

Produktion und Evaluierung von oral applizierbaren Impfstoffen aus Pflanzen

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Grit Hehmann-Titt geb. Hehmann
aus Georgsmarienhütte

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Rainer Fischer
 Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Dirk Prüfer

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Dezember 2011

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
I.1	Impfstoffe	1
I.1.1	Bedarf an neuen Impfstoffen	1
I.1.2	Prinzip und Wirkungsweise von Impfstoffen	1
I.1.3	Anforderungen an einen optimalen Impfstoff	2
I.1.4	Konventionelle Impfstoffe	2
I.1.5	Rekombinante Subunit-Impfstoffe	4
I.1.6	Mukosale Impfstoffe	5
I.2	Transgene Pflanzen als Bioreaktoren	6
I.2.1	Produktion oral verfügbarer Impfstoffe in gentechnisch veränderten Pflanzen	6
I.2.2	Optimierung pflanzlicher Expressionsstrategien	10
I.2.3	Tabak als Modellsystem zur Herstellung essbarer Impfstoffe	12
I.3	Strategien zur Optimierung oral verfügbarer Impfstoffe	13
I.3.1	Mukosale Adjuvantien	13
I.4	Modellantigene	17
I.4.1	Die Hypervariable Region 1 (HVR1) des Hepatitis C Virus	17
I.4.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Antigen MPT64	18
I.5	Zielsetzung der Arbeit	19
II.	Material und Methoden	22
II.1	Material	22
II.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Reaktionskits	22
II.1.2	Antikörper und enzymkonjugierte Nachweisantikörper	22
II.1.3	Synthetische Oligonukleotide	24
II.1.4	Plasmid-Vektoren	25
II.1.5	Bakterienstämme und Pflanzen	26
II.1.6	Versuchstiere	27
II.1.7	Mukosale Adjuvantien	27
II.1.8	Puffer, Medien und Lösungen	27
II.1.9	Geräte, Apparaturen und Zubehör	28
II.1.10	Genehmigung der durchgeführten Arbeiten	29
II.2	Molekularbiologische Methoden	29
II.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	29
II.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
II.2.3	Restriktion von DNA	32
II.2.4	Analytische Agarosegelelektrophorese	32
II.2.5	Präparative Agarosegelelektrophorese und DNA-Isolierung	32
II.2.6	Ligation restringierter DNA-Fragmente	32
II.2.7	Sequenzierung von DNA	33
II.3	Proteinanalytische Methoden	33
II.3.1	Isolierung von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial	33
II.3.2	Isolierung von Gesamtprotein aus BY-2 Zellen	33
II.3.3	Bestimmung des Gesamtproteingehalts	34
II.3.4	SDS-PAA Gelelektrophorese und CBB-Färbung	34
II.3.5	Immunoblot und Dot Blot Analyse	35
II.3.6	GM1-ELISA	35
II.3.7	Kationenaustauschchromatographie	36
II.3.8	Oberflächen Plasmon Resonanz (SPR) Messungen	37

II.4	Mikrobiologische Methoden.....	38
II.4.1	Kultivierung und Stammhaltung von <i>E. coli</i>	38
II.4.2	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	38
II.4.3	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> Zellen	39
II.4.4	Kultivierung und Aufbewahrung von <i>A. tumefaciens</i>	39
II.4.5	Herstellung elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i> Zellen.....	39
II.4.6	Elektrotransformation von <i>A. tumefaciens</i> Zellen	40
II.5	Pflanzenbiotechnologische Methoden.....	40
II.5.1	Kultivierung von Pflanzen und Pflanzenzellen	40
II.5.2	Transformation von Pflanzen und Pflanzenzellen.....	41
II.6	Zellbiologische Methoden	43
II.6.1	Präparation von Protoplasten.....	43
II.6.2	Fixierung von Protoplasten.....	45
II.6.3	Immunfluoreszenzfärbung von Protoplasten.....	45
II.6.4	Fluoreszenz- und konfokale Laser Scanning-Mikroskopie	46
II.6.5	Isolierung von Membranen aus BY-2 Zellen	46
II.7	Immunologische Methoden	47
II.7.1	Herstellung der Futterpellets	47
II.7.2	Orale Applikation des Pflanzen-basierten Impfstoffes.....	47
II.7.3	Intranasale Applikation der mukosalen Adjuvanzien.....	48
II.7.4	Probenentnahme und -aufbereitung.....	48
II.7.5	Analyse der mukosalen und humoralen Antikörperantworten	48
II.8	Bestimmung des Nikotingehaltes in Tabakblättern.....	51
II.8.1	Nikotinextraktion.....	51
II.8.2	HPLC-MS-MS-Analyse	52
III.	Ergebnisse	54
III.1	Produktion der pflanzenbasierten, oral applizierbaren Impfstoffe	55
III.1.1	Herstellung der Pflanzenexpressionsvektoren	55
III.1.2	Qualitativer und quantitativer Nachweis der löslichen und membranständigen Modellantigene	60
III.1.3	Funktionalitätsanalyse der TCRCys-Membranankervariante	70
III.2	Evaluierung von Tabak als Produktionssystem für essbare Impfstoffe	89
III.2.1	Nikotinbestimmung	90
III.2.2	Studien zur oralen Aufnahme und Verträglichkeit von prozessiertem und unprozessiertem Tabakmaterial.....	93
III.2.3	Studien zur Antigenstabilität in Tabakfutterpellets	93
III.3	Orale Immunisierungen	94
III.3.1	Herstellung von Futterpellets und Quantifizierung der Antigenmenge.....	95
III.3.2	Immunisierungsprotokoll.....	97
III.3.3	Analyse der Immunantworten	99
IV.	Diskussion.....	114
IV.1	Akkumulation der löslichen und membranständigen Antigene	115
IV.2	Funktionalität des CTB-Fusionspartners	118
IV.3	Funktionalität der TCRCys-Membranankervariante	121
IV.4	Orale Immunisierungen	126
IV.4.1	Mukosales Immunsystem im Darm.....	126
IV.4.2	Wirksamkeit des CTB-HVR1-TCRCys-basierten oralen Impfstoffes	129
V.	Ausblick.....	146
VI.	Zusammenfassung	149

VII.	Literatur	152
VIII.	Abkürzungsverzeichnis.....	174
IX.	Abbildungsverzeichnis	177
X.	Tabellenverzeichnis	179

I. EINLEITUNG

I.1 Impfstoffe

I.1.1 Bedarf an neuen Impfstoffen

Infektionskrankheiten sind für etwa 25% aller Todesfälle weltweit verantwortlich [1]. Besonders in den Entwicklungsländern hat die Vorbeugung und Bekämpfung von Seuchen und übertragbaren Krankheiten oberste medizinische Priorität. Aber auch in den Industrienationen kommt der Prävention von Infektionskrankheiten eine immer größere Bedeutung zu. Durch die Rückkehr bereits zurückgedrängter Erreger wie Malaria und Tuberkulose sowie der Verbreitung ursprünglich lokal beschränkter Pathogene wie Influenza-Virus, Dengue-Virus oder SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome)-assoziiertes Coronavirus oder den Ausbruch bisher unbekannter Infektionskrankheiten wie Aids, Ebola, Lassa-Fieber und Lyme-Borreliose, die u.a. auf eine gesteigerte Globalisierung und Zunahme der Impfmüdigkeit sowie die zunehmende Resistenz pathogener Mikroorganismen gegen anti-virale Hemmstoffe und Antibiotika zurückzuführen sind [2], besteht ein enormer, ständig wachsender Bedarf an neuen effektiveren Impfstoffen. Diese sollten mit Hilfe ökonomischer Produktionsverfahren und einer leichten Verabreichbarkeit eine Versorgung der gesamten Bevölkerung gewährleisten.

Gegen viele Infektionskrankheiten ist aber immer noch kein Impfstoff verfügbar. Durch die Aufklärung der Genomsequenzen weiterer Erreger und die Identifizierung neuer Targets wird der Bedarf an der Entwicklung neuer Impfstoffe und alternativer Herstellungsverfahren sowie Impfstrategien zur Optimierung der Sicherheit, Verträglichkeit, Wirksamkeit und Kosteneffizienz von Impfstoffen weiter steigen. Die Entwicklung und Etablierung alternativer Produktionssysteme und Verabreichungsformen gehören demnach zu den wichtigsten Zielen der modernen Impfstoffforschung.

I.1.2 Prinzip und Wirkungsweise von Impfstoffen

Aktive oder präventive Vakzinierungen (Schutzimpfungen) erfolgen nach dem Prinzip, dass das Immunsystem mit abgeschwächten, abgetöteten Mikroorganismen oder Bruchstücken derselben konfrontiert wird, ohne dass eine Erkrankung entsteht [3]. Ziel ist die Erzeugung einer spezifischen humoralen Immunität in Form von neutralisierenden Antikörpern zur Bekämpfung extrazellulärer Krankheitserreger, und/oder einer zellvermittelten Immunität durch spezifische sensibilisierte, cytotoxische T-Lymphozyten, die die Eliminierung intrazellulärer Mikroorganismen gewährleistet. Der Aufbau eines immunologischen

Gedächtnisses in Form von T- und B-Gedächtniszellen soll nach einem potentiellen Kontakt mit dem authentischen Erreger eine schnelle und effektive Mobilisierung der Immunantwort bewirken.

Passive Immunisierung basieren auf der Injektion von Immunglobulinpräparationen oder von Serum aktiv immunisierter Tiere [3]. Da Antikörper nur eine geringe Halbwertszeit im Organismus aufweisen, werden sie v.a. zur direkten Neutralisation von Toxinen und seltener zur kurzfristigen Prävention von Infektionskrankheiten eingesetzt.

I.1.3 **Anforderungen an einen optimalen Impfstoff**

Ein idealer Impfstoff sollte in erster Linie wirksam sein, d.h. unabhängig von der individuellen genetischen Disposition des geimpften Organismus einen effektiven, lang anhaltenden Impfschutz vermitteln. Die induzierten Immunantworten sollten denen der natürlichen Immunisierung gleichen, d.h. gegen intrazelluläre Krankheitserreger sollten vorwiegend zelluläre und gegen extrazelluläre Pathogene humorale Immunantworten induziert werden. Dies setzt die Entwicklung optimaler Impfstoffkompositionen voraus (I.3.1). Dabei hängt die Wirksamkeit eines Impfstoffes nicht nur von der Wahl und dem Design des Zielmoleküls, d.h. dem Vorhandensein geeigneter B- und T-Zell-Epitope [4], sondern von der Dosis, der Häufigkeit (Boosterung) und der Verabreichungsrouten (mukosal, transkutan, intramuskulär, intraperitoneal) ab. Die effiziente Aufnahme und Antigenpräsentation durch Antigen präsentierende Zellen (APC), bzw. im Fall einer mukosalen Verabreichung die Adhäsion und Aufnahme über das Mukosaepithelium, setzt bei nichtzellulären Impfstoffen oft die Konjugation an geeignete Vehikel oder Trägermoleküle (Carrier) und die Coapplikation von immunstimulatorischen Adjuvantien voraus (I.3.1). Weitere Ansprüche an einen optimalen Impfstoff sind die Einhaltung hoher Sicherheitsstandards, d.h. die Verabreichung sollte mit geringen Nebenwirkungen verbunden sein, eine hohe Bevölkerungsakzeptanz, eine kosteneffektive Produktion und eine hohe Stabilität der Impfantigene, um eine ungekühlte Lagerung und eine gewisse Halbwertszeit im geimpften Organismus zu gewährleisten.

I.1.4 **Konventionelle Impfstoffe**

Die Geburtsstunde der traditionellen Vakzinierungen im Jahre 1796 durch Edward Jenner, der mit der Verabreichung harmloser, kreuzreaktiver Kuhpocken-Viren (Vaccinia-Virus, VACV) einen Schutz vor Pocken beim Menschen induzierte [5], ermöglichte die Entwicklung einer Vielzahl human- und veterinärmedizinisch relevanter Vakzine. Konventionelle Impfstoffe basieren auf attenuierten (Lebendimpfstoffe), inaktivierten Krankheitserregern

(Totimpfstoffe) und Bruchstücken von Pathogenen (Spaltimpfstoffe und Untereinheiten- (Subunit-) Impfstoffe) [6].

Attenuierte Lebendimpfstoffe enthalten replikations- bzw. vermehrungsfähige Viren oder Bakterien, die in ihrer Virulenz abgeschwächt wurden (Attenuierung). Sie induzieren überwiegend effektive, lang anhaltende Immunantworten und führen im Fall viraler Lebendimpfstoffe aufgrund einer intrazellulären Replikation zur Proliferation cytotoxischer T-Zellen. Ihre Verabreichung ist jedoch risikoreich, da sie zur infektiösen Wildtyp-Form revertieren können [7].

Totimpfstoffe bestehen aus physikalisch oder chemisch inaktivierten Viren oder Bakterien. Sie sind zwar unter Sicherheitsaspekten vorteilhaft, da nach der Verabreichung keine Vermehrung erfolgt, oft aber weniger wirksam. Virale Totimpfstoffe induzieren im Gegensatz zu den Lebendvakzinen überwiegend humorale Immunantworten, da keine aktive Proteinsynthese stattfindet und somit Peptide aus den viralen Antigenen nicht über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden (I.3.1). Sie führen vielfach zu Unverträglichkeiten, da einige Bestandteile des Impfstoffes toxisch sein können. Nachteilig ist auch, dass sie im Unterschied zu attenuierten Vakzinen nicht mukosal verabreicht werden können [6].

Die Wirksamkeit von Spalt- und Subunit-Vakzinen basiert auf dem Prinzip, dass ausgewählte Antigene von Pathogenen, wie Toxine bzw. Toxoide, oder Oberflächenstrukturen genügen, um eine protektive Immunität zu induzieren [8]. Sie weisen jedoch zahlreiche Nachteile, wie geringere Effizienz und fehlende Induktion zellulärer Immunantworten auf. Desweiteren führt ihre Verabreichung oft zu unerwünschten Nebenwirkungen [9].

Konventionelle Verfahren zur Herstellung von Impfstoffen implizieren die Einhaltung hoher Sicherheitsstandards, da sie auf der Fermentation infektiöser Organismen in steriler Zellkultur bzw. ihrer Produktion in Eiern und der anschließenden Inaktivierung bzw. Attenuierung oder der Isolierung und Aufreinigung von Erregerbestandteilen basieren. Selbst bei konventionellen Subunit-Impfstoffen ist daher eine Verunreinigung mit infektiösen Komponenten nicht ausgeschlossen. Die klassische Impfstoffproduktion in Zellsuspensionen ist suboptimal, da einige human- und tierpathogene Viren und Bakterien sich in Zellkulturen nicht oder nur durch den Einsatz erheblicher Kosten vermehren lassen. Ökonomische Nachteile entstehen ebenfalls durch die hohe Anfälligkeit von sterilen Zellkulturen für Kontaminationen, der Verwendung teurer, komplexer Medien, der kostenintensiven Reinigung der Vakzine und der notwendigen Kühlung bei Transport und Lagerung [10]. Der hochtechnologische, kostenintensive Produktionsprozess sowie eine parenterale Verabreichung verhindern v.a. in Entwicklungsländern mit marginaler Infrastruktur, schlecht

ausgebildetem medizinischem Personal und mangelnder Expertise flächendeckende Vakzinierungen und machen ebenfalls eine Anwendung in der Tiermedizin unattraktiv [11, 12]. Die Biofermenter-basierte Herstellung verhindert zudem ein schnelles, flexibles Scale-up und damit eine schnelle Bereitstellung ausreichender Vakzinmengen im Fall bevorstehender Epidemien und Pandemien. Für die Bekämpfung einiger Krankheitserreger, besonders solcher, die aufgrund hoher Mutationsraten einem Antigen drift unterliegen oder solcher, die durch gezielten Antigen shift zwischen unterschiedlichen Virusstämmen zum Auftreten neuer pathogener Varianten führen, sind konventionelle Impfstoffe häufig ungeeignet. Die erforderliche Anpassung an neue Virusstämme ist mit einem enormen finanziellen Aufwand verbunden und kann im Epidemiefall aufgrund unzureichender Produktionskapazitäten zu Engpässen in der Impfstoffversorgung führen.

I.1.5 **Rekombinante Subunit-Impfstoffe**

Die alternative Produktion rekombinanter Subunit-Vakzine in Zellkulturen pro- oder eukaryotischer GRAS-(Generally Recognized As Safe-) Organismen erlaubt die Produktion von Protein- bzw. Peptidimpfstoffen unabhängig vom infektiösen Krankheitserreger und verringert dadurch signifikant ihr Risikopotential. Eine Vielzahl human- und veterinärmedizinisch relevanter Vakzinantigene wurde bereits erfolgreich in gentechnisch veränderten Bakterien, Hefen, Insekten- und Säugetierzellen produziert [13-17]. Rekombinante Produktionsverfahren ermöglichen ebenfalls die Herstellung von Impfstoffen gegen Pathogene, deren Kultivierung problematisch ist, oder die Anreicherung von immunrelevanten Antigenen, die vom Erreger selbst in zu geringen Mengen produziert werden. Der erste für den humanen Gebrauch zugelassene, rekombinante Impfstoff basiert auf einem in Hefezellen produzierten Hüllprotein des Hepatitis B-Virus und befindet sich bereits seit 1986 auf dem Markt [18].

Im Vergleich zu klassischen Ganzkeimimpfstoffen sind nichtzelluläre Protein- und Peptidimpfstoffe jedoch oft nur schwach oder gar nicht immunogen und sind daher häufig nur in hohen Dosierungen wirksam. Sie sind für die Bekämpfung intrazellulärer Krankheitserreger ungeeignet, da sie fast ausschließlich humorale Immunantworten induzieren [19]. Die Induktion der gewünschten Immunantwort erfordert daher häufig geeignete Vakzin-Formulierungen und die unterstützende Wirkung von coapplizierten Adjuvantien [14] (I.3.1).

Klassische rekombinante Herstellungsverfahren mit Hilfe tierischer oder bakterieller Zellkulturen sind mit hohen Produktionskosten verbunden, da sie einerseits auf eine Fermenter basierte Produktion angewiesen sind und andererseits die Entfernung potentieller

Kontaminationen mit Tier- und Humanpathogenen bzw. toxischen, bakteriellen Komponenten mit einem hohen technischen und finanziellen Aufwand verbunden ist. Zudem setzt die notwendige parenterale Verabreichung der rekombinanten Impfstoffe einen aufwendigen Reinigungsschritt voraus, der die nachfolgende Kühlung der isolierten Impfantigene erfordert, die in Entwicklungsländern kaum zu realisieren ist. Die Entwicklung und Etablierung alternativer Produktionssysteme und ökonomischer Herstellungsverfahren ist daher die Voraussetzung für eine Versorgung der gesamten Bevölkerung. Aufgrund zahlreicher positiver Eigenschaften könnten transgene Pflanzen in Zukunft einen großen Beitrag zur Impfstoffproduktion und -versorgung leisten (I.2).

I.1.6 Mukosale Impfstoffe

Ein Großteil derzeit gebräuchlicher Impfstoffe wird auf klassischem Wege mittels intramuskulärer oder subkutaner Injektion verabreicht und ist daher aus ökonomischer und mitunter auch aus immunologischer Sicht unvorteilhaft [20]. Alternative Impfstrategien, die eine „nadelfreie“ Verabreichung von Impfstoffen über die Schleimhäute ermöglichen, eliminieren nicht nur Kosten, bedingt durch die Injektion von Vakzinen, sondern auch das Risiko der Verbreitung von Infektionen durch kontaminierte Spritzen. Die wesentlich angenehmere Art der Impfstoffgabe führt zudem zu einer höheren Akzeptanz in der Bevölkerung und fördert somit die Impfbereitschaft, die eine Voraussetzung für flächendeckende Vakzinierungen ist.

Das Potential eines Impfstoffes wird wesentlich durch die Verabreichungsrouten beeinflusst [21, 22]. Da über 90% aller Krankheitserreger über die Schleimhäute der oberen Atemwege sowie des Verdauungs- und Urogenitaltraktes übertragen werden, haben mukosal verabreichte Impfstoffe, die den natürlichen Infektionsweg mukosal übertragener Pathogene nachahmen, aus immunologischer Sicht einen ganz entscheidenden Vorteil gegenüber injizierten Impfstoffen [20, 23, 24]. Während injizierbare Impfstoffe im Wesentlichen zur Aktivierung des peripheren Immunsystems führen, d.h. die Produktion von Serum IgG und/oder die Proliferation von cytotoxischen T-Zellen induzieren, also erst eingreifen, wenn die Erreger bereits in den Organismus eingedrungen sind, basieren mukosale Vakzinierungsstrategien auf der Mobilisierung von lokalen Immunmechanismen an den Schleimhäuten, die Krankheitserreger direkt an ihrer „Eintrittspforte“ eliminieren. Sie ermöglichen somit die Entwicklung einer neuen Generation von potentiell effektiveren Impfstoffen [20, 24]. Neben dem Aufbau einer lokalen Infektabwehr an den Schleimhäuten in Form von sekretorischem Immunglobulin A (sIgA), haben mukosale Impfstoffe das Potential, auch systemische IgG- sowie spezifische T-Zell-vermittelte Immunantworten in den peripheren Lymphorganen

sowie ein immunologisches Gedächtnis zu induzieren [23]. Mukosale Vakzine haben daher ein großes Potential im Kampf gegen eine Vielzahl nicht nur mukosal übertragbarer Infektionskrankheiten.

Aufgrund der Schwierigkeit einer exakten Dosierung sowie der Kontrolle mukosaler Immunantworten [20] sind bislang nur wenige mukosale Vakzine für den humanen Gebrauch zugelassen. Das prominenteste und älteste Beispiel für einen effektiven mukosalen Impfstoff ist die orale Polio-Vakzine nach Sabin, die auf attenuierten Lebendimpfstoffen basiert [25]. Sie wird heute hauptsächlich in Dritte-Welt-Ländern verabreicht und wurde aufgrund seltener Fälle einer Vakzine-assoziierten Poliomyelitis in den Industrienationen weitestgehend durch eine inaktivierte Variante ersetzt, die parenteral verabreicht werden muss [26]. Weiterhin kommen im Humanmedizinbereich orale Ganzkeimimpfstoffe gegen *Salmonella typhi* (Vivotif, Berna Biotech) [27, 28], *Vibrio cholerae* (Orochol, Berna Biotech) [29] und Rotavirus [30] sowie ein intranasaler, Virosomen-basierter Influenza-Impfstoff (FluMist, Medimmune/Wyeth) [31] zum Einsatz.

I.2 Transgene Pflanzen als Bioreaktoren

I.2.1 Produktion oral verfügbarer Impfstoffe in gentechnisch veränderten Pflanzen

Die alternative Produktion rekombinanter Proteine in transgenen Pflanzen und Pflanzenzellkulturen bietet zahlreiche Vorteile im Vergleich zu herkömmlichen Fermentationstechniken [32-36]. Im Gegensatz zu tierischen und bakteriellen Systemen bieten transgene Pflanzen ein sicheres Expressionssystem zur Produktion von pharmazeutischen Proteinen ohne Kontaminationsrisiko durch human- oder tierpathogene, virale oder bakterielle Komponenten. Neben sicherheitstechnischen Aspekten sind Pflanzensysteme auch in ökonomischer Hinsicht vorteilhaft. Die Herstellung kommerzieller PMPs (**Plant Made Pharmaceuticals**) erfordert im Vergleich zu herkömmlichen Bioreaktorproduktionen deutlich geringere Investitions- und Produktionskosten. Für ihre Kultivierung sind keine teuren Nährmedien und Medienzusätze erforderlich und für ihre Ernte, Lagerung und Aufbereitung könnten bereits vorhandene Infrastrukturen der Lebensmitteltechnologie genutzt werden. Eine Vergrößerung des Produktionsmaßstabes wäre im Fall einer Freilandproduktion leicht zu erreichen und ist mit geringeren Kosten verbunden als ein Scale-up von bakteriellen oder eukaryotischen Zellkulturen. Dadurch wird im Bedarfsfall eine schnelle Mobilisierung großer Produktionskapazitäten ermöglicht.

Aufgrund der genannten Vorzüge gewinnen pflanzliche Produktionssysteme bei der Entwicklung und Herstellung medizinisch relevanter Proteine immer mehr an Bedeutung [37, 38]. Mit der Herstellung des ersten pharmazeutischen Stoffes, humanem Serumalbumin in transgenem Tabak und Kartoffeln [39], eröffnete sich ebenfalls die Möglichkeit der Produktion von Subunit-Impfstoffen in Lebensmittel- oder Futtermittelpflanzen. Dies ermöglicht eine orale Aufnahme des Impfstoffes in Form von nicht oder nur geringfügig prozessierten essbaren Pflanzenteilen (oral verfügbare Impfstoffe) sowie, in Abhängigkeit von der Pflanzenart und dem Prozessierungsgrad, eine ungekühlte Lagerung der Impfstoffe. Die orale Verabreichung eliminiert zusätzliche Kosten für ein aufwendiges Downstream-Processing, das für eine Injektion von Impfstoffen erforderlich ist und bei der Herstellung von Biopharmazeutika in herkömmlichen Systemen 60-80% der Produktionskosten ausmachen kann [40]. Durch die technisch anspruchslose lokale Impfstoffproduktion in unmittelbarer Nachbarschaft zur verarbeitenden Industrie und die einfache Verabreichung ohne das Risiko der Verbreitung von Infektionen durch kontaminierte Spritzen, sind oral verfügbare Impfstoffe besonders für die Prävention von Infektionskrankheiten in weniger entwickelten Ländern interessant [41]. Ihre Entwicklung ist ebenfalls im Bereich der Tiermedizin von großem Nutzen, da die in der Handhabung einfache und preiswerte Verfütterung Impfstoff produzierender Futtermittelpflanzen zur Prävention von Tierseuchen, besonders solcher die auf den Menschen übergreifen oder durch die Vernichtung infizierter Tiere zu erheblichen Ertragseinbußen im Nutztierbereich führen, eingesetzt werden könnte [12, 42, 43].

Als immunologische Vorteile einer Verabreichung von intaktem Pflanzenmaterial im Vergleich zu isolierten Antigenen sind zum einen eine gesteigerte Stabilität der Antigene durch das sie umgebende Pflanzengewebe bzw. die Pflanzenzellwand („Bioencapsulation“), die vor Säuredenaturierung und proteolytischem Abbau im Verdauungstrakt schützen, zu nennen [41, 44-46]. Zudem wurde ein potentieller Adjuvanzeffekt (I.3.1) verschiedener Pflanzenkomponenten bzw. sekundärer Pflanzenmetabolite nachgewiesen [47-49]. Die Stabilität und biologische Wirksamkeit pharmazeutischer Proteinprodukte bzw. Vakzinantigene im Produktionssystem hängen in hohem Maße von ihrer Authentizität, d.h. ihrer korrekten Faltung und posttranslationalen Modifizierung, beispielsweise ihrer Glykosylierung, ab. Je nach Komplexität des Zielproteins führt die Produktion heterologer Proteine in prokaryotischen Expressionssystemen durch eine fehlende Enzymausstattung für posttranslationale Modifizierungen und das reduzierende Milieu des Cytoplasmas, das die Ausbildung korrekter Disulfidbindungen verhindert, häufig zu Fehlfaltungen und der Bildung unlöslicher Proteinaggregate („inclusion bodies“) und damit zu signifikanten Ertragseinbußen

bzw. Steigerungen der Produktionskosten [50]. Bakterielle Systeme sind daher besonders für die authentische Produktion vieler viraler Proteine wie beispielsweise glykosylierter Oberflächenantigene ungeeignet. Pflanzenzellen besitzen dagegen eine ähnliche Enzyrnaustattung zur N-Glykosylierung von Proteinen wie Säugetierzellen und haben im Unterschied zu mikrobiellen Systemen das Potential, komplexe, aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzte sowie hochkomplexe Glykoproteine wie beispielsweise Antikörper in ihrer aktiven Form zu produzieren [51-54]. Die Generierung von β -1,2-Xylosyltransferase- und α -1,3-Fucosyltransferase-Doppelmutanten, sowie die Einführung der Gene für die Synthese und Verknüpfung der terminalen Zuckerreste mit β -1,4-Galaktose und Sialinsäure könnte zukünftig die vollständige Humanisierung der Glykanstruktur rekombinanter pflanzenproduzierter Glykoproteine erlauben [55-58].

Seit der Produktion des ersten, pflanzenproduzierten Impfstoffes (einem Hepatitis B Oberflächen-Antigen) im Jahre 1992 in gentechnisch verändertem Tabak [59], wurden zahlreiche human- und tiermedizinisch relevante Antigene viralen und bakteriellen Ursprungs erfolgreich in den unterschiedlichsten Pflanzenspezies produziert [46, 60-64]. Inzwischen liegen vielversprechende Daten für die Immunogenität [44, 65-69] und Protektivität zahlreicher oral verabreichter, pflanzenbasierter Vakzine gegen human- bzw. veterinärmedizinisch relevante Pathogene im Tierversuch vor [70-74]. Obwohl rohe Kartoffeln und insbesondere Tabak nur in begrenztem Umfang oral verabreicht werden können, überwiegen in der Literatur die Ergebnisse mit diesen beiden eher als Modellsysteme zu bezeichnenden Pflanzenspezies.

Die ersten pflanzenproduzierten, oral verfügbaren Impfstoffe wurden bereits erfolgreich in klinischen Phase I-Studien getestet [75-78]. Dabei handelt es sich um eine auf der B-Untereinheit des hitzelabilen Toxins (LTB) enteropathogener *E. coli* Stämme basierende Vakzine sowie ein Kapsidprotein-Impfstoff gegen Norwalk Virus, die in Form von rohen transgenen Kartoffelknollen bzw. Maiskörnern verabreicht wurden und einen in Feldsalat produzierten Hepatitis B-Impfstoff.

Einige kommerziell genutzte Proteine, darunter Avidin, Aprotinin, β -Glucuronidase, menschliches Lactoferrin sowie Lysozym und Trypsin, werden bereits in transgenen Pflanzen (Tabak, Mais und Reis) produziert [79-83]. Dabei handelt es sich jedoch ausschließlich um technische Enzyme bzw. Proteine für die diagnostische Anwendung. Die Markteinführung von rekombinanten, pflanzenproduzierten Proteinen mit pharmazeutischer Anwendung gestaltet sich dagegen weitaus komplizierter und setzt eine hohe Qualität, einen hohen Reinheitsgrad der Produkte, eine Standardisierbarkeit des Produktionsprozesses und eine

Konformität der finalen Produkte mit GMP („good manufacturing practice“)-Anforderungen voraus. Die kommerzielle Produktion rekombinanter Arzneimittel beschränkt sich zurzeit vorwiegend auf mikrobielle [84, 85] sowie tierische Zellkulturen [86, 87]. Eine Reihe von Biopharmazeutika aus transgenen Pflanzen befindet sich jedoch bereits in der klinischen Erprobung der Phasen I und II, darunter Interferon- α 2b, Insulin und ein Antikörper zur Kariesprophylaxe [88-91]. Das in Karottenzellsuspension hergestellte Enzym Glucocerebrosidase zur Behandlung von Morbus Gaucher befindet sich kurz vor der Zulassung durch die FDA [92, 93].

Die Entwicklung marktorientierter oral verfügbarer Impfstoffe, insbesondere für die humane Anwendung, gestaltet sich jedoch als sehr komplex. Auf der einen Seite haben die derzeit noch sehr geringe Akzeptanz und Vorbehalte in der Bevölkerung Medikamente in Lebensmitteln zu produzieren, oder gar transgene Pflanzen mit dem Ziel einer oralen Immunisierung zu verabreichen sowie bislang noch nicht genau definierte Regelungsmechanismen für ihre Produktion und Zulassung einen negativen Einfluss auf schnelle Fortschritte in der Forschung und Entwicklung direkt konsumierbarer, oral verfügbarer Impfstoffe. Eine potentielle Marktzulassung wird auf der anderen Seite dadurch erschwert, dass die Impfantigene nicht aus der produzierenden Pflanze isoliert werden. Daher ist eine exakte Dosierung, die eine generelle Anforderung an pharmazeutische Proteine mit kommerzieller Anwendung ist, bei einem direkten Konsum ganzer Pflanzenteile durch schwankende Akkumulationsraten nahezu unmöglich. Gründe sind wechselnde Umwelteinflüsse bzw. Kultivierungsbedingungen sowie die genetische Instabilität der Pflanzenzelle [94], und ein potentieller proteolytischer Abbau der Vakzinantigene im Gastrointestinaltrakt [95].

Im Gegensatz zur parenteralen Injektion von Impfstoffen, die im Fall von isolierten Subunit-Vakzinen durch Reinigung aufkonzentriert werden können, ist bei einer oralen Applikation eine vielfach höhere Dosierung des Antigens nötig, um protektive Immunantworten zu induzieren [96]. Die Entwicklung wirksamer essbarer Impfstoffe setzt demnach eine adäquate Akkumulation der Vakzinantigene im Pflanzensystem voraus, um einerseits mit klassischen Verfahren der rekombinanten Impfstoffproduktion konkurrieren zu können und andererseits eine realisierbare Dosierung des zu verzehrenden Pflanzenmaterials zu ermöglichen. Neben Ertragsvariationen zwischen individuellen Pflanzen ist die Erzielung ausreichend hoher Akkumulationsraten eine der wichtigsten Limitierung oral verfügbarer Impfstoffe [97, 98]. Obwohl die Expression von Antikörpern in Pflanzen zu Akkumulationsraten von bis zu 8% des löslichen Gesamtproteins führen kann [99], ist die stabile Integration des Transgens in das

Pflanzengenom im Vergleich zu etablierten mikrobiellen und eukaryotischen Fermentationstechniken jedoch häufig mit einer geringen Proteinausbeute (0,1-1% des löslichen Gesamtproteins) verbunden [81, 97, 100, 101]. Die Reduzierung von Produktschwankungen und die Steigerung der Produktivität haben demnach bei der Entwicklung effektiver, oral verfügbarer Vakzine oberste Priorität. Geringfügige Prozessierungen von Pflanzenmaterial, beispielsweise die Prozessierung zu Pflanzensaft oder -pulver oder die Formulierung von Impfstoffen in Form von Kapseln oder Tabletten, könnten in Zukunft die Stabilität und Standardisierbarkeit essbarer Impfstoffe optimieren [50, 102]. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung ist es jedoch fraglich, ob sich direkt konsumierbare pflanzenbasierte Impfstoffe für die humanmedizinische Anwendung jemals am Markt durchsetzen können. In naher Zukunft ist ihre Anwendung eher im Bereich der Tiermedizin zu erwarten. Derzeit werden von verschiedenen US Firmen kommerzielle Tiervakzine für den amerikanischen Markt entwickelt [103-105]. Die Zulassung des ersten pflanzenproduzierten Impfstoffes durch die USDA Anfang 2006, einer in Tabaksuspensionskultur hergestellten Subunit-Vakzine zur Prävention von „Newcastle disease“ in Geflügel, ist ein erster Schritt auf dem Weg zur Kommerzialisierung pflanzenproduzierter Vakzine (www.dowagro.com/newsroom/corporatenews/2006/20060131b.htm).

