R: Ampicillinresistenz.

Plas mid	Resistenz	Herkunft
pTRAk-2F5L	Amp ^R	T. Rademacher, RWTH Aachen, Aachen, BRD
pTRAk-2F5H	Amp ^R	T. Rademacher, RWTH Aachen, Aachen, BRD
pTRAk-2G12L	Amp ^R	T. Rademacher, RWTH Aachen, Aachen, BRD
pTRAk-2G12H	Amp ^R	T. Rademacher, RWTH Aachen, Aachen, BRD
pRTRA-ELP	Amp ^R	Basierend auf pRT103 (Topfer <i>et al.</i> , 1987)
pRTRA-anti-oxa	Amp ^R	Basierend auf pRTRA15 (Artsaenko <i>et al.</i> , 1995)
pRTRA7/3-USP-anti-oxa-scFv	Amp ^R	Scheller <i>et al.</i> (2006)
pRTRA7/3-LeB4-anti-oxa-scFv	Amp ^R	Scheller <i>et al.</i> (2006)
pCB301-Kan	Kan ^R	Basierend auf pCB301 (Xiang <i>et al.</i> , 1999)

II.1.4 Oligonucleotide

Für die Amplifikation der Immunglobulingene sowie spezifischer DNA-Fragmente wurden Oligonucleotide der Firma Metabion International AG (Martinsried, BRD) verwendet. Primer zur Sequenzierung bestimmter DNA-Fragmente wurden von der MWG Biotech AG (Martinsried, BRD) bezogen.

Die Sequenzen der einzelnen Primer sowie deren Schmelztemperaturen (T_m) finden sich in Tab. II-3.

Tab. II-3: Sequenzen der Oligonucleotide für PCR und Sequenzierung. Schnittstellen der Restriktionsenzyme (*NcoI*, *BamHI*, *NotI*), die zur Klonierung verwendet wurden, sind hervorgehoben. LC: leichte Kette; HC: schwere Kette; 2F5: anti-HIV-1 Antikörper 2F5; 2G12: anti-HIV-1 Antikörper 2G12; pTRAK: Primer zur Amplifikation der Immunglobulingene; pSEQ: Primer zur DNA-Sequenzierung; 35S: CaMV 35S-Promotor; USP: USP-Promotor; LeB4: LeB4-Promotor; pMPCR: Primer für *Multiplex*-PCR; for: *forward*; rev: *reverse*; T_m: Schmelztemperatur.

Name	Sequenz	T _m
pTRAK-LC- <i>NcoI</i> _{for}	5'-gac <u>cca tgg</u> aca tga ggg tcc ceg ctc agc-3'	75,0°C
pTRAK-LC- <i>BamHI</i> _{rev}	5'-gac <u>gga tcc</u> aca ctc tcc cct gtt gaa gc-3'	70,9°C
pTRAK-LC- <i>NotI</i> _{rev}	5'-gac <u>gcg gcc gca</u> cac tct ccc ctg ttg aag c-3'	76,1°C
pTRAK-HC- <i>NcoI</i> _{for}	5'-gac <u>cca tgg</u> agt tgg gac tga gct gga ttt tc-3'	70,8°C
pTRAK-HC- <i>BamHI</i> _{rev}	5'-gac <u>gga tcc</u> ttt acc cg gaga cag gga gag-3'	72,2°C
pTRAK-HC- <i>NotI</i> _{rev}	5'-gac <u>gcg gcc gct</u> tta ccc gga gac agg gag ag-3'	77,2°C
pTRAK-2F5HC- <i>BamHI</i> _{rev}	5'-gac <u>gga tcc</u> agc cta cac cca ctc caa aat c-3'	70,8°C
pTRAK-2F5HC- <i>BamHI</i> _{for}	5'-gac <u>gga tcc</u> gtc agc ccc cag gaa agg ccc ta-3'	75,9°C
pTRAK-2G12HC- <i>BamHI</i> _{rev}	5'-gac <u>gga tcc</u> tcc cgc ctt gac cag gcc tc-3'	75,2°C
pTRAK-2G12HC- <i>BamHI</i> _{for}	5'-gac <u>gga tcc</u> ctc ata ctc tcc tgt gga gtc tc-3'	72,1°C
pSEQ-35S _{for}	5'-cac tga cgt aag gga tga cgc-3'	66,0°C
pSEQ-USP _{for}	5'-tga cat cca ctt gga gga tgc-3'	64,0°C
pSEQ-LeB4 _{for}	5'-tcc ata gcc atg cat gct gaa g-3'	64,0°C
pSEQ-2F5LC _{for}	5'-gcg gca gtg gtt ctg gga-3'	60,0°C
pSEQ-2F5HC-1 _{for}	5'-ctg cct ggt caa gga cta c-3'	60,0°C
pSEQ-2F5HC-2 _{for}	5'-cgt gtg gtc agc gtc ctc-3'	60,0°C
pSEQ-2G12LC _{for}	5'-gcg gca gtg gat ctg gaa c-3'	62,0°C
pSEQ-2G12HC-1 _{for}	5'-ctg cct ggt caa gga cta c-3'	58,0°C
pSEQ-2G12HC-2 _{for}	5'-ctg gtg gtc agc gtc ctc-3'	60,0°C
pMPCR-LC _{for}	5'-acg aac tgt ggc tgc acc atc tc-3'	64,2°C
pMPCR-LC _{rev}	5'-cac tct ccc ctg ttg aag ctc ttt g-3'	64,6°C
pMPCR-HC _{for}	5'-tte ccc ctg gca ccc tcc tc-3'	65,5°C
pMPCR-HC _{rev}	5'-tcc tcc cgc ggc ttt gtc tt-3'	61,4°C

II.1.5 Bakterienstämme

Escherichia coli

Der *Escherichia coli* Stamm XL1-blue {*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10 (Tet^r)*}, Stratagene, La Jolla, CA, USA} wurde als Wirtszelle für rekombinante DNA-Moleküle verwendet. Für die Kultivierung (Fest- sowie Flüssigkultur) dieses Stamms wurde LB-Medium (vgl. II.1.2) mit dem Zusatz des plasmidspezifischen Antibiotikums verwendet (vgl. Tab. II-1 und Tab. II-2). Die pTRAK-HC-

Vektoren wurden im dam-negativen Stamm SCS110 {[*rpsL* (Str^r) *thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44* Δ (*lac-proAB*) F' (*traD36proAB*⁺, *lacI*^f *lacZ*Δ*AMI*]}, Stratagene, La Jolla, CA, USA} amplifiziert, da die *Xba*I-Erkennungssequenz in diesem Plasmid dam methyliert ist. Dieser Bakterienstamm wird in NZY-Medium mit dem plasmidspezifischen Antibiotikum kultiviert (vgl. II.1.2).

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte über Nacht bei 37°C (Flüssigkultur: 140 rpm, Kulturschüttler Multitron, INFORS AG, Bottmingen, BRD; Agarplatten: Heraeus Kelvitron[®] t, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ein Aliquot Flüssigkultur der Kolonie, die das erwartete Plasmid enthielt, wurde mit 7% (v/v) DMSO versetzt, in N₂ überführt und bei -80°C für eine spätere Verwendung gelagert.

Agrobacterium tumefaciens

Für den Agrobakterium-vermittelten Gentransfer sowie die transiente Expression der Transgene in Tabakblättern wurde der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm C58C1 (pGV2260, Deblaere *et al.*, 1985) verwendet. Die Flüssigkultur dieses Stamms erfolgte in SOC- bzw. YEB-Medium (vgl. II.1.2) mit Carbenicillin (Ti-Plasmid), Rifampicin (chromosomale DNA) und Kanamycin (bakterielles, plasmidspezifisches Selektionsantibiotikum, vgl. Tab. II-1 und Tab. II-2) für 24 - 48 h bei 28°C und 140 rpm (Kulturschüttler Multitron, INFORS AG, Bottmingen, BRD). Als Nährmedium für Agarplatten wurde vorwiegend SOC-Medium mit den jeweiligen Antibiotika verwendet (Heraeus Kelvitron[®] t, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ein Aliquot Flüssigkultur einer Kolonie mit dem gewünschten binären Plasmid wurde mit 7% (v/v) DMSO versetzt, in N₂ überführt und bei -80°C für spätere Experimente gelagert.

II.1.6 Pflanzematerial

Zur transienten Expression der Antikörpergene, der Regeneration transgener Pflanzen durch den Agrobakterium-vermittelten Gentransfer (vgl. II.2.2.2) sowie für die Erzeugung der Doppelhaploiden (DH, vgl. II.2.3.3) wurde *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN (SNN) verwendet.

Die Aussaat, Anzucht und Kultur von Tabakpflanzen *in vitro* erfolgte auf MS-Medium (vgl. II.1.2) mit Kanamycin (Selektionsantibiotikum) und ggf. Cefotaxim (breites antibakterielles Spektrum, u. a. Agrobakterien, vgl. Tab. II-1 und Tab. II-2) bei 21°C und 16 h Licht pro Tag (150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Licht). Tabaksamen wurden für die *in vitro* Aussaat in 80% (v/v) Ethanol für 2 min oberflächensterilisiert.

Für die Aussaat und Anzucht der Tabakpflanzen (3- bis 4-Blattstadium) im Gewächshaus (22°C; 50 - 70% relative Luftfeuchte; 16 h Licht pro Tag, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Licht) wurden Substrat 1 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste-Groß Hesepe, BRD) und Pflanztöpfe mit 6 cm Durchmesser (Hermann Meyer KG, Rellingen, BRD) verwendet. Sechs bis sieben Wochen nach der Aussaat wurden die Jungpflanzen in Pflanztöpfe (Ø 16 cm, Hermann Meyer

KG, Rellingen, BRD) mit Substrat 2 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste-Groß Hesepe, BRD) überführt (22 °C; 45% relative Luftfeuchte; 16 h Licht pro Tag, 200 - 220 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Licht). Die Düngung der Tabakpflanzen und eine eventuelle Schädlingsbekämpfung erfolgten nach Bedarf.

II.1.7 Antikörper und Antigene

Antikörper

Der im Western Blot und bei der Elektronenmikroskopie verwendete monoklonale anti-c-myc Antikörper, der einen Bereich des humanen Proto-Oncogens p62 (c-myc) erkennt (AS 408 bis 439; Ramsay *et al.*, 1984), wurde aus dem Überstand der Hybridomzelllinie 9E10 gewonnen (Evan *et al.*, 1985). Alle weiteren im Rahmen der Arbeit genutzten Antikörper sind in der nachfolgenden Tabelle gelistet.

Tab. II-4: Antikörper für Western Blot, ELISA, Biacore und Elektronenmikroskopie. IgG: Immunglobulin G; CHO: engl. *Chinese hamster ovary*; gp41: Glycoprotein 41; gp120: Glycoprotein 120.

Antikörper	Epitop	Charakteristika
Ziege-anti-Hu man <i>kappa light chain</i>	Leichte Ketten (κ -Subtyp) humaner Antikörper	Alkalische Phosphatasekonjugat, polyklonal
Ziege-anti-Hu man IgG	Fc-Teil humaner IgGs	Peroxidasekonjugat, polyklonal
Kaninchen-anti-Hu man IgG (Pierce, Rockford, IL, USA)	Fc-Teil humaner IgGs	Peroxidasekonjugat, polyklonal
Schaf-anti-Maus IgG (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)	IgGs von Mäusen	Peroxidasekonjugat, polyklonal
Anti-HIV-1 ^{CHO} 2F5 (POLYMUN Scientific Immunbiologische Forschung GmbH, Wien, Österreich)	gp41 des HI-Virus	Monoklonal
Anti-HIV-1 ^{CHO} 2G12 (POLYMUN Scientific Immunbiologische Forschung GmbH, Wien, Österreich)	gp120 des HI-Virus	Monoklonal
Ziege-anti-Maus IgG (British Biocell International Ltd, Cardiff, UK)	IgGs von Mäusen	Goldkonjugat (15 nm Goldpartikel), polyklonal

Antigene

Das im Rahmen der Dissertation verwendete Antigen (Peptid GGGLELDKWASLW) des anti-HIV-1 Antikörpers 2F5 wurde von der Firma POLYMUN Scientific Immunbiologische Forschung GmbH (Wien, Österreich) zur Verfügung gestellt. Für die Analyse der Antigenbindung des Antikörpers 2F5 mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz (vgl. II.2.4.8) wurde Fuzeon[®], ein trimeres synthetisches 36 AS-Peptid mit dem ELDKWA Epitop (www.fuzeon.com) genutzt. HIV-1_{BaL} gp120 (exprimiert in HEK 293-Zellen) wurde als Antigen für den anti-HIV-1 Antikörper 2G12 verwendet und vom NIH *AIDS Research and Reference Reagent Program* (www.aidsreagent.org) bezogen.

II.2 Methoden

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methoden orientierten sich an Ausubel *et al.* (1998) sowie Sambrook & Russell (2001).

II.2.1 Molekularbiologische Arbeiten

II.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung der Plasmid-DNA von Bakterienzellen für die Analyse mittels Restriktionsspaltung (vgl. II.2.1.5) wurden 2 ml Flüssigkultur der jeweiligen Kolonie eingesetzt (*E. coli* in LB-Medium, *A. tumefaciens* in SOC-Medium, vgl. II.1.2). Nach Zentrifugation der Zellen (15000 g; 3 min; RT) wurden diese in 100 µl P1-Puffer (Qiagen GmbH, Hilden, BRD) resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl P2-Puffer erfolgte die Lyse der Bakterien und nach Zusatz von 150 µl P3-Puffer (beide Qiagen GmbH, Hilden, BRD) die Neutralisation der Suspension. Nach dem Entfernen der Zellbestandteile (15000 g; 15 min; RT) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 270 µl Isopropanol gefällt (10 min; RT). Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zentrifugation (15000 g; 15 min; RT). Anschließend wurde das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl H₂O_{dd} gelöst.

Plasmid-DNA für Klonierungsschritte, Sequenzierungsreaktionen (vgl. II.2.1.8) und Bakterientransformation (vgl. II.2.2.1) wurde mit dem QIAGEN[®] Plasmid Mini oder Midi Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen GmbH, Hilden, BRD) isoliert.

II.2.1.2 Präparation von genomischer DNA

Für die Präparation genomischer DNA aus Tabak wurden zwei Scheiben Blattmaterial (Ø 13 mm) zerkleinert (Retsch TissueLyzer, Qiagen GmbH, Hilden, BRD) und in 300 µl 100 mM Tris (pH 7,5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA und 0,5% (w/v) SDS homogenisiert. Das Gemisch wurde 15 min bei 65°C inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg, BRD) und mit 150 µl 5 M Natriumacetat versetzt. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert (15000 g; 20 min; 4°C). Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zentrifugation (15000 g; 20 min; 4°C). Das Pellet wurde in 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O_{dd} resuspendiert.

II.2.1.3 Agarosegelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten

Plasmid-DNA (vgl. II.2.1.1), mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA (vgl. II.2.1.5) und PCR-Fragmente (vgl. II.2.1.4) wurden elektrophoretisch in Agarosegelen [0,7 - 2,0% (w/v) Agarose in 88 mM Tris; 88 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; pH 8,0] mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid bei konstanter Spannung (70 - 100 V) getrennt. Die DNA wurde hierfür mit Ladepuffer [0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,2 M EDTA; 30% (v/v) Glycerin; pH 8,0]

versetzt. Definierte Mengen an DNA-Marker (MassRuler™ DNA Ladder, Low Range, Fermentas, St. Leon-Rot, BRD bzw. SmartLadder, Eurogentec, Seraing, Belgien) wurden zur Abschätzung der Größe sowie der DNA-Konzentration aufgetragen. Die Auswertung der Agarosegele erfolgte mit einem UV-Transilluminator (Gel Jet Imager, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, BRD) und wurde per Kamera dokumentiert.

Zur Reinigung von PCR-Produkten für nachfolgende Klonierungsschritte wurden sogenannte präparative Gele verwendet. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden hierbei mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und anschließend extrahiert (QIAquick® Gel Extraction Kit bzw. QIAEX®II Gel Extraction Kit, beide Qiagen GmbH, Hilden, BRD). Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte in einem analytischen Gel unter Verwendung eines definierten Größenstandards.

II.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die gezielte Amplifikation eines DNA-Fragments mit zwei spezifischen Oligonucleotiden (Primer) und einer hitzebeständigen DNA-Polymerase wurde die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt (Mullis & Faloona, 1987). Ein Thermocycler (GeneAmp® PCR System 9700) der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) wurde für die PCR-Reaktionen verwendet. Eine Standardreaktion setzte sich wie folgt zusammen:

PCR Puffer mit 2 mM MgCl ₂	1 x
dNTP-Mix	250 µM
<i>forward</i> Primer (vgl. Tab. II-3)	0,5 µM
<i>reverse</i> Primer (vgl. Tab. II-3)	0,5 µM
DNA Polymerase	0,025 U/µl
<i>template</i> DNA	0,5 pg Plasmid-DNA bzw. 300 ng genomische DNA
H ₂ O _{dd}	ad 50 µl oder 20 µl, je nach Ansatz

Zur Amplifikation der Immunglobulingene wurde die *Pwo* DNA-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD) eingesetzt. Als *template* DNA dienten die pTRAK-Vektoren (vgl. Tab. II-2) und spezifische Primer mit für die Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen (vgl. Tab. II-3). Für die Analyse der doppelhaploiden Pflanzen (vgl. II.2.3.3) sowie zur Vorselektion von Tabakpflanzen mit samenspezifischer Expression der Immunglobulingene wurde eine *Multiplex*-PCR etabliert (Chamberlain *et al.*, 1988). In einem Reaktionsansatz wurden die *Taq* DNA-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD), genomische DNA aus Tabakblättern (vgl. II.2.1.2) und spezifische Primer für Fragmente beider Transgene (konstante Regionen der Antikörperketten) eingesetzt.

Alle PCR-Reaktionen liefen nach folgendem Standardprogramm ab:

Initiale Denaturierung	95°C	5 min
Denaturierung	95°C	30 s
<i>Annealing</i> der Oligonucleotide	T _{opt}	30 s
Elongation	72°C	30 bis 60 s
----- 3 5 Z y k l e n -----		
Finale Elongation	72°C	7 min
Kühlung	4°C	∞

Die Temperatur für das *Annealing* der Primer (T_{opt}) lag 5°C unter deren Schmelztemperatur (T_m). Für die Dauer der Elongation war die Größe des zu amplifizierenden Fragments und die verwendete Polymerase (*Tag* 1 kb/min bzw. *Pwo* 1,5 kb/min) ausschlaggebend. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte im Agarosegel (vgl. II.2.1.3).

II.2.1.5 Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsenzyme und die zur Reaktion benötigten Puffer stammten von den Firmen Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, BRD) oder Invitrogen GmbH (Karlsruhe, BRD). Die Reaktionen wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers der Enzyme durchgeführt. Die Isolation der gewünschten Fragmente erfolgte mit Agarosegelelektrophorese und anschließender Gelextraktion (vgl. II.2.1.3) oder, im Fall der Linearisierung von Vektoren, direkt mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, BRD) aus dem Reaktionsansatz.

II.2.1.6 Dephosphorylierung

Die durch Spaltung entstandenen Phosphatreste an den 5'-Enden der DNA-Fragmente mussten nach der Linearisierung des Plasmids zur Verhinderung einer Religation entfernt werden. Für diese Reaktion wurde *shrimp* alkalische Phosphatase (SAP, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

II.2.1.7 Ligation von DNA

DNA-Fragmente wurden mit T4 DNA-Ligase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD) nach Angaben des Herstellers verknüpft. Das molare Verhältnis von Vektor-DNA zu *insert*-DNA betrug in der Regel 1:5.

Sticky-end Ligationen wurden für 2 h bei RT durchgeführt. *Blunt-end* Reaktionen wurden für 14 - 16 h bei 14°C inkubiert. Die Ligationsprodukte wurden anschließend 2 h gegen H_2O_{dd} dialysiert (Membranfilter $0,025\ \mu\text{m}$, „V“ Serie, Ø 25 mm, Millipore, Billerica, MA, USA) und zur Transformation von *E. coli* (vgl. II.2.2.1) verwendet.

II.2.1.8 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma MWG Biotech AG (Martinsried, BRD) als *value read* durchgeführt.

Für eine Reaktion wurden 2 - 3 μg Plasmid-DNA mittels Ethanol präzipitiert [2,5 Vol. 100% (v/v) Ethanol; 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat; pH 5,2 bis 5,5; 1 h; -20°C]. Ein fragmentspezifischer Primer wurde pro Reaktion eingesetzt (vgl. Tab. II-3). Die Auswertung der Nucleotidsequenzen erfolgte mit den Programmen SeqManTMII Lasergen[®] v6 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) sowie TraceViewer (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA).

II.2.2 Transformationstechniken

II.2.2.1 Transformation von Bakterien

Escherichia coli

Die Transformation elektrokompenter *E. coli* XL1-blue Zellen (vgl. II.1.5) erfolgte mit Elektroporation (Inoue *et al.*, 1990).

Zur Herstellung der elektrokompenten Zellen wurde 500 ml LB-Medium (vgl. II.1.2) mit 5 ml Bakterienkultur beimpft und bei 37°C und 140 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1750 g; 15 min; 4°C), mehrmals in sterilem H₂O_{dd} (4°C) gewaschen, in 10% (v/v) Glycerin aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot der elektrokompenten Zellen mit 300 ng Plasmid-DNA versetzt, in eine Küvette (Gene Pulser[®] Cuvette, 0,2 cm, BIO-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) überführt und ein elektrischer Puls ausgelöst (25 µF; 2,5 kV und 200 Ohm; Gene Pulser[®], BIO-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Der Transformationsansatz wurde in 1 ml SOC-Medium für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Mengen der Bakterienlösung auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (vgl. Tab. II-1) verteilt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Klone mit dem gewünschten Vektor wurden nach Restriktionsspaltung der isolierten Plasmid-DNA identifiziert (vgl. II.2.1.1, II.2.1.5).

Agrobacterium tumefaciens

Für die Transformation von *A. tumefaciens* wurden nach dem bereits für *E. coli* beschriebenen Protokoll elektrokompente Zellen hergestellt. Abweichungen traten im Hinblick auf die Inkubationstemperatur (28°C) und das Nährmedium (YEB-Medium, vgl. II.1.2) auf. Die Transformation der Zellen erfolgte ebenfalls durch Elektroporation von Plasmid-DNA (Mersereau *et al.*, 1990; 25 µF; 2,5 kV und 200 Ohm; Gene Pulser[®], BIO-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Der Transformationsansatz wurde mit 1 ml SOC-Medium versetzt, 1 h bei 28°C inkubiert, anschließend Aliquote auf Nährplatten mit Selektionsantibiotika (vgl. Tab. II-1) verteilt und für zwei Tage bei 28°C kultiviert. Die Identifizierung von Klonen mit dem gewünschten binären Vektor erfolgte nach Restriktionsspaltung der isolierten Plasmid-DNA (vgl. II.2.1.1, II.2.1.5).

II.2.2.2 Transformation von *Nicotiana tabacum*

Transientes Expressionssystem

Das in dieser Arbeit verwendeten Protokoll für die Agrobakterium-Injektion (T. Rademacher, RWTH Aachen, Aachen, BRD) basiert auf den Veröffentlichungen von Kapila *et al.* (1997) und Vaquero *et al.* (1999).

Für die transiente Expression der Proteine wurden rekombinante Agrobakterien in 10 ml YEB-Medium mit Kan₅₀, Carb₅₀ und Rif₅₀ entsprechend dem binären Vektor pCB301-Kan bei 28°C und 140 rpm kultiviert (vgl. II.1.2, Tab. II-1 und Tab. II-2). Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 200 mM Acetosyringon (Endkonzentration 20 µM), 1 M Glucose (Endkonzentration 10 mM) und 1 M MES (pH 5,6; Endkonzentration 10 mM). Nach weiteren 24 h wurde die OD₆₀₀ dieser Kulturen bestimmt und mit Infiltrationsmedium [10% (w/v) Saccharose; 20 µM Glucose; 0,86% (w/v) Murashige & Skoog-Fertigsubstanz (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande); pH 5,6] und H₂O_d auf eine Extinktion von ca. 1 eingestellt. Anschließend wurde nochmals Acetosyringon (Endkonzentration 200 µM) zugeführt und die Suspension mit einer Spritze (Omnifix[®]-F 1 ml Einmalspritze, B. Braun AG, Melsungen, BRD) in die Blattunterseite von *N. tabacum* injiziert. Die Tabakpflanzen wurden bei 21°C, 16 h Licht pro Tag (200 - 220 µmol m⁻² s⁻¹) und 70% relativer Luftfeuchte inkubiert. Vier bis fünf Tage nach der Injektion erfolgte die Ernte des Blattmaterials mit Hilfe eines Korkbohrers (Ø 13 mm) und die Analyse der rekombinanten Proteine durch Western Blot (vgl. II.2.4.3).

Stabiles Expressionssystem

Die Generation transgener Tabakpflanzen erfolgte in Anlehnung an Horsch *et al.* (1985).

Blattscheiben steriler Tabakpflanzen wurden für 1 h in einem Gemisch aus MS-Medium (vgl. II.1.2) und *A. tumefaciens* Flüssigkultur inkubiert (50 ml SOC-Medium mit den entsprechenden Selektionsantibiotika, vgl. Tab. II-1). Anschließend wurde das Blattmaterial mit den Bakterien auf MS-Platten im Dunkeln für 48 h bei 21°C kultiviert. Die Blattscheiben wurden danach auf MG-Platten mit dem Selektionsantibiotikum Kanamycin und den Wuchsstoffen BAP und NES (vgl. II.1.2) überführt. Zur Abtötung der Agrobakterien erfolgte die Zugabe von Cefotaxim zum Nährmedium. Nach Bildung erster Sprosse wurden diese zur Bewurzelung auf MS-Medium mit Selektionsantibiotikum, Cefotaxim und den beiden bereits erwähnten Wuchsstoffen gegeben. Die Erneuerung der Nährböden für die Regeneration transgener Pflanzen erfolgte alle sieben bis zehn Tage. Nach Bewurzelung wurden die erzeugten T₀-Pflanzen durch Western Blot (vgl. II.2.4.3) auf Transgenexpression analysiert (ubiquitärer Promotor) und bis zur Samenbildung und -reife im Gewächshaus kultiviert. Kanamycinresistente T₀-Pflanzen mit samenspezifischer Expression wurden nach Bildung der Wurzeln in Erde überführt. Die reifen Samen wurden durch Western Blot untersucht.

II.2.3 Arbeiten mit Pflanzen

II.2.3.1 Segregationsanalyse

Zur Identifikation transgener T₀-Linien, die eine 3:1 Segregation und somit *single locus* Insertion des Transgens (ein Transgenlocus) aufwiesen, wurden 100 Samen oberflächensterilisiert und auf MS-Agarplatten mit Kanamycin als Selektionsantibiotikum (vgl. II.1.2) ausgelegt. Die Auswertung des Keimtests erfolgte ca. vier Wochen später.

II.2.3.2 Kreuzung

Die künstliche Kreuzung einer ausgewählten Mutterpflanze (♀) mit einer ausgesuchten Vaterpflanze (♂) erforderte bei dem vorwiegend selbstbefruchtenden, amphidiploiden Bastard *N. tabacum* ($2n = 48$) künstliche Eingriffe. Die Staubgefäße von ♀ wurden, bevor sie sich geöffnet hatten, entfernt und die Bestäubung der Narbe erfolgte mit dem Pollen von ♂. Die bestäubten Narben der Mutterpflanzen (zehn pro Pflanze) wurden gekennzeichnet und alle weiteren Blüten dieser Pflanzen entfernt. Die Ernte der Kreuzungsprodukte erfolgte nach Reifung der Tabaksamen. Eine Analyse der Nachkommen (F_1) wurde mit *Sandwich-ELISA* (vgl. II.2.4.5) und *Multiplex-PCR* (vgl. II.2.1.4) vorgenommen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden transgenexprimierende Nachkommen (T_1) der T_0 -Linien, die im Verhältnis 3:1 segregierten (vgl. II.2.3.1), für die Kreuzungen verwendet.

II.2.3.3 Regeneration doppelhaploider Pflanzen

Die Erzeugung von Pflanzen, die für zwei unabhängige Transgene homozygot sind, erfolgte neben dem traditionellen Weg mit der Doppelhaploiden-Technik und wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Pflanzliche Reproduktionsbiologie“ am IPK Gatersleben durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurden haploide Tabakpflanzen aus einer embryogenen Pollenkultur regeneriert. Hierfür wurden unreife Knospen (ca. 18 - 22 mm lang) von ausgewählten F_1 -Pflanzen entfernt, oberflächensterilisiert [70% (v/v) Ethanol] und deren Antheren freigelegt. Zur Isolation der unreifen Pollen erfolgte der Aufschluss der Antheren in 20 ml B-Medium (Kyo & Harada, 1986) für 30 s bei niedriger Geschwindigkeit im Mixer (Waring Blender, Eberbach Corp., Ann Arbor, MI, USA). Das Homogenisat wurde durch ein Sieb gestrichen (40 μ m Maschenweite), zentrifugiert (200 g; 3 min; RT) und das erhaltene Pellet in 3 ml B-Medium resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation (200 g; 3 min; RT) wurde das Pellet in 10 ml B-Medium aufgenommen, die Dichte der Pollen mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und auf ca. 500000 Pollen pro ml Medium eingestellt. Die sogenannten Mikrosporen wurden anschließend für 7 d bei 32°C in B-Medium inkubiert, zentrifugiert (200 g; 3 min; RT) und in gleichem Volumen KBP-Medium (Kumlehn *et al.*, 2006) mit Amicase (3 g/l) und fünf unreifen Weizenfruchtknoten pro ml Nährmedium für drei Wochen kultiviert (25°C). Die Pollenkultur wurde anschließend auf MS-Agarplatten mit 1 mg/l BAP und 0,1 mg/l NES (vgl. II.1.2) übertragen. Nach weiteren zehn Tagen wurde diese auf neues MS-Medium mit 0,1 mg/l BAP überführt. Die Wurzelbildung der haploiden Pflanzen erfolgte auf MS-Medium ohne jeglichen Zusatz.

Die Genomverdopplung der regenerierten haploiden Pflanzen ereignete sich spontan (Li & Devaux, 2003) oder durch die Zugabe von 0,1% (v/v) Colchizin. Die Unterscheidung zwischen haploiden und doppelhaploiden Pflanzen (Pflanzen mit verdoppeltem Chromosomensatz, DH) erfolgte mit Hilfe eines Durchflußcytometers (PA Ploidy Analyser)

unter Verwendung von CyStain UV Ploidy Staining Solution (beides Partec GmbH, Münster, BRD) nach Angaben des Herstellers.

Für die Colchizinbehandlung wurden haploide Pflanzen über Nacht bei 10°C inkubiert. Nach Beseitigung der Erde und Reinigung der Wurzeln wurden diese auf ca. 1 - 2 cm gekürzt. Sämtliche Blätter wurden entfernt, die Pflanze auf ca. 5 cm gestutzt und bis zum Ansatz der oberirdischen Teile in 0,1% (v/v) Colchizin [0,8% (v/v) DMSO; 0,05% (v/v) Tween20] für 6 h bei 24°C inkubiert. Anschließend wurden diese intensiv mit H₂O_{dd} gewaschen und in Pflanztöpfe mit Erde überführt.

Die Analyse der Doppelhaploiden hinsichtlich der Akkumulation beider Antikörperketten und somit des kompletten Immunglobulins erfolgte mit *Sandwich*-ELISA (vgl. II.2.4.5) und *Multiplex*-PCR (vgl. II.2.1.4). Für die statistische Auswertung der Verteilung antikörperproduzierender, doppelhaploider Pflanzen wurde der χ^2 -Anpassungstest angewandt und der *P*-Wert mit dem Programm R berechnet (www.r-project.org).

II.2.4 Proteinbiochemische Arbeiten

II.2.4.1 Herstellung pflanzlicher Proteinextrakte

Die Extraktion löslicher Proteine aus Tabakblättern für Western Blot Analysen (vgl. II.2.4.3) erfolgte in 72 mM Tris (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerin, 3% (w/v) SDS und 0,25 µM Bromphenolblau. Zwei Scheiben Blattmaterial (Ø 13 mm) wurden mit 100 µl dieses Probenpuffers versetzt und homogenisiert (Euro Star Digital, IKA® Werke GmbH+Co. KG, Staufen, BRD). Für die Auftrennung der Proteine im reduzierenden SDS-PAA-Gel (vgl. II.2.4.3) wurde 5% (v/v) β-Mercaptoethanol zugegeben und die Proben für 10 min bei 95°C inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg, BRD). Anschließend wurden überschüssige Blattbestandteile entfernt (15000 g; 20 min; 4°C) und die Proteinkonzentration im Überstand ermittelt (vgl. II.2.4.2).

Für ELISA-Experimente wurde das Blattmaterial in PBS [150 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,6] oder 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) mit 0,1% (v/v) TritonX-100 homogenisiert, zentrifugiert (15000 g; 20 min; 4°C) und der Gehalt an löslichem Gesamtprotein (TSP) im Überstand bestimmt.

Die Extraktion der Samenproteine erfolgte in 50 mM Tris (pH 8,0), 200 mM NaCl, 5 mM EDTA und 0,1% (v/v) Tween20. Reife Samen (ca. 50 mg) wurden unter N₂ und Zusatz von gereinigtem Quarzsand mit Mörser und Pistill homogenisiert und in 800 µl des Extraktionspuffers aufgenommen. Nach Zentrifugation (15000 g; 20 min; 4°C) wurde die Konzentration der Samenproteine im Überstand ermittelt.

II.2.4.2 Quantifizierung von Proteinen

Die Bestimmung der Konzentration von löslichen Proteinen in Blatt- und Samenextrakten erfolgte nach Bradford (1976) mit dem BIO-Rad Protein Assay (BIO-Rad Laboratories GmbH, München, BRD). Eine Eichgerade mit BSA wurde angefertigt und zur Berechnung der Proteinkonzentrationen verwendet. Für die Messungen wurde 1 µl der Proteinlösung eingesetzt und die Extinktion bei 595 nm bestimmt (SmartSpec™ Plus Spektralphotometer, BIO-Rad Laboratories GmbH, München, BRD). Als Nullwert diente der jeweilige Extraktionspuffer.

Die Konzentration der affinitätsgereinigten Antikörper (vgl. II.2.4.6) wurde mit dem BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Als Standard diente neben BSA auch humanes IgG. Die Messung erfolgte in 96-Well-Platten (CELLSTAR® Tissue Culture Plate, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, BRD) mit einem Spektralphotometer (SpectraMax Plus³⁸⁴, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA). Alternativ wurde die Konzentration der affinitätsgereinigten Antikörper über die Absorption bei 280 nm unter Einbeziehung des molaren Extinktionskoeffizienten nach Stoscheck (1990) berechnet.

Die Evaluierung des pflanzlichen Expressionsniveaus rekombinanter Antikörper und auch die Quantifizierung affinitätsgereinigter Antikörper erfolgte durch semi-quantitativen Western Blot (vgl. II.2.4.3) unter Verwendung mehrerer Verdünnungen des jeweiligen CHO-Standards (vgl. Tab. II-4).

II.2.4.3 SDS-PAGE und Western Blot

Die Trennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts erfolgte in der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Für die Separation wurden 10%- bzw. 12%-ige (v/v) SDS-PAA-Gele unter reduzierenden Bedingungen (β-Mercaptoethanol im Probenpuffer) verwendet. Bei nicht reduzierenden Bedingungen (ohne β-Mercaptoethanol) wurden 6%-ige (v/v) SDS-PAA-Gele eingesetzt (Sambrook & Russell, 2001). Zur Identifikation des Molekulargewichts der rekombinanten Proteine wurden Molekulargewichtsmarker (SeeBlue® Pre-Stained Standard, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD oder PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus bzw. PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, BRD) genutzt.

Für die Immundetektion *via* peroxidasemarkierter Antikörper wurden die Proteine nach der Elektrophorese in 25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS, 192 mM Glycin und 20% (v/v) Methanol auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel, BRD) transferiert (18 V; ca. 16 h). Zum Blockieren freier Bindestellen wurden die Membranen nach dem Transfer für 3 h in 5% (w/v) Magermilchlösung (Sprüh-Magermilchpulver J. M. Gabler-Saliter Milchwerke, Obergünzburg, BRD) in 180 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,8) unter Schütteln inkubiert. Die Detektion der rekombinanten Proteine erfolgte mit dem anti-c-myc Antikörper [vgl. II.1.7,

1:30 Verdünnung in 5% (w/v) Magermilchlösung für 1,5 - 2 h] gefolgt von Schaf-anti-Maus IgG-Peroxidasekonjugat [vgl. Tab. II-4; 1:2000 Verdünnung in 5% (w/v) Magermilchlösung für 1 h]. Zwischen beiden Inkubationsschritten wurde intensiv mit 1% (w/v) Magermilchlösung gewaschen. Weiterhin wurden rekombinante schwere Ketten oder komplette Antikörper direkt mit einem Ziege- oder Kaninchen-anti-Human Fc-spezifischen IgG-Peroxidasekonjugat (vgl. Tab. II-4; 1:2000 Verdünnung in 5% (w/v) Magermilchlösung für 1 h) nachgewiesen. Nach Inkubation mit dem Detektionsantikörper (Peroxidasekonjugat) wurden die Membranen nochmals in 1% (w/v) Magermilchlösung, gefolgt von Tris-Puffer (180 mM NaCl; 20 mM Tris; pH 7,8) und abschließend PBS (150 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,6) gewaschen, bevor der ECL Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) zur Visualisierung der rekombinanten Proteine angewendet wurde.

Bei der Immundetektion *via* alkalischer Phosphatase wurden die Nitrocellulosemembranen zunächst für 1 h unter Schütteln in 3% (w/v) BSA in TBST [10 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 8,0; 0,1% (v/v) Tween20] zum Blockieren freier Bindestellen inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des 1:1000 verdünnten phosphatasemarkierten Detektionsantikörpers (Ziege-anti-Human *kappa light chain*, vgl. Tab. II-4) in TBST (ca. 1 h). Die Membranen wurden intensiv gewaschen (TBST) und die Visualisierung der Proteine erfolgte mit NBT/BCIP (Blake *et al.*, 1984). Nachdem die Banden eine sichtbare Intensität aufwiesen, wurde die Farbreaktion mit 10 mM EDTA gestoppt.

II.2.4.4 Färbung von Proteinen

Die Visualisierung von Proteinen im SDS-PAA-Gel erfolgte entweder mit dem Roti[®]-Black-Silberfärbungskit nach Angaben des Herstellers oder mit Coomassie[®] Brilliant Blue. Für Letzteres wurden die Gele zunächst in Entfärber [25% (v/v) Methanol; 8% (v/v) Essigsäure] für 30 min unter Schütteln inkubiert. Die Färbung der Gele erfolgte in 10% (v/v) Essigsäure, 45% (v/v) Methanol und 0,05% (w/v) Coomassie[®] Brilliant Blue R-250 für mindestens 1 h. Anschließend wurden die Gele in Entfärber inkubiert bis die Proteinbanden gut sichtbar waren und die Hintergrundfärbung auf ein Minimum reduziert war.

II.2.4.5 ELISA - *enzyme linked immunosorbent assay*

Antigen-ELISA

Die Spezifität der rekombinanten Antikörper aus Tabak wurde durch indirekte ELISA-Methoden untersucht. Hierfür wurden die jeweiligen Antigene (vgl. II.1.7) der beiden anti-HIV-1 Antikörper an ELISA-Platten (MaxiSorp[™] Surface, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) gebunden (1 µg/ml HIV-1_{BaL} gp120 bzw. 0,2 µg/ml GGLELDKWASLW Peptid in 100 mM NaHCO₃; 40 mM Na₂CO₃; pH 9,6 - 9,8; über Nacht; RT). Nach Verwerfen dieser Lösungen wurden freie Bindestellen der ELISA-Platten mit 3% (w/v) BSA in PBST [150 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; 0,1% (v/v) Tween20; pH 7,6] blockiert (1,5 h; RT). Die BSA-Lösung wurde anschließend entfernt und Verdünnungen der gereinigten Antikörper

bzw. der Proteinextrakte transgener Tabakpflanzen in 1% (w/v) BSA in PBST zugegeben. Als Positivkontrollen wurden die in tierischen Zellkulturen exprimierte anti-HIV-1 Antikörper (vgl. Tab. II-4) eingesetzt. Negativkontrollen waren der BSA-Verdünnungspuffer und Proteinextrakt des Wildtyps (*N. tabacum*). Die ELISA-Platten wurden für 1 h bei 24°C inkubiert (Heidolph Inkubator1000). Nach Entfernen der Antikörperlösungen wurde mehrmals mit PBST gewaschen. Die Detektion der rekombinanten Immunglobuline erfolgte mit einem Ziege-anti-Human Fc-spezifischen Antikörper-Peroxidasekonjugat (vgl. Tab. II-4), das 1:2000 in 1% (w/v) BSA in PBST verdünnt wurde (1 h; 24°C; Heidolph Inkubator1000). Anschließend wurde nochmals intensiv mit PBST sowie PBS (150 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,6) gewaschen und der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Tetramethylbenzidin [100 mM Natriumacetat; 0,01% (w/v) TMB; 0,006% (v/v) H₂O₂; pH 6,0]. Nach hinreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion mit 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Farbintensität anhand OD₄₅₀ (Messfilter) und OD₆₃₀ (Referenzfilter) ermittelt (Dynatech MR7000, Denkendorf, BRD).

Sandwich-ELISA

Transgene F₁- sowie doppelhaploide Pflanzen wurden mit einem Sandwich-ELISA auf Expression kompletter Antikörper getestet. Hierfür wurden Antikörper-Protein A- und Antikörper-Protein L-Interaktionen genutzt. Die Bindung von Protein A (42 kDa Oberflächenprotein von *Streptococcus aureus*) an Immunglobuline verschiedener Species erfolgt über den Fc-Teil. Humane IgG₃ werden jedoch nicht erfasst. Protein L (72 kDa Protein aus der Zellwand von *Peptostreptococcus magnus*) bindet mit hoher Affinität an κ-Ketten, λ-Ketten werden nur sehr schwach erkannt. Die humanen κ-Subgruppen I und III werden sehr gut gebunden. Für einen Nachweis der humanen λ-Subgruppen und κ-Subgruppe II kann Protein L jedoch nicht verwendet werden.

Rekombinantes Protein A (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) oder Protein L (Actigen über Affitech AS, Oslo, Norwegen) wurde an ELISA-Platten (MaxiSorpTM Surface, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) adsorbiert (1 µg/ml in 150 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,6; über Nacht; RT). Nach Entfernen dieser Lösungen wurden freie Bindestellen der ELISA-Platten mit 3% (w/v) BSA in PBST [150 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,6; 0,1% (v/v) Tween20] blockiert (1,5 h; RT). Entsprechend verdünnte Proteinextrakte transgener Tabakpflanzen [in 1% (w/v) BSA in PBST] wurden nach dem Entfernen der Blockierungslösung zugegeben. Positivkontrollen waren die in CHO-Zellen exprimierte anti-HIV-1 Antikörper (vgl. Tab. II-4) und Negativkontrollen der Proteinextrakt vom Wildtyp (*N. tabacum*) sowie der BSA-Verdünnungspuffer. Die ELISA-Platten wurden für 1 h bei 24°C inkubiert (Heidolph Inkubator1000). Anschließend wurden die Antikörperlösungen verworfen und die Platten mehrmals mit PBST gewaschen. Die Detektion der rekombinanten Antikörper erfolgte mit Protein L-Peroxidasekonjugat (Actigen über Affitech AS, Oslo, Norwegen) oder Protein A-Peroxidasekonjugat [Amersham

Biosciences, Piscataway, NJ, USA; 1:2000 Verdünnung in 1% (w/v) BSA in PBST; 1 h; 24°C; Heidolph Inkubator1000]. Abschließend wurde nochmals intensiv mit PBST sowie PBS (150 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,6) gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte wie bereits beschrieben mit TMB als Substrat der Peroxidase.

Diese ELISA-Methode wurde ebenfalls zur Quantifizierung der pflanzlich exprimierten Antikörper ohne ELP unter Verwendung einer Eichgerade mit dem jeweiligen CHO-Standardantikörper (^{CHO}2F5 bzw. ^{CHO}2G12, vgl. Tab. II-4) genutzt.

II.2.4.6 Affinitätsreinigung

Das Oberflächenprotein „Protein A“ aus *S. aureus* weist vier Bindestellen für den Fc-Teil (*interface* von C_{H2}- u. C_{H3}-Domäne) von IgG-Molekülen vieler verschiedener Species auf. Diese Bindung von Protein A zu Immunglobulinen ist antigenunspezifisch sowie reversibel und dient als Grundlage der Protein A-Affinitätschromatographie, eine Methode die häufig zur Reinigung rekombinanter Antikörpermoleküle verwendet wird (Ey *et al.*, 1978).

Für die Affinitätsreinigung wurden 500 g Blattmaterial in 1 l 100 mM Tris-HCl [pH 8,0; 0,1% (v/v) TritonX-100] homogenisiert (Waring Blender) und anschließend durch ein Sieb mit Gaze gestrichen. Nach Zentrifugation (3500 g; 30 min; 4°C) wurde der klare Überstand mit 4 ml Protein A-Agarose (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD) versetzt und unter Rühren über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Absetzen der Protein A-Agarose wurde diese in einer Chromatographiesäule (5 ml, Qiagen GmbH, Hilden, BRD) aufgefangen und mehrmals mit 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) sowie 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte mit 100 mM Glycin-HCl (pH 2,8), eine sofortige Neutralisation der einzelnen Fraktionen mit 1 M Tris-HCl (pH 8,0) schloss sich an. Alle Fraktionen wurden durch Western Blot (vgl. II.2.4.3) auf Präsenz der Antikörper getestet, vereinigt, gegen 100 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl (pH 7,6) dialysiert und konzentriert (iCONTM Concentrator, MWCO = 20 kDa, Pierce, Rockford, IL, USA bzw. Microcon Centrifugal Filter Devices Ultracel YM-50, MWCO = 50 kDa, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA).

Zur Charakterisierung der rekombinanten Antikörpervarianten hinsichtlich der Zusammenlagerung der Immunglobulinketten wurden lediglich 50 g Blattmaterial für die Affinitätschromatographie *via* Protein A eingesetzt (*small scale*). Die Konzentrationsbestimmung der affinitätsgereinigten Antikörperpräparationen erfolgte mit UV-Spektroskopie, BCA-Test bzw. durch semi-quantitativen Western Blot (vgl. II.2.4.2).

II.2.4.7 ITC - *inverse transition cycling*

ELP-Fusionsproteine können aufgrund ihres temperatur- und salzabhängigen Phasenübergangs mit einfachen Inkubations- und Zentrifugationsschritten gereinigt werden (Meyer & Chilkoti, 1999). Die Anreicherung der rekombinanten Antikörper-ELP-Fusionen

aus Blattextrakten unter Nutzung dieser Eigenschaften erfolgte im Labormaßstab in Anlehnung an Scheller *et al.* (2004) und Lin *et al.* (2006) bei unterschiedlichen Temperaturen.

Dazu wurden 6 g gemörseretes Blattmaterial in 12 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) homogenisiert und anschließend zentrifugiert (15000 g; 30 min; 4°C). Zu je 4 ml des klaren Überstands wurde NaCl gegeben und eine Konzentration von 2 M eingestellt. Die Extrakte wurden anschließend für 30 min im Wasserbad (GFL mbH, Burgwedel, BRD) bei 37°C, 40°C, 45°C bzw. 50°C inkubiert. Die Präzipitation der ELP-Aggregate erfolgte durch Zentrifugation (4500 g; 1 h) bei den entsprechenden Temperaturen (37°C; 40°C; 45°C oder 50°C). Die Überstände wurden vollständig entfernt und die erhaltenen Pellets (= ELP-Aggregate) über Nacht bei 4°C in 200 µl 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) gelöst (CMV-Mischer, Labortechnik Fröbel, Lindau, BRD). Unlösliche Bestandteile wurden nochmals durch Zentrifugation (15000 g; 30 min; 4°C) entfernt, in 100 µl 72 mM Tris (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerin, 3% (w/v) SDS, 0,025 µM Bromphenolblau und 5% (v/v) β-Mercaptoethanol gelöst, 10 min bei 95°C inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg, BRD) und durch Western Blot analysiert (vgl. II.2.4.3). Die Auswertung der ITC-Präparationen erfolgte ebenfalls durch Western Blot sowie Färbung der SDS-PAA-Gele mit Silbernitrat oder Coomassie Brilliant Blue (vgl. II.2.4.4).

II.2.4.8 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse

Die Bestimmung der kinetischen Parameter der Antigen-Antikörper-Bindung und der Bindungsaktivitäten (im weiteren Verlauf dieses Kapitels als Aktivität bezeichnet) der pflanzlich exprimierten Immunglobuline erfolgten mit der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse (SPR, engl. *surface plasmon resonance*; Malmqvist, 1993). Diese optische Methode ermöglicht es, Bindungen zwischen Proteinen in Echtzeit zu ermitteln. Die Interaktionen zwischen den Bindungspartnern führen zu einer Masseänderung auf der Oberfläche eines Sensorchips. Diese Änderung der Masse beeinflusst wiederum den Brechungsindex innerhalb einer dünnen Schicht über dem Sensorchip. Mit Plasmon-Resonanz lässt sich die Änderung des Brechungsindex ermitteln. Sie wird in *resonance units* (RU) angegeben. Wird die Änderung der *resonance units* gegen die Zeit aufgetragen, wird das sogenannte Sensorgramm erhalten.

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bindungsexperimente wurde ein BIACORE2000 Instrument (Biacore, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) verwendet. Die Messungen und deren Auswertungen erfolgten in Zusammenarbeit mit M. Sack (RWTH Aachen, Aachen, BRD).

Die Antikörperbindung an der Oberfläche einer Flusszelle des CM5-rg Sensorchips (Biacore, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) erfolgte über Protein A, das durch Aminokopplung (EDC/NHS-Standardprotokoll; Johnsson *et al.*, 1991) auf dem Sensorchip immobilisiert wurde (etwa 4 kRU Protein A; 200 µg/ml in 10 mM Natriumacetat; pH 4,5). Als Referenz diente die aktivierte/deaktivierte Oberfläche einer weiteren Flusszelle des Sensorchips. Die affinitätsgereinigten Antikörper (vgl. II.2.4.6) wurden in Laufpuffer [10 mM HEPES;

150 mM NaCl; 3,4 mM EDTA; 0,05% (v/v) Tween20; pH 7,4] verdünnt und ca. 300 RU (2F5) bzw. 150 RU (2G12) der verschiedenen Varianten sowie der entsprechenden Standardantikörper ($^{CHO}2F5$, $^{CHO}2G12$, vgl. Tab. II-4) an dem immobilisierten Protein A gebunden.

Für einen Vergleich der 2F5 Antikörper wurde Fuzeon[®], ein trimeres synthetisches Peptid, das das 2F5 Epitop enthält (www.fuzeon.com), in einer Konzentration von 6,67 nM injiziert (*kinject* Modus). Die kinetischen Konstanten (*on rate* Konstante k_{on} , *off rate* Konstante k_{off} , Dissoziationskonstante K_D ,) der Antigenbindung wurden nach Anpassung („fitten“) der Kurven an ein 1:1 Bindungsmodell mit Massentransport mit Hilfe der BIAevaluation Software ermittelt (Biacore, GE Healthcare, Uppsala, Schweden, vgl. Anhang VII.7).

Zur Abschätzung der absoluten Aktivitäten (A) der 2F5 Antikörperpräparationen wurde Fuzeon[®] in einer Konzentration von 66,7 nM über die Antikörperoberfläche injiziert (*kinject* Modus). Gleichung (1) wurde zur Berechnung verwendet (Karlsson *et al.*, 1993; Sack *et al.*, 2007).

$$A = \frac{R_{Fuz}}{R_{AK}} \times \frac{MW_{AK}}{2 \times MW_{Fuz}} \quad (1)$$

A	absolute Aktivität gegenüber Fuzeon [®]
R_{Fuz}	Sättigungssignal für die Fuzeon [®] -Bindung
R_{AK}	Menge <i>via</i> Protein A gebundener Antikörper
MW_{AK}	Molekulargewicht des Antikörpers (vgl. Tab. III-2)
MW_{Fuz}	Molekulargewicht des Fuzeon [®] Trimers (13476 Da)

Putative Molekulargewichtsdifferenzen der einzelnen Antikörpervarianten (ΔMW_{AK}) wurden mit Gleichung (2) berechnet. Diese beruht auf der Umstellung von Gleichung (1) und der Annahme von 100% Fuzeon[®]-Aktivität.

$$\Delta MW_{AK} = MW_{AK} - 2 \times MW_{Fuz} \times \frac{R_{AK}}{R_{Fuz}} \quad (2)$$

Für einen Vergleich der gp120-Bindungskinetiken der 2G12 Varianten wurde HIV-1_{BaL} gp120 (150 nM) über die an der Protein A-Oberfläche gebundenen Antikörper injiziert (*kinject* Modus). Die kinetischen Konstanten der Antikörper-Antigen-Bindung wurden nach dem „Fitten“ (Anpassung an 1:1 Bindungsmodell) der Kurven berechnet (vgl. Anhang VII.7).

Das Verhältnis der Bindungskurven zwischen den einzelnen Antikörpervarianten zum CHO-Standard wurde zur Abschätzung der relativen Aktivität (α) der jeweiligen Präparation eingesetzt. Hierfür wurde Gleichung (3) verwendet.

$$\alpha = \frac{R(t)_{AK}}{R(t)_{CHO}} \times \frac{R_{CHO}}{R_{AK}} \times \frac{MW_{AK}}{MW_{CHO}} \quad (3)$$

α	relative Aktivität zu m ^{CHO} 2G12
$R(t)_{AK}$	Signal bei t=310 s für Antikörpervariante
$R(t)_{CHO}$	Signal bei t=310 s für ^{CHO} 2G12
R_{AK}	Menge <i>via</i> Protein A gebundener Antikörper
R_{CHO}	Menge <i>via</i> Protein A gebundener ^{CHO} 2G12
MW_{AK}	Molekulargewicht des Antikörpers (vgl. Tab. III-2)
MW_{CHO}	Molekulargewicht des ^{CHO} 2G12 (vgl. Tab. III-2)

Putative Molekulargewichtsdifferenzen der 2G12 Antikörpervarianten (ΔMW_{AK}) wurden mit Gleichung (4) berechnet.

$$\Delta MW_{AK} = MW_{AK} \times (\alpha - 1) \quad (4)$$

Die Regeneration der Protein A-Oberfläche erfolgte mit 30 mM HCl (30 s Kontaktzeit). Alle Analysen wurden bei 25°C und 30 μ l/min Flussrate durchgeführt. Für die Datenauswertung wurde die BIAevaluation Software v4.0 (Biacore, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) sowie Microcal Origin v5.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) verwendet.

II.2.4.9 Massenspektrometrie

Die Analyse der *N*-Glycanformen an den schweren Ketten aller Antikörpervarianten erfolgte durch Massenspektrometrie in Zusammenarbeit mit J. Stadlmann (Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich).

Hierfür wurden die affinitätsgereinigten, rekombinanten Antikörper in einem SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen getrennt (vgl. II.2.4.3) und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (vgl. II.2.4.4). Die Banden der entsprechenden Proteine wurden aus dem Gel geschnitten, mit 50% (v/v) Acetonitril entfärbt und getrocknet. Anschließend wurden die inter- und intramolekularen Disulfidbrücken mit 10 mM DTT in 0,1 M NH_4CO_3 reduziert und mit Iodoacetamid (55 mM in 0,1 M NH_4CO_3) durch Carbamidomethylierung blockiert. Die rekombinanten Proteine wurden mit Trypsin (15 ng/ml in 20 mM NH_4CO_3) verdaut und die entstandenen Peptide extrahiert. Deren Analyse erfolgte mit LC-ESI-MS in Anlehnung an Kolarich & Altmann (2000) und Kolarich *et al.* (2006). Für die Datenauswertung wurde die Software MassLynx 4.0 SP4 (Waters Micromass, Milford, MA, USA) verwendet.

II.2.5 Sonstige Methoden

II.2.5.1 HIV-Neutralisationstest

Die *in vitro* Neutralisation des HI-Virus durch die rekombinanten Antikörpervarianten aus Tabak wurde bei der Firma POLYMUN Scientific Immunbiologische Forschung GmbH (Wien, Österreich) in Zusammenarbeit mit G. Stiegler unter Verwendung eines Syncytieninhibitionstests mit HIV-1 RF (Laborstamm) bestimmt.

Die rekombinanten Antikörper wurden aus Tabakblättern mittels Protein A-Affinitätschromatographie extrahiert (vgl. II.2.4.6) und deren Konzentration bestimmt (vgl. II.2.4.2). Zehn zweifach Verdünnungen (Startkonzentration: 100 µg/ml) dieser Präparationen sowie des jeweiligen CHO-Standardantikörpers (^{CHO}2F5 bzw. ^{CHO}2G12, vgl. Tab. II-4) wurden mit HIV-1 RF für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe der Substratzellen (immortalisierte CD4+ B-Zelllinie AA-2) wurde der Gesamtansatz für weitere 5 d bei 37°C inkubiert. Das Auftreten von mehr als einem Syncytium pro Reaktionsgefäß wurde als positive Infektion gewertet. Nach der Methode von Reed & Muench (1938) wurde die IC₅₀ der Antikörperpräparationen und des CHO-Standards berechnet (Präinkubation).

II.2.5.2 Elektronenmikroskopie

Die Lokalisierung der rekombinanten 2F5 Antikörper in unreifen und reifen Samen von *N. tabacum* erfolgte elektronenmikroskopisch. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit E. Arcalis (RWTH Aachen, Aachen, BRD) durchgeführt.

Tabaksamen wurden aus den Kapseln isoliert, über Nacht mit 4% (v/v) Paraformaldehyd / 0,2% (v/v) Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer [0,1 M NaH₂PO₄ (190 ml); 0,1 M Na₂HPO₄ (810 ml); pH 7,4] fixiert und anschließend in 2% (v/v) Paraformaldehyd in Phosphatpuffer gelagert. Für die Einbettung wurden die fixierten Proben mehrmals gewaschen (0,1 M Phosphatpuffer). Die Dehydrierung der Proben erfolgte mit Ethanol. Zunächst wurde das fixierte Material in 50% (v/v) Ethanol für 30 min inkubiert (4°C). Weitere Schritte bei 70% (v/v), 90% (v/v), 96% (v/v) und 100% (v/v) Ethanol (je 30 min; -20°C) folgten. Anschließend wurden die Proben mit LR White (London Resin Co Ltd, Berkshire, UK) und 0,5% (w/v) Benzoinmethylether bei -20°C infiltriert. Auch hier folgte eine Reihe von mehreren Inkubationsschritten mit einem Verhältnis LR White zu Ethanol von 1:3, 1:1 und 3:1 für mindestens 1 h (-20°C). Das Material wurde danach über Nacht in 100% (v/v) LR White bei -20°C gelagert. Die Polymerisation der Proben erfolgte in vorgekühlten Beem-Kapseln (SPI Supplies, West Chester, PA, USA) bei -20°C unter UV-Licht für mindestens 24 h in einer Gefriersubstitutionsanlage (Automatic Freeze-Substitution, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, BRD). Für die Herstellung der Ultradünnschnitte wurde zunächst im Bereich des eingeschlossenen Gewebes eine glatte Oberfläche geschaffen (Ultra-Trim, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, BRD). Mit dem Ultracut E Ultramikrotom (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, BRD) wurden Schnitte von 100 nm angefertigt und auf Goldobjektträger (200 mesh) aufgebracht. Der Nachweis der rekombinanten Antikörper erfolgte mit Immungoldfärbung.

Zur Blockierung der unspezifischen Bindestellen wurden die Schnitte zunächst in 5% (w/v) BSA (in 0,1 M Phosphatpuffer) für 15 min und anschließend mit dem anti-c-myc Antikörper (vgl. Tab. II-4, 1:100 Verdünnung in 0,1 M Phosphatpuffer) über Nacht inkubiert (4°C). Die Schnitte wurden gewaschen [0,1 M Phosphatpuffer; 0,25% (v/v) Tween20] und auf eine Lösung des Detektionsantikörpers (Ziege-anti-Maus Antikörper konjugiert mit 15 nm Gold,

vgl. Tab. II-4, 1:30 Verdünnung in 0,1 M Phosphatpuffer) überführt (1 h; RT). Anschließend wurde das Präparat nochmals intensiv mit 0,1 M Phosphatpuffer sowie $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gewaschen, getrocknet und in 2% (w/v) Uranylacetat für 10 min kontrastiert.