I.2.2 Optimierung pflanzlicher Expressionsstrategien

Die Entwicklung effektiver pflanzenproduzierter, essbarer Vakzine wird häufig durch die geringe Akkumulation rekombinanter Proteine in Pflanzen (I.2.1) und eine unzureichende Immunogenität löslicher Proteinantigene beschränkt (I.3.1). Verschiedene Strategien zur Optimierung der Akkumulation heterologer Antigene sind bereits in zahlreichen Arbeitsgruppen etabliert. Neben der Verwendung zusätzlicher genregulatorischer Elemente (Enhancer-Sequenzen, Polyadenylierungssignale) [106-108] und Steigerung der Translationsrate durch die Verwendung pflanzentypischer Triplets (Codonoptimierung) [109] [110], kommen alternative Transformationsmethoden wie die Chloroplasten- [111-113] bzw. Chromoplastentransformation [114] sowie virale Vektorsysteme zur transienten [115, 116] bzw. stabilen Transformation [117] zum Einsatz. Einige dieser Strategien sind jedoch für die Optimierung essbarer Impfstoffe ungeeignet. Transiente Systeme sind aufgrund einer Kontamination mit viralen Sequenzen oder Agrobakterien nicht für den direkten Verzehr von Pflanzenmaterial geeignet: Die Integration von Transgenen in das Chloroplastengenom ist für die authentische Produktion von Glykoproteinen ungeeignet, da keine N-Glykosylierung erfolgt. Alternative Strategien zur Optimierung der Produktivität nukleär transformierter

Pflanzen sind daher erforderlich, um die Entwicklung oral verfügbarer Vakzine voranzutreiben.

Die Akkumulation hoher Proteinausbeuten im Cytosol gestaltet sich aufgrund des reduzierenden Milieus, das die Ausbildung von Disulfidbrücken verhindert, dem Fehlen geeigneter Chaperone, die v.a. die korrekte posttranslationale Faltung komplexer, multimerer Proteine unterstützt, und dem Vorhandensein zahlreicher Proteasen für eine Vielzahl rekombinanter Proteine als problematisch [118]. Die Fusion an spezifische Signale, die ein subzelluläres Targeting in intrazelluläre Kompartimente bzw. in den sekretorischen Weg erlauben und eine Anreicherung im ER oder Apoplasten sowie eine Integration der Zielproteine in die Pflanzenzellmembran bewirkten, führten in vielen Fällen zu signifikanten Produktsteigerungen [119-123].

I.2.2.1 Verwendung der β -Kette des humanen T-Zell-Rezeptors als heterologer Transmembrananker

Eine erfolgreiche Verankerung von rekombinanten Proteinen in der Zellmembran von Säugetier- und Pflanzenzellen durch die Verwendung von heterologen Transmembranankern konnte bereits für scFv-Fragmente sowie Vollängenantikörper gezeigt werden [122-124]. Erstmals sollten in dieser Arbeit Antigene in der Pflanzenzellmembran verankert werden, um neben einer potentiellen Akkumulationssteigerung eine partikuläre Präsentation von Modellantigenen zu bewirken. Dies sollte zu einer gesteigerten Antigenaufnahme durch M-(microfold, membraneous) Zellen, morphologisch und funktionell spezialisierte Zellen des Dünndarmepithels, die in die transepitheliale Aufnahme von Makromolekülen, partikulären Antigenen und Mikroorganismen involviert sind, führen (I.3.1).

Die erfolgreiche Verankerung heterologer Proteine in der Cytoplasmamembran durch Fusion an die β -Untereinheit des humanen T-Zell-Rezeptors (TCR β) konnte erstmals in Säugetierzellen gezeigt werden [125]. Der humane T-Zell-Rezeptor (TCR) reifer zirkulierender T-Lymphozyten im peripheren Blut besteht aus einer α - und β -transmembranen Glykoproteinkette. Die extrazelluläre Domäne des heterodimeren Rezeptormoleküls setzt sich aus einer aminoterminalen variablen (V) und einer carboxyterminalen konstanten Region (C) zusammen, die in hohem Maße dem Fab-Fragment eines Immunglobulins homolog ist [126, 127]. Sie ist über eine kurze Gelenk (hinge-) Region, die einen Cysteinrest enthält, der über die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke eine Dimerisierung der Ketten bewirkt, mit den Transmembranhelices verbunden. Die Transmembransegmente weisen neben hydrophoben Aminosäuren untypischerweise auch positiv geladene Aminosäurereste auf (zwei im Fall der α -Ketten und eine innerhalb der β -

Kette), die für die Assoziation des TCR mit den invarianten Proteinen des CD3-Komplexes (CD3- γ , - δ , - ϵ , $\zeta\zeta$) verantwortlich sind (IV.3). Letztere sind in den Transport des Rezeptorkomplexes an die Zelloberfläche und die Signaltransduktion nach Aktivierung der T-Zelle involviert [128]. C-terminal folgt eine kurze cytoplasmatische Domäne.

Im Pflanzensystem konnten bereits die anti-TMV scFv-Fragmente scFv24 [123] und scFv29 [129] sowie die NA3-Domäne von CEA (carcinoembryonic antigen) (persönliche Mitteilung C. Vaquero, Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen) durch Fusion an die vollständige, konstante Region der TCR β -Kette in die Pflanzenzellmembran integriert werden. Die Akkumulation des membranverankerten scFv24 in Tabak konnte im Vergleich zur korrespondierenden cytosolisch exprimierten Version entscheidend verbessert werden [123].

I.2.3 **Tabak als Modellsystem zur Herstellung essbarer Impfstoffe**

Tabak ist ein etabliertes Expressionssystem und durch die unproblematische Kultivierung und die hohe Biomasseproduktion in relativ kurzen Zeiträumen grundsätzlich für die rekombinante Produktion von Proteinen geeignet [81, 130, 131]. Protokolle zur transienten und stabilen Transformation und Regeneration von Tabakpflanzen sowie Aufschlussmethoden zur Analyse transgener Pflanzen sind bereits seit Jahren etabliert und erlauben eine leichte genetische Manipulation. Da Tabak weder Nahrungs- noch Futtermittelpflanze ist, ist die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination der Nahrungskette relativ gering [50]. Für die Entwicklung oral verfügbarer Impfstoffe ist Tabak als Expressionssystem jedoch nur in begrenztem Umfang geeignet, da Solanaceen und insbesondere Tabakspezies überwiegend signifikante Mengen an toxischen Alkaloiden (Sekundärmetabolite zu denen beispielsweise das in Tabak vorkommende Nikotin gehört) enthalten, die sich je nach Konzentration und Toxizität bei einer oralen Verabreichung von transgenem Tabakmaterial als problematisch erweisen können [132]. Die Verfütterung von Tabakextrakt [133, 134] sowie von prozessierten Tabakblättern [95] in früheren Tierstudien lassen jedoch auf eine generelle Verträglichkeit von Tabak im Rahmen einer oraler Immunisierungen schließen und erlauben die Herstellung einer experimentellen oral verfügbaren Vakzine.

I.3 Strategien zur Optimierung oral verfügbarer Impfstoffe

I.3.1 Mukosale Adjuvantien

Die Immunogenität von Vakzin-Antigenen hängt maßgeblich von ihrer physikalischen und chemischen Beschaffenheit ab. Partikuläre Antigene wie Bakterien, Viren und Zellorganellen haben das Potential starke und schnelle Immunantworten zu induzieren, da sie effektiver von Immunzellen aufgenommen werden und eine multivalente Präsentation der Antigene durch Quervernetzung von B-Zell-Rezeptoren zu einer T-Zell-unabhängigen Aktivierung von B-Zellen führen kann [135]. Lösliche Antigene vermitteln, je nach Molekulargewicht und Komplexität, allein meistens keine ausreichende Immunität [136, 137]. Besonders die orale Verabreichung von Antigenen ist mit zahlreichen Herausforderungen verbunden. Neue Generationen von Impfstoffen, die nicht mehr auf intakten, vermehrungsfähigen Erregern beruhen, sind oral appliziert meistens nur schwach oder überhaupt nicht immunogen. Der Gastrointestinaltrakt stellt einerseits durch Passagen extrem hoher und niedriger pH-Werte und der Vielzahl proteolytischer Enzyme ein ungünstiges Milieu für Proteine dar. Andererseits werden lösliche Antigene nur ineffizient über das Schleimhautepithel aufgenommen, da sie nicht auf effiziente Mechanismen des Targetings und der Invasion authentischer Erreger zurückgreifen können [138]. Zudem können sie aufgrund fehlender konservierter Strukturen, die an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche von dendritischen Zellen binden, keine costimulierende Aktivität induzieren (s.u.) und induzieren somit mit höherer Wahrscheinlichkeit immunologische Toleranz als zelluläre und partikuläre Varianten. Potentielle Immunantworten gegen rekombinante Subunit-Impfstoffe sind überwiegend humoraler Natur, da extrazelluläre Antigene normalerweise nicht in den MHC Klasse-I Weg eingeschleust werden. Ein ausreichender Impfschutz gegen intrazelluläre Krankheitserreger erfordert jedoch ebenfalls die Aktivierung cytotoxischer CD8 T-Zellen [139]. Eine effektive Antigenpräsentation ist demnach Voraussetzung für die Erzeugung einer protektiven Immunantwort.

Die Art, die Intensität und die Beständigkeit der Immunantworten gegen solche Antigene können durch individuelle Vakzinformulierungen und die Verwendung geeigneter Hilfsstoffe, sogenannter Adjuvantien (adjuvare: [lat.] = helfen) signifikant verstärkt bzw. modifiziert werden [140-142]. Dabei handelt es sich um eine Gruppe strukturell heterogener Komponenten für die es derzeit noch keine allgemeingültige Klassifizierung gibt. Die immunstimulatorische Wirkung kann dabei entweder auf einer Verstärkung des Antigen signals (Erhöhung der Stabilität und Dauer der Antigenpräsenz, Targeting in immunologisch sensible Regionen, Optimierung der Antigenaufnahme), oder der Induktion

costimulatorischer Aktivität durch Bindung an phylogenetisch konservierte, spezifische Pathogen-Erkennungsrezeptoren (PRR, „Pathogen Recognition Receptors“) immunrelevanter Zellen beruhen (IV.4.1), oder beide Eigenschaften miteinander verbinden. Zu den Antigen-signal-verstärkenden Adjuvantien zählen Trägerstrukturen (Vehikel, Carrier), die lösliche Antigene in ein partikuläres bzw. multimeres Format überführen, das von M-Zellen des Dünndarmepithels effektiver aufgenommen wird [143-146] und/oder das Antigen vor proteolytischer Aktivität im Gastrointestinaltrakt schützen, es langsam und kontinuierlich freigeben und damit die Dauer der Antigenpräsenz im geimpften Organismus erhöhen (Depoteffekt). Dazu zählen ebenfalls Protein-Carrier, die potente T-Zell-Epitope bereitstellen und/oder solche, die ihre Funktion maßgeblich über die Bindung an spezifische Rezeptoren immunrelevanter Zellen vermitteln (Targetingfunktion). Zu den Erstgenannten zählen immunologisch inerte Verpackungssysteme wie PLG (**P**oly-**L**actide-co-**G**lycolide)-, Alginat-, Chitosan-, oder Stärke-Partikel [147-152]. Liposomen können sowohl die Antigenaufnahme als auch die –präsentation durch APC's optimieren und das Antigen vor potentielltem Abbau schützen [153]. ISCOMs (**I**mmune **S**timulatory **C**omplexes) sind in der Lage konjugierte Antigene in den MHC-Klasse-I Weg einzuschleusen und können so neben humoralen auch zelluläre Immunantworten gegen konjugierte lösliche Antigene induzieren, die für die Bekämpfung intrazellulärer Erreger essentiell sind [154]. Virus-like Particles (VLP), multimer Partikel viraler Kapsid- und Hüllproteine, sind nicht nur durch das Vorhandensein spezifischer T-Zell-Epitope und der potentiellen Erhaltung von Konformationsepitopen hochimmunogen, sondern besitzen die Eigenschaft, genetisch fusionierte (synthetische) B-Zell-Epitope in partikulärer, multivalenter Form zu präsentieren und damit ihr immunogenes Potential zu erhöhen [155-158].

Die immunstimulatorische Potenz mukosaler Adjuvantien mit Targetingfunktion beruht auf einem selektiven Targeting von fusionierten Vakzinantigenen zum Mukosaepithelium, bedingt durch eine hohe Affinität zu Strukturen auf der apikalen Zelloberfläche von Epithelzellen. Dies bewirkt eine optimierte Zelladhäsion und transepithelialen Aufnahme von Antigenen. Die Wirkung von invasiven avirulenten oder attenuierten viralen Impfstämmen, wie Vaccinia-, Adeno- oder Herpes-Simplex-Virus [159-161] sowie attenuierten bakteriellen Lebendvektoren wie Salmonellen oder Shigellen [28, 161-163] als Träger von rekombinanten Antigenen, basiert auf angeborenen Mechanismen der Kolonisation und Invasion über mukosale Epithelien [164] und dem Vorhandensein hochkonservierter bakterieller Komponenten (PAMP's). Alternative Ansätze beruhen auf der Nachahmung mikrobieller Strategien der endozytotischen Aufnahme über das Mukosaepithel. Ein äußerst viel

versprechender Ansatz ist der Einsatz von bakteriellen Adhäsinen, mikrobielle Virulenzfaktoren, die spezifische Rezeptormoleküle auf der Oberfläche von Wirtszellen erkennen und binden, und dadurch eine Kolonisation des Mukosaepitheliums und die Infektion des Wirtes ermöglichen. Dazu gehören Lektine, die spezifische Kohlehydratanteile von Rezeptormolekülen erkennen [165, 166] sowie Fimbrien [167] und Invasine [168]. Als vielversprechend hat sich ebenfalls die Identifizierung synthetischer M-Zell-Liganden erwiesen [169]. Die Adjuvantizität bakterieller Enterotoxine, wie Cholera Toxin (CT) aus *Vibrio cholerae* (I.3.1.1) und hitzelabiles Toxin (LT) enterotoxischer *Escherichia coli*-Stämme beruht einerseits auf einer durch ihre nicht toxische B-Untereinheit vermittelte spezifische Bindung an Zellen des Mukosaepithels und andererseits auf den starken immunmodulatorischen Eigenschaften der toxischen A-Untereinheit [170, 171] (I.3.1.1). Der Einsatz von CT und LT ist durch ihre Toxizität limitiert. Eine Alternative ist die Verwendung detoxifizierter Derivate mit erhaltener immunologischer Aktivität [172-174].

Die adjuvante Wirkung coapplizierter bakterieller oder viraler PAMP's beruht auf ihrer Bindung an Pathogen-Erkennungsrezeptoren (PRR) auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen [175], die zur Expression von costimulatorischen Molekülen und damit zur Aktivierung spezifischer, adaptiver Immunreaktionen führt (IV.4.2.8). Dazu gehören beispielsweise Monophosphoryl Lipid A (MPL-A), ein detoxifiziertes Derivat der Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Bakterien [176] sowie bakterieller Lipopeptide, darunter Muramyldipeptid (MDP) eine immunologisch aktive Zellwandkomponente aus Mycobakterien [177] und Makrophagen aktivierendes Lipopeptid-2 (MALP-2) (I.3.1.2), oder bakterielle DNA [178].

I.3.1.1 Die Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB)

Cholera Toxin (CT) ist ein Enterotoxin, das von dem nicht-invasiven enteropathogen Bakterium *Vibrio cholerae* sekretiert wird. Es bewirkt nach Aufnahme in Darmepithelzellen über Signaltransduktion die Adenylat-Cyclase-abhängige Öffnung von Ionenkanälen, die zu einer verstärkten Sekretion von Wasser und Elektrolyten ins Darmlumen führt [179]. CT ist eine heterohexamere Verbindung, die zur AB₅-Gruppe bakterieller Toxine gehört [180]. Die spezifische Bindung und Aufnahme von CT in Epithelzellen erfolgt über die nicht toxische B-Untereinheit (CTB). Diese bildet einen homopentameren Ring aus fünf identischen, über Wasserstoffbrücken und Salzbrücken assoziierten Polypeptiden. Pentameres CTB bindet mit hoher Affinität und Spezifität an seinen Rezeptor Gangliosid GM1 (Galactosyl-*N*-acetylgalactosamylsialyl-galactosylglucosylceramide), ein Glycosphingolipid das ubiquitär

auf der Zelloberfläche von Säugetierzellen vorkommt [181] und schleust so die enzymatisch aktive, toxische A-Untereinheit in die Zielzelle [182].

CTB ist nicht nur ein potentes mukosales Immunogen [96], sondern weist ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften auf [183, 184]. Die adjuvante Wirkung von CTB beruht jedoch vorwiegend auf der Adhäsion und Aufnahme genetisch fusionierter bzw. chemisch konjugierter Antigene in Zellen des Schleimhautepithels [185, 186]. CTB, sowie verschiedene chimäre CTB-Vakzinantigene, wurden bereits erfolgreich in unterschiedlichen Pflanzensystemen produziert [187-191]. Zahlreiche Studien im Tiermodell bestätigten die Effektivität von CTB als mukosalen Carrier [192-196].

I.3.1.2 Das Makrophagenaktivierende Lipoprotein-2 (MALP-2)

Das synthetische 2 kDa große membrangebundene Lipopeptid MALP-2 (S-[2,3-bispalmitoyloxypropyl] cysteinyl-GNNDESNISFKEK, Abb. II.1) stammt ursprünglich aus *Mycoplasma fermentans* [197]. Es enthält im Gegensatz zu den Lipopeptiden anderer Eubakterien nur zwei Fettsäuren und einen freien N-Terminus, der für die hohe Makrophagen- und Monozyten-aktivierende Eigenschaft verantwortlich ist. Das synthetisch hergestellte MALP-2 unterscheidet sich vom authentischen mykosomalen Lipopeptid durch die Anwesenheit von gesättigten statt ungesättigten Fettsäuren und der Ausbildung zweier stereoisomerer Konfigurationen des C₂-Atoms des Glycerols: 2R-MALP-2 und 2S-MALP-2. Die Adjuvantizität von MALP-2 hängt maßgeblich von seiner Chiralität ab, so weist die R-Konfiguration eine 1000fach höhere Aktivität auf, wohingegen der Peptidanteil keinen Einfluss auf die Aktivität hat [198].

Als Ligand von PRR's, dem TLR (Toll-like-Rezeptor) 2/6 Heterodimer [198] aktiviert MALP-2 Makrophagen und dendritische Zellen, was über die Rekrutierung der Adapterproteine MyD88 und TIRAP (Toll-IL-1-Rezeptoradapterprotein), nachfolgender Signaltransduktion und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF_κB in die Freisetzung einer Reihe von Cytokinen, Chemokinen und immunologisch relevanten Adaptormolekülen resultiert [198-201].

Experimentelle Ansätze im Tiermodell bestätigten die adjuvante Wirkung von MALP-2. Die intranasale Coapplikation von MALP-2 führte zur Induktion antigenspezifischer humoraler und zellulärer Immunantworten, sowohl auf mukosaler als auch systemischer Ebene [202-204] sowie protektiver Immunität [205, 206].

I.3.1.3 Das Pseudomonas Quinolone Signal (PQS)

PQS ist ein Signalmolekül, das von dem Gram-negativem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* am Ende der exponentiellen Phase sekretiert wird und chemisch als 2-Heptyl-3-Hydroxy-4-Quinolone identifiziert wurde (Abb. II.2). Zusammen mit anderen Quorum-sensing Signalmolekülen (QSSM) kontrolliert PQS als Bestandteil der 4-Quinolone Signaltransduktionswege die Expression zahlreicher Virulenzfaktoren [207]. Wie andere Mitglieder der QSSM weist PQS eine starke immunomodulatorische Aktivität auf [208]. PQS induziert die Sekretion von Th1 Cytokinen und aktiviert dadurch vorwiegend Th1 Immunantworten, die für die Bekämpfung von Infektionskrankheiten wie AIDS, Tuberkulose und Malaria, die durch intrazelluläre Krankheitserreger ausgelöst werden, essentiell sind.

I.4 Modellantigene

I.4.1 Die Hypervariable Region 1 (HVR1) des Hepatitis C Virus

Hepatitis C ist mit etwa 130 Millionen Infizierten [209] eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. Das Hepatitis C Virus (HCV), ein einzelsträngiges (+Strang) RNA Virus der Familie der Flaviviridae [210], wird über den parenteralen Weg, beispielsweise durch unsterile Nadeln sowie Transfusion von Blut- und Blutprodukten übertragen und ist einer der Hauptverursacher von chronischen Lebererkrankungen, darunter Leberzirrhose und Leberkrebs [211]. Zurzeit ist jedoch weder eine effektive Therapie noch ein wirksamer prophylaktischer Impfstoff gegen Hepatitis C verfügbar. Die derzeit übliche Interferon/Ribavarin Kombinationstherapie ist sehr kostenintensiv und verursacht starke Nebenwirkungen [211]. Die Zukunft der HCV-Forschung geht in zwei Richtungen: Verbesserung der Medikation und Entwicklung einer präventiven Impfung. Die Entwicklung eines effizienten HCV-Impfstoffes gestaltete sich bislang jedoch als schwierig, da auf der einen Seite eine Kultivierung des Virus nicht möglich ist und auf der anderen Seite das HCV-Genom, bedingt durch das Fehlen der Reparaturfähigkeit der RNA-Polymerase, genetisch sehr variabel ist und zu einer heterogenen Population von HCV-Varianten („Quasispezies“) innerhalb eines infizierten Organismus führt [212, 213]. Bislang sind sechs verschiedene HCV Genotypen und mindestens 70 Subtypen bekannt [214]. Folge dieser genetischen Variabilität ist das Auftreten von sog. „Escapemutanten“, die vom Immunsystem nicht erkannt werden, was in ca. 70% der Fälle zu einem chronischen Verlauf der HCV-Infektion führen kann [215].

Neue Ansätze der HCV Impfstoffentwicklung konzentrieren sich auf den besonders variablen aminoterminalen Bereich des E2-Hüllproteins des Virus, die hypervariable Region 1 (HVR1),

die vermutlich direkt in die Interaktion des HCV mit der Wirtszelle involviert ist [216, 217] und als Region einer möglichen Neutralisierung des Virus identifiziert wurde [218, 219]. Die Entwicklung einer effektiven HVR1-basierten HCV-Vakzine wird jedoch durch die hohe genetische Variabilität von HVR1 erschwert. Puntoriero *et al.* (1998) erstellten aus mehr als 200 HVR1-Varianten ein Konsensusmotif und konnten durch die Selektion einer HVR1 Phage Display Bibliothek mittels Seren chronisch mit unterschiedlichen Virus-Varianten infizierter Patienten ein synthetisches Konsensus epitop (R9) identifizieren, das eine hohe Reaktivität mit den verschiedenen Antikörperpopulationen aufwies und somit einen geeigneten Kandidaten für die Entwicklung einer effektiven HCV Vakzine darstellt.

I.4.2 ***Mycobacterium tuberculosis* Antigen MPT64**

Tuberkulose (TBC) fordert jährlich mehr Todesopfer als jede andere Infektionskrankheit [220]. Ausgelöst wird TBC durch *Mycobacterium tuberculosis*, ein invasives, intrazelluläres Bakterium das durch Tröpfcheninfektion übertragen wird und sich über die Interaktion mycobacterieller Lipoproteine mit TLR`s Eintritt in seine Wirtszelle, vorwiegend alveolare Makrophagen [221], verschafft. Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit *M. tuberculosis* infiziert, aber nur in etwa 5 bis 10% der Fälle kommt es zu einem Krankheitsausbruch; betroffen sind v.a. Immungeschwächte. So ist das Risiko einer Krankheitsmanifestation im Fall einer Coinfektion von HIV-Infizierten mit *M. tuberculosis* um ein Vielfaches erhöht und stellt besonders in Ländern mit hoher HIV Durchseuchung, d.h. vorwiegend in Entwicklungsländern, ein immenses Problem dar [222].

TBC wird derzeit überwiegend mit Hilfe von Antibiotika behandelt, die bei einem direkten Einsatz in frühen Stadien einer Tuberkuloseerkrankung höchst wirksam sind [223, 224]. Ihr Einsatz ist jedoch sehr kosten- und zeitintensiv und wird von hohen Nebenwirkungen begleitet [225]. Viele der derzeit verwendeten Antibiotika sind jedoch durch das verstärkte Auftreten multiresistenter Erregerstämme nur begrenzt wirksam.

Zurzeit ist kein effektiver Impfstoff zur Prävention von TBC verfügbar [226, 227]. Die Verwendung der einzigen verfügbaren Vakzine, einem Lebendimpfstoff basierend auf einem aus Gallenflüssigkeit von Rindern isolierten *Mycobacterium bovis* Stamm, Bacillus Calmette-Guérin (BCG), der Anfang des letzten Jahrhundert durch mehr als 230 *in vitro*- Passagen attenuiert wurde, wird heute wegen einer häufig auftretenden Unverträglichkeit und der geringen Protektivität kontrovers diskutiert [228, 229].

Verschiedene potentiell protektive mycobakterielle Antigene wurden bereits identifiziert. Dazu gehören ESAT-6, Antigen 85 und MPT64 [230-235].

Das ~22 kDa große Protein MPT64 ist Mitglied einer hochkonservierten Familie sekretorischer Proteine mit bislang noch unbekannter Funktion und wird bereits in frühen Phasen während der aktiven Replikation von *M. tuberculosis* sekretiert [236]. Experimentelle Anwendung fand MPT64 als Alternative zum Tuberkulin-Hauttest im Tierversuch [234] sowie in klinischen Phase III Studien [237]. Die Verwendung von MPT64 im Rahmen der Entwicklung einer effektiven TBC-Vakzine hat sich bislang besonders im Fall von DNA-Vakzinen [238] als erfolgreich erwiesen.

I.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Hinblick auf die stetige Zunahme von Infektions- und Tropenkrankheiten, die unzureichende Kapazität etablierter Produktionssysteme sowie die mitunter unzureichende Wirksamkeit konventioneller Vakzine besteht weltweit ein enormer, stetig wachsender Bedarf an Produktionsverfahren, die eine Herstellung von effektiven, kostengünstigen und leicht zu handhabenden Impfstoffen garantieren. Die orale Verabreichung von pflanzenproduzierten human- oder tiermedizinisch relevanten Subunit-Impfstoffen in Form von un- oder geringfügig prozessierten essbaren Lebensmittel- bzw. Futtermittelpflanzen ist unter sicherheitstechnischen und ökonomischen Gesichtspunkten vorteilhaft und könnte in Zukunft einen großen Beitrag zur Impfstoffversorgung leisten.

Neben der geringen Immunogenität von löslichen Subunit-Impfstoffen stellt die Erzeugung adäquater Akkumulationslevel, die eine orale Verabreichung angemessener Mengen des zu verzehrenden bzw. zu verfütternden Pflanzenmaterials erlauben, eine der größten Herausforderungen auf dem Weg der Entwicklung und Etablierung oral applizierbarer Impfstoffe dar.

In der vorliegenden Arbeit sollten Strategien zur Steigerung der Akkumulation und Effektivität pflanzenproduzierter oral verfügbarer Subunit-Vakzine evaluiert werden:

1. Verankerung von Vakzinantigenen in der Pflanzenzellmembran zur Erhöhung der Stabilität (gesteigerte Akkumulation) und partikulären Präsentation (verbesserte Aufnahme durch spezialisierte Zellen des Darmepithels)
2. Fusion der Vakzinantigene an das mukosale Carrierprotein CTB (gesteigerte Adhäsion und Aufnahme über das Darmepithel)
3. Coapplikation von mukosalen Adjuvantien (immunstimulatorische Wirkung).

Die Vakzinantigene sollten durch die Fusion an die β -Kette des humanen T-Zell Rezeptors (TCR β) in der Zellmembran der Tabakkultivare *Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SR1 und *N. tabacum* cv. Nft51 verankert und die Membranintegration durch Lokalisationsanalysen

bestätigt werden. Am Beispiel zweier Modellantigene (HVR1/R9 und MPT64) sollte der Einfluss von drei Membranankerversionen mit unterschiedlich verkürzter bzw. fehlender konstanter extracytoplasmatischer Domäne der TCR β -Kette auf die Stabilität und Akkumulation der Antigene in der Pflanzenzelle im Vergleich zu apoplasmatisch exprimierten Antigenversionen analysiert werden.

Die bestexprimierenste Antigenvariante sollte nach der Analyse des Einflusses von Prozessierung und Lagerung auf die Antigenstabilität in verschiedenen Präparationsvarianten mit und ohne die intranasal verabreichten mukosalen Adjuvantien MALP-2 und PQS zum Einsatz kommen. Anschließend sollte die immunogene Wirkung der unterschiedlichen Impfstoffkompositionen nach oraler Applikation in Mäusen durch die Analyse der antigenspezifischen lokalen sIgA- und Serum-IgG-Antikörperantworten charakterisiert werden.

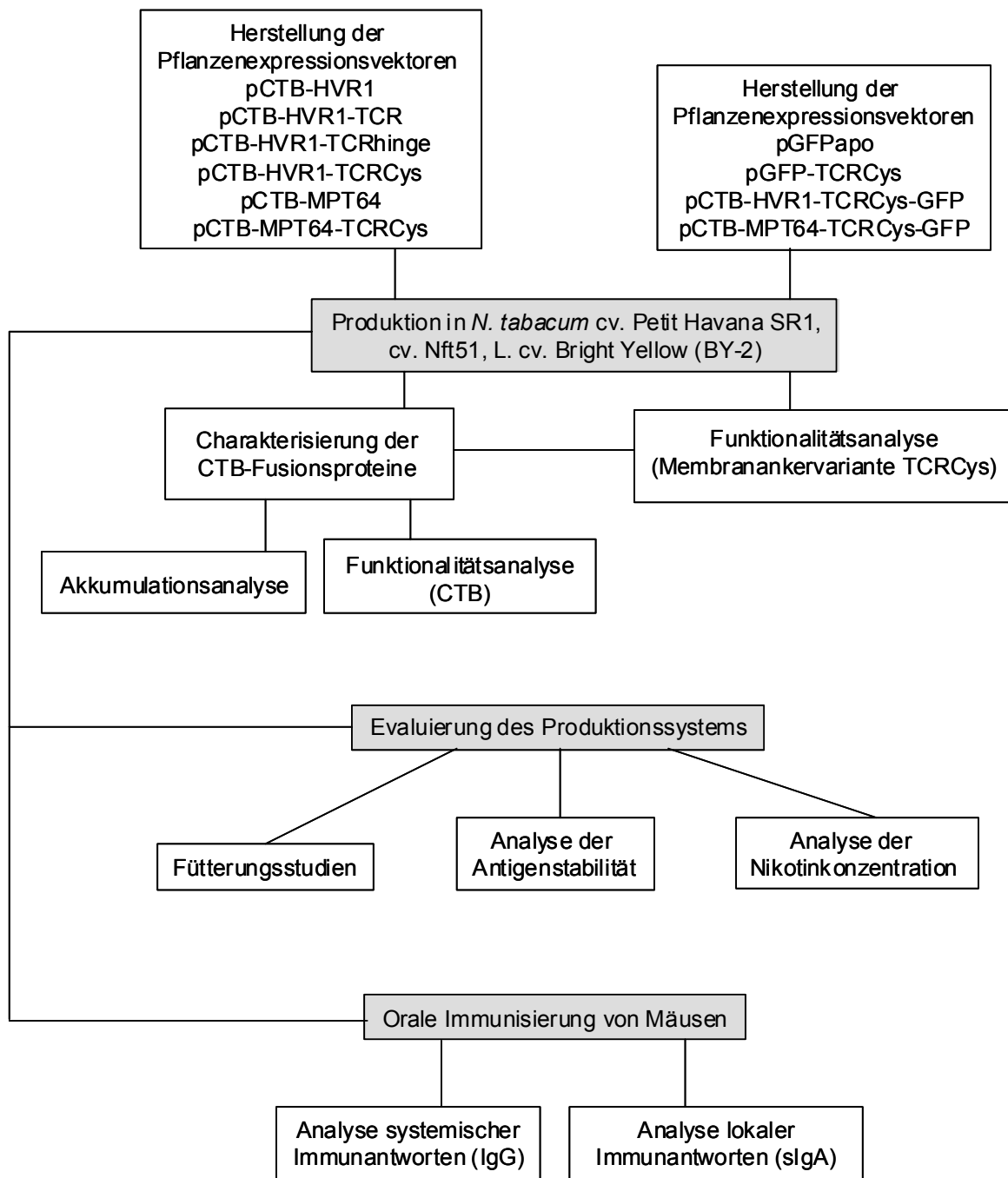


Abbildung I.1: Schematische Übersicht über den experimentellen Ablauf der durchgeführten Arbeiten.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Reaktionskits

Alle verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: BioRad (München), GibcoBRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), MWG-Biotech (Ebersberg), Pharmacia (Uppsala, Schweden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Disenhofen). Verbrauchsmaterialien stammten von: Amersham (Braunschweig), Amicon (Witten), Biozym (Oldendorf), Eppendorf (Hamburg), Fermentas (Sankt Leon-Rot), Filtron (Northborough, USA), Greiner (Solingen), ICN Biomedicals GmbH (Meckenheim), Invitrogen (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), Millipore (Eschborn), MP Biomedicals (Ohio, USA) Novagen (Darmstadt), Pall Life Sciences (Dreieich), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht), Schott (Mainz), Serva, Stratagene (Amsterdam, Niederlande), Whatman (Bender & Hobheim, Bruchsal) und Zeiss (Oberkochen). Die verwendeten Enzyme zur Restriktion, Modifikation und Amplifikation von DNA wurden von den Firmen New England Biolabs (NEB, Schwalbach), Fermentas, ABgene (Epson, UK) und Promega (Mannheim) bezogen. Folgende Reaktionskits der Firma Qiagen wurden verwendet: QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Plasmid Midi Kit, QIAquick Gel Extraction Kit und QIAquick PCR Purification Kit.

II.1.2 Antikörper und enzymkonjugierte Nachweisantikörper

Tabelle II.1: Antikörper zum qualitativen bzw. quantitativen Proteinnachweis im Immunoblot (II.3.5), Dot Blot (II.3.5) bzw. im ELISA (II.3.6).

Antikörper	Merkmal	Zielepitop	Konzentration	Bezugsquelle
Mα-CTB Clone 3D11	monoklonal, aus Maus	Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB)	3,2 mg/ml	HyTest, Finnland
Kα-CTB	polyklonal, aus Kaninchen	Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB)	1 mg/ml	Sigma-Aldrich, USA
Zα-CTB	polyklonal, aus Ziege	Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB)	-	Calbiochem, USA
Kα-CT	polyklonal, aus Kaninchen	Cholera Toxin (CT)	1 mg/ml	Sigma-Aldrich, USA

Mα-GFP JL-8	monoklonal, aus Maus	<i>Aequoria victoria</i> GFP	-	BD Biosciences, Heidelberg
Kα-GST	polyklonal, aus Kaninchen	GST	-	M. Monecke, Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen
Mα-GST	monoklonal, aus Maus	GST	~1-5 mg/ml	M. Monecke
Kα-R9 (R208)	polyklonal, aus Kaninchen	HVR1	-	[239]

Tabelle II.2 : Antikörper für den immunologischen Nachweis antigenspezifischer IgA-Antikörper im Stuhl sowie IgG-Antikörper im Serum (II.7.5.2 und II.7.5.3) und die Quantifizierung von Gesamt-IgA im ELISA (II.7.5.1).

Antikörper	Merkmal	Zielepitop	Konzentration	Bezugsquelle
Kα-IgA (H)	polyklonal, aus Kaninchen	Maus IgA, H (α -Kette)	1 mg/ml	Rockland, USA
Zα-IgA (H)	polyklonal, aus Ziege	Maus IgA, H (α -Kette)	1 mg/ml	Sigma-Aldrich, USA
Zα-IgG, IgA, IgM (H+L)	polyklonal, aus Ziege	Maus IgG, IgA und IgM, H+L	2 mg/ml	Rockland, USA
ZαM (Fab)	polyklonal, aus Ziege	Maus, Fab- Fragment	2 mg/ml	Sigma-Aldrich
ZαM^{HRPO} (Fc)	polyklonal, aus Ziege HRPO-Konjugat	Maus IgG, Fc	0,4-0,8 mg/ml	Dianova, Hamburg

Tabelle II.3: Enzymkonjugierte Sekundärantikörper.

AP (Alkalische Phosphatase-) konjugierte Sekundärantikörpern dienen dem qualitative Proteinnachweis im Immunoblot (II.3.5). Der quantitative Nachweis im ELISA erfolgte ausschließlich mit HRPO (Meerrettich-Peroxidase-)konjugierten Sekundärantikörpern (II.3.6).

Antikörper	Merkmal	Zielepitop	Konzentration	Bezugsquelle
ZαM^{HRPO} (H+L) (Fc)	polyklonal, aus Ziege HRPO-Konjugat	Maus IgG, H+L, Fc	0,4-0,8 mg/ml	Dianova
ZαK^{HRPO} (Fc)	polyklonal, aus Ziege HRPO-Konjugat	Kaninchen IgG, Fc	0,4-0,8 mg/ml	Dianova
KαZ^{HRPO} (Fc)	polyklonal, aus Kaninchen HRPO-Konjugat	Ziege IgG, Fc	0,4-0,8 mg/ml	Dianova

ZαM^{AP}(H+L), (Fc)	polyklonal, aus Ziege AP-Konjugat	Maus IgG, H+L, Fc	0,4-0,8 mg/ml	Dianova
ZαK^{AP}(Fc)	polyklonal, aus Ziege AP-Konjugat	Kaninchen IgG, Fc	0,4-0,8 mg/ml	Dianova
KαZ^{AP}(Fc)	polyklonal, aus Kaninchen AP-Konjugat	Ziege IgG, Fc	0,4-0,8 mg/ml	Dianova

Tabelle II.4: Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörper.

Antikörper	Merkmal	Zielepitop	Konzentration	Bezugsquelle
HαZ^{Alexa488} (H+L)	polyklonal, aus Huhn Alexa Fluor™ 488- Konjugat	Ziege IgG, H+L	2 mg/ml	Molecular Probes, Niederlande

II.1.3 Synthetische Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (München) synthetisiert und dienen zur Modifikation bzw. Amplifikation von DNA-Fragmenten (II.2.2) sowie gegebenenfalls zur Überprüfung der korrekten Basenpaarabfolge mittels Sequenzierung (II.2.7).

Tabelle II.5 : Klonierungsoligonukleotide.

Name	Sequenz 5'- 3'
pSS LPH forw.	ACC ACG TCT TCA AAG CAA GTG G
LPH-CTB back	GTA ATA TTT TGA GGT GTG GAG TGA ACA CCT GCA GTG CCG
CTB forw.	GCA GGT GTT CAC TCC ACA CCT CAA AAT ATT ACT GAT TTG
HVR1 back	GCG CAA GCT TGT CGA CAT TTT GAG AAG CTC CTG GAG
HVR1-apo back	GCG CAA GCT TCT AGA TTT AAT TTT GAG AAG CTC CTG GAG
MPT64 back	GCG CAA GCT TGT CGA CGG CCA GCA TCG AGT CG
MPT64-apo back	GCG CAA GCT TCT AGA TTT AGG CCA GCA TCG AGT C
TcR forw.	CCG GAA TTC GTC GAC ATC CTG CTA GGG AAG GCC ACC CTG
TcRhinge forw.	CCG GAA TTC GTC GAC GGC TTA ACC TCG GTG TCC
TcRCys forw.	CCG GAA TTC GTC GAC GGT AGA GCA GAC TGT GGC
TcR back	GCG CAA GCT TCT AGA TTT AGA AAT CCT TTC TCT TGA CC
GFP forward	CAT GCC ATG GGG CCA GCC GCT GCT GCA GCC GCA TCT GCT
GFP back	GCT CTA GAT TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC
GFP only back	CGC GTC GAC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC

Tabelle II.6 : Sequenzieroligonukleotide.

Name	Sequenz 5'- 3'
35Sseq2	ATC CTT CGC AAG ACC CTT CC
35Sseq1	ATC CTT CGC AAG ACC CTT CC
PS-3-back	AGA GAG AGA TAG ATT TGT AGA GA

II.1.4 Plasmid-Vektoren

pTRAKc:

Der binäre Pflanzenexpressionsvektor pTRAKc (6,6 Kb) [Amp^R, Cb^R, Km^R] diente sowohl der Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* als auch dem Transfer der Expressionskassetten in das Tabakgenom. Das pTRAKc Plasmid ist ein Derivat des pPAM Expressionsvektors (GenBank: AY027531; Dr. Thomas Rademacher, Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen). Zwischen der linken und der rechten „Border“-Sequenz befindet sich die CaMV-35-S Expressionskassette von pRT101 mit 35S Promotorsequenz des *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) mit duplizierter 35S-Enhancer Region [107], die Signalsequenz der schweren Kette des monoklonalen Antikörpers mAk24 sowie die CaMV Terminations- und Polyadenylierungssequenz. Neben der 5' untranslatierten Region (UTR) der Chalconsynthase aus *P. hortense* und der „Scaffold Attachment Regions“ (SAR) aus Tabak zur optimierten Proteinexpression *in planta* [240] ist ebenfalls das Kanamycinresistenzgen *nptII* integriert, das eine Selektion positiver transgener Pflanzen ermöglicht. Die Replikationsstartpunkte *RK2* und *ColE1* erlauben eine Replikation sowohl in *A. tumefaciens* als auch in *E. coli*. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das rekombinante Plasmid pTRAKc-dhfr-AH-new verwendet, das die kodierende Sequenz für die Dihydrofolatreduktase (*dhfr*) mit C-terminalem His6-Motiv enthielt.

pTRA-Ve2-GFP:

Der rekombinante Vektor pTRA-Ve2-GFP [241] basiert auf pTRAKc und enthält die kodierende Sequenz für das Emerald CytoGem GFP [242] (Aurora Bioscience, San Diego) mit N-terminal fusioniertem 20aaLinker, der die individuelle Faltung von Fusionspartnern garantieren soll (III.1.3.2). Die cDNA für diese GFP-Variante, die sich durch zahlreiche Mutationen (S65T/S72A/N149K/M153T/I167T/H231L) vom WT-GFP unterscheidet, stammt ursprünglich aus dem Vektor pB10-2 (Dr. Paul Dupree, University of Cambridge, UK).

pCEANA3-TcR:

Der auf pSS basierende Vektor pCEANA3-TcR (Dr. Carmen Vaquero, Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen) kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus

der N-terminalen N- und A3-Domäne des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) und der C-terminal fusionierten konstanten Region der β -Kette des humanen T-Zell-Rezeptors (TCR β) (I.2.2.1) und diente als Template zur Amplifikation der TCR β -Membranankervarianten.

HVR1 in 30B:

Der rekombinante virale TMV-basierte Vektor 30B [243] wurde freundlicherweise von Dr. Vidadi Yusibov (Fraunhofer CMB, Newark, DE, USA) zur Verfügung gestellt. Er kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus der N-terminalen B-Untereinheit des Cholera Toxins (CTB) (GenBank: U25679) [244] und dem C-terminalen HVR1 Konsensus-Epitop R9 [218] und wurde als Template zur Amplifikation des CTB-HVR1 Genkonstruktes verwendet. Die *hvr1*-Sequenz wurde unter der Verwendung pflanzentypischer Codons modifiziert [244].

MPT64 in 30B:

Der rekombinante virale TMV-basierte Vektor 30B kodiert für ein Fusionsprotein aus dem N-terminalen CTB und der Proteinsequenz des reifen MPT64 (Dr. Vidadi Yusibov, Fraunhofer CMB, Newark, DE, USA). Die *mpt64*-Sequenz unterscheidet sich durch folgende Austausch von der NCBI Datenbanksequenz X75361: E7Q (GAG→CAG).

II.1.5 Bakterienstämme und Pflanzen

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 α [245] diente als Rezipient von rekombinanter DNA sowie der *in vitro* Amplifikation und Isolierung von Plasmid-DNA. Die Agrobakterienvermittelte Transformation von Tabak erfolgte mit Hilfe des Stammes *A. tumefaciens* GV3101, der das Helferplasmid pMP90RK trägt [246].

Für die transiente und stabile Expression der Genkonstrukte wurden die Tabakkultivare *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1 [247] und *Nicotiana tabacum* Nft51 (Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Quedlinburg) [248], sowie Tabaksuspensionszellen der Varietät *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 (BY-2) verwendet [249].

Bakterienstamm	Charakterisierung	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁻</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U196	Hanahan, 1983
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	pMP90RK[Gm ^R , Km ^R , Rif ^R]	Koncz and Schell, 1986

II.1.6 Versuchstiere

In den Immunisierungsexperimenten wurden ausschließlich weibliche acht Wochen alte Versuchstiere des Maus-Inzuchtstammes Balb/c verwendet. Die Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren wurde gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes durch die Bezirksregierung des Landes NRW erteilt und wird unter dem Aktenzeichen 50.203.2-AC 30,38/03 und der ZV-Nummer: 10073G1 geführt. Die Haltung der Tiere erfolgte entsprechend den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes in der Versuchstieranlage des Universitätsklinikums Aachen.

II.1.7 Mukosale Adjuvantien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Varianten der unter I.3.1.2 und I.3.1.3 beschriebenen Adjuvantien MALP-2 (Abb. II.1) und PQS (Abb. II.2) verwendet, die durch chemische Kopplung an PEG (Polyethylenglycol) modifiziert wurden, um ihre Löslichkeit zu erhöhen und die Aufnahme über die Schleimhaut zu optimieren. Die modifizierten Adjuvantien wurden freundlicherweise von Dr. Thomas Ebensen (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Abteilung Vakzinologie) zur Verfügung gestellt.

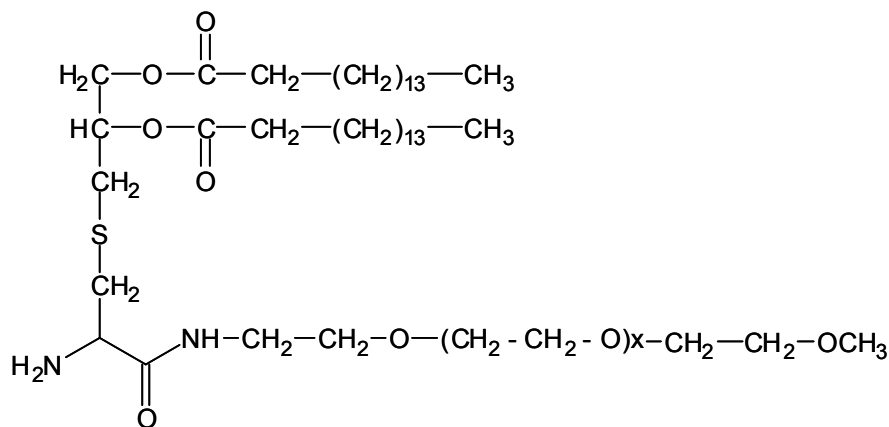


Abbildung II.1: Strukturformel BPPCysPEG (modifiziertes MALP-2).

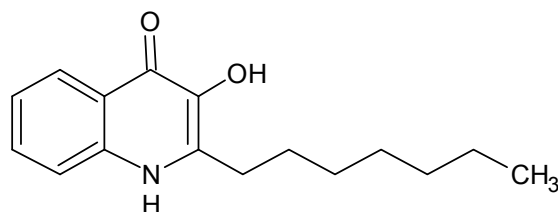


Abbildung II.2: Strukturformel PQS-PEG (modifiziertes PQS-Hydroxyquinolone).

II.1.8 Puffer, Medien und Lösungen

Standardpuffer, -medien und -lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, nach Sambrook (2000) hergestellt. Medien wurden durch Autoklavieren (25 min./ 121°C/ 1 bar) sterilisiert, thermolabile Substanzen wurden gegebenenfalls steril filtriert (Ausschlussgröße

Ø 0,22 µm). Soweit nicht in den entsprechenden Methoden aufgeführt wurde der pH-Wert mit 1 M HCl bzw. 1 M NaCl eingestellt.

II.1.9 Geräte, Apparaturen und Zubehör

Biosensor-Messgerät:	BIAcore T100 (BIAcore AB, Uppsala, Schweden)
Bohrer:	Motorgetriebener Edelstahlpistill (Heidolph, Darmstadt)
Dampfsterilisator:	Varioclav 135S (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
DNA Sequenzierapparatur:	ABI <i>Prism</i> 3700 Sequenzier-Station (Applied Biosystems, Darmstadt)
Elektrotransformations-App.:	Gene Pulser und Pulse Controller Unit (BioRad)
HPLC:	Waters 2795 Alliance HPLC (Waters, Milford USA)
Lyophilisator:	Loc-2 Beta 1-8 (Christ, Osterode)
Mikroskope:	Leica TCS SP Upright Confocal Laser Scanning Microscope (Leica, Heidelberg), Objektive: HCX PL APO 40x/1,25-0,75 NA oil immersion, HCX PL APO 63x/1,32-0,6 NA oil immersion, LaserL: Argon-Laser (488nm), Krypton-Laser (564nm); Lichtmikroskop Dialux 20 Diavert (Leitz, Wetzlar)
Mixer:	Warring Blender (VWR, Darmstadt)
MS:	Quattro Ultima PT, Waters, Säule 125 x 2.0 mm Hypersil MOS 5 µm (Waters)
PCR-Thermocycler:	Primus 96 und Primus 25 (MWG-Biotech, Ebersberg), Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg), MJ Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, Waltham, USA)
Photodokumentation:	UV-Transilluminator und Fotodokumentationssystem: 299 (Herolab, Wiesloch)
Photometer:	Eppendorf Bio Photometer (Eppendorf), NanoDrop ND-1000 (Peylab), ELISA-Lesegerät SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)
Phytokammer:	OSRAM Powerstar, HQI 400W/DH (Osram, München)
Pipettierrobotor:	Beckman Biomek 2000 Robotic Workstation und Beckman Biomek FX Robotic Workstation (Beckman Coulter, Fullerton, USA)
Proteinblotting-Apparatur:	Mini Trans-Blot Cell (BioRad)
Proteingel-Apparatur:	Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell (BioRad)
Reinstwasseranlage:	Easypure (Werner GmbH, Leverkusen), MembraPure (MembraPure GmbH, Bodenheim)
Rotoren:	JA-25.50, JLA-10.500, JA-10 und SW60 (Beckmann Coulter)
Rührer:	RCT-Basic (IKA Labortechnik, Staufen)
Scanner:	Agfa Arcus II Scanner (Agfa, Leverkusen); HP Scanjet 4890
Schüttler:	Innova 4430 und Innova 4340 (New Brunswick Scientific, Nürtingen), Function line (Heraeus, Hanau), Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf), ELMI Skyline, Intelli-Mixer RM-2 (ELMI, Riga, Lettland)

Software:	Microsoft Office 2000 (Microsoft), Adobe Photoshop 6.0 (Microsoft), Origin 6.1 und 7.5G (Microcal), Metamorph 4.5 (Universal Imaging, West Chester, PA), Clone Manager 5 und 8 (Scientific & Educational Software, Cary NC, USA)
Sonifier:	Labsonic U (B. Braun Biotech, Melsungen)
Speed Vac Zentrifuge:	Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf)
Sterilbänke:	Babcock-BSH Typ THL 1.33.1 (Bad Hersfeld), Herasafe (Kendro, Hanau), Kojair KR Biowizard 130 (Kojair Tech Oy, Vippula, Finnland)
UV-Crosslinker:	GS Gene Linker UV Chamber (BioRad), Crosslinker CL-1000 (LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg)
Vakuumsikkator:	Glaswerk (Wertheim)
Vakuumpumpe:	Trivac S4A (Leybold-Heraeus, Osterode)
Vortexer:	Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)
Zentrifugen:	Avanti J-26 XPI (Beckman Coulter), Avanti J25 (Beckman Coulter), Microfuge R (Beckman Coulter), Eppendorf Centrifuge 5415 D und 5415 R (Eppendorf), Multifuge 3S (Heraeus), Biofuge pico (Heraeus), Pico Fuge (Stratagene, La Jolla, CA, USA), Varifuge 3.0R (Heraeus), Ultrazentrifuge L60 (Beckman Coulter)

II.1.10 **Genehmigung der durchgeführten Arbeiten**

Die Genehmigung der gentechnischen Arbeiten ist unter der Registrierbescheid-Nr. 130(64-K-1.85/02) beim Landesumweltamt NRW eingetragen.

II.2 **Molekularbiologische Methoden**

II.2.1 **Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Zwecks anschließender Analyse und Identifizierung positiver Bakterienklone wurde Plasmid-DNA nach der „Boiling-Prep“-Methode isoliert (Holmes und Quigley, 1981). Die Isolierung von Plasmid-DNA für Klonierungen (II.2.6) und Sequenzierungen (II.2.7) aus *E. coli* erfolgte chromatographisch mit Hilfe der Reaktionskits „QIAprep Spin Miniprep Kit“ und „Plasmid-DNA QIAquick Plasmid Midi Kit“ (Qiagen). Die Ausbeute und Qualität der isolierten Plasmid-DNA wurde durch photometrische Absorptionsmessung bei 260nm sowie Restriktionsanalysen (II.2.3) mit anschließender Agarosegelelektrophorese bestimmt (II.2.4)

II.2.2 **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Amplifikation und Modifikation von DNA erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion [250].

II.2.2.1 Standard-PCR

Die Amplifikation sowie das Einfügen gewünschter Restriktionsschnittstellen an den 5'- und 3'-Enden der zu amplifizierenden DNA-Fragmente erfolgte nach einem Standard-Protokoll durch die Verwendung von spezifischen synthetischen Oligonukleotiden (II.1.3) und der Expand™ High Fidelity DNA Polymerase (Roche) mit „Proof Reading“-Aktivität.

PCR-Ansatz:	10 x PCR-Puffer (Roche)	10 % (v/v)
	dNTP Mix	0,2 µM
	MgCl ₂	1,5–2,5 mM
	3'-Primer	0,2 µM
	5'-Primer	0,2 µM
	Template DNA	10-100 ng
	“Expand High Fidelity Polymerase” (Roche)	1-3,5 U
	ddH ₂ O	ad 50 µl

PCR-Reaktion:	Denaturierung:	5 min.	94°C	1x
	Annealing:	2 min.	50°C	
	Primer-Verlängerung:	2 min.	72°C	30x
	Denaturierung:	1 min.	94°C	
	Finale Verlängerung:	5 min.	72°C	1x

Nach Abschluss der PCR-Reaktionen wurden 5 µl des Reaktionsansatzes auf ein 1,2%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen, aufgetrennt und hinsichtlich Größe, Reinheit und Ertrag analysiert (II.2.4). Bei erfolgreicher Amplifikation wurden die DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung im präparativen Agarosegel (II.2.5) mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ bzw. des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert und standen für weitere Klonierungsschritte zur Verfügung.

II.2.2.2 SOE-PCR

Die SOE (“gene splicing by overhang extension”) PCR ist eine Variante der PCR, welche die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente ohne die Verwendung von Restriktionsenzymen und Ligase durch einen Überlappungsbereich zwischen den beiden Fragmenten ermöglicht [251]. Mit Hilfe von SOE-Primern wurden im Vorfeld in einer Standard-PCR komplementäre Überhänge an den Enden der zu verknüpfenden Fragmente erzeugt (II.2.2.1), welche in PCR Reaktion 1 hybridisierten und durch die Verwendung einer DNA-Polymerase aufgefüllt wurden. In einer zweiten PCR-Reaktion erfolgte die Reamplifikation der entstandenen doppelsträngigen Hybriden (SOE-PCR-Produkte) durch die Verwendung von Primern, die komplementär zu den Enden des Gesamtproduktes sind.

PCR-Ansatz 1:	10 x PCR-Puffer (Roche)	10 % (v/v)
	dNTP Mix	0,2 µM
	MgCl ₂ (Roche)	1,5-2,5 mM
	DNA-Fragment 1	x µl
	DNA-Fragment 2	x µl
	“Expand High Fidelity Polymerase” (Roche)	1,05-3,5 U
	ddH ₂ O	ad 50 µl

PCR-Reaktion 1:	Denaturierung:	5 min.	94°C	1x
	Annealing:	2 min.	53°C	
	Primer-Verlängerung:	2 min.	72°C	5x
	Denaturierung:	1 min.	94°C	

PCR-Ansatz 2:	10 x PCR-Puffer (Roche)	10 % (v/v)
	dNTP Mix	0,2 µM
	MgCl ₂ (25mM, Roche)	1,5-2,5 mM
	3`-Primer	0,2 µM
	5`-Primer	0,2 µM
	PCR-Ansatz 1 (SOE-PCR-Produkt)	10 µl
	“Expand High Fidelity Polymerase” (Roche)	1,05-3,5 U
ddH ₂ O	ad 50µl	

PCR-Reaktion 2:	Denaturierung:	5 min.	94°C	1x
	Annealing:	2 min.	50°C	
	Primer-Verlängerung:	2 min.	72°C	30x
	Denaturierung:	1 min.	94°C	
	Finale Verlängerung:	5 min.	72°C	1x

Die qualitative und quantitative Analyse und Isolierung der PCR-Produkte erfolgte wie unter II. 2.2.1 beschrieben.

II.2.2.3 Kolonie PCR

Die Identifizierung rekombinanter *E. coli* (II.1.5) und *A. tumefaciens* Zellen (II.1.5) erfolgte mit Hilfe einer Kolonie-PCR, die auf der Verwendung intakter Zellen als DNA-Template basiert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 20 µl sterilem ddH₂O überführt, die Plasmid-DNA durch Aufkochen freigesetzt und 10 µl des Zelllysats in einem PCR-Ansatz (II.2.2.1, Endvolumen 25 µl) eingesetzt. Die PCR erfolgte nach dem unter II.2.2.1 aufgeführten Standardprotokoll unter der Verwendung der *Taq* DNA-Polymerase. Die PCR-Produkte wurden in einer nachfolgenden Agarosegelelektrophorese (II.2.4) analysiert.

II.2.3 Restriktion von DNA

Für analytische Restriktionen wurde ca. 100 ng DNA in einem Volumen von 10 µl, für präparative Verdauung ca. 2 µg DNA in einem Volumen von 50 µl eingesetzt. Alle enzymatischen Restriktionen erfolgten mit ~1 U Enzym pro µg DNA nach Herstellerangaben in dem optimalen Puffersystem. Bei einem Doppelverdau wurden Restriktionsenzyme mit gleichem Pufferanspruch und Temperaturoptimum gleichzeitig verwendet. Im Fall inkompatibler Reaktionsbedingungen wurde die Plasmid-DNA zwischen den Restriktionen säulenchromatographisch (QIAquick PCR Purification Kit[®], Qiagen) gereinigt.

II.2.4 Analytische Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA und DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8 bis 1,2%igen (w/v) Agarosegelen mit 0,1 µg/ml des interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoffes Ethidiumbromid im TBE-Puffersystem (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) in einer Horizontal-Gelelektrophese kammer (BioRad) bei 100 V [252]. Als Molekulargewichtsstandard zur Konzentrations- und Größenbestimmung dienten jeweils 500 ng *Pst*I-restringierte DNA des λ-Phagen, 1 kbp Leiter (Roth) oder 100 bp Leiter (Roth). Die aufgetrennte DNA wurde unter UV-Bestrahlung mit Hilfe des UV-Transilluminator und Fotodokumentationssystem 299 (Herolab) bei einer Wellenlänge von 302 nm visualisiert und dokumentiert.

II.2.5 Präparative Agarosegelelektrophorese und DNA-Isolierung

Analog zur analytischen Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung von DNA zur Gewinnung linearisierter Vektoren und verdauter DNA-Fragmente in frischem TBE-Puffer (II.2.4). Die entsprechenden DNA-Banden wurden mit Hilfe eines Skalpell auf dem UV-Transilluminator bei 302 nm direkt aus den Agarosegelen ausgeschnitten. Die Isolierung von DNA erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gelextraktionskits (Qiagen) nach Herstellerangaben.

II.2.6 Ligation restringierter DNA-Fragmente

Die Ligation der linearisierten Vektoren und DNA-Fragmente nach erfolgreicher Restriktion und chromatographischer Reinigung erfolgte in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit Hilfe der T4 DNA Ligase (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Ligation fand unter optimalen Pufferbedingungen gemäß Herstellerangaben statt (Quick Ligation Kit, New England Biolabs). Zur Entfernung der Salze wurden die Ligationansätze gegen ddH₂O dialysiert (Millipore Filtermembran, cutoff 0,025 µm) und in *E. coli* transformiert (II.4.3).

II.2.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von rekombinanter Plasmid-DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode, die auf dem statistischen Einbau von fluoreszenzmarkierten 2',3'-Dideoxyribonukleotiden und nachfolgendem Kettenabbruch am 3'-Ende beruht [253]. Zur Sequenzanalyse wurde der „DNA Analyzer ABI PRISM® 3730“ (Applied Biosystems) und das Big Dye™ cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben eingesetzt. Diese Methode basiert auf der Fluoreszenzmarkierung einzelner Dideoxynukleotide und Auftrennung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente in Kapillaren. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der Programme Chromas und Align IR (Sequence Alignment Program Version 4.0).

II.3 Proteinanalytische Methoden

II.3.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial

Zur Extraktion von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial wurden Blätter transient (II.5.2.2) oder stabil transformierter Tabakpflanzen (II.5.2.3) nach Entfernen der Mittelrippe in flüssigem Stickstoff in einem Mörser pulverisiert und anschließend in 2 Volumen (v/v) eiskaltem denaturierenden, detergenzhaltigem Extraktionspuffer (200 mM Tris (pH 7.5), 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20, 10 mM DTT) homogenisiert. Analog dazu erfolgte in einem schnellen Verfahren das Screening transgener Pflanzen durch die Proteinextraktion aus ausgestanzten Blattscheiben in 1,5 ml Eppendorfgefäßen unter der Verwendung eines elektrischen Pistills bzw. die Homogenisierung größerer Mengen Blattmaterial im Waring Blender und Zugabe von Extraktionspuffer. Nach Sedimentation der Zelltrümmer (13.000 x g, 4°C, 30 min.) wurden die Proteine im Überstand proteinchemisch analysiert und gegebenenfalls üN bei 4°C oder längerfristig bei -20°C gelagert.

II.3.2 Isolierung von Gesamtprotein aus BY-2 Zellen

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurden ca. 0,2-0,3 g BY-2 Kalli bzw. Suspensionszellen nach dem vollständigen Sedimentieren der Zellen (2500 x g, 4°C, 5 min.) mit 2-fach (v/v) eiskaltem Extraktionspuffer (II.3.1) versetzt und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit dem elektrischen Pistill homogenisiert. Die Zellen wurden anschließend durch Ultraschall aufgeschlossen (1 min., 60 Watt, Impulslänge 0,6 sec.) und der Zellaufschluss zur Entfernung der Zelltrümmer zentrifugiert (15.000 x g, 4°C, 30 min.). Der klare Überstand wurde proteinchemisch analysiert und gegebenenfalls üN bei 4°C oder längerfristig bei -20 °C gelagert.

II.3.3 Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Die photometrische Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue (CBB) G250 (Roti[®]-Quant, Roth) und anschließender Extinktionsmessung bei 595 nm gemäß Herstellerangaben. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in Doppelbestimmung durch Korrelation der Mittelwerte mit einer Eichkurve, die aus bekannten Konzentrationen des Standardproteins Rinderserumalbumin (RSA, Albumin Fraction V Protease free, Roth) (Eichkonzentrationen von 10-250 µg/ml) erstellt wurde.

II.3.4 SDS-PAA Gelelektrophorese und CBB-Färbung

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in einem diskontinuierlichen SDS-PAA Gel unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970). Die Proteine wurden zwecks Denaturierung und Anlagerung von SDS in 1 x SDS-Probenpuffer über einen Zeitraum von 5 min. aufgekocht und anschließend im elektrischen Feld bei 160 V im 12%igen (w/v) SDS PAA Gel aufgetrennt. Die alternative Auftrennung der CTB-Fusionsproteine im linearen Gradientengel (NuPAGE[®] Novex 4-12% (w/v) Bis Tris Gel, Invitrogen) erfolgte nach dem Aufkochen der Proben für mindestens 15 min. in Probenpuffer (LDS Sample Buffer, Invitrogen) mit Reduktionsmittel (NuPAGE[®] Sample Reducing Buffer, Invitrogen) in Laufpuffer (NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer) unter Zusatz von Antioxidans (NuPAGE[®] Antioxidant, Invitrogen) gemäß Herstellerangaben.

Vorgefärbte Proteinlängenstandards („PPM, Prestained Protein Marker Broad Range“, New England Biolabs; „Page Ruler[™] Prestained Protein Ladder“, Fermentas) dienen der Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Gesamtproteine mittels CBB-Färbung visualisiert (Wilson, 1983). Zur Dokumentation wurde das entfärbte Gel zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet und digitalisiert.

5 x SDS Probenpuffer:

Tris-HCl (pH 6,8)	62 mM
Glycerin	30% (v/v)
SDS	4% (w/v)
2-Mercaptoethanol	10% (v/v)
Bromphenolblau	0,05% (w/v)

1 x SDS-Laufpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,5% (w/v)

CBB-Färbelösung:

Methanol	50% (v/v)
Essigsäure	9% (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,25% (w/v)

CBB-Entfärbelösung:

Methanol	5% (v/v)
Eisessig	7,5% (v/v)

II.3.5 Immunoblot und Dot Blot Analyse

Die Immunoblot Analyse erlaubt einen schnellen und spezifischen Nachweis rekombinanter Proteine im Nanogrammbereich über spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen [254]. Der Transfer und die Immobilisierung der im SDS PAA Gel aufgetrennten Proteine (II.3.4) auf eine Nitrozellulosemembran („Hybond C Nitrocellulose Membrane“, Amersham) erfolgte nach Herstellerangaben in einem „Wet Blotting“-Verfahren in einer Mini Protean II Transblot Zelle (BioRad) in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) im elektrischen Feld (250 mM, 45 min.). Nach Absättigung freier Bindungsstellen mit 2,5% (w/v) Trockenmilchpulver (Marvel) (üN, 4°C) erfolgte die Anlagerung des antigenspezifischen Primärantikörpers (1:5000 in 1x PBS) und die des korrespondierenden alkalische Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörpers (jeweils 1 h, RT). Nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch intensives Waschen der Membran mit PBS-T zwischen den Inkubationsschritten entfernt. Nach Zugabe des Substrats NBT/BCIP (Nitroblauterauolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-p-Phosphat-p-Toluidinsalz, Gibco BRL), 1:100 verdünnt in AP-Substratpuffer (Tris-HCl (pH 9,6), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂), erfolgte die Visualisierung in einer enzymatischen Farbreaktion anhand des Substratumsatzes, der äquivalent zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase ist [255]. Im Schnellverfahren (Dot Blot) wurden die Gesamt-Zellextrakte manuell unter Zuhilfenahme einer Wasserstrahlpumpe oder in einem automatisierten Verfahren (Beckman Biomek Robots) aus Mikrotiterplatten im 96-Well-Format direkt auf eine angefeuchtete Nitrozellulosemembran („Hybond C Nitrocellulose Membrane“, Amersham) transferiert. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte analog zum Immunoblot.

10x PBS-Puffer:

NaCl	1,37 M
KCl	27 mM
Na ₂ HPO ₄	81 mM
NaH ₂ PO ₄	15 mM

PBS-T:

1 x PBS	
Tween-20	0,05% (v/v)

II.3.6 GM1-ELISA

Der Nachweis der Funtionalität der CTB-Fusionsproteine und deren Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines modifizierten Sandwich-ELISA („Enzyme-linked-immunosorbent-assay“), dem GM1-ELISA [244] (Tab. II.7). Diese ELISA Variante beruht auf der Kopplung von GM1 an die Festphase durch Adsorption an eine Polystyrol-Mikrotiterplatte. Als Standard diente bakteriell exprimiertes CTB bekannter Konzentration (Prof. Dr. T. R. Hirst, The University of Sydney, Australia) [256].