Die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte an einem TEM Philips EM 400 (Eindhoven, Niederlande) bei 80 kV.

III Ergebnisse

Ziele der vorliegenden Arbeit sind die Expression der kompletten humanen anti-HIV-1 Antikörper 2F5 und 2G12 als ELP-Fusionsproteine in Blättern und Samen von Tabakpflanzen (*N. tabacum* cv. SNN) sowie die strukturelle und funktionelle Charakterisierung der affinitätsgereinigten, rekombinanten Antikörpervarianten.

Obwohl der Begriff **Genexpression** per Definition für die Transkription eines Gens steht, wird „**Expression**“ im Folgenden auch generell für die Bildung eines bestimmten Proteins genutzt.

III.1 Konstruktion der Kassetten für die pflanzliche Expression

Die Expression der Immunglobulingene im Blatt erfolgte unter Kontrolle eines ubiquitären Promotors. Für die samenspezifische Expression wurden zwei verschiedene Promotoren genutzt. Zur Akkumulation der rekombinanten Proteine im ER der Pflanzenzellen wurde das KDEL Retentionssignal verwendet.

Im vorliegenden Kapitel wird zunächst auf die Herstellung der für die Tabaktransformation benötigten binären Plasmide näher eingegangen. Oftmals wird der Term „**Gen**“ verwendet, wobei es sich ausschließlich um den codierenden Sequenzbereich handelt.

III.1.1 Plasmide für die ubiquitäre Expression der Immunglobulingene

Zur ubiquitären Expression der Immunglobulingene in Tabak wurden die jeweiligen codierenden Sequenzen für leichte (LC) und schwere Ketten (HC) unter Kontrolle des *Cauliflower Mosaic Virus* 35S-Promotors (CaMV 35S; Franck *et al.*, 1980; Odell *et al.*, 1985) gestellt. Die Terminationssequenz entstammt ebenfalls dem CaMV 35S-Transkript (Gardner *et al.*, 1981). Für Faltung und Zusammenlagerung beider Ketten zu kompletten Antikörpermolekülen müssen die rekombinanten Proteine ins ER der Pflanzenzelle gelangen (Hiatt *et al.*, 1989). Dies wurde durch die N-terminalen Signalpeptide erreicht. Um den Nachweis der rekombinanten Proteine durch Western Blot mit Hilfe eines anti-c-myc Antikörpers zu ermöglichen (vgl. II.1.7), wurde die Sequenz des c-myc *tags* (EQKLISEEDLN; Munro & Pelham, 1986) im *downstream* Bereich des jeweiligen Immunglobulingens eingefügt. Den C-Terminus eines jeden rekombinanten Proteins bildete das ER-Retentionssignal KDEL (Munro & Pelham, 1987).

Zur Konstruktion der Expressionskassetten (vgl. Abb. III-1) wurden die Plasmide pRTRA-anti-oxa sowie pRTRA-ELP verwendet (vgl. Tab. II-2). Der Vektor pRTRA-anti-oxa basiert auf pRTRA15 (Artsaenko *et al.*, 1995) und enthält die Nucleotidsequenzen des CaMV 35S-Promotors, des LeB4-Signalpeptids (Baumlein *et al.*, 1986), des anti-Oxazoloneinkettenantikörpers (anti-oxa scFv, Fiedler & Conrad, 1995), des c-myc *tags*, des KDEL ER-Retentionssignals sowie die CaMV 35S-Terminationssequenz (vgl. Anhang VII.1.1). Die in pRTRA-anti-oxa befindliche LeB4-Signalsequenz und die Sequenz des scFvs wurden

durch *NcoI/NotI*-Restriktionsspaltung entfernt und die gereinigten *NcoI/NotI*-PCR-Fragmente der Immunglobulingene eingefügt (vgl. II.2.1.4, II.2.1.5, II.2.1.7). Die codierenden Bereiche der Antikörpergene enthalten die Signalsequenzen der Konstrukte, die auch zur Expression in CHO-Zellen verwendet werden. Hierbei handelt es sich um die *leader* Sequenzen des humanen monoklonalen Antikörpers 3D6 (Felgenhauer *et al.*, 1990). Die für die Klonierung der einzelnen pRTRA-Plasmide eingesetzten Primerpaare (vgl. Tab. II-3) und Basisvektoren sind in Tab. III-1 aufgeführt.

Tab. III-1: Konstruktion der pRTRA-Plasmide mit den Kassetten zur ubiquitären Expression. 35S: CaMV 35S-Promotor; 2F5: anti-HIV-1 Antikörper 2F5; 2G12: anti-HIV-1 Antikörper 2G12; LC: leichte Kette des Antikörpers; HC: schwere Kette des Antikörpers; ELP: elastinähnliches Polypeptid; for: *forward*; rev: *reverse*.

pRTRA-Plasmid	Primer für die Amplifikation		Basisvektor
	<i>forward</i> Primer	<i>reverse</i> Primer	
^{35S} 2F5-LC	pTRAk-LC- <i>NcoI</i> _{for}	pTRAk-LC- <i>NotI</i> _{rev}	pRTRA-anti-oxa
^{35S} 2F5-HC	pTRAk-HC- <i>NcoI</i> _{for}	pTRAk-HC- <i>NotI</i> _{rev}	pRTRA-anti-oxa
^{35S} 2F5-LC _{ELP}	pTRAk-LC- <i>NcoI</i> _{for}	pTRAk-LC- <i>BamHI</i> _{rev}	pRTRA-ELP
^{35S} 2F5-HC _{ELP}	pTRAk-HC- <i>NcoI</i> _{for}	pTRAk-2F5HC- <i>BamHI</i> _{rev}	pRTRA-ELP
	pTRAk-2F5HC- <i>BamHI</i> _{for}	pTRAk-HC- <i>BamHI</i> _{rev}	
^{35S} 2G12-LC	pTRAk-LC- <i>NcoI</i> _{for}	pTRAk-LC- <i>NotI</i> _{rev}	pRTRA-anti-oxa
^{35S} 2G12-HC	pTRAk-HC- <i>NcoI</i> _{for}	pTRAk-HC- <i>NotI</i> _{rev}	pRTRA-anti-oxa
^{35S} 2G12-LC _{ELP}	pTRAk-LC- <i>NcoI</i> _{for}	pTRAk-LC- <i>BamHI</i> _{rev}	pRTRA-ELP
^{35S} 2G12-HC _{ELP}	pTRAk-HC- <i>NcoI</i> _{for}	pTRAk-2G12HC- <i>BamHI</i> _{rev}	pRTRA-ELP
	pTRAk-2G12HC- <i>BamHI</i> _{for}	pTRAk-HC- <i>BamHI</i> _{rev}	

Für die Generierung der ELP-Vektoren wurde das Plasmid pRTRA-ELP verwendet. Dieser Vektor ist nahezu identisch zu pRTRA-anti-oxa, allerdings fehlt die Sequenz des anti-Oxazolons scFvs (vgl. Anhang VII.1.2). Das Fragment, das für 100 Wiederholungen des elastinähnlichen Peptids VPGXG codiert, befindet sich zwischen der Sequenz des *c-myc tags* und des KDEL ER-Retentionssignals. Die LeB4-Signalsequenz von pRTRA-ELP wurde durch *NcoI/BamHI*-Restriktion entfernt und die gereinigten *NcoI/BamHI*-PCR-Fragmente der L-Kettengene mit den Signalsequenzen eingefügt. Für die Konstruktion der pRTRA-HC-Plasmide war eine Zwei-Schritt-Klonierung notwendig. Ein 170 bp (2F5-HC) bzw. 103 bp (2G12-HC) *NcoI/BamHI*-Fragment wurde zunächst in das *NcoI/BamHI*-gespaltene Plasmid pRTRA-ELP ligiert (vgl. II.2.1.4, II.2.1.5, II.2.1.7). Die daraus resultierenden Vektoren wurden mit *BamHI* linearisiert, dephosphoryliert (vgl. II.2.1.6), gereinigt und die fehlenden Sequenzen der H-Kettengene als *BamHI*-PCR-Fragmente eingefügt (1273 bp 2F5-HC; 1313 bp 2G12-HC). Alle pRTRA-Plasmide (vgl. Tab. III-1) wurden zur Kontrolle sequenziert (vgl. II.2.1.8).

Die Expressionskassetten (Abb. III-1; CaMV 35S-Promotor/Signalsequenz/codierende Sequenz der jeweiligen Antikörperkette/*c-myc tag*/eventuell Sequenz von 100xELP/KDEL

ER-Retentionssignal/Terminator) wurden durch *Hind*III-Restriktionsspaltung aus den pRTRA-Plasmiden isoliert und in den ebenfalls mit *Hind*III geschnittenen binären Vektor pCB301-Kan (vgl. Anhang VII.1.3) überführt (vgl. II.2.1.5, II.2.1.7). Die resultierenden binären Plasmide wurden in *A. tumefaciens* transformiert und diese für die transiente und stabile Expression der Immunglobulingene in Tabak verwendet (vgl. II.2.2.1, II.2.2.2).

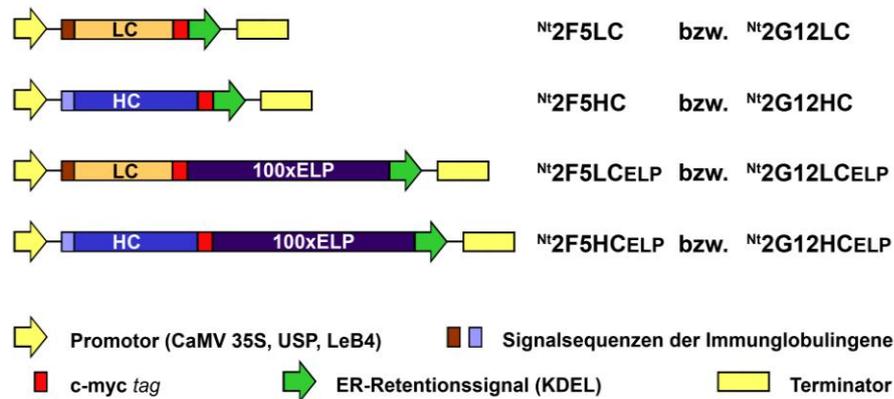


Abb. III-1: Schematische Darstellung der Kassetten für die Expression der Immunglobulingene. Zur ubiquitären Expression wurde der CaMV 35S-Promotor und für die samenspezifische Expression der USP- sowie der LeB4-Promotor verwendet. Die N-terminalen Signalpeptide der Immunglobuline und das ER-Retentionssignal (KDEL) erlauben die Akkumulation der rekombinanten Proteine (N^t2F5LC , N^t2F5HC , N^t2F5LC_{CELP} , N^t2F5HC_{CELP} , $N^t2G12LC$, $N^t2G12HC$, $N^t2G12LC_{CELP}$, $N^t2G12HC_{CELP}$) im ER der Pflanzenzellen (*N. tabacum*, Nt). Zur Immundetektion der rekombinanten Proteine wurde der *c-myc tag* eingefügt. Die einzelnen Ketten (LC: leichte Kette; HC: schwere Kette) beider Antikörper (2F5, 2G12) wurden mit einer 100-fachen Wiederholung des Pentapeptids VPGXG (100xELP) fusioniert (Abb. nicht maßstabsgetreu).

III.1.2 Plasmide für die samenspezifische Expression der Immunglobulingene

Zur samenspezifischen Expression der Immunglobulingene wurden zwei unterschiedliche Promotoren von *Vicia faba*, die in Stärke und zeitlicher Aktivität differieren, verwendet. Der USP-Promotor ist bereits in frühen Stadien der Samenentwicklung aktiv (Baumlein *et al.*, 1991; Fiedler *et al.*, 1993). Er kontrolliert das USP-Gen (engl. *unknown seed protein*, Bassuner *et al.*, 1988) und ermöglicht eine hohe Expression des Transgens. Der LeB4-Promotor ist ein Samenproteinpromotor (**Legumin B4**-Gen, Baumlein *et al.*, 1986) und während der Samenreifung aktiv (Fiedler & Conrad, 1995; Fiedler *et al.*, 1997).

Die Nucleotidsequenzen beider Promotoren wurden aus den Plasmiden pRTRA7/3-USP-anti-oxa-scFv sowie pRTRA7/3-LeB4-anti-oxa-scFv (vgl. Tab. II-2) durch *Hinc*II/*Nco*I-Restriktion isoliert (vgl. II.2.1.5) und in die ebenfalls mit *Hinc*II/*Nco*I gespaltenen pRTRA-^{35S}LC- bzw. pRTRA-^{35S}HC-Vektoren ligiert (vgl. Tab. III-1, II.2.1.7). Die resultierenden pRTRA-^{USP}- und pRTRA-^{LeB4}-Vektoren (analog zu 35S-Plasmiden in Tab. III-1) wurden zur Kontrolle sequenziert (vgl. II.2.1.8). Die Expressionskassetten (vgl. Abb. III-1; USP- oder LeB4-Promotor/Signalsequenz/codierende Sequenz der jeweiligen Antikörperkette/*c-myc tag*/eventuell Sequenz von 100xELP/KDEL ER-Retentionssignal/Terminator) wurden mit *Hind*III-Restriktionsspaltung aus den pRTRA-Plasmiden isoliert und in den ebenfalls mit *Hind*III geschnittenen binären Vektor pCB301-Kan integriert (vgl.

II.2.1.5, II.2.1.7). Die binären Plasmide wurden in Agrobakterien überführt und diese für die Transformation von Tabak verwendet (vgl. II.2.2.2).

III.2 Expression der Immunglobulingene in *Nicotiana tabacum*

Für die pflanzliche Expression kompletter Antikörper-ELP-Fusionen wurden zunächst transgene Tabakpflanzen (T_0) erzeugt, die einzelne Antikörperketten oder entsprechende ELP-Fusionen im ER der Zellen akkumulieren.

III.2.1 Transiente Expression in Tabakblättern

Zur Kontrolle der ubiquitären Expressionsvektoren wurde das transiente Expressionssystem der Agrobakterium-Injektion genutzt. Rekombinante Agrobakterien werden ins Blattmaterial injiziert und das auf der T-DNA befindliche Transgen wird exprimiert. Die Evaluierung der unter Pkt. III.1.1 beschriebenen Expressionskassetten mit dem CaMV 35S-Promotor erfolgte nach einem Protokoll von T. Rademacher (RWTH Aachen, Aachen, BRD) in Anlehnung an Kapila *et al.* (1997) und Vaquero *et al.* (1999).

Rekombinante Agrobakterien wurden durch *Hind*III-Restriktion (vgl. II.2.1.5) auf das Vorhandensein der Expressionskassetten überprüft und Bakterienkolonien mit dem gewünschten binären Plasmid für den Test verwendet. Die transiente Expression der Immunglobulingene beider Antikörper (2F5, 2G12) mit und ohne ELP-Fusion (LC: leichte Kette ohne ELP, HC: schwere Kette ohne ELP, LC_{ELP}: leichte Kette mit ELP, HC_{ELP}: schwere Kette mit ELP) wurde untersucht.

Nachfolgend sind die rekombinanten Agrobakterien (At) mit den entsprechenden binären Vektoren benannt (Genexpression unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors).

At ^{35S} 2F5-LC	At ^{35S} 2G12-LC
At ^{35S} 2F5-HC	At ^{35S} 2G12-HC
At ^{35S} 2F5-LC _{ELP}	At ^{35S} 2G12-LC _{ELP}
At ^{35S} 2F5-HC _{ELP}	At ^{35S} 2G12-HC _{ELP}

Fünf Tage nach der Injektion wurde das Blattmaterial geerntet, die löslichen Proteine extrahiert und durch Western Blot Analyse mit anti-c-myc Antikörper auf Präsenz des rekombinanten Proteins analysiert (vgl. II.2.4.1, II.2.4.3).

Jedes der acht Immunglobulingenkonstrukte wurde nach Injektion rekombinanter Agrobakterien in die Unterseite von Tabakblättern exprimiert (Abb. III-2). Die rekombinanten Proteine wiesen das kalkulierte Molekulargewicht auf (vgl. Anhang VII.2.1 und VII.2.2). Allerdings besaßen die ELP-Fusionsproteine eine geringere elektrophoretische Mobilität als erwartet. Dieses Phänomen wurde bereits bei anderen ELP-Fusionen beobachtet (Shimazu *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2006).

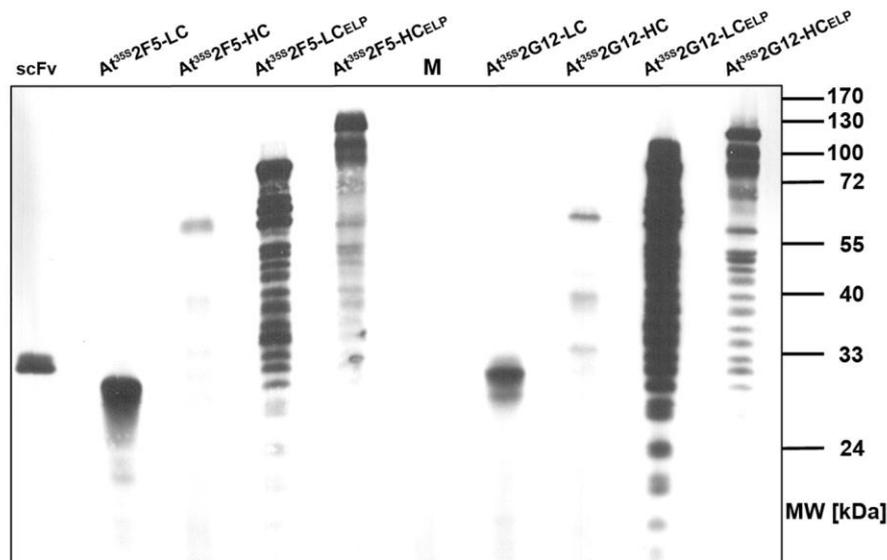


Abb. III-2: Nachweis der transient exprimierten Immunglobulingene in Tabakblättern nach Agrobakterium-Injektion. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (10%) unter reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit dem anti-c-myc Antikörper. scFv: 20 ng Einkettenantikörper/c-myc Standard; M: Blattmaterial mit Infiltrationsmedium (20 µg TSP); Blattmaterial mit rekombinanten Agrobakterien: At^{35S}2F5-LC (10 µg TSP), At^{35S}2F5-HC (20 µg TSP), At^{35S}2F5-LC_{ELP} (5 µg TSP), At^{35S}2F5-HC_{ELP} (10 µg TSP), At^{35S}2G12-LC (15 µg TSP), At^{35S}2G12-HC (20 µg TSP), At^{35S}2G12-LC_{ELP} (5 µg TSP), At^{35S}2G12-HC_{ELP} (10 µg TSP); At: *A. tumefaciens*; 35S: CaMV 35S-Promotor; LC: leichte Kette; HC: schwere Kette; 2F5: anti-HIV-1 Antikörper 2F5; 2G12: anti-HIV-1 Antikörper 2G12; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht; TSP: gesamtlösliches Protein.

Degradationsprodukte wurden hauptsächlich nach transienter Expression der ELP-Konstrukte gefunden. Verschiedene Mengen an gesamtlöslichem Protein wurden für diese Analyse pro Gelspur appliziert. Dies weist auf Unterschiede im Expressionsniveau der einzelnen Immunglobulingene hin.

Die in diesem Experiment verwendeten rekombinanten Agrobakterien wurden anschließend für die Tabaktransformation zur Erzeugung stabiler T₀-Pflanzen genutzt (vgl. II.2.2.2).

Um ein Zusammenlagern zu den kompletten Antikörpern (^{At/Nt}2F5, ^{At/Nt}2G12) und den entsprechenden ELP-Fusionen (^{At/Nt}2F5_{LELP}, ^{At/Nt}2F5_{HELP}, ^{At/Nt}2F5_{ELP}, ^{At/Nt}2G12_{LELP}, ^{At/Nt}2G12_{HELP}, ^{At/Nt}2G12_{ELP}) im transienten System zu untersuchen, wurden Agrobakterien mit binären Plasmiden für leichte und schwere Ketten kombiniert und injiziert. Nachfolgend sind die verschiedenen Injektionsmöglichkeiten der rekombinanten Agrobakterien dargestellt. Die Abkürzung At vor jeder Bezeichnung steht in diesem Fall für die transiente Expression der Immunglobulingene.

<i>A. tumefaciens</i> 1		<i>A. tumefaciens</i> 2		Rekombinanter Antikörper
At ^{35S} 2F5-LC	+	At ^{35S} 2F5-HC	→	At/Nt ^{2F5}
At ^{35S} 2F5-LC _{ELP}	+	At ^{35S} 2F5-HC	→	At/Nt ^{2F5} _{L_{ELP}}
At ^{35S} 2F5-LC	+	At ^{35S} 2F5-HC _{ELP}	→	At/Nt ^{2F5} _{HELP}
At ^{35S} 2F5-LC _{ELP}	+	At ^{35S} 2F5-HC _{ELP}	→	At/Nt ^{2F5} _{ELP}
At ^{35S} 2G12-LC	+	At ^{35S} 2G12-HC	→	At/Nt ^{2G12}
At ^{35S} 2G12-LC _{ELP}	+	At ^{35S} 2G12-HC	→	At/Nt ^{2G12} _{L_{ELP}}
At ^{35S} 2G12-LC	+	At ^{35S} 2G12-HC _{ELP}	→	At/Nt ^{2G12} _{HELP}
At ^{35S} 2G12-LC _{ELP}	+	At ^{35S} 2G12-HC _{ELP}	→	At/Nt ^{2G12} _{ELP}

Alle acht Antikörpervarianten wurden durch Western Blot nach Trennung unter nicht reduzierenden Bedingungen (vgl. II.2.4.3) mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Leichte und schwere Ketten lagerten sich nach transienter Expression der Immunglobulingene zu kompletten Antikörpermolekülen zusammen (Abb. III-3).

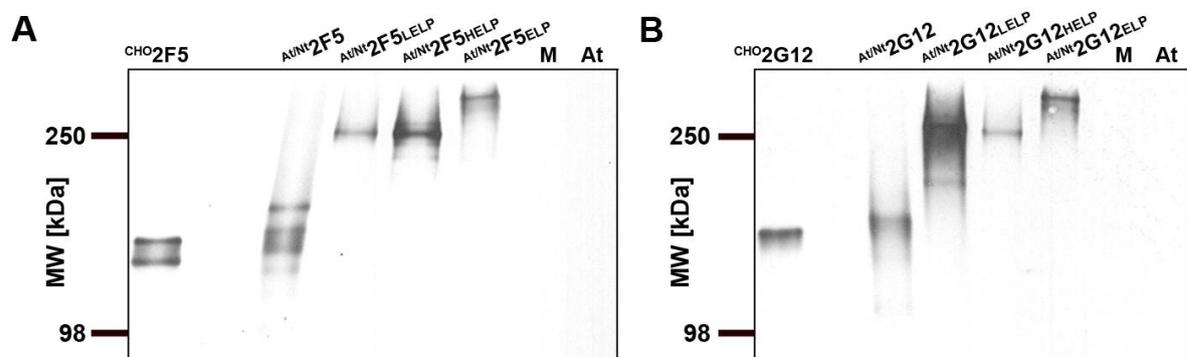


Abb. III-3: Nachweis der assemblierten Antikörpervarianten nach Agrobakterium-Injektion. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. **A:** Transiente Expression der 2F5 Antikörpervarianten. ^{CHO}2F5: 1 ng Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; Blattmaterial von *N. tabacum* (Nt) mit Kombination der rekombinanten Agrobakterien (At) zur Produktion der vollständigen Immunglobuline: At/Nt^{2F5}, At/Nt^{2F5}_{L_{ELP}}, At/Nt^{2F5}_{HELP}, At/Nt^{2F5}_{ELP}. **B:** Transiente Expression der 2G12 Antikörpervarianten. ^{CHO}2G12: 2 ng Standardantikörper 2G12 aus CHO-Zellen; Blattmaterial von *N. tabacum* (Nt) mit Kombination der rekombinanten Agrobakterien (At) zur Produktion der vollständigen Immunglobuline: At/Nt^{2G12}, At/Nt^{2G12}_{L_{ELP}}, At/Nt^{2G12}_{HELP}, At/Nt^{2G12}_{ELP}. M: Blattmaterial mit Infiltrationsmedium; At: Blattmaterial mit Agrobakterium-Stamm; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

In CHO-Zellen exprimierte Standardantikörper dienten bei der Western Blot Analyse als Positivkontrollen (^{CHO}2F5 bzw. ^{CHO}2G12, vgl. Tab. II-4). Negativkontrollen waren Blätter mit injiziertem Infiltrationsmedium oder dem verwendeten Agrobakterium-Stamm. Diese zeigten keine Signale (vgl. Abb. III-3).

Eine Übersicht der Molekulargewichte der verschiedenen Antikörpervarianten liefert Tab. III-2.

Tab. III-2: Molekulargewicht der rekombinanten Immunglobuline und Antikörper-ELP-Fusionen. Zur Berechnung des Molekulargewichts der Proteine wurden die molaren Massen der beiden leichten und schweren Ketten summiert und das durchschnittliche Molekulargewicht der *N*-Glycane an den schweren Immunglobulinketten (3200 Da) addiert. ^{CHO}2F5: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; ^{Nt}2F5: 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5_{LELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an den leichten Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5_{HELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an den schweren Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5_{ELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ^{CHO}2G12: Standardantikörper 2G12 aus CHO-Zellen; ^{Nt}2G12: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12_{LELP}: 2G12 mit ELP-Fusion an den leichten Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12_{HELP}: 2G12 mit ELP-Fusion an den schweren Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12_{ELP}: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Antikörpervariante	Molekulargewicht [Da]
^{CHO} 2F5	150814
^{Nt} 2F5	159384
^{Nt} 2F5 _{LELP}	241493
^{Nt} 2F5 _{HELP}	241493
^{Nt} 2F5 _{ELP}	323601

^{CHO} 2G12	148999
^{Nt} 2G12	157567
^{Nt} 2G12 _{LELP}	239678
^{Nt} 2G12 _{HELP}	239678
^{Nt} 2G12 _{ELP}	321787

III.2.2 Stabile Expression der Immunglobulingene in Tabak

Rekombinante Agrobakterien (Transgen unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors), die zur transienten Expression der Immunglobulingene in Tabakblättern führten, wurden für die stabile Transformation von *N. tabacum* verwendet (vgl. II.2.2.2). Regenerierte Pflanzen (T₀) wurden auf Selektionsmedium mit Kanamycin kultiviert und durch Western Blot selektiert (vgl. II.2.4.3).

Die Analyse transgener Pflanzen mit ubiquitärer Expression erfolgte im *in vitro* Stadium. Eine Vielzahl Pflanzen, die das entsprechende Transgen unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimieren, wurde identifiziert (vgl. Anhang VII.3). In Abb. III-4 sind Ergebnisse der Analyse von je drei T₀-Pflanzen, die die leichten Ketten (LC), schweren Ketten (HC) oder die entsprechenden ELP-Fusionen (LC_{ELP}, HC_{ELP}) eines jeden Antikörpers (2F5, 2G12) akkumulieren, dargestellt. Pro Gelspur wurden unterschiedliche Mengen an gesamtlöslichem Protein (TSP) appliziert (LC: 15 µg TSP; HC: 40 µg TSP; LC_{ELP}: 5 µg TSP; HC_{ELP}: 15 µg TSP). Die Banden der rekombinanten Proteine reflektieren somit die Unterschiede im Expressionsniveau der Immunglobulingene, die bereits im transienten System angedeutet wurden. Fusionen mit dem elastinähnlichen Polypeptid (LC_{ELP} bzw. HC_{ELP}) führten zu einer verstärkten Akkumulation der leichten und schweren Ketten beider Antikörper im Vergleich zu den rekombinanten Proteinen ohne ELP (LC bzw. HC, Abb. III-4). Unterschiede in der Produktion von leichten und schweren Ketten wurden

ebenfalls nachgewiesen. Leichte Ketten sowie deren ELP-Fusionen werden stärker exprimiert. Eine, im Vergleich zu den schweren Ketten, erhöhte Akkumulation der leichten Ketten wurde bereits bei der Produktion kompletter Antikörper beschrieben (Law *et al.*, 2006; Rademacher *et al.*, 2008).

Die rekombinanten Proteine wiesen das kalkulierte Molekulargewicht auf (vgl. Anhang VII.2.1, VII.2.2). Allerdings war die elektrophoretische Mobilität der ELP-Fusionen, wie auch schon bei der transienten Expression (vgl. III.2.1), deutlich geringer. Schwere Ketten ohne C-terminale ELP-Fusion wurden als Doppelbanden detektiert (besonders deutlich bei 2G12-HC). Dieses Phänomen ist möglicherweise auf die unterschiedliche Glycosylierung zurückzuführen (Petruccioli *et al.*, 2006; Rademacher *et al.*, 2008). Bereits bei den Untersuchungen von Hiatt *et al.* (1989) wurden die schweren Ketten eines Antikörpers als Doppelbanden durch Western Blot visualisiert.

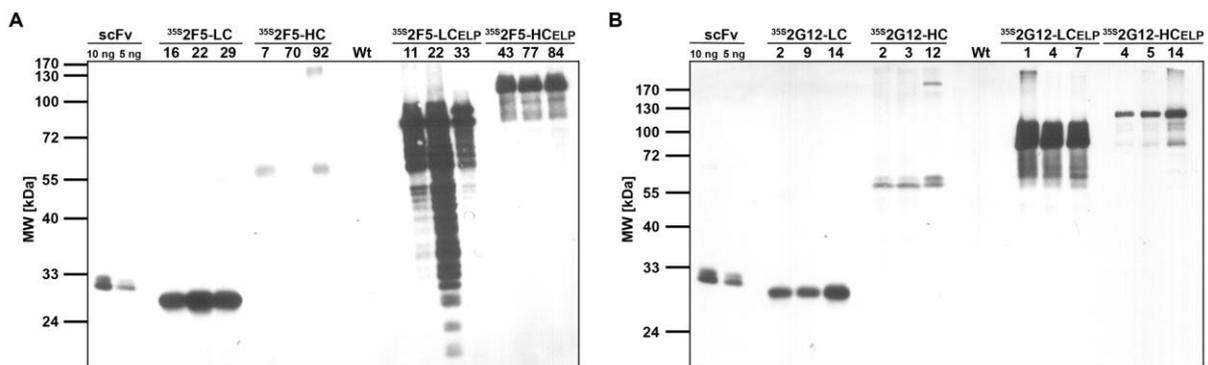


Abb. III-4: Nachweis der leichten und schweren Antikörperketten sowie der ELP-Fusionen in Blättern transgener Tabakpflanzen. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (10%) unter reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit dem anti-c-myc Antikörper. Jeweils drei T₀-Pflanzen wurden für diesen repräsentativen Western Blot verwendet. **A:** Stabile Expression der 2F5 Immunglobuline. ^{35S}2F5-LC (15 µg TSP); ^{35S}2F5-HC (40 µg TSP); ^{35S}2F5-LC_{ELP} (5 µg TSP); ^{35S}2F5-HC_{ELP} (15 µg TSP). **B:** Stabile Expression der 2G12 Immunglobuline. ^{35S}2G12-LC (15 µg TSP); ^{35S}2G12-HC (40 µg TSP); ^{35S}2G12-LC_{ELP} (5 µg TSP); ^{35S}2G12-HC_{ELP} (15 µg TSP). scFv: Einkettenantikörper/c-myc Standard; Wt: Wildtyp *N. tabacum* (20 µg TSP); LC: leichte Kette; HC: schwere Kette; 35S: CaMV 35S-Promotor; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht; TSP: gesamtlösliches Protein.

Degradationsprodukte der Fusionsproteine wurden vorwiegend bei 2F5-LC_{ELP} nachgewiesen, mit deutlich verringertem Maße auch bei 2F5-HC_{ELP}, 2G12-LC_{ELP} und 2G12-HC_{ELP}.

Zur Erzeugung von Tabakpflanzen mit samenspezifischer Expression der Immunglobuline wurden die unter Pkt. III.1.2 beschriebenen rekombinanten Agrobakterien verwendet. Der Austausch der Promotorsequenzen in den pRTRA-Klonierungsvektoren (CaMV 35S-Promotor gegen USP- bzw. LeB4-Promotor) wurde jedoch erst nach erfolgreicher, transienter Expression der Immunglobuline in Tabakblättern vorgenommen.

Nach Ernte des Samenmaterials der erzeugten T₀-Pflanzen, dessen Zerkleinerung und Extraktion der löslichen Proteine, erfolgte deren Analyse durch Western Blot (vgl. II.2.4.1, II.2.4.3). Abb. III-5 reflektiert die Analyse von T₀-Pflanzen, die Immunglobuline des Antikörpers 2G12 unter Kontrolle von samenspezifischen Promotoren exprimieren.

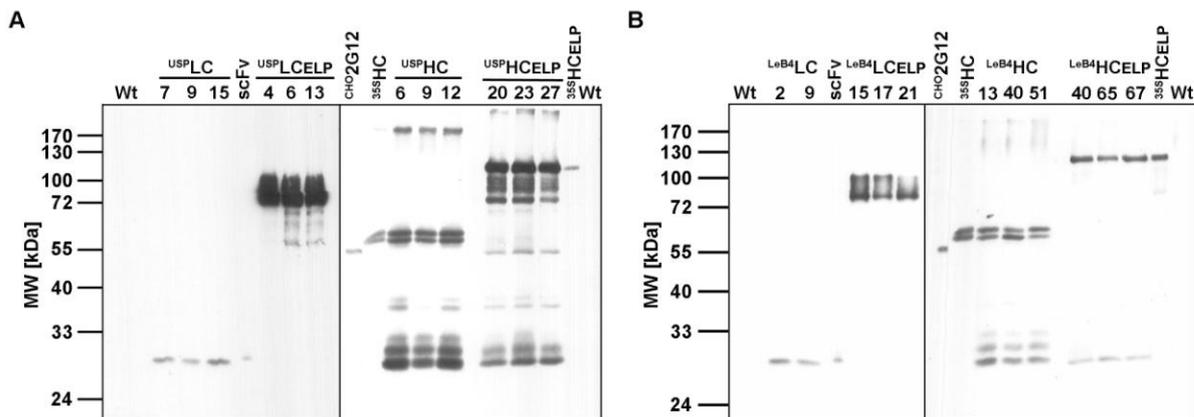


Abb. III-5: Nachweis der 2G12 Antikörperketten und ELP-Fusionen in Samen transgener Tabakpflanzen. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (10%) unter reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit dem anti-c-myc Antikörper (leichte Ketten) und einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper (schwere Ketten). Verschiedene T₀-Pflanzen wurden für diese repräsentativen Western Blots verwendet. **A:** Stabile Expression der 2G12 Immunglobulingene unter Kontrolle des USP-Promotors. ^{USP}LC: 20 µg TSP; ^{USP}LC_{ELP}: 5 µg TSP; ^{USP}HC: 60 µg TSP; ^{USP}HC_{ELP}: 30 µg TSP. **B:** Stabile Expression der 2G12 Immunglobulingene unter Kontrolle des LeB4-Promotors. ^{LeB4}LC: 20 µg TSP; ^{LeB4}LC_{ELP}: 5 µg TSP; ^{LeB4}HC: 60 µg TSP; ^{LeB4}HC_{ELP}: 30 µg TSP. Wt: Wildtyp *N. tabacum* (20 bzw. 60 µg TSP); scFv: 10 ng Einkettenantikörper/c-myc Standard; ^{CHO}2G12: 2 ng Standardantikörper 2G12 aus CHO-Zellen; Expression unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors: ^{35S}HC (20 µg TSP), ^{35S}HC_{ELP} (10 µg TSP); LC: leichte Kette; HC: schwere Kette; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht; TSP: gesamtlösliches Protein.

Verschieden starke Western Blot Signale verdeutlichen die Unterschiede im Expressionsniveau der einzelnen Immunglobulingene (2G12-LC: 20 µg TSP; 2G12-LC_{ELP}: 5 µg TSP; 2G12-HC: 60 µg TSP; 2G12-HC_{ELP}: 30 µg TSP). Leichte Ketten sowie deren ELP-Fusionen wurden mit dem anti-c-myc Antikörper detektiert. Für den Nachweis der schweren Ketten wurde ein anti-Human Fc-spezifischer Antikörper (vgl. Tab. II-4) eingesetzt. Als Positivkontrollen für die Detektion mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper dienten aus CHO-Zellen stammende Immunglobuline (^{CHO}2F5, ^{CHO}2G12, vgl. Tab. II-4). Eine erhöhte Akkumulation der ELP-Fusionen (LC_{ELP}, HC_{ELP}) wurde auch bei der Expression der Immunglobulingene unter Kontrolle der beiden samenspezifischen Promotoren festgestellt. Die nachgewiesenen rekombinanten Proteine zeigten das kalkulierte Molekulargewicht (vgl. Anhang VII.2.2). Die molaren Massen der ELP-Fusionsproteine waren wiederum höher als erwartet. Dies wurde bereits im transienten System (vgl. III.2.1) und auch bei der Expression unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors festgestellt.

Schwere Ketten mit ELP-Fusion waren im Samen instabil, da durch Western Blot unter Verwendung eines anti-Human Fc-spezifischen Antikörpers Degradationsprodukte nachgewiesen wurden. Abbaubanden wurden ebenfalls bei schweren Ketten ohne ELP-Fusion erhalten. Die entsprechenden Degradationsprodukte bei den analogen rekombinanten Proteinen aus Tabakblättern konnten nicht detektiert werden (^{35S}2G12-HC bzw. ^{35S}2G12-HC_{ELP}, vgl. Abb. III-5). Petruccelli *et al.* (2006) zeigten ähnliche Ergebnisse. Auch sie identifizierten ein Degradationsprodukt der schweren Kette eines in Tabaksamen exprimierten Antikörpers. Da dieses Spaltprodukt nicht auftrat, wenn der Antikörper aus den Blättern stammt, vermuteten sie, dass eine samenspezifische Protease ein bestimmtes Motiv innerhalb der schweren Kette erkennt und das rekombinante Protein spaltet.

Immunglobulingene des Antikörpers 2F5 wurden samenspezifisch exprimiert (Abb. III-6). Die Expressionssteigerung durch ELP wurde ebenfalls nachgewiesen. Degradationsprodukte der schweren Ketten traten auch hier auf.

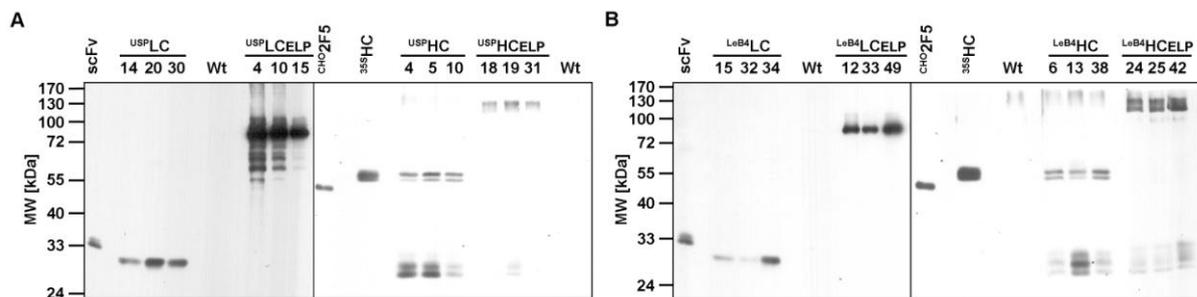


Abb. III-6: Nachweis der 2F5 Antikörperketten und ELP-Fusionen in Samen transgener Tabakpflanzen. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (10%) unter reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit dem anti-c-myc Antikörper (leichte Ketten) und einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper (schwere Ketten). Jeweils drei T₀-Pflanzen wurden für diese repräsentativen Western Blots verwendet. **A:** Stabile Expression der 2F5 Immunglobulingene unter Kontrolle des USP-Promotors. ^{USP}LC: 10 µg TSP; ^{USP}LC_{ELP}: 2 µg TSP; ^{USP}HC: 60 µg TSP; ^{USP}HC_{ELP}: 30 µg TSP. **B:** Stabile Expression der 2F5 Immunglobulingene unter Kontrolle des LeB4-Promotors. ^{LeB4}LC: 10 µg TSP; ^{LeB4}LC_{ELP}: 2 µg TSP; ^{LeB4}HC: 60 µg TSP; ^{LeB4}HC_{ELP}: 30 µg TSP. scFv: 10 ng Einkettenantikörper/c-myc Standard; Wt: Wildtyp *N. tabacum* (10 bzw. 60 µg TSP); ^{CHO}2F5: 2 ng Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; Expression unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors: ^{35S}HC (20 µg TSP); ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht; TSP: gesamtlösliches Protein.

III.3 Expression von Antikörpern und ELP-Fusionsproteinen in *Nicotiana tabacum*

Zur Erzeugung von Pflanzen mit Akkumulation der kompletten Antikörper im ER wurden transgene Linien für die leichten Ketten mit denen für die schweren gekreuzt (vgl. II.2.3.2). Die Nachkommen dieser Kreuzungen (F₁-Pflanzen) wurden hinsichtlich der Präsenz vollständig assemblierter Immunglobulinmoleküle analysiert.

Die Segregation der Nachkommen (T₁) verschiedener T₀-Pflanzen wurde für die Kreuzungen untersucht. Der Indikator für das Vorhandensein der T-DNA und somit des Transgens war Kanamycinresistenz (*nptII* Gen). Aus diesem Grund erfolgten die Analysen auf Selektionsplatten mit dem Antibiotikum. Von jedem Transformationsansatz wurden mehrere T₀-Linien hinsichtlich eines 3:1 Spaltungsverhältnisses, das auf eine *single locus* Insertion der T-DNA (ein Transgenlocus) hinweist, getestet (vgl. II.2.3.1). Lediglich Linien, deren Nachkommen dieser Spaltung entsprachen, wurden für die Kreuzungen verwendet.

Die T₁-Keimlinge lassen sich in drei Kategorien einteilen:

- (A) Ungekeimte Samen
- (B) Keimlinge im 2- bis 4-Blattstadium Genotyp Aa oder AA
- (C) Keimlinge im Keimblattstadium Genotyp aa

Ungekeimte Samen wurden in die Auswertung nicht einbezogen, da diese eine mangelnde Keimfähigkeit des Saatguts repräsentieren können. Für die Segregationsanalyse wurde das Verhältnis aus (B) und (C) bestimmt. Dies sollte nicht signifikant von einer 3:1 Verteilung abweichen. Zu Kategorie (C) zählen Pflanzen, die keine Kanamycinresistenz und somit auch

kein Transgen besitzen (aa). Diese Pflanzen sind bis zum Keimblattstadium phänotypisch identisch mit den hemizygoten (Aa) oder homozygoten (AA) T₁-Pflanzen, die als Kategorie (B) eingestuft werden und das Transgen aufweisen. Die Weiterentwicklung der Pflanzen ohne Transgen (aa) bleibt unter dem Einfluss von Kanamycin aus, sie vergilben. Ein Beispiel dieser Spaltungsanalyse ist in Abb. III-7 dargestellt. Die Zusammenfassung aller Segregationsanalysen befindet sich im Anhang (vgl. Tab. VII-1).

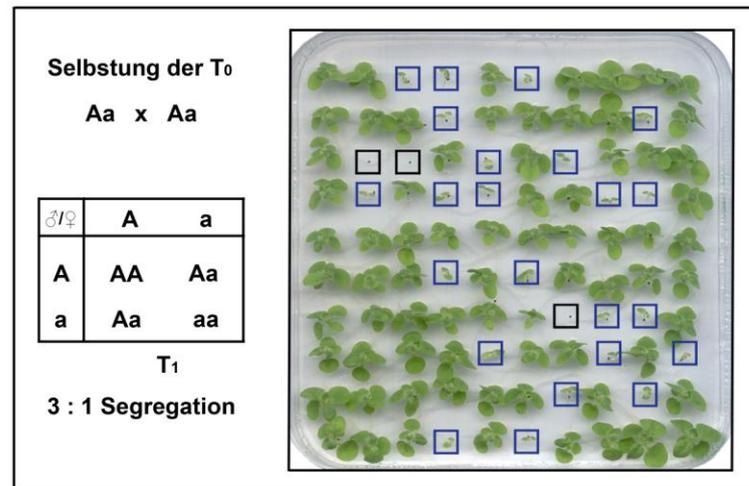


Abb. III-7: Spaltungsanalyse der Nachkommen einer ausgewählten T₀-Linie. Die Segregationsanalyse der T₁-Pflanzen (T₀-Pflanze: ^{LeB4}2F5-HC 8) erfolgte auf Selektionsmedium mit Kanamycin. Ungekeimte Samen (schwarz) und kanamycinsensitive Keimlinge (blau) sind gekennzeichnet. Aa, AA bzw. aa repräsentieren den Genotyp der putativ transgenen Pflanzen bezogen auf die Existenz der T-DNA. A: Vorhandensein der T-DNA; a: T-DNA ist nicht vorhanden; Aa: hemizygot; aa bzw. AA: homozygot.

Von jedem Transformationsansatz (^{35S}2F5-LC, ^{USP}2F5-LC, ^{LeB4}2F5-LC usw., insgesamt 24, vgl. Anhang VII.3) wurden drei T₀-Linien mit *single locus* Insertion der T-DNA für die Kreuzungen ausgewählt. Diese wurden kombiniert, so dass drei verschiedene Möglichkeiten von ♀ und ♂ pro Antikörpervariante existierten. Innerhalb jeder Kombination wurden mehrere Mutter- und Vaterpflanzen einer Linie verwendet. Eine Variation der Kreuzungspartner und weitere Kombinationen der sechs T₀-Linien erfolgten nicht.

Zum Zeitpunkt der Kreuzungen war es nicht möglich, eine Aussage über die Genotypen der Mutter- und Vaterpflanzen zu treffen. Dies wurde nach der Analyse der Nachkommen vorgenommen. Bei Kreuzung zweier für das jeweilige Transgen homozygoter Pflanzen (LL x HH) akkumulierte die gesamte Nachkommenschaft den kompletten Antikörper. Waren beide Kreuzungspartner hemizygot (Ll x Hh), wiesen lediglich 25% der Nachkommen den vollständigen Antikörper auf. Wurde eine homozygote Pflanze mit einer hemizygoten verpaart (Ll x HH oder LL x Hh), produzierten 50% der Nachkommen das komplette Immunglobulin. Ein Beispiel für die Kreuzung von ^{35S}2F5-LC mit ^{35S}2F5-HC zur Erzeugung von Pflanzen (^{35S}2F5), die den kompletten Antikörper 2F5 im ER unter Kontrolle des ubiquitären CaMV 35S-Promotors exprimieren, ist im Anhang dargestellt (vgl. VII.4).

Für die Kreuzungen zu den verschiedenen Antikörpervarianten existieren vier Kombinationsmöglichkeiten der leichten und schweren Ketten mit und ohne ELP-Fusion (Abb. III-8).

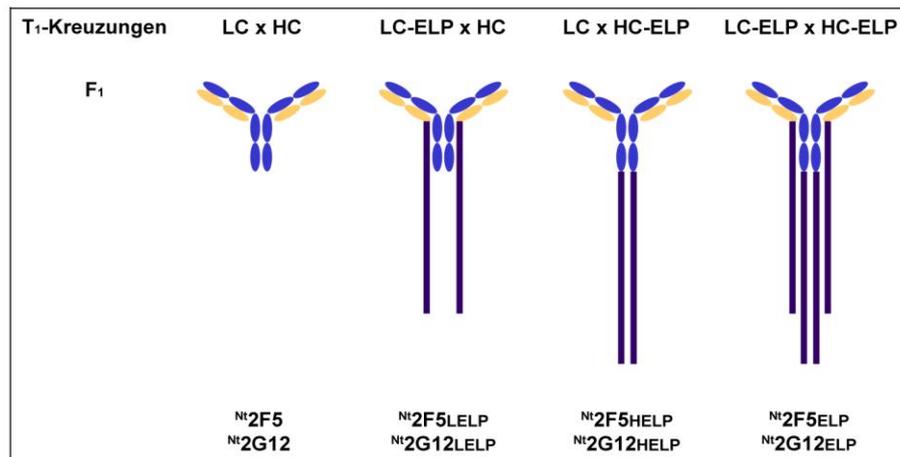


Abb. III-8: Kombinationsmöglichkeiten der T₀-Linien zur Erzeugung der verschiedenen Antikörper in der Nachkommenschaft. Die Immunglobuline 2F5 sowie 2G12 und deren ELP-Fusionen sind schematisch dargestellt. Auf die Struktur der Proteine sowie die exakten Größenverhältnisse wurde nicht eingegangen. T₁: T₁-Pflanzen; LC: leichte Kette (orange); HC: schwere Kette (blau); ELP: elastinähnliches Polypeptid (violett); x: Kreuzung; F₁: Nachkommen; N^t2F5: 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*, N^t2F5LELP: 2F5 mit ELP-Fusion an den leichten Ketten aus *N. tabacum*; N^t2F5HELP: 2F5 mit ELP-Fusion an den schweren Ketten aus *N. tabacum*; N^t2F5ELP: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; N^t2G12: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*; N^t2G12LELP: 2G12 mit ELP-Fusion an den leichten Ketten aus *N. tabacum*; N^t2G12HELP: 2G12 mit ELP-Fusion an den schweren Ketten aus *N. tabacum*; N^t2G12ELP: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*.

Vier verschiedene Antikörpervarianten resultieren daraus:

- | | |
|---|--|
| N ^t 2F5 bzw. N ^t 2G12 | in <i>N. tabacum</i> exprimierte Antikörper ohne elastinähnliche Polypeptide |
| N ^t 2F5LELP bzw. N ^t 2G12LELP | in <i>N. tabacum</i> exprimierte Antikörper mit elastinähnlichen Polypeptiden an den leichten Ketten |
| N ^t 2F5HELP bzw. N ^t 2G12HELP | in <i>N. tabacum</i> exprimierte Antikörper mit elastinähnlichen Polypeptiden an den schweren Ketten |
| N ^t 2F5ELP bzw. N ^t 2G12ELP | in <i>N. tabacum</i> exprimierte Antikörper mit elastinähnlichen Polypeptiden an allen vier Ketten |

Bei den verschiedenen Kreuzungsmöglichkeiten wurden die gleichen T₀-Linien mit Expression der entsprechenden Transgene eingesetzt. Dies bedeutet, dass für die Generation von Pflanzen mit Akkumulation von N^t2F5 oder N^t2F5HELP dieselbe LC T₀-Linie verwendet wurde.

Zur Produktion der Immunglobuline unter Kontrolle der samenspezifischen Promotoren (USP- bzw. LeB4-Promotor) wurden lediglich Kreuzungen zur Erzeugung der kompletten Antikörper N^t2F5 und N^t2F5ELP bzw. N^t2G12 sowie N^t2G12ELP durchgeführt.

Die Analyse der Kreuzungsprodukte (F₁-Pflanzen) mit ubiquitärer Expression der Transgene erfolgte mit einem Sandwich-ELISA unter Nutzung der Interaktionen zwischen Immunglobulin G-Molekülen und Protein A sowie Protein L (vgl. II.2.4.5). Lediglich Pflanzen, deren Extrakte eine Gelbfärbung nach der Peroxidasereaktion hervorriefen, wurden bis zur Samenreife kultiviert. In Abb. III-9 ist beispielhaft eine Analyse von Nachkommen einer vorgenommenen Kreuzung durch Sandwich-ELISA dargestellt. Die Signale für den Standardantikörper (CHO²F5, Tab. II-4), der als Positivkontrolle verwendet wurde, und für die

Pflanzenextrakte mit den kompletten Antikörpern sind deutlich zu unterscheiden. Negativkontrollen, Wildtyp *N. tabacum* sowie der BSA-Verdünnungspuffer, zeigten keine Farbreaktion.

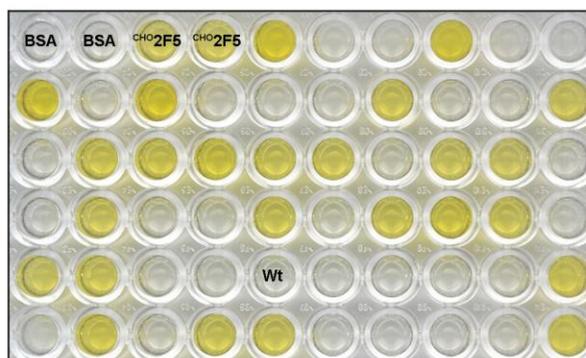


Abb. III-9: Analyse der Kreuzungsprodukte durch Sandwich-ELISA. 96-Well-Platten wurden mit rekombinantem Protein L beschichtet. Nach Zugabe der Pflanzenextrakte erfolgte der Nachweis der assemblierten leichten und schweren Ketten mit Protein A-Peroxidasekonjugat. BSA: BSA-Verdünnungspuffer; ^{CHO}2F5: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; Wt: Wildtyp *N. tabacum*.

Mit dieser Methode war es lediglich möglich, ein Zusammenlagern von leichten (L) und schweren Ketten (H) nachzuweisen. Eine Unterscheidung zwischen den Antikörperderivaten L₂H₂ (Immunglobulin G), LH₂, L₂H oder LH konnte nicht getroffen werden. Hierfür wurden die putativ antikörperexprimierenden Pflanzen nochmals durch Western Blot überprüft (vgl. II.2.4.3). Die verschiedenen Antikörpervarianten von 2F5 und 2G12 wurden mit einem Fc-spezifischen Antikörper mit den kalkulierten Molekulargewichten detektiert (vgl. Tab. III-2). Abb. III-10 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Western Blots mit je zwei F₁-Pflanzen für jede Kombinationsmöglichkeit des Antikörpers 2F5 (Transgene unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors).

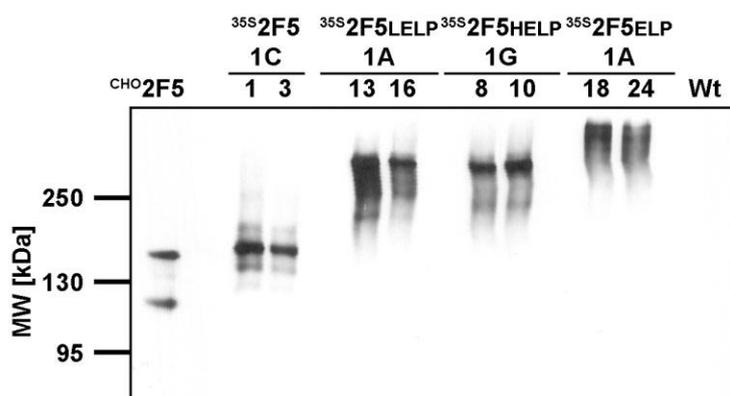


Abb. III-10: Nachweis der assemblierten 2F5 Antikörper und ELP-Fusionen in Tabakblättern. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. Jeweils zwei F₁-Pflanzen (1 u. 3; 13 u. 16; 8 u. 10; 18 u. 24), die von einer Bestäubung (Kapsel 1C; 1A; 1G; 1A) stammen, wurden für diesen repräsentativen Western Blot verwendet. ^{CHO}2F5: 2 ng Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; 35S: CaMV 35S-Promotor; ^{35S}2F5: Pflanzen mit Akkumulation von 2F5 ohne ELP; ^{35S}2F5LELP: Pflanzen mit Akkumulation von 2F5 mit ELP-Fusion an den leichten Ketten; ^{35S}2F5HELP: Pflanzen mit Akkumulation von 2F5 mit ELP-Fusion an den schweren Ketten; ^{35S}2F5ELP: Pflanzen mit Akkumulation von 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten; ELP: elastinähnliches Polypeptid; Wt: Wildtyp *N. tabacum*; MW: Molekulargewicht.

Zwei leichte und zwei schwere Ketten lagern sich jeweils zu kompletten IgG-Molekülen (L_2H_2 , N^t2F5) bzw. den ELP-Fusionsproteinen (N^t2F5_{LELP} , N^t2F5_{HELP} , N^t2F5_{ELP}) zusammen. Dies ist anhand des Molekulargewichts der unter nicht reduzierenden Bedingungen getrennten Proteine ersichtlich. Die ELP-Fusionen am C-Terminus der leichten und schweren Ketten behindern die Zusammenlagerung zum vollständigen Antikörper nicht.

Für einen Vergleich der Expressionsniveaus der verschiedenen 2F5 Antikörpervarianten in Tabakblättern wurden Pflanzenextrakte in einem SDS-PAA-Gel unter reduzierenden Bedingungen getrennt. In den T_0 -Pflanzen wurden leichte Ketten meist stärker exprimiert als schwere Ketten (vgl. III.2.2). Die Akkumulation der kompletten Antikörper wurde daher durch spezifische Analyse der schweren Ketten bzw. von deren ELP-Fusionen durchgeführt. SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen eignete sich für die Quantifizierung der rekombinanten Proteine nicht, da Unterschiede beim Transfer auf die Nitrocellulosemembran zwischen Molekülen mit verschiedenen molaren Massen auftreten. Proteine mit einem geringen Molekulargewicht (z. B. N^t2F5 oder $^{CHO}2F5$) werden im Vergleich zu den Antikörpern mit ELP deutlich effizienter transferiert.

Für alle vier 2F5 Varianten (ubiquitäre Expression) wurden drei F_1 -Pflanzen durch Western Blot Analyse analysiert (Abb. III-11). Die Fusion mit ELP führte zu einer Steigerung der Akkumulation der Antikörper-ELP-Varianten. Sogar ELP-Fusion an den leichten Ketten (siehe $^{35S}2F5_{LELP}$) erhöhte, im Vergleich zu der Variante ohne ELP (siehe $^{35S}2F5$), die Produktion des kompletten Antikörpers. Dies lässt eine zusätzliche Stabilisierung des Immunglobulins durch elastinähnliche Polypeptide vermuten und ist ein weiterer Hinweis auf die korrekte Zusammenlagerung der Antikörperketten in *N. tabacum*.



Abb. III-11: Akkumulation der schweren Ketten der 2F5 Antikörpervarianten in Blättern transgener Tabakpflanzen. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (12%) unter reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. Von den Pflanzenextrakten wurden 10 µg gesamtlösliches Protein pro Gelspur aufgetragen. Jeweils drei F_1 -Pflanzen (z. B. 24; 15; 25), die von einer Bestäubung (u. a. Kapsel 1C) stammen, wurden analysiert. $^{CHO}2F5$: 30 ng Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; Wt: Wildtyp *N. tabacum*; 35S: CaMV 35S-Promotor; $^{35S}2F5$: Pflanzen mit Akkumulation von 2F5 ohne ELP; $^{35S}2F5_{LELP}$: Pflanzen mit Akkumulation von 2F5 mit ELP-Fusion an den leichten Ketten; $^{35S}2F5_{HELP}$: Pflanzen mit Akkumulation von 2F5 mit ELP-Fusion an den schweren Ketten; $^{35S}2F5_{ELP}$: Pflanzen mit Akkumulation von 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

Die Bestimmung der Menge an rekombinantem Antikörper bezogen auf den Gehalt an gesamtlöslichem Protein im Pflanzenextrakt wurde durch einen semi-quantitativen Western Blot vorgenommen (Abb. III-12).

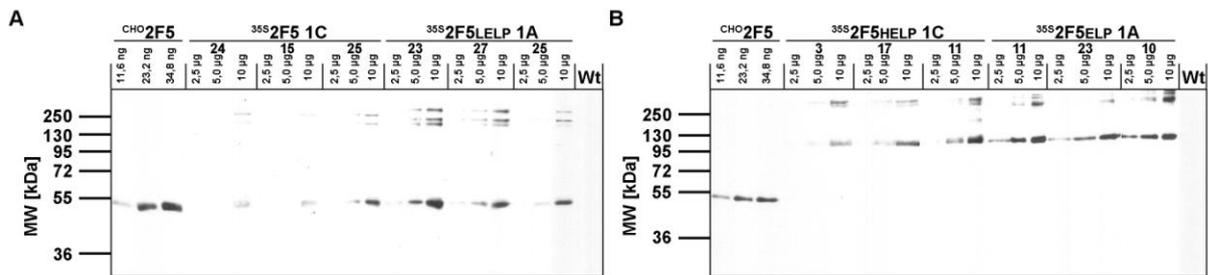


Abb. III-12: Semi-quantitativer Western Blot zur Bestimmung der Expressionshöhe rekombinanter 2F5 Antikörpervarianten in Tabakblättern. Die Trennung der Proteine erfolgte unter reduzierenden Bedingungen im SDS-PAA-Gel (10%) und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. Definierte Konzentrationen an CHO-Standard (11,6 ng; 23,2 ng; 34,8 ng) sowie vergleichbare Mengen an gesamtlöslichem Protein der F₁-Blattextrakte (2,5 µg; 5 µg; 10 µg) wurden pro Gelspur aufgetragen. Jeweils drei F₁-Pflanzen wurden analysiert. **A:** Analyse des Expressionsniveaus der Antikörper ^{Nt}2F5 und ^{Nt}2F5_{LELP}. F₁-Pflanzen: ^{35S}2F5 1C 24; ^{35S}2F5 1C 15 bzw. ^{35S}2F5 1C 25 und ^{35S}2F5_{LELP} 1A 23; ^{35S}2F5_{LELP} 1A 27 bzw. ^{35S}2F5_{LELP} 1A 25. **B:** Analyse des Expressionsniveaus der Antikörper ^{Nt}2F5_{HELP} und ^{Nt}2F5_{ELP}. F₁-Pflanzen: ^{35S}2F5_{HELP} 1C 3; ^{35S}2F5_{HELP} 1C 17 bzw. ^{35S}2F5_{HELP} 1C 11 und ^{35S}2F5_{ELP} 1A 11; ^{35S}2F5_{ELP} 1A 23 bzw. ^{35S}2F5_{ELP} 1A 10. ^{CHO}2F5: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; Wt: Wildtyp *N. tabacum* (10 µg TSP); ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht; TSP: gesamtlösliches Protein.

Die Intensität der Banden der in Tabak produzierten schweren Ketten bzw. ELP-Fusionen wurde mit den Signalen der schweren Ketten des CHO-Standards (^{CHO}2F5) verglichen.

Die Angabe des Expressionsniveaus der rekombinanten Antikörper erfolgte in Prozent an gesamtlöslichem Protein (% TSP). Das Molekulargewicht des ELP-Fusionspartners wurde bei der Angabe der Expressionshöhe nicht berücksichtigt, da lediglich die Menge an Immunglobulin von Interesse ist.

Die relativen Expressionshöhen der kompletten Antikörper in Tabakblättern, bezogen auf den Gehalt an gesamtlöslichem Protein (TSP), betragen für die vier analysierten Varianten:

^{Nt} 2F5	0,1% TSP
^{Nt} 2F5 _{LELP}	0,3% TSP
^{Nt} 2F5 _{HELP}	0,2% TSP
^{Nt} 2F5 _{ELP}	0,6% TSP

Durch C-terminale ELP-Fusion aller Antikörperketten wurde die Expression des Immunglobulins 2F5 um das 6-fache gesteigert (^{Nt}2F5_{ELP}). Eine 3- bis 2-fache Erhöhung der Produktion wurde bei der Fusion des elastinähnlichen Polypeptids mit leichten oder schweren Ketten beobachtet (^{Nt}2F5_{LELP}, ^{Nt}2F5_{HELP}).

Die gleiche experimentelle Vorgehensweise wurde zur Bestimmung der Expressionsniveaus der 2G12 Antikörpervarianten in Tabakblättern angewandt (Daten nicht gezeigt) und so der Gehalt der rekombinanten Immunglobuline am gesamtlöslichem Protein (% TSP) ermittelt.

^{Nt} 2G12	0,4% TSP
^{Nt} 2G12 _{LELP}	1,0% TSP
^{Nt} 2G12 _{HELP}	0,1% TSP
^{Nt} 2G12 _{ELP}	1,0% TSP

Eine Steigerung der Akkumulation der 2G12 Immunglobuline um das 2,5-fache konnte durch C-terminale ELP-Fusion mit leichten (^{Nt}2G12_{LELP}) oder mit leichten und schweren Ketten

(^{Nt}2G12_{ELP}) erzielt werden. Deutlich geringere Mengen wurden für Antikörper mit ELP-Fusion an den schweren Ketten detektiert (^{Nt}2G12_{HELP}).

Da die Quantifizierung der Antikörper-ELP-Fusionen relativ zum CHO-Standard (Konzentration von POLYMUN angegeben) erfolgte und dieser nicht mit ELP fusioniert war, wurden die Mengen der „gesamten“ Fusionsproteine generell unterschätzt. Bei Antikörpervarianten mit ELP an allen vier Ketten fallen ca. 50% des Molekulargewichts auf die elastinähnlichen Polypeptide (164 kDa). Fusionsproteine mit ELP an leichten oder schweren Immunglobulinketten haben einen ELP-Anteil von ca. 35% (82 kDa).

Neben der Expression der Antikörpervarianten unter Kontrolle des ubiquitären CaMV 35S-Promotors wurden zwei samenspezifische Promotoren (USP- und LeB4-Promotor) zur Akkumulation der Immunglobuline und Fusionen mit dem elastinähnlichen Polypeptid an allen vier Antikörperketten evaluiert. Putativ transgene Pflanzen wurden durch *Multiplex*-PCR vorselektiert (vgl. II.2.1.4). Spezifische Primerpaare für Fragmente beider Immunglobulingene wurden parallel in einem PCR-Reaktionsansatz verwendet und resultierten in zwei Fragmenten (LC: 320 bp-Fragment, HC: 506 bp-Fragment). Die Analyse des Samenmaterials erfolgte mit *Sandwich*-ELISA (vgl. II.2.4.5) und durch Western Blot (vgl. II.2.4.3).

In Abb. III-13 ist die Analyse putativ transgener F₁-Pflanzen mit Akkumulation des Antikörpers 2F5 unter Kontrolle des samenspezifischen LeB4-Promotors dargestellt. F₁-Pflanzen mit beiden gewünschten PCR-Fragmenten wurden bis zur Samenreife kultiviert und anschließend die Akkumulation des rekombinanten Antikörpers überprüft (3, 5 und 6). Der *Sandwich*-ELISA (Abb. III-13B) und auch der Western Blot (Abb. III-13C) bestätigten die Ergebnisse der *Multiplex*-PCR (Abb. III-13A). Zur Kontrolle wurde Pflanze 1, bei der lediglich das PCR-Fragment der leichten Kette nachgewiesen wurde, ebenfalls bis zur Samenreife kultiviert und analysiert. Weder mit *Sandwich*-ELISA noch durch Western Blot konnten komplette Antikörper in Samen von Pflanze 1 detektiert werden.

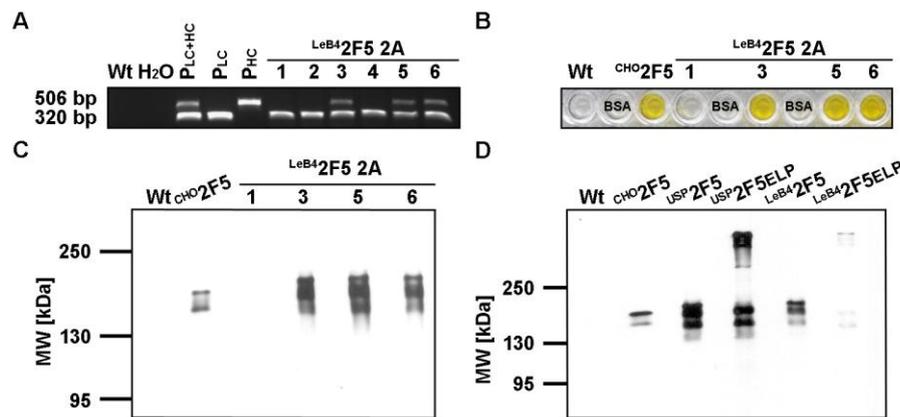


Abb. III-13: Analyse putativ transgener Tabakpflanzen mit samenspezifischer Expression der 2F5 Immunglobulingene. **A:** Identifikation der Immunglobulingene für leichte und schwere Ketten in ^{LeB4}2F5 2A Pflanzen mit *Multiplex*-PCR. Spezifische Primer für die Immunglobulingene wurden zur Amplifikation bestimmter Fragmente eingesetzt (LC: 320 bp; HC: 506 bp). Negativkontrollen: Wt (Wildtyp *N. tabacum*) und H₂O; Positivkontrollen: Plasmid-DNA der entsprechenden binären Vektoren für leichte (LC) und schwere (HC) Kette (P_{LC}, P_{HC}) sowie 1:1 Gemisch von beiden (P_{LC+HC}); ^{LeB4}2F5 2A F₁-Pflanzen: 1, 2, 3, 4, 5 und 6. **B:** Sandwich-ELISA zur Analyse der Samenextrakte von ^{LeB4}2F5 2A Pflanzen. 96-Well-Platten wurden mit Protein L beschichtet. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Protein A-Peroxidasekonjugat. Wt: Wildtyp *N. tabacum*; BSA: BSA-Verdünnungspuffer; ^{LeB4}2F5 2A F₁-Pflanzen: 1, 3, 5 und 6. **C:** Western Blot Analyse der Samenextrakte von ^{LeB4}2F5 2A Pflanzen. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. ^{LeB4}2F5 2A F₁-Pflanzen: 1, 3, 5 und 6. **D:** Western Blot Analyse zum Vergleich der Expressionsniveaus. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. Pflanzen mit Expression des Antikörpers, mit und ohne ELP, unter Kontrolle des USP-Promotors (^{USP}2F5: 5 µg TSP; ^{USP}2F5_{ELP}: 10 µg TSP) und des LeB4-Promotors (^{LeB4}2F5: 10 µg TSP; ^{LeB4}2F5_{ELP}: 20 µg TSP) wurden verglichen. Wt: Wildtyp *N. tabacum* (5 µg bzw. 20 µg TSP); ^{CHO}2F5: 2 ng Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht; TSP: gesamt lösliches Protein.

Ein Zusammenlagern der einzelnen Antikörperketten zum vollständigen IgG wurde ebenfalls bei samenspezifischer Expression der Immunglobulingene gezeigt. Die Antikörper sowie auch die ELP-Fusionsproteine wiesen das kalkulierte Molekulargewicht auf (vgl. Tab. III-2). Aus den im Western Blot auftretenden Degradationsprodukten (vgl. Abb. III-13D) wurde geschlossen, dass Antikörper-ELP-Fusionen in Samen nicht stabil sind. Das Molekulargewicht dieser Fragmente ist vergleichbar mit dem Immunglobulin ohne ELP. Daher wird die Abspaltung des elastinähnlichen Polypeptids vermutet. Dieser Abbau wurde bei Expression der HC-Gene unter Kontrolle beider samenspezifischer Promotoren beobachtet, nicht aber bei der ubiquitären Produktion im Blatt. Die nachgewiesenen Abbaubanden können aber auch Fragmente der schweren Ketten sein, da diese in Samen nicht stabil sind (vgl. III.2.2).

Ein Vergleich der 2F5 Akkumulation in Samen, bei Verwendung zwei verschiedener Promotoren, weist auf eine verstärkte Expression der Immunglobulingene unter Kontrolle des USP-Promotors hin (vgl. Abb. III-13D). Für den abgebildeten Western Blot wurde für Pflanzen mit den Transgenen unter Kontrolle des LeB4-Promotors mehr Gesamtprotein pro Gelspur appliziert. Die erhaltenen Signale für die USP-Varianten waren deutlich stärker. Ein direkter Vergleich zwischen nicht fusionierten und ELP-Varianten war jedoch nicht möglich.

Die Akkumulation des kompletten Antikörpers 2G12 sowie der entsprechenden ELP-Fusionen in Blättern und Samen transgener Tabakpflanzen wurde ebenfalls untersucht und bestätigt (Abb. III-14A, Abb. III-14B). Eine erhöhte Expression der 2G12 Immunglobulingene in Samen unter Kontrolle des USP-Promotors im Vergleich zum LeB4-Promotor wurde nachgewiesen.

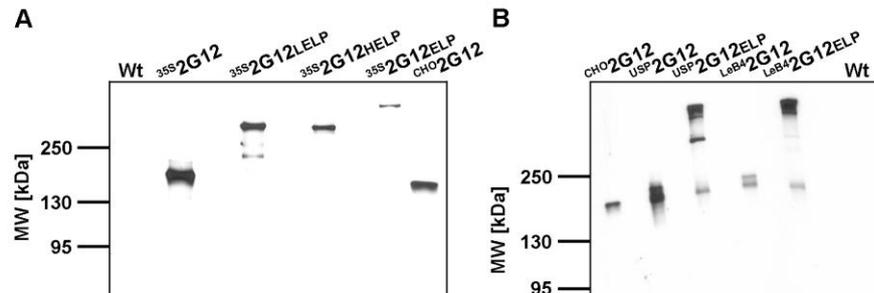


Abb. III-14: Detektion rekombinanter 2G12 Antikörper und ELP-Fusionen in transgenen Tabakpflanzen. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analysen mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. **A:** Nachweis der 2G12 Antikörpervarianten in Blattmaterial. ^{35S}2G12: F₁-Pflanze mit Expression des 2G12 ohne ELP (1,5 µg TSP); ^{35S}2G12_{LELP}: F₁-Pflanze mit Expression des 2G12 mit ELP-Fusion an den leichten Ketten (1,5 µg TSP); ^{35S}2G12_{HELP}: F₁-Pflanze mit Expression des 2G12 mit ELP-Fusion an den schweren Ketten (1,5 µg TSP); ^{35S}2G12_{ELP}: F₁-Pflanze mit Expression des 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten (1,5 µg TSP). **B:** Nachweis der 2G12 Antikörpervarianten in Samen transgener Pflanzen. ^{USP}2G12: F₁-Pflanze mit Expression des 2G12 ohne ELP unter Kontrolle des USP-Promotors (2,5 µg TSP); ^{USP}2G12_{ELP}: F₁-Pflanze mit Expression des 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten unter Kontrolle des USP-Promotors (10 µg TSP); ^{LeB4}2G12: F₁-Pflanze mit Expression des 2G12 ohne ELP unter Kontrolle des LeB4-Promotors (25 µg TSP); ^{LeB4}2G12_{ELP}: F₁-Pflanze mit Expression des 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten unter Kontrolle des LeB4-Promotors (50 µg TSP). Wt: Wildtyp *N. tabacum* (1,5 bzw. 50 µg TSP); ^{CHO}2G12: 2 ng Standardantikörper 2G12 aus CHO-Zellen; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht; TSP: gesamt lösliches Protein.

III.4 Erzeugung von homozygoten, antikörperexprimierenden Tabaklinien

Homozygote Linien sind für die Produktion rekombinanter Proteine in Pflanzen essenziell. Die Reinerbigkeit dieser Pflanzen ist eine wichtige Voraussetzung für Freisetzungsversuche, da eine weitere Segregation des Transgens nicht erfolgt. Auch für die pflanzliche Herstellung rekombinanter Proteine im industriellen Maßstab werden stabile homozygote Linien benötigt. Bei transgenen Pflanzen mit Akkumulation vollständiger IgG-Moleküle bedeutet dies homozygot für beide Immunglobulingene (Gene für die leichten und die schweren Antikörperketten).

Die Kreuzungsprodukte (F₁-Pflanzen) der T₁-Pflanzen sind hemizygot für beide Transgene (LHh) und segregieren nach Selbstung. Lediglich 6% der resultierenden F₂-Pflanzen sind homozygot für beide Immunglobulingene (LLHH, Abb. III-15). Eine Bestätigung für das Vorliegen homozygoter Pflanzen liefert die folgende Generation. Nach Selbstung homozygoter F₂-Pflanzen müssen alle Nachkommen (F₃-Pflanzen) den kompletten Antikörper exprimieren. Dies trifft jedoch nur auf Pflanzen mit je einem Locus (Genort) für jedes Immunglobulingen zu.

Neben diesem klassischen Weg ermöglicht die sogenannte Doppelhaploiden-Technik die Erzeugung reinerbiger Linien ausgehend von haploiden Pflanzen (Abb. III-15). Diese wurden, im Rahmen der vorliegenden Arbeit, aus einer embryogenen Pollenkultur regeneriert (Arbeitsgruppe „Pflanzliche Reproduktionsbiologie“, IPK, Gatersleben, BRD). Nach Genomaufdopplung entstanden homozygote Pflanzen (DH), die in der nächsten Generation nochmals auf Reinerbigkeit getestet wurden. Voraussetzung dafür war, dass die hemizygote Ausgangspflanze (F₁) je einen Locus für beide Immunglobuline aufwies.

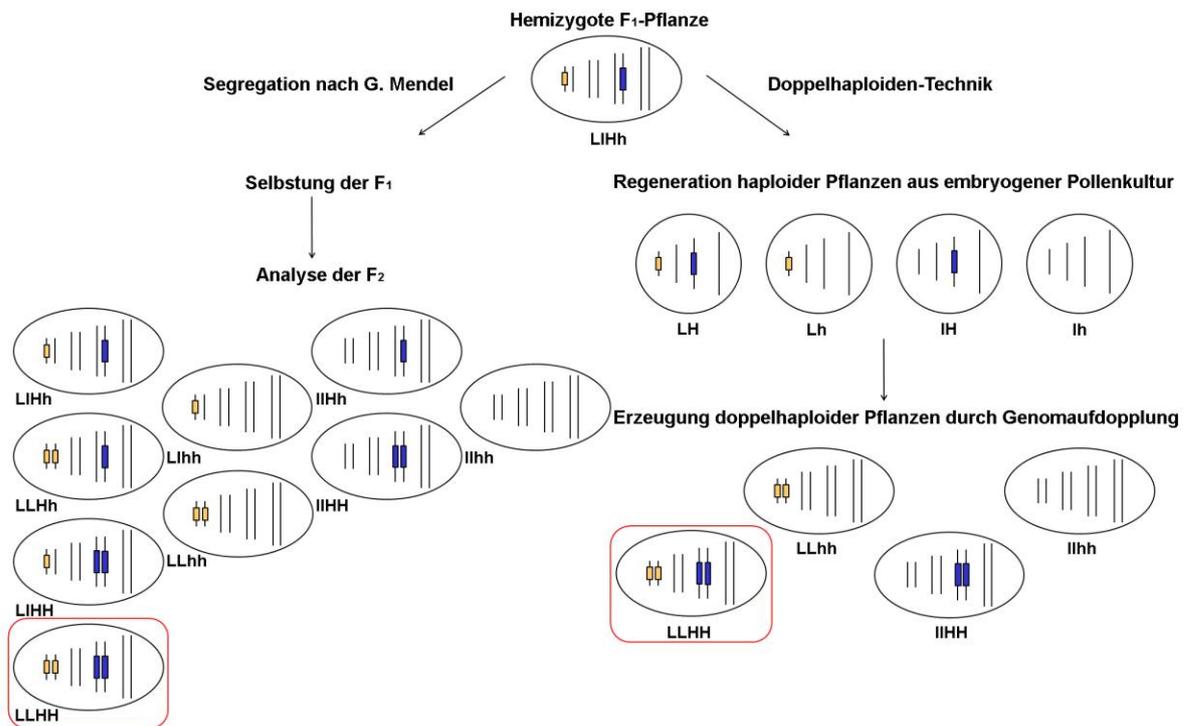


Abb. III-15: Erzeugung von Pflanzen mit Homozygotie für zwei nicht gekoppelte Transgene. Die beiden Strategien zur Erzeugung homozygoter Pflanzen (LLHH, rote Markierung) ausgehend von einer hemizygoten F₁-Pflanze (LIHh) sind schematisch abgebildet. Der Genotyp von *N. tabacum* (2n = 48) wird durch vier homologe Chromosomen repräsentiert. Die Transgene für leichte (orange) und schwere Ketten (blau) sind farblich markiert. L: Transgen für leichte Ketten ist vorhanden; l: Transgen für leichte Ketten ist nicht vorhanden; H: Transgen für schwere Ketten ist vorhanden; h: Transgen für schwere Ketten ist nicht vorhanden.

Transgene, homozygote Linien mit Akkumulation des Immunglobulins 2F5 bzw. des Fusionsproteins mit ELP an allen vier Antikörperketten in Tabakblättern und in Samen wurden mit der Doppelhaploiden-Technik erzeugt. Die Etablierung einer stabilen transgenen Linie auf herkömmlichem Weg durch Spaltungsanalyse erfolgte für den 2F5 ohne ELP bei ubiquitärer Expression.

III.4.1 Identifikation homozygoter Tabaklinien nach Segregationsanalyse

Nach Selbstung der hemizygoten F₁-Pflanze (LIHh) wurden deren Nachkommen (F₂) durch Sandwich-ELISA auf Akkumulation der leichten und schweren Ketten getestet.

Nach dem dritten Mendelschen Gesetz spaltet, unter der Annahme je eines Locus für beide Immunglobulingene, diese Generation wie folgt (vgl. Abb. III-15).

Pflanzen mit Akkumulation des kompletten Antikörpers	(L_H_)	56%
Pflanzen mit Akkumulation der leichten Ketten	(L_hh)	19%
Pflanzen mit Akkumulation der schweren Ketten	(llH_)	19%
Pflanzen ohne Transgen	(llhh)	6%

Ausgewählte Pflanzen mit Expression beider Transgene (Produktion des rekombinanten Antikörpers, L_H_) wurden in die nächste Generation (F₃) überführt und auf Reinerbigkeit getestet. Auch für diese Analyse wurde der Sandwich-ELISA eingesetzt. Lediglich bei homozygoten F₂-Pflanzen (LLHH) kann bei allen überprüften Nachkommen die Akkumulation des kompletten Antikörpers nachgewiesen werden. Hemizygoten Linien (LIHh) sowie Pflanzen mit Homozygotie für ein Transgen (LIHH, LLHh) zeigen eine Segregation in der F₃. Diese Hypothese wurde mit einer hemizygoten F₁-Pflanze mit *single locus* Insertionen der beiden Transgene bestätigt.

Nach Selbstung der hemizygoten F₁-Pflanze ^{35S}2F5 1C 3 wurden 80 Nachkommen (F₂) getestet (Abb. III-16A). 45 der untersuchten Pflanzen wurden als antikörperexprimierend bewertet (L_H_). Dies entspricht 56% der Nachkommen und stimmt mit dem erwarteten Wert überein (vgl. Abb. III-15). Pflanzen, deren Extrakte eine besonders intensive Farbreaktion bei diesem Testverfahren zeigten, wurden in die nächste Generation überführt (Selbstung) und die Nachkommen (F₃) analysiert.

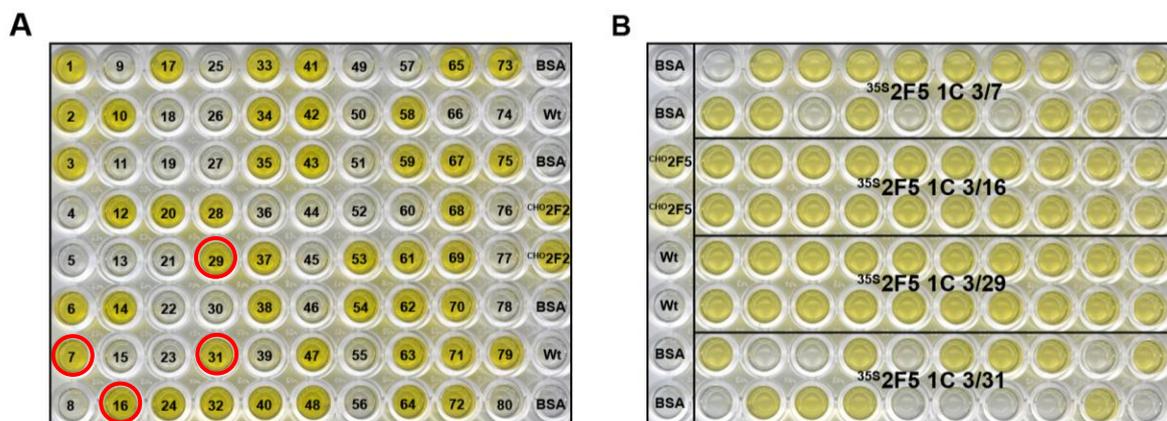


Abb. III-16: Identifikation homozygoter Linien mit Akkumulation des Antikörpers 2F5. Für die Analyse der F₂- und F₃-Pflanzen wurde der Protein L/ Protein A Sandwich-ELISA eingesetzt. 96-Well-Platten wurden mit Protein L beschichtet. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Protein A-Peroxidasekonjugat. **A:** Spaltungsanalyse der F₂-Pflanzen. Nach Selbstung der F₁-Pflanze ^{35S}2F5 1C 3 wurden 80 Nachkommen (F₂) hinsichtlich der Akkumulation des kompletten Antikörpers evaluiert. Die Wells der entsprechenden F₂-Pflanzen für die weitere Analyse sind rot markiert. **B:** Identifizierung homozygoter Linien durch Analyse der F₃. Antikörperexprimierende F₂-Pflanzen (^{35S}2F5 1C 3/7; ^{35S}2F5 1C 3/16; ^{35S}2F5 1C 3/29; ^{35S}2F5 1C 3/31) wurden in die nächste Generation überführt (Selbstung) und die F₃-Pflanzen hinsichtlich der Akkumulation des Antikörpers 2F5 getestet. BSA: BSA-Verdünnungspuffer; Wt: Wildtyp *N. tabacum*; ^{CHO}2F5: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; 35S: CaMV 35S-Promotor.

Abb. III-16B repräsentiert die Analyse vier putativ homozygoter F₂-Pflanzen. Zwei der analysierten transgenen Linien (^{35S}2F5 1C 3/16 bzw. ^{35S}2F5 1C 3/29) zeigten keine Segregation und wurden als reinerbig identifiziert. Bei diesem Versuch wurden jeweils 20

Nachkommen von 13 F₂-Pflanzen überprüft, wobei drei als homozygot bewertet werden konnten.

Insgesamt wurden bei dieser Vorgehensweise **340** Pflanzen (80 F₂-Pflanzen + 20 x 13 F₃-Pflanzen) analysiert und letztendlich **drei** homozygote transgene Linien mit *single locus* Insertionen beider Immunglobulingene identifiziert.

III.4.2 Regeneration doppelhaploider Tabakpflanzen

Parallel zum klassischen Weg der Spaltungsanalyse zur Erzeugung einer stabilen, homozygoten, transgenen Linie wurde die Doppelhaploiden-Technik angewandt. Ausgehend von einer hemizygoten F₁-Pflanze, die ebenfalls je einen Locus für beide Immunglobulingene aufwies, wurden mit embryogener Pollenkultur haploide Pflanzen regeneriert (vgl. Abb. III-15). Nach überwiegend spontaner Genomverdopplung wurden die sogenannten **doppelhaploiden** (DH) Pflanzen mit dem *Sandwich*-ELISA überprüft (vgl. II.2.4.5).

Dieses Verfahren wurde zur Erzeugung homozygoter Pflanzen, die den Antikörper 2F5 ohne ELP bzw. 2F5 mit ELP an allen vier Antikörperketten in Blättern (DH^{35S}2F5, DH^{35S}2F5_{ELP}) oder in Samen unter Kontrolle des USP-Promotors (DH^{USP}2F5, DH^{USP}2F5_{ELP}) akkumulieren, verwendet. Die hemizygoten F₁-Pflanze ^{35S}2F5 1C 3 der klassischen Vorgehensweise war ebenfalls ein Ausgangspunkt für die Doppelhaploiden-Technik und erlaubt somit einen direkten Vergleich beider Methoden.

Putativ doppelhaploide Pflanzen wurden mit dem Durchflußcytometer identifiziert (vgl. II.2.3.3). Tab. III-3 gibt eine Übersicht aller Haploiden und den daraus resultierenden Doppelhaploiden. Die Verdopplung des Genoms sollte zu einer fertilen Pflanze führen.

Tab. III-3: Regeneration haploider Pflanzen aus embryogenen Pollenkulturen und deren Genomverdopplung. ^{35S}2F5: Expression des Antikörpers 2F5 ohne ELP unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors; ^{35S}2F5_{ELP}: Expression des Antikörpers 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors; ^{USP}2F5: Expression des Antikörpers 2F5 ohne ELP unter Kontrolle des USP-Promotors; ^{USP}2F5_{ELP}: Expression des Antikörpers 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten unter Kontrolle des USP-Promotors; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

F ₁ -Pflanze für Pollenkultur	Regenerierte, haploide Pflanzen	Doppelhaploide Pflanzen	Fertile, doppelhaploide Pflanzen	Relative Häufigkeit* [%]
^{35S} 2F5 1C 1	62	51	50	80,6
^{35S} 2F5 1C 3	92	72	68	73,9
^{35S} 2F5 _{ELP} 1A 18	121	82	80	66,1
^{35S} 2F5 _{ELP} 1A 24	94	61	54	57,4
^{USP} 2F5 1A 10	70	59 ^a	51	72,8
^{USP} 2F5 1A 10	99	85	84	84,8
^{USP} 2F5 _{ELP} 8B 2	100	77	75	75,0

*fertile DH-Pflanzen bezogen auf die Anzahl insgesamt regenerierter Pflanzen

^aGenomverdopplung der Pflanzen *via* Colchizin, 59 von 70 mit Colchizin behandelten Pflanzen wurden im Gewächshaus kultiviert

Die unter Pkt. II.2.3.3 beschriebene Methode der embryogenen Pollenkultur wurde erfolgreich zur Regeneration doppelhaploider Pflanzen verwendet. Der Anteil an DH-Pflanzen lag bei den verschiedenen Experimenten zwischen 57% und 85%, wobei überwiegend eine spontane Genomverdopplung auftrat. Einzige Ausnahme war die Erzeugung der DH-Pflanzen mit Expression der Immunglobulingene unter Kontrolle des samenspezifischen USP-Promotors (F₁-Pflanze: ^{USP}2F5 1A 10). In einem ersten Versuch mussten die regenerierten haploiden Pflanzen zur Genomverdopplung mit Colchizin behandelt werden. Lediglich 84% dieser Pflanzen entwickelten sich nach der Colchizinierung weiter. Insgesamt konnten 73% der mit Colchizin behandelten Pflanzen als fertil identifiziert werden. Eine spontane Genomverdopplung haploider Pflanzen der gleichen Charge wurde in einem weiteren Versuch beobachtet.

Regenerierte Haploide unterscheiden sich hinsichtlich ihres Genotyps und somit im Vorhandensein des Transgens (vgl. Abb. III-15). Jeweils 25% der Pflanzen besitzen das Transgen für die leichten oder schweren Ketten, beide Immunglobulingene oder keins. Folglich sollte der vollständige Antikörper in 25% der DH-Pflanzen nachgewiesen werden. Dies entspricht einer 3:1 Verteilung. Innerhalb der verbleibenden 75% der DH-Pflanzen kann zwischen homozygoten Pflanzen mit Akkumulation der leichten oder schweren Ketten und nicht transgenen Pflanzen unterschieden werden. Dies gilt wiederum nur unter der Annahme, dass die hemizygoten Ausgangspflanze (F₁) jeweils einen Locus für beide Immunglobulingene besitzt.

Durch die Analyse von Pflanzenextrakten der Doppelhaploiden mit dem *Sandwich*-ELISA konnten Pflanzen mit Akkumulation beider Antikörperketten identifiziert werden. Pflanzen mit samenspezifischer Expression der Immunglobulingene wurden in einem ersten Schritt mit *Multiplex*-PCR getestet (vgl. II.2.1.4). Putativ antikörperexprimierende DH-Pflanzen (DH^{USP}2F5, DH^{USP}2F5ELP) wurden anschließend im Gewächshaus bis zur Samenreife kultiviert und nach der Ernte der Samen analysiert.

Abb. III-17A repräsentiert die Analyse der DH-Pflanzen mit ubiquitärer Expression an einem Beispiel. Aus dem Pollen der F₁-Pflanze ^{35S}2F5 1C 3 wurden 92 Pflanzen regeneriert (vgl. Tab. III-3) und diese im Durchflußcytometer auf ihre Ploidiestufe getestet. 72 dieser Pflanzen wurden als doppelhaploid identifiziert und mit dem *Sandwich*-ELISA hinsichtlich der Akkumulation des Antikörpers 2F5 analysiert (vgl. Tab. III-3, Abb. III-17A).

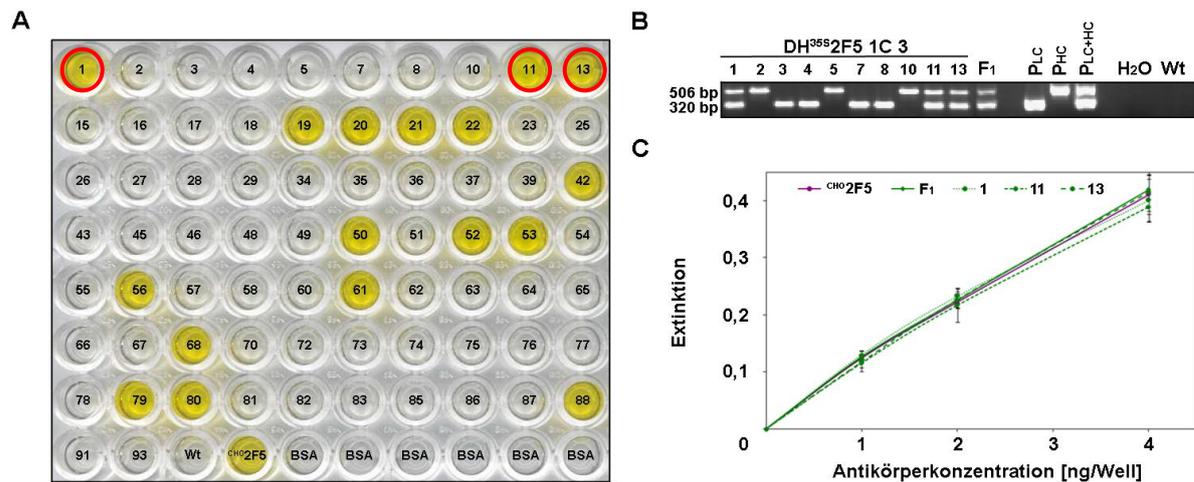


Abb. III-17: Analyse der regenerierten doppelhaploiden Pflanzen und Nachweis der Antigenbindung der in Tabak exprimierten Antikörper. **A:** Nachweis antikörperexprimierender DH-Pflanzen mit Protein L/ Protein A Sandwich-ELISA. 72 Regenerate (DH^{35S}2F5 1C 3) wurden auf Akkumulation des kompletten Antikörpers 2F5 getestet. Wt: Wildtyp *N. tabacum*; CHO2F5: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; BSA: BSA-Verdünnungspuffer. Die rote Markierung kennzeichnet Pflanzen, die zur weiteren Analyse verwendet wurden. **B:** Identifikation der Immunglobulingene mit Multiplex-PCR. Genomische DNA der regenerierten Pflanzen (DH^{35S}2F5 1C 3/1; DH^{35S}2F5 1C 3/2; DH^{35S}2F5 1C 3/3; DH^{35S}2F5 1C 3/4; DH^{35S}2F5 1C 3/5; DH^{35S}2F5 1C 3/7; DH^{35S}2F5 1C 3/8; DH^{35S}2F5 1C 3/10; DH^{35S}2F5 1C 3/11; DH^{35S}2F5 1C 3/13) wurde bei der PCR eingesetzt. Spezifische Fragmente der Immunglobulingene (LC: 320 bp; HC: 506 bp) wurden amplifiziert und die DH-Pflanzen anhand der PCR-Ergebnisse in vier verschiedenen Kategorien eingeordnet. Genomische DNA der F₁-Pflanze sowie Plasmid-DNA dienten als Positivkontrollen. F₁: F₁-Pflanze ^{35S}2F5 1C 3; P_{LC}: Plasmid-DNA des binären Vektors für die Expression der leichten Ketten; P_{HC}: Plasmid-DNA des binären Vektors für die Expression der schweren Ketten; P_{LC+HC}: Gemisch der Plasmid-DNA; H₂O: Wasserkontrolle; Wt: Wildtyp *N. tabacum*. **C:** Vergleich der Antigenbindung pflanzlich exprimierter Antikörper und des CHO-Standards. 96-Well-Platten wurden mit dem Peptid GGLELDKWASL beschichtet. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem anti-Human Fc-spezifischem Antikörper-Peroxidasekonjugat. Definierte Mengen an Antikörper wurden pro Well eingesetzt. CHO2F5: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; F₁: Blattextrakt der F₁-Pflanze ^{35S}2F5 1C 3; 1, 11 bzw. 13: Blattextrakte der DH-Pflanzen DH^{35S}2F5 1C 3/1, DH^{35S}2F5 1C 3/11 bzw. DH^{35S}2F5 1C 3/13; DH: Doppelhaploide; 35S: CaMV 35S-Protomotor.

In Blattextrakten von 17 DH-Pflanzen wurden assemblierte leichte und schwere Antikörperketten, und somit das komplette IgG, nachgewiesen (vgl. Abb. III-17A). 16 der untersuchten Pflanzen waren fertil (vgl. Tab. III-4). Dies entspricht 23,5% der regenerierten, fertilen Doppelhaploiden. Mit dem χ^2 -Anpassungstest konnte keine signifikante Abweichung von einer 3:1 Verteilung nachgewiesen werden (*P*-Wert: 0,7794). Tab. III-4 fasst die Ergebnisse aller Experimente zusammen und gibt einen Überblick über die mit der Doppelhaploiden-Technik erzeugten Pflanzen (Regenerate). Außer bei DH^{U_{SP}}2F5ELP 8B 2 konnte mit dem χ^2 -Anpassungstest gezeigt werden, dass keine signifikanten Unterschiede zu einer 3:1 Verteilung auftraten.

Tab. III-4: Auswertung der einzelnen Experimente zur Doppelhaploiden-Technik. ^{35S}2F5: Expression des Antikörpers 2F5 ohne ELP unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors; ^{35S}2F5_{ELP}: Expression des Antikörpers 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors; ^{USP}2F5: Expression des Antikörpers 2F5 ohne ELP unter Kontrolle des USP-Promotors; ^{USP}2F5_{ELP}: Expression des Antikörpers 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten unter Kontrolle des USP-Promotors. DH: Doppelhaploide; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Experiment	Regenerate (DH)		Antikörperexprimierende Regenerate (DH)		Relative Häufigkeit* [%]	P-Wert**
	Gesamt	Fertil	Gesamt	Fertil		
DH ^{35S} 2F5 1C 1	51	50	7	7	14,0	0,0724
DH ^{35S} 2F5 1C 3	72	68	17	16	23,5	0,7794
DH ^{35S} 2F5 _{ELP} 1A 18	82	80	23	22	27,5	0,6056
DH ^{35S} 2F5 _{ELP} 1A 24	61	54	11	10	18,9	0,2714
DH ^{USP} 2F5 1A 10 ^a	70	51 ^a	16	16	31,4	0,4669
DH ^{USP} 2F5 1A 10	85	84	23	23	27,4	0,6143
DH ^{USP} 2F5 _{ELP} 8B 2	77	75	11	11	14,7	0,0388

* fertile DH-Pflanzen mit Akkumulation des Antikörpers bezogen auf die Anzahl insgesamt regenerierter, fertiler DHs

** Berechnung des P-Werts erfolgte mit dem Programm R (www.r-project.org)

^a Genomaufdopplung haploider Pflanzen *via* Colchizin

Das gleichverteilte Auftreten der Regenerate (je 25%, vgl. Abb. III-15) wurde ebenfalls für die DH^{35S}2F5 1C 3 Pflanzen untersucht, indem alle mit *Multiplex*-PCR auf Präsenz der Immunglobulingene getestet wurden. Abb. III-17B zeigt die PCR-Produkte für einige dieser Pflanzen (obere Reihe der ELISA-Platte, vgl. Abb. III-17A). Regenerate, bei denen ein 320 bp-Fragment nach PCR detektiert wurde, akkumulieren die leichten Ketten (LLhh). Pflanzen mit Expression der schweren Ketten (llHH) zeigten nach der *Multiplex*-PCR lediglich das 506 bp-Fragment. Regenerate, bei denen die Fragmente beider Immunglobulingene nachgewiesen wurden (LLHH), waren identisch zu denen, die mit *Sandwich*-ELISA als antikörperexprimierend identifiziert wurden. Nach der PCR-Analyse nicht transgener Pflanzen (llhh) konnten keine Fragmente detektiert werden.

Die Verteilung der verschiedenen Genotypen der 68 fertilen Pflanzen, die als Doppelhaploide identifiziert wurden, lautete:

LLHH:	16	Pflanzen mit Akkumulation des kompletten Antikörpers	23,5%
LLhh:	18	Pflanzen mit Akkumulation der leichten Ketten	26,5%
llHH:	15	Pflanzen mit Akkumulation der schweren Ketten	22,1%
llhh:	19	Pflanzen ohne Transgen	27,9%

Die Auswertung des χ^2 -Anpassungstests zeigte keine signifikante Abweichung von einer 3:1 Verteilung (1:1:1:1, P-Wert: 0,8991).

Die Antigenbindung der exprimierten 2F5 Antikörper in Blattextrakten von Regeneraten (DH^{35S}2F5 1C 3/1, DH^{35S}2F5 1C 3/11, DH^{35S}2F5 1C 3/13) wurde mit ELISA analysiert (vgl. II.2.4.5). Für diesen Nachweis wurde in einem ersten Schritt die Konzentration der rekombinanten Antikörper in den jeweiligen Pflanzenextrakten mit *Sandwich*-ELISA

bestimmt. Beim anschließenden Antigen-ELISA wurden jeweils die gleichen Konzentrationen an Antikörper pro Well appliziert. Unterschiede in der Antigenbindung zwischen den Antikörpern aus DH-Pflanzen und der F₁-Pflanze sowie dem CHO-Standard konnten nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. III-17C).

Die Anzahl der Kopien eines Transgens beeinflusst die Menge des Genprodukts (Gendosiseffekt). Dieser Zusammenhang wurde bei der Analyse der DH-Pflanzen experimentell bestätigt. Blattextrakte (E1 und E2) von drei Regeneraten (DH^{35S}2F5 1C 3/1, DH^{35S}2F5 1C 3/11, DH^{35S}2F5 1C 3/13) sowie der entsprechenden F₁-Pflanze (^{35S}2F5 1C 3) wurden durch Western Blot analysiert (Abb. III-18).

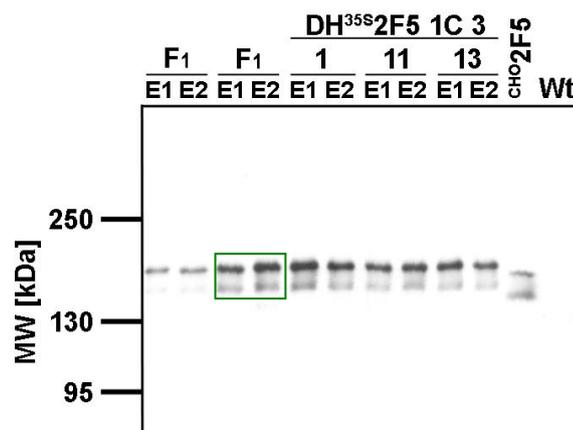


Abb. III-18: Nachweis des Gendosiseffekts bei Doppelhaploiden im Vergleich zur hemizygoten F₁-Pflanze durch Western Blot. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. Blattextrakte (E1 und E2) der F₁- und DH-Pflanzen wurden hergestellt und vergleichbare Mengen an gesamtlöslichem Protein pro Gelspur appliziert. Für die F₁-Pflanze wurde ebenfalls die doppelte Menge an Protein aufgetragen (grüne Markierung). F₁: F₁-Pflanze ^{35S}2F5 1C 3; 1, 11 bzw. 13: DH-Pflanzen DH^{35S}2F5 1C 3/1, DH^{35S}2F5 1C 3/11 bzw. DH^{35S}2F5 1C 3/13; CHO 2F5: 4 ng Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; Wt: Wildtyp *N. tabacum*; DH: Doppelhaploide; 35S: CaMV 35S-Promotor; MW: Molekulargewicht.

Gleiche Mengen an gesamtlöslichem Protein (TSP) wurden pro Gelspur aufgetragen. Bei den Blattextrakten der F₁-Pflanze wurden zusätzlich die doppelten Mengen an TSP (grüne Markierung) eingesetzt. Die hervorgehobenen Signale für den 2F5 Antikörper in den Extrakten der F₁-Pflanze wiesen eine vergleichbare Intensität zu den entsprechenden Banden der DH-Pflanzen auf. Die erhaltenen Signale, bei gleicher Menge löslichen Proteins der F₁-Pflanze, zeigten deutliche Unterschiede. Die Menge des akkumulierten Antikörpers in Blättern der DH-Pflanzen lag somit deutlich über dem Expressionsniveau, das in Blattmaterial der entsprechenden F₁-Pflanze detektiert wurde.

Weiterhin wurde die Reinerbigkeit der doppelhaploiden Pflanzen (LLHH) durch die Analyse der nachfolgenden Generation mit *Sandwich*-ELISA untersucht. Da für die Doppelhaploidenteknik ausschließlich Pflanzen mit *single locus* Insertionen beider Transgene verwendet wurden, sollten die Nachkommen der erzeugten DH-Pflanzen nicht segregieren sondern den rekombinanten Antikörper aufweisen. Nach Selbstung der DH-Pflanzen (DH^{35S}2F5 1C 3/52, DH^{35S}2F5 1C 3/53, DH^{35S}2F5 1C 3/56, DH^{35S}2F5 1C 3/61) wurden jeweils 20 Nachkommen hinsichtlich der Akkumulation des Antikörpers getestet (Abb. III-19). Alle analysierten Linien

von DH^{35S}2F5 1C aber auch von den anderen DH-Experimenten (jeweils vier Linien) zeigten in der nächsten Generation keine Spaltung.

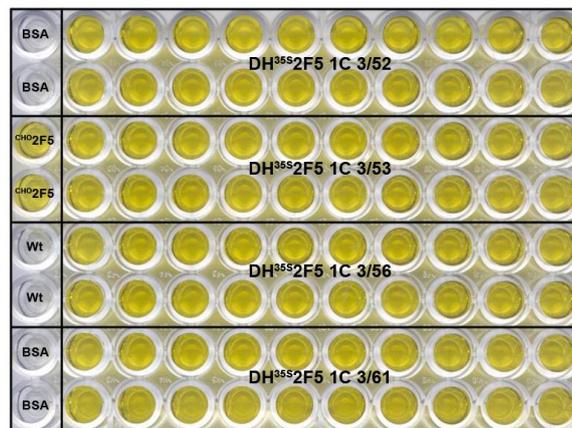


Abb. III-19: Analyse der Nachkommen doppelhaploider Pflanzen. Nach Selbstung der DH-Pflanzen (DH^{35S}2F5 1C 3/52; DH^{35S}2F5 1C 3/53; DH^{35S}2F5 1C 3/56; DH^{35S}2F5 1C 3/61) wurden jeweils 20 Nachkommen mit Protein L/ Protein A Sandwich-ELISA analysiert. BSA: BSA-Verdünnungspuffer; CHO^{2F5}: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; Wt: Wildtyp *N. tabacum*; DH: Doppelhaploide; 35S: CaMV 35S-Promotor.

Ausgehend von dem nachgewiesenen Gendosiseffekt und der Analyse der Nachkommen wird angenommen, dass die erzeugten Doppelhaploiden reinerbig sind.

Bei regenerierten DH-Pflanzen mit Expression der Immunglobulingene unter Kontrolle des samenspezifischen USP-Promotors (DH^{USP}2F5, DH^{USP}2F5_{ELP}) wurden die ELP-Fusionen der leichten und schweren Ketten nach Silberfärbung eines SDS-PAA-Gels nachgewiesen (Abb. III-20A). Vergleichbare Mengen an Samenproteinen wurden pro Gelspur aufgetragen. Die Banden für die ELP-Fusionsproteine sind nach Silberfärbung deutlich sichtbar und in der Abbildung mit Pfeilen markiert. Das durch SDS-PAGE ermittelte Molekulargewicht der ELP-Fusionen war wiederum höher als erwartet (vgl. Anhang VII.2.1). Unterschiede zwischen Pflanzen, deren Genom sich spontan verdoppelte und Pflanzen, die nach Behandlung mit Colchizin als Doppelhaploide identifiziert wurden, gab es nicht. Rekombinante Antikörper wurden durch Western Blot nachgewiesen (Abb. III-20B). Degradationsprodukte bei den ELP-Fusionen wurden, wie bei Analyse der F₁-Pflanzen mit samenspezifischer Expression (vgl. Abb. III-13D), erhalten. Vergleichbare Mengen an gesamtlöslichem Samenprotein der DH- und der entsprechenden F₁-Pflanzen wurden pro Gelspur aufgetragen. Aufgrund des Gendosiseffekts akkumulieren DH-Pflanzen mehr Immunglobulin als die jeweiligen F₁-Pflanzen.

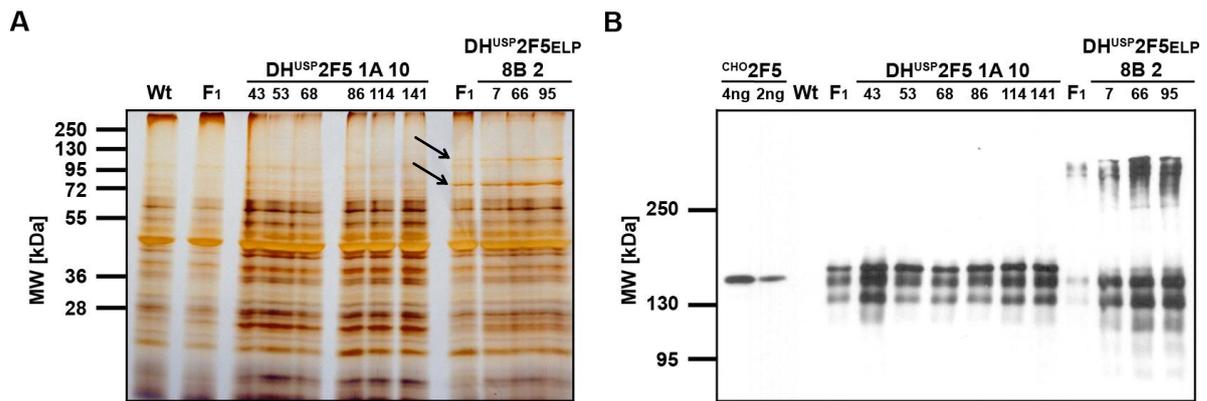


Abb. III-20: Nachweis der rekombinanten Proteine und ELP-Fusionen in Samen doppelhaploider Pflanzen. **A:** Detektion der ELP-Fusionsproteine nach Silberfärbung. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (12%) unter reduzierenden Bedingungen. Gleiche Mengen des gesamtlöslichen Proteins (30 µg) der Samenextrakte von Wildtyp *N. tabacum* (Wt), F₁-Pflanzen (^{USP}2F5 1A 10 und ^{USP}2F5ELP 8B 2) und DH-Pflanzen (DH^{USP}2F5 1A 10/43; DH^{USP}2F5 1A 10/53; DH^{USP}2F5 1A 10/68; DH^{USP}2F5 1A 10/86; DH^{USP}2F5 1A 10/114; DH^{USP}2F5 1A 10/141 sowie DH^{USP}2F5ELP 8B 2/7; DH^{USP}2F5ELP 8B 2/66; DH^{USP}2F5ELP 8B 2/95) wurden pro Gelspur appliziert. Die DH-Pflanzen 43, 53 und 68 resultieren aus Colchizinbehandlung von Haplloiden. Bei den Doppelhaploiden 86, 114 und 141 wurde eine spontane Verdopplung des Genoms beobachtet. **B:** Nachweis der 2F5 Antikörpervarianten in Samen doppelhaploider Pflanzen. Die Trennung der Proteine (10 µg TSP) erfolgte im SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. ^{CHO}2F5: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; Wt: Wildtyp *N. tabacum*; F₁: F₁-Pflanzen (^{USP}2F5 1A 10 und ^{USP}2F5ELP 8B 2); DH-Pflanzen: DH^{USP}2F5 1A 10/43, DH^{USP}2F5 1A 10/53, DH^{USP}2F5 1A 10/68, DH^{USP}2F5 1A 10/86, DH^{USP}2F5 1A 10/114, DH^{USP}2F5 1A 10/141 sowie DH^{USP}2F5ELP 8B 2/7, DH^{USP}2F5ELP 8B 2/66, DH^{USP}2F5ELP 8B 2/95. DH: Doppelhaploide; USP: USP-Promotor; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

In einem abschließenden Experiment wurden die Expressionshöhen der rekombinanten Antikörper in Samen reinerbiger DH-Pflanzen ermittelt (vgl. Anhang VII.5). Durch die Fusion aller Antikörperketten mit ELP war die Akkumulation des Immunglobulins 6-fach höher im Vergleich zu dem 2F5 ohne ELP. Auch hier muss beachtet werden, dass die Quantifizierung der Antikörper-ELP-Fusionen relativ zum Standard ohne ELP erfolgte und somit die Menge des „gesamten“ rekombinanten Proteins deutlich unterschätzt wurde (vgl. III.3).

Durch Anwendung der Doppelhaploiden-Technik konnten auf einfachem und schnellem Weg Pflanzen mit Homozygotie für beide Transgene (leichte und schwere Kette) erzeugt werden. Lediglich 92 Regenerate der F₁-Pflanze ^{35S}2F5 1C 3 wurden analysiert und 16 fertile DH-Linien identifiziert. Letztendlich wurden bei diesem DH-Experiment 172 Pflanzen (92 Regenerate + 20 x 4 DH-Nachkommen) untersucht und mindestens vier transgene, homozygote Linien mit *single locus* Insertionen der Immunglobulingene bestätigt (von vier DH-Linien wurden die Nachkommen analysiert, nicht von allen 16). Die Effizienz dieser Methode liegt somit deutlich über der der klassischen Spaltungsanalyse (vgl. III.4.1).

III.5 Charakterisierung der rekombinanten Antikörper-ELP-Fusionen

Die in Tabakblättern akkumulierten Antikörper, besonders die ELP-Fusionsproteine, wurden hinsichtlich ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften bewertet und mit den Standardantikörpern aus CHO-Zellen verglichen (^{CHO}2F5 bzw. ^{CHO}2G12, vgl. Tab. II-4). Ziel

dieser Untersuchungen war es, einen möglichen Einfluss der ELP-Fusionspartner auf die Zusammenlagerung und Faltung der kompletten Immunglobuline, auf die *N*-Glycosylierung und Funktionalität der Antikörper festzustellen und zu untersuchen.

III.5.1 Strukturelle Charakterisierung

III.5.1.1 Zusammenlagerung der einzelnen Antikörperketten zu kompletten Immunglobulin G-Molekülen

Das Zusammenlagern von leichten und schweren Ketten konnte unter Verwendung des Protein L / Protein A *Sandwich*-ELISAs mit der Identifikation antikörperexprimierender F₁-Pflanzen nachgewiesen werden. Zur Prüfung, inwieweit ein vollständiges IgG-Molekül (L₂H₂) entstand, wurden die rekombinanten Proteine im SDS-PAA-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen und anschließendem Western Blot getestet (vgl. II.2.4.3). Die Charakterisierung der affinitätsgereinigten Antikörper hinsichtlich ihrer Molekulargewichte erforderte ebenfalls die Analyse der SDS-PAA-Gele mit Coomassiefärbung und durch Western Blot. Abb. III-21 repräsentiert alle Protein A-gereinigten Immunglobuline aus Tabakblättern (^{Nt}2F5, ^{Nt}2F5LELP, ^{Nt}2F5HELP, ^{Nt}2F5ELP sowie ^{Nt}2G12, ^{Nt}2G12LELP, ^{Nt}2G12HELP, ^{Nt}2G12ELP). Für die SDS-PAA-Gele wurden die neutralisierten Elutionsfraktionen I und III der *small scale* Protein A-Affinitätsreinigungen verwendet (vgl. II.2.4.6).

Alle acht Protein A-gereinigten Immunglobuline wiesen die berechnete molare Masse auf (vgl. Tab. III-2). Die mit Coomassie gefärbten Banden der entsprechenden rekombinanten Proteine wurden durch Western Blot Analyse bestätigt. Unterschiede im Molekulargewicht der rekombinanten Antikörper konnten bei beiden verwendeten Methoden nicht gezeigt werden. Die kompletten Immunglobulin G-Moleküle scheinen vollständig intakt zu sein. Freie schwere Ketten oder Degradationsprodukte konnten durch Western Blot mit einem Fc-spezifischen Antikörper nicht nachgewiesen werden. Verunreinigungen der Protein A-Präparationen wurden ebenfalls nicht identifiziert.

Die erhaltenen Banden für die in Tabak exprimierten Antikörper ohne ELP (^{Nt}2F5, ^{Nt}2G12) unterschieden sich hinsichtlich Größe und Muster (drei Banden bei ^{Nt}2F5, zwei Banden bei ^{Nt}2G12) von den CHO-Standards (nur eine Bande). Die leicht abweichenden Molekulargewichte sind auf das Vorhandensein zusätzlicher Aminosäuren (*c-myc tag*, ER-Retentionssignal KDEL) und auf die unterschiedlichen *N*-Glycane an den schweren Ketten zurückzuführen.

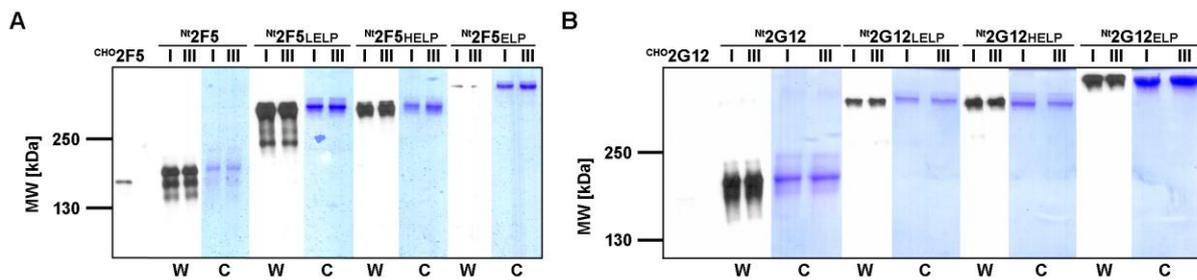


Abb. III-21: Analyse der affinitätsgereinigten Antikörpervarianten mit Coomassie® Brilliant Blue und Western Blot. Die Trennung der rekombinanten Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen. Für den Nachweis der Antikörperpräparationen (Elutionsfraktionen I und III) wurden die Gele mit Coomassie® Brilliant Blue gefärbt (C), oder die Proteine auf Nitrocellulosemembranen transferiert und durch Western Blot Analyse (W) mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Gleiche Volumina der Elutionsfraktionen wurden jeweils pro Gelspur appliziert. **A:** Analyse der 2F5 Präparationen. ^{CHO}2F5: 2 ng Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; ^{Nt}2F5: 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5LELP: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5HELP: 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5ELP: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*. **B:** Analyse der 2G12 Präparationen. ^{CHO}2G12: 2 ng Standardantikörper 2G12 aus CHO-Zellen; ^{Nt}2G12: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12LELP: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12HELP: 2G12 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12ELP: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*. ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

Der 2G12 Standardantikörper (^{CHO}2G12), der für die Western Blot Analyse als Positivkontrolle verwendet wurde (vgl. Abb. III-21B), konnte nur sehr schwach nachgewiesen werden. Bei längerer Exposition des Röntgenfilms wurde ein deutliches Signal erhalten. In der Präparation des ^{Nt}2F5LELP wurden Abbauprodukte, aufgrund einer Überentwicklung des Röntgenfilms, die für den Nachweis des ^{Nt}2F5ELP Antikörpers notwendig war, erhalten. Die Banden für ^{Nt}2F5ELP konnten eindeutig nach Coomassiefärbung der SDS-Gele identifiziert werden (vgl. Abb. III-21A).

III.5.1.2 Analyse der N-Glycane an den schweren Antikörperketten und ELP-Fusionsproteinen

Eine wichtige Aufgabe von Antikörpern liegt in der Erkennung von spezifischen Antigenen. IgG-Moleküle besitzen weiterhin noch Effektorfunktionen (Komplementaktivierung, ADCC), die eine Glycosylierung des Antikörpers voraussetzen. Auch für die Halbwertszeit eines Immunglobulins sind die N-Glycane am Fc-Teil entscheidend. N-Glycane liefern außerdem wichtige Hinweise zum Transport und Verbleib der exprimierten Proteine innerhalb der Pflanzenzelle (Übersichten bei Lerouge *et al.*, 1998 und Molinari, 2007).