Beschichtungspuffer (CP) (pH 9.6):NaCO₃ 0,2 MNaHCO₃ 0,2 M**Tabelle II.7: Durchführung des GM1-ELISA.**

Die Proteinextrakte und der Standard wurden in einer seriellen 1:2 Verdünnung in 1 x PBS auf eine GM1-beschichtete Mikrotiterplatte im 96-Well-Format mit hoher Bindungsaffinität aufgetragen (Greiner). Zur Entfernung nicht gebundener Moleküle wurden die Platten nach jedem Inkubationsschritt jeweils 3x mit Leitungswasser und 6 x mit PBS-T gewaschen und nach dem letzten Waschschrift Pufferreste durch Ausschlagen der Platten entfernt. Nach Zugabe eines colorimetrisch detektierbaren Substrats erfolgte die spektralphotometrische Absorptionsmessung des Substratumschlags bei 405 nm im Multikanalphotometer. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den analysierten Proben erfolgte nach Ermittlung der Steigungen der Proben und des mitgeführten Standards durch lineare Regression mit Hilfe der Tabellenkalkulationssoftware Origin (v 6.1 und v 7.5G, Microcal) anhand folgender Formel: $C_{\text{Probe}} = m_{\text{Probe}}/m_{\text{Standard}} * C_{\text{Standard}} * V$. C = Konzentration; m = Steigung; V = Probenverdünnung, * = 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat.

Schritt	Komponente	Konzentration/Verdünnung	Volumen	Inkubation
Beschichten	Gangliosid GM1	1 µg/ml in CP	100 µl	2 h, 37°C
Blockieren	RSA	1% (w/v) in 1 x PBS	150 µl	1 h, 37°C
Probeninkubation	Proteinextrakte	1:25-1:50 in 1x PBS	100 µl	üN, 4°C
	CTB-Standard	100 ng/ml in 1 x PBS	100 µl	üN, 4°C
	Blank	1 x PBS	100 µl	üN, 4°C
1. Hybridisierung	Kα-CTB, Gα-CTB, oder Mα-CTB	1:5000-1:10000 in PBS-T	100 µl	1 h, 37°C
2. Hybridisierung	ZαK ^{HRPO} , KαZ ^{HRPO} , oder ZαM ^{HRPO}	1:5000 in PBS-T	100 µl	1 h, 37°C
Farbreaktion	ABTS ^{TM*} (Roche)	nach Herstellerangaben	100 µl	5-30 min., RT

II.3.7 Kationenaustauschchromatographie

Der hohe isoelektrische Punkt von CTB-HVR1-TCRCys (III.1.1.1) erlaubte eine Reinigung der Proteine über Kationenaustauschchromatographie. Im Vorfeld der chromatographischen Reinigung erfolgte die Extraktion von Gesamtprotein aus Blattmaterial des Kultivars *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 in zwei Volumen Standard-Extraktionspuffers (II.3.1) und anschließend die Äquilibrierung des pH-Werts auf pH 5,25. Nach drei Waschsritten in 5 Matrixvolumen 1 x PBS (100 x g, 5 min., 4°C) und Äquilibrieren der Matrix mit 2 x 5 Matrixvolumen Extraktionspuffer pH 5,25 (100 x g, 5 min., 4°C) wurde die Sepharose-Matrix („SP Sepharose Big Beads“, Amersham Bioscience) mit dem 2,5-fachen Volumen Pflanzenextrakt versetzt. Die Adsorption von CTB-HVR1-TCRCys an den Ionentauscher erfolgte im Batch-Verfahren in 2 ml Eppendorfgefäßen im Überkopfschüttler (üN, 4°C). Nach

Zentrifugation (100 x g, 15 min., 4°C) wurde die Sepharosematrix 5 x mit 5 Matrixvolumen Extraktionspuffer pH 5,25 gewaschen (100 x g, 5 min., 4°C) und 2 x mit dem 0,5-fachen Matrixvolumen eluiert. Die erste Elution erfolgte durch 5-minütige Inkubation bei RT, die zweite durch 45-minütige Inkubation im Überkopfschüttler bei 4°C. Im Anschluss an die chromatographische Reinigung erfolgte ein zweiter Reinigungsschritt mit Hilfe von Ultrafiltration (Nanosep[®]-Säule, molecular weight cutoff 10 kDa, Pall Life Sciences). Dazu wurden die Elutionsfraktion bis zum Ausgangsvolumen mit Elutionspuffer versetzt, auf die Säule aufgetragen und so lange zentrifugiert (14.000 x g, 4°C) bis das Ausgangsvolumen des Eluates erreicht wurde. CTB-HVR1-TCRCys verblieb dabei im Retentat während Pflanzenproteine <10 bis < 60 kDa (s. Herstellerangaben) durch Zentrifugation entfernt wurden.

Elutionspuffer (pH 8,0):

NaCl	1 M
Tris	100 mM

II.3.8 Oberflächen Plasmon Resonanz (SPR) Messungen

Alternativ zum GM1-ELISA (II.3.6) erfolgte die funktionelle und quantitative Analyse der CTB-Fusionproteine mit SPR im BIAcore T100 Gerät (BIAcore GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Dabei handelt es sich um ein spektroskopisches Messverfahren, das auf der Detektion von Massenänderungen in einem evaneszenten Feld beruht. Dazu werden Biomoleküle an der Oberfläche von Sensorchips immobilisiert und potentielle Interaktionspartner über die Oberfläche gespült. Durch eine zeitabhängige Änderung des Brechungsindex auf der Chipoberfläche durch die Bindung des löslichen Reaktionspartners an einen immobilisierten Liganden, können kinetische Parameter der beobachteten Interaktion (Assoziation, Gleichgewicht, Dissoziation) ermittelt werden. Die Signalstärke ist dabei direkt proportional zur gebundenen Masse an der Sensoroberfläche und wird als Response Unit (RU) angegeben. Dabei entspricht 1 RU etwa der Masse von 1 pg/mm².

Der Sensor besteht aus einem Carboxymethyl-Dextran beschichteten Goldchip (CM5-rg Sensorchip, BIAcore GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Zur Herstellung des GM1-Rezeptorchips erfolgte zunächst die Aktivierung des Dextrans mit Hilfe eines „EDC/NHS Coupling Kit“ nach Herstellerangaben (BIAcore AB, Uppsala, Schweden). Die aktivierte Oberfläche wurde anschließend mit 25-50 µl/ml LysoGM1 beschichtet (15 min., Flussrate 10 µl/min., 25°C). Die Deaktivierung der Oberfläche erfolgte mit Ethanolamin (10 min., Flussrate 10 µl/min., 25°C). Aufgrund des geringen Molekulargewichtes von lysoGM1 konnte die Kopplungsrate nicht bestimmt werden. Das Sättigungssignal der Chipoberfläche nach

Injektion von CTB und ETB im Überschuss lag jedoch bei 900-1000 RU und war damit ausreichend für kinetische Messungen der CTB-Interaktion. Zur Bestimmung der Bindungskinetiken wurde der Standard (bakterielles CTB, 500 ng/ml) bzw. 1:5 verdünnter Pflanzenextrakt mit einer Flussrate von 15 $\mu\text{l}/\text{min}$. in die Messzelle injiziert. Die Verdünnung des Standards und der Proben erfolgte in HBS-EP (10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,05 mM EDTA, 0,05 % (v/v) Tween). Die Bindungskinetiken wurden mit der BIAevaluation 3.0 Software (BIAcore) dargestellt. Die Quantifizierung der Antigenkonzentration erfolgte durch Endpunktbestimmung anhand bekannter Standardkonzentrationen mit Hilfe der Tabellenkalkulationssoftware Origin (v 7.5, Microcal). Nach Abschluss der SPR-Messungen erfolgte die Regeneration der Sensoroberfläche mit 30mM HCl.

Der GM1-Sensorchip wurde freundlicherweise von Markus Sack hergestellt, die Durchführung der SPR-Messungen erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Holger Spiegel (beide Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen).

II.4 Mikrobiologische Methoden

II.4.1 Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* in Flüssigkultur erfolgte standardmäßig in LB-Medium bei 37°C in Schüttelkultur bei 225 UpM oder gegebenenfalls auf Festmedium (1,2% (w/v) Agar). Antibiotika-resistente Stämme wurden in Gegenwart von Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) kultiviert. Zur längerfristigen Aufbewahrung von *E. coli* wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden Flüssigkulturen 1:1 mit 50 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert

LB-Medium:

Trypton	1% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	0,5% (w/v)

LB-Agarplatten:

LB-Medium	
Agar	1,5% (w/v)

Ampicillin wurde den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt.

II.4.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

500 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer *E. coli* Vorkultur angeimpft und bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 225 UpM bis zu einer $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 0,8 kultiviert. Die Zellen wurden nach 10-minütiger Kühlung auf Eis durch Zentrifugation (4000 x g, 4°C, 15 min.) abgeerntet und das Zellpellet dreimal mit 10 ml sterilem, eiskaltem ddH₂O gewaschen, vorsichtig mit 10 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert, erneut zentrifugiert und schließlich in

500 µl bis 1 ml eiskalten 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Aliquots von 50 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

II.4.3 Elektrotransformation von *E. coli* Zellen

Jeweils 50–100 ng salzfreie Plasmid-DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz wurden zu 50 µl auf Eis aufgetauten elektrokompenten *E. coli* Zellen gegeben, 3 min. auf Eis gekühlt und in eine vorgekühlte Elektroküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem „Gene Pulser“ (BioRad) nach Herstellerangaben bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Die transformierten Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml LB-Medium 1 h bei 37°C ohne Schütteln regeneriert, zur Selektion positiver Klone auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und üN bei 37°C kultiviert.

II.4.4 Kultivierung und Aufbewahrung von *A. tumefaciens*

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte standardmäßig in YEB-Medium mit Rifampicin (Rif, 100 µg/ml) und Kanamycin (Km, 25 µg/ml) für 48-72 h bei 28°C in Schüttelkultur bei 225 UpM oder gegebenenfalls auf Agarplatten. Zur Selektion positiver Klone bzw. zur Kultivierung rekombinanter *A. tumefaciens* wurde zusätzlich Carbenicillin (Carb, 100 µg/ml) zugesetzt. Die langfristige Lagerung erfolgte in Form von Glycerinstammkulturen (50 % (v/v) Glycerin).

YEB Medium (pH 7,4):

Fleischextrakt	0,5 % (w/v)
Hefeextrakt	0,1 % (w/v)
Trypton	0,1 % (w/v)
Sucrose	0,5 % (w/v)
MgSO ₄	2 mM

YEB Agarplatten

YEB-Medium	
Agar	1,2% (w/v)

Die Antibiotika und MgSO₄ wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt.

II.4.5 Herstellung elektrokompenter *A. tumefaciens* Zellen

100 ml YEB-Rif-Km-Carb-Medium wurden mit 1 ml einer Vorkultur angeimpft und bei 28°C unter Schütteln (225 UpM) bis zu einer OD_{600 nm} von 1 bis 1,5 kultiviert. Die Zellen wurden 15 min. auf Eis gekühlt, durch Zentrifugation (4000 x g, 4°C, 15 min) abgeerntet, dreimal vorsichtig in 100 ml eiskaltem ddH₂O gewaschen und einmal in 100 ml einer eiskalten 10%igen (v/v) Glycerinlösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml 10% (v/v) Glycerin resuspendiert und in Form von 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

II.4.6 Elektrotransformation von *A. tumefaciens* Zellen

Die auf Eis aufgetauten elektrokompetenten Zellen wurden mit 1-3 µg salzfreier Plasmid-DNA gemischt und ca. 10 min. auf Eis gekühlt. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe des „Gene Pulsers“ (BioRad) gemäß Herstellerangaben bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Die transformierten Zellen wurden mit 1 ml YEB-Medium versetzt, 1 h bei 28°C ohne Schütteln regeneriert und zur Selektion positiver Klone auf YEB-Rif-Km-Carb-Agarplatten ausgestrichen und 48-72 h bei 28°C inkubiert.

II.5 Pflanzenbiotechnologische Methoden

II.5.1 Kultivierung von Pflanzen und Pflanzenzellen

II.5.1.1 Kultivierung von Tabakpflanzen

Die Kultivierung von Tabakpflanzen der Kultivare *N. tabacum* cv. Petite Havana SR1 und *N. tabacum* cv. Nft51 erfolgte im Gewächshaus in einem Gemisch aus Einheitserde (ED73, Patzer, Sinntal-Jossa) und 50% (w/w) Seesand unter folgenden Bedingungen: 16 h künstliche Belichtung (5000-10.000 Lux), 8 h Dunkel und in Abhängigkeit von der Jahreszeit und der Außentemperatur $\geq 25^{\circ}\text{C}$ und 70-90% Luftfeuchtigkeit.

Die Anzucht steriler Pflanzen erfolgte nach Sterilisation der Samen (70%iger (v/v) EtOH für 5 min. und 3 x Waschen in sterilem ddH₂O) auf MS-Agarplatten in der Phytokammer (22°C, 16 h Licht (5000-10.000 Lux)). Die Samen wurden auf Agarplatten zu Keimlingen angezogen, in sterile Weckgläser überführt und für die stabile Transformation (II.5.2.3) bis zu einer Größe von ca. 15 cm kultiviert. Zur Selektion transgener Pflanzenlinien wurde dem MS-Medium Kanamycin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

MS-Medium (pH 5,8):

MS-Salze* 0,47 % (w/v)

Sucrose 2% (w/v)

Vitamine**

MS-Agarplatten:

MS-Medium

Agar 0,8% (w/v)

Die Vitamine wurden dem autoklavierten Medium nach Abkühlen auf 50°C als steril filtrierte (\varnothing 0,2 µm) Lösungen in den angegebenen Endkonzentrationen zugefügt.

*(Murashige und Skoog, 1962); **Thiamin 2 µg/ml, Glycin 2 µg/ml, Nikotinsäure 0,5 µg/ml, Pyridoxin 0,5 µg/ml.

II.5.1.2 Kultivierung von Tabaksuspensionszellen

Tabakzellen des Kultivars *N. tabacum* L. cv Bright Yellow 2 (BY-2) wurden im Dunkeln bei 24°C auf BY-2-Agarplatten als Kalluskultur, oder als Suspensionskultur in BY-2 Medium unter Schütteln (130 UpM) propagiert. Suspensionskulturen wurden durch Transfer von

Kallusmaterial, oder 5% (v/v) einer Suspensionszellkultur angeimpft. Im 7-Tage-Rhythmus erfolgte die Subkultivierung durch eine 1:20 (v/v) Verdünnung der BY-2 Zellen mit frischem Medium. Eine Inkubation bei 16°C ermöglichte eine Kultivierung über 4 Wochen. Längere Aufbewahrung von rekombinanten BY-2 Zellen erfolgte in Form von Kalluskulturen, die monatlich auf frische BY-2 Platten umgesetzt wurden. Die Selektion transgener BY-2 Zellen erfolgte durch Zugabe von Kanamycin (Endkonzentration 100 mg/ml).

BY-2-Medium (pH 5,8):

MS-Salze	0,43 % (w/v)
Sucrose	3% (w/v)
Inositol	100 µg/ml
Thiamin	1 µg/ml
KH ₂ PO ₄	200 µg/ml

BY-2-Agarplatten (pH 5,8):

BY-2-Medium	
Agar	0,8% (w/v)

Kanamycin wurde dem Medium nach Abkühlen auf 50°C in der angegebenen Endkonzentration zugesetzt.

II.5.2 Transformation von Pflanzen und Pflanzenzellen**II.5.2.1 Kultivierung von *A. tumefaciens* zur transienten und stabilen Pflanzentransformation**

Die Anzucht rekombinanter *A. tumefaciens* erfolgte nach Animpfen einer 50 ml YEB-Rif-Km-Carb Vorkultur mit rekombinanten Agrobakterien einer Stammkultur bzw. mit rekombinatem Zellmaterial einer Selektionsplatte für 24-48 h bei 28°C in Schüttelkultur (225 UpM). Nach Zentrifugation (4000 x g, 15 min., 20°C) wurden die abgeernteten Zellen in 250 ml einer YEB-Rif-Km-Carb Hauptkultur überführt und für 24-48 h bei 28°C unter Schütteln (225 UpM) inkubiert. Am Tag vor der Infiltration erfolgte nach Zentrifugation (4000 x g, 15 min., 20°C) die Induktion der *vir*-Gene durch Inkubation der Zellen üN bei 26°C und 225 UpM in Induktionsmedium. Nach erneuter Zentrifugation (4000 x g, 15 min., 20°C) wurde die vorinduzierte Agrobakterienkultur bis zu einer End-OD_{600nm} von 0,5-1,5 in Infiltrationsmedium (MMA) verdünnt und 1 h bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubiert.

Induktionsmedium (pH 5,6):

YEB-Medium (II.4.4)	
Acetoxyrington	20 µM

Infiltrationsmedium (MMA) (pH 5,6):

MS-Salze	0,43% (w/v)
MES	10 mM
10 mM Sucrose	20% (w/v)
Acetosyrington	200 µM

Die Antibiotika und Acetosyrington wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Medien auf 50°C als filtrierte Lösungen (Ø 0,22 µm) in den angegebenen Endkonzentrationen (II.4.4) zugefügt.

II.5.2.2 Transiente Transformation von Tabakblättern

Die transiente Transformation von Tabakblättern erfolgte mittels Vakuuminfiltration. Dazu wurden 2-4 frisch geerntete Tabakblätter in 100-150 ml einer vorinduzierten Agrobakteriensuspension (II.5.2.1) in einem Vakuumexsikkator einem Unterdruck von 60-80 mbar ausgesetzt. Nach vollständigem Entweichen der Luft aus dem Blattgewebe erfolgte durch Druckausgleich der Eintritt der Agrobakteriensuspension über die Stomata in die Interzellularräume der Blätter. Die transiente Expression der rekombinanten DNA erfolgte auf angefeuchtetem Whatmanpapier in mit Frischhaltefolie abgedeckten Inkubationsschalen während einer 3-4 tägigen Inkubation in der Phytokammer (II.5.1.1).

II.5.2.3 Stabile Transformation von Tabakpflanzen

Die stabile nukleäre Transformation der Tabakvarietäten *N. tabacum* cv. Petite Havana SR1 und *N. tabacum* Nft51 erfolgte mit Hilfe der „leaf-disc“-Methode, die auf der Inkubation von Blattscheibchen in einer Agrobakteriensuspension beruht.

Tabakblätter steril kultivierter Tabakpflanzen (II.5.1.1) wurden 4-6 Wochen nach ihrer Aussaat, nach Entfernen der Mittelrippe, unter sterilen Bedingungen in ca. 1 cm² große Blattexplantate geschnitten und 30 min. bei RT in 50-100 ml einer vorinduzierten Agrobakteriensuspension (II.5.2.1) eingetaucht, nach Abschluss der Infektion auf sterilem, mit ddH₂O angefeuchteten Whatman-Filterpapier ausgelegt und 2 Tage im Dunkeln bei 26-28°C in einer Petrischale inkubiert. Nach einem Waschschrift zur Entfernung von Agrobakterien in sterilem ddH₂O das Claforan (Endkonzentration 200 µg/ml) und Kanamycin (Endkonzentration 100 µg/ml) enthielt, wurden die infizierten Blattstückchen auf Kallus-induzierendem Selektionsmedium (MS-II-Medium) ausgelegt und in der Phytokammer kultiviert (II.5.1.1). Innerhalb von 3-4 Wochen erfolgte unter Selektionsdruck die Regeneration transgener Sprosse, die zur Wurzelbildung auf hormonfreies MS-III-Medium transferiert wurden. Die regenerierten Pflanzen wurden in Torfquelltopfe (Jiffy-7, Meyer, Willich) umgesetzt und nach ca. 2-3 Wochen auf Erde ausgebracht und nach ca. 3-wöchiger Inkubation im Gewächshaus (II.5.1.1) mittels GM1-ELISA (II.3.6) auf Fremdgenexpression untersucht. Die geernteten Samen wurden zur Selektion der nächsten transgenen Generation auf Kanamycin-haltiges MS-Medium (II.5.1) ausgelegt.

MS-II-Medium (pH 5,8):

MS-Medium (II.5.1)	
BAP*	1 µg/ml
NAA**	0,1 µg/ml
Claforan	250 µg/ml

MS-III-Medium (pH 5,8):

MS-Medium (II.5.1)	
Claforan	250 µg/ml
Kanamycin	100 µg/ml

Kanamycin 100 µg/ml

Antibiotika wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C als sterilfiltrierte Lösungen (\varnothing 0,22 µm) in den angegebenen Endkonzentrationen zugefügt.

*6-Benzylaminopurin, ** α -Naphthylelessigsäure

II.5.2.4 Stabile Transformation von BY-2 Tabaksuspensionszellen

Die stabile Transformation von Tabaksuspensionszellen (II.1.5) erfolgte durch Koinkubation mit rekombinanten Agrobakterien (An, 1985). Dazu wurden 150 µl einer vorinduzierten Agrobaktériensuspension ($OD_{600\text{ nm}} \sim 1$) (II.5.2.1) zu 3 ml einer 3-4 Tage alten exponentiell wachsenden BY-2 Suspensionskultur gegeben und Acetosyringon in einer Endkonzentration von 200 µM zugefügt. Die Infektion erfolgte während einer 3-tägigen Koinkubation bei 22-23°C in. Die Zellen wurden dreimal mit 3 ml BY-2-Medium gewaschen (50 x g, 3 min., RT), und das Zellpellet in einem Volumen BY-2-Medium mit Claforan (Enkonzentration 200 µg/ml) und Kanamycin (Endkonzentration 100 µg/ml) resuspendiert und 200 µl Aliquote auf festes BY-2-Medium ausplattiert. Unter Selektionsdruck entwickelten sich nach 4-6 Wochen transgene Kalli, die nach dem Vereinzeln und Isolierung von Gesamtprotein (II.3.2) mittels Dot Blot (II.3.5) und ELISA (II.3.6) hinsichtlich Fremdgenexpression untersucht wurden.

II.6 Zellbiologische Methoden

II.6.1 Präparation von Protoplasten

II.6.1.1 Isolierung von Protoplasten aus Tabaksuspensionskulturen

40 ml einer 3-5 Tage alten BY-2 Suspensionszellkultur (II.1.5) wurden 5 min. bei 300 x g bei RT zentrifugiert und 5-10 ml der sedimentierten Zellen zur Protoplastierung in einer Petrischale mit dem 2-fachen Volumen einer sterilen frisch angesetzten Enzymlösung versetzt und 5-8 h im Dunkeln unter leichtem Schütteln (50-75 UpM) bei 26°C inkubiert. Die Protoplastierung wurde unter dem Mikroskop analysiert und erfolgreich protoplastierte BY-2 Zellen abgeerntet (100 x g, 5 min., RT), zweimal mit 20 ml sterilem MMC gewaschen und in 20 ml MMC resuspendiert. Die Protoplasten wurden vorsichtig auf eine sterile 25%ige (w/v) Sucroslösung gebettet und zentrifugiert (100 x g, 15 min., RT). Intakte Protoplasten, die sich in der Interphase ablagerten, wurden in 20 ml MMC aufgenommen, zentrifugiert (100 x g, 5 min., RT), in 20 ml sterilem MMC resuspendiert, ün bei 26°C in einer sterilen, silikonisierten Petrischale unter leichtem Schütteln im Dunkeln regeneriert und anschließend mit Paraformaldehyd fixiert (II.6.2). Alle Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen

statt. Nach der Protoplastierung wurde zum Pipetieren ausschließlich das Ende einer 25 ml Glaspipette verwendet.

MMC (pH 5,6):

Mannitol	0,5 M
MES	10 mM
CaCl ₂	10 mM

Enzymlösung (pH 5,6):

MMC	
Cellulase Onozuka R-10 (Serva)	1,5% (w/v)
Macerozyme R-10 (Serva)	0,3% (w/v)
RSA	1% (w/v)

Zunächst wurde die Zellulase in der angegebenen Endkonzentration unter Rühren in MMC gelöst. Nach 5 min. wurde Mazerozym zugefügt und 25 min. im Dunkeln gerührt. Nach vollständiger Lösung der Enzyme wurde RSA hinzugefügt und weitere 5 min. gerührt. Die Enzymlösung wurde sterilfiltriert (\varnothing 0,22 μ m) und anschließend 10 min. bei 45°C inkubiert.

II.6.1.2 Isolierung von Protoplasten aus Tabakblättern

Die Protoplastenpräparation aus Blattgewebe erfolgte in Anlehnung an eine etablierte Methode, die auf dem enzymatischen Abbau der Zellwand mittels Cellulase und Mazerozym basiert [257]. Zunächst wurden frisch geerntete Blätter 4-6 Wochen alter Tabakpflanzen des Kultivars cv. Petit Havana SR1 sterilisiert (70%iger (v/v) EtOH für 1 min, 5%ige (w/v) Chlorlösung in ddH₂O für 5 min., 4x Waschen in sterilem ddH₂O). Die oberflächensterilisierten Blätter wurden von der Mittelrippe ausgehend mit dem Skalpell in ca. 1 mm breite Streifen geritzt. Die Protoplastierung erfolgte in Enzymlösung bei 26°C. Protoplasten, die sich aus dem Zellverband lösten und an der Oberfläche schwammen wurden mit dem Ende einer 25 ml Pipette vorsichtig isoliert und nach Zentrifugation (100 x g, 8 min., RT) das Pellet sowie die unteren zwei Drittel der Lösung abgesaugt und intakte Protoplasten, die sich an der Oberfläche befanden in 5 ml F-PCN aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (100 x g, 8 min., RT) und Isolierung intakter Protoplasten wurden diese im 2-fachen Volumen W5 gewaschen (100 x g, 2 min., RT) und in 1 ml F-PCN aufgenommen und mit Paraformaldehyd fixiert (II.6.2).

F-PCN („Fast Protoplast Culture Nicotiana“)
[257]**W5-Medium (pH 5,6-6,0):**

NaCl	154 mM
CaCl ₂	125 mM
KCl	5 mM
Glucose	5 mM

Enzymlösung

F-PIN (“Fast Protoplast Incubation Nicotiana”) [257]

Cellulase Onozuka R-10 (Serva)	0,25% (w/v)
Macerozyme R-10 (Serva)	0,25% (w/v)

II.6.2 Fixierung von Protoplasten

Die Fixierung der Protoplasten (II.6.1.1., II.6.1.2) erfolgte durch Paraformaldehyd. Zunächst wurden die $\bar{u}N$ regenerierten Protoplasten zentrifugiert (100 x g, 5 min., RT) und anschließend in einer 4%igen Fixierungslösung, die unmittelbar vor dem Gebrauch durch Zugabe von 2 x MTSB aus einer 8%igen (w/v) bei -20°C gelagerten Paraformaldehyd-Stammlösung hergestellt wurde, für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln (50-75 UpM) fixiert. Die Protoplasten wurden nach der Fixierung dreimal mit MMC (II.6.1.1) gewaschen (100 x g, 5 min., 4°C) und standen für die nachfolgende Immunfluoreszenzfärbung (II.6.3) zur Verfügung.

MTSB* (pH 6,9):

Pipes	50 mM
EGTA	5 mM Mg ₂ SO ₄
Mg ₂ SO ₄	5 mM
Mannitol	0,3 M

8%ige Fixierungslösung:

Paraformaldehyd	8% (w/v)
ddH ₂ O	

*, „Microtubule Stabilizing Buffer“

II.6.3 Immunfluoreszenzfärbung von Protoplasten

Multitest-Objektträgern („8-well multitest slides“, ICN Biomedicals GmbH) wurden gemäß Herstellerangaben mit absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und mit Poly-L-Lysin (1 mg/ml, Sigma) beschichtet. Jeweils 10 μ l der fixierten Protoplasten (II.6.2) wurden in die Vertiefungen pipettiert und nach Sedimentation der Protoplasten (II.6.1.1., II.6.1.2) die überschüssige Flüssigkeit mit Hilfe einer Pipette abgesaugt, die Objektträger dreimal für mindestens 5 min. mit MTSB (II.6.2) gewaschen und anschließend für 20 min. bei RT mit jeweils 20 μ l 0,1% (v/v) TritonX-100 in MTSB permeabilisiert. Die Immunfluoreszenzmarkierung erfolgte nach Inkubation mit spezifischen Primärantikörpern (Z α -CTB, 1:250-1:500 in MTSB mit 3% (w/v) RSA, II.1.2) mit Hilfe des entsprechenden Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper (H α Z^{Alexa488}, 1:500 in MTSB mit 3% (w/v) RSA, II.1.2). Die Inkubation mit jeweils 20 μ l Antikörperlösung erfolgte für 1 h bei RT auf angefeuchtetem Whatman-Filterpapier in verschlossenen bzw. in mit Alufolie abgedeckten Petrischalen, um ein Ausbleichen der Fluorophore zu verhindern. Nicht konjugierte Fluorochrommoleküle wurden unmittelbar vor dem Gebrauch durch Zentrifugation der Antikörperlösungen (13.000 x g, 5 min., 4°C) entfernt. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und die Objektträger dreimal für 15 min. mit MTSB gewaschen. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte nach Zugabe von 50% (v/v) Glycerol in MTSB, Verschließen der Objektträger mit Deckgläschen und Versiegeln mit

Nagellack, das die Präparate bei Lagerung im Dunkeln bei 4°C für mindestens 4 Wochen konservierte.

II.6.4 **Fluoreszenz- und konfokale Laser Scanning-Mikroskopie**

Die Fluoreszenzanalyse Fluorochrom-markierter Protoplasten (II.6.1.1., II.6.1.2) sowie GFP-exprimierender BY-2 Zellen bzw. Tabakblätter erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning-Mikroskops (Leica TCS SP Upright, Leica) Die Emission (grünes Fluoreszenzlicht) von GFP und Alexa Fluor™ 488 wurde nach Anregung mit einem Argon-Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) in einer Bandbreite von 500-530 nm detektiert. Die subzelluläre Lokalisation der GFP-Fusionsproteine bzw. der Fluorophor-markierten CTB-Fusionsproteine wurde in konfokalen Z-Sektionen von $\sim 1 \mu\text{m}$ Schichtdicke mit Hilfe eines HCX PL APO 40x/1,25-0,75 NA bzw. HCX PL APO 63x/1,32-0,6 NA Ölimmersion-Objektivs analysiert.

Die Aufnahmen wurden als TIF Dateien gespeichert und in Adobe Photoshop (Microsoft) exportiert; gegebenenfalls erfolgte die Überlagerung und Verrechnung der generierten Daten mit Hilfe der Anwendersoftware Metamorph 4.5 (Universal Imaging, West Chester, USA).

II.6.5 **Isolierung von Membranen aus BY-2 Zellen**

Die Anreicherung von Membranen aus BY-2 Zellen (II. 1.5) erfolgte in Anlehnung an eine von Goubet und Mohnen (1999) beschriebene Methode. Zunächst wurden 5 g Zellmaterial einer 3 Tage alten Tabaksuspensionskultur auf Filterpapier durch einen Saugtrichter mit angeschlossener Wasserstrahlpumpe gesammelt und mit dem 1,3-fachen Volumen eiskalten Homogenisationspuffer versetzt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines vorgekühlten Mixers (Waring Blender) 1 min. bei höchster Stufe homogenisiert und das Homogenat durch eine Lage Miraclothgaze (Porengröße 100 μm) filtriert. Nicht aufgeschlossene Zellen, Zellkerne und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation des Filtrats (3500 x g, 15 min., 4°C) sedimentiert und 4 ml des Überstandes in Zentrifugationsröhrchen (50.2 Ti, Beckman Coulter) überführt und 1 h bei 100.000 x g und 4°C einer Ultrazentrifugation unterzogen, um die Gesamtmembranfraktion zu sedimentieren. Die löslichen Proteine verblieben dabei im Überstand und wurden durch zwei Waschschriffe mit Homogenisierungspuffer (100.000 x g, 60 min., 4°C) vollständig entfernt bevor das Membranpellet in 200 μl Aufbewahrungspuffer resuspendiert wurde. Zur Solubilisierung von Membranproteinen wurde die Hälfte der erhaltenen Membranfraktion 1:1 mit detergentenhaltigem Extraktionspuffer (II.3.1) versetzt und gevortext. Die Membranfraktion, Membranextraktion sowie die Überstände nach Zentrifugation und Ultrazentrifugation wurden anschließend mittels Western Blot (II.3.5) analysiert.

Homogenisierungspuffer (pH 7,3):

Tris	50 mM
Sucrose	0,4 M
EDTA	1 mM
RSA	1% (w/v)

Aufbewahrungspuffer (pH 6,8):

Tris	50 mM
Sucrose	0,4 M

II.7 Immunologische Methoden**II.7.1 Herstellung der Futterpellets**

Transgenes sowie Pflanzenmaterial von Wildtyp-Pflanzen (II.1.5) wurde im Vorfeld der oralen Immunisierung von Mäusen (II.7.2) zu Tabakfutterpellets verarbeitet. Im Vorfeld der Prozessierung wurde das gesamte geerntete Blattmaterial nach Entfernen der Mittelrippe mit dem Skalpell in Blattstückchen zerschnitten und homogenisiert. Die Prozessierung erfolgte in zwei Variationen. Der überwiegende Teil des Homogenats wurde in flüssigem Stickstoff zu Blattpulver gemörsert (Präparationsvariante 1), der Rest wurde mit Hilfe eines Skalpells zu kleineren Blattstückchen verarbeitet (Präparationsvariante 2). Anschließend wurde das aufbereitete Pflanzenmaterial jeweils 1:1 mit zu Mehl verarbeitetem Standard-Nagetierfutter im Mörser homogenisiert und anschließend zu Futterpellets von ca. 1,5 cm Länge verarbeitet, die je 0,5g Tabak (Frischgewicht) und Futtermaterial enthielten. Die Trocknung der Futterpellets erfolgte für ca. 1 h bei einem Unterdruck von 60-80 mbar im Vakuumexsikkator nach Zugabe von Trocknungspellets. Die getrockneten Pellets wurden bis zur Verfütterung separat in Eppendorfgläsern bei -20°C gelagert und die jeweils benötigte Menge an Futterpellets ca. 30 min. vor Immunisierungsbeginn aufgetaut. Die Quantifizierung der Antigenkonzentration erfolgte nach der Extraktion von Gesamtprotein (II.3.1) mit dem 5-fachen Volumen Extraktionspuffer aus jeweils einem Futterpellet im GM1-ELISA (II.3.6).

II.7.2 Orale Applikation des Pflanzen-basierten Impfstoffes

Die Immunisierung von Balb/c Mäusen erfolgte durch die orale Verabreichung des Antigens in Form von jeweils zwei Tabakfutterpellets (1 g Pflanzenmaterial (Frischgewicht)) pro Maus und Immunisierungsschritt (II.7.1) nach einer Hungerperiode von ca. 14 h. Um eine konstante Dosierung zu garantieren, wurden die Mäuse über die Immunisierungszeitdauer in separaten Käfigen ohne Einstreu gehalten. Während der oralen Immunisierungen erfolgte keine weitere Nahrungszufuhr, die Versuchstiere wurden jedoch über den gesamten Fütterungszeitraum mit ausreichend Wasser versorgt. Die Fütterungsversuche wurden erst nach vollständigem Verzehr der Futterpellets bzw. nach max. acht Stunden beendet und gegebenenfalls Pelletrückstände dokumentiert.

II.7.3 **Intranasale Applikation der mukosalen Adjuvantien**

Die Verabreichung von BPPCysPEG (modifiziertes MALP-2) (II.1.7) und PQS-PEG (II.1.7) erfolgte nach dem Konsum von etwa der Hälfte der Futterpellets, d.h. ca. 4 Stunden nach Immunisierungsbeginn. Zur Fixierung wurden die Versuchstiere mit Daumen und Zeigefinger am Nackenfell gefasst und der Schwanz zusätzlich mit dem kleinen Finger am Handballen fixiert. Pro Maus und Immunisierungsschritt wurden 0,5 µg MALP-2 (BPPCysPEG) bzw. 10 µg PQS (PQS-PEG) in einem Endvolumen von 5 µl durch vorsichtiges Pipetieren vollständig in das rechte oder das linke Nasenloch verabreicht.

II.7.4 **Probenentnahme und -aufbereitung**

Die Entnahme von Blut- und Stuhlproben erfolgte vor der ersten Immunisierung, sowie jeweils 6 Tage nach der 2. und 4. bzw. 13 Tage nach der 5. und 14 Tage nach der 6. Immunisierung (Abb. III.19). Aus der Schwanzvene entnommene Blutproben wurden 1:100 in sterilem 1x PBS verdünnt, zur Gewinnung von Serum zentrifugiert (15.000 x g, 5min., RT), der Überstand aliquotiert und bis zur Austestung bei -20°C gelagert. Die Stuhlproben der individuellen Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von ca. 5 h in Käfigen ohne Streu gesammelt und bis zum Ende des Immunisierungsexperiments bei -20°C gelagert. Im Vorfeld der Analyse von Gesamt-IgA bzw. spezifischer mukosaler Immunantworten wurden die Stuhlproben in Eppendorfgefäßen nach Zugabe von 20-fach Extraktionspuffer (PBS-T) unter zu Hilfenahme eines elektrischen Pistills homogenisiert und feste Bestandteile durch Zentrifugation (15.000 x g, 5 min., 4 °C) entfernt. Die Überstände mit löslichem IgA wurden aliquotiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

II.7.5 **Analyse der mukosalen und humoralen Antikörperantworten**

Die Verfolgung der mukosalen und systemischen humoralen Immunantworten sowie die Quantifizierung des Gesamt-IgA erfolgten mit Hilfe des ELISA. Die Beschickung der Mikrotiterplatten sowie die sukzessiven Probenverdünnungen erfolgten in einem automatisierten Verfahren (Beckman Biomek Robots).

II.7.5.1 **Sandwich-ELISA zur Bestimmung des Gesamt IgA**

Die Quantifizierung des Gesamtgehaltes an lokalem IgA in Stuhlextrakten (II.7.4) erfolgte im Sandwich-ELISA in Anlehnung an das unter II.3.6 aufgeführte Protokoll des GM1-ELISA. Die Durchführung des ELISA sowie die Konzentrationen und Verdünnungen der verwendeten Antigene, Kontrollseren und Detektionsantikörper können Tabelle II.8 entnommen werden.

Tabelle II.8: Durchführung des ELISA zur Bestimmung des Gesamt-IgA.

Die Waschschrte, die Probenverdünnungen und die Absorptionsmessungen erfolgten analog zum GM1-ELISA (II.3.6). Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach Ermittlung der Steigungen der Proben und des mitgeführten IgA-Standards durch lineare Regression mit Hilfe der Tabellenkalkulationssoftware Origin (v 6.1 und v 7.5G, Microcal) anhand folgender Formel: $C_{\text{Probe}} = m_{\text{Probe}} / m_{\text{Standard}} * C_{\text{Standard}} * V$. C = Konzentration; m = Steigung; V = Probenverdünnung.

Schritt	Komponente	Konzentration/Verdünnung	Volumen	Inkubation
Beschichten	ZAM (Fab)	1:5000 in CP	100 µl	2 h, 37°C
Blockieren	Milchpulver (Marvel)	2,5% in PBS-T	200 µl	1 h, 37°C
Probeninkubation	Stuhlextakte	1:50 in 1 x PBS	100 µl	üN, 4°C
	IgAκ Standard (Sigma)	10 µg/ml in 1x PBS	100 µl	üN, 4°C
	Blank	1 x PBS	100 µl	üN, 4°C
1. Hybridisierung	Kα-IgA	1:5000 in PBS-T	100 µl	1 h, 37°C
2. Hybridisierung	ZαK ^{HRPO}	1:5000 in PBS-T	100 µl	1 h, 37°C
Farbreaktion	ABTS TM (Roche)	nach Herstellerangaben	100 µl	1 h, RT bis üN, 4°C

II.7.5.2 ELISA zum Nachweis antigenspezifischer Antikörper gegen CTB und HVR1

Der Nachweis von antigenspezifischen lokalen Schleimhaut-IgA in Stuhleextrakten (II.7.4) sowie Serum-IgG erfolgte mit Hilfe eines indirekten ELISA (Tab. II.9). Dazu wurden Mikrotiterplatten im 96-Well-Format direkt mit den bakteriell exprimierten Antigenen CTB (II.3.6) bzw. GST-R9R9 (GST-R9-Tandemkonstrukt aus *E. coli*, Dr. K. Uhde-Holzem, Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen) in einem Konzentrationsüberschuss beschichtet.

Tabelle II.9: Durchführung des ELISA zur Bestimmung mukosaler und humoraler Immunantworten gegen CTB bzw. HVR1 in Stuhlextrakten und im Serum.

Die Waschschritte, die Probenverdünnungen und die Absorptionsmessungen erfolgten analog zum GM1-ELISA (II.3.6). Die Kontrollseren, K α -CT im Fall der Analyse CTB-spezifischer sowie K α -R9 und K α -GST im Fall HVR1-spezifischer Antikörperantworten, wurden als Positivkontrolle bzw. zur Standardisierung der antigenspezifischen Aktivitäten mitgeführt (III.3.3). Die Bindungsaktivität der Antikörper wurde als relative Reaktivität ($m_{\text{Probe}} / m_{\text{Standard}}$) dargestellt und im Fall der lokalen IgA-Aktivitäten mit dem Gesamtgehalt an sekretorischem IgA korreliert ($m_{\text{Probe}} / m_{\text{Standard}} / C_{\text{Gesamt IgA}}$).

Schritt	Komponente	Konzentration/Verdünnung	Volumen	Inkubation
Beschichten	CTB	1:5000 in 1 x PBS (220 ng/ml)	100 μ l	2 h, 37°C
	GST-R9R9	1:1000 in 1 x PBS	100 μ l	
Blockieren	Milchpulver (Marvel)	2,5% in 1x PBS-T	200 μ l	1 h, 37°C
Proben-inkubation	I. Stuhlproben	1:100 in 1x PBS	100 μ l	üN, 4°C
	II. Serumproben	1:200 in 1x PBS	100 μ l	üN, 4°C
	III. K α -CT	1:3200 in 1 x PBS	100 μ l	üN, 4°C
	IV. K α -R9	1: 1000 in 1 x PBS	100 μ l	üN, 4°C
	V. K α -GST	1:3200 in 1 x PBS	100 μ l	üN, 4°C
	VI. Blank	1 x PBS	100 μ l	üN, 4°C
1. Hybridisierung	I., VI. K α -IgA	1:5000 in 1x PBS	100 μ l	1 h, 37°C
	II., VI. Z α M ^{HRPO}	1:5000 in 1x PBS	100 μ l	1 h, 37°C
	III., IV., V. Z α K ^{HRPO}	1:5000 in 1x PBS	100 μ l	1 h, 37°C
2. Hybridisierung	I., VI. K α Z ^{HRPO}	1:5000 in 1x PBS	100 μ l	1 h, 37°C
Farbreaktion	ABTS TM (Roche)	nach Herstellerangaben	100 μ l	1 h, RT bis üN, 4°C

II.7.5.3 GM1-ELISA zum Nachweis antigenspezifischer Antikörper gegen pflanzenexprimiertes CTB-HVR1-TCRCys

Die Bindungsaktivität der Stuhl- und Serumproben gegen das pflanzenexprimierte CTB-Fusionsprotein wurde mit Hilfe eines modifizierten GM1-ELISA analysiert (Tab. II.10) Dabei wurde in Pflanzenextrakt enthaltenes CTB-HVR1-TCRCys indirekt über GM1 an die ELISA-Platten gebunden.

Tabelle II.10: Durchführung des ELISA zur Bestimmung mukosaler und humoraler Immunantworten gegen pflanzenexprimiertes CTB-HVR1-TCRCys in Stuhlextrakten und im Serum.

Die Waschschritte, die Probenverdünnungen und die Absorptionsmessungen erfolgten analog zum GM1-ELISA (II.3.6). Zur Immobilisierung von CTB-HVR1-TCRCys wurde transgener Pflanzenextrakt (II.3.1) auf der Hälfte einer GM1-beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Extrakt von Wildtyp-Pflanzen in einer identischen Gesamtproteinkonzentration auf die zweite Hälfte der Platte aufgetragen. Die Kontrollseren $R\alpha$ -CT und $M\alpha$ -CTB dienen als Positivkontrolle bzw. zur Standardisierung der antigenspezifischen Aktivitäten in den analysierten Stuhl- bzw. Serumproben (III.3.3). Die Bindungsaktivität der Antikörper wurde als relative Reaktivität ($m_{\text{Probe}} / m_{\text{Standard}}$) dargestellt und im Fall der lokalen IgA-Antikörperantworten mit dem Gesamtgehalt an lokalem IgA korreliert ($m_{\text{Probe}} / m_{\text{Standard}} / C_{\text{Gesamt IgA}}$).

Schritt	Komponente	Konzentration/Verdünnung	Volumen	Inkubation
Beschichten	Gangliosid GM1	1 µg/ml in CP	100 µl	2 h, 37°C
Blockieren	Milchpulver (Marvel)	2,5% in 1x PBS-T	200 µl	1 h, 37°C
Antigeninkubation	transgener Pflanzenextrakt	1:5-1:10 in 1x PBS	100 µl	üN, 4°C
	WT- Pflanzenextrakt	1:5-1:10 in 1x PBS	100 µl	üN, 4°C
Probeninkubation	I. Stuhlproben	1:100 in 1x PBS	100 µl	2 h, 37°C
	II. Serumproben	1:200 in 1x PBS	100 µl	2 h, 37°C
	III. $R\alpha$ -CT	1:3200 in 1 x PBS	100 µl	2 h, 37°C
	IV. $M\alpha$ -CTB	1:3200 in 1 x PBS	100 µl	2 h, 37°C
1. Hybridisierung	I. $K\alpha$ -IgA	1:5000 in 1 x PBS	100 µl	1 h, 37°C
	II., IV $Z\alpha M^{\text{HRPO}}$	1:5000 in 1 x PBS	100 µl	1 h, 37°C
	III. $Z\alpha K^{\text{HRPO}}$	1:5000 in 1 x PBS	100 µl	1 h, 37°C
2. Hybridisierung	I. $Z\alpha K^{\text{HRPO}}$	1:5000 in 1 x PBS	100 µl	1 h, 37°C
Farbreaktion	ABTS TM (Roche)	nach Herstellerangaben	100 µl	1 h, RT bis üN, 4°C

II.8 Bestimmung des Nikotingehaltes in Tabakblättern

II.8.1 Nikotinextraktion

Zur Bestimmung des Nikotingehalts in Tabakblättern wurden jeweils die 8ten Blätter von drei ca. 30 cm hohen Pflanzen der Tabakkultivare Petit Havana SR1, Nft51 und Maryland Mamouth sowie *N. benthamiana* verwendet. Die Blätter wurden längs der Mittelrippe in zwei

identische Hälften geteilt, von denen eine frisch extrahiert und die andere vor der Extraktion gefriergetrocknet wurde. Im Fall von *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 wurden zusätzlich entsaftete Blätter analysiert. Die Isolierung der Alkaloide des frischen Materials erfolgte nach Mörsern der Blatthälften in flüssigem Stickstoff für 120 min. unter Schütteln (VortexGenie 2, Schüttelstufe 3) bei RT in dem 10-fachen Volumen wässriger Extraktionslösung (40% (v/v) Methanol, 0,5% (v/v) Essigsäure in ddH₂O). Der Extrakt wurde zur Abtrennung aller Festbestandteile dreimal zentrifugiert (15.000 x g, 15 min., 4°C) und die Überstände in Reaktionsampullen für HPLC-Analysen überführt [258]. Die zweiten Blatthälften wurden nach dem Mörsern in flüssigen Stickstoff lyophilisiert, anschließend erneut mit flüssigen Stickstoff gemörsert, der Trocknungsverlust (ca. 90% des Frischgewichtes) durch Zugabe von Extraktionslösung ausgeglichen und nach der weiteren Zugabe von 10-fachen Extraktionslösung analog zum Frischmaterial extrahiert.

Zur Analyse der Nikotinreduktion durch Entsaftung wurden zusätzlich zwei Blätter des Kultivars Petit Havana SR1 herangezogen. Jeweils eine Blatthälfte wurde normal prozessiert, während die korrespondierende zweite Blatthälfte vor der Extraktion durch Ausquetschen entsaftet wurde.

Die Nikotinextraktion aus Zellpellets von zwei Proben einer BY-2 Zellsuspension erfolgte analog zum Pflanzenmaterial nach Zellaufschluss durch Mörsern in flüssigen Stickstoff und Inkubation im 10-fachen Volumen Extraktionslösung.

Vor der quantitativen Bestimmung des Nikotingehaltes der verschiedenen Tabakkultivare erfolgte in einem Vorversuch die Analyse der Extraktionseffizienz. Dazu wurde jeweils ein frisches sowie ein bei 60°C ü.N. getrocknetes Blatt des Tabakkultivars Petit Havana SR1 30, 60, 120, 180 bzw. 210 min. in 10-fach Extraktionspuffer inkubiert, nach Zentrifugation der alkaloidhaltige Überstand in Reaktionsampullen überführt und das Zellpellet erneut für 120 min. reextrahiert und anschließend die Nikotinkonzentrationen der Extraktionen und Reextraktionen quantitativ in einem HPLC-MS-MS System ermittelt (II.8.2).

II.8.2 HPLC-MS-MS-Analyse

Die quantitative Bestimmung des Nikotingehaltes wurde freundlicherweise von Heinrich Jüring (Fraunhofer IME, Schmallenberg) in einem HPLC-MS-MS Verfahren durchgeführt. In Vorversuchen wurden mit Hilfe eines kommerziellen Nikotinstandards sowohl die Elutionszeiten des Analyten auf der HPLC (High Performance Liquid Chromatography-) Säule als auch der lineare Bereich bekannter Standardkonzentrationen (1 ng/ml bis 10000 ng/ml) in der anschließenden MS (Massenspektrometrie-) basierten quantitativen Bestimmung ermittelt. Nach Auftrennung der Extrakte über die HPLC Säule wurden die

HPLC-Eluate positiv ionisiert (Elektrospray-Ionisierung, ESI) und zweimal massenspektrometrisch aufgetrennt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Korrelierung der Signale (Kurvenflächen) der im MS gemessenen positiv-ionisierten Tochter-Ionen mit den bei der Kalibrierung ermittelten Standardsignalen.

HPLC-MS Bedingungen:

HPLC	2795 Alliance (Waters)
MS	Quattro Ultima PT (Waters)
Säule	125 x 2,0 mm Hypersil MOS 5 µm (VDS Optilab)
Fliessmittel A	10 mM NH ₄ Ac (pH 9,5)
Fliessmittel B	Methanol (Baker)
Fluss	0,25 ml/min
Injektion	5 µl
Gradient	0 min. 100% A 5 min. 100% B (linearer Anstieg) 10 min. 100% B 15 min. 100% A

MS-Einstellungen:

Ionisierung	Elektrospray positiv (ES+)
Cone-Spannung	40 V
Collisionsenergie	10 eV
MRM	163>106 163>132

III. ERGEBNISSE

Die Entwicklung effektiver, oral applizierbarer Vakzine setzt eine adäquate Akkumulation der Zielantigene im Pflanzensystem voraus. Eine erfolgsversprechende Strategie zur Steigerung der Produktivität ist die Verankerung rekombinanter Proteine in der Pflanzenzellmembran durch die Fusion an geeignete Transmembrananker (I.2.2). Obwohl ihre Aktivität auf zellbiologischer Ebene intensiv erforscht wurde, wurden bislang nur wenige pflanzliche Transmembranproteine auf molekularer und struktureller Ebene charakterisiert. Darunter befinden sich vorwiegend Carrier- und Kanalproteine, die in den Transport von Ionen, Wasser und Nährstoffen involviert sind und die Lipid-Doppelschicht mehrfach durchdringen („Multipass-Transmembranproteine“) und Rezeptorproteine, die in Signaltransduktionsprozesse involviert sind [259, 260]. Bislang liegen jedoch nur wenige Daten der membranständigen Expression rekombinanter Proteine im Pflanzensystem unter der Verwendung homologer Transmembrananker vor [261]. Die funktionale *in planta* Produktion von Transmembranimmunglobulinen humaner und tierischer Herkunft und ihre korrekte Lokalisation bestätigen die generelle Eignung heterologer Transmembrananker zur Verankerung rekombinanter Zielproteine in der Pflanzenzellmembran [122-124]. Studien zur membranständigen Expression rekombinanter Proteine in Tabak am Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen haben gezeigt, dass die Fusion an die konstante Region der β -Kette des humanen T-Zell-Rezeptors (TCR β) (I.2.2.1) sowohl zu einer funktionalen Expression des chimären T-Zell-Rezeptorfragments, als auch zu einer signifikanten Produktsteigerung führte [123, 262]. Die TCR β -Transmembranankervarianten der vorliegenden Arbeit basieren auf verkürzten Versionen des von Schillberg *et al.* (2000) verwendeten Transmembranankers, bestehend aus der vollständigen konstanten Region der extrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne sowie der cytoplasmatischen Domäne der TCR β -Kette. Der konstante Teil der extrazellulären Domäne wurde entweder vollständig entfernt (TCR), bzw. bis auf die hinge-Region (I.2.2.1) verkürzt (TCRhinge, TCRCys). Letztere sollte als Linkerregion zwischen den N-terminal fusionierten Antigenen und der Transmembrandomäne der TCR β -Kette fungieren, um die unabhängige Faltung der Antigene zu garantieren. Die hinge-Region wurde mit (TCRCys) und ohne (TCRhinge) dem an Position 264 lokalisierten Cystein (NCBI-Datenbanksequenz: AF043185) exprimiert, das eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen der α - und β -Kette des humanen TCR ausbildet, um den Einfluss einer potentiellen Dimerisierung zweier chimärer β -Ketten auf die Proteinstabilität im Pflanzensystem zu analysieren.

Am Beispiel der Modellantigene HVR1 und MPT64 (I.4), sollte im Rahmen dieser Arbeit die Eignung der drei genannten Membranankerversionen auf der Basis einer verkürzten TCR β -Kette zur Stabilisierung und Anreicherung von Antigenen in der pflanzlichen Zellmembran im Vergleich zu apoplasmatisch exprimierten Antigenversionen bewertet werden. Aufgrund der hohen genetischen Variabilität des HCV-Antigens HVR1 wurde in dieser Arbeit das Konsensus-Epitop R9 eingesetzt, das das Potential besitzt protektive Immunantworten gegen ein großes Repertoire an HCV-Varianten zu induzieren (I.4.1). Die HVR1 Konsensus-Sequenz kodiert für ein 27 Aminosäure großes Peptid, das bereits erfolgreich in *Nicotiana* Spezies exprimiert wurde [239, 244, 263, 264] und nach intranasaler Verabreichung im Tiermodell sowohl mukosale als auch systemische Immunantworten induzierte [244]. Der reife Proteinanteil des ~22 kDa sekretorischen Proteins MPT64 aus *Mycobacterium tuberculosis* ist ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung einer effektiven Tuberkulose-Vakzine, da er das Potential besitzt cytotoxische CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren, die neben CD4⁺ T-Zellen essentiell für eine protektive Immunantwort gegen *M. tuberculosis* sind [265]. Während HVR1 nach oraler Verabreichung an Mäuse ebenfalls auf immunologischer Ebene charakterisiert werden sollte, diente MPT64 in der vorliegenden Arbeit ausschließlich als Modellprotein für Akkumulations- und Lokalisationsanalysen (III.1.2 und III.1.3).

Die Modellantigene wurden sowohl in Tabakpflanzen als auch in Tabaksuspensionszellen der Varietät *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 (BY-2) exprimiert. Letztere wurden ausschließlich in den nachfolgenden Lokalisierungsstudien eingesetzt (III.1.3). Als Modellexpressionssystem für die oralen Immunisierungen wurde neben dem Tabakkultivar *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 aufgrund einer angenommenen besseren Verträglichkeit im Rahmen einer oralen Applikation die Varietät *N. tabacum* cv. Nft51 eingesetzt, die in getrocknetem Zustand signifikant geringere Nikotinkonzentrationen aufweisen sollte (II.1.5). Nach oraler Vakzinierung mit Tabakblattmaterial der höchstexprimierenden membranverankerten Antigenvariante sollte die Immunogenität des membranständigen Modellantigens auf mukosaler und humoraler Ebene analysiert werden (III.3.3).

III.1 Produktion der pflanzenbasierten, oral applizierbaren Impfstoffe

III.1.1 Herstellung der Pflanzenexpressionsvektoren

Als Template für die CTB, HVR1 und MPT64 kodierende DNA dienten die rekombinanten TMV-basierten Vektoren 30B [266], die bereits die Genkonstrukte für CTB-HVR1, unter der Verwendung der pflanzenkodonoptimierten Genvariante des HVR1 (II.1.4) bzw. CTB-

MPT64 (II.1.4) [243] enthielten. Sie kodieren für ein 130 bzw. 308 Aminosäuren großes Fusionsprotein bestehend aus der N-terminalen reifen Proteinsequenz der B-Untereinheit des Cholera Toxins (CTB) und des entsprechenden C-terminalen Antigens.

Als Basis für die Generierung der membranverankerten Antigene diente das bereits erfolgreich in Pflanzen exprimierte Konstrukt pC-H-CEANA3-TCR-PW* (Vaquero, Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen). Es kodiert für ein Fusionsprotein aus der N-terminalen N- und A3-Domäne des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) [267] fusioniert an die konstante Region der extrazellulären Domäne der β -Kette des humanen TCR und wurde auch schon zur Konstruktion der membranständigen anti-TMV-spezifischen scFv24 sowie scFv29 verwendet [123, 129].

III.1.1.1 Klonierung der membranständigen Antigenkonstrukte

Um eine Integration der Antigene in der Pflanzenzellmembran zu erreichen, wurde das murine Signalpeptid der schweren Kette des monoklonalen Antikörpers mAk24 (LPH), das ein Targeting in den sekretorischen Weg bewirkt, den Fusionsproteinen vorgeschaltet. Um die Einführung zusätzlicher Aminosäuren zu verhindern und nach der proteolytischen Spaltung des Vorläuferproteins durch die Signalpeptidase einen authentischen N-Terminus der reifen Fusionsproteine zu gewährleisten, wurde die Signalsequenz LPH durch direkte Fusion mittels SOE-PCR (II.2.2.2) eingefügt (Abb. III.1 und III.2).

In einem ersten Schritt wurden mittels PCR (II.2.2.1) unter der Verwendung der „inneren“ SOE-Primerpaare (LPH-CTBback und CTBforw, II.1.3) und der spezifischen äußeren Primer pSS-LPHforw. und HVR1back bzw. MPT64back (II.1.3) aus den Vektoren pTRAKc-dhfrAHnew bzw. CTB-HVR1 in 30B und CTB-MPT64 in 30B (II.1.4) DNA-Fragmente mit überlappenden, komplementären Enden erzeugt. Diese kodieren aufgrund einer Hybridisierung des Primers pSS-LPHforw in der duplizierten Enhancerregion für zwei Genkonstrukte bestehend aus Sequenzbereichen des Promotors, der 5'UTR (**un**translatierte Region) der Chalkon-Synthase (CHS) und LPH (35SS-CHS-LPH) (567 bzw. 240 Bp) mit der vorhandenen *EcoRI*-Schnittstelle am 5'-Ende der 5'UTR sowie für CTB-HVR1 (501 Bp) bzw. CTB-MPT64 (1035 Bp). In einem zweiten Schritt erfolgten unter der Verwendung des 35SS-CHS-LPH-Fragmentes in zwei unabhängigen SOE-PCR-Reaktionen einerseits durch Hybridisierung der überlappenden Enden die Fusion der Signalsequenz mit den Genkonstrukten für CTB-HVR1 bzw. CTB-MPT64 und andererseits durch die Verwendung der äußeren Primerpaare pSS-LPHforw und HVR1back bzw. MPT64back die Amplifikation des SOE-PCR-Produktes und die Integration einer *SaI*I-Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende.

Die Genkonstrukte, die für die drei in dieser Arbeit generierten TCR β -Membranankervarianten kodieren wurden mit Hilfe der spezifischen Primer TCRCysforw (Abb. III.1, Primer 1), TCRhingeforw (Abb. III.1, Primer 2), TCRforw (Abb. III.1, Primer 3) mit den eingefügten Restriktionsschnittstellen für *SalI* am 5'-Ende und dem 3'-Primer TCRback mit integrierter *XbaI*-Schnittstelle aus dem Vektor pC-H-CEANA-TCR-TM* amplifiziert. Nach dem präparativen Verdau mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen, wurden die DNA-Fragmente mittels präparativer Agarosegelelektrophorese mit anschließender Affinitätschromatographie gereinigt (II.2.5). Anschliessend erfolgte die gerichtete in frame-Klonierung der isolierten Genkonstrukte bestehend aus den kodierenden Sequenzen für CHS-LPH und CTB-HVR1 bzw. CTB-MPT64 sowie TCRCys (153 Bp), TCRhinge (138 Bp) bzw. TCR (81 Bp) in die kompatible *EcoRI*-*XbaI*-Schnittstelle des verdauten Pflanzenexpressionsvektor pTRAKc-dhfr-AHnew (II.1.4).

Nach Transformation der individuellen Ligationsansätze in *E. coli* DH5 α (II.4.2) wurden auf Ampicillin-haltigem Medium rekombinante Klone selektioniert und das Vorhandensein der Inserts durch Kontrollrestriktionen (II.2.3) und Kolonie-PCR (II.2.2.3) bestätigt. In Korrelation zum Antigen und der TCR β -Membranankervariante wurden die resultierenden Konstrukte pCTB-HVR1-TCR, pCTB-HVR1-TCRhinge, und pCTB-HVR1-TCRCys bzw. pCTB-MPT64-TCRCys genannt (Abb. III.1). Sequenzverifizierungen der Expressionskassette ergaben im Bereich der kodierenden Sequenz für TCR β im Vergleich zur Datenbanksequenz (NCBI: AF043185) und publizierten Daten [268] an Position 8 der Transmembrandomäne aller Konstrukte einen Aminosäureaustausch von Methionin nach Leucin (M8L) durch eine Punktmutation an Position 24 (ATG→CTG) der kodierenden cDNA, die sich bereits im Ausgangsplasmid pC-H-CEANA3-TCR-PW* befand. Da es sich jedoch in beiden Fällen um hydrophobe Aminosäure handelt, waren keine Auswirkungen auf die Funktionalität des Transmembranankers zu erwarten. Dies wurde ebenfalls durch die Analyse der entsprechenden Aminosäuresequenzen mit Hilfe des TMHMM („Transmembrane Hidden Markov Model“) Server`s v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) [269] im Vorfeld der Expression in Tabak bestätigt. Eine weitere Sequenzabweichung der Template DNA im Vergleich zur Originalsequenz (TTT→TTA) führte zu einem Aminosäureaustausch von Phenylalanin nach Leucin an Position 7 der extrazellulären Domäne von TCRCys (F7L) bzw. Position 2 im Fall von TCRhinge (F2L). Da dieser Bereich ausschließlich als Linker fungieren sollte, war jedoch keine Einschränkung der Funktionalität der Membrananker zu erwarten.

Die Konstrukte wurden in *A. tumefaciens* transformiert. Nach der Identifizierung positiver Klone mittels Kolonie-PCR (II.2.2.3) erfolgte die transiente bzw. stabile Transformation von Tabakpflanzen der Kultivare Petit Havana SR1 bzw. Nft51 und BY-2 Suspensionszellen (II.5.2).

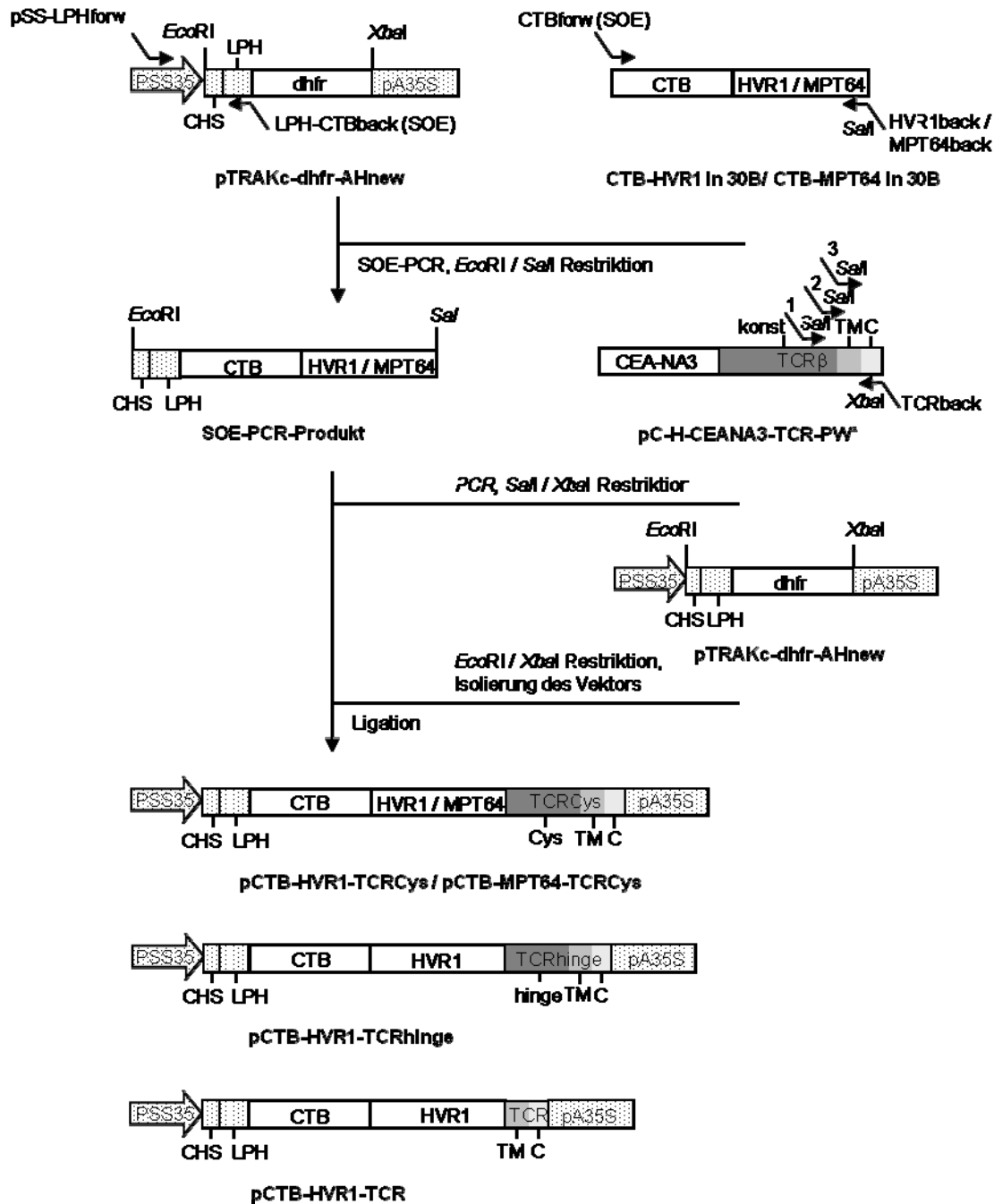


Abbildung III.1: Schematische Darstellung der Klonierung von pCTB-HVR1-TCR, pCTB-HVR1-TCRhinge, pCTB-HVR1-TCRCys, und pCTB-MPT64-TCRCys.

PSS35: 35S Promotor des CaMV mit duplizierter Enhancer-Region, CHS: 5'-UTR der Chalcon-Synthase; LPH: Signalpeptid der schweren Kette des monoklonalen Antikörpers mAk24; CTB: Cholera Toxin B-Untereinheit; TCRβ: β-Kette des humanen T-Zell-Rezeptors; konst: konstante, extrazelluläre Domäne der TCR β-Kette; Cys: Gelenkregion der TCR β-Kette inklusive Cystein; hinge: verkürzte Gelenkregion der TCR β-Kette; TM: Transmembrandomäne der TCR β-Kette; C: cytoplasmatische Domäne der TCR β-Kette; pA35S: CaMV 3'-UTR; 1: TCRCysforw; 2: TCRhingeforw; 3: TCRforw.

III.1.1.2 Klonierung der sekretierten Antigenkonstrukte

Analog zur Generierung der membranständigen Antigenkonstrukte wurde an das 5'-Ende der Genkonstrukte, die für die löslichen Antigene kodieren, mittels SOE-PCR die Signalsequenz der schweren Kette des monoklonalen Antikörpers mAk24 (LPH) ohne die im Ausgangsvektor pTRAKc-dhfr-AHnew vorhandene 3'-terminale *NcoI* Restriktionschnittstelle fusioniert, um ein Targeting der Antigene in den sekretorischen Weg zu erreichen (III.1.1.1). Mit Hilfe der äußeren Primer pSSLPHforw und MPT64apoback bzw. HVR1apoback wurden Genkonstrukte erzeugt, die für 35SS-CHS-LPH und CTB-HVR1 bzw. CTB-MPT64 kodieren und am 3'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle integriert. Nach enzymatischer Restriktion der SOE-PCR-Produkte mit *EcoRI* und *SalI* erfolgte die gerichtete in-frame-Klonierung in den über *EcoRI-XbaI*-Restriktion gewonnenen Pflanzenexpressionsvektor pTRAKc (Abb. III.2).