Die Bezeichnung der N-Glycane im weiteren Verlauf der Dissertationsschrift orientiert sich an der Nomenklatur von ProGlycAn (www.proglycan.com) und ist im Folgenden für die verwendeten Abkürzungen kurz erklärt:

A	Galactose (Gal)
F	Fucose (Fuc)
Gn	N-Acetylglucosamin (GlcNAc)
M	Mannose (Man)
X	Xylose (Xyl)

N-Glycane vom oligo-mannosidischen Typ (OMT) werden als Man5, Man6, Man7, Man8 bzw. Man9, je nach Anzahl der vorhandenen Mannosereste, bezeichnet.

Die acht affinitätsgereinigten Antikörpervarianten wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen im SDS-PAA-Gel getrennt und mit Coomassie® Brilliant Blue gefärbt (vgl. II.2.4.3, II.2.4.4). Die Banden der entsprechenden Proteine wurden ausgeschnitten (vgl. Anhang VII.6), tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide mit LC-ESI-MS von J. Stadlmann (Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich) analysiert (vgl. II.2.4.9).

Die nachgewiesenen *N*-Glycosylierungsmuster der vier affinitätsgereinigten Varianten des Antikörpers 2F5 aus Tabakblättern (^{Nt}2F5, ^{Nt}2F5_{LELP}, ^{Nt}2F5_{HELP}, ^{Nt}2F5_{ELP}) waren vergleichbar, lediglich geringfügige qualitative Unterschiede traten auf (Abb. III-22). C-terminale ELP-Fusionen beeinflussten die *N*-Glycosylierung und somit auch den Transport und Verbleib der Antikörper in der Pflanzenzelle nicht.

Alle analysierten IgG-Moleküle besaßen vorwiegend *N*-Glycane vom oligo-mannosidischen Typ, wobei Man7 bei allen vier Varianten dominierte. Weitere oligo-mannosidische Zuckerreste, Man9, Man8, Man6 und Man5, wurden nur in geringeren Mengen detektiert.

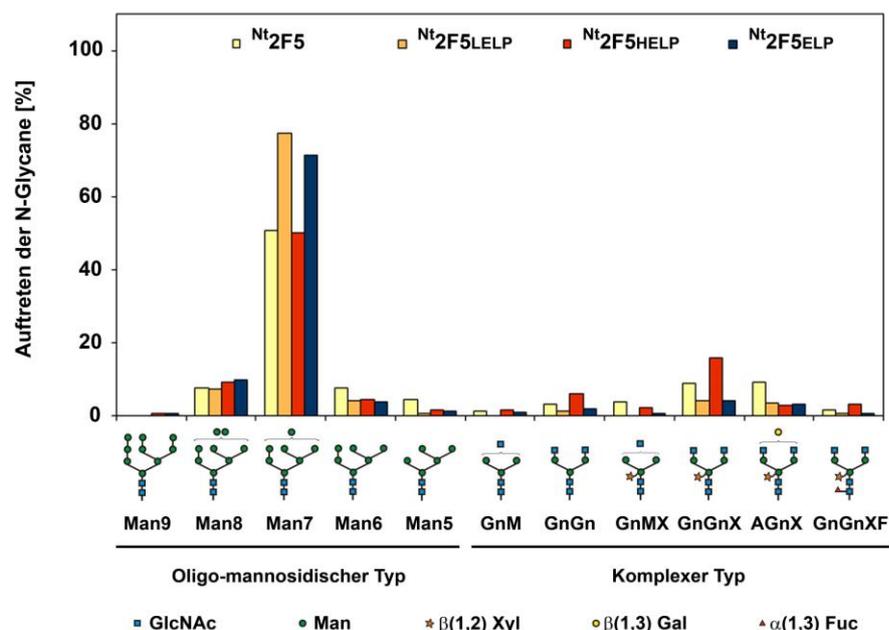


Abb. III-22: Auftreten der verschiedenen *N*-Glycane an den schweren Ketten der 2F5 Varianten aus Tabakblättern. Die relativen Häufigkeiten für das Auftreten der einzelnen Glycoformen wurden anhand der Spektren der *N*-glycosylierten Fc-Peptide der Antikörpervarianten berechnet (J. Stadlmann). Die Namen und Strukturen der *N*-Glycane basieren auf der Nomenklatur von ProGlycAn (www.proglycan.com). ^{Nt}2F5: 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5_{LELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5_{HELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5_{ELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

In allen vier Fällen konnten ebenfalls komplexe *N*-Glycane (CT, engl. *complex type*) nachgewiesen werden. Der Grund dafür könnte eine unvollständige ER-Retention sein, da eine Bildung der CT *N*-Glycane vorwiegend im Golgi-Apparat erfolgt (Übersicht bei Gomord *et al.*, 2005). Die relativen Häufigkeiten der OMT und CT *N*-Glycane der einzelnen 2F5 Varianten aus Tabakblättern sind in Tab. III-5 aufgeführt.

Tab. III-5: Auftreten der OMT und CT *N*-Glycane an den schweren Ketten der 2F5 Varianten aus Tabakblättern. OMT *N*-Glycane: *N*-Glycane vom oligo-mannosidischen Typ, CT *N*-Glycane: *N*-Glycane vom komplexen Typ; ^{Nt}2F5: 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5_{LELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5_{HELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5_{ELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Antikörpervariante	OMT <i>N</i> -Glycane	CT <i>N</i> -Glycane
^{Nt} 2F5	71%	29%
^{Nt} 2F5 _{LELP}	90%	10%
^{Nt} 2F5 _{HELP}	67%	33%
^{Nt} 2F5 _{ELP}	88%	12%

Bei den komplexen *N*-Glycanen wurde GnGnX als dominante Form detektiert. Geringere Mengen an AGnX mit einem terminalen $\beta(1,3)$ -Galactoserest wurden ebenfalls nachgewiesen. Die weiteren CT *N*-Glycane (GnM, GnGn, GnMX sowie GnGnXF) traten lediglich in einem sehr geringen Anteil auf. Quantitative Unterschiede existieren bei OMT und CT *N*-Glycanen zwischen den verschiedenen 2F5 Antikörpern (vgl. Tab. III-5). Varianten mit C-terminaler ELP-Fusion an den leichten Ketten (^{Nt}2F5_{LELP} und ^{Nt}2F5_{ELP}) wiesen einen höheren Anteil an Man7 im Vergleich zu ^{Nt}2F5 sowie ^{Nt}2F5_{HELP} auf. Dies korreliert mit dem Auftreten der CT *N*-Glycane, vornehmlich GnGnX. Die Schwankungen von Man7 werden mit dem Auftreten von GnGnX reflektiert (vgl. Abb. III-22).

Auch bei den 2G12 Varianten aus Tabakblättern (^{Nt}2G12, ^{Nt}2G12_{LELP}, ^{Nt}2G12_{HELP}, ^{Nt}2G12_{ELP}) wurden überwiegend OMT *N*-Glycane nachgewiesen. Nur ein sehr geringer Anteil der *N*-Glycane an den schweren Ketten war vom komplexen Typ (Abb. III-23) und deutete auf eine unvollständige ER-Retention hin. Man7 dominierte auch hier bei den oligo-mannosidischen Formen. Die quantitativen Unterschiede im Gehalt an Man7 und GnGnX der 2F5 Varianten wurden bei den 2G12 Immunglobulinen nicht bestätigt. Antikörpervarianten mit ELP an den schweren Ketten zeigten einen geringeren Man7 aber höheren Man8 Anteil.

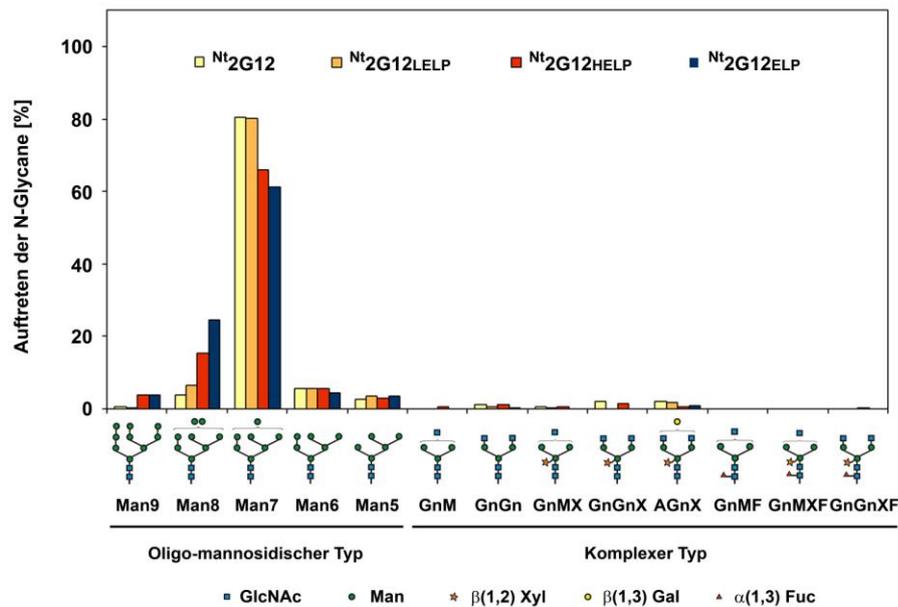


Abb. III-23: Auftreten der verschiedenen N-Glycane an den schweren Ketten der 2G12 Varianten aus Tabakblättern. Die relativen Häufigkeiten für das Auftreten der einzelnen Glycoformen wurden anhand der Spektren der N-glycosylierten Fc-Peptide der Antikörpervarianten berechnet (J. Stadlmann). Die Namen und Strukturen der N-Glycane basieren auf der Nomenklatur von ProGlycAn (www.proglycan.com). Nt2G12: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*; Nt2G12LELP: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; Nt2G12HELP: 2G12 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; Nt2G12ELP: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Im Gegensatz zu den 2F5 Immunglobulinen wurden bei allen vier 2G12 Varianten aus Tabakblättern lediglich 2 bis 6% CT N-Glycane nachgewiesen. Der Anteil an OMT N-Glycanen lag deutlich über 90% (Tab. III-6).

Tab. III-6: Auftreten der OMT und CT N-Glycane an den schweren Ketten der 2G12 Varianten aus Tabakblättern. OMT N-Glycane: N-Glycane vom oligo-mannosidischen Typ, CT N-Glycane: N-Glycane vom komplexen Typ; Nt2G12: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*; Nt2G12LELP: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; Nt2G12HELP: 2G12 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; Nt2G12ELP: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Antikörpervariante	OMT N-Glycane	CT N-Glycane
Nt2G12	94%	6%
Nt2G12LELP	97%	3%
Nt2G12HELP	94%	6%
Nt2G12ELP	98%	2%

III.5.2 Funktionelle Charakterisierung

III.5.2.1 Nachweis der Antigenbindung der in Tabak exprimierten 2F5 Antikörper mit ELISA

Die Bindung der rekombinanten Antikörper-ELP-Fusionen an das jeweilige Antigen wurde mit einem Antigen-ELISA (vgl. II.2.4.5) bestimmt. Vorexperimente zur Quantifizierung der Antikörpermenge im Pflanzenrohextrakt mit Sandwich-ELISA lassen eine Maskierung der Protein A- bzw. Protein L-Bindestellen durch die C-terminalen ELP-Fusionen vermuten

(Daten nicht gezeigt). Infolgedessen wurde dieser Immunoassay lediglich zur Quantifizierung der Antikörper ohne ELP eingesetzt. Beim anschließenden Vergleich des in Tabak exprimierten $Nt2F5$ und des CHO-Antikörpers ($CHO2F5$, vgl. Tab. II-4), hinsichtlich der Antigenbindung, wurden nur geringfügige Unterschiede nachgewiesen (Abb. III-24A).

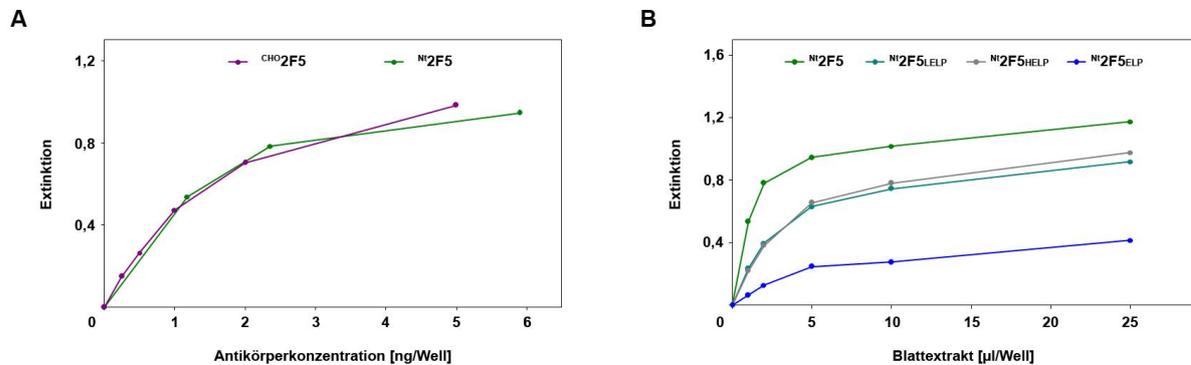


Abb. III-24: Nachweis der Antigenbindung rekombinanter 2F5 Antikörpervarianten. 96-Well-Platten wurden mit dem Peptid GGGLELDKWASL beschichtet. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem anti-Human Fc-spezifischem Antikörper-Peroxidasekonjugat. **A:** Antigenbindung der Antikörper $CHO2F5$ und $Nt2F5$. Die Menge an $Nt2F5$ im Blattextrakt wurde mit Sandwich-ELISA ermittelt und entsprechende Volumina an Rohextrakt eingesetzt. **B:** Vergleich der Antigenbindung der in Tabak exprimierten 2F5 Varianten. Gleiche Volumina an Pflanzenextrakt wurden für diesen Nachweis verwendet. Eine Quantifizierung der Expressionshöhe der rekombinanten Proteine im Pflanzenrohextrakt erfolgte nicht. $CHO2F5$: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; $Nt2F5$: 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*; $Nt2F5LELP$: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; $Nt2F5HELP$: 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; $Nt2F5ELP$: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Da der Sandwich-ELISA aufgrund der Maskierung bestimmter Antikörperregionen durch ELP bei $Nt2F5LELP$, $Nt2F5HELP$ sowie $Nt2F5ELP$ nicht angewendet werden konnte, wurde bei diesen die Bindung des Antigens in einem gesonderten Diagramm zusammen mit $Nt2F5$ dargestellt. Pflanzenextrakte mit vergleichbarem Gehalt an löslichem Gesamtprotein wurden für diese Analyse verwendet. Eine Bindung an das Antigen (Peptid mit dem ELDKWA Epitop) konnte bei allen vier Antikörpervarianten nachgewiesen werden (vgl. Abb. III-24B). Allerdings wies der $Nt2F5$ ohne ELP ein höheres Sättigungssignal im Vergleich zu den ELP-Fusionen ($Nt2F5LELP$, $Nt2F5HELP$ sowie $Nt2F5ELP$) auf. Die erhöhte Expression durch ELP-Fusion wurde in die Analyse nicht einbezogen.

Vergleichbare Ergebnisse wurden ebenfalls für Blattextrakte der 2G12 Varianten erhalten (Daten nicht gezeigt). Für einen Vergleich der Antigenbindung der in Tabakblättern exprimierten Antikörper mit den entsprechenden Immunglobulinen aus CHO-Zellen wurde die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technologie (SPR) eingesetzt, da hier die Wechselwirkung mit dem Antigen direkt ohne Verwendung von Hilfsantikörpern gemessen werden konnte. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit M. Sack (RWTH Aachen, Aachen, BRD) durchgeführt.

III.5.2.2 Funktionelle Charakterisierung der 2F5 Antikörper mit Biacore

Zur Ermittlung des Bindungsverhaltens der Protein A-gereinigten 2F5 Antikörpervarianten gegenüber Fuzeon[®], einem trimeren, synthetischen Peptid mit dem ELDKWA Epitop (vgl.

II.1.7), wurde Oberflächen-Plasmon-Resonanz verwendet (BIAcore2000 Gerät). Die hierfür eingesetzten Präparationen aus Tabakblättern (N^t 2F5, N^t 2F5_{LELP}, N^t 2F5_{HELP}, N^t 2F5_{ELP}) wurden zunächst auf Präsenz der vollständigen Antikörper, Abwesenheit freier schwerer Ketten und weiterer Degradationen durch Western Blot untersucht (Abb. III-25).

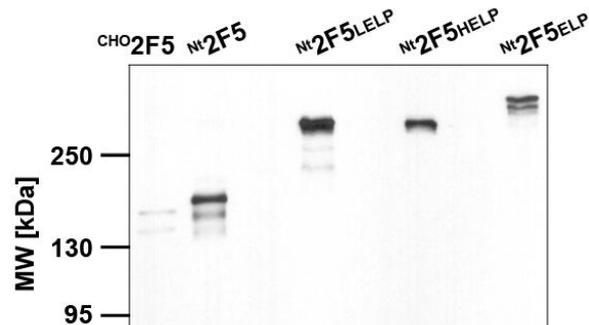


Abb. III-25: Nachweis der affinitätsgereinigten 2F5 Antikörpervarianten durch Western Blot. Die Trennung der rekombinanten Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gelel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. CHO 2F5: 2 ng Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; N^t 2F5: 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*; N^t 2F5_{LELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; N^t 2F5_{HELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; N^t 2F5_{ELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

Die Banden der verschiedenen Antikörpervarianten wurden mit dem kalkulierten Molekulargewicht nachgewiesen (vgl. Tab. III-2). Abbauprodukte oder freie schwere Ketten traten nicht auf.

Bei den Biacore-Experimenten wurden die Antikörpervarianten als Liganden verwendet und über Protein A am Sensorchip immobilisiert. Fuzeon[®] diente als Analyt und wurde über die gebundenen Antikörper injiziert. Eine monovalente Bindung von Fuzeon[®] (ein Trimer bindet an ein Paratop des IgGs) wurde beobachtet.

Zur Bestimmung der Assoziations- bzw. Dissoziationsraten von Fuzeon[®] gegenüber den Antikörpervarianten wurde der Analyt in einer geringen Konzentration eingesetzt. In Abb. III-26A sind die Bindungskurven dargestellt. Die doppelreferenzierten Kurven wurden mit einem 1:1 Bindungsmodell mit Massentransport „gefittet“. Die Bindung der einzelnen Varianten (N^t 2F5, N^t 2F5_{LELP}, N^t 2F5_{HELP}, N^t 2F5_{ELP}) sowie des Standardantikörpers (CHO 2F5, vgl. Tab. II-4) sind in der Assoziations- und Dissoziationsphase vergleichbar (Abb. III-26A). Eine optische Überlagerung der Kurven für CHO 2F5 und N^t 2F5 zeigt bereits, dass es keine signifikanten Unterschiede gibt. Abweichungen der ELP-Fusionen von diesen beiden Kurven sind in der unterschiedlichen Menge an Antikörper, die über Protein A am Sensorchip immobilisiert wurde, begründet (R_{AK} , vgl. Tab. III-7).

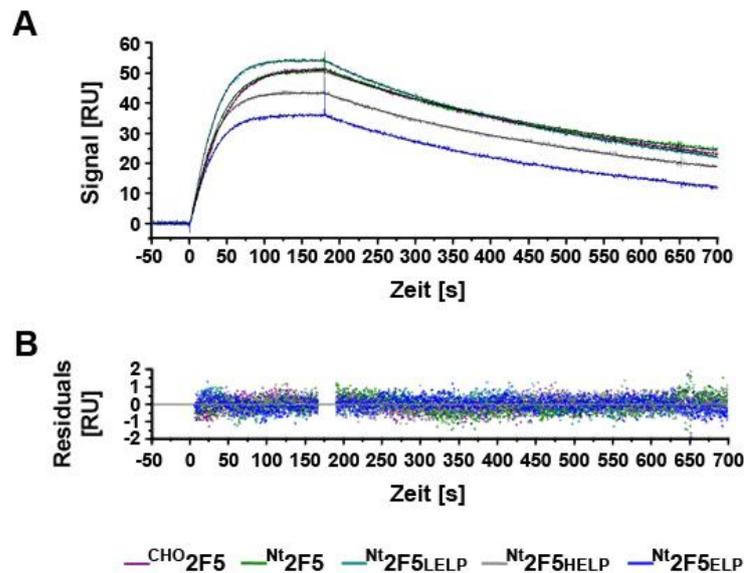


Abb. III-26: Analyse der Fuzeon®-Assoziation und -Dissoziation mit Biacore. Die 2F5 Antikörpervarianten wurden über Protein A an der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert. Der Analyt Fuzeon® wurde injiziert (6,67 nM) und die Assoziation und Dissoziation an bzw. von den Antikörpern mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz gemessen. **A:** Sensorgramme der Fuzeon®-Bindungskinetik der verschiedenen Antikörpervarianten. **B:** Verteilung der *residuals* der einzelnen Messpunkte. CHO2F5: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; Nt2F5: 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*; Nt2F5LELP: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; Nt2F5HELP: 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; Nt2F5ELP: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Die Proben wurden so eingestellt, dass vergleichbare *resonance units* (RU) für die immobilisierten Antikörper erhalten wurden (R_{AK} ist ca. 300 RU), ohne das Molekulargewicht der einzelnen Antikörper zu berücksichtigen. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Bindungskapazitäten (R_{max}) für Fuzeon®.

Die Abweichung des Fits von den Messdaten (*residuals*) wird zur Beurteilung der Güte des Fits (Anpassung) herangezogen. Eine gute Übereinstimmung zwischen Messdaten und Fit liegt vor, wenn die Abweichungen gering (± 1 RU), gleichverteilt und unsystematisch sind. Die hier beobachteten *residuals* betragen $\pm 0,5$ RU und sind in der Größenordnung des Rauschens (vgl. Abb. III-26B). Darüber hinaus wird die Güte des Fits durch den χ^2 -Wert angegeben (berechnet mit BIAevaluation Software). Dieser sollte in der Regel kleiner als 1 sein.

Die kinetischen Konstanten (*on rate* Konstante k_{on} , *off rate* Konstante k_{off} , Dissoziationskonstante K_D) der Fuzeon®-Bindung wurden mit der BIAevaluation Software ermittelt (vgl. Anhang VII.7) und sind in Tab. III-7 aufgeführt. R_{max} ist das durch den Fit bestimmte Sättigungssignal (auch Oberflächenkapazität). Die erhaltenen kinetischen Parameter für alle 2F5 Antikörpervarianten sind im Rahmen der Messgenauigkeit identisch. Nur geringfügige, nicht signifikante Unterschiede im Vergleich zum Standard wurden für die Bindung von Fuzeon® an den verschiedenen Varianten ermittelt.

Tab. III-7: Kinetische Konstanten der Fuzeon®-Bindung der 2F5 Antikörpervarianten. R_{AK} : Menge via Protein A gebundener Antikörper; k_{on} : on rate Konstante; k_{off} : off rate Konstante; K_D : Dissoziationskonstante; R_{max} : Oberflächenkapazität (Fit); $^{CHO}2F5$: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; $^{Nt}2F5$: 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*; $^{Nt}2F5_{LELP}$: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; $^{Nt}2F5_{HELP}$: 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; $^{Nt}2F5_{ELP}$: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Antikörper	R_{AK} [RU]	k_{on} [$M^{-1} s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [pM]	R_{max} [RU]	χ^2 [RU ²]
$^{CHO}2F5$	331,5	$6,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^{-3}$	348	54,1	0,11
$^{Nt}2F5$	326,5	$7,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{-3}$	277	52,9	0,16
$^{Nt}2F5_{LELP}$	390,5	$7,4 \times 10^6$	$2,3 \times 10^{-3}$	312	56,6	0,12
$^{Nt}2F5_{HELP}$	325,5	$7,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^{-3}$	281	44,9	0,13
$^{Nt}2F5_{ELP}$	315,0	$6,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^{-3}$	388	38,1	0,11

χ^2 ist ein Maß für die Abweichung des Fits von den Messwerten, Berechnung erfolgt mit Biacore Software (Biacore, 2004)

Die absolute Aktivität (A) gegenüber Fuzeon® wurde durch eine Sättigung der Paratope ermittelt und berechnet (vgl. II.2.4.8 und Abb. III-27). Im Gegensatz zu den kinetischen Konstanten konnten Unterschiede zwischen den verschiedenen Antikörpern hinsichtlich der absoluten Fuzeon®-Aktivität (A) nachgewiesen werden (Tab. III-8). Die Differenzen zwischen dem Standardantikörper ($^{CHO}2F5$) und dem $^{Nt}2F5$ aus Tabak waren gering. $^{Nt}2F5$ wies sogar eine etwas höhere absolute Fuzeon®-Aktivität auf. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Sack *et al.* (2007) wurde für $^{CHO}2F5$ nur eine absolute Aktivität von 94% erhalten. Dies kann mit der Lagerung des Standardantikörpers über einen längeren Zeitraum und daraus resultierenden Aktivitätsverlusten erklärt werden.

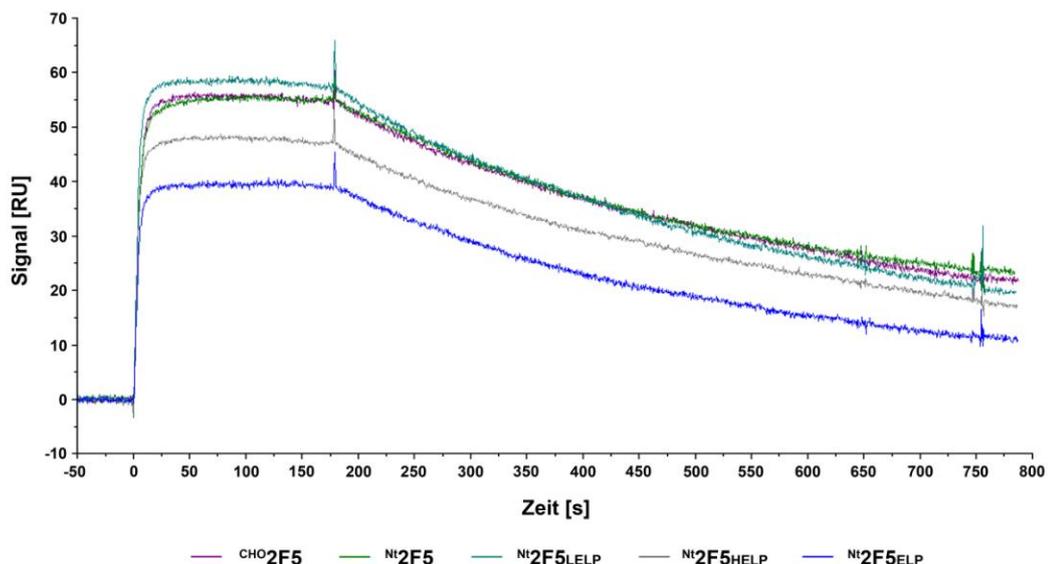


Abb. III-27: Analyse der Fuzeon®-Sättigung der über Protein A immobilisierten 2F5 Antikörpervarianten mit Biacore. Die 2F5 Antikörpervarianten wurden an der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert. Fuzeon® wurde injiziert (66,7 nM) und die Sättigung der Paratope ermittelt. $^{CHO}2F5$: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; $^{Nt}2F5$: 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*; $^{Nt}2F5_{LELP}$: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; $^{Nt}2F5_{HELP}$: 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; $^{Nt}2F5_{ELP}$: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Für die ELP-Fusionen (N^t2F5_{LELP} , N^t2F5_{HELP} sowie N^t2F5_{ELP}) wurden Sättigungssignale (R_{Fuz}) erhalten, die nach Gleichung (1) eine Aktivität von über 100% ergeben. Geringfügig größere Werte sind aufgrund von Ungenauigkeiten bei der Messung denkbar, bei höheren Werten ergeben sich jedoch Widersprüche. Diese können z. B. durch die Annahme aufgelöst werden, dass das tatsächliche Molekulargewicht des Protein A gebundenen Antikörpers geringer ist, als das aus der AS-Sequenz abgeleitete, das für die Berechnung verwendet wurde. Dies kann z. B. durch in der Präparation vorliegende Degradationsprodukte zustande kommen, die präferenziell an der Protein A-Oberfläche des Sensorchips binden könnten. Um dies zu prüfen, wurden zunächst mögliche Masseverluste der Antikörper nach Gleichung (2) kalkuliert (Tab. III-8).

Tab. III-8: Bestimmung der absoluten Fuzeon[®]-Aktivität der Antikörper und möglicher Verluste an Molekulargewicht. R_{AK} : Menge *via* Protein A gebundener Antikörper; R_{Fuz} : Sättigungssignal; A: absolute Aktivität der Antikörper gegenüber Fuzeon[®]; ΔMW_{AK} : kalkulierte Differenzen im Molekulargewicht der Antikörper; $^{CHO}2F5$: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; N^t2F5 : 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*; N^t2F5_{LELP} : 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; N^t2F5_{HELP} : 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; N^t2F5_{ELP} : 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Antikörper	R_{AK} [RU]	R_{Fuz} [RU]	A	A [%]	ΔMW_{AK} [kDa]
$^{CHO}2F5$	331,5	55,8	0,94	94	-9,4
N^t2F5	326,5	54,0	0,98	98	-3,6
N^t2F5_{LELP}	390,5	59,0	1,35	135	63,0
N^t2F5_{HELP}	325,5	48,5	1,33	133	60,6
N^t2F5_{ELP}	315,0	40,0	1,52	152	111,4

Für die ELP-Fusionen liegen die Molekulargewichtsdifferenzen im Bereich von ca. 60 bis 111 kDa und sollten durch Western Blot eindeutig nachweisbar sein. Die erhaltenen Unterschiede können durch das Fehlen von Antikörperketten und somit dem Vorhandensein unvollständiger IgGs und/oder der Abwesenheit von ELP-Fusionen erklärt werden. Zur Bestätigung putativer Masseverluste wurden die über Protein A immobilisierten Antikörper-ELP-Fusionen vom Sensorchip mit 30 mM HCl eluiert, neutralisiert, konzentriert (vgl. II.2.4.8) und im Vergleich zu den affinitätsgereinigten Proben durch Western Blot analysiert (Abb. III-28).

Der Vergleich der verwendeten Antikörperpräparationen (P) mit den eluierten Proben (R) zeigt keine Unterschiede im Molekulargewicht der einzelnen Varianten, ein Masseverlust oder eine präferenzielle Bindung unvollständiger Antikörper-ELP-Varianten an die Protein A-Oberfläche kann deshalb eindeutig ausgeschlossen werden. Weitere Erklärungsmöglichkeiten für die erhaltenen Ergebnisse sind das optische Verhalten der ELPs sowie die Orientierung der ELP-Fusionen in der Dextranmatrix (vgl. IV).

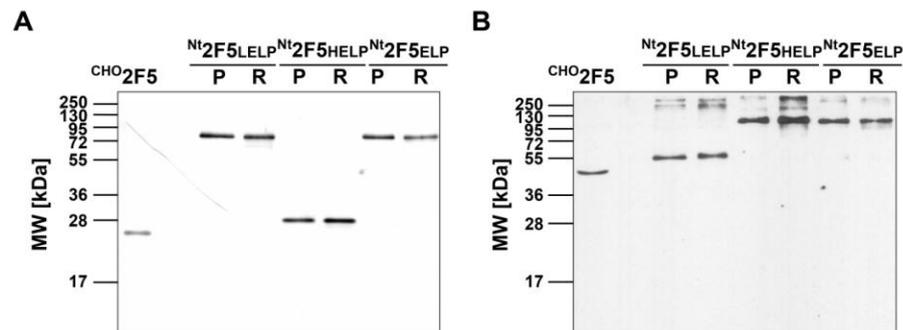


Abb. III-28: Nachweis der Vollständigkeit der 2F5 Antikörpervarianten nach Elution von der Protein A-Oberfläche des Biacore-Sensorchips. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (12%) unter reduzierenden Bedingungen. **A:** Detektion der leichten Ketten und ELP-Fusionen mit einem anti-Human *kappa light chain* Antikörper und NBT/BCIP-Färbung. **B:** Nachweis der schweren Ketten und ELP-Fusionen durch einen anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. CHO2F5: 2 ng Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; N^t2F5LELP: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; N^t2F5HELP: 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; N^t2F5ELP: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperringen aus *N. tabacum*; P: Protein A-gereinigte Antikörpervariante; R: eluierte Antikörperpräparation vom Biacore-Sensorchip; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

III.5.2.3 Funktionelle Charakterisierung der 2G12 Antikörper mit Biacore

Oberflächen-Plasmon-Resonanz wurde ebenfalls zur Beurteilung der affinitätsgereinigten 2G12 Antikörper aus Tabakblättern (N^t2G12, N^t2G12LELP, N^t2G12HELP, N^t2G12ELP) eingesetzt (vgl. II.2.4.8). Die Integrität der verwendeten 2G12 Präparationen wurde wiederum durch Western Blot bestätigt, d. h. die Anwesenheit grösserer Mengen von Degradationsprodukten bzw. von unvollständigen Antikörpern oder einzelnen schweren Ketten wurde ausgeschlossen (Abb. III-29A).

In einem Vorversuch wurde zunächst mittels ELISA gezeigt, dass der pflanzlich exprimierte 2G12 ohne ELP gegenüber dem CHO2G12 eine vergleichbare Antigenbindung aufweist (Abb. III-29B). Für die rekombinanten ELP-Fusionen aus Tabak wurden diese Analysen nicht durchgeführt, da der ELISA aus zur Zeit noch nicht genau bekannten Gründen durch die elastinähnlichen Polypeptide beeinträchtigt wird. Vermutlich kommt es durch die ELPs zur Maskierung des Antikörpers, wodurch die Bindung des sekundären Antikörpers verhindert und eine deutlich niedrigere Extinktion erhalten wird (vgl. III.5.2.1).

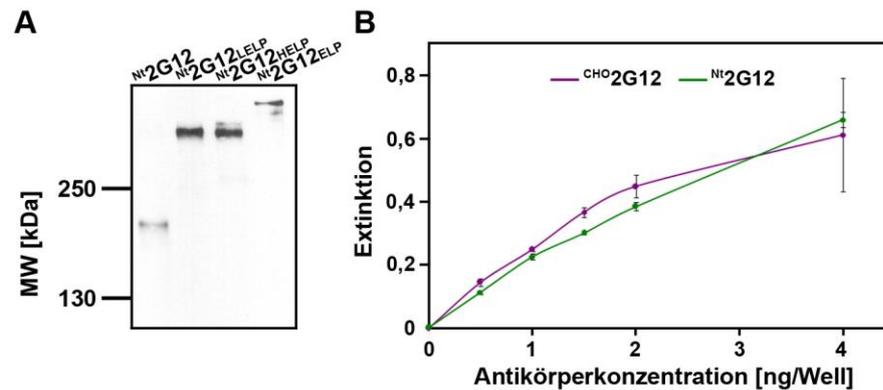


Abb. III-29: Evaluierung der Protein A-gereinigten rekombinanten 2G12 Antikörpervarianten für Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse. A: Nachweis der gereinigten Antikörper durch Western Blot. Die Trennung der rekombinanten Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit dem anti-c-myc Antikörper. ^{Nt}2G12: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12_{LELP}: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12_{HELP}: 2G12 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12_{ELP}: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht. **B:** Nachweis der Antigenbindung des rekombinanten 2G12 Antikörpers mit ELISA. 96-Well-Platten wurden mit HIV-1_{BaL} gp120 beschichtet. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem anti-Human Fc-spezifischem Antikörper-Peroxidasekonjugat. Gleiche Konzentrationen des Protein A-gereinigten ^{Nt}2G12 und des ^{CHO}2G12 wurden eingesetzt. ^{CHO}2G12: Standardantikörper 2G12 aus CHO-Zellen; ^{Nt}2G12: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*.

Zur Ermittlung der HIV-1_{BaL} gp120-Bindungskinetiken wurden die affinitätsgereinigten 2G12 Antikörpervarianten (^{Nt}2G12, ^{Nt}2G12_{LELP}, ^{Nt}2G12_{HELP}, ^{Nt}2G12_{ELP}) und der CHO-Standard über Protein A an der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert und das Antigen, HIV-1_{BaL} gp120, als Analyt injiziert. Signale der Referenzzelle wurden subtrahiert. Für die Bestimmung der kinetischen Konstanten (*on rate* Konstante k_{on} , *off rate* Konstante k_{off} , Dissoziationskonstante K_D) der Antigenbindung wurden die einzelnen Kurven einem 1:1 Langmuir-Modell angepasst. Sie sind in Abb. III-30 zusammen mit den *residuals* dargestellt.

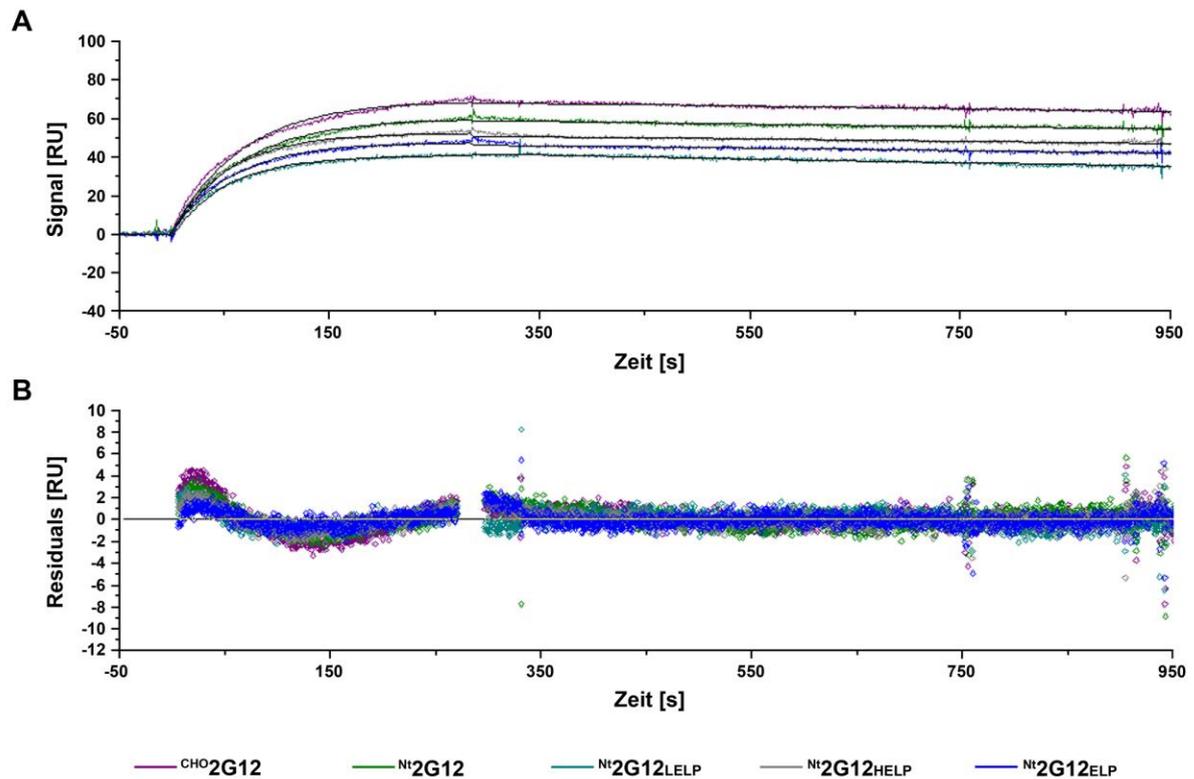


Abb. III-30: Analyse der HIV-1_{BaL} gp120-Bindung der 2G12 Antikörpervarianten mit Biacore. Die 2G12 Antikörpervarianten wurden über Protein A an der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert. Das Antigen wurde injiziert (150 nM) und die Assoziation sowie Dissoziation an bzw. von den Antikörpern mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz gemessen. **A:** Sensorgramme der gp120-Bindungskinetik der verschiedenen Antikörpervarianten. **B:** Verteilung der *residuals* der einzelnen Messpunkte. ^{CHO}2G12: Standardantikörper 2G12 aus CHO-Zellen; ^{N^t}2G12: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*; ^{N^t}2G12LELP: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; ^{N^t}2G12HELP: 2G12 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; ^{N^t}2G12ELP: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Die errechneten Werte für k_{on} , k_{off} und K_D der Varianten ^{N^t}2G12, ^{N^t}2G12HELP und ^{N^t}2G12ELP sind mit den entsprechenden Werten des Standardantikörpers (^{CHO}2G12) vergleichbar (Tab. III-9). Im Rahmen der Messgenauigkeit sind die kinetischen Parameter des ^{N^t}2G12 identisch mit den Werten des ^{CHO}2G12. Geringfügige Unterschiede im Bindungsverhalten (siehe k_{off}) wies lediglich ^{N^t}2G12LELP auf. Die ELP-Fusionen als Ursache sind hierfür eher unwahrscheinlich, da sich eine verminderte Antigenbindung in der k_{on} bemerkbar gemacht hätte. Die Unterschiede des ^{N^t}2G12LELP können mit der Qualität der Antikörperpräparation erklären werden.

Die berechneten χ^2 -Werte der 2G12 Fits (Tab. III-9) sind größer, als diejenigen bei den 2F5 Abschätzungen (vgl. Tab. III-7) und weisen auf geringfügige Abweichungen der berechneten und der experimentell bestimmten Bindungskurven hin. Die *residuals* dieser Messungen lagen für die Dissoziation im Bereich von +/- 2 RU und sind ebenfalls größer als bei den 2F5 Varianten. Stärkere Schwankungen traten besonders in den Assoziationsphasen auf.

Tab. III-9: Kinetische Konstanten der gp120-Bindung der 2G12 Antikörpervarianten. R_{AK} : Menge *via* Protein A gebundener Antikörper; k_{on} : *on rate* Konstante; k_{off} : *off rate* Konstante; K_D : Dissoziationskonstante; R_{max} : Oberflächenkapazität (Fit); $^{CHO}2G12$: Standardantikörper 2G12 aus CHO-Zellen; $^{Nt}2G12$: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*; $^{Nt}2G12_{LELP}$: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; $^{Nt}2G12_{HELP}$: 2G12 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; $^{Nt}2G12_{ELP}$: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Antikörper	R_{AK} [RU]	k_{on} [$M^{-1} s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [nM]	R_{max} [RU]	χ^2 [RU ²]
$^{CHO}2G12$	163	$1,00 \times 10^5$	$1,01 \times 10^{-4}$	1,01	69,6	1,31
$^{Nt}2G12$	172	$0,99 \times 10^5$	$1,06 \times 10^{-4}$	1,07	59,9	1,05
$^{Nt}2G12_{LELP}$	168	$1,26 \times 10^5$	$2,53 \times 10^{-4}$	2,01	42,4	0,64
$^{Nt}2G12_{HELP}$	166	$1,22 \times 10^5$	$1,20 \times 10^{-4}$	0,98	51,5	0,58
$^{Nt}2G12_{ELP}$	166	$1,14 \times 10^5$	$1,41 \times 10^{-4}$	1,24	47,0	0,48

χ^2 ist ein Maß für die Abweichung des Fits von den Messwerten, Berechnung erfolgt mit Biacore Software (Biacore, 2004)

Eine Absättigung der Paratope der 2G12 Antikörper mit dem Analyt wurde nicht erreicht. Die Aktivitäten (α) der verschiedenen rekombinanten Immunglobuline zum HIV-1_{BaL} gp120 wurden deshalb relativ im Vergleich zum Standardantikörper angegeben (vgl. II.2.4.8 und Tab. III-10).

Tab. III-10: Abschätzung der relativen Aktivität der 2G12 Antikörperpräparationen gegenüber HIV-1_{BaL} gp120. R_{AK} : Menge *via* Protein A gebundener Antikörper; $R(t=310 s)$: Signal bei $t=310 s$; α : relative Aktivität der Antikörper gegenüber gp120; ΔMW_{AK} : kalkulierte Differenzen im Molekulargewicht der Antikörper; $^{CHO}2G12$: Standardantikörper 2G12 aus CHO-Zellen; $^{Nt}2G12$: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*; $^{Nt}2G12_{LELP}$: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; $^{Nt}2G12_{HELP}$: 2G12 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; $^{Nt}2G12_{ELP}$: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Antikörper	R_{AK} [RU]	$R(t=310 s)$ [RU]	α	α [%]	ΔMW_{AK} [kDa]
$^{CHO}2G12$	163	68,7	1,00	100	0,0
$^{Nt}2G12$	172	60,0	0,88	88	-19,7
$^{Nt}2G12_{LELP}$	168	40,1	0,91	91	-21,3
$^{Nt}2G12_{HELP}$	166	51,7	1,19	119	45,3
$^{Nt}2G12_{ELP}$	166	47,8	1,48	148	153,2

Trotz nahezu identischer Kinetiken der $^{Nt}2G12$ -Präparationen wiesen diese unterschiedliche relative Aktivitäten auf. Unter der Annahme, dass der $^{CHO}2G12$ vollständig aktiv ist ($\alpha = 100\%$), wurden für die Präparationen $^{Nt}2G12_{HELP}$ und $^{Nt}2G12_{ELP}$ relative Aktivitäten von über 100% geschätzt. Eine Ausnahme war wiederum $^{Nt}2G12_{LELP}$ mit einer relativen Aktivität von 88%.

Im Gegensatz zur Aktivitätsbestimmung der 2F5 Präparationen (vgl. Tab. III-8) war die Situation für die 2G12 Varianten komplizierter, da das Molekulargewicht des Analyts (HIV-1_{BaL} gp120) nicht exakt definiert war. Das Vorhandensein der *N*-Glycane am gp120 (etwa 50% der molaren Masse von gp120, die V3-Domäne ist als einzige der variablen Regionen nicht glycosyliert) führt außerdem zu dessen verstärkter Heterogenität. Unter

Bezug auf die Ergebnisse der 2F5 Varianten könnten putative Masseverluste (vgl. Tab. III-10) die geschätzten relativen Aktivitäten von über 100% erklären. Die Analyse der eingesetzten 2G12 Präparationen durch Western Blot schließt dies jedoch, genau wie bei den 2F5 Varianten, eindeutig aus (vgl. Abb. III-29). Weitere Erklärungsmöglichkeiten (gerichtete Orientierung, optisches Verhalten) sind, wie auch schon für die 2F5 Antikörper, in Betracht zu ziehen.

Mit der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technologie wurden für alle pflanzlich exprimierten Antikörper nahezu identische Bindungskinetiken des jeweiligen Antigens ermittelt. Die Unterschiede zu den entsprechenden Standardantikörpern aus CHO-Zellen waren sehr gering. Somit wurde sicher gestellt, dass die Antikörperpräparationen keine Degradationsprodukte bzw. unvollständige Antikörpern oder einzelne schwere Ketten aufweisen. Für eine Bestimmung der Bindungsaktivitäten der jeweiligen Antikörper-ELP-Fusionen ist diese Methode jedoch weniger geeignet. Die entsprechenden Gründe hierfür werden im Diskussionsteil näher betrachtet.

III.5.2.4 *In vitro* HIV-Neutralisationsfähigkeit der rekombinanten Antikörper

Die Fähigkeit der pflanzlich exprimierten Antikörper und ELP-Fusionen das HI-Virus zu neutralisieren, wurde unter Verwendung eines Syncytieninhibierungstests bei der Firma POLYMUN Scientific Immunbiologische Forschung GmbH (Wien, Österreich) untersucht (vgl. II.2.5.1).

Ein Syncytium ist eine mehrkernige Zelle und entsteht u. a. bei der HIV-Infektion. Während des Infektionsprozesses werden virale Proteine, die das Virus für den Zelleintritt benötigt, zur Oberfläche der Wirtszelle transportiert. Dies kann zur Verschmelzung mit den benachbarten Zellen und somit zur Bildung eines Syncytiums führen. Das Auftreten von mehr als einem Syncytium pro Reaktionsgefäß (Well) wurde bei diesem Test als positive Infektion gewertet und die IC_{50} der Antikörperpräparationen sowie des CHO-Standards berechnet. Der IC_{50} -Wert gibt die Konzentration des Antikörpers an, die nötig ist, um das HI-Virus *in vitro* zu 50% zu blockieren.

Die *in vitro* HIV-1-Neutralisationsfähigkeit (oder *in vitro* Aktivität) der in Tabak exprimierten Antikörpervarianten wurde von G. Stiegler (POLYMUN) analysiert. Für sämtliche 2F5 Antikörper-ELP-Fusionen ($^{Nt}2F5_{LELP}$, $^{Nt}2F5_{HELP}$ sowie $^{Nt}2F5_{ELP}$) konnte keine *in vitro* Aktivität nachgewiesen werden. Die IC_{50} des $^{Nt}2F5$ aus Tabakblättern betrug 19,31 $\mu\text{g/ml}$. Der Standardantikörper $^{CHO}2F5$ zeigte eine IC_{50} von 2,21 $\mu\text{g/ml}$ und lag somit eindeutig unter dem Antikörper aus Pflanzen. Zur Klärung der deutlich schlechteren *in vitro* Neutralisation des $^{Nt}2F5$ wurden beide rekombinanten Antikörper mit ELISA hinsichtlich ihrer Antigenbindung verglichen. Signifikante Unterschiede konnten mit dem Immunoassay nicht nachgewiesen werden (Abb. III-31).

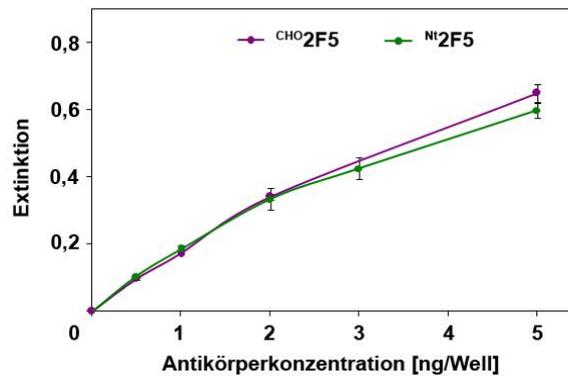


Abb. III-31: Vergleich der Antigenbindung rekombinanter 2F5 Antikörper. 96-Well-Platten wurden mit dem Peptid GGGLELDKWASL beschichtet. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem anti-Human Fc-spezifischem Antikörper-Peroxidasekonjugat. Die Konzentration des affinitätsgereinigten Nt2F5 wurde mit Sandwich-ELISA unter Verwendung des CHO-Standards bestimmt. CHO2F5: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; Nt2F5: 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*.

Die vier 2G12 Antikörper aus Tabakblättern wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer *in vitro* Aktivität untersucht. Eine Konzentrationsbestimmung der Protein A-gereinigten Antikörper erfolgte durch semi-quantitativen Western Blot und ist im Anhang erläutert (vgl. VII.8). Bei allen vier Antikörpern konnte die *in vitro* Neutralisation des HIV-1 Laborstamms RF nachgewiesen werden (Tab. III-11).

Tab. III-11: *In vitro* Aktivität der 2G12 Antikörper. CHO2G12: Standardantikörper 2G12 aus CHO-Zellen; Nt2G12: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*; Nt2G12LELP: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; Nt2G12HELP: 2G12 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; Nt2G12ELP: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid; IC₅₀-Wert: Konzentration des Antikörpers, um das HI-Virus *in vitro* zu 50% zu blockieren.

Antikörper	IC ₅₀ [µg/ml]	Verhältnis*
CHO2G12	3,71	1,00
Nt2G12	0,93	3,99
Nt2G12LELP	18,79	0,20
Nt2G12HELP	5,24	0,71
Nt2G12ELP	29,44	0,13

Virus: HIV-1 RF

Titer: 10^{2,14} TCID₅₀/ml

*Verhältnis aus IC₅₀ von CHO2G12 zu IC₅₀ der jeweiligen Antikörpervariante aus Tabakblättern

Die verschiedenen 2G12 Varianten inhibierten HIV *in vitro* in unterschiedlicher Weise. Immunglobuline mit C-terminaler ELP-Fusion an den leichten Ketten (Nt2G12LELP und Nt2G12ELP) besaßen, im Vergleich zu CHO2G12, eine 5- bzw. 8-fach höhere IC₅₀. Bei der Antikörpervariante mit ELP an beiden schweren Ketten (Nt2G12HELP) wurde eine geringfügig schlechtere Neutralisation (1,4-fach), im Vergleich zum Standard, nachgewiesen. Die IC₅₀ des Nt2G12 lag deutlich unter der des Standards (CHO2G12). Dieser Antikörper zeigte eine 4-fach bessere Neutralisation des HIV-Laborstamms RF.

Trotz vergleichbarer kinetischer Parameter (k_{on}, k_{off}, K_D) der Antigenbindung der pflanzlich exprimierten Antikörper im Vergleich zu dem jeweiligen Standard aus CHO-Zellen wurden

Unterschiede in der Virusneutralisation erhalten (Ausnahmen ^{Nt}2G12 und ^{Nt}2G12_{HELP}). Die Ursachen für diese Differenzen werden im Diskussionsteil näher erläutert.

III.6 Immunlokalisierung rekombinanter Antikörper und ELP-Fusionen in Samen transgener Tabakpflanzen

Die Lokalisation der rekombinanten Proteine in Samen transgener Tabakpflanzen wurde in Zusammenarbeit mit E. Arcalis (RWTH Aachen, Aachen, BRD) untersucht.

Für die Immunlokalisierung des 2F5 Antikörpers und der ELP-Fusionen in Tabaksamen wurden doppelhaploide Pflanzen mit Expression der Immunglobulingene unter Kontrolle des USP-Promotors verwendet (DH^{USP}2F5, DH^{USP}2F5_{ELP}). Ultradünnschnitte von unreifen sowie reifen Samen dieser transgenen Pflanzen und des Wildtyps wurden angefertigt. Zur Erhaltung der Antigenität des Gewebes erfolgte eine relativ milde Fixierung des Samenmaterials. Für die Markierung der rekombinanten Proteine wurde der anti-c-myc Antikörper und ein sekundärer Antikörper mit kolloidalem Gold verwendet. Zur Auswertung wurde die Elektronenmikroskopie eingesetzt (vgl. II.2.5.2).

Der anti-c-myc Antikörper markiert nicht nur vollständige Immunglobuline, sondern auch freie Antikörperketten bzw. deren ELP-Fusionen, da alle Expressionskassetten mit dem c-myc *tag* versehen wurden (vgl. Abb. III-1). Ein erfolgreiches Zusammenlagern fast aller Antikörperketten zu kompletten Immunglobulinmolekülen in Samen wurde durch Western Blot nachgewiesen (vgl. Abb. III-20B). Aufgründessen wurde angenommen, dass die Mehrheit der detektierten Signale für die kompletten Antikörper stand.

Die rekombinanten Proteine wurden durch Immunmarkierung in unreifen Samen nachgewiesen (Abb. III-32). Unterschiede in der Abundanz der Goldpartikel sind beim Vergleich von Immunglobulinen mit und ohne ELP erkennbar. Antikörper mit ELP-Fusionen an allen vier Ketten (Abb. III-32B) zeigen eine stärkere Immunmarkierung als nicht fusionierte Proteine (Abb. III-32A). Rekombinante Antikörper wurden überwiegend im rauhen ER lokalisiert. Dies bestätigt die Retention der Proteine in diesem Kompartiment.

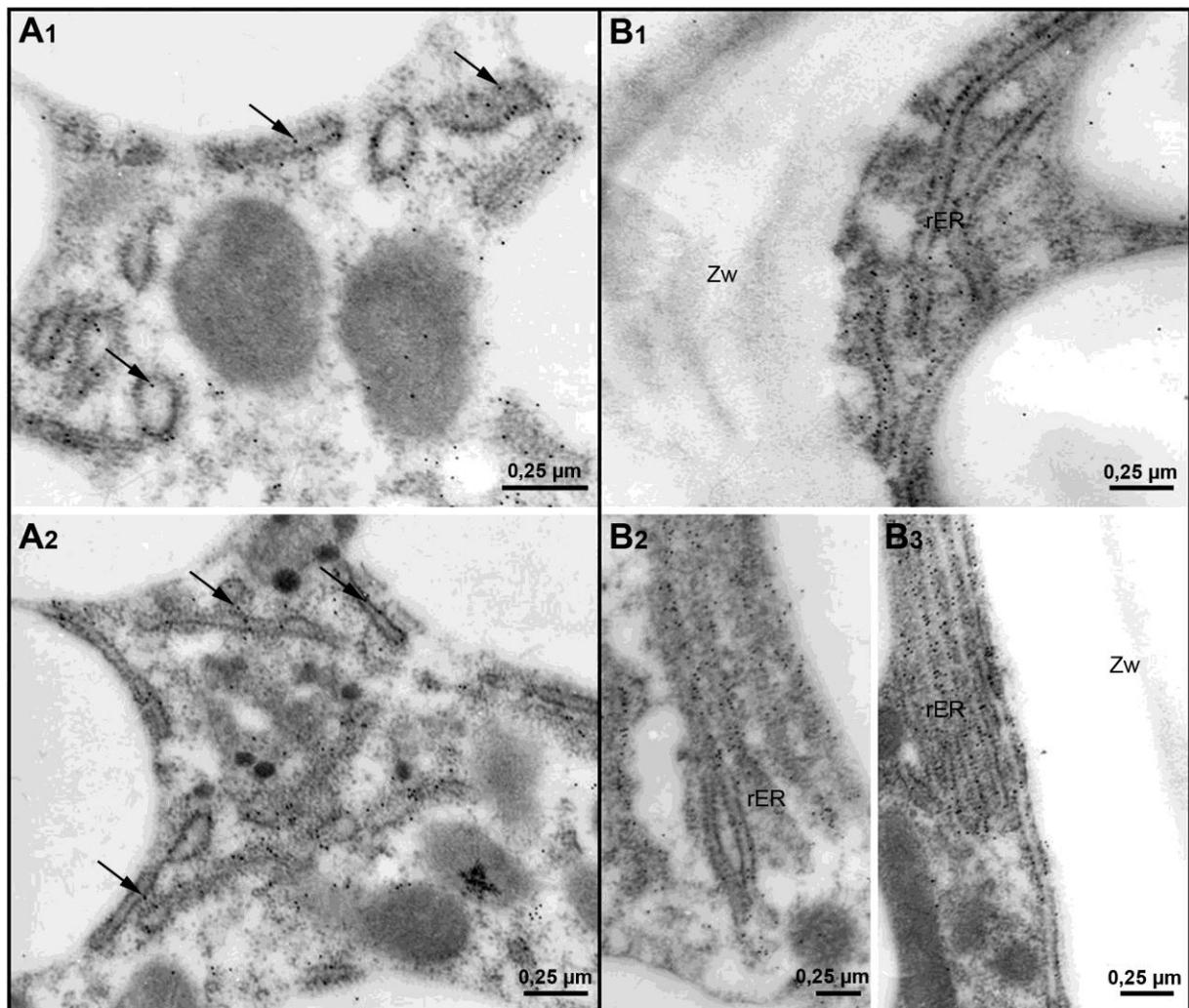


Abb. III-32: Immunlokalisierung rekombinanter 2F5 Antikörper und ELP-Fusionen in unreifen Tabaksamen. Die Lokalisation der rekombinanten Antikörper in Samen transgener Tabakpflanzen erfolgte durch Immunogoldfärbung und Elektronenmikroskopie. Die Goldmarkierungen (schwarze Punkte) sind durch Pfeile gekennzeichnet. **A:** Lokalisation der rekombinanten $Nt2F5$ in unreifen Samen der DH-Pflanze $DH^{USP}2F5\ 1A\ 10/43$. Zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen sind abgebildet. Maßstab: $0,25\ \mu m$. **B:** Lokalisation der rekombinanten $Nt2F5_{ELP}$ in unreifen Samen der DH-Pflanze $DH^{USP}2F5_{ELP}\ 8B\ 2/95$. Drei elektronenmikroskopische Aufnahmen sind abgebildet. Zw: Zellwand; rER: rauhes oder granuläres ER; Maßstab: $0,25\ \mu m$. DH: doppelhaploide Pflanze; USP: USP-Promotor; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

In reifen Samen konnten nur Antikörper-ELP-Fusionen lokalisiert werden (Abb. III-33). Rekombinante 2F5 ELP-Fusionen wurden im Endosperm im Bereich um die *lipid bodies* (Lb) detektiert (Abb. III-33A). Im Embryo konnten Goldpartikel beim rauhen ER (Abb. III-33B) und im Cytoplasma identifiziert werden (Abb. III-33C, Abb. III-33D). In *protein storage vacuoles* (PSV) und Zellwänden wurden die rekombinanten Proteine nicht nachgewiesen.

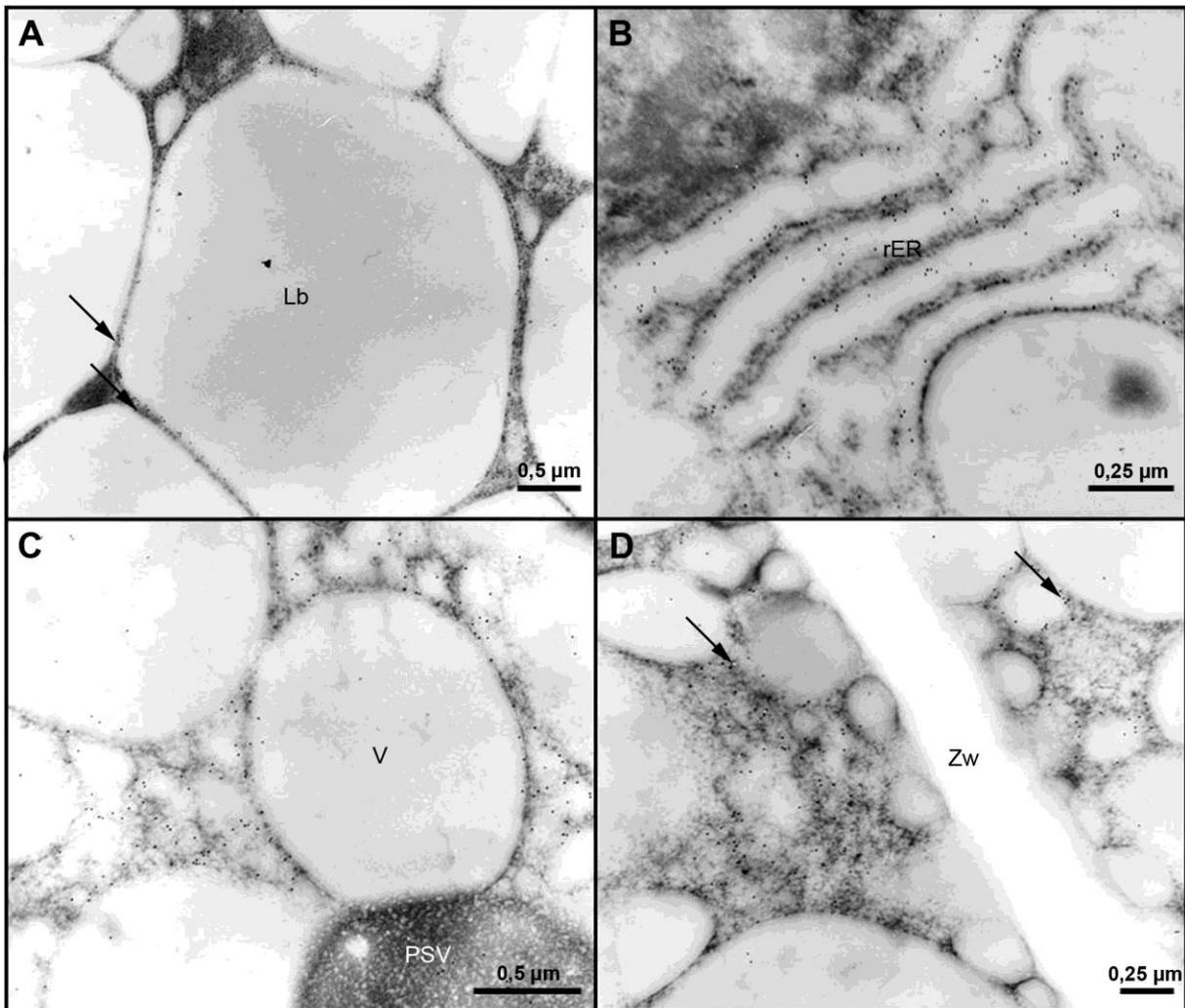


Abb. III-33: Immunlokalisierung rekombinanter 2F5 Antikörper-ELP-Fusionen in reifen Tabaksamen. Die Lokalisation der rekombinanten Antikörper-ELP-Fusionen in Samen transgener Tabakpflanzen ($DH^{USP}2F5_{ELP} 8B 2/95$) erfolgte durch Immunogoldfärbung und Elektronenmikroskopie. Die Goldmarkierungen (schwarze Punkte) sind durch Pfeile gekennzeichnet. **A:** Lokalisation der rekombinanten N^t2F5_{ELP} im Endosperm. Lb: engl. *lipid bodies*; Maßstab: 0,5 µm. **B:** Lokalisation der rekombinanten N^t2F5_{ELP} im Embryo. rER: rauhes oder granuläres ER; Maßstab: 0,25 µm. **C:** Lokalisation der rekombinanten N^t2F5_{ELP} im Embryo. V: Vakuole; PSV: engl. *protein storage vacuole*; Maßstab: 0,5 µm. **D:** Lokalisation der rekombinanten N^t2F5_{ELP} im Embryo. Zw: Zellwand; Maßstab: 0,25 µm. DH: doppelhaploide Pflanze; USP: USP-Promotor; ELP: elastinähnliches Polypeptid.

Die ER-Retention der rekombinanten Antikörper mit und ohne ELP in unreifen Tabaksamen wurde anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt. Das deutlich niedrigere Expressionsniveau des Immunglobulins 2F5 ohne ELP im Vergleich zur Variante mit ELP an allen vier Antikörperketten kann eine mögliche Ursache für das Fehlen entsprechender Signale sein (vgl. Anhang VII.5). Antikörper-ELP-Fusionen wurden im ER aber auch im Cytoplasma des Embryos bzw. des Endosperms detektiert. Eine mögliche Erklärung für die Lokalisation der rekombinanten Proteine im Cytoplasma ist zum einen das Anfertigen der Ultradünnschnitte ohne dass typische ER-Strukturen (verzweigtes Membrannetzwerk) direkt getroffen wurden. Zum anderen kann das Ergebnis auch durch Immunkomplexe erklärt werden, die aufgrund der Markierung entstehen (anti-c-myc Primäantikörper und

goldmarkierter Sekundärantikörper). Diese besitzen eine bestimmte Größe und können somit zu Signalen führen, die etwas entfernt vom ER liegen.

Schnitte unreifer und reifer Samen des Wildtyps *N. tabacum* weisen nach Immunfärbung keine signifikanten Markierungen auf (Abb. III-34).

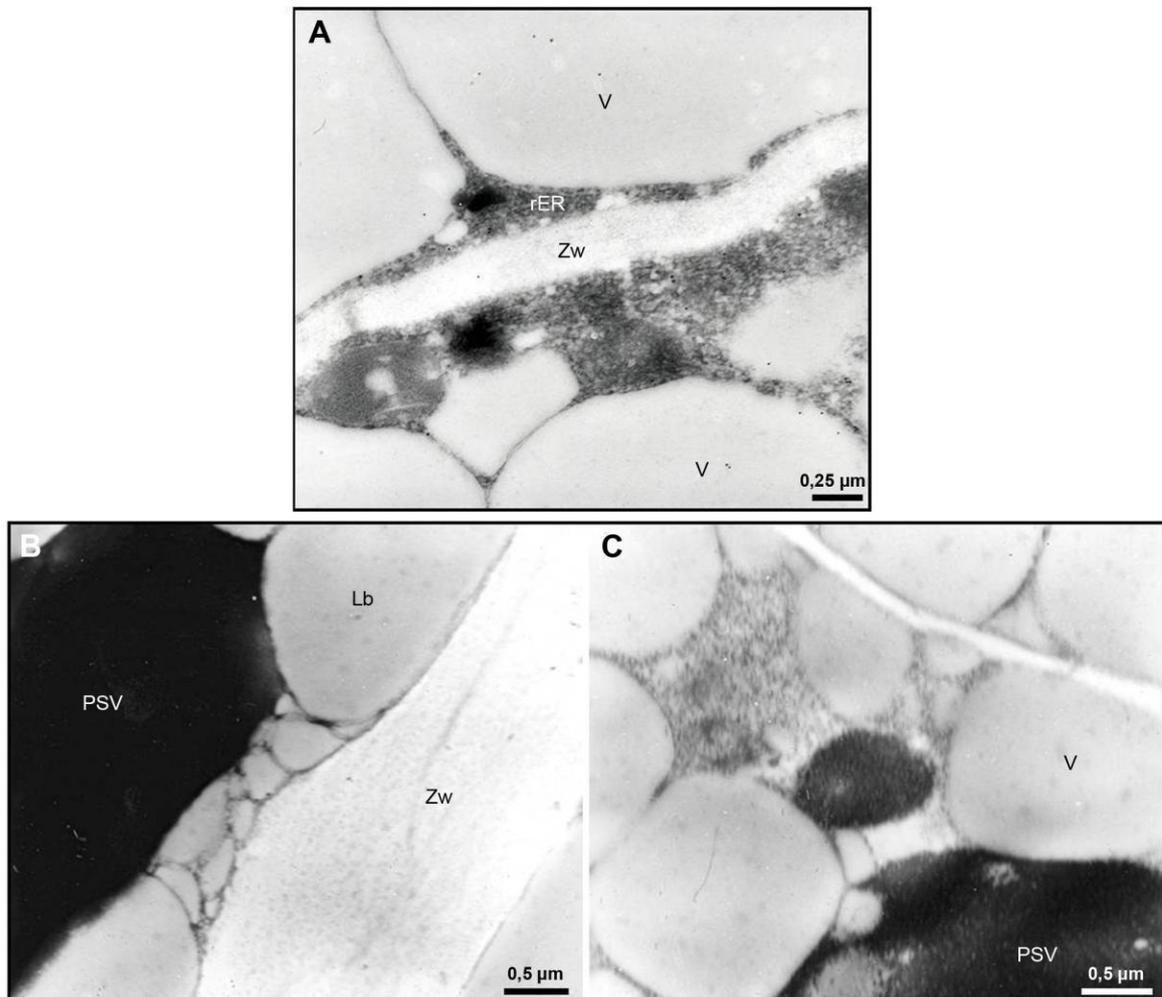


Abb. III-34: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Samen des Wildtyps nach Immunogoldmarkierung. Als Negativkontrolle wurden Ultradünnschnitte von Samen des Wildtyps (*N. tabacum*) angefertigt, mit anti-c-myc Antikörper und anschließend mit dem Goldkonjugat inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach Immunogoldfärbung an einem Elektronenmikroskop. **A:** Immunogoldfärbung von unreifen Tabaksamen. Maßstab: 0,25 µm. **B:** Endosperm des reifen Tabaksamens. Maßstab: 0,5 µm. **C:** Embryo des reifen Samens. Maßstab: 0,5 µm. V: Vakuole; rER: rauhes oder granuläres ER; Zw: Zellwand; PSV: engl. *protein storage vacuole*; Lb: engl. *lipid bodies*.

III.7 Anreicherung rekombinanter Antikörper-ELP-Fusionen aus Blattextrakten mit *inverse transition cycling*

Neben der Expressionssteigerung rekombinanter Proteine durch C-terminale ELP-Fusion (Scheller *et al.*, 2004; Scheller *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007) ist der temperatur- und salzabhängige Phasenübergang eine weitere Eigenschaft, die zur spezifischen Abtrennung dieser Proteine genutzt werden kann. ELP-Fusionsproteine können durch einfache Zentrifugationsschritte bei bestimmten Temperaturen und definierter NaCl-Konzentration gereinigt werden (Meyer & Chilkoti, 1999). Dieses Verfahren wurde 1999 als *inverse*

transition cycling (ITC) beschrieben und ist ebenfalls für in Tabak produzierte ELP-Fusionen anwendbar (Scheller *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006).

Antikörper-ELP-Fusionen ($Nt2F5_{LELP}$, $Nt2F5_{HELP}$, $Nt2F5_{ELP}$, $Nt2G12_{LELP}$, $Nt2G12_{HELP}$, $Nt2G12_{ELP}$) wurden wie unter Pkt. II.2.4.7 beschrieben aus Blattextrakten von Tabak konzentriert. Vier unterschiedliche Inkubations- und Zentrifugationstemperaturen (37°C, 40°C, 45°C bzw. 50°C) wurden bei diesem Vorgang eingesetzt ohne eine Variation der Salzkonzentration (2 M NaCl). Blattmaterial von Pflanzen mit Expression der Antikörper ohne ELP ($Nt2F5$ oder $Nt2G12$) wurde zur Kontrolle analog verarbeitet.

Die Banden der 2F5 ELP-Fusionsproteine wurden durch Western Blot und Färbung der SDS-PAA-Gele mit dem kalkulierten Molekulargewicht (vgl. Tab. III-2) nachgewiesen und sind für die 2F5 Varianten in Abb. III-35 und Abb. III-36 dargestellt.

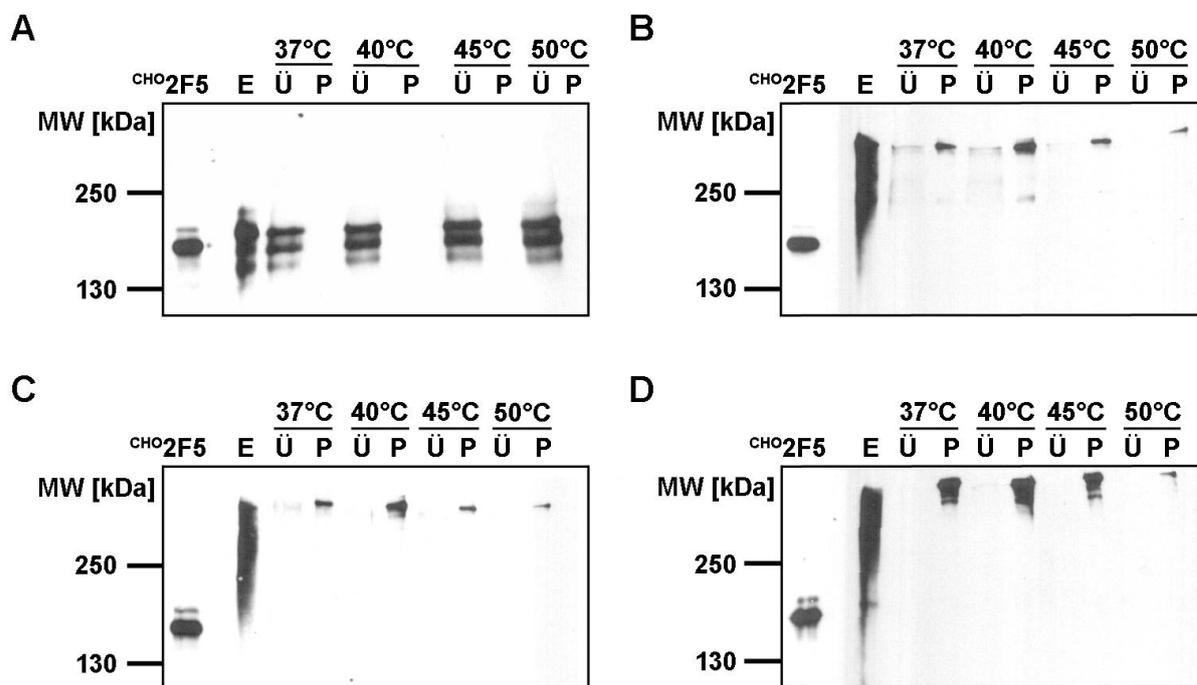


Abb. III-35: Anreicherung rekombinanter 2F5 Antikörper-ELP-Fusionen durch *inverse transition cycling*. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. Vier verschiedenen Temperaturen (37°C; 40°C; 45°C und 50°C) wurden beim *inverse transition cycling* verwendet. Gleiche Volumina an Rohextrakten (E) und Überständen (Ü) nach Zentrifugation bei 37°C, 40°C, 45°C und 50°C wurden pro Gelspur appliziert (10 µl). Von den Proteinpräparationen (P) wurde jeweils 1 µl pro Gelspur aufgetragen. **A:** Nachweis von $Nt2F5$. $Nt2F5$: 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*. **B:** Nachweis von $Nt2F5_{LELP}$. $Nt2F5_{LELP}$: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*. **C:** Nachweis von $Nt2F5_{HELP}$. $Nt2F5_{HELP}$: 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*. **D:** Nachweis von $Nt2F5_{ELP}$. $Nt2F5_{ELP}$: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*. $CHO2F5$: 2 ng Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

Erwartungsgemäß konnte in den Präparationen von 2F5 ohne ELP-Fusion ($Nt2F5$), der Antikörper nur im Rohextrakt (E) sowie in den Überständen (Ü) nach Zentrifugation bei 37°C, 40°C, 45°C oder 50°C detektiert werden (Abb. III-35A). Keine Signale wurden für die gelösten Pellets („Aggregate“) nach ITC identifiziert. Ein mit Silbernitrat gefärbtes SDS-Gel bestätigt dies (vgl. Abb. III-36A). Das gegenteilige Phänomen wurde für die ELP-Fusionen ($Nt2F5_{LELP}$, $Nt2F5_{HELP}$, $Nt2F5_{ELP}$) gezeigt. Die kompletten Antikörper-ELP-Fusionen konnten

nur in den Rohextrakten und in den gelösten Pellets (ELP-Aggregate, P) nachgewiesen werden (Abb. III-35B-D). In den Überständen (Ü) wurden keine Signale erhalten. Lediglich schwache Banden konnten bei N^t2F5_{LELP} bei Inkubations- und Zentrifugationstemperaturen von 37°C und 40°C detektiert werden (Abb. III-35B).

Für eine Silber- und Coomassiefärbung der Proteine wurden gleiche Volumina der Präparationen bei den SDS-Gelen aufgetragen (Abb. III-36). Dies erlaubt einen direkten Vergleich der verschiedenen Temperaturen. Geringfügige Unterschiede in der Intensität der Bandenfärbung konnten nachgewiesen werden.

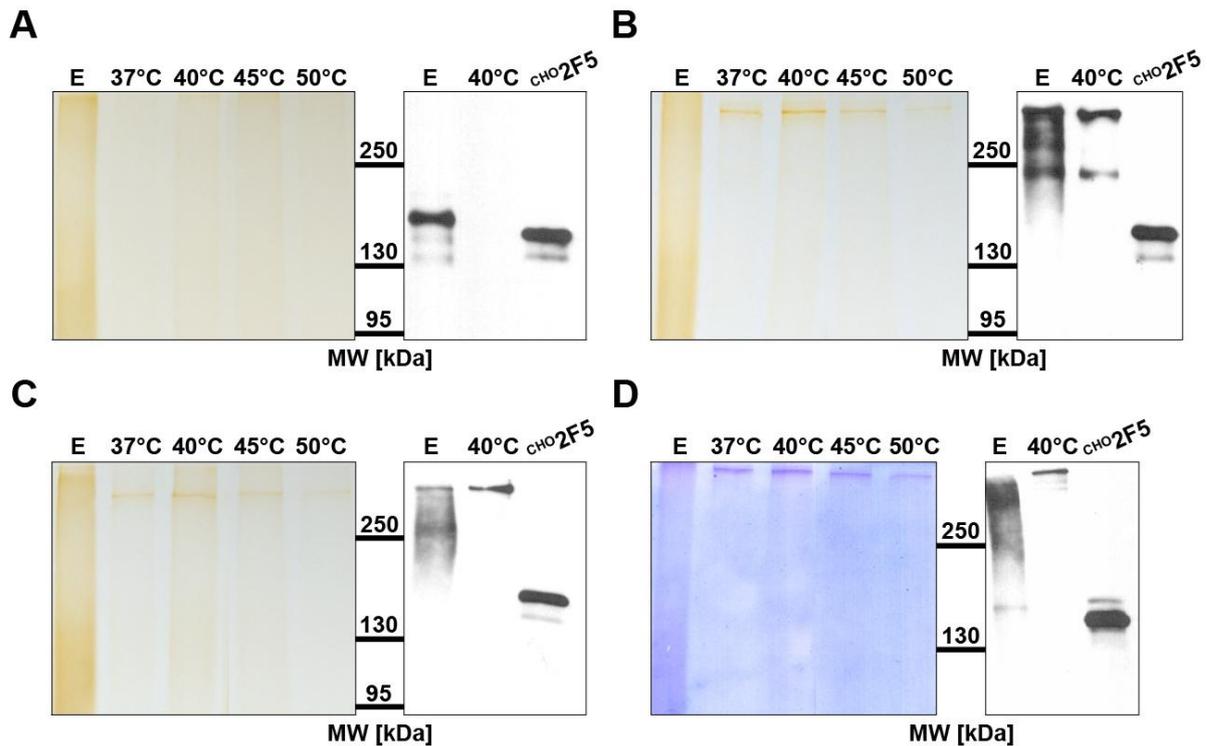


Abb. III-36: Nachweis der rekombinanten 2F5 Antikörper-ELP-Fusionen nach *inverse transition cycling* aus Blattextrakten. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper bzw. die Gele wurden mit Silbernitrat oder Coomassie® Brilliant Blue gefärbt. Vier verschiedenen Temperaturen (37°C; 40°C; 45°C und 50°C) wurden bei der Reinigung verwendet. Gleiche Volumina an Rohextrakten (E) und der Präparationen wurden zur Visualisierung (Silber- oder Coomassiefärbung) pro Gelspur aufgetragen. **A:** Nachweis von N^t2F5 im silbergefärbten SDS-PAA-Gel und durch Western Blot. N^t2F5 : 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*. **B:** Nachweis von N^t2F5_{LELP} im silbergefärbten SDS-PAA-Gel und durch Western Blot. N^t2F5_{LELP} : 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*. **C:** Nachweis von N^t2F5_{HELP} im silbergefärbten SDS-PAA-Gel und durch Western Blot. N^t2F5_{HELP} : 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*. **D:** Nachweis von N^t2F5_{ELP} mit Coomassiefärbung und durch Western Blot. N^t2F5_{ELP} : 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*. $^{CHO}2F5$: 2 ng Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

Deutliche Signale waren bei einer Inkubations- und Zentrifugationstemperatur von 40°C bei allen ELP-Fusionen des Antikörpers 2F5 erkennbar. Diese Präparationen wurden außerdem für einen Western Blot mit anti-Human Fc-spezifischem Antikörper (vgl. II.2.4.3) verwendet und die rekombinanten ELP-Fusionen mit dem berechneten Molekulargewicht (vgl. Tab. III-2) bestätigt. Das silbergefärbte SDS-Gel und der Western Blot der Präparation des 2F5 Antikörpers ohne ELP lieferten keine Signale (vgl. Abb. III-36A). Die Präzipitation der

Antikörper-ELP-Fusionen erfolgte bereits bei 37°C und einer Salzkonzentration von 2 M NaCl. Unter physiologischen Bedingungen (150 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,6) wurden jedoch keine rekombinanten Proteine nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Ähnliche Ergebnisse wurden für die 2G12 Antikörper erzielt (vgl. Anhang Abb. VII-7 und Abb. VII-8). Im Gegensatz zu den 2F5 Antikörper-ELP-Fusionen sind bei diesen Varianten Temperaturen von 45°C und höher für eine effiziente Anreicherung *via* ITC sinnvoll. Lediglich schwache Banden konnten nach der Färbung der SDS-Gele für die Präparationen, deren Präzipitation bei 37°C und 40°C erfolgte, nachgewiesen werden (vgl. Anhang Abb. VII-8).

Inwieweit die ELP-Aggregate nach dem Prozess des Phasenübergangs erneut in Lösung gehen, wurde ebenfalls untersucht. Nach Lösung der ELP-Aggregate wurden die unlöslichen Bestandteile in 72 mM Tris (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerin, 3% (w/v) SDS, 0,25 µM Bromphenolblau und 5% (v/v) β-Mercaptoethanol gekocht und durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Pro Gelspur wurden gleiche Volumina an Proben appliziert (0,5 µl). Zur Kontrolle diente der jeweilige Pflanzenrohextrakt (10 µl). Die separierten Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und die Antikörperketten mit anti-c-myc Antikörper, gefolgt von anti-Maus Antikörper-Peroxidasekonjugat, nachgewiesen. Abb. III-37 verdeutlicht, dass mit zunehmender Inkubations- und Zentrifugationstemperatur die Intensität der Banden für leichte und schwere Ketten sowie der entsprechenden ELP-Fusionen steigt. Dies ist ein Indiz für die Löslichkeit der aggregierten Proteine. Je höher die Temperatur bei ITC, desto weniger Protein geht anschließend in Lösung. Anhand der gefärbten SDS-Gele wird dieser Befund ebenfalls deutlich (vgl. Abb. III-36B-D).

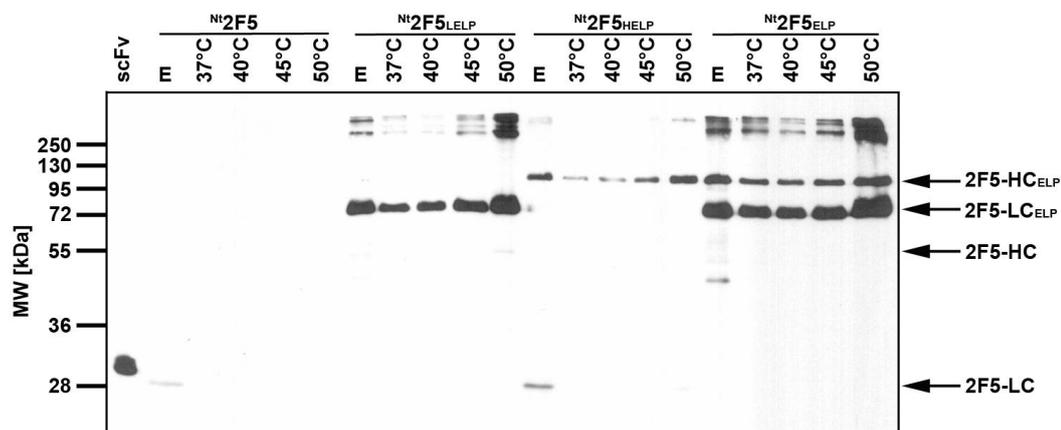


Abb. III-37: Kontrolle der Löslichkeit der 2F5 Antikörper-ELP-Fusionen nach *inverse transition cycling*. Die Trennung der Proteine erfolgte unter reduzierenden Bedingungen im SDS-PAA-Gel (12%) und die Western Blot Analyse mit dem anti-c-myc Antikörper. Vier verschiedenen Temperaturen (37°C; 40°C; 45°C und 50°C) wurden bei der Anreicherung verwendet. Unlösliche Bestandteile der Proteinpräparationen wurden in 72 mM Tris (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerin, 3% (w/v) SDS, 0,25 µM Bromphenolblau und 5% (v/v) β-Mercaptoethanol gekocht und gleiche Volumina für die Visualisierung pro Gelspur aufgetragen (0,5 µl). scFv: 20 ng Einkettenantikörper/c-myc Standard, E: Pflanzenrohextrakt; ^{Nt}2F5: 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5_{LELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5_{HELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2F5_{ELP}: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; 2F5-LC: 2F5 leichte Kette; 2F5-HC: 2F5 schwere Kette; 2F5-LC_{ELP}: 2F5 leichte Kette mit ELP-Fusion; 2F5-HC_{ELP}: 2F5 schwere Kette mit ELP-Fusion; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

Die stärksten Signale wurden für die unlöslichen Bestandteile der Präparationen, deren Anreicherung bei 50°C erfolgte, erhalten. Da für die Detektion der leichten und schweren Ketten sowie der ELP-Fusionen der anti-c-myc Antikörper im Western Blot eingesetzt wurde, sind die schweren Ketten ohne ELP nur sehr schwer nachweisbar (vgl. Abb. III-4). Wurde die Exposition des Röntgenfilms verlängert, waren diese Banden deutlich erkennbar. Signale der ELP-Fusionen waren in diesem Fall jedoch stark überrepräsentiert (Daten nicht gezeigt). Die Banden für die vier rekombinanten Proteine (2F5-LC, 2F5-HC, 2F5-LC_{ELP} und 2F5-HC_{ELP}) sind in Abb. III-37 mit Pfeilen markiert. Im Rohextrakt von Pflanzen mit Expression des N^t2F5_{ELP} wurde eine weitere Bande detektiert. Degradation einzelner Antikörperketten kann für diese Bande verantwortlich sein. Der 2F5 ohne ELP (N^t2F5) konnte lediglich im Pflanzenrohextrakt nachgewiesen werden. Alle weiteren Gelspuren zeigten, wie erwartet, keine signifikanten Banden.

Die ITC-Technik wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals für die Anreicherung von Antikörper-ELP-Fusionen aus Blattextrakten erfolgreich eingesetzt. Inwieweit die verwendeten Inkubations- und Zentrifugationstemperaturen die Aktivität der Immunglobuline beeinflussen, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

IV Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde erstmals die ELP-Fusionstechnologie zur pflanzlichen Expression von zwei neutralisierenden Antikörpern gegen HIV angewendet. Folgende Fragestellungen sollten somit beantwortet werden:

- Steigert die ELP-Fusion von leichten und/oder schweren Antikörperketten die Akkumulation der Immunglobuline in Pflanzen?
- Wird die Zusammenlagerung der einzelnen Antikörperketten zum vollständigen IgG durch ELP behindert?
- Haben die Fusionspartner Auswirkungen auf die posttranslationalen Modifizierungen der rekombinanten Proteine?
- Ist die Bindung der Antikörper-ELP-Fusionen an das Antigen noch gewährleistet?
- Können rekombinante anti-HIV Antikörper-ELP-Fusionen das Virus inaktivieren?
- Inwieweit kann die ELP-basierte Reinigungstechnik auch für Antikörper-ELP-Fusionen angewendet werden?

Ob die ELP-Fusionsstrategie tatsächlich vorteilhaft für die pflanzliche Expression multimerer Proteine ist, in diesem Fall vollständiger Antikörper, wird im folgenden Kapitel unter Verwendung der Ergebnisse dieser Doktorarbeit diskutiert.

Methoden zur Expression von Immunglobulinen in Pflanzen

Antikörper sind wichtige Proteine zur Diagnose, Therapie und Prophylaxe vieler Krankheiten. Der Markt für therapeutische, humane Antikörper steigt zurzeit jährlich um 21% und wird 2008 etwa 16,7 Milliarden US \$ erreichen (Pavlou & Belsey, 2005). Für die Herstellung von Immunglobulinen ist ein hoher finanzieller Aufwand nötig, der folglich deren Einsatz erheblich limitiert (Scott, 2005). Expressionssysteme mit einer gesteigerten Ausbeute und/oder verringerten Produktionskosten sind eine Alternative.

Pflanzen bieten verschiedene Vorteile bei der Herstellung rekombinanter Proteine (Übersichten bei Giddings, 2001 und Teli & Timko, 2004). Die zeitliche Komponente (u. a. Regeneration der Pflanzen, Herstellung homozygoter Linien) und die entstehenden Produktionskosten müssen bei der Wahl eines geeigneten pflanzlichen Expressionssystems besonders beachtet werden (Übersicht bei Stoger *et al.*, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die anti-HIV Antikörper 2F5 und 2G12 mit und ohne das elastinähnliche Polypeptid (ELP) in Tabakblättern und in Samen produziert. Für die Erzeugung von transgenen Pflanzen, die IgGs akkumulieren, sind in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben.

Bereits 1988 bzw. 1989 konnte erstmals die Akkumulation von Immunglobulinen in Pflanzen erfolgreich demonstriert werden (During, 1988; Hiatt *et al.*, 1989). Hiatt *et al.* kreuzten Pflanzen, die entweder leichte oder schwere Ketten produzierten und erhielten Nachkommen, die den vollständigen Antikörper bildeten (1,3% TSP). Dabei konnte gezeigt werden, dass für eine erfolgreiche Expression des multimeren Immunglobulins im ER/Golgi-Apparat Signalpeptide erforderlich waren. During *et al.* (1990) hingegen integrierten die cDNAs beider Immunglobulingene mit Signalsequenzen der α -Amylase von Gerste in die T-DNA eines binären Vektors. In den letzten Jahren wurden weitere IgG-Moleküle auf diese Art in transgenen Pflanzen produziert. Das Expressionsniveau der Antikörper betrug generell weniger als 1% des gesamtlöslichen Proteins (Voss *et al.*, 1995; Bouquin *et al.*, 2002; Ko *et al.*, 2003; Ramirez *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2005). Eine Ausnahme war ein Antikörper, der gegen die Cutinase von *Botrytis cinerea* gerichtet ist. Dieser akkumulierte in Wurzeln transgener Tabakpflanzen bis zu 1,1% des gesamtlöslichen Proteins (Van Engelen *et al.*, 1994). Ausgehend von den unterschiedlichen Werten für die verschiedenen IgGs wird eine Abhängigkeit des Expressionsniveaus von der individuellen Antikörpersequenz vermutet.

Bereits 1995 verglichen Ma & Hein in einem Übersichtsartikel die verschiedenen Möglichkeiten zur Erzeugung transgener Pflanzen mit Immunglobulingenexpression. Sie merkten an, dass Kreuzungen im Hinblick auf den zeitlichen Aspekt von Nachteil, bezogen auf das Expressionsniveau der rekombinanten Proteine jedoch von Vorteil sind. Zur effizienten Produktion kompletter Antikörper in transgenen Pflanzen müssen Kreuzungspartner mit annähernd gleichem Expressionsniveau ausgewählt werden. Für die pflanzliche Produktion der anti-HIV Antikörper wurden daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit T₁-Pflanzen ausgewählter T₀-Tabaklinien gekreuzt (vgl. Kapitel III.3).

Zur Minderung der Zeitspanne bei der Regeneration transgener Pflanzen mit multimeren rekombinanten Proteinen findet die Co-Transformation Anwendung (De Wilde *et al.*, 2002; Rademacher *et al.*, 2008). Vektoren, die jeweils die codierenden Sequenzen für leichte oder schwere Immunglobulinketten enthalten, werden hierfür gleichzeitig beim Gentransfer eingesetzt. De Neve *et al.* (1993) erzeugten mit dieser Methode Arabidopsis- und Tabakpflanzen, die den MAK33 Antikörper akkumulierten. Verglichen mit dem Verfahren der Kreuzung transgener Pflanzen waren die Expressionshöhen wiederum deutlich geringer (< 1% TSP). Die Mengen der antigenbindenden Antikörper im Pflanzenextrakt wurden direkt bestimmt und nicht die Konzentration des akkumulierten IgGs. Das Immunglobulin wurde mit unterschiedlicher Effizienz im Kallus von *N. tabacum* (0,48% TSP) und von *A. thaliana* (0,22% TSP) exprimiert. Um Pflanzen mit einem angemessenen Akkumulationsniveau des rekombinanten Proteins zu erhalten, musste jedoch eine größere Anzahl an Transformanten untersucht werden. De Neve *et al.* (1993) analysierten 103 Pflanzen und identifizierten lediglich zwei mit einer Expression des antigenbindenden Immunglobulins von mehr als 1% TSP.

Die Verwendung sogenannter Tandemkonstrukte (beide Immunglobulingene auf einer T-DNA) bei der Tabaktransformation schied in der vorliegenden Arbeit wegen der hohen Repetitivität der Sequenz des elastinähnlichen Fusionspartners und die dadurch bedingte genetische Instabilität aus. Weiterhin sprachen der bereits erwähnte höhere Selektionsaufwand, das verminderte Expressionsniveau der Immunglobulingene und eine gezielte Kombination ausgewählter Elternlinien bei den Kreuzungen gegen die letztgenannte Methode, aber auch gegen die Co-Transformation.

Akkumulation rekombinanter Antikörper in transgenen Pflanzen

Die innerhalb der Doktorarbeit regenerierten T₀-Pflanzen wiesen keine Unterschiede in der Akkumulation der rekombinanten Proteine auf (vgl. Kapitel III.2.2). Alle analysierten Pflanzen eines Transformationsansatzes zeigten vergleichbare Expressionsniveaus. Für die Kreuzungen wurden Linien mit *single locus* Insertion des Transgens verwendet.

Bouquin *et al.* (2002) erzeugten transgene *A. thaliana* mit einem Antikörper gegen das Rhesus D Antigen unter Verwendung von Tandemkonstrukten, aber auch durch Kreuzung ausgewählter Pflanzen mit Expression der individuellen Immunglobulingene. Eindeutige Unterschiede in der Akkumulationshöhe des Immunglobulins konnten nachgewiesen werden, wobei sich die Kreuzung wieder als vorteilhaft erwies (0,6% TSP). Die Akkumulation verschiedener IgG-, aber auch IgA-Moleküle konnte ebenfalls nach Kreuzungen transgener Pflanzenlinien in den Nachkommen gezeigt werden (Ma *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1995; Khoudi *et al.*, 1999). Die Produktion eines katalytischen Antikörpers (14D9) in Blättern und Samen transgener Tabakpflanzen nach Kreuzung der entsprechenden Linien mit leichter oder schwerer Kette ist ein weiteres Beispiel (Petruccelli *et al.*, 2006). Die Akkumulation der kompletten Antikörper im pflanzlichen ER wurde unter Verwendung eines *Sandwich*-ELISAs auf 5,2% TSP in Blättern und auf 0,41% (35S-Promotor) bzw. 1,08% TSP (α' subunit β -Conglycinin Promotor) in Samen bestimmt. Die nachgewiesene Menge des Antikörpers ohne ER-Retentionssignal (KDEL) war in Tabakblättern halbiert und in Samen sogar 10-fach niedriger. Eine Expressionssteigerung von Einkettenantikörpern (scFv) im Cytosol durch das C-terminale ER-Retentionssignal KDEL wurde bereits von Schouten *et al.* (1997) beschrieben (Konstrukte ohne Signalpeptide). Fiedler *et al.* (1997) bestätigten dies bei der Produktion eines scFv mit C-terminalem KDEL in Tabakblättern und in Samen (Konstrukte mit Signalpeptiden). Auch bei Immunglobulin G-Molekülen konnten De Wilde *et al.* (2002) eine deutlich erhöhte Akkumulation von Antikörpern mit KDEL nachweisen. Das KDEL ER-Retentionssignal wurde hierfür C-terminal mit den leichten Ketten fusioniert. Die Expression konnte um das 5-fache auf 0,5% TSP in Kartoffelknollen gesteigert werden. Inwieweit dies auch für die Expression der beiden anti-HIV Antikörper zutrifft, ist noch unklar.

Unterschiede im Akkumulationsniveau der individuellen Immunglobulinketten, aber auch entsprechender ELP-Fusionen, wurden in transgenen Blättern und Samen nachgewiesen (vgl.

Abb. III-4, Abb. III-5, Abb. III-6). Leichte Ketten wurden stärker detektiert. Dies steht im Widerspruch zu den Untersuchungen von Hiatt *et al.* (1989) und Petruccelli *et al.* (2006). Hiatt *et al.* belegten eine höhere Expression der schweren Ketten. Bei der Akkumulation des kompletten Antikörpers nach Kreuzung ausgewählter Linien wurden jedoch kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Immunglobulinketten identifiziert und die Mengen beider rekombinanter Proteine waren deutlich erhöht. Dies ließ eine verbesserte Stabilität des IgGs vermuten.

Bei den Untersuchungen von Petruccelli *et al.* (2006) wurden leichte Ketten eines mit KDEL versehenen Antikörpers mit 0,16% bis 0,5% TSP exprimiert. Die Akkumulation der schweren Ketten hingegen lag mit 0,41% bis 1,25% TSP deutlich darüber. Zum Nachweis der Antikörperketten wurden spezifische Antikörper, die gegen bestimmte Bereiche der Immunglobuline gerichtet sind, in einem *Sandwich*-ELISA eingesetzt. Hiatt *et al.* (1989) verwendeten ebenfalls mehrere spezifische Antikörper gegen IgGs von Mäusen.

Der Nachweis der Expressionsniveaus rekombinanter Proteine in den erzeugten T₀-Pflanzen erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch Western Blot Analyse mit einem c-myc spezifischen Antikörper (Evan *et al.*, 1985). Da Unterschiede in der Akkumulation der einzelnen Antikörperketten auch bei den ELP-Fusionen ausgeprägt waren (vgl. Kapitel III.2.2), kann nicht von einer verminderten Zugänglichkeit des c-myc Epitops bei den rekombinanten schweren Ketten ausgegangen werden. Die Quantifizierung assemblierter Antikörper in Pflanzenextrakten erfolgte ebenfalls durch Western Blot Analyse. Die Menge an antigenbindenden Antikörpern in den Pflanzenextrakten wurde nicht bestimmt. Für die Detektion der schweren Ketten bzw. der entsprechenden ELP-Fusionen, die den limitierenden Faktor bei der Zusammenlagerung zum IgG darstellten, wurde ein Antikörper verwendet, der gegen den Fc-Teil gerichtet ist (vgl. Abb. III-11). Bereits Law *et al.* (2006) zeigten, dass die leichten Ketten eines im Maisendosperm exprimierten Antikörpers in drei Formen vorlagen, nämlich als Bestandteil des assemblierten IgGs, als freie Monomere oder Dimere. Rekombinante schwere Ketten hingegen wurden lediglich als Komponenten des vollständigen Antikörpers nachgewiesen. Bei einem Vergleich der mRNA der Immunglobulingene wurden in zwei von drei Experimenten Unterschiede zwischen LC und HC erhalten. Deutlich weniger LC mRNA wurde detektiert. Das Auftreten der freien leichten Ketten (Monomer oder Dimer) im Gegensatz zu den proportional höheren Konzentrationen an HC mRNA verdeutlicht, dass ein geringer Anteil an schweren Ketten der limitierende Faktor bei der Produktion kompletter Antikörper im Maisendosperm ist.

Antikörper gegen HIV akkumulierten in Tabakblättern von hemizygoten F₁-Pflanzen lediglich mit 0,1% TSP (2F5, vgl. Abb. III-12). Eine Steigerung des Expressionsniveaus um ca. 100% konnte bei homozygoten Pflanzen, die mit Hilfe der DH-Technik erzeugt wurden, nachgewiesen werden (vgl. Abb. III-18). In Samen homozygoter Pflanzen (Expression der Transgene unter Kontrolle des USP-Promotors) akkumulierten assemblierte 2F5 Antikörper mit 0,1% TSP. Vollständige 2G12 Antikörper wurden in Tabakblättern mit 0,4% des

gesamtlöslichen Proteins nachgewiesen. Obwohl dies verhältnismäßig geringe Mengen des rekombinanten Proteins sind, liegen die Werte jedoch im Bereich der bereits publizierten Ergebnisse von assemblierten IgG-Molekülen. Außer bei den Untersuchungen von Petruccelli *et al.* (2006) sind alle bisher erreichten Akkumulationshöhen der rekombinanten IgG-Moleküle gering (siehe oben) und unterschreiten deutlich die Werte von stabil exprimierten Einkettenantikörpern (De Jaeger *et al.*, 2002; Van Droogenbroeck *et al.*, 2007) oder Antikörpern, die transient exprimiert wurden (Gritch *et al.*, 2006). Die Ergebnisse der pflanzlichen Expression beider anti-HIV Antikörper grenzen sich lediglich von Hiatt *et al.* (1989) und Petruccelli *et al.* (2006) ab. Wobei für die Untersuchungen von Hiatt *et al.* anzumerken ist, dass die verwendeten Konstrukte kein KDEL Signal aufwiesen.

Differenzen in der Akkumulation von 2F5 und 2G12 in Tabakblättern verdeutlichen, dass selbst Proteine mit einer hohen Homologie in der AS-Sequenz (Unterschiede in variablen Regionen der Antikörperketten), unterschiedlich exprimiert werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Abweichungen bei der Akkumulation von 2F5 und 2G12 wurden ebenfalls von T. Rademacher (RWTH Aachen, Aachen, BRD) für Tabakblätter und BY2 Suspensionszellkulturen bestätigt (unveröffentlicht).

Expressionssteigerung von rekombinanten Proteinen in Pflanzen

Zur Extraktion der rekombinanten Proteine aus Pflanzenmaterial sollte jedoch ein gewisses Expressionsniveau des Transgens erzielt werden. Nur so kann die Menge des zu verarbeitenden Materials minimiert werden. Nach Obregon *et al.* (2006) ist ein Gehalt von 1% des rekombinanten Proteins am gesamtlöslichen Protein erstrebenswert. Für eine Steigerung der heterologen Genexpression in *E. coli* werden rekombinante Proteine mit einem „Partner“ fusioniert. Dies führt zur Erhöhung der Translation der mRNA, Verbesserung der Löslichkeit oder Faltung der Proteine, aber auch zur positiven Beeinflussung der Proteinstabilität (Übersicht bei La Vallie & McCoy, 1995). Mainieri *et al.* (2004) fusionierten Phaseolin (Samenspeicherprotein der Bohne) mit 89 AS von γ -Zein (Samenspeicherprotein von Mais) und bezeichneten das resultierende Protein als Zeolin. Sie postulierten, dass aufgrund einer verstärkten Interaktion mit dem Chaperon BiP über γ -Zein und der Retention von γ -Zein im ER das Fusionsprotein Zeolin stabiler ist und erklären somit die Erhöhung der Akkumulation. Zur Steigerung der Expression pharmazeutischer, aber auch veterinärmedizinischer Proteine wurden verschiedene Fusionspartner studiert. Spiegel *et al.* (1999) untersuchten die Akkumulation eines Einkettenantikörpers (scFv24) als Fusionsprotein mit vier verschiedenen „Partnern“ (Glutathion-S-Transferase, Thioredoxin von Tabak und *E. coli*, Hüllprotein des Tabakmosaikvirus). Die N-terminale Fusion des scFv mit Glutathion-S-Transferase (GST) führte zu einem Gehalt des Antikörperfragments von 2,3 μ g pro Gramm Blattmaterial (ER-Retention). Im Cytoplasma konnten lediglich Antikörperderivate mit Fusion des Hüllproteins vom Tabakmosaikvirus nachgewiesen werden. Allerdings wurde die cytoplasmatische Akkumulation durch das C-terminale KDEL um das 3-fache erhöht. Eine

Steigerung der Produktion des HIV-1 Antigens p24 wurde durch Fusion mit IgA ($\alpha 2$ und $\alpha 3$ Domänen humaner schwerer Ketten) erzielt (Obregon *et al.*, 2006). Gil *et al.* (2001) fusionierten ein Peptid des *Canine Parvovirus* (CPV) mit β -Glucuronidase und zeigten ein Expressionsniveau von bis zu 3,3% TSP in *A. thaliana*. Keinen Erfolg erzielten sie bei der Fusion eines strukturellen Proteins des *Rabbit Haemorrhagic Disease Virus* (RHDV) mit Ubiquitin oder mit dem N-terminalen Teil der kleinen Untereinheit der Ribulosebiphosphatcarboxylase (Gil *et al.*, 2006).

Elastinähnliche Polypeptide (ELPs) besitzen drei besondere Eigenschaften im Hinblick auf die Produktion rekombinanter, pharmazeutisch relevanter Proteine in Pflanzen. Zum einen sind sie biologisch verträglich (Urry *et al.*, 1991b) und können als Bestandteile von *microbicides* eingesetzt werden (vgl. Kapitel I.2). Sie weisen einen temperaturabhängigen Phasenübergang auf, der für die Reinigung verwendet werden kann und steigern zusätzlich die Akkumulation rekombinanter Proteine (Meyer & Chilkoti, 1999; Scheller *et al.*, 2004; Scheller *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007).

Da Antikörper in hohen Mengen für die passive Immunisierung, aber auch für diagnostische Zwecke benötigt werden (2 bis 5 g reiner Herceptin Antikörper für einen Brustkrebspatienten pro Jahr, Übersicht bei Gomord *et al.*, 2004), ist die ELP-Fusionsstrategie eine Möglichkeit zur Produktionssteigerung rekombinanter IgGs. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die ELP-Fusionsstrategie erstmals zur Akkumulation multimerer Proteine, speziell vollständiger Immunglobuline, in Pflanzen angewandt.

ELP-basierte Steigerung der Akkumulation rekombinanter Proteine in Pflanzen

Nach Infiltration rekombinanter Agrobakterien konnten die individuellen Antikörperketten und auch deren ELP-Fusionen in Tabakblättern nachgewiesen werden. Die C-terminale ELP-Fusion erhöhte die Expression beider Immunglobulingene (vgl. Abb. III-2). Bereits Patel *et al.* (2007) verbesserten durch ELP die transiente Expression von humanen Interleukin-10 (IL10) und murinen Interleukin-4 (IL4) um das 15- bzw. 19-fache. Die Expression des Tragfadenseidenproteins MaSp2 konnte durch Fusion mit 27 Aminosäuren eines elastinähnlichen Peptids im transienten System um das 100-fache gesteigert werden. Patel *et al.* postulierten, dass aufgrund nicht vorhandener Positionseffekte bei der transienten Genexpression, dies die geeignete Methode zur Verdeutlichung der ELP-Wirkung auf die Akkumulation rekombinanter Proteine ist. Im Hinblick auf die Untersuchungen von Patel *et al.* (2007) muss jedoch bedacht werden, dass die Mengen der rekombinanten Proteine ohne ELP-Fusion nach transienter Expression extrem niedrig waren (ca. 0,05% TSP für IL10, ca. 0,05% TSP für IL4).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Phänomen der Expressionssteigerung der individuellen Immunglobulingene transient nach Agrobakterium-Injektion (vgl. Abb. III-2) und in Blattmaterial stabil transformierter Tabakpflanzen (vgl. Abb. III-4), aber auch in Samen nachgewiesen (vgl. Abb. III-5, Abb. III-6). Für jedes bei der Transformation

verwendete Konstrukt wurden mehrere Pflanzen hinsichtlich der Transgenakkumulation analysiert (vgl. Anhang Tab. VII-1). Unterschiede in der Expressionshöhe des rekombinanten Proteins zwischen verschiedenen Pflanzen eines Transformationsansatzes, die auf unabhängige Transformationsereignisse zurückgingen, traten nicht auf. Daraus folgt, dass die beobachtete Expressionserhöhung nicht auf zufällige Positionseffekte des Transgens zurückzuführen ist, sondern ELP für die Steigerung verantwortlich ist. Scheller *et al.* (2004) und Patel *et al.* (2007) zeigten ebenfalls die verstärkte Produktion von synthetischen Spinnenseidenproteinen mit ELP in transgenen Tabakpflanzen. Die Expression des Tragfadenseidenproteins MaSp2 wurde durch Fusion mit 27 Aminosäuren eines elastinähnlichen Peptids um das 60-fache gesteigert (Patel *et al.*, 2007). Dieser Effekt wird jedoch durch die geringe Expression von MaSp2 ohne ELP relativiert (0,0125% TSP). Der Gehalt an funktionellen Einkettenantikörpern mit C-terminaler Fusion von 100 Wiederholungen des Pentapeptids VPGXG, das dem hydrophoben Bereich des Tropoelastins entstammt, wurde in Tabaksamen um das 40-fache bis auf 20% TSP erhöht (Scheller *et al.*, 2006). Die ELP-Fusionsstrategie fand auch bei der pflanzlichen Produktion pharmazeutisch relevanter Proteine Anwendung. Patel *et al.* (2007) konnten ebenfalls im stabilen System eine Akkumulationssteigerung von IL4 und IL10 um das 85- bzw. 90-fache zeigen, wobei die Expressionsniveaus von IL4 ohne ELP (0,001% TSP) und IL10 ohne ELP (0,0002% TSP) kaum nachweisbar waren.

In Blättern von im Rahmen der Doktorarbeit erzeugten F₁-Tabakpflanzen konnte durch C-terminale ELP-Fusion von allen vier 2F5 Antikörperketten die Akkumulation des assemblierten IgGs um das 6-fache gesteigert werden. Die Mengen der Antikörpervarianten mit ELP an leichten oder schweren Ketten waren um das 3-fache bzw. Doppelte höher als die des IgGs ohne ELP (vgl. Kapitel III.3). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für homozygote DH-Linien mit samenspezifischer Expression der 2F5 Immunglobulingene erhalten (vgl. Anhang VII.5). Die Akkumulation der 2G12 Antikörpervarianten ist, wie bereits erwähnt, im Vergleich zu 2F5 generell besser. Das rekombinante IgG 2G12 ohne ELP wurde mit 0,4% am gesamtlöslichen Protein im Blatt nachgewiesen und die ELP-Varianten 2G12^{LELP} und 2G12^{ELP} zeigten Expressionshöhen von ca. 1% TSP. Eine Ausnahme war 2G12 mit C-terminaler ELP-Fusion an den schweren Ketten. Dieses Protein wurde in sehr geringer Konzentration im ER akkumuliert (ca. 0,1% TSP).

Da alle im Rahmen der Arbeit ermittelten Expressionsniveaus der ELP-Fusionen relativ zum jeweiligen Antikörper aus CHO-Zellen bestimmt wurden, sind die Mengen an den „gesamten“ Fusionsproteinen deutlich unterbewertet. Trotzdem wurden die von Patel *et al.* (2007) erhaltenen Steigerungen nicht erzielt. Eine Ursache hierfür kann die Länge des verwendeten ELP-Fusionspartners sein. Bereits Meyer & Chilkoti (1999) zeigten, dass in *E. coli* die Menge an exprimierten Fusionsproteinen mit zunehmender Länge der ELPs sank. Die Expression rekombinanter Spinnenseidenproteine konnte durch Fusion mit 100 Wiederholungen des elastinähnlichen Pentapeptids von 0,5 bis 2% TSP (Scheller *et al.*, 2001)

auf 0,5 bis 4% gesteigert und somit lediglich verdoppelt werden (Scheller *et al.*, 2004). Im Hinblick auf eine effiziente Fällung von Spinnenseide-ELP bei dem temperaturabhängigen Phasenübergang wurde als Fusionspartner jedoch 100xELP gewählt. Da bei den Antikörper-ELP-Fusionen das gleiche elastinähnliche Polypeptid verwendet wurde, kann dies die vermeintlich geringen Steigerungen bei einzelnen Antikörperketten und auch bei den vollständigen Immunglobulinen erklären (vgl. Abb. III-4, Abb. III-12). Die geschätzten Expressionsniveaus lagen ebenfalls deutlich unter den Werten der Einkettenantikörper (scFvs) von Scheller *et al.* (2006). Im Gegensatz zu scFvs sind IgGs multimerer Proteine mit einem deutlich höheren Molekulargewicht. Die Komplexität dieser Moleküle kann die Unterschiede in der Akkumulationshöhe der rekombinanten Proteine mit und ohne ELP begründen.

Patel *et al.* (2007) postulierten, dass die ELP-Expressionssteigerung zum einen durch die Interaktion mit dem ER-Chaperon BiP erklärt werden kann. Sie würde somit ähnlich wie bei Zeolin erfolgen (Mainieri *et al.*, 2004). Zum anderen weisen sie auf einen möglichen synergistischen Effekt von KDEL ER-Retention und ELP-Fusion hin. Bestätigen konnten Patel *et al.* (2007) diese Hypothese jedoch nicht. Bei der pflanzlichen Expression von scFv-ELP-Fusionen im Cytosol und ER von Tabakpflanzen wurden vergleichbare Akkumulationshöhen nachgewiesen (Leps, 2002). Dies unterstützt die Annahme von Patel *et al.* (2007) nicht. Die erhöhten Gehalte der ELP-Fusionen in Rohextrakten von Tabakblättern oder Samen können auch mit einer verbesserten Löslichkeit der rekombinanten Proteine erklärt werden. Genauere Untersuchungen zu dieser Theorie gibt es noch nicht, jedoch erste Hinweise. Meyer & Chilkoti (1999) exprimierten das relativ unlösliche Tendamistat als Thioredoxin-Fusion mit und ohne ELP in *E. coli*. Die Tendamistat-Thioredoxin-ELP-Fusion konnte mit einer Konzentration von 40 mg/l nachgewiesen werden. Diese war somit deutlich höher als die Tendamistat-Thioredoxin-Fusion (10 mg/l). Die Vermutung, dass ELP die Löslichkeit des Fusionsproteins zusätzlich zum Thioredoxin steigert, liegt somit nahe.

Die Zusammenlagerung einzelner Ketten zu den vollständigen Immunglobulin-ELP-Fusionen in Tabakblättern schließt einen negativen Einfluss der elastinähnlichen Polypeptide auf die Bildung von Antikörpern eindeutig aus (vgl. Abb. III-10, Abb. III-13, Abb. III-14, Abb. III-21). Durch die verstärkte Akkumulation der schweren Ketten ohne ELP im Beisein von LC-ELP-Fusionen wird eine zusätzliche Stabilisierung des gesamten IgGs durch ELP vermutet (vgl. Abb. III-11). Besonders die Fusion zwischen ELP und den schweren Ketten könnte positiv auf die Stabilität des kompletten 2F5 Antikörpers wirken, da die Konzentration der schweren Ketten limitierend bei der Zusammenlagerung ist (siehe oben). Bei den 2G12 Varianten trifft diese Hypothese allerdings nicht zu, da in diesem Fall die Variante mit ELP ausschließlich an den schweren Ketten (2G12_{HELP}) nur mit einem sehr geringen Anteil am gesamtlöslichen Protein nachgewiesen wurde (vgl. Kapitel III.3). Aufgrund der relativ hohen Akkumulationsniveaus ist die Stabilität der weiteren 2G12 ELP-Fusionen und auch die des 2G12 ohne ELP durchaus gegeben.

Durch C-terminale Fusion mit dem elastinähnlichen Polypeptid kann die Degradation von schweren Ketten in Samen jedoch nicht verhindert werden (vgl. Abb. III-5, Abb. III-6). Auch bei den vollständigen Antikörpern wurden die Abbauprodukte noch nachgewiesen (vgl. Abb. III-13D, Abb. III-14B) und die Hypothese von Petruccelli *et al.* (2006) zum Vorhandensein einer samenspezifischen Protease, die ein bestimmtes Motiv innerhalb der schwere Kette erkennt und spaltet, bestätigt.

ELP-basierte Reinigung pflanzlich exprimierter Fusionsproteine

Affinitätschromatographie unter Verwendung von Protein A oder Protein G sowie Ionenaustauschchromatographie werden zur Reinigung großer Mengen rekombinanter Antikörper für *in vivo* und *in vitro* Applikationen verwendet (Übersicht bei Schmidt, 1989). Für einen hohen Reinheitsgrad sind in speziellen Fällen jedoch zusätzliche Schritte notwendig. Die Affinitätschromatographie mit antikörperbindenden Proteinen (Antigen, Protein A oder G) ist teuer und setzt die Kopplung dieser Polypeptide an einer festen Matrix voraus. Dies wiederum kann die Bindungskapazität der Säule gegenüber dem Antikörper deutlich minimieren.

Eine Extraktion von Proteinen aus Pflanzen ist aufgrund des Auftretens von phenolischen Substanzen, Pigmenten und anderen Sekundärmetaboliten extrem schwierig und erfordert mehrere Filtrations-, aber auch Reinigungsschritte, u. a. Ionenaustausch, Gelfiltration und Affinitätschromatographie (Übersicht bei Jervis & Pierpoint, 1989). Unterschiede in fixen Kosten bei der Reinigung rekombinanter Proteine aus Säugerzellkulturen oder pflanzlichen Systemen gibt es nicht (Davenport, 2005), da u. a. die gleichen technischen Geräte eingesetzt werden. Die Kosten für die Reinigung können bei einem Produkt, bei dem eine hohe Reinheit gefordert wird, jedoch bis zu 80% der Gesamtkosten betragen (Übersicht bei Kusnadi *et al.*, 1997). Beispiele für derartige Proteine sind u. a. rekombinante Antikörper, die in großen Mengen für humanmedizinische Anwendungen benötigt werden. Die entstehenden Produktionskosten von einem Gramm Ausgangsmaterial liegen im Fall von transgenen Pflanzen insgesamt jedoch deutlich unter dem Niveau von CHO-Zellen und von transgenen Tieren (Übersicht bei Dove, 2002). So wird angenommen, dass bei gleichen Kosten für die Reinigung und bei ebenfalls gleichen Verlusten während dieses Prozesses, die Produktion eines IgA-Moleküls in transgenen Pflanzen deutlich preiswerter ist (Übersicht bei Daniell *et al.*, 2001).

Zur Minimierung der entstehenden Gesamtkosten bei der Herstellung rekombinanter Antikörper können alternative Reinigungsmethoden eingesetzt werden. Die Fusion der Immunglobuline mit dem elastinähnlichen Polypeptid eröffnet neue Möglichkeiten der Antikörperreinigung, da eine Anreicherung der IgGs aus dem Pflanzenextrakt erfolgen kann. Vorteile der ELP-basierten Reinigungstechnik sind die Senkung der anfallenden Kosten aufgrund wegfallender Chromatographiesäulen sowie spezieller Arbeitsgeräte, die günstigeren Bedingungen für Separation und Rücklösung der Fusionsproteine, die Reduktion

des Zeitaufwands und die Möglichkeit mehrere Proteine simultan zu bearbeiten (Meyer & Chilkoti, 1999). Letztendlich ist dieses Verfahren auch unabhängig von speziellen Expressionsvektoren oder -systemen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erste Experimente zur Anreicherung der ELP-Fusionen aus Blattextrakten durchgeführt (vgl. Kapitel III.7). Die Ergebnisse bestätigen die Anwendung dieses Verfahrens bei rekombinanten Proteinen aus Pflanzen im Labormaßstab. Außerdem demonstrieren sie den erfolgreichen Einsatz für die Anreicherung von verschiedenen Antikörper-ELP-Fusionen. Die angewendete Methode muss selbstverständlich für jede Antikörpervariante hinsichtlich Inkubations- und Zentrifugationstemperatur optimiert werden.