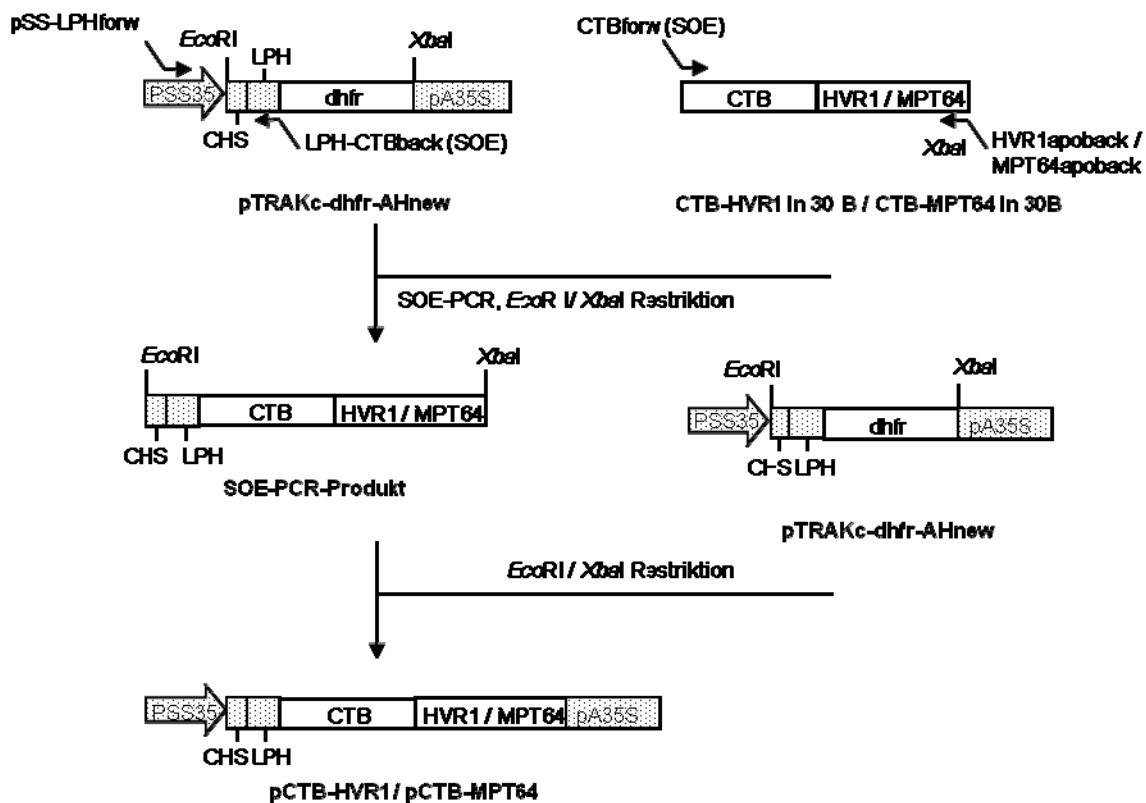


Abbildung III.2: Schematische Darstellung der Klonierung von pCTB-HVR1 und pCTB-MPT64.

PSS35: 35S Promotor des CaMV mit duplizierter Enhancer-Region, CHS: 5'-UTR der Chalcon-Synthase; LPH: Signalpeptid der schweren Kette des monoklonalen Antikörpers mAk24; CTB: Cholera Toxin B-Untereinheit; pA35S: 3' UTR des CaMV.

Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* (II.4.2), Kolonie-PCR der erhaltenen Transformanten (II.2.2.3) sowie Kontrollrestriktionen (II.2.3) und anschließender Sequenzanalyse (II.2.7) der Expressionskassetten der resultierenden Plasmide pCTB-HVR1 und pCTB-MPT64, erfolgte die Transformation in *A. tumefaciens* (II.4.6). Mit Hilfe von

Kolonie-PCR identifizierte positive Klone wurden zur Transformation von *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 bzw. Nft51 und BY-2 Suspensionszellen eingesetzt (III.1.2).

Tabelle III.1: Übersicht über die Größen und Molekularmassen der reifen CTB-Fusionsproteine und der individuellen Fusionspartner.

Die Angabe der Größen erfolgte in Aminosäuren [aa], die der Molekulargewichte in Kilodalton [kDa]. Die Molekulargewichte wurden mit Hilfe des ExPasy ProtParam Servers (<http://www.expasy.ch/tools/protparam>) ermittelt und beziehen sich jeweils auf die monomere Form.

Konstrukt	Größe [aa]	Molekulargewicht [kDa]	Molekulargewicht Fusionspartner [kDa]
CTB-HVR1-TCRCys	183	20,0	
CTB-HVR1-TCRhing	178	19,5	
CTB-HVR1-TCR	159	17,5	
CTB-HVR1	130	14,3	
CTB-MPT64-TCRCys	361	39,7	
CTB-MPT64	308	34,0	

III.1.2 Qualitativer und quantitativer Nachweis der löslichen und membranständigen Modellantigene

Die Fusion des scFv24 an die konstante Domäne von TCR β führte zu einer signifikanten Steigerung der Akkumulation in Tabakpflanzen [123, 262]. Nachfolgend sollte analysiert werden, ob die Fusion der Modellantigene CTB-HVR1 und CTB-MPT64 an die verkürzten TCR β -Membranankerversionen (TCRCys, TCRhing und TCR) im Vergleich zu den apoplasmatisch exprimierten Antigenversionen ebenfalls zu einer Steigerung der Akkumulation der Antigene in Blättern der Tabakkultivare *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 bzw. Nft51 führen. Des Weiteren sollte durch den Vergleich der Varianten TCRCys und TCRhing der Einfluss einer potentiellen Homodimerisierung durch Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen den Sulfhydrylgruppen der Cysteine zweier rekombinanter TCR β -Ketten auf die Antigenakkumulation evaluiert werden.

III.1.2.1 Akkumulation der Antigene in transient transformierten Tabakblättern und Analyse der Funktionalität des CTB-Fusionspartners

Um den Einfluss der Membranverankerung sowie der verschiedenen Membranankervarianten auf die Stabilität der Modellantigene im Pflanzensystem zu untersuchen, wurde im Vorfeld der stabilen nukleären Transformation zunächst die Expression der löslichen und membranständigen Antigenkonstrukte in transient transformierten Tabakblättern untersucht (II.5.2.2). Die Quantifizierung der Antigenakkumulation erfolgte nach Extraktion des löslichen und membranverankerten Gesamtproteins mit einem detergentshaltigen Puffer (II.3.1) mittels GM1-ELISA (II.3.6). Diese spezielle ELISA-Variante basiert auf der Immobilisierung ausschließlich pentamerer, biologisch aktiver CTB-Fusionsproteine durch Bindung von CTB an seinen nativen Rezeptor Gangliosid GM1 und erlaubte so neben der Analyse der Antigenakkumulation zusätzlich eine Aussage über die Funktionalität des N-terminalen CTB-Fusionspartners im Pflanzenrohextrakt. Die Mengen an mono-, di- tri- sowie tetrameren CTB-Fusionsproteinen konnten mit diesem Assay nicht erfasst werden. Die optimale Zusammensetzung des in dieser Arbeit standardmäßig verwendeten Puffers zur Extraktion und Solubilisierung TCR β -basierender membranständiger Proteine (200 mM Tris (pH 7.5), 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20, 10 mM DTT) (II.3.1) wurde im Vorfeld der Akkumulationsanalysen identifiziert (Ergebnisse nicht gezeigt). Ein potentieller negativer Einfluß des im Extraktionspuffer enthaltenen Reduktionsmittels DTT auf die Stabilität der Pentamere wurde durch die starke Probenverdünnung im ELISA ausgeschlossen.

Die signifikant unterschiedliche Akkumulation der löslichen und membranverankerten Versionen nach vier individuellen transienten Transformationen zeigte eine deutliche Abhängigkeit der Antigenakkumulation von der potentiellen Lokalisation (Apoplast oder Zellmembran) und der gewählten TCR β -Membranankervariante (Abb. III.3). Die Fehlerbalken der individuellen Proben verdeutlichen die mehr oder weniger starken Variationen der Konzentration innerhalb eines Konstruktes, die aus der Abhängigkeit der Produktivität transient transformierter Blätter von der Qualität der infiltrierten Blätter resultierten. Für beide Modellantigene konnte nach C-terminaler Fusion an den TCRCys-Membrananker im Vergleich zum entsprechenden sekretierten Antigen eine signifikante Steigerung der Akkumulation beobachtet werden. Das potentiell membranständige rekombinante Protein CTB-HVR1-TCRCys akkumulierte mit durchschnittlich 27,8 $\mu\text{g/g}$ (SEM \pm 8,6) und maximal 50,5 $\mu\text{g/g}$ Pflanzenmaterial des Kultivars Petit Havana SR1 im Durchschnitt 185,6-fach höher als lösliches CTB-HVR1, das sich in drei von vier transienten

Transformationen unterhalb des Detektionslimits des GM1-ELISA's befand. Der Vergleich mit der Membranankervariante TCRhinge, die zu einer durchschnittlich 3,6-fach geringeren Akkumulation von fusioniertem CTB-HVR1 führte, ergab, dass die beobachtete signifikante Akkumulationssteigerung von CTB-HVR1-TCRCys offensichtlich nicht ausschließlich auf einer Stabilisierung der Antigene in der Pflanzenzellmembran beruhte, sondern die Dimerisierung von zwei chimären TCRCys-Membranankerfragmenten über Disulfidbrückenbildung zu einer weiteren Stabilisierung der Antigene in der Membran führte. Die Fusion von CTB-HVR1 an die Membranankervariante TCR ergab mit einer durchschnittlich 18,4-fachen Steigerung der Antigenakkumulation den geringsten beobachteten stabilisierenden Effekt. Da die Transmembrandomäne flankierende Aminosäuren einen nicht ganz unwesentlichen Einfluss auf die Topologie [270] und Funktionalität [271] von Membranproteinen ausüben können, könnten aus der vollständigen Entfernung der konstanten extrazellulären Domäne resultierende Einbußen der Funktionalität der TCR-Membranankerversion und damit eine partielle Sekretion der Antigene in den Apoplasten eine Erklärung für die deutlich geringeren Antigenakkumulationen liefern.

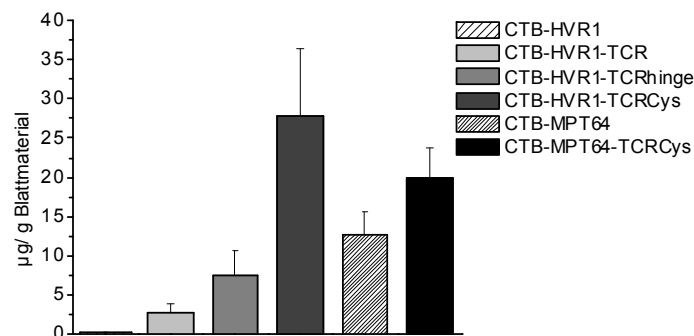


Abbildung III.3: Quantitativer und funktioneller Nachweis transient exprimierter CTB-Fusionsproteine im GM1-ELISA.

Die Akkumulation von funktionellem CTB-HVR1, CTB-HVR1-TCR, CTB-HVR1-TCRhinge, CTB-HVR1-TCRCys, CTB-MPT64 und CTB-MPT64-TCRCys in µg/g Blattmaterial (Frischgewicht) wurde nach Isolierung von Gesamtprotein (II.3.1) aus infiltrierten Blättern des Kultivars *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 mittels GM1-ELISA (II.3.6) bestimmt. Die immobilisierten pentameren Fusionsproteine wurden mittels $Z\alpha$ -CTB und $K\alpha Z^{HRPO}$ (Fc) (II.1.2) und anschließender Substratreaktion detektiert, als Negativkontrolle diente Pflanzenextrakt des nicht transformierten Wildtyps. Die Quantifizierung erfolgte nach photometrischer Absorptionsmessung des Farbumschlags anhand bekannter Standardkonzentrationen (bakteriell exprimiertes CTB, 100 ng/ml). Die individuellen Säulen repräsentieren den Mittelwert der Akkumulation \pm SEM in jeweils zwei Tabakblättern nach vier individuellen transienten Transformationen.

Im Vergleich zum Modellantigen CTB-HVR1 war die beobachtete Akkumulationssteigerung von CTB-MPT64 durch Fusion an TCRCys mit einer durchschnittlich 1,6-fachen Akkumulationssteigerung deutlich geringer. Mit durchschnittlich 12,7 µg/g Blattmaterial (SEM \pm 2,96) wurde im Vergleich zu CTB-HVR1 eine 84,7-fach höhere Konzentration an

löslichem Antigen, mit einer mittleren Akkumulation von 19,8 µg/g (SEM ± 3,9) jedoch eine 1,4–fach geringere Akkumulation des TCRCys-verankerten Antigens ermittelt.

Der Nachweis der CTB-Fusionsproteine im GM1-ELISA bestätigte, dass pflanzenexprimiertes CTB in Analogie zu publizierten Daten (IV.2), zumindest nach Gesamtproteinextraktion im Pflanzenrohextrakt, an seinen nativen Rezeptor bindet, d.h. durch korrekte Faltung und Ausbildung von Disulfidbrücken seine native dreidimensionale Struktur einnimmt.

III.1.2.2 Akkumulation der Antigene in transgenen Tabakpflanzen und Analyse der Funktionalität des CTB-Fusionspartners

Analog zu den Analysen der Funktionalität und Quantität im transienten Ansatz (III.1.2.1) wurde die Akkumulation pentamerer CTB-Fusionsproteine nach stabiler nukleärer Transformation (II.5.2.3) in transgenen Pflanzen der Linien CTB-HVR1, CTB-HVR1-TCR, CTB-HVR1-TCRhinge und CTB-HVR1-TCRCys sowie CTB-MPT64 und CTB-MPT64-TCRCys der Tabakkultivare *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 und *N. tabacum* cv. Nft51 mittels GM1-ELISA (II.3.6) analysiert. Mit Ausnahme der transgenen Linien CTB-HVR1 und CTB-MPT64, deren Regeneration sich als problematisch herausstellte, wurden für jedes Konstrukt 30-50 Antibiotika-resistente T₀-Tabakpflanzen regeneriert. Jeweils 3-5 der bestexprimiersten Pflanzen pro Pflanzenlinie wurden geselbstet und die Antigenakkumulation über mindestens zwei Generationen beobachtet. Für die nachfolgenden Immunisierungen (III.3) wurde die vielversprechenste Antigenvariante CTB-HVR1-TCRCys und das produktivste Kultivar Petit Havana SR1 ausgewählt und homozygote Pflanzenlinien erzeugt. Aufgrund der zu dem Zeitpunkt der Pflanzentransformationen angenommenen besseren Verträglichkeit des Kultivars Nft51 im Rahmen einer oralen Vakzinierung, wurde die Akkumulation der Membranankerversionen TCR und TCRhinge des Modellantigens CTB-HVR1 ausschließlich im Kultivar Nft51 analysiert.

Tabelle III.2 verleiht einen Überblick über die nachgewiesenen Akkumulationsmengen in den entsprechenden analysierten Pflanzenlinien und Generationen. Mit Ausnahme der stabilen Expression von CTB-MPT64 in Pflanzen der T₀-Generation, die sich in nur einem Fall als erfolgreich erwiesen hatte (s.u.), ist jeweils der Mittelwert der Akkumulation der drei bestexprimiersten Pflanzen angegeben. Die Ergebnisse bestätigten die Tendenz der im transienten Ansatz beobachteten Akkumulation der Modellantigene (Abb. III.3). Die Fusion von CTB-HVR1 an die TCRCys-Membranankervariante führte in den Generationen T₀ bis T₂ zu einer durchschnittlich 25-fachen Steigerung der Akkumulation. Lösliches CTB-MPT64 akkumulierte im Vergleich zum transienten Ansatz mit durchschnittlich 4 µg/g deutlich

geringer. Die Fusion an TCRCys führte zu einer durchschnittlich 22-fachen Steigerung der Akkumulation. Generell konnten im Fall der membranständigen Antigene durch die stabile Integration der Transgene in das Tabakgenom höhere Proteinausbeuten erzielt werden, besonders signifikant im Fall der TCRCys-Antigenversionen. Im Vergleich zum transienten Ansatz konnten für CTB-HVR1-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys in den Generationen T_0 bis T_2 durchschnittlich 8,8- bzw. 5,4-fache Steigerungen der Akkumulation verzeichnet werden. In beiden Fällen waren die nachgewiesenen rekombinanten Proteinmengen in den analysierten Generationen T_0 und T_1 im Kultivar Nft51 im Vergleich zum Kultivar Petit Havana SR1 durchschnittlich 1,5-fach geringer. Die Regeneration von Pflanzen der Linien CTB-HVR1 und CTB-MPT64 erwies sich im Unterschied zu denen, die die membranständigen Antigene exprimierten, als problematisch. Aufgrund der geringen Regenerationseffizienz konnten nur jeweils 3-8 Antibiotika-resistente Pflanzen der T_0 -Generation selektioniert werden, die, mit Ausnahme der getesteten Pflanzen der Linie CTB-MPT64 des Kultivars Petit Havana SR1, geringe bzw. keine im GM1-ELISA detektierbaren Antigenakkumulationen aufwiesen. Dieser negative Einfluss der apoplasmatischen Antigene auf die Regeneration konnte bei der Anzucht der Tochtergenerationen nicht beobachtet werden.

Mitunter konnten signifikante Schwankungen der rekombinanten Proteinmenge in den analysierten Parenterallinien beobachtet werden. Diese Schwankungen kamen vermutlich einerseits durch eine jahreszeitlich bedingte Schwankung der Produktivität bedingt durch Unterschiede in der Aktivität des verwendeten 35S Promotors [272], und andererseits möglicherweise durch die Integration mehrerer Kopien der T-DNA in verschiedene Genloci des Pflanzengenoms zustande. Im Rahmen dieser Arbeit wurde überwiegend auf eine Bestimmung des Segregationsverhältnisses sowie auf eine genotypische Charakterisierung zur Bestimmung der Genkopienzahl verzichtet.

Tabelle III.2: Akkumulation der löslichen und membranständigen Antigene in transgenen Tabakpflanzen.

Die Akkumulation in $\mu\text{g/g}$ (Frischgewicht) transgenem Blattmaterial CTB-HVR1-TCRCys-, CTB-HVR1-TCRhinge-, CTB-HVR1-TCR-, CTB-HVR1-, CTB-MPT64-TCRCys- und CTB-MPT64-produzierender Linien der Kultivare Petit Havana SR1 und Nft51 wurde nach Isolierung von Gesamtprotein (II.3.1) mittels GM1-ELISA (II.3.6) bestimmt. Die immobilisierten pentameren Fusionsproteine wurden mittels $Z\alpha$ -CTB bzw. $M\alpha$ -CTB und $K\alpha Z^{\text{HRPO}}$ bzw. $Z\alpha M^{\text{HRPO}}$ und anschließender Substratreaktion detektiert, als Negativkontrolle diente Pflanzenextrakt des nicht transformierten Wildtyps. Die Quantifizierung erfolgte nach photometrischer Absorptionsmessung des Farbumschlags anhand bekannter Standardkonzentrationen (bakteriell exprimiertes CTB, 100 ng/ml). Die dargestellten Werte errechneten sich aus dem Mittelwert (\pm SEM) von jeweils drei der bestexprimierten Pflanzen pro Pflanzenlinie und Generation.

Antigen	Akkumulation in <i>N. tabacum</i> cv. Petit Havana SR1 [$\mu\text{g/g}$]				Akkumulation in <i>N. tabacum</i> cv. Nft51 [$\mu\text{g/g}$]	
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₀	T ₁
CTB-HVR1-TCRCys	132,1	245,0 (\pm 37,9)	77,9 (\pm 1,6)	192,4 (\pm 9,2)	116,5 (\pm 11,8)	141,1 (\pm 28,1)
CTB-HVR1-TCRhinge	-	-	-	-	15,8 (\pm 4,5)	9,5 (\pm 2,0)
CTB-HVR1-TCR	-	-	-	-	0,8 (\pm 0,23)	29,5 (\pm 3,9)
CTB-HVR1	0 (-)	16 (\pm 1,94)	2,2 (\pm 0,38)	-	0 (-)	-
CTB-MPT64-TCRCys	51,9 (\pm 3,7)	106,6 (\pm 3,9)	105,5 (\pm 40,0)	-	35,0 (\pm 7,0)	69,2 (\pm 12,7)
CTB-MPT64	2,6 (-)	5,4 (\pm 1,5)	-	-	0	-

III.1.2.3 Analyse der Integrität

Aussagen zur Integrität der Fusionsproteine waren zu Beginn der Expressionsanalysen nicht möglich, da sich der zweifelsfreie Nachweis der CTB-Fusionsproteine im Western Blot zunächst als problematisch darstellte (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Aufkochen der Proben in denaturierendem Probenpuffer sollte zu einer Dissoziation der pentameren CTB-Fusionsproteine im Rohextrakt führen. Unter den gewählten Bedingungen der Denaturierung und Auftrennung der CTB-Fusionsproteine im SDS-PAA-Gel (II.3.4) kam es jedoch vermutlich durch eine Abnahme der reduzierenden Bedingungen zu einer Reassemblierung der monomeren CTB-Untereinheiten, die eine präzise Größenbestimmung im Western Blot verhinderten. Der Einsatz eines kommerziellen linearen Gradientengels, die Verwendung eines Reduktionsmittels, das im SDS-Gel mitläuft, die Erhöhung der Denaturierungsdauer

sowie der Zusatz eines Antioxidans in den Laufpuffer (II.3.4) ermöglichten letztendlich nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran den Nachweis der monomeren membranständigen CTB-Fusionsproteine im Western Blot (Abb. III.4.A). Der eindeutige Nachweis der Integrität der monomeren sekretierten Antigenversionen nach Auftrennung im linearen Gradientengel zu einem späteren Zeitpunkt erwies sich als nicht erfolgreich, da ausschließlich potentiell oligomere Formen des abgespalteten CTB-Fusionspartners nachgewiesen werden konnten (s.u.; Ergebnisse nicht gezeigt).

Abbildung III.4 zeigt den qualitativen Nachweis von CTB-HVR1-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys mit Hilfe eines Cholera Toxin-spezifischen Antiserums im Western Blot unter denaturierenden Bedingungen im Pflanzenrohextrakt (Abb. III.4.A) und den von CTB-HVR1-TCRCys nach Kationenaustauschchromatographie und anschließender Ultrafiltration (II.3.7) (Abb. III.4.C). Bakteriell exprimiertes CTB, das als Positivkontrolle verwendet wurde, lag nach elektrophoretischer Auftrennung in zwei detektierbaren Formen vor. Während unter denaturierenden Bedingungen vorwiegend die monomere Form mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 11,6 kDa und der weitaus geringere Teil in der dimeren Form mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 23,2 kDa vorlag (Abb. III.4.A, III.10 und III.12), konnte unter nicht-reduzierenden Bedingungen überwiegend das Pentamer nachgewiesen werden (Abb. III.4.B). Im Vergleich zu den pflanzenproduzierten CTB-Fusionsproteinen wies das bakteriell exprimierte Referenzprotein im SDS-PAA-Gel offensichtlich eine geringfügig reduzierte Laufgeschwindigkeit auf, die in ein größeres apparentes Molekulargewicht resultierte.

Im Pflanzenextrakt der Linie CTB-HVR1-TCRCys konnte eine prominente Proteinbande unterhalb der 25 kDa Markierung des Größenmarkers nachgewiesen werden (Abb. III.4.A, 2) die der monomeren Form des reifen CTB-HVR1-TCRCys mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 20 kDa entspricht (Tab. III.1). Diese trat in den unterschiedlichen Analysen im Western Blot stets als Doppelbande mit einer schwächeren, geringfügig höhermolekularen Proteinbande auf (Abb. III.4.A und III.4.C), vermutlich aufgrund einer partiellen Glykosylierung des Fusionsproteins. Die Proteinsequenz von CTB-HVR1-TCRCys beinhaltet eine potentielle N-Glycosylierungsstelle an aa-Position 4 des reifen CTB (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>), die in eine Erhöhung des Molekulargewichts um 3 kDa resultierte [273]. Unterhalb des kalkulierten Molekulargewichts der dimeren Konfiguration von 40 kDa konnte eine Proteinbande schwächerer Signalintensität detektiert werden. Vermutlich lag pflanzenproduziertes CTB-HVR1-TCRCys in Analogie zum bakteriellen CTB nach der Denaturierung ebenfalls in der dimeren Konformation vor

(Abb.III.4.A und III.4.C). In Übereinstimmung mit publizierten Daten wies die oligomere Form offensichtlich eine höhere Mobilität im SDS-Gel auf [274]. Unterhalb des intakten CTB-HVR1-TCRCys konnten zwei weitere Proteinbanden am Detektionslimit des Western Blots detektiert werden. Die höhermolekulare Proteinbande auf der Höhe der 15 kDa Markierung resultierte vermutlich aus einer Größenreduzierung durch Abspaltung des TCRCys-Membranankers (5,7 kDa, Tab. III.1) vom intakten Fusionsprotein. Die Proteinbande oberhalb der 10 kDa Markierung konnte aufgrund ihrer Größe (11,6 kDa, Tab. III.1) und aufgrund ihrer Reaktivität mit dem CT-spezifischen Antiserum als abgespaltenes CTB identifiziert werden.

Im Fall CTB-MPT64-TCRCys-exprimierender Tabakpflanzen konnten eine prominente Proteinbande auf der Höhe von 40 kDa, bei der es sich um monomeres CTB-MPT64-TCRCys mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 39,7 kDa (Tab. III.1) handeln könnte, sowie zwei mögliche Abbauprodukte unterhalb der potentiellen Proteinbande des intakten Fusionsproteins detektiert werden (Abb. III.4.A, 1). Ein zweifelsfreier Nachweis der Integrität von CTB-MPT64-TCRCys war jedoch nicht möglich. Der Nachweis der sekretierten Antigenversionen im Western Blot zu einem späteren Zeitpunkt wies darauf hin, dass die höhermolekulare Proteinbande ebenfalls auf oligomere Formen von abgespaltenen CTB zurückzuführen sein könnte, da sowohl in Blattextrakten CTB-HVR1- als auch CTB-MPT64-

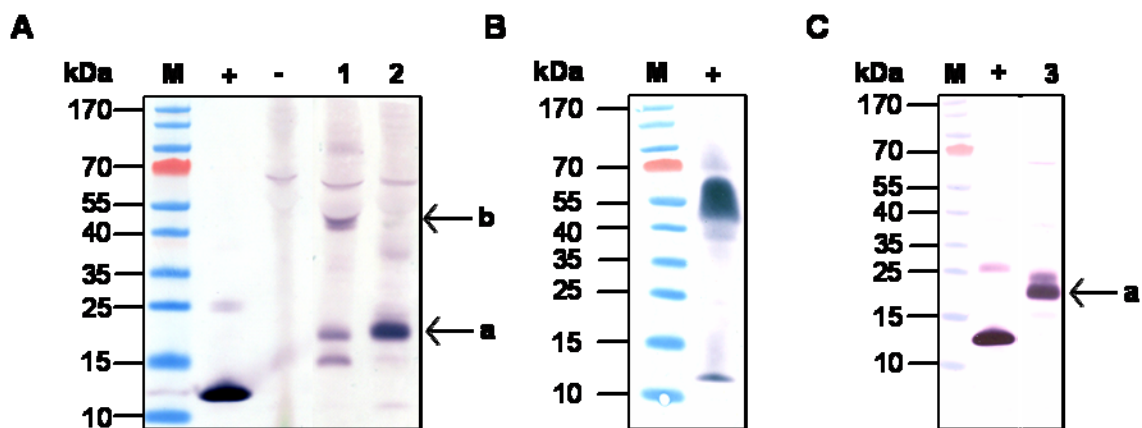


Abbildung III.4: Western Blot Analyse zum qualitativen Nachweis der Akkumulation von CTB-HVR1-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys in transgenen Tabakpflanzen.

Der immunologische Nachweis der CTB-Fusionsproteine in 10 μ l Tabakrohextrakt (A, B) bzw. in der Elutionsfraktion nach Kationenaustauschchromatographie und Ultrafiltration (Nanosep[®]-Säule, molecular weight cutoff 10 kDa, Pall Life Sciences) (II.3.7) (C) erfolgte nach elektrophoretischer Proteinauftrennung unter denaturierenden (A, C) und nicht-denaturierenden Bedingungen (B) im linearen Gradientengel (NuPAGE[®] Novex 4-12% Bis Tris Gel, Invitrogen) (II.3.4) und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mittels $\text{K}\alpha$ -CT und $\text{Z}\alpha\text{K}^{\text{AP}}$ (Fc) und nachfolgender Visualisierung in einer AP-Substratreaktion (II.3.5). M: „Page Ruler[™] Prestained Protein Ladder“ (Fermentas), +: authentisches CTB, 330 ng (A, B) bzw. 550 ng (C); -: Wildtyp; 1: CTB-MPT64-TCRCys; 2: CTB-HVR1-TCRCys; 3: CTB-HVR1-TCRCys nach Kationenaustauschchromatographie und Ultrafiltration. Die Pfeile (a und b) markieren die Positionen der intakten monomeren Fusionsproteine. a: CTB-HVR1-TCRCys; b: CTB-MPT64-TCRCys.

exprimierender Tabakpflanzen im Bereich von 40 kDa eine prominente Proteinbande detektiert wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Die stabile nukleäre Integration der CTB-MPT64-TCRCys-Expressionskassette konnte jedoch unter der Verwendung spezifischer Primer in einer PCR-Reaktion nach Isolierung der genomischen DNA aus Tabakblättern der entsprechenden transgenen Linie bestätigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die starken nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen den monomeren CTB-Untereinheiten erlauben die Analyse intakter CTB-Pentamere unter nicht denaturierenden Bedingungen im Western Blot [275]. Der Nachweis der pentameren Antigene erwies sich jedoch im Rahmen dieser Arbeit als schwierig, da einerseits das hohe Molekulargewicht von pentameren CTB-MPT64-TCRCys (Tab. III.1), andererseits die mangelnde Qualität der Western Blots unter nicht-denaturierenden Bedingungen einen eindeutigen Nachweis der pentameren Formen verhinderten (Ergebnisse nicht gezeigt).

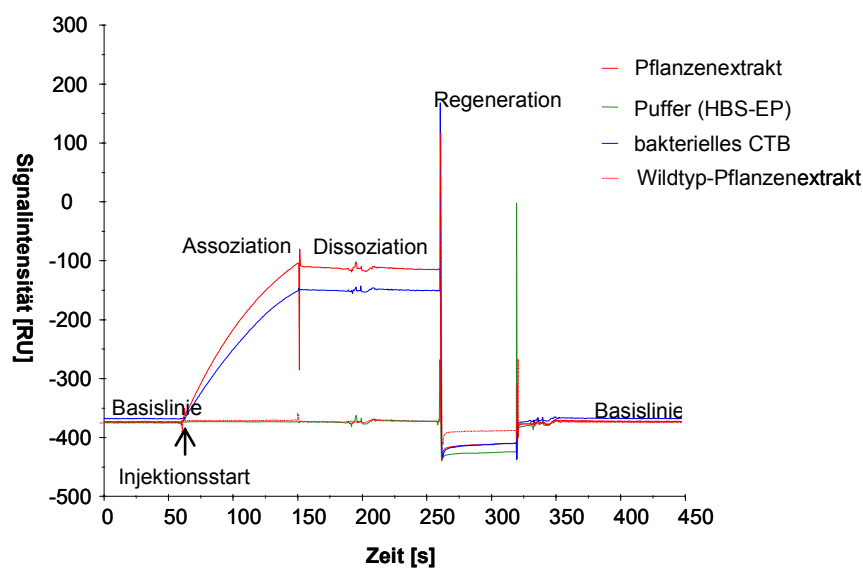
III.1.2.4 Quantitative und funktionale Analyse der CTB-Fusionsproteine mittels Oberflächen Plasmon Resonanz (SPR, Surface Plasmon Resonance)

Nach Abschluss der eigentlichen Laborarbeiten ergab sich die Möglichkeit, die Kinetiken der GM1-Bindung der pflanzenexprimierten CTB-Fusionsproteine (CTB-HVR1, CTB-HVR1-TCRCys, CTB-MPT64, CTB-MPT64-TCRCys) mit Hilfe von SPR zu analysieren (II.3.8).

Abbildung III.5 zeigt am Beispiel von Blattextrakt einer CTB-HVR1-TCRCys-produzierenden Tabakpflanze des Kultivars Petit Havana SR1 das SPR-Sensogramm der Assoziation von CTB-HVR1-TCRCys an einen GM1-Chip (II.3.8), gefolgt von der Regenerierung der Chipoberfläche (II.3.8). Der Anstieg des SPR-Signals nach der Injektion von Pflanzenextrakt reflektiert die spezifische Bindung des pentameren Fusionsproteins an den GM1-beladenen Chip. Zudem zeigte der Vergleich der Bindungskinetiken des eingesetzten Standards (bakterielles CTB) und des pflanzenproduzierten CTB-HVR1-TCRCys ein identisches Bindungsverhalten. Der Fusionspartner übte demnach offenbar keinen Einfluss auf die Pentamerisierung des CTB-Fusionspartners und die Interaktion mit der GM1-Oberfläche aus und bestätigte damit die bereits im GM1-ELISA (III.1.2.1 und III.1.2.2) gezeigte funktionale *in planta* Expression von CTB im Kontext von Fusionsproteinen. Die Indexsprünge am Anfang und Ende der Messung waren auf Unterschiede zwischen dem Lauf- und Probenpuffer zurückzuführen.

Der Einsatz eines CTB-Standards bekannter Konzentration offerierte ebenfalls die Möglichkeit einer quantitativen Akkumulationsanalyse mit Hilfe von Endpunktbestimmungen. Die Quantifizierungen mittels SPR ergaben im Vergleich zu den

initialen Messungen im GM1-ELISA (III.1.2.2) eine durchschnittlich 10-fach geringere Akkumulation von CTB-HVR1, CTB-HVR1-TCRCys, CTB-MPT64 und CTB-MPT64-TCRCys in Tabak. Die parallele Analyse der Proben sowie des eingesetzten CTB-Standard in SPR- und ELISA-Messungen ergab, dass die Konzentrationsunterschiede nicht auf Mängel im Nachweisverfahren zurückzuführen waren, sondern vermutlich auf einem Aktivitätsverlust des im ELISA eingesetzten CTB-Standards beruhten (Ergebnisse nicht gezeigt). Da für die Messungen zwar ein identischer CTB-Standard eingesetzt wurde, die eingesetzten Standard-Verdünnungen sich aber durch die Anfangskonzentration und verwendeten Puffersysteme sowie die Lagerungsbedingungen unterschieden, konnte ein signifikanter Einfluss der genannten Parameter auf die Stabilität und/oder Funktionalität von CTB nicht ausgeschlossen werden. Das im GM1-ELISA eingesetzte bakteriell exprimierte CTB wurde 110-fach mit sterilem 1 x PBS verdünnt (Endkonzentration 10 µg/ml), aliquotiert, bis zur Austestung der Proben bei -20°C gelagert und in einer Ausgangsverdünnung von 100 ng/ml im ELISA eingesetzt (II.3.6). Im Unterschied dazu wurde für die Quantifizierungen mittels SPR bei 4°C gelagertes CTB (Endkonzentration 500 ng/ml) in HBS-EP (10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,05 mM EDTA, 0,05 % (v/v) Tween)



(Endkonzentration 500 ng/ml) eingesetzt.