Die Verwendung des Phasenübergangs der ELPs für die Reinigung heterolog exprimierter Fusionsproteine wurde 1999 unter dem Begriff *inverse transition cycling* (ITC) von Dan Meyer und Ashutosh Chilkoti beschrieben. Neben der erfolgreichen Isolation relativ kleiner Proteine (< 20 kDa) wiesen sie bereits auf die Applikation dieser Methode bei Immunkomplexen (> 230 kDa) hin. Neben mehreren heterologen ELP-Fusionsproteinen (Shimazu *et al.*, 2003; Trabbic-Carlson *et al.*, 2004a; Trabbic-Carlson *et al.*, 2004b; Chow *et al.*, 2006) wurden auch Antikörper durch den Einsatz von ELP-Protein L-, ELP-Protein G- oder ELP-Protein L/G-Fusionen aus Tierserum und Hybridomzellen isoliert (Kim *et al.*, 2005). Scheller *et al.* (2004) berichteten erstmalig von der Reinigung rekombinanter Spinnenseiden-ELP-Fusionen aus Tabakblättern. Von einem Kilogramm Blattmaterial wurden 80 mg Spinnenseiden-ELP-Fusionsprotein gewonnen und zur Beschichtung von Kulturplatten für Säugerzellen sowie Chondrozyten eingesetzt. Die ELP-basierte Reinigung wurde weiterhin bei einem Fragment von einem natürlichen Inhibitor des IL6 *Transsignallings* mit C-terminaler ELP-Fusion angewendet (mini-sgp130-ELP, Lin *et al.*, 2006). Bei dem Verfahren, bestehend aus zwei Runden ITC, wurde lediglich 10 g Blattmaterial eingesetzt und die erhaltene Extraktionsfraktion nochmals mit Größenausschlusschromatographie gereinigt. Das reine Protein war biologisch aktiv (Lin *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die beiden zuletzt genannten Beispiele verdeutlichen den möglichen Einsatz der ITC-Technologie bei der Reinigung pharmazeutisch relevanter, pflanzlich exprimierter Proteine. Rekombinante Antikörper-ELP-Fusionen können mit dieser Technik aus Pflanzenextrakten stark angereichert werden. Für eine ausreichende Reinheit der Immunglobuline für medizinische Anwendungen wird jedoch ein abschließender Reinigungsschritt notwendig sein. Die biologische Verträglichkeit der ELPs ermöglicht die Verwendung der rekombinanten Antikörper-ELP-Fusionen ohne Abspaltung der ELPs als Komponenten von *microbicides* im Vaginalbereich zur Verhinderung von HIV-Infektionen. Durch die verstärkte Akkumulation der Antikörper-ELP-Fusionen und eine preiswertere Reinigung können die anfallenden Gesamtkosten bei der Produktion der rekombinanten Proteine deutlich gesenkt werden.

N-Glycosylierung rekombinanter Antikörper aus Pflanzen

Die Anwendung der ELP-Technologie zur Steigerung der Antikörperakkumulation erfordert, die Funktionsfähigkeit dieser Fusionsproteine eingehend zu untersuchen. Antikörper sind bifunktionelle Moleküle, die zum einen direkt über ihre Paratope mit Antigenen in Kontakt treten und so z. B. die Neutralisation eines Pathogens, u. a. Virus, ermöglichen. Zum anderen besitzen IgGs sogenannte Effektorfunktionen (ADCC, Komplementaktivierung) bei der Immunantwort über ihren Fc-Teil.

Wie bereits erwähnt, beeinflussten die C-terminalen ELP-Fusionen an leichten und/oder schweren Ketten die Zusammenlagerung zum vollständigen Immunglobulin nicht. Assemblierte 2F5 sowie 2G12 Antikörpervarianten wurden in Blatt- und Samenextrakten transgener F₁-Pflanzen nachgewiesen. Eventuell werden Antikörper durch ELP-Fusionen sogar stabilisiert.

Die biologische Aktivität von Proteinen ist u. a. abhängig von Oligosacchariden, die an das Asparagin der AS-Sequenz N-X-T/S (X = jede AS außer Prolin) gebunden sind. Im Fall von Antikörpern besitzt die *N*-Glycosylierung Auswirkungen auf die Halbwertszeit der IgGs im Blut und die Fähigkeit, das Immunsystem zu stimulieren (Übersicht bei Jefferis, 2005). Proteinfaltung, Ligandenbindung und Verteilung der Proteine nach deren Expression, aber auch die Proteinstabilität können durch Anfügen von Glycanen beeinflusst werden (Übersicht bei Walsh & Jefferis, 2006). Viele therapeutische Antikörper sind vom IgG₁-Typ und vermitteln die Fc-basierten Funktionen (Effektorfunktionen), zu denen die antikörperabhängige zellvermittelte Cytotoxizität (ADCC, engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity*) sowie die Komplementaktivierung zählen (Übersicht bei Adams & Weiner, 2005). Über bestimmte Fc-Rezeptoren (FcγRI, FcγRII, FcγRIII) erfolgt eine Bindung von verschiedenen Zellen des Immunsystems an die Fc-Teile von Antikörpern (ADCC). Diese Zellen schädigen durch Phagozytose das gebundene Target (Zielstruktur, z. B. Viruspartikel). Der klassische Weg der Komplementaktivierung wird ebenfalls durch Antigen-Antikörper-Komplexe stimuliert. Die Vernichtung des Pathogens wird hierbei durch Lyse oder Phagozytose erreicht.

Konformationsänderungen im Bereich der C_H2-Domäne von Antikörpern ereigneten sich aufgrund angefügter Oligosaccharide und können die Bindungsstellen von Fc-Rezeptoren und C1-Liganden (Komponenten des Komplementsystems) beeinflussen (Mimura *et al.*, 2000). Im Hinblick auf den therapeutischen Einsatz rekombinanter Antikörper ist demzufolge die Analyse der *N*-Glycosylierung an den schweren Ketten notwendig. Oligo-mannosidische *N*-Glycane (OMT) der Glycoproteine aus Pflanzen oder Säugern besitzen die gleiche Struktur. Pflanzliche *N*-Glycane vom komplexen Typ (CT) unterscheiden sich jedoch von denen aus tierischen Organismen (Cabanes-Macheteau *et al.*, 1999; Bardor *et al.*, 2003). Obwohl Kohlenhydrate aufgrund fehlender T-Zellepitope eine geringe Immunogenität aufweisen (Übersicht bei Sepalla & Makela, 1997), zeigen einige Studien die Bildung von Antikörpern gegen β(1,2)-Xylose- und α(1,3)-Fucosereste der pflanzlichen CT *N*-Glycane in

verschiedenen Labortieren (Faye *et al.*, 1993; Bardor *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2006). Nach Injektion von Meerrettichperoxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) und rekombinanten IgG (Guy'13, Ma *et al.*, 1994) aus Pflanzen in BALB/c Mäuse konnten jedoch keine glycoproteinspezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Chargelegue *et al.*, 2000). Die Bildung von Antikörpern gegen $\beta(1,2)$ -Xylose- und $\alpha(1,3)$ -Fucosereste und deren Effekte werden kontrovers diskutiert (Jin *et al.*, 2006). Unabhängig davon werden jedoch verschiedene Ansätze verfolgt, um die Entstehung putativ immunogener, pflanzlicher CT *N*-Glycane zu unterbinden (Übersicht bei Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007). Eine wichtige Strategie zur Vermeidung dieser Glycanstrukturen, die auch im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit angewendet wurde, ist die Retention der rekombinanten Antikörper im pflanzlichen ER. Dies wird in Eukaryonten durch C-terminale HDEL oder KDEL Sequenzen ermöglicht (Gomord *et al.*, 1997; Pagny *et al.*, 2000). Der Effekt wird zum einen durch die strenge Retention der Proteine in diesem Kompartiment, zum anderen durch einen Rücktransport der rekombinanten Proteine ins ER erzielt (Übersicht bei Gomord *et al.*, 1999). Zusätzlich zum Einfluss auf die Glycosylierung gilt ER-Retention als Methode der Wahl zur optimalen Antikörperproduktion in transgenen Pflanzen.

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Expressionskassetten enthielten am C-Terminus die KDEL Sequenz (vgl. Abb. III-1). Dies resultierte in Antikörpervarianten mit vier ER-Retentionssignalen. Die *N*-Glycane der rekombinanten Immunglobuline aus den Tabakblättern wurden mit Massenspektrometrie untersucht. Bei allen acht Antikörpern wurden überwiegend OMT *N*-Glycane nachgewiesen, wobei Man7 bei allen dominierte (vgl. Kapitel III.5.1.2). Komplexe *N*-Glycane mit $\beta(1,2)$ -Xylose- und $\alpha(1,3)$ -Fucoseresten konnten trotz KDEL detektiert werden und deuten auf eine unvollständige ER-Retention hin. Lediglich Sriraman *et al.* (Antikörper cPIPP, 2004) und Petruccelli *et al.* (Antikörper 14D9, 2006) wiesen bei rekombinanten IgGs aus Tabakpflanzen ausschließlich OMT *N*-Glycane nach. Die KDEL ER-Retentionssignale befanden sich bei beiden Untersuchungen jeweils an leichten und schweren Ketten der entsprechenden Immunglobuline. Sriraman *et al.* verwendeten *N. tabacum* cv. Petite Havana SR1, während Petruccelli *et al.* *N. tabacum* cv. Xanthi NN zur pflanzlichen Expression nutzten. Eine Reihe anderer Autoren konnten trotz KDEL komplexe *N*-Glycane an den schweren Ketten der jeweiligen IgGs detektieren (Ko *et al.*, 2003; Tekoah *et al.*, 2004; Triguero *et al.*, 2005; Rademacher *et al.*, 2008). Die Akkumulation der rekombinanten Proteine erfolgte bei den Untersuchungen von Triguero *et al.* (2005, *N. tabacum* cv. Petite Havana SR1) und Ko *et al.* (2003, *N. tabacum* cv. Xanthi) bzw. Tekoah *et al.* (2004, *N. tabacum* cv. Xanthi) in Tabak. Da auch Petruccelli *et al.* (2006) und Sriraman *et al.* (2004) diese Sorten verwendeten, schließt dies einen Einfluss auf die *N*-Glycosylierung aus. Rademacher *et al.* (2008) konnten bei dem im Maisendosperm akkumulierten Antikörper 2G12 vorwiegend *N*-Glycane ohne die Golgi-spezifischen Modifizierungen nachweisen. Allerdings war ein Großteil der *N*-Glycane auf GlcNAc-Reste (*N*-Acetylglucosamin) reduziert.

In den Untersuchungen von Triguero *et al.* (2005) und Rademacher *et al.* (2008) besaßen die IgG-Moleküle das C-terminale KDEL ER-Retentionssignal an allen vier Antikörperketten. Dies traf lediglich für die schweren Ketten des Immunglobulins bei Ko *et al.* (2003) bzw. Tekoah *et al.* (2004) zu. Im Gegensatz dazu wiesen Tekoah *et al.* verschiedene komplexe *N*-Glycane bei einem weiteren Antikörper, der jedoch kein KDEL-Signal besaß, nach. Ob ein Vorhandensein von KDEL an allen Antikörperketten für die effiziente Retention der rekombinanten Immunglobuline im ER notwendig ist, lässt sich somit nicht eindeutig klären. Abweichungen im *N*-Glycosylierungsmuster der pflanzlich exprimierten Antikörper können auch durch Unterschiede in der Antikörpersequenz bedingt sein. Im Gegensatz zu den 2F5 Varianten wurden bei allen 2G12 Antikörpern deutlich höhere Anteile an OMT und niedrige Anteile an CT *N*-Glycanen nachgewiesen (vgl. Kapitel III.5.1.2).

Sriraman *et al.* (2004) und Triguero *et al.* (2005) mutmaßten, dass eine längere AS-Sequenz des ER-Retentionssignals die Zugänglichkeit von KDEL generell verbessert und somit die Interaktionen mit dem KDEL-Rezeptor positiv beeinflusst. Diese Annahme würde die Ergebnisse zu den 2F5 Antikörpervarianten erklären (vgl. Tab. III-5). Quantitativ höhere Mengen an OMT *N*-Glycanen wurden für Antikörpervarianten mit ELP-Fusion an den leichten Ketten nachgewiesen (^{Nt}2F5_{LELP} und ^{Nt}2F5_{ELP}), wohingegen Immunglobuline ohne ELP bzw. mit ELP ausschließlich an den schweren Ketten deutlich geringere Anteile an oligo-mannosidischen *N*-Glycanformen besaßen (^{Nt}2F5 und ^{Nt}2F5_{HELP}). KDEL an den LC-ELP-Fusionen könnte für den KDEL-Rezeptor besser zugänglich sein und infolgedessen die Retention der assemblierten Antikörper im ER erhöhen. Bei den pflanzlich exprimierten 2G12 Immunglobulinen wurde dieses Phänomen jedoch nicht nachgewiesen.

Das Auftreten von komplexen *N*-Glycanen trotz ER-Retentionssignal kann einerseits mit dem Rücktransport vom Golgi-Apparat zum ER erklärt werden (Galili *et al.*, 1998; Pagny *et al.*, 2000). Andererseits besteht die Möglichkeit, dass bedingt durch die starke Überexpression der Immunglobulingene, eine 100%-ige „Sicherheit“ der ER-Retention nicht gegeben ist. Die rekombinanten Proteine wandern, durch Überlastung des „Systems“, somit in den Golgi-Apparat, wo deren weitere Glycosylierungen erfolgen. Bereits Van Droogenbroeck *et al.* (2007) postulierten diese Möglichkeit anhand von Ergebnissen zur Akkumulation rekombinanter scFv-Fc-Fusionen in Samen von *A. thaliana*.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die 2F5 Antikörpervarianten unterstützen die erste Annahme. Bei den komplexen *N*-Glycanen der 2F5 IgGs liegt die Form GnGnX in relativ hohen Mengen vor (vgl. Abb. III-22). Xylosyltransferasen befinden sich im medialen Golgi-Apparat, wohingegen Fucosyltransferasen im *trans* Golgi lokalisiert sind (Fitchette-Laine *et al.*, 1994). Ein Transport der rekombinanten Proteine aus dem ER in den Golgi-Apparat mit anschließendem Rücktransfer würde den relativ hohen Anteil an GnGnX im Vergleich zu den geringen Mengen an GnGnXF belegen. Ein „Steckenbleiben“ der rekombinanten Proteine zwischen medialem und *trans* Golgi wäre eine weitere Erklärung der vorliegenden *N*-Glycosylierungsmuster. Anhand der Ergebnisse der Massenspektrometrie kann dies jedoch

nicht eindeutig geklärt werden. Ein Einfluss von ELP auf den intrazellulären Transport der rekombinanten Proteine und auch auf die verschiedenen Enzyme der *N*-Glycosylierung wurde mit den Ergebnissen nicht nachgewiesen. Die *N*-Glycanmuster der verschiedenen Antikörpervarianten mit und ohne ELP waren qualitativ nahezu identisch.

Funktionalität pflanzlich exprimierter Immunglobuline

Wie bereits erwähnt, bewirken modifizierte *N*-Glycane eine reduzierte Affinität der Fc-Rezeptoren, C1q sowie weiterer Faktoren. Dies wiederum kann zu einem Ausfall der Effektorfunktionen des Antikörpers führen. Die Antigenbindung wird infolge von Änderungen der *N*-Glycane an der C_H2-Domäne von Antikörpern jedoch nicht beeinflusst (Übersichten bei Wright & Morrison, 1997 und Rudd *et al.*, 2001). Für viele in Pflanzen exprimierte Antikörper wurde generell biologische Aktivität, d. h. effektive Bindung des jeweiligen Antigens gezeigt (During *et al.*, 1990; Ma *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1995; Voss *et al.*, 1995; Zeitlin *et al.*, 1998; Khoudi *et al.*, 1999; Vaquero *et al.*, 1999; De Wilde *et al.*, 2002; Bouquin *et al.*, 2002; Kathuria *et al.*, 2002; Ramirez *et al.*, 2003; Ludwig *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2005; Alamillo *et al.*, 2006). Nicht glycosylierte Antikörper sind ebenfalls in der Lage das entsprechende Antigen zu binden. Nuttall *et al.* (2005) exprimierten den IgG Guy's 13 (Ma *et al.*, 1994) mit und ohne Mutationen in den Glycosylierungsstellen der schweren Ketten in Tabakprotoplasten. Sie zeigten die korrekte Zusammenlagerung der einzelnen Antikörperketten zum vollständigen Immunglobulin und die Bindung zum Antigen (SA I/II). Ein nicht glycosylierter Antikörper (Nemotuzumab bzw. TheraCIM[®]) gegen den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-R, engl. für *epidermal growth factor receptor*) wurde transient in Pflanzen exprimiert und dessen Bindung zum entsprechenden Antigen auf der Oberfläche von humanen Tumorzellen nachgewiesen (Rodriguez *et al.*, 2005). Der Antikörper C225 (Cetuximab bzw. Erbitux[®]), der ebenfalls gegen EGF-R gerichtet ist, wurde in glycosylierter und nicht glycosylierter Form im Maiskorn akkumuliert (Ludwig *et al.*, 2004). Beide Varianten zeigten im Vergleich zum Standard aus Säugerzellkultur ähnliche Bindungseigenschaften zum Antigen. Die Halbwertszeit des glycosylierten Antikörpers war allerdings deutlich reduziert.

Inwieweit ein Antikörper aus dem pflanzlichen ER neben der Antigenerkennung auch die Effektorfunktionen besitzt, untersuchten Brodzik *et al.* (2006) am Beispiel eines Antikörpers, der gegen das Lewis Y Oligosaccharidantigen gerichtet ist, das bei Krebsgeschwülsten überexprimiert wird. Sie zeigten, dass der Antikörper aus Pflanzen mit Brust- sowie Darmkrebszellen interagiert und ein, im Vergleich zum Kontrollantikörper, ähnliches Bindungsverhalten an den FcγRI (Fc-Rezeptor) aufwies. In einem Test zur ADCC konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Immunglobulin aus Pflanzen und dem Standard gefunden werden. Die Bindung von FcγRI an den in BY2 Suspensionszellkultur hergestellten anti-HIV-1 Antikörper 2F5 wurde von Sack *et al.* (2007) bestätigt. Bei diesen Untersuchungen konnten jedoch geringfügige Unterschiede in der Dissoziation des Rezeptors

im Vergleich zum Standardantikörper aus CHO-Zellen und einem weiteren, in Pflanzen exprimierten IgG, identifiziert werden. Die aufgeführten Beispiele für die Produktion rekombinanter Antikörper aus Pflanzen belegen die Fähigkeit der Immunglobuline zur effektiven Antigenbindung sowie die Beibehaltung der essenziellen Effektorfunktionen.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde das Bindungsverhalten der verschiedenen Antikörpervarianten zunächst durch ELISA ermittelt. Anhand dieser Experimente sollte ein möglicher Einfluss des Fusionspartners auf die Antigenbindung untersucht werden. Die affinitätsgereinigten Antikörper ohne ELP aus Tabakblättern (^{Nt}2F5 und ^{Nt}2G12) zeigten nur geringfügige Unterschiede in der Erkennung ihres spezifischen Antigens im Vergleich zu den Standardantikörpern aus CHO-Zellen (vgl. Abb. III-29B, Abb. III-31). Differenzen in der Antigenbindung des ^{Nt}2F5 bei Verwendung von Pflanzenrohextrakt oder affinitätsgereinigtem Immunglobulin konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. III-24A, Abb. III-31). Eine genaue Aussage über das Bindungsverhalten der Antikörper-ELP-Fusionen konnte mit ELISA jedoch nicht getroffen werden. 2F5 Varianten mit ELP an leichten und/oder schweren Ketten (^{Nt}2F5_{LELP}, ^{Nt}2F5_{HELP}, ^{Nt}2F5_{ELP}) wiesen zwar die Bindung zum Antigen auf, allerdings mit einem deutlich niedrigeren Sättigungssignal (vgl. Abb. III-24B). Aufgrund der Ergebnisse weiterer Experimente (*Sandwich*-ELISA, Western Blot, Protein A-Affinitätschromatographie, Daten nicht gezeigt) wird vermutet, dass bestimmte Antikörperregionen durch die ELP-Fusionspartner verdeckt werden und eine Interaktion mit anderen Proteinen nicht mehr möglich ist. Dies muss sich allerdings nicht zwangsläufig auf die entsprechenden Paratope der Immunglobuline beziehen. Vielmehr kann es sich auch um die Bindungsstellen des Fc-spezifischen Antikörpers handeln, der im ELISA zur Detektion verwendet wurde (vgl. Kapitel II.2.4.5). Die Zugänglichkeit der Protein A- oder Protein L-Bindestellen der Immunglobuline kann durch ELP ebenfalls verringert sein. Aus diesem Grund wurde für eine Quantifizierung der Antikörpermengen in Blattextrakten der Western Blot im Gegensatz zum *Sandwich*-ELISA verwendet (vgl. Kapitel III.3). Ein Einfluss von ELP auf den Nachweis der Antigenbindung im ELISA konnte bei scFv-ELP-Fusionen nicht gezeigt werden. Scheller *et al.* (2006) wiesen eine höhere Aktivität der im ELISA eingesetzten Samenextrakte mit scFv-ELP nach, die etwa der gesteigerten Akkumulation der Fusionsproteine entsprach. Die Affinitätskonstanten der Bindung zwischen scFv mit und ohne ELP und Antigen waren identisch.

Binden Antikörper-ELP-Fusionen ihr Antigen?

Für eine detaillierte funktionelle Charakterisierung der verschiedenen, in Tabakblättern exprimierten Antikörpervarianten wurde die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse eingesetzt. Mit einem BIACORE2000 Gerät und der entsprechenden Software konnten die kinetischen Parameter (*on rate* Konstante k_{on} , *off rate* Konstante k_{off} , Dissoziationskonstante K_D) der Antigenbindung bestimmt und mit dem jeweiligen CHO-Standard verglichen werden.

Die 2F5 Antikörpervarianten zeigten kaum Unterschiede in Assoziations- und Dissoziationsverhalten von Fuzeon[®], dem bei diesen Untersuchungen verwendeten Antigen (vgl. Abb. III-26, Tab. III-7). Die Bindungskurven der Varianten ^{Nt}2F5 und ^{CHO}2F5 überlagern sich und die geringen Unterschiede der kinetischen Parameter sind somit nicht signifikant. Für die 2G12 Präparationen wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Die Differenzen zwischen dem Standardantikörper ^{CHO}2G12 und ^{Nt}2G12, ^{Nt}2G12_{HELP} sowie ^{Nt}2G12_{ELP} waren marginal. ^{Nt}2G12_{LELP} unterschied sich hinsichtlich der k_{off} geringfügig von den anderen Varianten (vgl. Abb. III-30, Tab. III-9). Wie bereits erwähnt, sind die ELPs nicht die Ursache (vgl. Kapitel III.5.2.3). Eine durch ELP hervorgerufene Verminderung der Antigenbindung würde k_{on} beeinflussen. Vielmehr sollte die Qualität der ^{Nt}2G12_{LELP} Präparation zur Klärung der Ergebnisse herangezogen werden. Die Analyse einer neuen, verbesserten Präparation von ^{Nt}2G12_{LELP} kann zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse beitragen.

Generell ist bei kinetischen Untersuchungen der Antigenbindung zu beachten, dass oftmals die Konzentration der verwendeten Proteine, in diesem Fall des Analyts (Antigens), deutlich höher angegeben ist als die tatsächlich aktive Konzentration (Menge an Analyt, die an den Liganden wirklich bindet). Demzufolge können die kinetischen Parameter unterschätzt werden (Zeder-Lutz *et al.*, 2001).

Die im Rahmen der Dissertation berechneten kinetischen Parameter lassen den Schluss zu, dass die Paratope der Immunglobuline durch ELP-Fusion nicht beeinflusst werden. Vielmehr weisen die Daten auf eine exakte Proteinsynthese, -faltung und Zusammenlagerung der einzelnen Ketten zum vollständigen Antikörpermolekül mit intaktem Antigenbindungsverhalten in Tabakpflanzen hin.

Basierend auf der Methode von Sack *et al.* (2007) wurden die absoluten Aktivitäten (Bindungsaktivitäten) der 2F5 Antikörpervarianten gegenüber dem Trimer Fuzeon[®], der als Antigen diente, mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse ermittelt. Unterschiede zwischen dem 2F5 ohne ELP (^{Nt}2F5) und dem Standard wurden nicht gefunden. Der rekombinante Antikörper aus Tabakblättern wies sogar eine geringfügig höhere Aktivität gegenüber Fuzeon[®] auf. Absolute Aktivitäten von über 100% wurden für die 2F5 ELP-Fusionen erhalten (vgl. Tab. III-8). Da eine Sättigung der Paratope bei den verschiedenen 2G12 Varianten mit dem Antigen gp120 nicht erreicht wurde, konnten deren Bindungsaktivitäten lediglich relativ zum Standard angegeben werden. Werte von über 100% wurden ebenfalls für die Varianten ^{Nt}2G12_{HELP} und ^{Nt}2G12_{ELP} erreicht (vgl. Tab. III-10). Der Antikörper ^{Nt}2G12 wies eine geringere relative Aktivität im Vergleich zum Standardantikörper auf. Die Präparation ^{Nt}2G12_{LELP} unterschied sich wiederum von den weiteren 2G12 ELP-Varianten. Da ein Einfluss der ELPs auf die antigenbindenden Domänen des ^{Nt}2G12_{LELP} nicht angenommen wird, sollten weitere Experimente mit neuen Proteinpräparationen diese Unterschiede klären können (siehe oben).

Für eine Interpretation der Aktivitäten von über 100% bei den ELP-Fusionen (außer N^t2G12_{LELP}) wurden mögliche Masseverluste der Antikörpervarianten kalkuliert. Nur unter Verwendung eines höheren Molekulargewichts als tatsächlich vorhanden, können Werte von über 100% nach den Formeln (1) und (3) errechnet werden (vgl. Kapitel III.5.2.2, III.5.2.3). Unterschiede im Molekulargewicht können mit dem Fehlen von Antikörperketten und somit dem Vorhandensein unvollständiger IgGs und/oder der Abwesenheit von ELP-Fusionspartnern erklärt werden. Diese reduzierten Moleküle könnten bevorzugt an der Protein A-Oberfläche des Sensorchips binden und die Ergebnisse der geschätzten Aktivitäten beeinflussen. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden die 2F5 Antikörper-ELP-Fusionen nach Immobilisierung an dem Sensorchip (über Protein A) eluiert und die erhaltenen Proben im Vergleich zu den eingesetzten Antikörperpräparationen analysiert. Unvollständige 2F5 IgG-Moleküle wurden nicht gefunden und ein Masseverlust bei den ELP-Varianten eindeutig ausgeschlossen (vgl. Abb. III-28).

Eine mögliche Orientierung der Antikörpervarianten mit ELP in der Dextranmatrix des Sensorchips kann ebenso zum Verständnis der hier diskutierten Ergebnisse beitragen. Am Beispiel der 2F5 Immunglobuline wird dieser Aspekt näher erläutert. Aufgrund der C-terminalen ELP-Fusionen dringen die Antikörpervarianten N^t2F5_{LELP} , N^t2F5_{HELP} und N^t2F5_{ELP} lediglich gerichtet in die Dextranmatrix ein (Abb. IV-1). Für die ELPs (ca. 80 nm) geschieht dies auch nur unvollständig. Im Gegensatz dazu ordnen sich die Antikörper ohne ELP (N^t2F5 , $CHO2F5$) zufällig an.

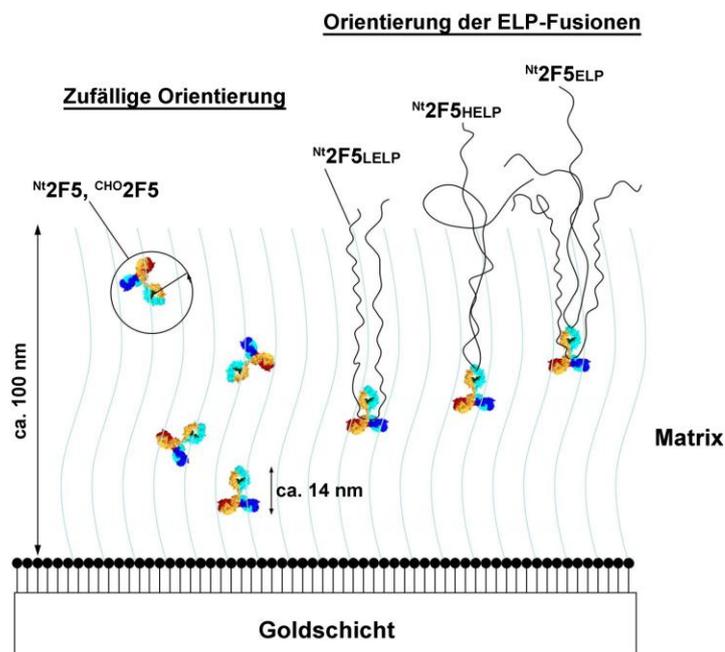


Abb. IV-1: Schematische Darstellung der Orientierung der verschiedenen 2F5 Antikörpervarianten in der Dextranmatrix des Biacore-Sensorchips. Für die Illustration der Antikörpergröße (ca. 14 nm), Länge des ELP-Fusionspartners (ca. 80 nm) und der Dicke der Dextranmatrix (ca. 100 nm) wurden die Größenverhältnisse beibehalten. Abbildung nach M. Sack (RWTH Aachen, Aachen, BRD).

Die gerichtete Orientierung der Immunglobuline resultiert aus einem veränderten Masseschwerpunkt der Antikörper-ELP-Fusionen. In Abb. VII-10 im Anhang sind diese für

die 2F5 Antikörpervarianten dargestellt. Das unvollständige Eindringen der ELPs und die Orientierung der IgGs verursachen ein geringeres SPR-Signal. Bereits Jung *et al.* (1998) stellten fest, dass zufällig verteilte Moleküle, die sich nah an der Oberfläche eines Sensorchips befinden, ein stärkeres Signal erzeugen als weiter entfernt liegende. Ursache hierfür ist der exponentielle Zerfall der evaneszenten Welle. Bei den 2F5 Antikörpern ohne ELP befindet sich der Masseschwerpunkt nach Bindung des Antigens (Fuzeon[®]) in der Mitte der Protein A-Bindestellen der schweren Ketten. Die Schwerpunkte der ELP-Varianten liegen augenscheinlich davon und somit auch deutlich von der Oberfläche des Sensorchips entfernt (vgl. Anhang Abb. VII-10). Die Änderung des SPR-Signals kann daher geringer als erwartet ausfallen.

Eine weitere Erklärung für die geschätzten Aktivitäten der Antikörper-ELP-Fusionen von über 100% basiert auf der Abhängigkeit des SPR-Signals vom Brechungsindex der Moleküle, die an der Sensoroberfläche immobilisiert wurden. Änderungen im Brechungsindex sind direkt proportional zur Masseänderung der gebundenen Moleküle (Stenberg *et al.*, 1991). Die meisten Proteine weisen einen Brechungsindex von 1,6 auf (Armstrong *et al.*, 1947). Bei Glyco- und Lipoproteinen ist dieser jedoch etwas geringer (1,51; Armstrong *et al.*, 1947). Im Fall der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse wird allgemein angenommen, dass der Anstieg des Signals um 1 RU einer Erhöhung der Proteinkonzentration um 1 pg/mm² entspricht (Übersicht bei Jonsson *et al.*, 1991). Geringe Unterschiede im Brechungsindex der verschiedenen Proteine werden meist ignoriert. Über die Struktur des in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten ELP-Fusionspartners ist wenig bekannt. Aufgrund ihrer ungewöhnlichen Aminosäurezusammensetzung können ELPs, aber auch deren Fusionsproteine, ein verändertes optisches Verhalten bei der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse zeigen, das sich klar von dem der „normalen“ Proteine abgrenzt. Dies wiederum kann die SPR-Signale der über Protein A gebundenen Antikörpervarianten (R_{AK} , vgl. Tab. III-8, Tab. III-10) modifizieren und in nicht realen Werten für die geschätzten Aktivitäten resultieren. Bereits Zako *et al.* (2001) beschrieben Veränderungen des SPR-Signals durch Konformationsänderungen eines am Sensorchip immobilisierten Proteins. Das SPR-Signal immobilisierter Luciferase nahm nach Denaturierung des Proteins ab und stieg bei anschließender Renaturierung wieder an. Sota *et al.* (1998) zeigten erstmals die Beeinflussung des SPR-Signals durch Denaturierung eines immobilisierten Proteins.

Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen der Biacore-Analysen ist eine exakte Bestimmung der Bindungsaktivitäten von Antikörper-ELP-Fusionen nicht möglich. Allerdings konnte anhand der Resultate der Bindungsstudien ein direkter Einfluss der ELPs auf die Paratope der Antikörper eindeutig ausgeschlossen werden.

Inaktivieren rekombinante Antikörper aus Pflanzen HIV-1 in vitro?

Letztendlich ist die Funktionalität (Virusneutralisation) der in Pflanzen produzierten Antikörper-ELP-Fusionen ausschlaggebend für deren weitere Nutzung. Die Fähigkeit

pflanzlich exprimierter Immunglobuline entsprechende Viruspartikel zu neutralisieren wurde schon mehrfach dokumentiert. Zeitlin *et al.* (1998) untersuchten die *in vitro* Neutralisation des Herpes-simplex-Virus mit einem Antikörper aus Pflanzen und Säugerzellkultur. Sie stellten keine Unterschiede zwischen den Immunglobulinen fest. Beide Antikörper waren für 24 h bei 37°C im Zervixschleim und Sperma stabil. In einer weiteren Studie wurden diese Antikörper hinsichtlich ihrer Stabilität bei vaginalem pH-Wert evaluiert. Unterschiede zwischen beiden IgGs wurden wiederum nicht nachgewiesen (Castle *et al.*, 2002). Antikörper können somit vaginal als Bestandteil von bestimmten Substanzgemischen (*microbicides*) zur Verhinderung von sexuell übertragbaren Krankheiten, u. a. AIDS, eingesetzt werden. Immunglobuline gegen den Erreger von Tollwut (Rabiesvirus, *Rhabdoviridae*) wurden ebenfalls in Pflanzen exprimiert und hinsichtlich ihrer Neutralisationsfähigkeit untersucht. Der in *N. tabacum* produzierte Antikörper zeigte die gleiche Effizienz wie das entsprechende IgG aus Säugerzellen (Ko *et al.*, 2003). Die Neutralisation des *Transmissible Gastroenteritis Virus* (TGEV) durch ein pflanzlich hergestelltes IgA-Molekül wurde ebenfalls bestätigt (Alamillo *et al.*, 2006). Durch die orale Verabreichung von Pflanzenextrakten mit diesem Antikörper an Ferkel wurde ein Schutz vor dem Virus erreicht.

Alle aus transgenen Pflanzen gereinigten anti-HIV Antikörpervarianten wurden im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit POLYMUN Scientific Immunbiologische Forschung GmbH (Wien, Österreich) hinsichtlich ihrer *in vitro* Neutralisation (*in vitro* Aktivität) untersucht. Im Vergleich zum Standardantikörper war die Fähigkeit von ^{Nt}2F5 zur HIV-Neutralisation trotz identischer kinetischer Parameter bei der Fuzeon[®]-Bindung (vgl. Tab. III-7), deutlich geringer. Für die 2F5 ELP-Fusionen konnte keine Inaktivierung des HI-Virus, trotz identischer Bindungskinetiken zu Fuzeon[®], nachgewiesen werden (vgl. Kapitel III.5.2.4). Sack *et al.* (2007) zeigten für den in BY2 Suspensionszellkultur produzierten Antikörper 2F5 eine 3-fach geringere HIV-Neutralisation im Vergleich zu ^{CHO}2F5. Sie postulierten, dass geringe strukturelle Unterschiede außerhalb der antigenbindenden Domänen der Antikörper dafür verantwortlich sind. Differenzen in der N-Glycosylierung und das Vorhandensein einer C-terminalen SEKDEL Sequenz bei dem Antikörper aus BY2 Suspensionszellen können nach Sack *et al.* die möglichen Ursachen sein. Zusätzlich sind Fremdstoffe oder Antikörperaggregate, die in den Protein A-Präparationen vorliegen, aber auch nicht identifizierte Proteinmodifizierungen, für die Unterschiede zwischen Antigenbindung und Virusneutralisation in Betracht zu ziehen. Dies gilt nicht nur für die ^{Nt}2F5 Ergebnisse sondern auch für alle weiteren Antikörpervarianten.

Unterschiede im Neutralisationsverhalten von Antikörpern aus CHO-Zellen oder Pflanzen können mit einem abweichenden N-Glycanmuster begründet werden. Der Antikörper F240 (IgG₁), der ebenfalls gegen ein Epitop des HIV-1 gp41 gerichtet ist, kann Viren nicht inaktivieren, wenn er aus Hybridomzellen stammt. Nach Produktion in CHO-Zellen wurde jedoch eine starke Neutralisation von mehreren HIV-Isolaten festgestellt (Miranda *et al.*, 2007). Da die mRNA von F240 aus Hybridom- und CHO-Zellen keine Sequenzunterschiede

aufwies, postulierten Miranda *et al.* die Existenz von zellspezifischen, posttranslationalen Modifizierungen. Sie zeigten, dass der Antikörper aus CHO-Zellen einen höheren Anteil an terminalen *N*-Glycanen (Galactose- oder Sialinsäurereste), aber auch Fucose aufwies. Differenzen im Gehalt an Mannose gab es jedoch nicht. Unterschiede in der *N*-Glycosylierung bei Pflanzen und Säugern sind seit langem bekannt und können, wie bereits oben erwähnt, eine mögliche Erklärung für das divergente Verhalten von ^{Nt}2F5 und ^{CHO}2F5 im Virusneutralisationstest sein (vgl. Kapitel I.1, Übersicht bei Lerouge *et al.*, 1998). Mit dieser Annahme können die Ergebnisse der 2F5-ELP-Fusionen jedoch nicht begründet werden, da keine qualitativen Abweichungen im Glycanmuster der in Tabak exprimierten 2F5 Antikörper vorhanden waren (vgl. Abb. III-22). Für die 2G12 Varianten gilt dies ebenfalls (vgl. Abb. III-23). Zur Bestimmung der 2F5 Antigenbindung mit ELISA aber auch SPR wurden in der vorliegenden Arbeit keine Viruspartikel sondern lediglich Teile des gp41, lösliche Antigene, verwendet (vgl. Kapitel II.1.7). Bei Vorliegen des kompletten Virions kann die Bindungseffizienz des Antikörpers deutlich verändert sein und in einer geringeren *in vitro* Aktivität resultieren.

Eine Virusneutralisation durch das IgG 2F5 erfolgt während des Fusionsprozesses mit der Wirtszelle (Wolbank *et al.*, 2003). Da sich das 2F5 Epitop in der Nähe der Virusmembran befindet, kann es aus physikalischer Sicht für „größere“ Antikörpermoleküle, z. B. ELP-Fusionen, schwerer zugänglich sein. Ofek *et al.* (2004) zeigten, dass lediglich 10 von 22 Aminosäuren der CDR H3-Domäne des 2F5 mit gp41 interagieren. Wolbank *et al.* (2003) untersuchten 2F5-IgG, 2F5-IgA und 2F5-IgM hinsichtlich Antigenbindung und Virusneutralisation. Die Antigenbindung von 2F5-IgG und 2F5-IgA waren annähernd gleich, wobei für die IgM-Klasse deutlich schlechtere Werte erzielt wurden. Im Syncytieninhibitionstest rief 2F5-IgG gegenüber IgA und IgM die effizientere Reaktion hervor. Wolbank *et al.* (2003) postulierten, dass die Zugänglichkeit des 2F5 Epitops innerhalb des funktionsfähigen gp120/gp41-Komplexes für 2F5-IgA oder 2F5-IgM verschlechtert ist und somit aus physikalischer Sicht limitierend auf die Neutralisationskapazität wirkt. Im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit wirken die ELPs an den leichten und/oder schweren Immunglobulinketten von 2F5 somit „störend“ auf die Funktionalität des Antikörpers, da das Epitop für diese „größeren“ Immunglobuline schlechter erreichbar ist.

Im Gegensatz zu ^{Nt}2F5 konnte für ^{Nt}2G12 eine deutlich verbesserte Neutralisationsfähigkeit im Vergleich zum Standardantikörper nachgewiesen werden, obwohl die mit Biacore ermittelte Bindungsaktivität deutlich schlechter war als bei ^{CHO}2G12 (vgl. Tab. III-10, Tab. III-11). Bereits Rademacher *et al.* (2008) erhielten eine vierfach höhere *in vitro* HIV-Neutralisation von ^{Zm}2G12_{SEKDEL} gegenüber ^{CHO}2G12. Die 2G12 ELP-Fusionen grenzten sich jedoch von ^{Nt}2G12 und ^{CHO}2G12 ab, wobei die Variante mit ELP an beiden schweren Ketten des Immunglobulins lediglich eine um Faktor 1,4 schlechtere IC₅₀ gegenüber dem Standardantikörper aufwies (vgl. Tab. III-11). Die *N*-Glycosylierungsmuster der verschiedenen 2G12 Antikörpervarianten waren qualitativ und quantitativ nahezu identisch

(vgl. Abb. III-23, Tab. III-6) und schließen einen Einfluss dieser posttranslationalen Modifizierung auf die unterschiedliche *in vitro* Aktivität aus.

Differenzen im Neutralisationsverhalten zwischen den beiden Antikörpern ohne ELP aus Tabak (^{Nt}2F5 und ^{Nt}2G12) können mit deren verschiedenen Epitopen auf der Oberfläche des HI-Virus erklärt werden. Wie bereits erwähnt, befindet sich das 2F5 Epitop im membrannahen Bereich von gp41 und wird lediglich von 10 AS der CDR H3-Domäne des Antikörpers gebunden (Ofek *et al.*, 2004). Nach Untersuchungen von Calarese *et al.* (2003) interagiert 2G12 über CDR L3, CDR H1, CDR H2 sowie CDR H3 mit Zuckerresten auf gp120. Wyatt *et al.* (1998) postulierten, dass der Antikörper 2G12 die Interaktion zwischen dem gp120/gp41-Komplex und dem Co-Rezeptor nach Bindung von CD4 beeinflusst.

Die gp120-Bindungskinetiken der 2G12 Antikörper-ELP-Fusionen wiesen im Vergleich zu dem Standardantikörper keine bedeutenden Unterschiede auf (vgl. Tab. III-9). Infolgedessen wurde ein Einfluss der ELPs auf die Paratope der Immunglobuline, wie auch schon für die 2F5 Varianten, ausgeschlossen. Bereits Cavacini *et al.* (1994) zeigten, dass die Bindung eines Antikörpers an das jeweilige Antigen nicht zwangsläufig auch eine effektive Neutralisation des Virus verursacht. Sie untersuchten Antikörperfragmente [IgG, F(ab')₂, Fab] des Immunglobulins F105, das gegen die CD4-Bindestelle des HIV gp120 gerichtet ist. Eine effektive Neutralisation von freien Viruspartikeln konnte nur für die bivalenten Antikörper, IgG und F(ab')₂, nachgewiesen werden. Cavacini *et al.* nahmen an, dass Unterschiede in der gp120-Konformation, hervorgerufen durch die Bindung der verschiedenen Antikörperfragmente, die Differenzen im Virusneutralisationstest erklären. Dies könnte auch eine mögliche Erläuterung für die Ergebnisse der 2G12-ELP-Varianten sein.

Der Einfluss der Antikörperklasse (Wolbank *et al.*, 2003) und der Subklasse (Cavacini *et al.*, 1995; Miranda *et al.*, 2007) auf die HIV-Neutralisation wurde bereits näher untersucht. Cavacini *et al.* (1995) verglichen u. a. die Neutralisation des HIV-Stamms RF durch F105-IgG₃ und F105-IgG₁, wobei das IgG₃-Molekül gegenüber dem Virus deutlich effektiver war. Sie erklärten die Differenzen bei der Virusinaktivierung mit auftretenden strukturellen Unterschieden innerhalb des gp120. Diese wurden durch die IgG₃ Variante hervorgerufen. Miranda *et al.* (2007) zeigten ebenfalls, dass F240-IgG₃ HI-Viren effizienter inaktivieren. Wolbank *et al.* (2003) evaluierten 2G12-IgG und 2G12-IgM hinsichtlich Antigenbindung und Virusneutralisation. Die Antigenbindung von 2G12-IgM war deutlich besser als für die IgG-Variante und auch im Syncytieninhibitionstest übertraf 2G12-IgM deutlich 2G12-IgG. Wolbank *et al.* postulierten, dass die „Größe“ der Immunglobuline für die Resultate verantwortlich ist. Das Pentamer von 2G12-IgM kann die Anlagerung des Virus an mögliche Wirtszellen wirkungsvoller verhindern, als die entsprechend „kleinere“ IgG-Variante.

Bei der Diskussion der Ergebnisse für die 2G12 Varianten sind alle aufgeführten Aspekte in Betracht zu ziehen. Das verbesserte Neutralisationsverhalten des Antikörpers aus Tabakblättern ohne ELP (^{Nt}2G12) gegenüber ^{CHO}2G12 kann mit den bereits von Wolbank *et al.* (2003) postulierten polymeren Formen des 2G12 erklärt werden. Hierfür wäre zu

untersuchen, ob tatsächlich dimere Formen in der ^{Nt}2G12 Präparation, aber auch bei den ELP-Varianten, vorliegen. Das Fehlen dieser putativen Dimere bei den ELP-Fusionen könnte deren eingeschränkte Effizienz bei der HIV-Inaktivierung erklären. Bereits Rademacher *et al.* (2008) merkten an, dass das Vorhandensein von IgG-Dimeren im Pflanzenextrakt die HIV-Neutralisation positiv beeinflussen könnte. Rekombinante Antikörper aus Tabakblättern wurden nach einem abweichenden Protokoll von dem des CHO-Standards gereinigt. Unterschiede innerhalb dieses Prozesses könnten ebenfalls die Differenzen zwischen ^{CHO}2G12 und ^{Nt}2G12 im Virusneutralisationstest erklären. Ein Einfluss der Lage der ELP-Fusion bei den 2G12-ELP-Varianten ist jedoch offensichtlich. Anhand der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse erweisen sich ELP-Fusionen an den schweren Ketten des 2G12 im Hinblick auf die *in vitro* Aktivität als vorteilhaft. Um diese jedoch eindeutig zu bestätigen, sollten weitere Inaktivierungsstudien durchgeführt werden. Nachteilig bei dieser Antikörpervariante war jedoch das geringe Expressionsniveau in Tabakblättern (vgl. Kapitel III.3).

Fazit und Ausblick

Die vorliegende Doktorarbeit befasst sich mit der Expression und Charakterisierung von Antikörper-ELP-Fusionen in transgenen Pflanzen. Erstmals wurden multimere Proteine mit elastinähnlichen Polypeptiden fusioniert und näher untersucht. Die bereits postulierte Expressionssteigerung durch ELP konnte für die Immunglobulinketten aber auch für die kompletten Antikörper bestätigt werden. Der Fusionspartner ELP beeinflusste die Zusammenlagerung zum multimeren Protein nicht. Vielmehr unterstützen die Ergebnisse (pflanzliche *N*-Glycosylierung, Fähigkeit der Antikörper-ELP-Fusionen das entsprechende Antigen zu binden) die fehlerfreie Faltung der rekombinanten Proteine und deren korrekten Transport innerhalb der Pflanzenzelle. Die ELP-basierte Reinigung dieser Proteine vereinfacht die pflanzliche Produktion der Antikörperfusionen und reduziert den finanziellen Aufwand für diesen Prozess.

Die Anwendung der ELP-Fusionstechnologie wurde mit der vorliegenden Arbeit am Beispiel von zwei Antikörpern mit einer neutralisierenden Wirkung gegenüber vielen HIV-1-Isolaten demonstriert. Grundsätzlich kann jeder beliebige Antikörper, aber auch jedes Antigen, mit elastinähnlichen Polypeptiden fusioniert und exprimiert werden.

Zur weiteren Klärung der Ergebnisse der Virusinaktivierungstests sind zusätzliche Untersuchungen der rekombinanten ELP-Fusionsproteine notwendig. Vereinfachte Strukturmodelle der Antikörpervarianten sind hierfür ein erster Ansatz. Die Kernresonanzspektroskopie kann ebenso eingesetzt werden, um die Struktur der Antikörper-ELP-Fusionen näher zu untersuchen. Inwieweit die Länge des Fusionspartners einen Einfluss auf die Neutralisationsfähigkeit der Antikörper hat, sollte durch die Konstruktion neuer Expressionskassetten mit kürzeren ELP *tags* für die pflanzliche Produktion ermittelt werden. Eine Fokussierung auf samengestützte Expressionssysteme kann die Herstellung dieser

rekombinanten Proteine begünstigen. Selbstbefruchtende Kulturarten (Gerste, Erbse) könnten hierfür verwendet werden.

Weiterführende Studien zur Untersuchung der Antikörper-ELP-Fusionen an Schleimhäuten sind essenziell, um ihren Einsatz als Bestandteil von *microbicides* im Vaginalbereich zu untersuchen und somit einen wesentlichen Beitrag zur weiteren Behandlung von AIDS-Patienten und für die weltweite Bekämpfung der Immunschwächekrankheit zu leisten.

Im Rahmen des FP6/Pharma-Planta Projekts wird die Produktion eines pflanzlich hergestellten Antikörpers gegen HIV-1 angestrebt. Eine erste klinische Studie (*phase I clinical trial*) des Immunglobulins 2G12 aus Tabakpflanzen als Bestandteil eines im Vaginalbereich angewendeten *microbicide* soll Anfang 2009 durchgeführt werden (Pharma-Planta Meeting 2008, Maynooth, Irland).

Die pflanzliche Produktion von Antikörper-ELP-Fusionen in Kombination mit einer vereinfachten und kostengünstigen Reinigung kann die Bereitstellung großer Mengen an Pharmazeutika zur passiven Immunisierung von HIV-positiven Patienten besonders in Entwicklungsländern ermöglichen.

V Zusammenfassung

Pflanzen können als vielversprechende Expressionssysteme zur Produktion von rekombinanten Proteinen für Human- und Veterinärmedizin verwendet werden. Eine Vielzahl von Antikörpern und Antikörperderivaten wurde seit den ersten Berichten von pflanzlich hergestellten Immunglobulinen in verschiedenen Pflanzenarten produziert.

Die Antikörperketten von zwei HIV neutralisierenden Immunglobulinen (2F5 und 2G12) wurden mit elastinähnlichen Polypeptiden (ELP) fusioniert, um eine Akkumulationssteigerung der rekombinanten Proteine in transgenen Pflanzen zu erzielen. Ausgewählte Pflanzen mit Expression der Immunglobulingene wurden anschließend gekreuzt. Daraus resultierten vier verschiedene Antikörpervarianten: Ohne ELP, mit ELP an leichten oder schweren Ketten bzw. mit ELP an allen vier Antikörperketten (ubiquitäre Expression). Bei Pflanzen mit samenspezifischer Akkumulation der rekombinanten Proteine wurden Kreuzungen zur Erzeugung der Antikörper ohne und mit ELP an allen vier Ketten durchgeführt. Die ELP-basierte Expressionssteigerung konnte für die einzelnen Antikörperketten und auch die vollständigen Immunglobuline bestätigt werden.

Stabile, homozygote Tabaklinien mit Akkumulation der kompletten Antikörper wurden durch die Nutzung der Doppelhaploiden-Technik erzeugt. Ausgehend von einer embryogenen Pollenkultur wurden haploide Pflanzen regeneriert, deren Genomverdopplung zu Doppelhaploiden (DH) führte. Doppelhaploide Pflanzen mit Immunglobulingenexpression wurden identifiziert und deren Reinerbigkeit durch die Analyse der Nachkommen bestätigt. Ein Gendosiseffekt konnte ebenfalls nachgewiesen werden.

Affinitätsgereinigte Antikörper wurden hinsichtlich ihres Bindeverhaltens zum jeweiligen Antigen mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz näher charakterisiert. Die kinetischen Parameter der Antigenbindung waren nahezu identisch zu den Werten der aus CHO-Zellen stammenden Standardantikörper.

Am Fc-Teil aller rekombinanten Immunglobuline wurden überwiegend *N*-Glycane vom oligomannosidischen Typ identifiziert. Ein negativer Einfluss von ELP auf diese posttranslationale Modifizierung und Proteinqualität konnte nicht gefunden werden. Die Faltung, Zusammenlagerung und der Transport aller Antikörpervarianten wurden durch ELP nicht behindert.

In Pflanzen produzierte 2G12 Antikörper und Antikörper-ELP-Fusionen neutralisierten HI-Viren *in vitro*.

Experimente zur ELP-basierten Reinigung der rekombinanten Proteine führten zu einer starken Anreicherung der Antikörperfusionen aus Pflanzenextrakten.

Summary

Plants are promising vehicles for the expression of recombinant proteins with regard to medical and veterinary purposes. Since the first reports of recombinant antibodies derived from transgenic plants, various antibody derivatives have been produced in different crop species using several expression systems.

In order to enhance the accumulation of two HIV-1 neutralizing antibodies (2F5 and 2G12) in tobacco leaves and seeds, synthetic repeats of elastin-like polypeptides (ELPs) were C-terminally fused to both antibody chains. The individual chains were expressed both with and without C-terminal ELP fusion. Crossing these plants in all combinations resulted in transgenic lines producing the full antibodies in four formats in tobacco leaves, with ELP on either the light or heavy chains, on both or on neither. For seed-specific expression, plants without and with ELP on all four antibody chains were produced. An increase of the expression based on ELP fusion was confirmed for the individual antibody chains and for the full-length antibodies.

Homozygous lines offer a great potential for the large scale production of antibodies. Such lines can be created by self-pollination of F₁ plants and analysis of the next two generations. Alternatively, haploid plants can be produced by embryogenic pollen culture and the genome of these haploids can be doubled. The genome was doubled spontaneously or after colchicine treatment leading to doubled haploids (DH). Homozygosity of the DH plants was confirmed by the examination of the gene dosage effect and by testing the sexual progeny.

Characterization of the affinity-purified antibodies from tobacco leaves by surface plasmon resonance spectroscopy showed that the kinetic binding parameters were identical to those of the CHO cell counterparts lacking ELP. N-Glycan analysis of these preparations revealed that all four derivatives of 2F5 and 2G12 contained predominantly oligo-mannose type N-glycans. ELP fusion has no significant effect on N-glycan structure and no adverse effect on protein quality. ELP fusions do not interfere with folding, assembly, trafficking in the secretory pathway, or post-translational modification.

In vitro neutralization assays demonstrated that the HIV-1 inactivation capacity of the tobacco produced 2G12 was equivalent or even better compared to the CHO standard. ELP fusion to the heavy chains of 2G12 resulted in HIV neutralization with minor differences relative to the standard.

First experiments on the enrichment of recombinant antibody ELP fusions in tobacco leaf extracts were performed and indicated a simplified recovery of the recombinant proteins.

VI Literatur

- Adams, G.P. & Weiner, L.M.** (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* **23**:1147-1157.
- Akad, F.; Eybishtz, A.; Edelbaum, D.; Gorovits, R.; Dar-Issa, O.; Iraki, N. & Czosnek, H.** (2007) Making a friend from a foe: Expressing a GroEL gene from the whitefly *Bemisia tabaci* in the phloem of tomato plants confers resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Arch. Virol.* **152**:1323-1339.
- Alamillo, J.M.; Monger, W.; Sola, I.; Garcia, B.; Perrin, Y.; Bestagno, M.; Burrone, O.R.; Sabella, P.; Plana-Duran, J.; Enjuanes, L.; Lomonosoff, G.P. & Garcia, J.A.** (2006) Use of virus vectors for the expression in plants of active full-length and single chain anti-coronavirus antibodies. *Biotechnol. J.* **1**:1103-1111.
- Albrecht, H. & DeNardo, S.J.** (2006) Recombinant antibodies: From the laboratory to the clinic. *Cancer Biother. Radiopharm.* **21**:285-304.
- Alcami, J.** (2004) Advances in the immunopathogenesis of HIV infection. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **22**:486-496.
- Almqvist, K.C.; Niu, Y.Q.; McLean, M.D.; Mena, F.L.; Yau, K.Y.F.; Brown, K.; Brandle, J.E. & Hall, J.C.** (2004) Immunomodulation confers herbicide resistance in plants. *Plant Biotechnol. J.* **2**:189-197.
- Altmann, F.** (2007) The role of protein glycosylation in allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **142**:99-115.
- Altpeter, F.; Baisakh, N.; Beachy, R.; Bock, R.; Capell, T.; Christou, P.; Daniell, H.; Datta, K.; Datta, S.; Dix, P.J.; Fauquet, C.; Huang, N.; Kohli, A.; Mooibroek, H.; Nicholson, L.; Nguyen, T.T.; Nugent, G.; Raemakers, K.; Romano, A.; Somers, D.A.; Stoger, E.; Taylor, N. & Visser, R.** (2005) Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: Myths and realities. *Mol. Breed.* **15**:305-327.
- Armbruster, C.; Stiegler, G.M.; Vcelar, B.A.; Jager, W.; Koller, U.; Jilch, R.; Ammann, C.G.; Pruenster, M.; Stoiber, H. & Katinger, H.** (2004) Passive immunization with the anti-HIV-1 human monoclonal antibody (hMAb) 4E10 and the hMAb combination 4E10/2F5/2G12. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:915-920.
- Armbruster, C.; Stiegler, G.M.; Vcelar, B.A.; Jager, W.; Michael, N.L.; Vetter, N. & Katinger, H.** (2002) A phase I trial with two human monoclonal antibodies (hMAb 2F5, 2G12) against HIV-1. *AIDS* **16**:227-233.
- Armstrong, S.H.; Budka, M.J.E.; Morrison, K.C. & Hasson, M.** (1947) Preparation and properties of serum and plasma proteins. XII. The refractive properties of the proteins of human plasma and certain purified fractions. *J. Am. Chem. Soc.* **69**:1747-1753.
- Artsaenko, O.; Peisker, M.; Zur Nieden, U.; Fiedler, U.; Weiler, E.W.; Muntz, K. & Conrad, U.** (1995) Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *Plant J.* **8**:745-750.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidmann, J.G.; Smith, J.A. & Struhl, K.** (1998) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Baba, T.W.; Liska, V.; Hofmann-Lehmann, R.; Vlasak, J.; Xu, W.D.; Ayehunie, S.; Cavacini, L.A.; Posner, M.R.; Katinger, H.; Stiegler, G.; Bernacky, B.J.; Rizvi, T.A.; Schmidt, R.; Hill, L.R.; Keeling, M.E.; Lu, Y.C.; Wright, J.E.; Chou, T.C. & Ruprecht, R.M.** (2000) Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat. Med.* **6**:200-206.
- Bakker, H.; Bardor, M.; Molthoff, J.W.; Gomord, V.; Elbers, I.; Stevens, L.H.; Jordi, W.; Lommen, A.; Faye, L.; Lerouge, P. & Bosch, D.** (2001) Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**:2899-2904.
- Bakker, H.; Rouwendal, G.J.; Karnoup, A.S.; Florack, D.E.; Stoopen, G.M.; Helsper, J.P.; Van Ree, R.; Van Die, I. & Bosch, D.** (2006) An antibody produced in tobacco expressing a hybrid beta-1,4-galactosyltransferase is essentially devoid of plant carbohydrate epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:7577-7582.
- Banki, M.R.; Feng, L. & Wood, D.W.** (2005) Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. *Nat. Methods* **2**:659-661.
- Bardor, M.; Faveeuw, C.; Fitchette-Laine, A.C.; Gilbert, D.; Galas, L.; Trottein, F.; Faye, L. & Lerouge, P.** (2003) Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core alpha(1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology* **13**:427-434.

- Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J.C.; Rey, F.; Nugeyre, M.T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W. & Montagnier, L.** (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
- Barta, A.; Sommergruber, K.; Thompson, D.; Hartmuth, K.; Matzke, M.A. & Matzke, A.J.M.** (1986) The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol. Biol.* **6**:347-357.
- Barton, K.A.; Binns, A.N.; Matzke, A.J.M. & Chilton, M.D.** (1983) Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell* **32**:1033-1043.
- Bassuner, R.; Baumlein, H.; Huth, A.; Jung, R.; Wobus, U.; Rapoport, T.A.; Saalbach, G. & Muntz, K.** (1988) Abundant embryonic mRNA in field bean (*Vicia faba* L) codes for a new class of seed proteins: cDNA cloning and characterization of the primary translation product. *Plant Mol. Biol.* **11**:321-334.
- Baumlein, H.; Boerjan, W.; Nagy, I.; Bassuner, R.; Van Montagu, M.; Inze, D. & Wobus, U.** (1991) A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and Arabidopsis plants. *Mol. Gen. Genet.* **225**:459-467.
- Baumlein, H.; Wobus, U.; Pustell, J. & Kafatos, F.C.** (1986) The legumin gene family - structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. *Nucleic Acids Res.* **14**:2707-2720.
- Behring, E. & Kitasato, S.** (1890) Ueber das Zustandekommen der Diphtherieimmunität und der Tetanusimmunität bei Tieren. *Deutsche medizinische Wochenschrift* **16**:1113-1114.
- Bevan, M.** (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**:8711-8721.
- Biacore** (2004) BIAevaluation Software Handbook. Biacore AB, Uppsala, Sweden.
- Binley, J.A.; Wrin, T.; Korber, B.; Zwick, M.B.; Wang, M.; Chappey, C.; Stiegler, G.; Kunert, R.; Zolla-Pazner, S.; Katinger, H.; Petropoulos, C.J. & Burton, D.R.** (2004) Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J. Virol.* **78**:13232-13252.
- Blake, M.S.; Johnston, K.H.; Russelljones, G.J. & Gotschlich, E.C.** (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase conjugated anti-antibody on western blots. *Anal. Biochem.* **136**:175-179.
- Bock, R.** (2006) Plastid biotechnology: Prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**:1-7.
- Boehm, R.** (2007) Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. In *Biology of emerging viruses: SARS, Avian and Human Influenza, Metapneumovirus, Nipah, West Nile, and Ross River Virus*. Lal, S., pp 121-134, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Bogers, W.M.J.M.; Bergmeier, L.A.; Ma, J.; Oostermeijer, H.; Wang, Y.F.; Kelly, C.G.; Ten Haaf, P.; Singh, M.; Heeney, J.L. & Lehner, T.** (2004) A novel HIV-CCR5 receptor vaccine strategy in the control of mucosal SIV/HIV infection. *Aids* **18**:25-36.
- Boonrod, K.J.; Galetzka, D.; Nagy, P.D.; Conrad, U. & Krczal, G.** (2004) Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance. *Nat. Biotechnol.* **22**:856-862.
- Botella-Pavia, P. & Rodriguez-Concepcion, M.** (2006) Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiol. Plantarum* **126**:369-381.
- Bouquin, T.; Thomsen, M.; Nielsen, L.K.; Green, T.H.; Mundy, J. & Dziegiel, M.H.** (2002) Human anti-rhesus D IgG1 antibody produced in transgenic plants. *Transgenic Res.* **11**:115-122.
- Boyd, M.R.; Gustafson, K.R.; McMahon, J.B.; Shoemaker, R.H.; Okeefe, B.R.; Mori, T.; Gulakowski, R.J.; Wu, L.; Rivera, M.I.; Laurencot, C.M.; Currens, M.J.; Cardellina, J.H.; Buckheit, R.W.; Nara, P.L.; Pannell, L.K.; Sowder, R.C. & Henderson, L.E.** (1997) Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: Potential applications to microbicide development. *Nat. Rev. Immunol.* **41**:1521-1530.
- Bradford, M.M.** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

- Brodzik, R.; Glogowska, M.; Bandurska, K.; Okulicz, M.; Deka, D.; Ko, K.; Van der Linden, J.; Leusen, J.H.W.; Pogrebnyak, N.; Golovkin, M.; Steplewski, Z. & Koprowski, H.** (2006) Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:8804-8809.
- Buchacher, A.; Predl, R.; Strutzenberger, K.; Steinfeldner, W.; Trkola, A.; Purtscher, M.; Gruber, G.; Tauer, C.; Steindl, F.; Jungbauer, A. & Katinger, H.** (1994) Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins - electrofusion and epstein-barr-virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:359-369.
- Bulterys, M.; Fowler, M.G.; Van Rompay, K.K. & Kourtis, A.P.** (2004) Prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 through breast-feeding: Past, present, and future. *J. Infect. Dis.* **189**:2149-2153.
- Burton, D.R.** (1997) A vaccine for HIV type 1: The antibody perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:10018-10023.
- Burton, D.R.; Desrosiers, R.C.; Doms, R.W.; Koff, W.C.; Kwong, P.D.; Moore, J.P.; Nabel, G.J.; Sodroski, J.; Wilson, I.A. & Wyatt, R.T.** (2004) HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat. Immunol.* **5**:233-236.
- Burton, D.R.; Pyati, J.; Koduri, R.; Sharp, S.J.; Thornton, G.B.; Parren, P.W.H.I.; Sawyer, L.S.W.; Hendry, R.M.; Dunlop, N.; Nara, P.L.; Lamacchia, M.; Garratty, E.; Stiehm, E.R.; Bryson, Y.J.; Cao, Y.Z.; Moore, J.P.; Ho, D.D. & Barbas, C.F.** (1994) Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* **266**:1024-1027.
- Burton, D.R.; Stanfield, R.L. & Wilson, I.A.** (2005) Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:14943-14948.
- Cabanes-Macheteau, M.; Fitchette-Laine, A.C.; Loutelier-Bourhis, C.; Lange, C.; Vine, N.D.; Ma, J.K.C.; Lerouge, P. & Faye, L.** (1999) N-glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants. *Glycobiology* **9**:365-372.
- Calarese, D.A.; Scanlan, C.N.; Zwick, M.B.; Deechongkit, S.; Mimura, Y.; Kunert, R.; Zhu, P.; Wormald, M.R.; Stanfield, R.L.; Roux, K.H.; Kelly, J.W.; Rudd, P.M.; Dwek, R.A.; Katinger, H.; Burton, D.R. & Wilson, I.A.** (2003) Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* **300**:2065-2071.
- Calarota, S.A. & Weiner, D.B.** (2003) Present status of human HIV vaccine development. *AIDS* **17**:S73-S84.
- Casadevall, A.; Dadachova, E. & Pirofski, L.** (2004) Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:695-703.
- Castle, P.E.; Karp, D.A.; Zeitlin, L.; Garcia-Moreno, E.B.; Moench, T.R.; Whaley, K.J. & Cone, R.A.** (2002) Human monoclonal antibody stability and activity at vaginal pH. *J. Reprod. Immunol.* **56**:61-76.
- Cavacini, L.A.; Emes, C.L.; Power, J.; Desharnais, F.D.; Duval, M.; Montefiori, D. & Posner, M.R.** (1995) Influence of heavy chain constant regions on antigen binding and HIV-1 neutralization by a human monoclonal antibody. *J. Immunol.* **155**:3638-3644.
- Cavacini, L.A.; Emes, C.L.; Power, J.; Duval, M. & Posner, M.R.** (1994) Effect of antibody valency on interaction with cell-surface expressed HIV-1 and viral neutralization. *J. Immunol.* **152**:2538-2545.
- CDC** (1982) Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - United States. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **31**:507-508.
- CDC** (1986) Classification system for human T-lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus infections. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **35**:334-339.
- Chamberlain, J.S.; Gibbs, R.A.; Ranier, J.E.; Nguyen, P.N. & Caskey, C.T.** (1988) Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* **16**:11141-11156.
- Chargelegue, D.; Vine, N.D.; Van Dolleweerd, C.J.; Drake, P.M.W. & Ma, J.K.C.** (2000) A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice. *Transgenic Res.* **9**:187-194.
- Check, E.** (2003) Aids vaccines: Back to 'plan A'. *Nature* **423**:912-914.
- Chilkoti, A.; Christensen, T. & MacKay, J.A.** (2006) Stimulus responsive elastin biopolymers: Applications in medicine and biotechnology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**:652-657.

- Chow, D.C.; Dreher, M.R.; Trabbic-Carlson, K. & Chilkoti, A.** (2006) Ultra-high expression of a thermally responsive recombinant fusion protein in *E. coli*. *Biotechnol. Prog.* **22**:638-646.
- Clavel, F.; Guetard, D.; Brunvezinet, F.; Chamaret, S.; Rey, M.A.; Santos -Ferreira, M.O.; Laurent, A.G.; Dauquet, C.; Katlama, C.; Rouzioux, C.; Klatzmann, D.; Champalimaud, J.L. & Montagnier, L.** (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343-346.
- Coeffier, E.; Clement, J.M.; Cussac, V.; Khodaei-Boorane, N.; Jehanno, M.; Rojas, M.; Dridi, A.; Latour, M.; El, H.R.; Barre-Sinoussi, F.; Hofnung, M. & Leclerc, C.** (2001) Antigenicity and immunogenicity of the HIV-1 gp41 epitope ELDKWA inserted into permissive sites of the MalE protein. *Vaccine* **19**:684-693.
- Coffin, J.; Haase, A.; Levy, J.A.; Montagnier, L.; Oroszlan, S.; Teich, N.; Temin, H.; Toyoshima, K.; Varmus, H.; Vogt, P. & Weiss, R.** (1986) Human immunodeficiency viruses. *Science* **232**:697-697.
- Conrad, U. & Manteuffel, R.** (2001) Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**:399-402.
- Conrad, U. & Scheller, J.** (2005) Considerations on antibody-phage display methodology. *Comb. Chem. High Throughput Screen* **8**:117-126.
- Cox, K.M.; Sterling, J.D.; Regan, J.T.; Gasdaska, J.R.; Frantz, K.K.; Peele, C.G.; Black, A.; Passmore, D.; Moldovan-Loomis, C.; Srinivasan, M.; Cuisson, S.; Cardarelli, P.M. & Dickey, L.F.** (2006) Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemma minor*. *Nat. Biotechnol.* **24**:1591-1597.
- Curtiss, R.I. & Cardineau, C.A.** (1990) Oral immunization by transgenic plants. WO 90/02484.
- Daniell, H.; Streatfield, S.J. & Wycoff, K.** (2001) Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* **6**:219-226.
- Davenport, K.G.** (2005) An Initiative in plant-made pharmaceuticals (PMP). Conference on Plant-made Pharmaceuticals, Montreal, Canada.
- De Jaeger, G.; De Wilde, C.; Eeckhout, D.; Fiers, E. & Depicker, A.** (2000) The plantibody approach: Expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. *Plant Mol. Biol.* **43**:419-428.
- De Jaeger, G.; Scheffer, S.; Jacobs, A.; Zambre, M.; Zobell, O.; Goossens, A.; Depicker, A. & Angenon, G.** (2002) Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat. Biotechnol.* **20**:1265-1268.
- De Neve, M.; De Loose, M.; Jacobs, A.; Van Houdt, H.; Kaluza, B.; Weidle, U.; Van Montagu, M. & Depicker, A.** (1993) Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Res.* **2**:227-237.
- De Wilde, C.; Peeters, K.; Jacobs, A.; Peck, I. & Depicker, A.** (2002) Expression of antibodies and Fab fragments in transgenic potato plants: A case study for bulk production in crop plants. *Mol. Breed.* **9**:271-282.
- Deblaere, R.; Byteler, B.; Degreve, H.; Deboeck, F.; Schell, J.; Van Montagu, M. & Leemans, J.** (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13**:4777-4788.
- Dove, A.** (2002) Uncorking the biomanufacturing bottleneck. *Nat. Biotechnol.* **20**:777-779.
- Downing, W.L.; Galpin, J.D.; Clemens, S.; Lauzon, S.M.; Samuels, A.L.; Pidkowich, M.S.; Clarke, L.A. & Kermode, A.R.** (2006) Synthesis of enzymatically active human alpha-L-iduronidase in *Arabidopsis* cgl (complex glycan-deficient) seeds. *Plant Biotechnol. J.* **4**:169-181.
- During, K.** (1988) Wundinduzierte Expression und Sekretion von T4 Lysozym und monoklonalen Antikörpern in *Nicotiana tabacum*. Dissertation/Thesis. Universität Köln, Deutschland.
- During, K.; Hippe, S.; Kreuzaler, F. & Schell, J.** (1990) Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.* **15**:281-293.
- Eggink, D.; Melchers, M. & Sanders, R.W.** (2007) Antibodies to HIV-1: Aiming at the right target. *Trends Microbiol.* **15**:291-294.
- Ehrlich, P.** (1900) On immunity, with special reference to cell life. *The Croonian Lecture. Proceedings of the Royal Society* **66**:424-448.

- Evan, G.I.; Lewis, G.K.; Ramsay, G. & Bishop, J.M.** (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell Biol.* **5**:3610-3616.
- Ey, P.L.; Prowse, S.J. & Jenkin, C.R.** (1978) Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* **15**:429-436.
- Faye, L.; Boulaflous, A.; Benchabane, M.; Gomord, W. & Michaud, D.** (2005) Protein modifications in the plant secretory pathway: Current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* **23**:1770-1778.
- Faye, L.; Gomord, V.; Fitchette-Laine, A.C. & Chrispeels, M.J.** (1993) Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing alpha 1,3 fucose or beta 1,2 xylose. *Anal. Biochem.* **209**:104-108.
- Felgenhauer, M.; Kohl, J. & Ruker, F.** (1990) Nucleotide sequences of the cDNAs encoding the V-regions of H-chains and L-chains of a human monoclonal antibody specific to HIV-1-gp41. *Nucleic Acids Res.* **18**:4927-4927.
- Ferrantelli, F.; Rasmussen, R.A.; Buckley, K.A.; Li, P.L.; Wang, T.; Montefiori, D.C.; Katinger, H.; Stiegler, G.; Anderson, D.C.; McClure, H.M. & Ruprecht, R.M.** (2004) Complete protection of neonatal rhesus macaques against oral exposure to pathogenic simian-human immunodeficiency virus by human anti-HIV monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* **189**:2167-2173.
- Fiedler, U. & Conrad, U.** (1995) High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Biotechnology* **13**:1090-1093.
- Fiedler, U.; Filistein, R.; Wobus, U. & Baumlein, H.** (1993) A complex ensemble of cis-regulatory elements controls the expression of a *Vicia faba* non-storage seed protein gene. *Plant Mol. Biol.* **22**:669-679.
- Fiedler, U.; Phillips, J.; Artsaenko, O. & Conrad, U.** (1997) Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology* **3**:205-216.
- Fischer, R.; Emans, N.; Schuster, F.; Hellwig, S. & Drossard, J.** (1999a) Towards molecular farming in the future: Using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**:109-112.
- Fischer, R. & Schillberg, S.** (2004) Molecular Farming: Plant-made pharmaceuticals and technical proteins. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Fischer, R.; Schumann, D.; Zimmermann, S.; Drossard, J.; Sack, M. & Schillberg, S.** (1999b) Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *Eur. J. Biochem.* **262**:810-816.
- Fischer, R.; Stoger, E.; Schillberg, S.; Christou, P. & Twyman, R.M.** (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**:152-158.
- Fischer, R.; Vaquero, C.; Sack, M.; Drossard, J.; Emans, N. & Commandeur, U.** (1999c) Towards molecular farming in the future: Transient protein expression in plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**:113-116.
- Fitchette-Laine, A.C.; Gomord, V.; Chekkafi, A. & Faye, L.** (1994) Distribution of xylosylation and fucosylation in the plant Golgi apparatus. *Plant J.* **5**:673-682.
- Floss, D.M.; Falkenburg, D. & Conrad, U.** (2007) Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: An overview. *Transgenic Res.* **16**:315-332.
- Fox, J.L.** (1994) FDA nears approval of Calgene's Flav'r Savr. *Biotechnology* **12**:439-439.
- Fraleigh, R.T.; Rogers, S.G.; Horsch, R.B.; Sanders, P.R.; Flick, J.S.; Adams, S.P.; Bittner, M.L.; Brand, L.A.; Fink, C.L.; Fry, J.S.; Galluppi, G.R.; Goldberg, S.B.; Hoffmann, N.L. & Woo, S.C.** (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**:4803-4807.
- Franck, A.; Guilley, H.; Jonard, G.; Richards, K. & Hirth, L.** (1980) Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* **21**:285-294.
- Fujiyama, K.; Furukawa, A.; Katsura, A.; Misaki, R.; Omasa, T. & Seki, T.** (2007) Production of mouse monoclonal antibody with galactose-extended sugar chain by suspension cultured tobacco BY2 cells expressing human beta(1,4)-galactosyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**:85-91.
- Galeffi, P.; Lombardi, A.; Pietraforte, I.; Novelli, F.; Di Donato, M.; Sperandei, M.; Tornambe, A.; Fraioli, R.; Martayan, A.; Natali, P.G.; Benevolo, M.; Mottolose, M.; Ylera, F.; Cantale, C. & Giacomini, P.** (2006) Functional expression of a single-chain antibody to ErbB-2 in plants and cell-free systems. *J. Transl. Med.* **4**.

- Galili, G.; Sengupta-Gopalan, C. & Ceriotti, A.** (1998) The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies. *Plant Mol. Biol.* **38**:1-29.
- Gallo, R.C.; Sarin, P.S.; Gelmann, E.P.; Robert-Guroff, M.; Richardson, E.; Kalyanaraman, V.S.; Mann, D.; Sidhu, G.D.; Stahl, R.E.; Zolla-Pazner, S.; Leibowitch, J. & Popovic, M.** (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:865-867.
- Gardner, R.C.; Howarth, A.J.; Hahn, P.; Brownluedi, M.; Shepherd, R.J. & Messing, J.** (1981) The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing. *Nucleic Acids Res.* **9**:2871-2888.
- Ge, X.; Trabbic-Carlson, K.; Chilkoti, A. & Filipe, C.D.M.** (2006) Purification of an elastin-like fusion protein by microfiltration. *Biotechnol. Bioeng.* **95**:424-432.
- Gerngross, T.U.** (2004) Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.* **22**:1409-1414.
- Giddings, G.** (2001) Transgenic plants as protein factories. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**:450-454.
- Gil, F.; Brun, A.; Wigdorovitz, A.; Catala, R.; Martinez-Torrecedrada, J.L.; Casal, I.; Salinas, J.; Borca, M.V. & Escibano, J.M.** (2001) High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. *FEBS Lett.* **488**:13-17.
- Gil, F.; Titarenko, E.; Terrada, E.; Arcalis, E. & Escibano, J.M.** (2006) Successful oral prime-immunization with VP60 from rabbit haemorrhagic disease virus produced in transgenic plants using different fusion strategies. *Plant Biotechnol. J.* **4**:135-143.
- Giritch, A.; Marillonnet, S.; Engler, C.; Van Eldik, G.; Botterman, J.; Klimyuk, V. & Gleba, Y.** (2006) Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:14701-14706.
- Girotti, A.; Reguera, J.; Arias, F.J.; Alonso, M.; Testera, A.M. & Rodriguez-Cabello, J.C.** (2004) Influence of the molecular weight on the inverse temperature transition of a model genetically engineered elastin-like pH-responsive polymer. *Macromolecules* **37**:3396-3400.
- Gleba, D.; Borisjuk, N.V.; Borisjuk, L.G.; Kneer, R.; Poulev, A.; Sarzhinskaya, M.; Dushenkov, S.; Logendra, S.; Gleba, Y.Y. & Raskin, I.** (1999) Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:5973-5977.
- Goedeke, S.; Hensel, G.; Kapusi, E.; Gahrtz, M. & Kumlehn, J.** (2007) Transgenic barley in fundamental research and biotechnology. *Transgenic Plant J.* **1**:104-117.
- Goldstein, D.A. & Thomas, J.A.** (2004) Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Q. J. Med.* **97**:705-716.
- Golovkin, M.; Spitsin, S.; Andrianov, V.; Smirnov, Y.; Xiao, Y.H.; Pogrebnyak, N.; Markley, K.; Brodzik, R.; Gleba, Y.; Isaacs, S.N. & Koprowski, H.** (2007) Smallpox subunit vaccine produced in planta confers protection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**:6864-6869.
- Gomord, V.; Denmat, L.A.; Fitchette-Laine, A.C.; Satiat-Jeunemaitre, B.; Hawes, C. & Faye, L.** (1997) The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER. *Plant J.* **11**:313-325.
- Gomord, V.; Chamberlain, P.; Jefferis, R. & Faye, L.** (2005) Biopharmaceutical production in plants: Problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol.* **23**:559-565.
- Gomord, V.; Sourrouille, C.; Fitchette-Laine, A.C.; Bardor, M.; Pagny, S.; Lerouge, P. & Faye, L.** (2004) Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: The antibodies as a challenge. *Plant Biotechnol. J.* **2**:83-100.
- Gomord, V.; Wee, E. & Faye, L.** (1999) Protein retention and localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Biochimie* **81**:607-618.
- Gorny, M.K.; Conley, A.J.; Karwowska, S.; Buchbinder, A.; Xu, J.Y.; Emini, E.A.; Koenig, S. & Zolla-Pazner, S.** (1992) Neutralization of diverse human immunodeficiency virus type-1 variants by an anti-V3 human monoclonal antibody. *J. Virol.* **66**:7538-7542.
- Gottlieb, M.S.; Schanker, H.M.; Fan, P.T.; Saxon, A. & Weisman, J.D.** (1981a) *Pneumocystis Pneumonia* - Los Angeles. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **30**:250-252.

- Gottlieb, M.S.; Schroff, R.; Schanker, H.M.; Weisman, J.D.; Fan, P.T.; Wolf, R.A. & Saxon, A. (1981b) *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **305**:1425-1431.
- Grunow, R.; Jahn, S.; Porstmann, T.; Kiessig, S.S.; Steinkellner, H.; Steindl, F.; Mattanovich, D.; Gurtler, L.; Deinhardt, F.; Katinger, H. & Von Baehr, R. (1988) The high efficiency, human B cell immortalizing heteromyeloma CB-F7 production of human monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus. *J. Immunol. Methods* **106**:257-265.
- Gudmundsdottir, L.; Sjödin, A.; Boström, A.C.; Hejdeman, B.; Theve-Palm, R.; Alaeus, A.; Lidman, K. & Wahren, B. (2006) Therapeutic immunization for HIV. *Semin. Immunol.* **28**:221-230.
- Guo, X.; Huang, C.; Jin, S.; Liang, S.; Nie, Y. & Zhang, X. (2007) Agrobacterium-mediated transformation of Cry1C, Cry2A and Cry9C genes into *Gossypium hirsutum* and plant regeneration. *Biol. Plant.* **51**:242-248.
- Hahn, B.H.; Shaw, G.M.; De Cock, K.M. & Sharp, P.M. (2000) AIDS as a zoonosis: Scientific and public health implications. *Science* **287**:607-614.
- Haynes, B.F. & Montefiori, D.C. (2006) Aiming to induce broadly reactive neutralizing antibody responses with HIV-1 vaccine candidates. *Expert Rev. Vaccines* **5**:347-363.
- Helenius, A. & Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**:2364-2369.
- Hiatt, A.; Cafferkey, R. & Bowdish, K. (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342**:76-78.
- Hofmann-Lehmann, R.; Vlasak, J.; Rasmussen, R.A.; Smith, B.A.; Baba, T.W.; Liska, V.; Ferrantelli, F.; Montefiori, D.C.; McClure, H.M.; Anderson, D.C.; Bernacky, B.J.; Rizvi, T.A.; Schmidt, R.; Hill, L.R.; Keeling, M.E.; Katinger, H.; Stiegler, G.; Cavacini, L.A.; Posner, M.R.; Chou, T.C.; Andersen, J. & Ruprecht, R.M. (2001) Postnatal passive immunization of neonatal macaques with a triple combination of human monoclonal antibodies against oral simian-human immunodeficiency virus challenge. *J. Virol.* **75**:7470-7480.
- Holliger, P. & Hudson, P.J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* **23**:1126-1136.
- Hondred, D.; Walker, J.M.; Mathews, D.E. & Vierstra, R.D. (1999) Use of ubiquitin fusions to augment protein expression in transgenic plants. *Plant Physiol.* **119**:713-723.
- Hood, E.E.; Witcher, D.R.; Maddock, S.; Meyer, T.; Baszczynski, C.; Bailey, M.; Flynn, P.; Register, J.; Marshall, L.; Bond, D.; Kulisek, E.; Kusnadi, A.; Evangelista, R.; Nikolov, Z.; Wooge, C.; Mehig, R.J.; Hernan, R.; Kappel, W.K.; Ritland, D.; Li, C.P. & Howard, J.A. (1997) Commercial production of avidin from transgenic maize: Characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Mol. Breed.* **3**:291-306.
- Horn, M.E.; Woodard, S.L. & Howard, J.A. (2004) Plant molecular farming: Systems and products. *Plant Cell Rep.* **22**:711-720.
- Horsch, R.B.; Fraley, R.T.; Rogers, S.G.; Sanders, P.R.; Lloyd, A. & Hoffmann, N. (1984) Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* **223**:496-498.
- Horsch, R.B.; Fry, J.E.; Hoffmann, N.L.; Eichholtz, D.; Rogers, S.G. & Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**:1229-1231.
- Ikonomou, L.; Schneider, Y.J. & Agathos, S.N. (2003) Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**:1-20.
- Imani, J.; Baltruschat, H.; Stein, E.; Jia, G.X.; Vogelsberg, J.; Kogel, K.H. & Huckelhoven, R. (2006) Expression of barley BAX Inhibitor-1 in carrots confers resistance to *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* **7**:279-284.
- Inoue, H.; Nojima, H. & Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.
- Ismaili, A.; Jalali-Javaran, M.; Rasaee, M.J.; Rahbarizadeh, F.; Forouzandeh-Moghadam, M. & Memari, H.R. (2007) Production and characterization of anti-(mucin MUCI) single-domain antibody in tobacco (*Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi). *Biotechnol. Appl. Biochem.* **47**:11-19.
- Jayaraj, J. & Punja, Z.K. (2007) Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. *Plant Cell Rep.* **26**:1539-1546.

- Jefferis, R.** (2005) Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol. Prog.* **21**:11-16.
- Jervis, L. & Pierpoint, W.S.** (1989) Purification technologies for plant proteins. *J. Biotechnol.* **11**:161-198.
- Jin, C.S.; Bencurova, M.; Borth, N.; Ferko, B.; Jensen-Jarolim, E.; Altmann, F. & Hantusch, B.** (2006) Immunoglobulin G specifically binding plant N-glycans with high affinity could be generated in rabbits but not in mice. *Glycobiology* **16**:349-357.
- Joensuu, J.** (2006) Production of F4 fimbrial adhesin in plants: A model for oral porcine vaccine against enterotoxigenic *Echerichia coli*. Dissertation/Thesis. University of Helsinki, Finland.
- Johnson, W.E. & Desrosiers, R.C.** (2002) Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. *Annu. Rev. Med.* **53**:499-518.
- Johnsson, B.; Lofas, S. & Lindquist, G.** (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal. Biochem.* **198**:268-277.
- Jonsson, U.; Fagerstam, L.; Ivarsson, B.; Johnsson, B.; Karlsson, R.; Lundh, K.; Lofas, S.; Persson, B.; Roos, H.; Ronnberg, I. & .** (1991) Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **11**:620-627.
- Jung, L.S.; Campbell, C.T.; Chinowsky, T.M.; Mar, M.N. & Yee, S.S.** (1998) Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films. *Langmuir* **14**:5636-5648.
- Kamenarova, K.; Abumhadi, N.; Gecheff, K. & Atanassov, A.** (2005) Molecular farming in plants: An approach of agricultural biotechnology. *J. Cell Mol. Biol.* **4**:77-86.
- Kapila, J.; De Rycke, R.; Van Montagu, M. & Angenon, G.** (1997) An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* **122**:101-108.
- Karasev, A.V.; Foulke, S.; Wellens, C.; Rich, A.; Shon, K.J.; Zwierzynski, I.; Hone, D.; Koprowski, H. & Reitz, M.** (2005) Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine* **23**:1875-1880.
- Karlsson, R.; Fagerstam, L.; Nilshans, H. & Persson, B.** (1993) Analysis of active antibody concentration - separation of affinity and concentration parameters. *J. Immunol. Methods* **166**:75-84.
- Karnoup, A.S.; Turkelson, V. & Anderson, W.H.K.** (2005) O-linked glycosylation in maize-expressed human IgA1. *Glycobiology* **15**:965-981.
- Kathuria, S.; Sriraman, R.; Sack, M.; Pal, R.; Artsaenko, O.; Talwar, G.P.; Fischer, R. & Finnern, R.** (2002) Efficacy of plant-produced recombinant antibodies against HCG. *Hum. Reprod.* **17**:2054-2061.
- Keefer, C.L.** (2004) Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Anim. Reprod. Sci.* **82/83**:5-12.
- Khoudi, H.; Laberge, S.; Ferullo, J.M.; Bazin, R.; Darveau, A.; Castonguay, Y.; Allard, G.; Lemieux, R. & Vezina, L.P.** (1999) Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnol. Bioeng.* **64**:135-143.
- Kim, J.Y.; Mulchandani, A. & Chen, W.** (2005) Temperature-triggered purification of antibodies. *Biotechnol. Bioeng.* **90**:373-379.
- Kim, M.; Qiao, Z.; Yu, J.; Montefiori, D. & Reinherz, E.L.** (2007) Immunogenicity of recombinant human immunodeficiency virus type 1-like particles expressing gp41 derivatives in a pre-fusion state. *Vaccine* **25**:5102-5114.
- Kipriyanov, S.M. & Le Gall, F.** (2004) Generation and production of engineered antibodies. *Mol. Biotechnol.* **26**:39-60.
- Ko, K. & Koprowski, H.** (2005) Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Res.* **111**:93-100.
- Ko, K.; Steplewski, Z.; Glogowska, M. & Koprowski, H.** (2005) Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:7026-7030.
- Ko, K.; Tekoah, Y.; Rudd, P.M.; Harvey, D.J.; Dwek, R.A.; Spitsin, S.; Hanlon, C.A.; Rupprecht, C.; Dietzschold, B.; Golovkin, M. & Koprowski, H.** (2003) Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**:8013-8018.
- Kohler, G. & Milstein, C.** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**:495-497.

- Kolarich, D. & Altmann, F.** (2000) N-Glycan analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of electrophoretically separated nonmammalian proteins: Application to peanut allergen Ara h 1 and olive pollen allergen Ole e 1. *Anal. Biochem.* **285**:64-75.
- Kolarich, D.; Altmann, F. & Sunderasan, E.** (2006) Structural analysis of the glycoprotein allergen Hev b 4 from natural rubber latex by mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**:715-720.
- Koprivova, A.; Stemmer, C.; Altmann, F.; Hoffmann, A.; Kopriva, S.; Gorr, G.; Reski, R. & Decker, E.L.** (2004) Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plantspecific immunogenic N-glycans. *Plant Biotechnol. J.* **2**:517-523.
- Kumlehn, J.; Serazetdinova, L.; Hensel, G.; Becker, D. & Loerz, H.** (2006) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol. J.* **4**:251-261.
- Kunert, R.; Ruker, F. & Katinger, H.** (1998) Molecular characterization of five neutralizing anti-HIV type 1 antibodies: Identification of nonconventional D segments in the human monoclonal antibodies 2G12 and 2F5. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**:1115-1128.
- Kunert, R.; Steinfeldner, W.; Purtscher, M.; Assadian, A. & Katinger, H.** (2000) Stable recombinant expression of the anti HIV-1 monoclonal antibody 2F5 after IgG3/IgG1 subclass switch in CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **67**:97-103.
- Kusnadi, A.R.; Hood, E.E.; Witcher, D.R.; Howard, J.A. & Nikolov, Z.L.** (1998) Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. *Biotechnol. Prog.* **14**:149-155.
- Kusnadi, A.R.; Nikolov, Z.L. & Howard, J.A.** (1997) Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnol. Bioeng.* **56**:473-484.
- Kyo, M. & Harada, H.** (1986) Control of the developmental pathway of tobacco pollen in vitro. *Planta* **168**:427-432.
- La Vallie, E.R. & McCoy, J.M.** (1995) Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**:501-506.
- Laemmlı, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Law, R.D.; Russell, D.A.; Thompson, L.C.; Schroeder, S.C.; Middle, C.M.; Tremaine, M.T.; Jury, T.P.; Delannay, X. & Slater, S.C.** (2006) Biochemical limitations to high-level expression of humanized monoclonal antibodies in transgenic maize seed endosperm. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**:1434-1444.
- Lederman, M.M.; Offord, R.E. & Hartley, O.** (2006) Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:371-382.
- Leps, M.** (2002) Expression von Einkettenantikörpern gegen das Fungizid Kresoxim-methyl in transgenen Tabakpflanzen. Dissertation/Thesis. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland.
- Lerouge, P.; Cabanes-Macheteau, M.; Rayon, C.; Fichette-Laine, A.C.; Gomord, V. & Faye, L.** (1998) N-glycoprotein biosynthesis in plants: Recent developments and future trends. *Plant Mol. Biol.* **38**:31-48.
- Li, B.; Alonso, D.O.V. & Daggett, V.** (2001) The molecular basis for the inverse temperature transition of elastin. *J. Mol. Biol.* **305**:581-592.
- Li, B. & Daggett, V.** (2003) The molecular basis of the temperature- and pH-induced conformational transitions in elastin-based peptides. *Biopolymers* **68**:121-129.
- Li, H.; Ramalingam, S. & Chye, M.** (2006) Accumulation of recombinant SARS-CoV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines. *Exp. Biol. Med.* **231**:1346-1352.
- Li, H.C. & Devaux, P.** (2003) High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. *Plant Sci.* **164**:379-386.
- Lin, M.; Rose-John, S.; Grotzinger, J.; Conrad, U. & Scheller, J.** (2006) Functional expression of a biologically active fragment of soluble gp130 as an ELP-fusion protein in transgenic plants: Purification via inverse transition cycling. *Biochem. J.* **398**:577-583.
- Liu, R.; Paxton, W.A.; Choe, S.; Ceradini, D.; Martin, S.R.; Horuk, R.; MacDonald, M.E.; Stuhlmann, H.; Koup, R.A. & Landau, N.R.** (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**:367-377.

- Ludwig, D.L.; Witte, L.; Hicklin, D.J.; Prewett, M.; Bassi, R.; Burtrum, D.; Pereira, D.S.; Jimenez, X.; Fox, F.; Saxena, B.; Zhou, Q.; Ma, Y.; Kang, X.; Patel, D.; Barry, M.; Kussie, P.; Zhu, Z.; Russell, D.A.; Petersen, W.L.; Jury, T.P.; Gaitan-Gaitan, F.; Moran, D.L.; Delannay, X.; Storrs, B.S.; Tou, J.; Zupc, M.E.; Gustafson, K.S.; McIntyre, J.; Tarnowski, S.J. & Bohlen, P. (2004) Conservation of receptor antagonist anti-tumor activity by epidermal growth factor receptor antibody expressed in transgenic corn seed. *Hum. Antibodies* **13**:81-90.
- Ma, J.K.C.; Barros, E.; Bock, R.; Christou, P.; Dale, P.J.; Dix, P.J.; Fischer, R.; Irwin, J.; Mahoney, R.; Pezzotti, M.; Schillberg, S.; Sparrow, P.; Stoger, E. & Twyman, R.M. (2005a) Molecular farming for new drugs and vaccines - current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Rep.* **6**:593-599.
- Ma, J.K.C.; Chikwamba, R.; Sparrow, P.; Fischer, R.; Mahoney, R. & Twyman, R.M. (2005b) Plant-derived pharmaceuticals - the road forward. *Trends Plant Sci.* **10**:580-585.
- Ma, J.K.C.; Drake, P.M.W. & Christou, P. (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* **4**:794-805.
- Ma, J.K.C. & Hein, M.B. (1995) Plant antibodies for immunotherapy. *Plant Physiol.* **109**:341-346.
- Ma, J.K.C.; Hiatt, A.; Hein, M.; Vine, N.D.; Wang, F.; Stabila, P.; Van Dolleweerd C.; Mostov, K. & Lehner, T. (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* **268**:716-719.
- Ma, J.K.C.; Hikmat, B.Y.; Wycoff, K.; Vine, N.D.; Chargelegue, D.; Yu, L.; Hein, M.B. & Lehner, T. (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat. Med.* **4**:601-606.
- Ma, J.K.C.; Lehner, T.; Stabila, P.; Fux, C.I. & Hiatt, A. (1994) Assembly of monoclonal antibodies with IgG1 and IgA heavy chain domains in transgenic tobacco plants. *Eur. J. Immunol.* **24**:131-138.
- Mainieri, D.; Rossi, M.; Archinti, M.; Bellucci, M.; De Marchis, F.; Vavassori, S.; Pompa, A.; Arcioni, S. & Vitale, A. (2004) Zeolin. A new recombinant storage protein constructed using maize gamma-zein and bean phaseolin. *Plant Physiol.* **136**:3447-3456.
- Malmqvist, M. (1993) Biospecific interaction analysis using biosensor technology. *Nature* **361**:186-187.
- Mansoor, S.; Amin, I.; Hussain, M.; Zafar, Y. & Briddon, R.W. (2006) Engineering novel traits in plants through RNA interference. *Trends Plant Sci.* **11**:559-565.
- Marusic, C.; Nuttall, J.; Burianni, G.; Lico, C.; Lombardi, R.; Baschieri, S.; Benvenuto, E. & Frigerio, L. (2007) Expression, intracellular targeting and purification of HIV Nef variants in tobacco cells. *BMC Biotechnol.* **7**:12.
- Mascola, J.R.; Lewis, M.G.; Stiegler, G.; Harris, D.; Van Cott, T.C.; Hayes, D.; Louder, M.K.; Brown, C.R.; Sapan, C.V.; Frankel, S.S.; Lu, Y.C.; Robb, M.L.; Katinger, H. & Birx, D.L. (1999) Protection of macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J. Virol.* **73**:4009-4018.
- Mascola, J.R.; Louder, M.K.; Van Cott, T.C.; Sapan, C.V.; Lambert, J.S.; Muenz, L.R.; Bunow, B.; Birx, D.L. & Robb, M.L. (1997) Potent and synergistic neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 primary isolates by hyperimmune anti-HIV immunoglobulin combined with monoclonal antibodies 2F5 and 2G12. *J. Virol.* **71**:7198-7206.
- Mascola, J.R.; Stiegler, G.; Van Cott, T.C.; Katinger, H.; Carpenter, C.B.; Hanson, C.E.; Beary, H.; Hayes, D.; Frankel, S.S.; Birx, D.L. & Lewis, M.G. (2000) Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat. Med.* **6**:207-210.
- McCormick, A.A.; Kumagai, M.H.; Hanley, K.; Turpen, T.H.; Hakim, I.; Grill, L.K.; Tuse, D.; Levy, S. & Levy, R. (1999) Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:703-708.
- McGowan, I. (2006) Microbicides: A new frontier in HIV prevention. *Biologicals* **34**:241-255.
- Mersereau, M.; Pazour, G.J. & Das, A. (1990) Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene* **90**:149-151.
- Meyer, D.E. & Chilkoti, A. (2004) Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules* **5**:846-851.

- Meyer, D.E. & Chilkoti, A. (1999) Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nat. Biotechnol.* **17**:1112-1115.
- Meyer, D.E. & Chilkoti, A. (2002) Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: Examples from the elastin-like polypeptide system. *Biomacromolecules* **3**:357-367.
- Mimura, Y.; Church, S.; Ghirlando, R.; Ashton, P.R.; Dong, S.; Goodall, M.; Lund, J. & Jefferis, R. (2000) The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: Properties of a series of truncated glycoforms. *Mol. Immunol.* **37**:697-706.
- Miranda, L.R.; Duval, M.; Doherty, H.; Seaman, M.S.; Posner, M.R. & Cavacini, L.A. (2007) The neutralization properties of a HIV-specific antibody are markedly altered by glycosylation events outside the antigen-binding domain. *J. Immunol.* **178**:7132-7138.
- Misaki, R.; Kimura, Y.; Palacpac, N.Q.; Yoshida, S.; Fujiyama, K. & Seki, T. (2003) Plant cultured cells expressing human beta 1,4-galactosyltransferase secrete glycoproteins with galactose-extended N-linked glycans. *Glycobiology* **13**:199-205.
- Modrow, S.; Falke, D. & Truyen, U. (2003) Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin - Heidelberg, Deutschland.
- Molinari, M. (2007) N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. *Nat. Chem. Biol.* **3**:313-320.
- Monger, W.; Alamillo, J.M.; Sola, I.; Perrin, Y.; Bestagno, M.; Burrone, O.R.; Sabella, P.; Plana-Duran, J.; Enjuanes, L.; Garcia, J.A. & Lomonosoff, G.P. (2006) An antibody derivative expressed from viral vectors passively immunizes pigs against transmissible gastroenteritis virus infection when supplied orally in crude plant extracts. *Plant Biotechnol. J.* **4**:623-631.
- Moon, H.S.; Halfhill, M.D.; Good, L.L.; Raymer, P.L. & Stewart, C.N. (2007) Characterization of directly transformed weedy *Brassica rapa* and introgressed *B. rapa* with Bt cry1Ac and gfp genes. *Plant Cell Rep.* **26**:1001-1010.
- Moore, J.P.; Parren, P.W. & Burton, D.R. (2001) Genetic subtypes, humoral immunity, and human immunodeficiency virus type 1 vaccine development. *J. Virol.* **75**:5721-5729.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**:335-350.
- Mulwa, R.M.S.; Norton, M.A.; Farrand, S.K. & Skirvin, R.M. (2007) Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of transgenic 'Chancellor' wine grape plants expressing the tfdA gene. *Vitis* **46**:110-115.
- Munro, S. & Pelham, H.R. (1986) An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**:291-300.
- Munro, S. & Pelham, H.R. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**:899-907.
- Muster, T.; Steindl, F.; Purtscher, M.; Trkola, A.; Klima, A.; Himmler, G.; Rucker, F. & Katinger, H. (1993) A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **67**:6642-6647.
- Nugent, J.M. & Joyce, S.M. (2005) Producing human therapeutic proteins in plastids. *Curr. Pharm. Des.* **11**:2459-2470.
- Nuttall, J.; Ma, J.K.C. & Frigerio, L. (2005) A functional antibody lacking N-linked glycans is efficiently folded, assembled and secreted by tobacco mesophyll protoplasts. *Plant Biotechnol. J.* **3**:497-504.
- Obregon, P.; Chargelegue, D.; Drake, P.M.W.; Prada, A.; Nuttall, J.; Frigerio, L. & Ma, J.K.C. (2006) HIV-1 p24-immunoglobulin fusion molecule: A new strategy for plant-based protein production. *Plant Biotechnol. J.* **4**:195-207.
- Odell, J.T.; Nagy, F. & Chua, N.H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**:810-812.
- Ofek, G.; Tang, M.; Sambor, A.; Katinger, H.; Mascola, J.R.; Wyatt, R. & Kwong, P.D. (2004) Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J. Virol.* **78**:10724-10737.

- Pagny, S.; Cabanes-Macheteau, M.; Gillikin, J.W.; Leborgne-Castel, N.; Lerouge, P.; Boston, R.S.; Faye, L. & Gomord, V.** (2000) Protein recycling from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in plants and its minor contribution to calreticulin retention. *Plant Cell* **12**:739-755.
- Parren, P.W. & Burton, D.R.** (2001) The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Adv. Immunol.* **77**:195-262.
- Patel, J.; Zhu, H.; Menassa, R.; Gyenis, L.; Richman, A. & Brandle, J.** (2007) Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves. *Transgenic Res.* **16**:239-249.
- Pavlou, A.K. & Belsey, M.J.** (2005) The therapeutic antibodies market to 2008. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59**:389-396.
- Peeters, K.; De Wilde, C. & Depicker, A.** (2001) Highly efficient targeting and accumulation of a Fab fragment within the secretory pathway and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* **268**:4251-4260.
- Pellett-Madan, R.; Keller, M.J. & Herold, B.C.** (2006) Prioritizing prevention of HIV and sexually transmitted infections: First-generation vaginal microbicides. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**:49-54.
- Perez-Filgueira, D.M.; Brayfield, B.P.; Phiri, S.; Borca, M.V.; Wood, C. & Morris, T.J.** (2004) Preserved antigenicity of HIV-1 p24 produced and purified in high yields from plants inoculated with a tobacco mosaic virus (TMV)-derived vector. *J. Virol. Methods* **121**:201-208.
- Petrucelli, S.; Otegui, M.S.; Lareu, F.; Dinh, O.T.; Fitchette-Laine, A.C.; Circosta, A.; Rumbo, M.; Bardor, M.; Carcamo, R.; Gomord, V. & Beachy, R.N.** (2006) A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds. *Plant Biotechnol. J.* **4**:511-527.
- Pogrebnyak, N.; Golovkin, M.; Andrianov, V.; Spitsin, S.; Smirnov, Y.; Egolf, R. & Koprowski, H.** (2005) Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: Development of recombinant vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:9062-9067.
- Porta, C. & Lomonosoff, G.P.** (2002) Viruses as vectors for the expression of foreign sequences in plants. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **19**:245-291.
- Purtscher, M.; Trkola, A.; Gruber, G.; Buchacher, A.; Predl, R.; Steindl, F.; Tauer, C.; Berger, R.; Barrett, N. & Jungbauer, A.** (1994) A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:1651-1658.
- Rademacher, T.; Sack, M.; Arcalis, E.; Stadmann, J.; Balzer, S.; Altmann, F.; Quendler, H.; Stiegler, G.; Kunert, R.; Fischer, R. & Stoger, E.** (2008) Recombinant antibody 2G12 produced in maize endosperm efficiently neutralizes HIV-1 and contains predominantly single-GlcNAc N-glycans. *Plant Biotechnol. J.* **6**:189-201.
- Ramirez, N.; Rodriguez, M.; Ayala, M.; Cremata, J.; Perez, M.; Martinez, A.; Linares, M.; Hevia, Y.; Paez, R.; Valdes, R.; Gavalondo, J.V. & Selman-Housein, G.** (2003) Expression and characterization of an anti-(hepatitis B surface antigen) glycosylated mouse antibody in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants and its use in the immunopurification of its target antigen. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **38**:223-230.
- Ramsay, G.; Evan, G.L. & Bishop, J.M.** (1984) The protein encoded by the human proto-oncogene c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**:7742-7746.
- Reed, L.J. & Muench, H.** (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**:493-497.
- Reichert, J.M. & Valge-Archer, V.E.** (2007) Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**:349-356.
- Robert-Guroff, M.** (2002) HIV regulatory and accessory proteins: New targets for vaccine development. *DNA Cell Biol.* **21**:597-598.
- Rodriguez, M.; Ramirez, N.I.; Ayala, M.; Freyre, F.; Perez, L.; Triguero, A.; Mateo, C.; Selman-Housein, G.; Gavalondo, J.V. & Pujol, M.** (2005) Transient expression in tobacco leaves of an aglycosylated recombinant antibody against the epidermal growth factor receptor. *Biotechnol. Bioeng.* **89**:188-194.
- Rudd, P.M.; Elliott, T.; Cresswell, P.; Wilson, I.A. & Dwek, R.A.** (2001) Glycosylation and the immune system. *Science* **291**:2370-2376.

- Sack, M.; Paetz, A.; Kunert, R.; Bomble, M.; Hesse, F.; Stiegler, G.; Fischer, R.; Katinger, H.; Stoger, E. & Rademacher, T. (2007) Functional analysis of the broadly neutralizing human anti-HIV-1 antibody 2F5 produced in transgenic BY-2 suspension cultures. *FASEB J.* **21**:1655-1664.
- Safrit, J.T.; Ruprecht, R.; Ferrantelli, F.; Xu, W.D.; Kitabwalla, M.; Van Rompay, K.; Marthas, M.; Haigwood, N.; Mascola, J.R.; Luzuriaga, K.; Jones, S.A.; Mathieson, B.J. & Newell, M.L. (2004) Immunoprophylaxis to prevent mother-to-child transmission of HIV-1. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **35**:169-177.
- Saint-Jore-Dupas, C.; Faye, L. & Gomord, V. (2007) From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends Biotechnol.* **25**:317-323.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sanders, R.W.; Venturi, M.; Schiffner, L.; Kalyanaraman, R.; Katinger, H.; Lloyd, K.O.; Kwong, P.D. & Moore, J.P. (2002) The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J. Virol.* **76**:7293-7305.
- Scanlan, C.N.; Pantophlet, R.; Wormald, M.R.; Ollmann, S.E.; Stanfield, R.; Wilson, I.A.; Katinger, H.; Dwek, R.A.; Rudd, P.M. & Burton, D.R. (2002) The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha-1,2 mannose residues on the outer face of gp120. *J. Virol.* **76**:7306-7321.
- Scheller, J. & Conrad, U. (2005) Plant-based material, protein and biodegradable plastic. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**:188-196.
- Scheller, J.; Guhrs, K.H.; Grosse, F. & Conrad, U. (2001) Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat. Biotechnol.* **19**:573-577.
- Scheller, J.; Henggeler, D.; Viviani, A. & Conrad, U. (2004) Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. *Transgenic Res.* **13**:51-57.
- Scheller, J.; Leps, M. & Conrad, U. (2006) Forcing single-chain variable fragment production in tobacco seeds by fusion to elastin-like polypeptides. *Plant Biotechnol. J.* **4**:243-249.
- Schmidt, C. (1989) The purification of large amounts of monoclonal antibodies. *J. Biotechnol.* **11**:235-251.
- Schneider, M.F.; Gange, S.J.; Williams, C.M.; Anastos, K.; Greenblatt, R.M.; Kingsley, L.; Detels, R. & Munoz, A. (2005) Patterns of the hazard of death after AIDS through the evolution of antiretroviral therapy: 1984-2004. *Aids* **19**:2009-2018.
- Schouten, A.; Roosien, J.; De Boer, J.M.; Wilmink, A.; Rosso, M.N.; Bosch, D.; Stiekema, W.J.; Gommers, F.J.; Bakker, J. & Schots, A. (1997) Improving scFv antibody expression levels in the plant cytosol. *FEBS Lett.* **415**:235-241.
- Scott, C.T. (2005) The problem with potency. *Nat. Biotechnol.* **23**:1037-1039.
- Sepalla, L.J.T. & Makela, O. (1997) Haptens and carriers. In *Handbook of experimental immunology*. Herzenberg, L.A.; Weir, D.M. & Blackwell, C., Blackwell Scientific, Oxford, UK.
- Sepkowitz, K.A. (2001) AIDS - the first 20 years. *N. Engl. J. Med.* **344**:1764-1772.
- Sexton, A.; Drake, P.M.; Mahmood, N.; Harman, S.J.; Shattock, R.J. & Ma, J.K.C. (2005) Transgenic plant production of Cyanovirin-N, an HIV microbicide. *FASEB J.* **19**:356-369.
- Shimazu, M.; Mulchandani, A. & Chen, W. (2003) Thermally triggered purification and immobilization of elastin-OPH fusions. *Biotechnol. Bioeng.* **81**:74-79.
- Simmick, A.J.; Lim, D.W.; Chow, D. & Chilkoti, A. (2007) Biomedical and biotechnological applications of elastin-like polypeptides. *J. Macromol. Sci.* **47**:121-154.
- Small, I. (2007) RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**:148-153.
- Soria-Guerra, R.E.; Rosales-Mendoza, S.; Marquez-Mercado, C.; Lopez-Revilla, R.; Castillo-Collazo, R. & Puche-Solis, N.G. (2007) Transgenic tomatoes express an antigenic polypeptide containing epitopes of the diphtheria, pertussis and tetanus exotoxins, encoded by a synthetic gene. *Plant Cell Rep.* **26**:961-968.
- Sota, H.; Hasegawa, Y. & Iwakura, M. (1998) Detection of conformational changes in an immobilized protein using surface plasmon resonance. *Anal. Chem.* **70**:2019-2024.

- Spiegel, H.; Schillberg, S.; Sack, M.; Holzem, A.; Nahrung, J.; Monecke, M.; Liao, Y.C. & Fischer, R.** (1999) Accumulation of antibody fusion proteins in the cytoplasm and ER of plant cells. *Plant Sci.* **149**:63-71.
- Sriraman, R.; Bardor, M.; Sack, M.; Vaquero, C.; Faye, L.; Fischer, R.; Finnern, R. & Lerouge, P.** (2004) Recombinant anti-hCG antibodies retained in the endoplasmic reticulum of transformed plants lack core-xylose and core-alpha(1,3)-fucose residues. *Plant Biotechnol. J.* **2**:279-287.
- Stenberg, E.; Persson, B.; Roos, H. & Urbaniczky, C.** (1991) Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabelled proteins. *J. Colloid Interface Sci.* **143**:513-526.
- Stiegler, G.; Armbruster, C.; Vcelar, B.; Stoiber, H.; Kunert, R.; Michael, N.L.; Jagodzinski, L.L.; Ammann, C.; Jager, W.; Jacobson, J.; Vetter, N. & Katinger, H.** (2002) Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1-infected humans: A phase I evaluation. *AIDS* **16**:2019-2025.
- Stiegler, G.; Kunert, R.; Purtscher, M.; Wolbank, S.; Voglauer, R.; Steindl, F. & Katinger, H.** (2001) A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **17**:1757-1765.
- Stoger, E.; Ma, J.K.C.; Fischer, R. & Christou, P.** (2005a) Sowing the seeds of success: Pharmaceutical proteins from plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**:167-173.
- Stoger, E.; Sack, M.; Nicholson, L.; Fischer, R. & Christou, P.** (2005b) Recent progress in plantibody technology. *Curr. Pharm. Des.* **11**:2439-2457.
- Stoger, E.; Sack, M.; Perrin, Y.; Vaquero, C.; Torres, E.; Twyman, R.M.; Christou, P. & Fischer, R.** (2002) Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Mol. Breed.* **9**:149-158.
- Stone, A.** (2002) Microbicides: A new approach to preventing HIV and other sexually transmitted infections. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**:977-985.
- Stoscheck, C.M.** (1990) Quantitation of protein. *Meth. Enzymol.* **182**:50-68.
- Strasser, R.; Altmann, F.; Mach, L.; Glossl, J. & Steinkellner, H.** (2004) Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking beta 1,2-linked xylose and core alpha 1,3-linked fucose. *FEBS Lett.* **561**:132-136.
- Streatfield, S.J.** (2005) Plant-based vaccines for animal health. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **24**:189-199.
- Streatfield, S.J. & Howard, J.A.** (2003) Plant-based vaccines. *Int. J. Parasitol.* **33**:479-493.
- Suresh, P. & Wanchu, A.** (2006) Chemokines and chemokine receptors in HIV infection: Role in pathogenesis and therapeutics. *J. Postgrad. Med.* **52**:210-217.
- Tekoah, Y.; Ko, K.; Koprowski, H.; Harvey, D.J.; Wormald, M.R.; Dwek, R.A. & Rudd, P.M.** (2004) Controlled glycosylation of therapeutic antibodies in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* **426**:266-278.
- Teli, N.P. & Timko, M.P.** (2004) Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **79**:125-145.
- Thali, M.; Moore, J.P.; Furman, C.; Charles, M.; Ho, D.D.; Robinson, J. & Sodroski, J.** (1993) Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J. Virol.* **67**:3978-3988.
- The BHITS Group** (2004) Late postnatal transmission of HIV-1 in breast-fed children: An individual patient data meta-analysis. *J. Infect. Dis.* **189**:2154-2166.
- Topfer, R.; Matzeit, V.; Gronenborn, B.; Schell, J. & Steinbiss, H.H.** (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.* **15**:5890-5890.
- Trabicc-Carlson, K.; Liu, L.; Kim, B. & Chilkoti, A.** (2004a) Expression and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*: Comparison of an elastin-like polypeptide fusion with an oligohistidine fusion. *Protein Sci.* **13**:3274-3284.
- Trabicc-Carlson, K.; Meyer, D.E.; Liu, L.; Piervincenzi, R.; Nath, N.; La Bean, T. & Chilkoti, A.** (2004b) Effect of protein fusion on the transition temperature of an environmentally responsive elastin-like polypeptide: A role for surface hydrophobicity? *Protein Eng. Des. Sel.* **17**:57-66.

- Triguero, A.; Cabrera, G.; Cremata, J.A.; Yuen, C.T.; Wheeler, J. & Ramirez, N.I.** (2005) Plant-derived mouse IgG monoclonal antibody fused to KDEL endoplasmic reticulum-retention signal is N-glycosylated homogeneously throughout the plant with mostly high-mannose-type N-glycans. *Plant Biotechnol. J.* **3**:449-457.
- Trkola, A.; Kuster, H.; Rusert, P.; Joos, B.; Fischer, M.; Leemann, C.; Manrique, A.; Huber, M.; Rehr, M.; Oxenius, A.; Weber, R.; Stiegler, G.; Vcelar, B.; Katinger, H.; Aceto, L. & Gunthard, H.F.** (2005) Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat. Med.* **11**:615-622.
- Trkola, A.; Pomales, A.B.; Yuan, H.; Korber, B.; Maddon, P.J.; Allaway, G.P.; Katinger, H.; Barbas, C.F.; Burton, D.R.; Ho, D.D. & Moore, J.P.** (1995) Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type-1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J. Virol.* **69**:6609-6617.
- Trkola, A.; Purtscher, M.; Muster, T.; Ballaun, C.; Buchacher, A.; Sullivan, N.; Srinivasan, K.; Sodroski, J.; Moore, J.P. & Katinger, H.** (1996) Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **70**:1100-1108.
- Twyman, R.M.; Schillberg, S. & Fischer, R.** (2005) Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **10**:185-218.
- Twyman, R.M.; Stoger, E.; Schillberg, S.; Christou, P. & Fischer, R.** (2003) Molecular farming in plants: Host systems and expression technology. *Trends Biotechnol.* **21**:570-578.
- Tzfira, T. & Citovsky, V.** (2006) Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: Biology and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**:147-154.
- UNAIDS** (2007) AIDS epidemic update. WHO, USA.
- Urry, D.W.** (1997) Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein-based polymers. *J Phys. Chem. B* **101**:11007-11028.
- Urry, D.W.** (1992) Free energy transduction in polypeptides and proteins based on inverse temperature transitions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **57**:23-57.
- Urry, D.W.** (1993) Molecular machines - how motion and other functions of living organisms can result from reversible chemical changes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**:819-841.
- Urry, D.W.; Luan, C.H.; Parker, T.M.; Gowda, D.C.; Prasad, K.U.; Reid, M.C. & Safavy, A.** (1991a) Temperature of polypeptide inverse temperature transition depends on mean residue hydrophobicity. *J. Am. Chem. Soc.* **113**:4346-4348.
- Urry, D.W.; Parker, T.M.; Reid, M.C. & Gowda, D.C.** (1991b) Biocompatibility of the bioelastic materials, poly(GVGVP) and its gamma irradiation cross-linked matrix - summary of generic biological test results. *J. Bioact. Compat. Polym.* **6**:263-282.
- Van den Steen, P.; Rudd, P.M.; Dwek, R.A. & Opdenakker, G.** (1998) Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**:151-208.
- Van Droogenbroeck, B.; Cao, J.Y.; Stadmann, J.; Altmann, F.; Colanesi, S.; Hillmer, S.; Robinson, D.G.; Van Lerberge, E.; Terryn, N.; Van Montagu, M.; Liang, M.F.; Depicker, A. & De Jaeger, G.** (2007) Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic Arabidopsis seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**:1430-1435.
- Van Engelen, F.A.; Schouten, A.; Molthoff, J.W.; Roosien, J.; Salinas, J.; Dirkse, W.G.; Schots, A.; Bakker, J.; Gommers, F.J.; Jongma, M.A. & .** (1994) Coordinate expression of antibody subunit genes yields high levels of functional antibodies in roots of transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **26**:1701-1710.
- Van Larebeke, N.; Engler, G.; Holsters, M.; Van Denel, S.; Zaenen, I.; Schilpera, R. & Schell, J.** (1974) Large Plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**:169-170.
- Van Regenmortel, M.H.** (1999) Molecular design versus empirical discovery in peptide-based vaccines. Coming to terms with fuzzy recognition sites and ill-defined structure-function relationships in immunology. *Vaccine* **18**:216-221.
- Vaquero, C.; Sack, M.; Chandler, J.; Drossard, J.; Schuster, F.; Monecke, M.; Schillberg, S. & Fischer, R.** (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**:11128-11133.