Abbildung III.5: SPR-Sensogramm der Assoziation von CTB-HVR1-TCRCys an die GM1-beschichtete Sensoroberfläche.

Im Vorfeld der SPR-Interaktionsanalyse erfolgte die kovalente Bindung von lysoGM1-Gangliosid an die Dextran-beschichtete Oberfläche des CM5-Chips (II.3.8). Zur Bestimmung der Bindungskinetiken wurde 1:5 verdünnter Pflanzenextrakt in die Messzelle injiziert. Die Bindungskinetik wurde als zeitabhängige Änderung der Signalintensität (Masseveränderung), die als Response Unit (RU) angegeben wurde, dargestellt. Als Positivkontrolle diente bakterielles CTB (500 ng/ml), als Negativkontrolle wurden HBS-EP und Wildtyp-Pflanzenextrakt eingesetzt. Nach Erreichen der Sättigung wurde die GM1-beschichtete Sensoroberfläche mit 30 mM HCl regeneriert (II.3.8).

III.1.3 Funktionalitätsanalyse der TCRCys-Membranankervariante

Proteine, deren Zielort außerhalb des Cytoplasmas liegt, werden in der Regel als höhermolekulare Vorläuferproteine mit einem N-terminalen Signalpeptid synthetisiert, das die Proteine in den Exportweg einschleust. Im Fall von TypI-Transmembranproteinen, die mit einer C-terminalen Transmembrandomäne ausgestattet sind, determiniert die „positive inside rule“, die die zwangsläufige cytoplasmatische Orientierung der positiv geladenen Aminosäuren der hydrophilen aminoterminalen n-Region des Signalpeptids während der Membraneinlagerung am ER beschreibt [276] und die Abspaltung der Signalsequenz vom Vorläuferprotein während der Insertion durch den Signalpeptidase-Komplex [277] ihre $N_{out}C_{in}$ -Orientierung. Diese bleibt auch während der zahlreichen Membranabschnürungs- und Fusionsvorgänge während des anterograden Transportes zur Plasmamembran in den zwischengelagerten Zellorganellen, Transportvesikeln und der Plasmamembran erhalten [278]. Dementsprechend sollte die *in planta* Produktion von CTB-HVR1-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys, die nachweislich ein funktionelles N-terminales Signalpeptid besitzen, aufgrund der C-terminal gelegenen TCR β -Kette zu einer Präsentation der Antigene auf der extrazellulären Seite der Pflanzenzellmembran führen.

Im Rahmen der nachfolgenden Funktionalitäts- und Lokalisationsanalysen sollte die Eignung der TCRCys-Membranankervariante zur Integration der Modellantigene CTB-HVR1 und CTB-MPT64 in die Pflanzenzellmembran evaluiert werden.

III.1.3.1 Subzelluläre Lokalisierung der membranständigen Antigene mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie

Um den Einfluss einer Autofluoreszenz durch das in Tabakblättern enthaltene Chlorophyll möglichst gering zu halten, wurden für die Analysen zur Lokalisation der Antigene ausschließlich stabil transformierte BY-2 Zellen verwendet, die im Vergleich zu stabil transformierten Tabakpflanzen eine signifikant geringere Akkumulation der getesteten Antigene aufwiesen (Ergebnisse nicht gezeigt). Die in Abbildung III. 6 dargestellten immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen ausschließlich die Fluoreszenzverteilung in BY-2 Suspensionszellen der Linien CTB-HVR1-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys. Unter den gewählten Versuchsbedingungen war aufgrund der geringen Akkumulation ein eindeutiger Nachweis der TCR- und TCRhinge-membranverankerten Antigene nicht möglich (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Unterschied zur Transgen-Expression in Tabakpflanzen akkumulierte CTB-HVR1-TCRCys gemäß GM1-ELISA Analysen (II.3.6) mit maximal 10,5 $\mu\text{g/g}$ geringer als CTB-MPT64-TCRCys mit 22,4 $\mu\text{g/g}$ Zellmaterial (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Immunfluoreszenz-Markierung der Antigene erforderte die Präparation von Protoplasten (II.6.1.2), da die Pflanzenzellwand die Passage von Nachweisantikörpern mit einem Molekulargewicht von 150 kDa verhindert (III.1.3.2.5). Nach Fixierung der Protoplasten, Detektion der Antigene mittels eines CTB-spezifischen Antiserums, Immunfärbung mit einem Alexa Fluor™ 488-konjugierten Sekundärantikörpern und Anregung der gebundenen Fluorophor-konjugierten Antikörper mit Laserlicht wurde die subzelluläre Lokalisation des Fluoreszenzsignals in mittleren Zellebenen mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie analysiert (II.6.2-II.6.4). Analog dazu wurden Protoplasten von nicht transformierten BY-2 Zellen unter identischen Einstellungen analysiert.

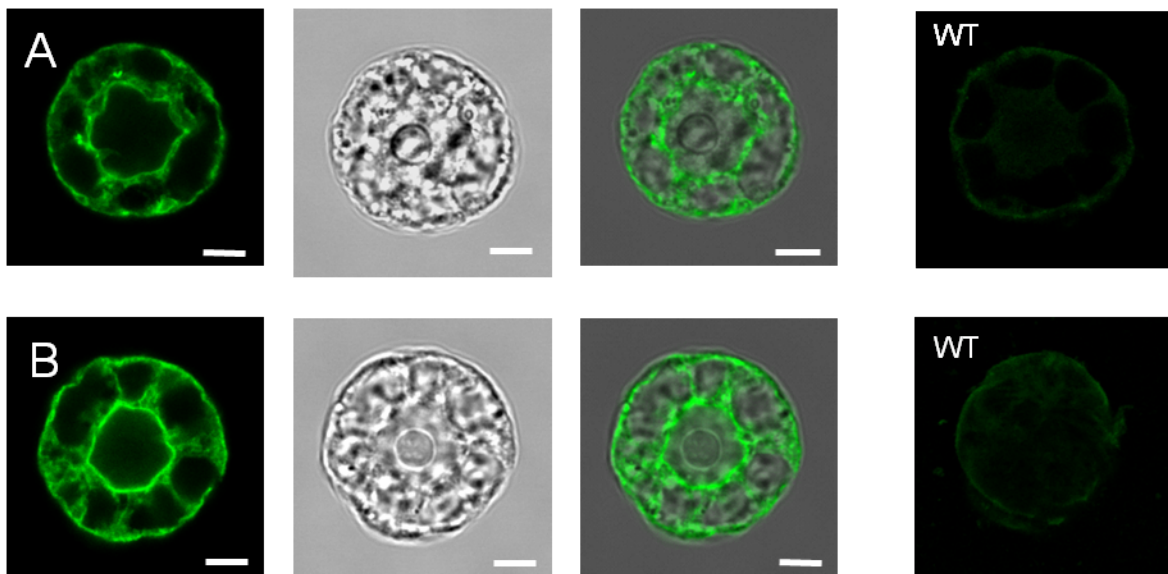


Abbildung III.6: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation der TCRCys-basierten membranständigen Antigene.

Aus drei Tage alten CTB-MPT64-TCRCys- (A) und CTB-HVR1-TCRCys-exprimierenden BY-2 Suspensionszellen (B) wurden Protoplasten präpariert (II.6.1.1). Die subzelluläre Lokalisation des Fluoreszenzsignals wurde nach Immunfluoreszenzmarkierung der CTB-Fusionsproteine mittels $Z\alpha$ -CTB und $H\alpha Z^{Alexa488}$ (II.1.2) mit Hilfe von konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie analysiert (II.6.4). Die linke Reihe zeigt Aufnahmen mittlerer konfokaler Z-Sektionen ($\sim 1\mu\text{m}$ Schichtdicke) von Protoplastenpräparationen nach Anregung mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm und Detektion bei 500-530 nm. Die mittlere Reihe zeigt die korrespondierenden Transmissionsbilder und die rechte Reihe die Overlays beider Aufnahmen. Als Negativkontrolle dienten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen parallel analysierter Protoplasten von Wildtyp-BY-2 Zellen bei identischen Einstellungen (ganz rechts). WT= Wildtyp. Skalierungsbalken: 5 μm .

Das signifikante Fluoreszenzsignal der transgenen Linien CTB-MPT64-TCRCys (Abb. III.6.A) und CTB-HVR1-TCRCys (Abb. III.6.B) bestätigte eindeutig die im GM1-ELISA beobachtete Akkumulation der CTB-Fusionsproteine im Pflanzensystem (III.1.2). Neben einer Anfärbung des Randbereiches der Zellen konnte eine signifikante Markierung im Bereich der cytoplasmatischen Stränge und des Nukleus beobachtet werden (Abb. III.6.A und III.6.B, links). Eine exakte Lokalisierung der membranständigen Antigene war jedoch nicht

möglich. Die Identifizierung subzellulärer Strukturen in ausdifferenzierten Pflanzenzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie wird dadurch erschwert, dass die zentrale Vakuole den größten Teil der Zelle ausmacht und das Cytoplasma auf den nur wenige μm umfassenden Cytoplasmasaum sowie die Cytoplasmastränge und den Bereich um den Zellkern beschränkt ist. Da Proteine mit einem funktionalen Signalpeptid in Eukaryoten cotranslational exprimiert werden, resultierte das Signal im Bereich der Cytoplasmastränge vermutlich aus einer Akkumulation der Antigene in ER- und Golgi-Membranen während ihrer Passage durch die Proteinexportmaschinerie. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Protoplasten gegenüber osmotischen und mechanischen Einflüssen, die eine optimale Protoplastenpräparation erschwerten, der unzureichenden Auflösung des konfokalen Mikroskops und membranverankerten Antigenen, war jedoch zu diesem Zeitpunkt eine eindeutige Aussage über die Lokalisation von CTB-HVR1-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys bzw. die Funktionalität der TCRCys-Membranankervariante nicht möglich.

III.1.3.2 Subzelluläre Lokalisierung der membranständigen Antigene durch das Grün-fluoreszierende Protein (GFP)

Das 27 kDa große grün fluoreszierende Protein (GFP) stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequoria victoria*. Seine einzigartige Struktur, die zu einer intensiven Autofluoreszenz bei einer Emissionswellenlänge von ca. 508 nm führt und durch Anregung mit blauem Licht deutlich verstärkt werden kann, macht GFP zu einem geeigneten Reportermolekül der *in vivo* Analyse von fusionierten heterologen Proteinen [279]. In der vorliegenden Arbeit wurde die GFP-Variante CytoGemTM Emerald GFP verwendet, die sich durch mehrere Punktmutationen (S65T/S72A/N149K/M153T/I167T/H231L) die zu verbesserten biochemischen und spektralen Eigenschaften führen von dem zuerst beschriebenen und im Allgemeinen als Wildtyp-GFP bezeichneten GFP unterscheidet [242] (Aurora Bioscience, San Diego). Diese optimierte Variante wurde im Rahmen der Dissertation von N. Ruthardt (2005) N-terminal um einen flexiblen Linker von 20 Aminosäuren (PAAAAAASAAAAAWVPVAT) erweitert, der die individuelle Faltung von Fusionspartnern ermöglichen sollte [280].

Die TCRCys-basierten Antigene sollten C-terminal um das 20aaLinker-GFP-Konstrukt erweitert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie innerhalb der Zelle sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung war so im Gegensatz zu immunchemischen Methoden, die die zeitaufwendige Präparierung von Protoplasten und ihre immunologische Anfärbung erfordern (III.1.3.2), ein *in vivo* Nachweis der Antigene auf zellulärer Ebene ohne vorherige Fixierung möglich. Die Generierung eines apoplasmatisch exprimierten 20aaLinker-GFP-Konstruktes sowie eines über TCRCys membranverankerten

20aaLinker-GFP-Konstruktes sollten durch direkten Vergleich der subzellulären Signalverteilung von sekretiertem und potentiell membranverankerten GFP weiteren Aufschluss über die Funktionalität der TCRCys Membranankervariante geben.

III.1.3.2.1 Klonierung von CTB-HVR1-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys mit C-terminaler GFP-Markierung

Die rekombinanten Plasmide pCTB-HVR1-TCRCys und pCTB-MPT64-TCRCys (III.1.1.1, Abb. III.1) wurden als Basisvektoren für die Klonierung des 20aaLinker-GFP-Genkonstruktes an das 3'-Ende der entsprechenden Expressionskassette genutzt. Zu diesem Zweck wurde in einer PCR-Reaktion unter dem Einsatz des Vektors pTRA-Ve2-GFP [241] als Template mit Hilfe der Primer GFPforw bzw. GFPback eine *NcoI*-Schnittstelle am 5'-Ende der 20aaLinkers-Sequenz, bzw. eine *XbaI*-Schnittstelle am 3'-Terminus des 20aaLinker-GFP-Genkonstruktes integriert. Das Einführen der Schnittstellen erlaubte nach Restriktion des PCR-Produktes eine in frame Klonierung in die *NcoI*-Erkennungssequenz an Bp-Position 2 der kodierenden Sequenz der cytoplasmatischen Domäne des Membranankers bzw. der *XbaI*-Schnittstelle der restringierten Vektoren pCTB-HVR1-TCRCys bzw. pCTB-MPT64-TCRCys (Abb. III.7). Die kodierende Sequenz des Transmembranankers der resultierenden GFP-Fusionsproteine unterschied sich demnach von der authentischen TCRCys-Sequenz der Ausgangskonstrukte durch eine um sechs Aminosäuren verkürzte cytoplasmatische Domäne. Um das korrekte Leseraster zu erhalten, wurden in die Sequenz von GFPforw zwei Guaninreste eingefügt, die in einen zusätzlichen Glycinrest am Aminoterminus des 20aaLinker-GFP-Konstruktes resultierten. Nach Transformation der Ligationsansätze in *E. coli* (II.4.3), und Identifizierung positiver Klone mittels Kolonie-PCR (II.2.2.3) sowie Kontrollrestriktion (II.2.3) wurden die resultierende Plasmide, die mit pCTB-HVR1-TCRCys-GFP und pCTB-MPT64-TCRCys-GFP bezeichneten wurden, in *A. tumefaciens* transformiert (II.4.6) und positive Transformanten für die transiente und stabile Transformation von *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 und BY-2 Suspensionszellen verwendet.

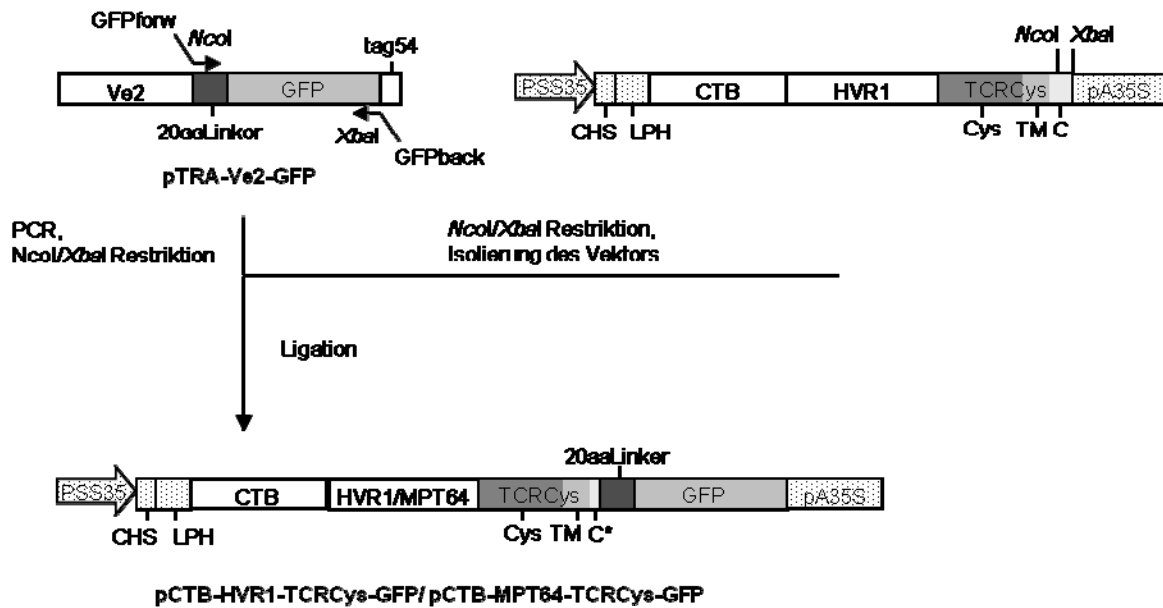


Abbildung III.7: Schematische Darstellung der Klonierung von pCTB-HVR1-TCRCys-GFP und pCTB-MPT64-TCRCys-GFP.

PSS35: 35S Promotor des CaMV mit duplizierter Enhancer-Region, CHS: 5'-UTR der Chalcon-Synthase; LPH: Signalpeptid der schweren Kette des monoklonalen Antikörpers mAk24; CTB: Cholera Toxin B-Untereinheit; TCRCys: verkürzte β -Kette des humanen T-Zell-Rezeptors; Cys: Gelenkregion der TCR β -Kette inklusive Cystein; TM: Transmembrandomäne der TCR β -Kette; C: cytoplasmatische Domäne der TCR β -Kette; C*: verkürzte cytoplasmatische Domäne der TCR β -Kette; GFP: CytoGemTM Emerald GFP; pA35S: CaMV 3'-UTR.

III.1.3.2.2 Klonierung des membranständigen GFP-Konstruktes

Die Fusion des 20aaLinker-GFP-Konstruktes an den N-Terminus der TCRCys-Membranankervariante erforderte eine Klonierung des GFP und TCRCys DNA-Fragmentes in den *NcoI-XbaI*-verdauten Vektor pTRAKc-dhfr-AHnew, da die *NcoI*-Schnittstelle am 5'-Ende der LPH-Sequenz in den Konstrukten pCTB-HVR1-TCRCys und pCTB-MPT64-TCRCys mit Hilfe von SOE-PCR entfernt wurde (III.1.1.1). Nach Isolierung des TCRCys Genkonstruktes aus pCTB-HVR1-TCRCys mittels *SalI-XbaI*-Restriktion, Amplifikation des 20aaLinker-GFP Genkonstruktes durch Verwendung des Primerpaares GFPforw und GFPonlyback mit integrierter *NcoI*- bzw. *SalI*-Schnittstelle für die Klonierung in pTRAKc, Fusion an das TCRCys Genkonstrukt und Restriktionsverdau des resultierenden PCR-Produktes erfolgte die Klonierung beider Genkonstrukte in die kompatible *NcoI-XbaI*-Schnittstelle des restringierten Vektors pTRAKc-dhfr-AHnew (Abb. III.8). Nach Transformation in *E. coli* (II.4.3) und *A. tumefaciens* (II.4.6), sowie Analyse der rekombinanten Genkonstrukte (II.2.2.3, II.2.3), erfolgte mittels Agrobakterium-vermittelter Transformation die stabile nukleäre Integration der GFP-TCRCys-Expressionskassette in das Genom von *N. tabacum* cv. Petit Havana bzw. BY-2 Zellen (II.5.2).

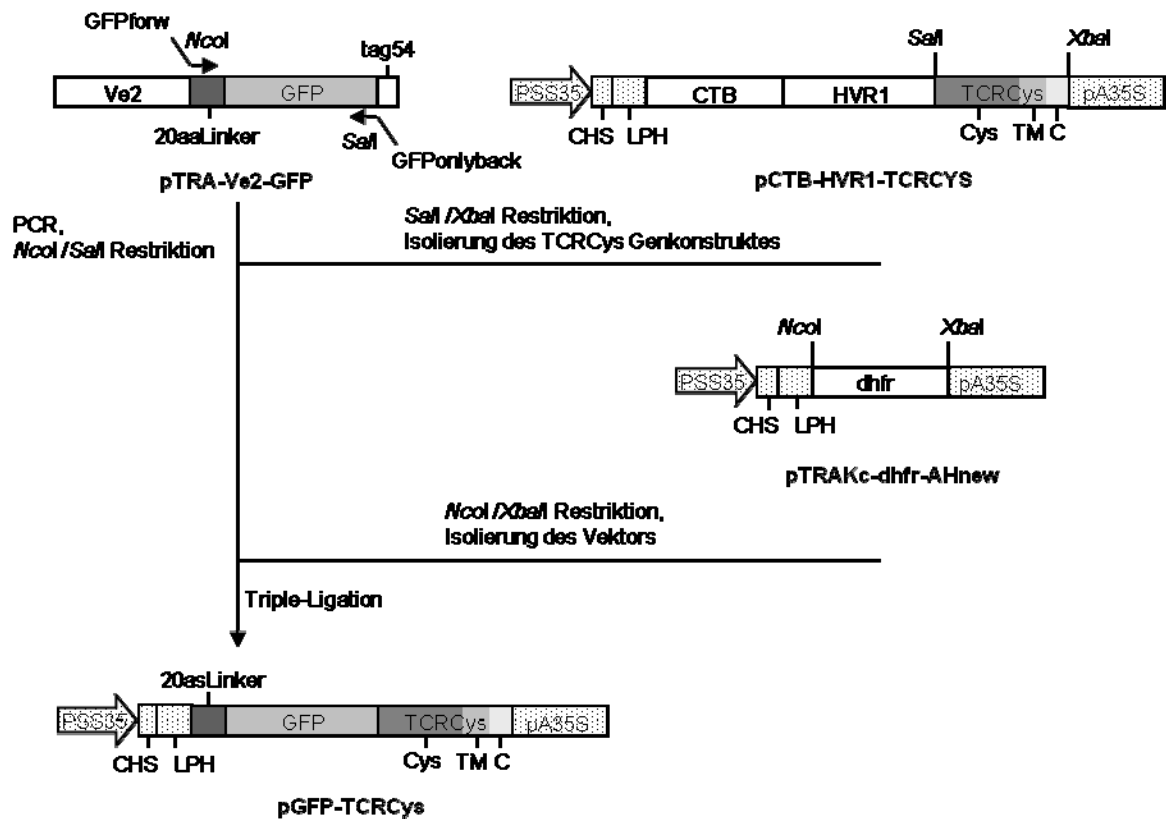


Abbildung III.8: Schematische Darstellung der Klonierung von pGFP-TCRCys.

PSS35: 35S Promotor des CaMV mit duplizierter Enhancer-Region, CHS: 5'-UTR der Chalcon-Synthase; LPH: Signalpeptid der schweren Kette des monoklonalen Antikörpers mAk24; GFP: CytoGem™ Emerald GFP; TCRCys: verkürzte β -Kette des humanen T-Zell-Rezeptors; Cys: Gelenkregion der TCR β -Kette inklusive Cystein; TM: Transmembrandomäne der TCR β -Kette; C: cytoplasmatische Domäne der TCR β -Kette; pA35S: CaMV 3'-UTR.

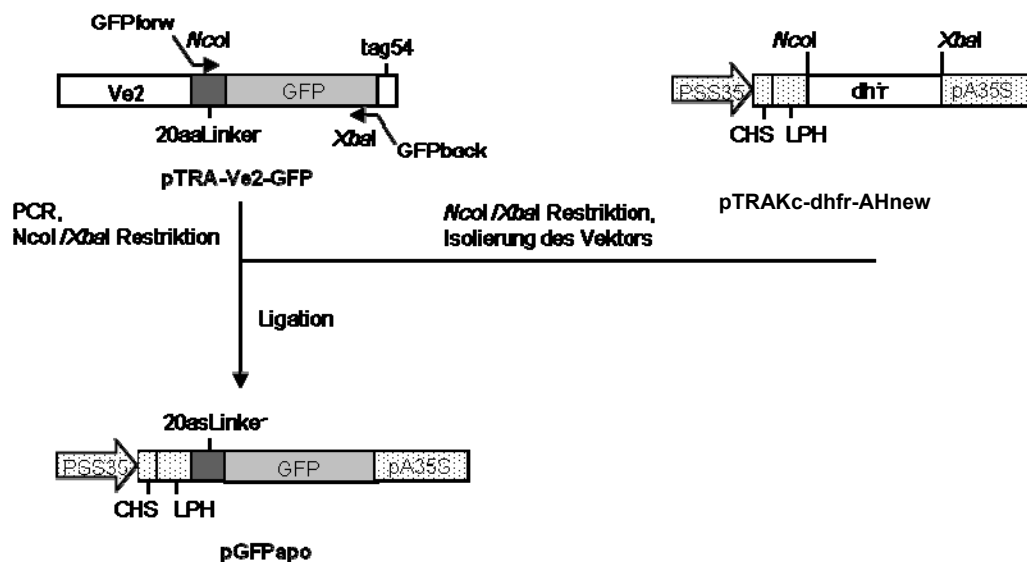


Abbildung III.9: Schematische Darstellung der Klonierung von pGFPapo.

PSS35: 35S Promotor des CaMV mit duplizierter Enhancer-Region, CHS: 5'-UTR der Chalcon-Synthase; LPH: Signalpeptid der schweren Kette des monoklonalen Antikörpers mAk24; GFP: CytoGem™ Emerald GFP; pA35S: CaMV 3'-UTR.

III.1.3.2.3 Klonierung des apoplasmatisch exprimierten GFP-Konstruktes

Das 5'- bzw. 3'-Ende des 20aaLinker-GFP Genkonstruktes wurde durch die Einführung einer *NcoI*- bzw. *XbaI*-Schnittstelle mit Hilfe der Primer GFPforw und GFPonly back modifiziert, um eine Klonierung in die *NcoI*-*XbaI*-Restriktionsschnittstelle des Pflanzenexpressionsvektor pTRAKc-dhfr-AHnew zu ermöglichen (Abb. III.9). Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* (II.4.3) transformiert und die Integration des Genkonstruktes mit Hilfe von Kolonie-PCR (II.2.2.3) und Kontrollrestriktionen (II.2.3) bestätigt. Das resultierende Plasmid pGFPapo wurde in *A. tumefaciens* transformiert (II.4.6) und einer der identifizierten rekombinanten Klone für die stabile nukleäre Transformation von BY-2 Suspensionszellen verwendet (II.5.2.4).

Tabelle III.3: Übersicht über die Größen und Molekularmassen der reifen GFP-Fusionsproteine und der individuellen Fusionspartner.

Die Angabe der Größen erfolgte in Aminosäuren [aa], die der Molekulargewichte in Kilodalton [kDa]. Die Molekulargewichte wurden mit Hilfe des ExPasy ProtParam Server's (<http://www.expasy.ch/tools/protparam>) ermittelt und beziehen sich im Fall der CTB-Fusionsproteine auf die monomere Form.

Konstrukt	Größe [aa]	Molekulargewicht [kDa]	Molekulargewicht Fusionspartner [kDa]
CTB-HVR1-TCRCys-GFP	437	47,9	
CTB-MPT64-TCRCys-GFP	615	67,6	
GFP-TCRCys	312	34,3	
GFPapo	259	28,6	

III.1.3.2.4 Analyse der Akkumulation und Integrität der GFP-Konstrukte in *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 und *N. tabacum* cv. BY-2 Suspensionszellen

Die Analyse der Zell- bzw. Blattextrakte transgener BY-2 Suspensionszellen und Tabakpflanzen im Western Blot sollte Aufschluss über die Akkumulation und Integrität der exprimierten GFP-Fusionsproteine geben (II.3.5). Jeweils zwei Extrakte, die in den im Vorfeld durchgeführten Dot Blot Analysen (II.3.5) die stärksten Signale zeigten (Ergebnisse nicht gezeigt), wurden pro Konstrukt analysiert. Abbildung III.10 zeigt den immunologischen Nachweis der Akkumulation von GFPapo sowie der drei membranständigen GFP-

Fusionsproteine in transgenen BY-2 Zellen (Abb. III.10.A) und Tabakpflanzen (Abb. III.10.B) im Western Blot mittels eines GFP-spezifischen monoklonalen Antikörpers (II.1.2). Als Positivkontrolle diente bakteriell exprimiertes GFP (M. Sack, Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen).

Mit Ausnahme von CTB-HVR1-TCRCys-GFP konnte, sowohl für apoplasmatisch exprimiertes GFP als auch für die membranständigen GFP-Konstrukte, eine signifikante Akkumulation in BY-2 Zellen nachgewiesen werden. Im Fall von GFP_{papo} konnte oberhalb der 25 kDa Markierung des Proteinlängenstandards eine prominente Doppelbande detektiert werden (Abb. III.10.A, 1). Die höhermolekulare Proteinbande korrelierte mit dem kalkulierten Molekulargewicht von 28,6 kDa für GFP inklusive des N-terminalen 20aaLinkers (Tab. III.3). Laut Größendetermination anhand des Proteinlängenstandards könnte es sich bei der kleineren Proteinbande um GFP handeln, von dem der 20aaLinker mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 1,7 kDa (Tab. III.3) abgespalten wurde. Weitere niedermolekulare Banden schwächerer Signalintensität wurden aufgrund ihrer Reaktivität mit dem verwendeten GFP-spezifischen Antikörper als Degradationsprodukte identifiziert, nachdem eine Kreuzreaktivität der Detektionantikörper mit Wildtyp-Komponenten ausgeschlossen wurde (Abb. III.12).

Das apparente Molekulargewicht des C-terminal um die Sequenz des TCRCys-Membranankers erweiterten GFP-TCRCys im Western Blot entsprach in etwa dem kalkulierten Molekulargewicht von 34,3 kDa (Tab. III.3) (Abb. III.10.A, 2). Niedermolekulare Proteinbanden intensiver Signalstärke wurden durch Vergleich mit GFP_{papo} (Abb. III.10.A, 1) als abgespaltenes GFP identifiziert. Offensichtlich wurden *in vivo* oder nach Extraktion des löslichen Gesamtproteins signifikante Mengen (~60%) des GFP-Reporters vom intakten TCRCys-Membrananker abgespalten. Sowohl das intakte Fusionsprotein als auch abgespaltenes GFP trennten sich im SDS-PAA-Gel als charakteristische Doppelbande auf. Da eine potentielle N-Glykosylierung durch die Analyse der Proteinsequenz im NetNGlyc Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) ausgeschlossen wurde, resultierte die niedermolekulare Bande vermutlich aus einer potentiellen Abspaltung des 20aaLinkers. Im Vergleich zu GFP_{papo} wurde eine deutlich geringere Akkumulation der membranständigen GFP-Variante beobachtet. Im Unterschied zu den analysierten Modellantigenen CTB-HVR1 und CTB-MPT64 führte die Fusion von GFP an den TCRCys-Membrananker offensichtlich zu einer Abnahme der Akkumulation (III.1.2). Im Fall von CTB-HVR1-TCRCys-GFP konnte nur für eine der beiden analysierten BY-2 Suspensionskulturen eine Proteinbande geringer Signalintensität nachgewiesen werden, deren

Größe mit dem kalkulierten Molekulargewicht des intakten monomeren Fusionsproteins von 47,9 kDa (Tab. III.3) korrelierte (III.10.A, 3). In beiden Fällen konnte im Bereich von etwa 25 kDa überwiegend abgespaltenenes GFP nachgewiesen werden.

Die Analyse von Zellextrakten transgener CTB-MPT64-TCRCys-GFP exprimierender BY-2 Zellen im Immunoblot führte zur Detektion einer prominenten immunoreaktiven Doppelbande oberhalb der 62 kDa Bande des verwendeten Proteinlängenstandards (Abb. III.10.A, 4). Diese entsprach der Größe des intakten monomeren Fusionsproteins mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 67,6 kDa (Tab. III.3). Da die GFP-Markierung C-terminal erfolgte, basierte das Auftreten der Doppelbande im Unterschied zu GFP_{Papo} und GFP-TCRCys nicht auf einer Abspaltung des 20aaLinkers, sondern vermutlich auf einer partiellen Glykosylierung. Analysen der Proteinsequenz von CTB-MPT64-TCRCys-GFP mit Hilfe des NetNGlyc 1.0 Server's (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) prognostizierten eine N-glykosylierte Seitenkette innerhalb der CTB-Proteinsequenz sowie zwei weitere im Bereich von MPT64. Der immunologische Nachweis der Doppelbande mit Hilfe eines CTB-spezifischen Antiserums in parallel durchgeführten Western Blot Analysen bestätigte ebenfalls die Integrität von CTB-MPT64-TCRCys-GFP (Ergebnisse nicht gezeigt). Analog zu den übrigen membranständigen GFP-Konstrukten wurden erhebliche Mengen GFP abgespalten, welches sich als die typische Doppelbande im Bereich von 25 kDa auftrennte.

Der hohe Anteil an abgespaltenen GFP lässt eine hohe Sensitivität der Fusionsproteine gegen Proteasen im Bereich der Zellmembran von BY-2 Zellen und/oder nach der Proteinextraktion und Probenvorverarbeitung vermuten. Da abgespaltenes GFP im Fall aller GFP-Konstrukte, d.h. unabhängig von einer N- oder C-terminalen GFP-Markierung, detektiert werden konnte ist von drei intrinsischen Proteaseschnittstellen auszugehen, jeweils eine am N- und C-Terminus des 20aaLinker-GFP-Konstruktes sowie einer dritten im Fusionsbereich von Linker und GFP. Abbildung III.10.B zeigt die Akkumulation von GFP-TCRCys, CTB-HVR1-TCRCys-GFP und CTB-MPT64-TCRCys-GFP in transgenen Tabakpflanzen. Für alle drei Membranproteine konnten in Western Blot Analysen von Blattextrakten Proteinbanden detektiert werden, die den entsprechenden kalkulierten Molekulargewichten der intakten GFP-Fusionsproteine entsprachen (Tab. III.3). Im Fall von GFP-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys-GFP konnte neben dem intakten Membranprotein ebenfalls abgespaltenes GFP detektiert werden, das im Unterschied zu den analysierten BY-2 Zellextrakten in nur einer detektierbaren Form auftrat (Abb. III.10.B, 2 und 4). Im Gesamtzellextrakt GFP-TCRCys-exprimierender Tabakpflanzen konnte zusätzlich eine definierte Proteinbande auf der Höhe des 62 kDa Proteins des Proteinlängenstandards nachgewiesen werden (Abb. III.10.B, 2). Der Vergleich mit bakteriell

exprimierten CTB zeigte, dass es sich dabei vermutlich um eine Aggregation von abgespaltenem GFP handelte (Abb. III.10.A und III.10.B, +).