- Vaquero, C.; Sack, M.; Schuster, F.; Finnern, R.; Drossard, J.; Schumann, D.; Reimann, A. & Fischer, R. (2002) A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco. *FASEB J.* **16**:408-410.
- Veazey, R.S.; Shattock, R.J.; Pope, M.; Kirijan, J.C.; Jones, J.; Hu, Q.X.; Ketas, T.; Marx, P.A.; Klasse, P.J.; Burton, D.R. & Moore, J.P. (2003) Prevention of virus transmission to macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120. *Nat. Med.* **9**:343-346.
- Vitale, A. & Pedrazzini, E. (2005) Recombinant pharmaceuticals from plants: The plant endomembrane system as bioreactor. *Mol. Interv.* **5**:216-225.
- Voss, A.; Niersbach, M.; Hain, R.; Hirsch, H.J.; Liao, Y.C.; Kreuzaler, F. & Fischer, R. (1995) Reduced virus infectivity in *Nicotiana tabacum* secreting a TMV specific full-size antibody. *Mol. Breed.* **1**:39-50.
- Walsh, G. (2006) Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nat. Biotechnol.* **24**:769-776.
- Walsh, G. & Jefferis, R. (2006) Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat. Biotechnol.* **24**:1241-1252.
- Weber, J.; Desai, K. & Darbyshire, J. (2005) The development of vaginal microbicides for the prevention of HIV transmission. *PLoS Med.* **2**:392-395.
- Weise, A.; Altmann, F.; Rodriguez-Franco, M.; Sjoberg, E.R.; Baumer, W.; Launhardt, H.; Kietzmann, M. & Gorr, G. (2007) High-level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the *Physcomitrella delta-fuc-t delta-xy-l-t* mutant. *Plant Biotechnol. J.* **5**:389-401.
- Whaley, K.J. & Zeitlin, L. (2005) Preventing transmission: Plant-derived microbicides and mucosal vaccines for reproductive health. *Vaccine* **23**:1819-1822.
- Witcher, D.R.; Hood, E.E.; Peterson, D.; Bailey, M.; Bond, D.; Kusnadi, A.; Evangelista, R.; Nikolov, Z.; Wooge, C.; Mehig, R.; Kappe, W.; Register, J. & Howard, J.A. (1998) Commercial production of beta-glucuronidase (GUS): A model system for the production of proteins in plants. *Mol. Breed.* **4**:301-312.
- Wolbank, S.; Kunert, R.; Stiegler, G. & Katinger, H. (2003) Characterization of human class-switched polymeric (immunoglobulin M [IgM] and IgA) anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies 2F5 and 2G12. *J. Virol.* **77**:4095-4103.
- Woodard, S.L.; Mayor, J.M.; Bailey, M.R.; Barker, D.K.; Love, R.T.; Lane, J.R.; Delaney, D.E.; Comas-Wagner, J.M.; Mallubhotla, H.D.; Hood, E.E.; Dangott, L.J.; Tichy, S.E. & Howard, J.A. (2003) Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: Characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **38**:123-130.
- Wright, A. & Morrison, S.L. (1997) Effect of glycosylation on antibody function: Implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol.* **15**:26-32.
- Wyatt, R.; Kwong, P.D.; Desjardins, E.; Sweet, R.W.; Robinson, J.; Hendrickson, W.A. & Sodroski, J.G. (1998) The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**:705-711.
- Wyatt, R. & Sodroski, J. (1998) The HIV-1 envelope glycoproteins: Fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**:1884-1888.
- Wycoff, K.L. (2005) Secretory IgA antibodies from plants. *Curr. Pharm. Des.* **11**:2429-2437.
- Xiang, C.B.; Han, P.; Lutziger, I.; Wang, K. & Oliver, D.J. (1999) A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **40**:711-717.
- Yu, J. & Langridge, W.H.R. (2001) A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat. Biotechnol.* **19**:548-552.
- Zako, T.; Harada, K.; Mannen, T.; Yamaguchi, S.; Kitayama, A.; Ueda, H. & Nagamune, T. (2001) Monitoring of the refolding process for immobilized firefly luciferase with a biosensor based on surface plasmon resonance. *J. Biochem.* **129**:1-4.
- Zeder-Lutz, G.; Hoebeke, J. & Van Regenmortel, M.H. (2001) Differential recognition of epitopes present on monomeric and oligomeric forms of gp160 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies. *Eur. J. Biochem.* **268**:2856-2866.
- Zeitlin, L.; Olmsted, S.S.; Moench, T.R.; Co, M.S.; Martinell, B.J.; Paradkar, V.M.; Russell, D.R.; Queen, C.; Cone, R.A. & Whaley, K.J. (1998) A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat. Biotechnol.* **16**:1361-1364.

- Zhou, T.Q.; Xu, L.; Dey, B.; Hessel, A.J.; Van Ryk, D.; Xiang, S.H.; Yang, X.Z.; Zhang, M.Y.; Zwick, M.B.; Arthos, J.; Burton, D.R.; Dimitrov, D.S.; Sodroski, J.; Wyatt, R.; Nabel, G.J. & Kwong, P.D.** (2007) Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* **445**:732-737.
- Zwick, M.B.; Labrijn, A.F.; Wang, M.; Spenlehauer, C.; Saphire, E.O.; Binley, J.M.; Moore, J.P.; Stiegler, G.; Katinger, H.; Burton, D.R. & Parren, P.W.** (2001) Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J. Virol.* **75**:10892-10905.

-
- VII Anhang**
- VII.1 Vektorkarten**
- VII.1.1 pRTRA-anti-oxa
 - VII.1.2 pRTRA-ELP
 - VII.1.3 pCB301-Kan
- VII.2 Aminosäuresequenz und Molekulargewicht der Antikörperketten und ELP-Fusionsproteine**
- VII.2.1 Leichte und schwere Ketten sowie ELP-Fusionsproteine des anti-HIV-1 Antikörpers 2F5
 - VII.2.2 Leichte und schwere Ketten sowie ELP-Fusionsproteine des anti-HIV-1 Antikörpers 2G12
- VII.3 Regeneration putativ transgener T₀-Pflanzen**
- VII.4 Kreuzung ausgewählter transgener Linien und Analyse der Nachkommen**
- VII.5 Kalkulation des Expressionsniveaus rekombinanter 2F5 Antikörpervarianten in Samen der DH-Pflanzen**
- VII.6 Analyse der N-Glycane an den schweren Ketten der Antikörper**
- VII.7 Bestimmung der kinetischen Konstanten der Antigen-Antikörper-Interaktion**
- VII.8 Konzentrationsbestimmung der Protein A-gereinigten 2G12 Antikörpervarianten**
- VII.9 Analyse der 2G12 Antikörperpräparationen nach *inverse transition cycling***
- VII.10 Veränderung der Masseschwerpunkte der Antikörper-ELP-Fusionen**

VII.1 Vektorkarten

VII.1.1 pRTRA-anti-oxa

Der Vektor pRTRA-anti-oxa wurde für die Klonierung der pRTRA-Plasmide ohne Gensequenz des elastinähnlichen Polypeptids verwendet. Er beruht auf dem Plasmid pRTRA15 (Artsaenko *et al.*, 1995).

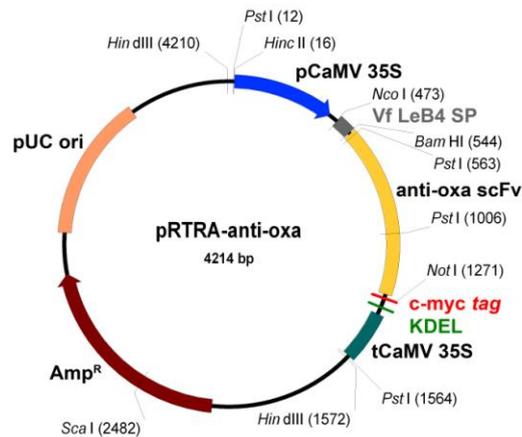


Abb. VII-1: Schematische Darstellung des pRTRA-anti-oxa-Vektors. pCaMV 35S: 16 bp - 435 bp, ubiquitärer Promotor des *Cauliflower Mosaic Virus*; Vf LeB4 SP: 474 bp - 542 bp, *Vicia faba* LeB4-Signalpeptid; anti-oxa scFv: 549 bp - 1259 bp, anti-Oxazoloneinkettenantikörper; c-myc tag: 1278 bp - 1310 bp; KDEL: 1317 bp - 1328 bp, ER-Retentionssignal; tCaMV 35S: 1348 bp - 1557 bp, Terminationssequenz des CaMV 35S-Transkripts; Amp^R: 2175 bp - 3035 bp, Ampicillinresistenz; pUC ori: 3207 bp - 3794 bp, bakterieller Replikationsursprung.

VII.1.2 pRTRA-ELP

Für die Klonierung der pRTRA-ELP-Plasmide wurde pRTRA-ELP eingesetzt. Dieser Vektor enthält die Gensequenz für 100 Wiederholungen des elastinähnlichen Peptids VPGXG mit Valin, Glycin oder Alanin als variable Aminosäure (X).

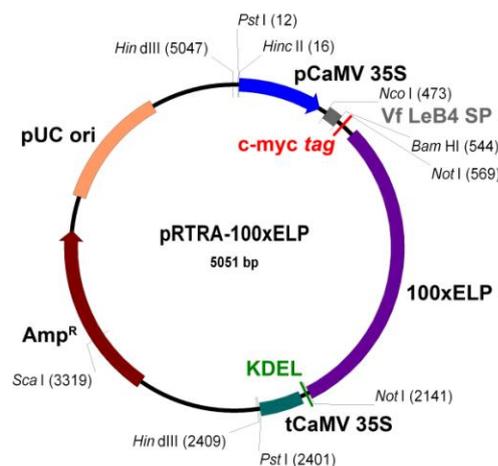


Abb. VII-2: Schematische Darstellung des pRTRA-ELP-Vektors. pCaMV 35S: 16 bp - 435 bp, ubiquitärer Promotor des *Cauliflower Mosaic Virus*; Vf LeB4 SP: 474 bp - 542 bp, *Vicia faba* LeB4-Signalpeptid; c-myc tag: 576 bp - 608 bp; 100xELP: 639 bp - 2138 bp, 100 Wiederholungen des elastinähnlichen Pentapeptids VPGXG; KDEL: 2154 bp - 2165 bp, ER-Retentionssignal; tCaMV 35S: 2185 bp - 2394 bp, Terminationssequenz des CaMV 35S-Transkripts; Amp^R: 3012 bp - 3872 bp, Ampicillinresistenz; pUC ori: 4044 bp - 4631 bp, bakterieller Replikationsursprung.

VII.1.3 pCB301-Kan

Für die Agrobacterium-vermittelte Transformation von Tabak wurde das binäre Plasmid pCB301-Kan, das auf dem Vektor pCB301 basiert (Xiang *et al.*, 1999), verwendet.

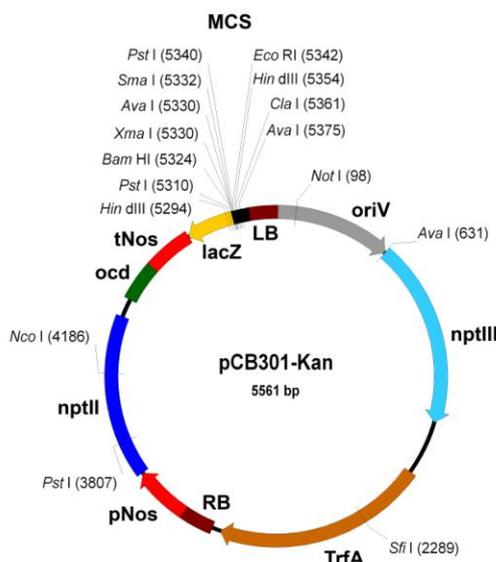


Abb. VII-3: Schematische Darstellung des binären Plasmids pCB301-Kan. oriV: 1 bp - 630 bp, RK2 Replikationsursprung (von BIN19); nptIII: 631 bp - 1636 bp, bakterielle Kanamycinresistenz; TrfA: 1935 bp - 3083 bp, RK2 Replikationsursprung; RB: 3130 bp - 3306 bp, *right border*; pNos: 3307 bp - 3610 bp, Promotor des Nopalinsyntasegens; nptII: 3614 bp - 4497 bp, pflanzliche Kanamycinresistenz; ocd: 4598 bp - 4809 bp, Gen für Ornithincyclodeaminase; tNos: 4810 bp - 5065 bp, Terminator des Nopalinsyntasegens; lacZ: 5066 bp - 5323 bp, Gen für β -Galactosidase; MCS: 5324 bp - 5416 bp, *multiple cloning site* von pBluescriptTM; LB: 4506 bp - 5561 bp, *left border*.

VII.2 Aminosäuresequenz und Molekulargewicht der Antikörperketten und ELP-Fusionsproteine

Die Kalkulation des Molekulargewichts der einzelnen Antikörperketten und entsprechenden ELP-Fusionen erfolgte mit dem Programm ProteanTM Lasergen[®] v6 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA).

Nachfolgend sind die AS-Sequenzen der in Tabak exprimierten Antikörperketten im Einbuchstaben-Aminosäurecode angegeben. Die Sequenzen des *c-myc tags* (rot), des elastinähnlichen Polypeptids (violett) und des ER-Retentionssignals KDEL (grün) wurden farblich hervorgehoben. Zusätzlich integrierte Aminosäuren sind grau markiert. Das *N*-glycosylierte Asparagin der schweren Ketten ist unterstrichen.

2F5 HC 100xELP

Signalpeptid: MELGLSWIFLLAILKGVQC

RITLKESGPPLVKPTQTLLTLCFSFSGFSLSDFGVGVGWIRQPPGKALEWLAIYSDDDKRYSPSLNTRLTITKDT
 SKNQVVLVMTRVSPVDATYFCAHRRGPTTLFGVPIARGPVNAMDVWGQGIVTIVTISSTSTKGPSVFPLAPSSKST
 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGKGSQLPGGQAAA**EQKLISEEDLN**GAVEMGHGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGV
 PGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGV
 PGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGV
 PGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGV
 PGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGV
 PGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGV
 PGGGVPGAGVPGGGVPGGLAAA**PKDEL**.

Molekulargewicht: 93721,2 Da

VII.2.2 Leichte und schwere Ketten sowie ELP-Fusionsproteine des anti-HIV-1 Antikörpers 2G12**2G12 LC**

Signalpeptid: MDMRVPAQLLGLLLLWLPGAKC

DVVMTQSPSTLSASVGDITITITCRASQSIETWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLKTGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
 SGLQFDDFATYHCQHYAGYSATFGQGRVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKV
 DNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECAAA**EQKLISEE**
DLNGS**KDEL**.

Molekulargewicht: 25467,3 Da

2G12 LC 100xELP

Signalpeptid: MDMRVPAQLLGLLLLWLPGAKC

DVVMTQSPSTLSASVGDITITITCRASQSIETWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLKTGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
 SGLQFDDFATYHCQHYAGYSATFGQGRVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKV
 DNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**CGSQLP**GGQAAA
EQKLISEEDLNGAVEMGHGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGV
 GVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGV
 GVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGV
 GVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGV
 GVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGV
 GVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGGLAAA
PKDEL.

Molekulargewicht: 66521,7 Da

2G12 HC

Signalpeptid: MELGLSWIFLLAILKGVQC

EVQLVESGGGLVKAGGSLIILSCGVSNFRISAHTMNWVRRVPGGGLEWVASISTSSSTYRDYADAVKGRFTVSRDDL
EDFVYLQMHKMRVEDTAIYYCARKGSDRLSDNDPFDWGPVTVTVSPASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGKAAA**EQKLISEEDLNGSKDEL**.

Molekulargewicht: 51717,3 Da

2G12 HC 100xELP

Signalpeptid: MELGLSWIFLLAILKGVQC

EVQLVESGGGLVKAGGSLIILSCGVSNFRISAHTMNWVRRVPGGGLEWVASISTSSSTYRDYADAVKGRFTVSRDDL
EDFVYLQMHKMRVEDTAIYYCARKGSDRLSDNDPFDWGPVTVTVSPASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGKGSQ**L**PGGQAAA**EQKLISEEDLNG**AVEMGHGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAG
VPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAG
VPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAG
VPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAG
VPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAG
VPGGGVPGGLAAA**E**PKDEL.

Molekulargewicht: 92771,7 Da

VII.3 Regeneration putativ transgener T₀-Pflanzen

Transgene Pflanzen mit Expression der Immunglobulingene sowie der entsprechenden ELP-Fusionen unter Kontrolle eines ubiquitären (CaMV 35S-Promotor) bzw. eines samenspezifischen Promotors (USP- oder LeB4-Promotor) wurden regeneriert. Die Zusammenfassung aller erzeugten und analysierten T₀-Pflanzen liefert Tab. VII-1. Zusätzlich sind die Ergebnisse der Spaltungsanalyse der T₁-Generation aufgeführt (vgl. II.2.3.1).

Tab. VII-1: Anzahl regenerierter T₀-Pflanzen für die Expression der Immunglobulingene. 2F5: anti-HIV-1 Antikörper 2F5; 2G12: anti-HIV-1 Antikörper 2G12; LC: leichte Kette; HC: schwere Kette; ELP: elastinähnliches Polypeptid; 35S: CaMV 35S-Promotor; USP: USP-Promotor; LeB4: LeB4-Promotor; T₀: primärtransgene Pflanze (regenerierte Pflanze aus Kallus); Kan^R: Kanamycinresistenz.

Konstrukt/ Transformationsansatz	Analysierte* T ₀ -Pflanzen mit Kan ^R	T ₀ -Pflanzen mit Transgenexpression**	Linien mit 3:1 Spaltung
^{35S} 2F5-LC	95	74	8/17
^{35S} 2F5-HC	100	55	2/18***
^{35S} 2F5-LC _{ELP}	100	65	15/19
^{35S} 2F5-HC _{ELP}	93	44	8/15
^{35S} 2G12-LC	82	62	3/19
^{35S} 2G12-HC	132	63	3/20
^{35S} 2G12-LC _{ELP}	69	50	7/20
^{35S} 2G12-HC _{ELP}	78	37	3/20

^{USP} 2F5-LC	47	27	8/19
^{USP} 2F5-HC	40	25	9/20
^{USP} 2F5-LC _{ELP}	47	34	12/19
^{USP} 2F5-HC _{ELP}	39	22	3/14
^{USP} 2G12-LC	23	17	1/17***
^{USP} 2G12-HC	34	30	4/20
^{USP} 2G12-LC _{ELP}	38	28	9/20
^{USP} 2G12-HC _{ELP}	41	28	3/20

^{LeB4} 2F5-LC	40	23	10/20
^{LeB4} 2F5-HC	40	25	7/19
^{LeB4} 2F5-LC _{ELP}	55	37	9/18
^{LeB4} 2F5-HC _{ELP}	39	21	4/14
^{LeB4} 2G12-LC	20	14	2/16***
^{LeB4} 2G12-HC	48	29	5/20
^{LeB4} 2G12-LC _{ELP}	37	20	2/20***
^{LeB4} 2G12-HC _{ELP}	39	24	8/20

* Analyse durch Western Blot (vgl. II.2.4.3) mit anti-c-myc Antikörper (vgl. II.1.7)

** Nachweisbare Akkumulation des rekombinanten Proteins durch Western Blot

*** Für Kreuzungen auch 4:1 bzw. 5:1 spaltende T₀-Linien verwendet

VII.4 Kreuzung ausgewählter transgener Linien und Analyse der Nachkommen

Zur Erzeugung transgener Pflanzen mit Akkumulation vollständiger Antikörper bzw. ELP-Fusionen (L₂H₂) wurden ausgewählte T₁-Pflanzen gekreuzt (vgl. II.2.3.2). Die Nachkommen von drei verschiedenen Kreuzungen pro Antikörpervariante wurden auf Präsenz des IgGs mit dem Sandwich-ELISA analysiert (vgl. II.2.4.5). In Tab. VII-2 ist als ein

Beispiel die Analyse von F₁-Pflanzen, die zur Produktion des Antikörpers 2F5 (ubiquitärer Expression) erzeugt wurden, dargestellt.

Tab. VII-2: Analyse der Kreuzungsprodukte. 2F5: anti-HIV-1 Antikörper 2F5; LC: leichte Kette; HC: schwere Kette; 35S: CaMV 35S-Promotor; F₁-Pflanze: Nachkommen der Kreuzung; L bzw. l: Gen für LC ist vorhanden (L) oder nicht (l); H bzw. h: Gen für HC ist vorhanden (H) oder nicht (h).

^{35S} 2F5 1C ♂ ^{35S} 2F5-LC32/19 x ♀ ^{35S} 2F5-HC94/16		^{35S} 2F5 7A ♂ ^{35S} 2F5-LC20/17 x ♀ ^{35S} 2F5-HC7/8		^{35S} 2F5 13B ♂ ^{35S} 2F5-LC10/9 x ♀ ^{35S} 2F5-HC8/9	
F ₁ -Pflanzen	Expression	F ₁ -Pflanze	Expression	F ₁ -Pflanze	Expression
1	+	1	-	1	+
2	+	2	-	2	-
3	+	3	-	3	-
4	+	4	-	4	+
5	+	5	+	5	-
6	+	6	-	6	-
7	+	7	-	7	-
8	+	8	-	8	-
9	+	9	+	9	+
10	+	10	-	10	+
11	+	11	+	11	-
12	+	12	+	12	+
13	+	13	-	13	-
14	+	14	-	14	+
15	+	15	-	15	-
16	+	16	-	16	-
17	+	17	-	17	+
18	+	18	-	18	-
19	+	19	-	19	+
20	+	20	-	20	+
21	+	21	+	21	-
22	+	22	-	22	-
23	+	23	-	23	+
24	+	24	+	24	-
25	+	25	+	25	-
26	+	26	-	26	+
27	+	27	Fehlt	27	Fehlt
28	+	28	+	28	-
29	+	29	-	29	+
30	+	30	-	30	+
Positiv:	30 von 30	Positiv:	8 von 29	Positiv:	13 von 29
100% der Nachkommen exprimieren den kompletten Antikörper 2F5.		28% der Nachkommen exprimieren den kompletten Antikörper 2F5.		45% der Nachkommen exprimieren den kompletten Antikörper 2F5.	
♂ und ♀ homozygot (LL x HH)		♂ und ♀ hemizygot (Ll x Hh)		Ein homozygoter und ein hemizygoter Kreuzungspartner (LL x Hh oder Ll x HH)	

Ausgehend von dem Auftreten der antikörperexprimierenden F₁-Pflanzen konnte auf den Genotyp der zur Kreuzung verwendeten T₁-Pflanzen geschlossen werden.

VII.5 Kalkulation des Expressionsniveaus rekombinanter 2F5 Antikörpervarianten in Samen der DH-Pflanzen

Die Bestimmung der Menge der rekombinanten Antikörper in Samen der DH-Pflanzen wurde anhand eines semi-quantitativen Western Blots vorgenommen. Definierte Mengen an gesamtlöslichen Samenproteinen wurden pro Gelspur appliziert und die Intensität der Banden der in Tabak produzierten schweren Ketten bzw. ELP-Fusionen mit den Signalen der schweren Ketten des CHO-Standards verglichen (Abb. VII-4). Die schweren Ketten des ^{Nt}2F5 aus Tabaksamen wurden als zwei getrennte Banden mit annähernd gleicher Intensität identifiziert. Für den Vergleich mit dem Standard wurde das obere Signal verwendet. Anschließend wurde der Wert mit zwei multipliziert. Die unteren Banden bei den Pflanzen 20/1 und 43/3 (ca. 35 kDa) wurde in die Berechnung nicht mit einbezogen.

Die Angabe des Expressionsniveaus der rekombinanten Antikörper erfolgte in Prozent an gesamtlöslichem Protein (% TSP). Für die Kalkulation des Gehalts an Immunglobulin wurde das Molekulargewicht des elastinähnlichen Fusionspartners nicht berücksichtigt (vgl. III.3).

Die Nachkommen verschiedener DH-Pflanzen (DH^{USP}2F5 1A 10/20, DH^{USP}2F5 1A 10/43, DH^{USP}2F5 1A 10/63 und DH^{USP}2F5_{ELP} 8B 2/56, DH^{USP}2F5_{ELP} 8B 2/82, DH^{USP}2F5_{ELP} 8B 2/95) wurden für diese Quantifizierung verwendet.

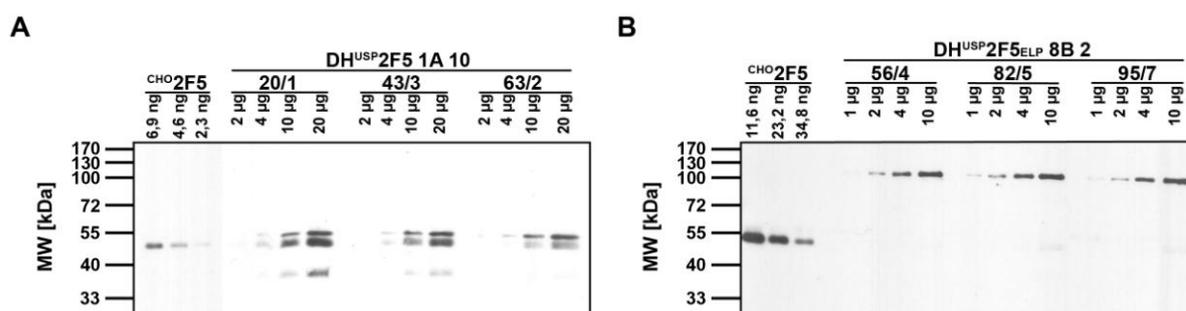


Abb. VII-4: Semi-quantitativer Western Blot zur Bestimmung der Expressionshöhe rekombinanter Antikörper in Tabaksamen. Die Trennung der Proteine erfolgte unter reduzierenden Bedingungen im SDS-PAA-Gel (10%) und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. Definierte Konzentrationen an CHO-Standard (6,9 ng; 4,6 ng; 2,3 ng bzw. 11,6 ng; 23,2 ng; 34,8 ng) sowie vergleichbare Mengen an gesamtlöslichem Samenprotein (1 µg; 2 µg; 4 µg; 10 µg; 20 µg) wurden pro Gelspur aufgetragen. Jeweils drei Nachkommen der DH-Pflanzen wurden analysiert. **A:** Analyse des Expressionsniveaus des Antikörpers ^{Nt}2F5 in Tabaksamen. DH^{USP}2F5 1A 10: DH-Experiment; 20/1: Nachkomme 1 der DH-Pflanze DH^{USP}2F5 1A 10/20; 43/3: Nachkomme 3 der DH-Pflanze DH^{USP}2F5 1A 10/43, 63/2: Nachkomme 2 der DH-Pflanze DH^{USP}2F5 1A 10/63. **B:** Analyse des Expressionsniveaus des Antikörpers ^{Nt}2F5_{ELP} in Tabaksamen. DH^{USP}2F5_{ELP} 8B 2: DH-Experiment; 56/4: Nachkomme 4 der DH-Pflanze DH^{USP}2F5_{ELP} 8B 2/56; 82/5: Nachkomme 5 der DH-Pflanze DH^{USP}2F5_{ELP} 8B 2/82; 95/7: Nachkomme 7 der DH-Pflanze DH^{USP}2F5_{ELP} 8B 2/95. CHO2F5: Standardantikörper 2F5 aus CHO-Zellen; DH: Doppelhaploide; USP: USP-Promotor; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

Die Expressionshöhen der kompletten Antikörper in Samen bezogen auf den Gehalt an gesamtlöslichem Protein (TSP) betragen für die analysierten 2F5 Varianten:

^{Nt} 2F5	0,1% TSP
^{Nt} 2F5 _{ELP}	0,6% TSP

Durch C-terminale ELP-Fusion aller Antikörperketten wird die Expression des Immunglobulins in Samen um etwa das 6-fache gesteigert. Der Gehalt an Antikörper-ELP-Fusion wurde mit der verwendeten Methode deutlich unterschätzt (vgl. III.3).

VII.6 Analyse der *N*-Glycane an den schweren Ketten der Antikörper

Für die Untersuchung der *N*-Glycane an den schweren Ketten der Antikörper wurden diese mit Protein A aus Blattmaterial transgener F_1 -Pflanzen extrahiert (vgl. II.2.4.6). Nach Trennung der affinitätsgereinigten Proteine im SDS-PAA-Gel (6%, nicht reduzierende Bedingungen) wurden diese mit Coomassie® Brilliant Blue gefärbt und die entsprechenden Banden aus dem Gel isoliert (vgl. II.2.4.4, Abb. VII-5). Die Analyse der *N*-Glycane erfolgte wie unter Pkt. II.2.4.9 beschrieben von J. Stadlmann (Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich).

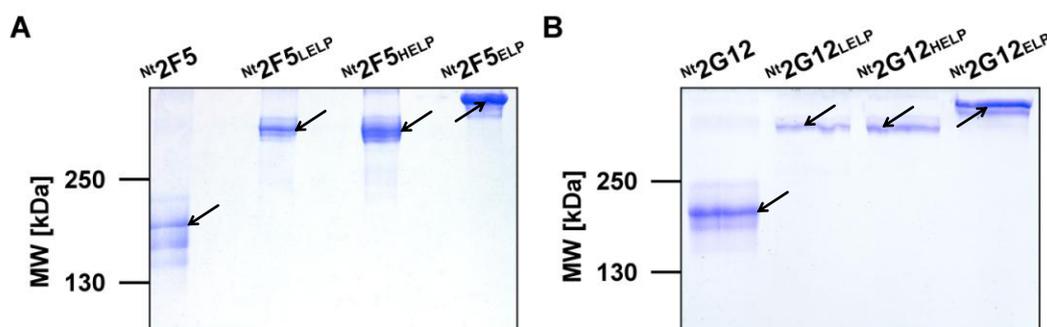


Abb. VII-5: Nachweis der Protein A-gereinigten Antikörper und ELP-Fusionen mit Coomassiefärbung. Die Trennung der rekombinanten Proteine erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen im SDS-PAA-Gel (6%). Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie® Brilliant Blue gefärbt. Markierte Banden (Pfeile) der rekombinanten Proteine wurden ausgeschnitten und für die *N*-Glycananalyse verwendet. **A:** Analyse der 2F5 Antikörpervarianten mit Coomassiefärbung. N^t2F5 : 2F5 ohne ELP aus *N. tabacum*; $N^t2F5LELP$: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; $N^t2F5HELP$: 2F5 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; $N^t2F5ELP$: 2F5 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*. **B:** Analyse der 2G12 Antikörpervarianten mit Coomassiefärbung. N^t2G12 : 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*; $N^t2G12LELP$: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; $N^t2G12HELP$: 2G12 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; $N^t2G12ELP$: 2G12 mit ELP-Fusion an allen vier Antikörperketten aus *N. tabacum*. ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

VII.7 Bestimmung der kinetischen Konstanten der Antigen-Antikörper-Interaktion

Die kinetischen Parameter (k_{on} , k_{off} , K_D) der Bindung zwischen Antigen (Analyt, A) und Antikörper (Ligand, B) werden im Folgenden kurz erläutert. Ihre Berechnung erfolgte mit der BIAevaluation Software v4.0 (Biacore, GE Healthcare, Uppsala, Schweden).

Zur Beschreibung der Bindung von Analyt und Ligand stellt BIAevaluation verschiedene Modelle zur Verfügung. Die Bindungen zwischen Antikörper und Antigen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit einem monovalenten Bindungsmodell beschrieben (1:1 Interaktion).

Das **Langmuir-Modell** ist das einfachste Modell für eine monovalente Interaktion zwischen Analyt (Antigen) und immobilisiertem Ligand (Antikörper) und ist äquivalent zur Langmuir

Isotherme für die Adsorption an eine Oberfläche. Ein weiteres Modell ist das **1:1 Bindungsmodell mit Massentransport**. Dies beschreibt ebenfalls eine 1:1 Interaktion zwischen Analyt und Ligand, allerdings unter Massentransportlimitation.



A Antigen (Analyt)
 B Antikörper (Ligand)
 k_{on} *on rate* Konstante [$M^{-1} s^{-1}$]
 k_{off} *off rate* Konstante [s^{-1}]
 AB Antigen-Antikörper-Komplex

Assoziation
$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{\text{on}} \times [A] \times [B] \quad (6)$$

Dissoziation
$$-\frac{d[AB]}{dt} = k_{\text{off}} \times [AB] \quad (7)$$

Im Gleichgewicht: Assoziation = Dissoziation

$$k_{\text{on}} \times [A] \times [B] = k_{\text{off}} \times [AB] \quad (8)$$

$$K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = \frac{[A] \times [B]}{[AB]} \quad (9)$$

Die Geschwindigkeit der Komplexbildung von Analyt und Ligand wird mit folgender Gleichung beschrieben:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{\text{on}} \times [A] \times [B] - k_{\text{off}} \times [AB] \quad (10)$$

Bezüglich des SPR-Signals wird Gleichung (11) erhalten:

$$\frac{dR}{dt} = k_{\text{on}} \times C \times R_{\text{max}} - (k_{\text{on}} \times C + k_{\text{off}}) \times R \quad (11)$$

R SPR-Signal in RU zur Zeit t
 k_{on} *on rate* Konstante [$M^{-1} s^{-1}$]
 k_{off} *off rate* Konstante [s^{-1}]
 C Konzentration des Analyts
 R_{max} Oberflächenkapazität

Die grafische Darstellung von dR/dt gegen R resultiert in einer Geraden mit dem Anstieg $-(k_{\text{on}}C + k_{\text{off}})$. Werden die Steigungen, die für verschiedene Analytkonzentrationen erhalten wurden, gegen die Konzentration (C) aufgetragen, ergibt dies eine Gerade mit dem Anstieg k_{on} . Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ist k_{off} .

Die Dissoziationskonstante K_D ergibt sich aus Gleichung (9).

VII.8 Konzentrationsbestimmung der Protein A-gereinigten 2G12 Antikörpervarianten

Die Bestimmung der Konzentration affinitätsgereinigter 2G12 Antikörpervarianten erfolgte durch semi-quantitativen Western Blot (vgl. II.2.4.2) unter Verwendung des CHO-Standardantikörpers (^{CHO}2G12, vgl. Tab. II-4). Die Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen im SDS-PAA-Gel (10%) getrennt und die schweren Ketten bzw. deren ELP-Fusionen mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper nach Transfer auf Nitrocellulose detektiert.

Die mit Protein A gereinigten 2G12 Antikörperpräparationen wurden verdünnt (1:200) und verschiedene Volumina (5 µl, 10 µl, 20 µl bzw. 40 µl) pro Gelspur appliziert. Zur Berechnung der Antikörperkonzentrationen wurden die Intensitäten der Banden der schweren Ketten von den in Tabak exprimierten Antikörpern mit den Signalen der schweren Ketten des CHO-Standards verglichen (Abb. VII-6). Die Konzentration der Präparationen wurde unter Verwendung des Verdünnungsfaktors (= 200) berechnet. Das Molekulargewicht des C-terminalen Fusionspartners wurde zur Berechnung nicht mit einbezogen.

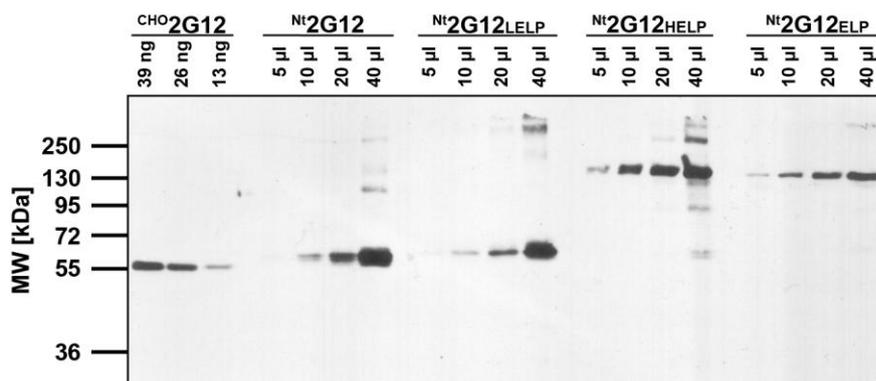


Abb. VII-6: Semi-quantitativer Western Blot zur Bestimmung der Konzentration affinitätsgereinigter 2G12 Antikörper. Die Trennung der Proteine erfolgte unter reduzierenden Bedingungen im SDS-PAA-Gel (10%) und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. Definierte Konzentrationen an CHO-Standard (30 ng; 26 ng; 13 ng) sowie gleiche Volumina (5 µl; 10 µl; 20 µl; 40 µl) der Präparationen wurden pro Gelspur aufgetragen. ^{CHO}2G12: Standardantikörper 2G12 aus CHO-Zellen; ^{Nt}2G12: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12LELP: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12HELP: 2G12 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12ELP: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

VII.9 Analyse der 2G12 Antikörperpräparationen nach *inverse transition cycling*

Die Anreicherung der 2G12 Antikörpervarianten in Blattextrakten und deren Auswertung erfolgten analog zu den 2F5 Immunglobulinen und sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt (Abb. VII-7, Abb. VII-8, Abb. VII-9).

Für eine optimale Ausbeute an 2G12 Antikörper-ELP-Fusionsproteinen waren Temperaturen von 45°C und höher erforderlich. Bei der Löslichkeit der rekombinanten Proteine nach ITC wurden vergleichbare Ergebnisse zu den 2F5 Antikörpervarianten erhalten. Je höher die Temperatur bei ITC, desto weniger Protein geht anschließend in Lösung.

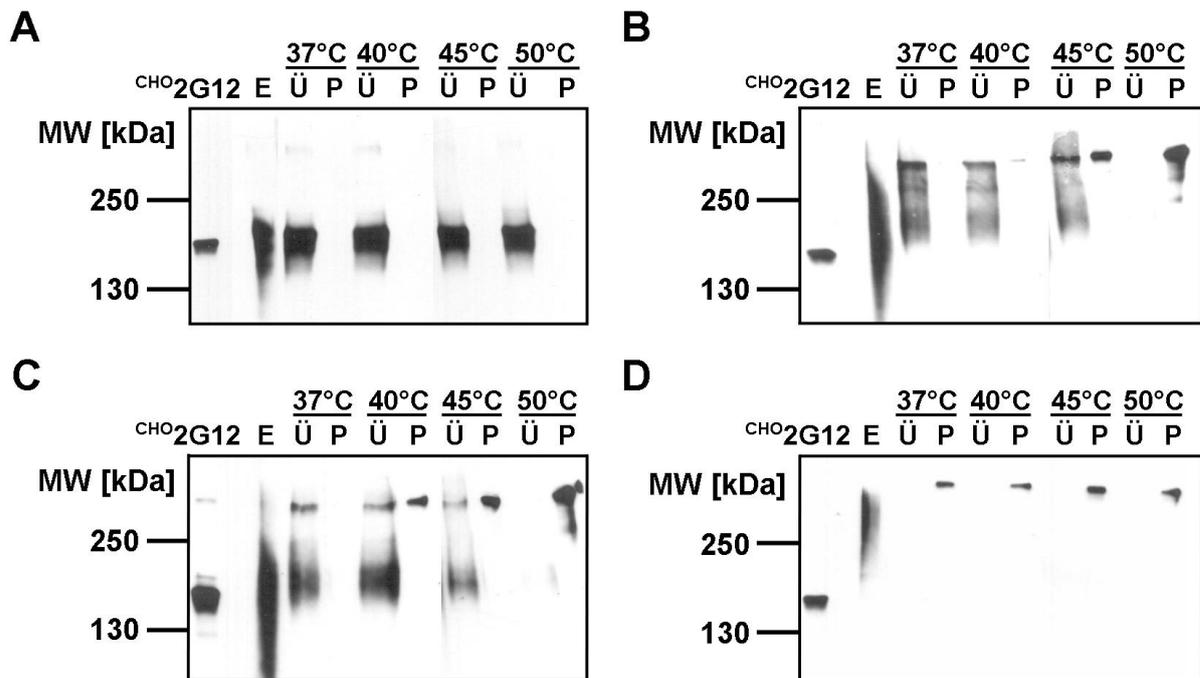


Abb. VII-7: Anreicherung rekombinanter 2G12 Antikörper-ELP-Fusionen durch *inverse transition cycling*. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper. Vier verschiedenen Temperaturen (37°C; 40°C; 45°C und 50°C) wurden beim *inverse transition cycling* verwendet. Gleiche Volumina an Rohextrakten (E) und Überständen (Ü) nach Zentrifugation bei 37°C, 40°C, 45°C und 50°C wurden pro Gelspur appliziert (10 µl). Von den Proteinpräparationen (P) wurde jeweils 1 µl pro Gelspur aufgetragen. **A:** Nachweis von ^{Nt}2G12. ^{Nt}2G12: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*. **B:** Nachweis von ^{Nt}2G12_{LELP}. ^{Nt}2G12_{LELP}: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*. **C:** Nachweis von ^{Nt}2G12_{HELP}. ^{Nt}2G12_{HELP}: 2G12 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*. **D:** Nachweis von ^{Nt}2G12_{ELP}. ^{Nt}2G12_{ELP}: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*. ^{CHO}2G12: 2 ng Standardantikörper 2G12 aus CHO-Zellen; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

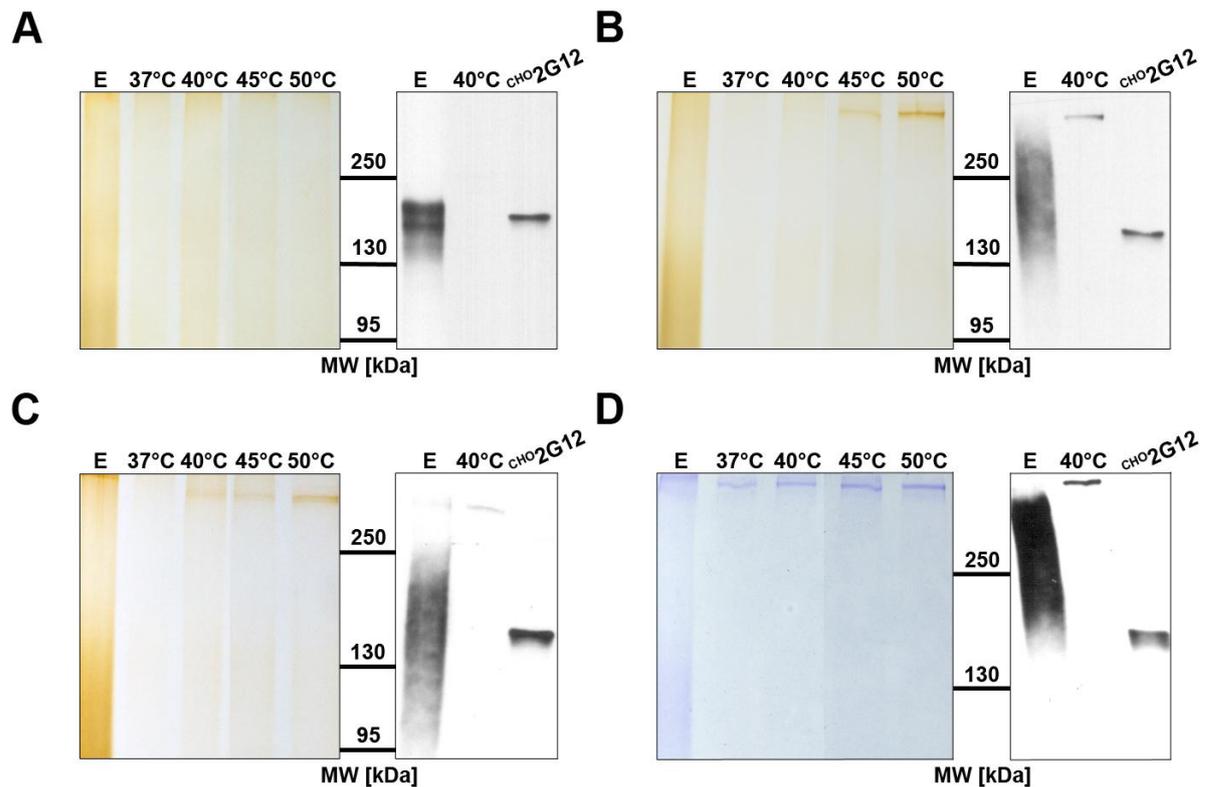


Abb. VII-8: Nachweis der rekombinanten 2G12 Antikörper-ELP-Fusionen nach *inverse transition cycling* aus Blattextrakten. Die Trennung der Proteine erfolgte im SDS-PAA-Gel (6%) unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Western Blot Analyse mit einem anti-Human Fc-spezifischen Antikörper bzw. die Gele wurden mit Silbernitrat oder Coomassie® Brilliant Blue gefärbt. Vier verschiedenen Temperaturen (37°C; 40°C; 45°C und 50°C) wurden bei der Reinigung verwendet. Gleiche Volumina an Rohextrakten (E) und der Präparationen wurden zur Visualisierung (Silber- oder Coomassiefärbung) pro Gelspur aufgetragen. **A:** Nachweis von N^t2G12 im silbergefärbten SDS-PAA-Gel und durch Western Blot. N^t2G12 : 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*. **B:** Nachweis von N^t2G12_{LELP} im silbergefärbten SDS-PAA-Gel und durch Western Blot. N^t2G12_{LELP} : 2G12 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*. **C:** Nachweis von N^t2G12_{HELP} im silbergefärbten SDS-PAA-Gel und durch Western Blot. N^t2G12_{HELP} : 2G12 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*. **D:** Nachweis von N^t2G12_{ELP} mit Coomassiefärbung und durch Western Blot. N^t2G12_{ELP} : 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*. $CHO2G12$: 2 ng Standardantikörper 2G12 aus CHO-Zellen; ELP: elastinähnlich Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

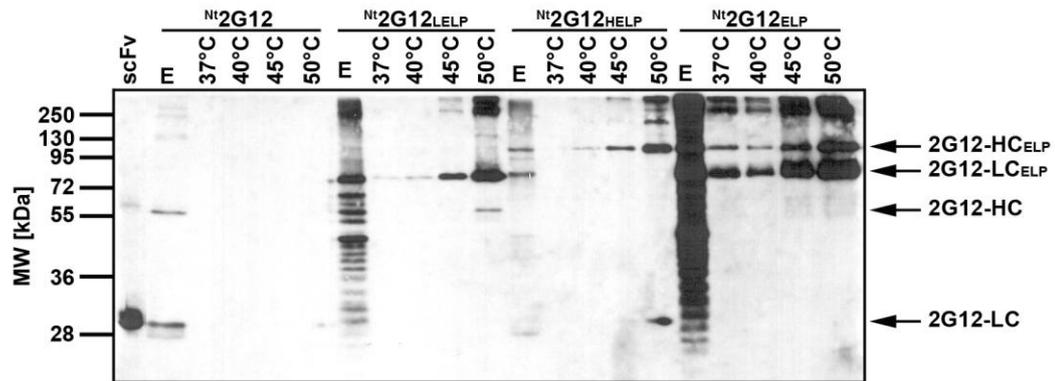


Abb. VII-9: Kontrolle der Löslichkeit der 2G12 Antikörper-ELP-Fusionen nach *inverse transition cycling*.

Die Trennung der Proteine erfolgte unter reduzierenden Bedingungen im SDS-PAA-Gel (12%) und die Western Blot Analyse mit dem anti-c-myc Antikörper. Vier verschiedenen Temperaturen (37°C; 40°C; 45°C und 50°C) wurden bei der Anreicherung verwendet. Unlösliche Bestandteile der Proteinpräparationen wurden in 72 mM Tris (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerin, 3% (w/v) SDS, 0,25 µM Bromphenolblau und 5% (v/v) β-Mercaptoethanol gekocht und gleiche Volumina für die Visualisierung pro Gelspur aufgetragen (0,5 µl). scFv: 20 ng Einkettenantikörper/c-myc Standard, E: Pflanzenrohextrakt; ^{Nt}2G12: 2G12 ohne ELP aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12_{LELP}: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12_{HELP}: 2G12 mit ELP-Fusion an schweren Ketten aus *N. tabacum*; ^{Nt}2G12_{ELP}: 2G12 mit ELP-Fusion an leichten und schweren Antikörperketten aus *N. tabacum*; 2G12-LC: 2G12 leichte Kette; 2G12-HC: 2G12 schwere Kette; 2G12-LC_{ELP}: 2G12 leichte Kette mit ELP-Fusion; 2G12-HC_{ELP}: 2G12 schwere Kette mit ELP-Fusion; ELP: elastinähnliches Polypeptid; MW: Molekulargewicht.

VII.10 Veränderung der Masseschwerpunkte der Antikörper-ELP-Fusionen

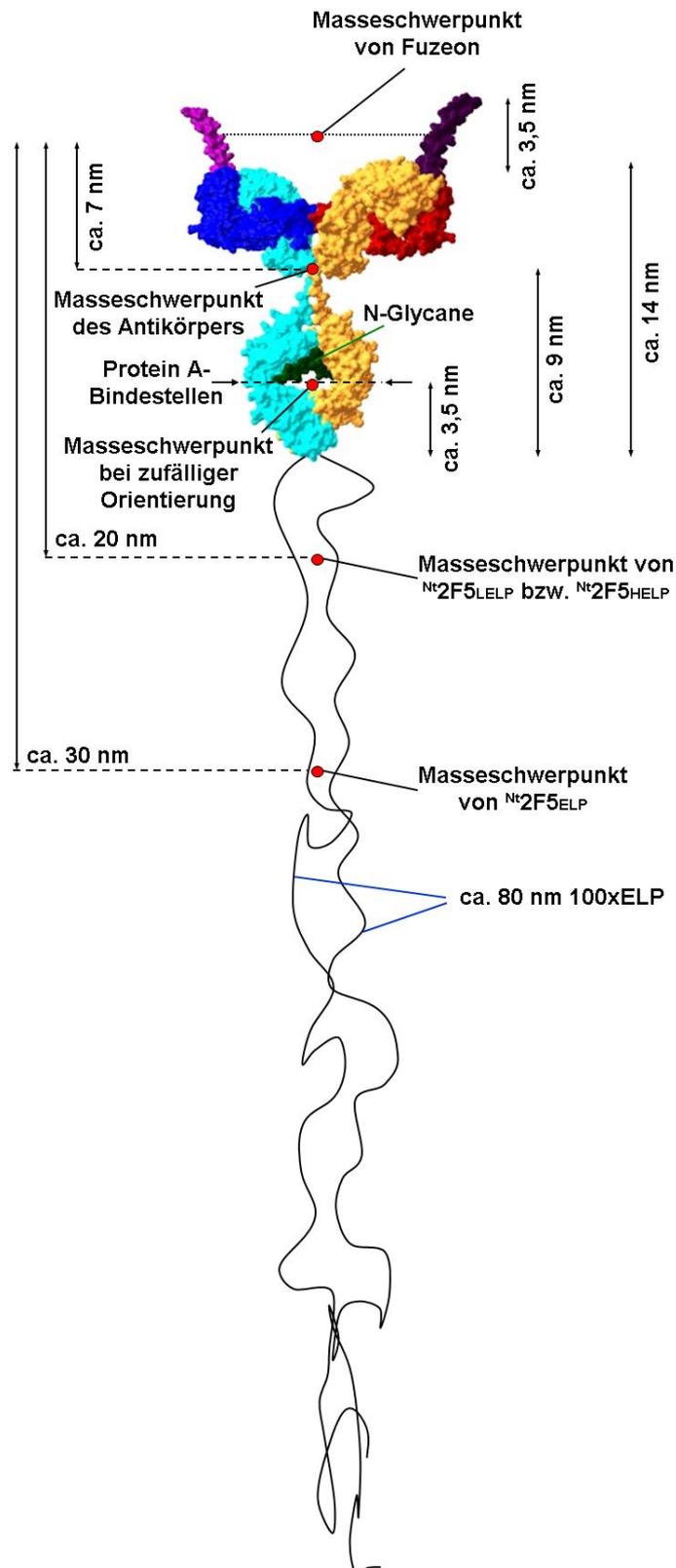


Abb. VII-10: Schematische Darstellung des 2F5 Antikörpers mit C-terminaler ELP-Fusion an den schweren Ketten und die veränderten Masseschwerpunkte. Die Dimensionen von Antikörper und Antigen (Fuzeon[®]) wurden unter Verwendung von SWISS-PDBviewer 3.7 von M. Sack (RWTH Aachen, Aachen, BRD) berechnet.

PUBLIKATIONSLISTE

Teile der vorliegenden Doktorarbeit sind in folgende Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge eingegangen.

VERÖFFENTLICHUNGEN IN FACHZEITSCHRIFTEN

Floss, D. M., D. Falkenburg & U. Conrad (2007) Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants - an overview. *Transgenic Research* 16(3):315-332. (Review)

Floss, D. M., M. Sack, J. Stadlmann, T. Rademacher, J. Scheller, E. Stoger, R. Fischer & U. Conrad (2008) Biochemical and functional characterization of anti-HIV antibody ELP fusion proteins from tobacco plants. *Plant Biotechnology Journal* 6:379-391.

Zwei Publikationen zur Doppelhaploiden-Technik und zur Expression und Charakterisierung der 2G12 Antikörpervarianten befinden sich in Arbeit.

TAGUNGSBEITRÄGE - VORTRÄGE

Floß, D. M.: Expression of anti-HIV antibody ELP fusion proteins in transgenic tobacco leaves and seeds. Pharma-Planta Meeting, 07./08.01.2005, Verona, Italien.

Floß, D. M.: Expression of anti-HIV antibody ELP fusion proteins in tobacco plants. 1st IPK Student Conference, 22. bis 25.06.2005, Gatersleben, Deutschland.

Floß, D. M.: Expression of anti-HIV antibody ELP fusion proteins in transgenic tobacco leaves and seeds. Pharma-Planta WP4 Meeting, 20. bis 22.01.2006, Heidelberg, Deutschland.

Floß, D. M.: Evaluating ELP fusions for the production of recombinant anti-HIV antibodies in tobacco plants. Pharma-Planta Meeting, 19./20.04.2006, Aachen, Deutschland.

Floß, D. M.: Anti-HIV antibody ELP fusion proteins derived from tobacco plants. Pharma-Planta Meeting, 02./03.02.2007, Wien, Österreich.

Floß, D. M.: Plantibodies against HIV: A proof of concept study. 3rd Plant Science Student Conference, 05. bis 08.06.2007, Halle, Deutschland.

Floß, D. M.: ELP-Fusionen: Werkzeuge zur Expressionssteigerung in transgenen Pflanzen. Workshop - Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie e. V. AK Gentechnik, 12./13.07.2007, Neustadt/Weinstraße, Deutschland.

Floß, D. M.: Expression of antibody ELP fusion proteins in tobacco plants. Pharma-Planta Meeting, 10./11.01.2008, Maynooth, Irland.

TAGUNGSBEITRÄGE - POSTER

Floß, D. M. & U. Conrad: Transient expression of anti-HIV antibody ELP fusions in *Nicotiana tabacum*. Fachtagung "Wirtschaftskraft Pflanze - Zukunft durch Innovationscluster" auf der Biotechnica, 19.10.2005, Hannover, Deutschland.

Floß, D. M. & U. Conrad: Evaluating ELP fusions for the production of recombinant anti-HIV antibodies in tobacco plants. 2nd IPK Student Conference, 30.05. bis 01.06.2006, Gatersleben, Deutschland.

Floß, D. M. & U. Conrad: Anti-HIV antibody light and heavy chain ELP fusion proteins are expressed and assembled in tobacco plants. Plant Transformation Technology Meeting, 04. bis 07.02.2007, Wien, Österreich.

Floß, D. M., M. Sack, J. Stadlmann & U. Conrad: Characterization of anti-HIV-1 antibody ELP fusion proteins from transgenic tobacco plants. BIO-Hanoi, 18./19.12.2007, Hanoi, Vietnam.

Floß, D. M., I. Saalbach, J. Kumlehn & U. Conrad: Rapid generation of homozygous anti-HIV antibody producing tobacco plants by doubled haploid technology. BIO-Hanoi, 18./19.12.2007, Hanoi, Vietnam.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich in den vergangenen Jahren unterstützt haben und somit zum Gelingen der Arbeit beitragen. Da es unmöglich ist, alle Namen an dieser Stelle aufzuführen, bitte ich die nicht namentlich erwähnten Personen vielmals um Verzeihung. Ich habe Euch nicht vergessen.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Udo Conrad danken. Sein unermüdliches Interesse an meiner Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft und die kompetente Betreuung waren ausschlaggebend für die Entstehung dieser Dissertation.

Die vorliegende Arbeit war Bestandteil des Pharma-Planta Projekts unter Leitung von Prof. Dr. Julian Ma (St. George's Hospital Medical School, University of London) und Prof. Dr. Rainer Fischer (Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Aachen). Ich möchte mich bei allen Pharma-Planta Kollegen für die Anregungen und Diskussionen sowie unsere jährlichen Meetings bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Wobus danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben anfertigen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Werner Roos vom Institut für Pharmazie danke ich für die Betreuung der Arbeit von Seiten der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

POLYMUN Scientific Immunbiologische Forschung GmbH (Wien) unter Leitung von Prof. Dr. Hermann Katinger danke ich für die Bereitstellung der Standardantikörper und des 2F5 Antigens. Frau Dr. Gabriela Stiegler danke ich herzlichst für die Durchführung der Virusneutralisationstests.

Mein besonderer Dank gilt Markus Sack von der RWTH Aachen für die Einführung in die Biacore-Technologie, ausführliche Diskussionen und die ein oder andere Lebensweisheit. Ich danke ebenfalls Dr. Eva Stöger und Dr. Elsa Arcalis, die mich während meines Aufenthalts an der RWTH Aachen mit der Elektronenmikroskopie vertraut machten sowie Dr. Thomas Rademacher für das Bereitstellen der pTRAK-Vektoren und das Protokoll der Agro-Injektion.

Ein besonderes Dankeschön geht an Johannes Stadlmann von der BOKU in Wien für die Analyse der *N*-Glycane und die erheiternden E-Mail-Konversationen, die den grauen Alltag auffrischten.

Mein Dank gilt der Arbeitsgruppe „Pflanzliche Reproduktionsbiologie“ am IPK für die Regeneration der DH-Pflanzen. Besonders erwähnen möchte ich Dr. Jochen Kumlehn, meine Mentorin Dr. Isolde Saalbach, Dr. Götz Hensel sowie Andrea Müller und Ingrid Otto.

Ich danke allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Phytoantikörper“, in der ich die vorliegende Arbeit angefertigt habe, für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung in den vergangenen vier Jahren. Mein spezieller Dank gilt Dr. Manfred Gahrtz, Dr. Gudrun Mönke, Christine Helmold und Anita Winger.

Ich bedanke mich herzlichst bei den Gärtnern in den Gewächshäusern „Genetik“ und „Chemie“ sowie bei den Grafikern des IPKs.

Mein größtes Dankeschön geht an meine Familie, meine Eltern, Daniela & René. Ihnen danke ich für die Liebe, das Verständnis und die ständige Unterstützung in allen Lebenslagen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und all denen bedanken, die mich besonders in der letzten Phase meiner Doktorarbeit durch unentwegtes Korrekturlesen, intensive Diskussionen, den ein oder anderen Kaffee, abwechslungsreiche Unterhaltungen am Mittagstisch, gemeinsame Laufrunden oder einfach nur durch Gespräche unterstützt haben.

- D A N K E -

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Name Doreen Manuela Floß
Wohnort Hans-Stubbe-Straße 28
06466 Gatersleben
Geburtstag 26.06.1979
Geburtsort Plauen
Staatsangehörigkeit Deutsch
Familienstand Ledig

Schulbildung

1986 bis 1992 Polytechnische Oberschule Pausa
1992 bis 1998 Diesterweg-Gymnasium Plauen
Abschluss: Abitur (Note 1,3)

Studium

1998 bis 2004 Studium der Agrarwissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Vordiplom (Note 1,4)
Fachrichtung im Hauptstudium: Pflanzenwissenschaften
Diplomarbeit am damaligen Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz mit dem Thema: „Anwendung subtraktiver Hybridisierungsverfahren zur Isolierung fungizidresponsiver Gene des Weizenpathogens *Pyrenophora tritici-repentis* (DIED.) DRECHS.“
Abschluss: Diplom-Agraringenieur (Note 1,0)

Berufstätigkeit

Seit 01.04.2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Abt. Molekulare Genetik, Arbeitsgruppe Phytoantikörper, Gatersleben

Gatersleben, März 2008



Doreen M. Floß

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Die angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich für die Anfertigung der Arbeit verwendet. Wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen dieser Werke sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt. Ich habe mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Gatersleben, März 2008

Doreen Floß

Doreen M. Floß