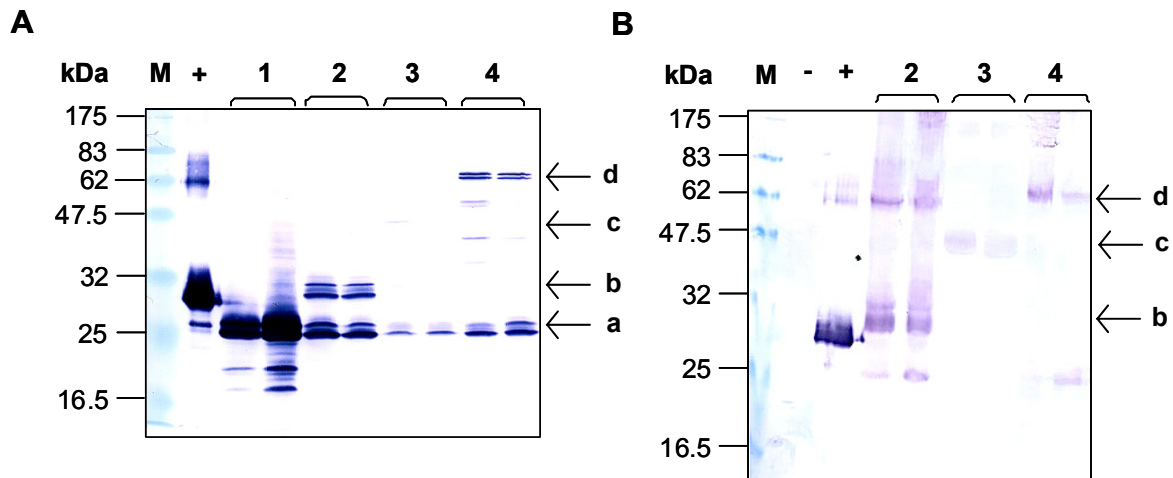


Abbildung III.10: Western Blot Analyse zum qualitativen Nachweis der Akkumulation von GFPapo, GFP-TCRCys, CTB-HVR1-TCRCys-GFP und CTB-MPT64-TCRCys-GFP in transgenen BY-2 Suspensionszellen und T₀-Generationen transgener Tabakpflanzen.

Der immunologische Nachweis der GFP-Konstrukte in jeweils 10 µl Gesamtzellextrakt vier Tage alter BY-2 Suspensionszellkulturen (A) und transgener Tabakpflanzen (B) erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der Gesamtproteine in einem SDS-PAA-Gel (II.3.4) und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (II.3.5) mittels M α -GFP und Z α M^{AP} und nachfolgender Visualisierung in einer AP-Substratreaktion (II.3.5). M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB); +: bakteriell exprimiertes GFP; -: Wildtyp; 1: GFPapo; 2: GFP-TCRCys; 3: CTB-HVR1-TCRCys-GFP; 4: CTB-MPT64-TCRCys-GFP. Die Pfeile (a-d) markieren die Position der intakten Fusionsproteine.

Quantifizierungen der Akkumulation pentamerer GFP-Fusionsproteine in Tabakpflanzen und BY-2 Suspensionszellen mit Hilfe von GM1-ELISA Analysen (II.3.6) ergaben für die jeweils bestexprimierenste Pflanze bzw. Zelllinie im Fall von CTB-MPT64-TCRCys-GFP 55,2 µg/g Blattmaterial bzw. 2,6 µg/g BY-2 Zellen. CTB-HVR1-TCRCys-GFP akkumulierte mit 5,6 µg/g Blattmaterial, bzw. 0,03 µg/g BY-2-Zellen wesentlich geringer (Ergebnisse nicht gezeigt). Auf die Etablierung einer ELISA Variante zur Quantifizierung von GFPapo und GFP-TCRCys wurde aus zeitlichen Gründen verzichtet. Jeweils die bestexprimierendsten Zelllinien wurden für die nachfolgenden Lokalisationsanalysen eingesetzt.

III.1.3.2.5 Analyse der Kulturüberstände transgener BY-2 Suspensionszellkulturen

Da die pflanzliche Zellwand Proteine bis zu einem Molekulargewicht von bis zu 75 kDa passieren lässt [39, 281, 282] erlaubt die Analyse der Kulturüberstände eine erste Aussage über die Funktionalität des TCRCys Membranankers. Um eine Sekretion der membranverankerten GFP-Konstrukte in den Kulturüberstand auszuschließen, wurden die Zellextrakte und Kulturüberstände vier, fünf und zehn Tage alter transgener BY-2 Zellsuspensionen im Immunoblot analysiert (Abb. III.11.A-C).

Die Analyse der Zellextrakte erlaubte -mit Ausnahme von CTB-HVR1-TCRCys-GFP- den immunologischen Nachweis der GFP-Fusionsproteine mit Hilfe eines monoklonalen GFP-spezifischen Antikörpers (Abb. III.11.A-C, 1-4). Analog zu den initialen Akkumulationsanalysen im Western Blot (III.1.3.2.4), wurden die charakteristischen Doppelbanden der intakten Fusionsproteine und des abgespaltenen GFP detektiert.

Im Kulturüberstand von GFP_{Papo}-exprimierenden BY-2 Zellen konnte nach vier Tagen eine im Vergleich zum Zellextrakt schwache Proteinbande detektiert werden (Abb. III.11.A, 1 und I). Offensichtlich wurde GFP relativ langsam in den Kulturüberstand sekretiert. Erst nach fünf Tagen konnte eine signifikante Signalverstärkung der entsprechenden Proteinbande beobachtet werden (Abb. III.11.B, I). Auffällig war, dass im Vergleich zum intakten 20aaLinker-GFP signifikant höhere Mengen des vermeintlichen GFP-Abbauproduktes freigesetzt wurden.

Im Fall der membranständigen GFP-Konstrukte konnten selbst nach fünf- und 10-tägiger Inkubation keine immunoreaktiven Banden, die dem Molekulargewicht der intakten Fusionsproteine entsprachen, in den Kulturüberständen nachgewiesen werden, obwohl die parallel analysierten Zellextrakte, mit Ausnahme von CTB-HVR1-TCRCys-GFP, einen eindeutigen Nachweis der Akkumulation der membranständigen GFP-Konstrukte innerhalb der Zelle erlaubten. Mit Ausnahme von GFP-TCRCys konnte nach zehn Tagen jedoch ausschließlich abgespaltenes GFP detektiert werden, dessen Nachweis im Kulturüberstand jedoch zunächst nicht möglich war (Abb. III.11.A-III.11.C). Zunächst wurde vermutet, dass die geringe Sensitivität des Western Blots, die vergleichsweise geringe Akkumulation der membranständigen GFP-Konstrukte im Vergleich zu GFP_{Papo} und die starke Verdünnung im Kulturmedium sowie die unterschiedlichen Zelldichten und dadurch abweichenden Volumina der Kulturüberstände den Nachweis potentiell sekretierter membranständigen Fusionsproteine erschweren könnten. Dies wurde aber zumindest im Fall von GFP-TCRCys durch den Nachweis des GFP-Abbauproduktes und die Abwesenheit des intakten membranständigen Fusionsproteins im Kulturüberstand von BY-2 Zellen nach 4-tägiger Inkubation ausgeschlossen (Abb. III.11.D, II). An dieser Stelle sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Freisetzung von CTB-HVR1-TCRCys-GFP und CTB-MPT64-TCRCys-GFP in den Apoplast und eine Rückhaltung ihrer oligomeren Konformationen durch die Pflanzenzellwand nicht ausgeschlossen werden konnte, da die kalkulierten Molekulargewichte der oligomeren bzw. pentameren Formen 75 kDa deutlich überschritten (Tab. III.3). In den Kulturüberständen von GFP-TCRCys-exprimierenden BY-2 Zellen wurde das intakte Fusionsprotein nicht nachgewiesen, obwohl es mit einem Molekulargewicht von 34,3 kDa die pflanzliche

Zellwand passieren könnte. Seine Freisetzung in den Kulturüberstand wurde demnach offensichtlich durch Membranintegration verhindert.

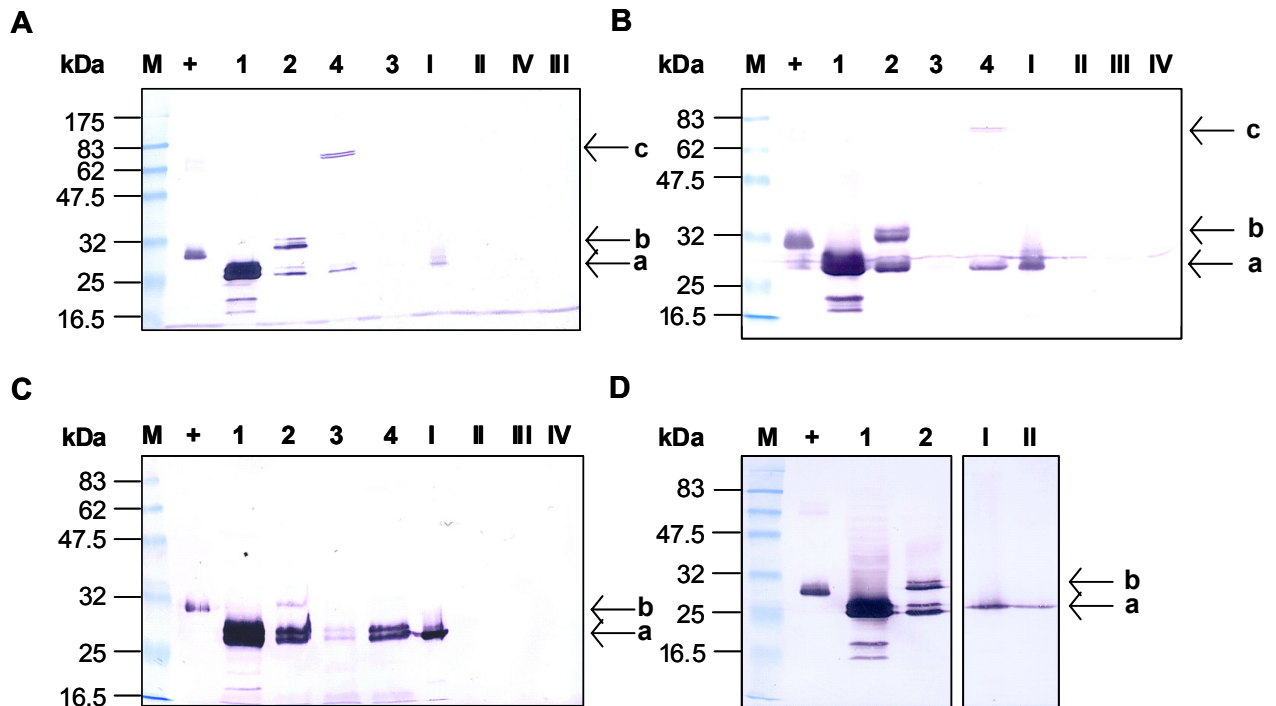


Abbildung III.11: Western Blot Analyse zum Nachweis der Akkumulation von GFPapo, GFP-TCRCys, CTB-HVR1-TCRCys-GFP und CTB-MPT64-TCRCys-GFP in Zellextrakten und Kulturüberständen transgener BY-2 Suspensionszellen.

Immunologischer Nachweis der GFP-Konstrukte in jeweils 10 μ l Zellextrakt (1-4) und Kulturüberstand (I-IV) einer 4 (A und D), 5 (B) und 10 (C) Tage alten BY-2 Suspensionszellkultur. Die Detektion mittels $M\alpha$ -GFP und $Z\alpha M^{AP}$ und anschließende Visualisierung in einer AP-Substratreaktion erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine in einem SDS-PAA-Gel (II.3.4) und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (II.3.5). M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB); +: bakteriell exprimiertes GFP; 1, I: GFPapo; 2, II: GFP-TCRCys; 3, III: CTB-HVR1-TCRCys-GFP; 4, IV: CTB-MPT64-TCRCys-GFP. Die Pfeile (a-c) markieren die Position der intakten Fusionsproteine. a: GFPapo; b: GFP-TCRCys; c: CTB-MPT64-TCRCys.

Die Analyse der Kulturüberstände transgener GFPapo-, GFP-TCRCys-, CTB-HVR1-TCRCys-GFP- und CTB-MPT64-TCRCys-GFP-exprimierender BY-2 Zellen lieferte einen ersten Hinweis auf eine Verankerung der Antigene in der Pflanzenzellmembran durch Fusion an die Membranankervariante TCRCys.

III.1.3.2.6 Isolierung von Membranen transgener BY-2 Zelllinien

Die Isolierung von Membranen transgener GFPapo-, GFP-TCRCys- sowie CTB-MPT64-TCRCys-GFP-exprimierender BY-2 Zelllinien sollte weiteren Aufschluss über die Funktionalität der TCRCys-Membranankervariante geben (II.6.5). Die Analyse CTB-HVR1-TCRCys-GFP-exprimierender BY-2 Zellen war aufgrund der geringen Akkumulationsraten nicht möglich. Zellextrakte mit löslichem Gesamtprotein (1), Kulturüberstände mit sekretiertem Protein (2), die Überstände nach der Homogenisierung mit intakten

Zellorganellen (Homogenat) (3), die Überstände nach Ultrazentrifugation mit löslichem Gesamtprotein (4), die Überstände nach dem ersten Waschschrift (5) sowie die Membranfraktionen (6) und die Membranfraktion nach Solubilisierung der Membranproteine (7) von drei Tage alten BY-2 Suspensionskulturen, wurden hinsichtlich der Akkumulation der GFP-Fusionsproteine mit Hilfe eines monoklonalen GFP-spezifischen Antikörpers im Western Blot analysiert (II.3.5).

Im Homogenat GFP_{Papo} exprimierender BY-2 Zellen (Abb. III.12.A, 3) sowie im Rohextrakt (Abb. III.12.A, 1) konnte die charakteristische Doppelbande detektiert werden, die dem intakten 20aaLinker-GFP (28,6 kDa, Tab. III.3) und dem vermeintlichen GFP-Abbauprodukt entsprach (Abb. III.12.A, 3). Nach Ultrazentrifugation konnte der überwiegende Anteil des löslichen Gesamt-GFP aus dem Homogenat im Überstand detektiert werden (Abb. III.12.A, 4). In der Membranfraktion (Abb. III.12.A, 6) sowie nach Solubilisierung der Membranproteine (Abb. III.12.A, 7) konnten dennoch signifikante Mengen an GFP nachgewiesen werden, obwohl zu berücksichtigen ist, dass im Vergleich zum Homogenat und Überstand nach Ultrazentrifugation eine 20-fache Aufkonzentrierung stattgefunden hatte (II.6.5). Interessanterweise handelte es sich dabei ausschließlich um das intakte 20aaLinker-GFP Konstrukt. Obwohl innerhalb der Proteinsequenz von GFP_{Papo} keine potentielle Transmembrandomäne identifiziert wurde (TMHMM Server v 2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) [269], könnte GFP_{Papo} aufgrund einer erhöhten Affinität zu lipophilen Membranstrukturen durch den relativ hohen Anteil an hydrophoben Resten in der Linkerregion (III.1.3.2) in der Membranfraktion zurückgehalten werden. Diese Hypothese könnte ebenfalls eine Erklärung für die Abwesenheit von GFP im Kulturüberstand der 3 Tage alten BY-2 Zellkultur liefern (Abb. III.12.A, 2). Dementsprechend konnte bereits durch die Analyse der Kulturüberstände transgener BY-2 Suspensionskulturen gezeigt werden, dass überwiegend GFP ohne 20aaLinker in den Überstand freigesetzt wird (Abb. III.11.A-C, I).

Im Rohextrakt GFP-TCRCys-exprimierender BY-2 Zellen konnten analog zu den unter III.1.3.2.4 und III.1.3.2.5 aufgeführten Western Blot Analysen erhebliche Mengen an abgespaltenem 20aaLinker-GFP detektiert werden, von dem zu etwa 50% die Linkersequenz abgespalten wurde (Abb. III.12.B, 1). Im Vergleich dazu lag GFP-TCRCys im Homogenat wesentlich stabiler vor (Abb. III.12.B, 3). Im Überstand nach Ultrazentrifugation konnte im Vergleich zum eingesetzten Homogenat noch ein erheblicher Anteil der Ausgangsmenge an GFP-TCRCys ohne N-terminalen 20aaLinker detektiert werden, der nicht ausschließlich aus toten Zellen stammen konnte (Abb. III.12.B, 4). Offensichtlich lag ein erheblicher Anteil von

GFP-TCRCys bereits im Homogenat als lösliches Protein vor oder es hatte während der Ultrazentrifugation eine Freisetzung des membranständigen Proteins in den Überstand stattgefunden. Mechanische Kräfte wie sie beim Homogenisieren der Zellen entstanden sind und/oder Scherkräfte während der Ultrazentrifugation reichten offensichtlich aus, um eine nicht unerhebliche Menge des Membranproteins aus der Membran freizusetzen. Im Unterschied zu GFPapo konnten in der Membranfraktion GFP-TCRCys-exprimierender BY-2 Zellen Proteinbanden nachgewiesen werden, die übereinstimmend mit dem eingesetzten Homogenat sowohl dem intaktem Membranprotein und, zu größeren Anteilen, GFP-TCRCys ohne 20aaLinker entsprachen (Abb. III.12.B, 6). Dies konnte als weiterer Hinweis der Funktionalität des TCRCys-Membranankers interpretiert werden. Der Vergleich der Bandenstärken im Homogenat und der Membranfraktion unter Berücksichtigung der 20-fachen Aufkonzentrierung des Ausgangsmaterials sowie der Nachweis von GFP-TCRCys im Überstand nach Ultrazentrifugation und in der Waschfraktion (Abb. III.12.B, 4 und 5) deuteten jedoch auf eine relativ instabile Membranverankerung von GFP-TCRCys hin.

Im Unterschied zu GFP-TCRCys konnten sowohl im Homogenat als auch im Überstand nach Ultrazentrifugation CTB-MPT64-TCRCys-GFP-exprimierender Zellen Proteinbanden schwacher Signalintensität nachgewiesen werden, die ausschließlich abgespaltenem GFP entsprachen (Abb. III.12.C, 3 und 4), obwohl ein eindeutiger Nachweis des membranständigen Proteins (67,6 kDa, Tab. III.3) im Zellextrakt möglich war (Abb. III.12.C, 1). Erst nach 20-facher Aufkonzentrierung im Verlauf der Membranisolierung konnte intaktes CTB-MPT64-TCRCys-GFP in der Membranfraktion detektiert werden, während das Signal für das abgespaltene GFP, vermutlich inklusive 20aaLinker, annähernd gleich blieb (Abb. III.12.C, 6).

Interessanterweise wurde nach Solubilisierung der Membranproteine eine signifikante Zunahme der Signalstärke der CTB-MPT64-TCRCys-GFP-entsprechenden Proteinbande beobachtet (Abb. III.12.C, 7). Offensichtlich wurde im Unterschied zum löslichen GFPapo (Abb. III.12.A, 6 und 7) durch Solubilisierung der Nachweis der cytosolisch lokalisierten GFP-Markierung des membranständigen CTB-MPT64-TCRCys-GFP erleichtert. Die signifikante Anreicherung des membranständigen Fusionsproteins, jedoch nicht des löslichen Abbauproduktes, war ein Hinweis auf die Membranintegration von CTB-MPT64-TCRCys-GFP. Analog zu GFP-TCRCys könnte es jedoch während der Homogenisierung von Zellmaterial und/oder während der Zentrifugationsschritte zu einer Freisetzung von Mengen an intakten Membranproteinen gekommen sein, die unterhalb der Detektionsgrenze des Western Blots lagen. Es konnte ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass die

Membranverankerung von CTB-MPT64-TCRCys-GFP durch die C-terminale Fusion von GFP zusätzlich stabilisiert wurde.

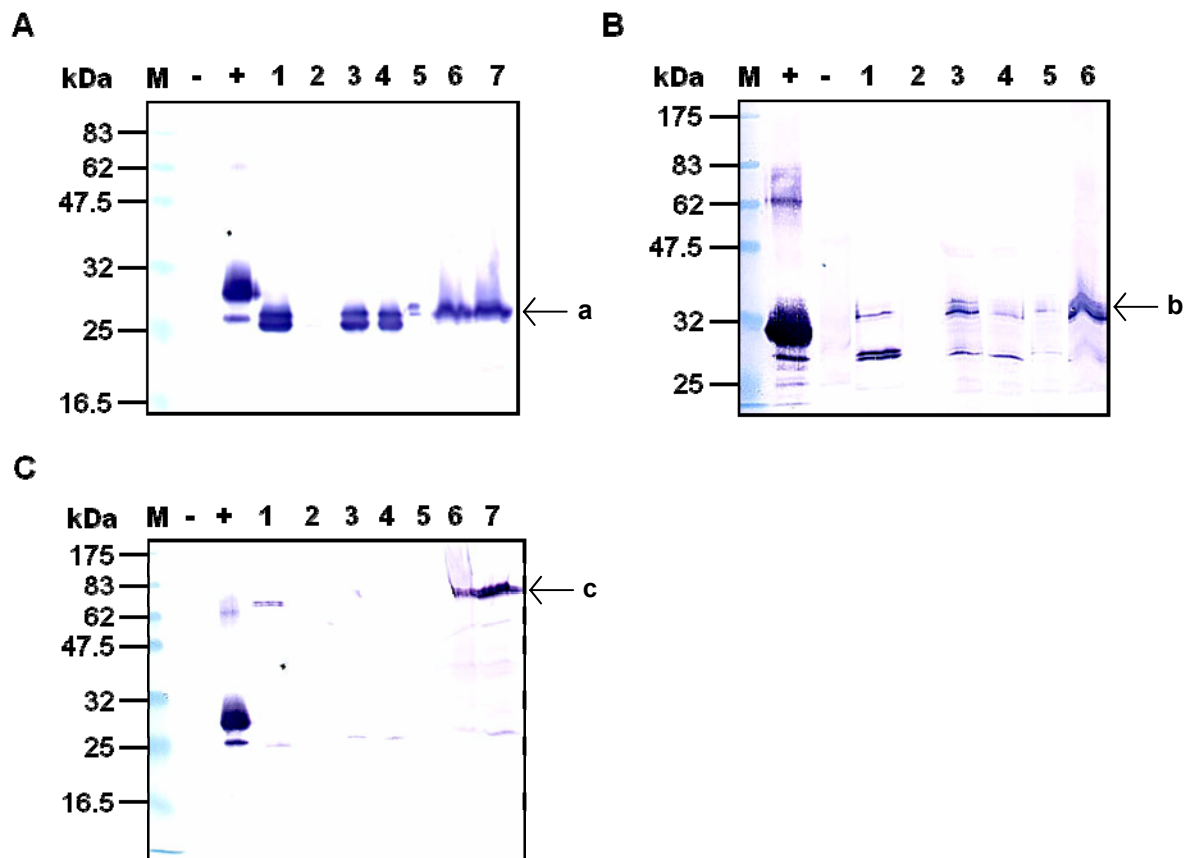


Abbildung III.12: Western Blot Analyse nach Isolierung von Membranen GFPapo, GFP-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys-GFP exprimierender BY-2 Zellen.

Immunologischer Nachweis von GFPapo (A), GFP-TCRCys (B) und CTB-MPT64-TCRCys-GFP (C) in jeweils 10 μ l Probenvolumen nach Extraktion der Gesamtproteine (1), im Kulturüberstand (2), im Homogenat nach Sedimentation der Zelltrümmer (3), im Überstand nach Ultrazentrifugation (UZ) (4), in der Waschfraktion nach UZ (5) und im Membranpellet nach UZ (6) sowie in 5 μ l Probenvolumen nach Solubilisierung der Membranproteine (7). Die Detektion mittels $M\alpha$ -GFP und $Z\alpha M^{AP}$ und die anschließende Visualisierung in einer AP-Substratreaktion erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine in einem SDS-PAA-Gel (II.3.4) und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (II.3.5). M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB), -: Wildtyp BY-2 Extrakt, +: bakteriell exprimiertes GFP. Die Pfeile (a-c) markieren die Position der intakten Fusionsproteine. a: GFPapo; b: GFP-TCRCys; c: CTB-MPT64-TCRCys.

III.1.3.2.7 Analyse der Membranverankerung mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe ihrer C-terminalen Fluoreszenzmarkierung durch GFP sollten die Modellantigene CTB-HVR1-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys in Hinsicht auf ihre Akkumulation in lebenden BY-2 Suspensionszellen und Pflanzenzellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden. Der direkte Vergleich der subzellulären Lokalisation von apoplasmatisch und membranständig exprimiertem GFP sollte weiteren Aufschluss über die Funktionalität des TCRCys-Membranankers liefern. Die Lokalisierung der grünen Fluoreszenzemission des GFP wurde in ca. 1 μ m dicken konfokalen Z-Sektionen von Zellen transgener BY-2

Suspensionskulturen, transient transformierter Blattstückchen, bzw. Protoplasten transgener BY-2 Zellen und Tabakblätter mit Hilfe von konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie detektiert und fotografisch dokumentiert (II.6.4).

Die subzelluläre Lokalisierung von GFP in Blattepidermiszellen (Abb. III.13.A-D, linke Reihe), erfolgte nach transienter Transformation von jeweils zwei Tabakblättern des Kultivars Petit Havana SR1 mit pGFPapo, pGFP-TCRCys, pCTB-HVR1-TCRCys-GFP und pCTB-MPT64-TCRCys-GFP und 3-tägiger Inkubation in der Phytokammer (II.5.2.2). Die Quantifizierung der CTB-Fusionen mittels GM1-ELISA (II.3.6) im Vorfeld der Fluoreszenzanalyse, ergaben im Vergleich zur stabilen Transformation (III. 1.3.2.4) mit maximal 2,5 µg CTB-MPT64-TCRCys-GFP bzw. 0,9 µg CTB-HVR1-TCRCys-GFP pro Gramm Blattmaterial relativ geringe Akkumulationsmengen (Daten nicht gezeigt). Jeweils das höchstexprimierende Blatt wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Im Fall von GFPapo und GFP-TCRCys wurde auf eine quantitative Analyse verzichtet. Als Negativkontrolle bzw. zum Ausschluss von Autofluoreszenz, die unter Stressbedingungen, die während der Infiltration und Inkubation der Blätter herrschen, verstärkt auftritt dienten infiltrierte Tabakblätter, die ein Kontrollkonstrukt exprimierten (Ergebnisse nicht gezeigt).

Apoplasmatisch exprimiertes GFP akkumulierte im transienten Ansatz vorwiegend im Randbereich transient transformierter Blattepidermiszellen bzw. im Fall lebender BY-2 Zellen und fixierter BY-2 Protoplasten ebenfalls im Bereich der Nukleusmembran und in den die Vakuole durchziehenden Cytoplasmasträngen (Abb. III.13.A, links, Mitte und rechts). Aufnahmen im Bereich von Zellwand und Interzellularraum zwischen zwei angrenzenden Zellen ergaben, dass das Fluoreszenzsignal vorwiegend aus einer Sekretion signifikanter Mengen GFPapo in den Apoplast resultierte (Pfeil in Abb. III.13.A, links und III.14.A). Ein erheblicher Anteil des Signal ging jedoch auch vom Cytoplasmasaum aus, der sich in Form von schmalen fluoreszierenden Streifen im Grenzbereich von benachbarten Blattepidermiszellen darstellte (Pfeilspitze in Abb. III.14.A). Die Analyse weiterer Zellebenen zeigte, dass die beobachtete Fluoreszenz in diesem Bereich in netzartigen (Pfeilspitze in Abb. III.15.A) sowie nicht identifizierten feinpartikulären Strukturen (Ergebnisse nicht gezeigt) akkumulierte, die in *in vivo* Studien teilweise eine Mobilität in Richtung der Zellmembran aufwiesen. Das unerwartet starke Signal im Bereich des Cytoplasmasaums ging demnach nicht vom Cytosol aus. Offensichtlich befanden sich signifikante Anteile des GFPapo zum Zeitpunkt der Analyse noch in Kompartimenten des sekretorischen Apparates, d.h im ER-Netzwerk und vermutlich in Golgi-Stapeln. Diese Beobachtung korrelierte mit der relativ langsamen Sekretion von GFPapo in den Kulturüberstand (III.1.3.2.5). Interessanterweise

konnte ausschliesslich in Blattepidermiszellen ein diffuses Fluoreszenzsignal im Bereich des Nukleoplasmas beobachtet werden (Pfeilspitze in Abb. III.13.A), ein Phänomen, das zuvor ausschließlich für cytoplasmatisch exprimiertes GFP beschrieben wurde. Es wurde darauf zurückgeführt, dass GFP mit einem Molekulargewicht unterhalb der Kernporenausschlußgröße von 60 kDa ungehindert durch die Kernporen diffundieren kann [283]. Da das GFPapo-Vorläuferprotein mit einem funktionalen Signalpeptid ausgestattet ist, das in Übereinstimmung mit den Prognosen des TargetP 1.1 Server's, (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) nachweislich ein Targeting von GFPapo in den sekretorischen Weg bewirkt, wurde eine cytosolische Akkumulation ausgeschlossen. Der Vergleich mit GFPapo-exprimierenden BY-2 Zellen sowie Protoplasten transgener Tabakpflanzen/BY-2 Zellen (Abb. III.13.A, Mitte und rechts) spricht vielmehr für eine stressinduzierte Autofluoreszenz des Kerns infiltrierter Zellen. Die Analyse lebender BY-2 Zellen zeigte in Analogie zu früheren Studien eine signifikante inkubationszeitabhängige Zunahme der Akkumulation von GFP in der Vakuole [284]. Bereits nach 3-tägiger Inkubation GFPapo-exprimierender BY-2 Zellen konnten vereinzelt Zellen identifiziert werden, die eine diffuse Akkumulation von GFP in der Vakuole aufwiesen (Abb. III.13.A, rechts).

Die Fluoreszenzverteilung in GFPapo- sowie GFP-TCRCys-exprimierenden BY-2 bzw. Tabakzellen erschien auf den ersten Blick sehr ähnlich (Abb. III.13.B, links, Mitte und rechts). Im Unterschied zu GFPapo zeigten GFP-TCRCys-exprimierende Blattepidermiszellen allerdings in allen analysierten mittleren Zellebenen einen Ausschluß der Fluoreszenz im Nukleoplasma (Pfeilspitze in Abb. III.13.B, links). Ein weiterer Unterschied wurde im Bereich der Interzellularräume angrenzender Zellen sichtbar. Im Gegensatz zu GFPapo-exprimierenden Zellen wurde keine Fluoreszenz im Apoplast beobachtet, obwohl GFP-TCRCys aufgrund seines kalkulierten Molekulargewichtes (Tab. III.3) die Zellwand mit einer Ausschlussgröße von 75 kDa passieren kann (Pfeil in Abb. III.13.B, rechts und III.14.B). Das GFP-Signal GFP-TCRCys-exprimierender BY-2 Zellen beschränkte sich ausschließlich auf den Cytoplasmasaum (Pfeilspitze in Abb. III.14.B). Offensichtlich wurde die Sekretion von GFP durch die C-terminale Fusion des TCRCys-Membranankers verhindert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse weiterer Zellebenen ergab, dass das Signal jedoch nicht ausschließlich, wie zunächst vermutet, aus der Akkumulation von GFP-TCRCys in der Zellmembran resultierte. Die Anordnung der Fluoreszenz in netzartigen und feinpartikulären Strukturen in diesem Bereich der Zelle (Abb. III.15.B) ließ einen Rückschluß auf eine Akkumulation signifikanter Anteile des membranverankerten GFP im ER-Netzwerk und nach dem Ausschluß unerwünschter N-terminaler Mitochondrien-Targetingpeptide und

Chloroplasten-Transpeptide (TargetP 1.1 Server, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>), vermutlich in Golgi-Stapeln oder Transportvesikeln zu. Die Abwesenheit von GFP-TCRCys im Kulturüberstand von BY-2 Zellen (Abb. III.11.A-C) sowie im Apoplast der analysierten Blattepidermiszellen führte zu der Annahme, dass die Fusion an TCRCys sehr wahrscheinlich eine Integration von GFP sowohl in die Plasmamembran als auch in die Membranen des ER und Golgi-Apparates zur Folge hatte. Ob es sich bei der Akkumulation in Kompartimenten des sekretorischen Apparates um eine vorübergehende, oder finale Lokalisation handelte konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden.

Die relativ geringe Akkumulation von CTB-HVR1-TCRCys-GFP und CTB-MPT64-TCRCys-GFP in infiltrierten Tabakblättern resultierte in die beobachteten sehr schwachen Fluoreszenzsignale. Analog zu GFP-TCRCys lokalisierten die Proteinkonstrukte im Bereich des Zellkerns und im Randbereich der Zellen (Pfeilspitze in Abb.III.13.C und III.13.D, links, Mitte und rechts). Die Abwesenheit einer Fluoreszenzmission im Apoplast CTB-MPT64-TCRCys-GFP exprimierender Blattepidermiszellen (Pfeil in Abb.III.14.C) bestätigte, dass analog zur Analyse der Kulturüberstände transgener BY-2 Zellen (III.1.3.2.5), eine Sekretion der Fusionsproteine verhindert wurde. Die Analyse weiterer Zellebenen zeigte, dass analog zu den Beobachtungen der GFP-TCRCys-Lokalisation ein signifikanter Anteil der GFP-Fluoreszenz an den Zellrändern von Kompartimenten des sekretorischen Apparates (Pfeil in Abb. III.15.C) bzw. dem ER-Netzwerk (Pfeilspitze in Abb. III.15.C) ausging. Das geringe Fluoreszenzsignal, das von CTB-HVR1-TCRCys-GFP exprimierenden Blattepidermiszellen ausging, verhinderte weitere Aussagen über die Lokalisation von CTB-HVR1-TCRCys-GFP. Die generierten fluoreszenzmikroskopischen Daten zur Funktionalität der TCRCys-Membranankervariante erlaubten keine endgültige Aussage über die Lokalisierung der membranständigen GFP-Konstrukte in der Zellmembran. Signifikante Anteile des Fluoreszenzsignals im Randbereich der Zellen akkumulierten im Bereich subzellulärer Strukturen, nachweislich im ER-Netzwerk und vermutlich in Golgi-Zisternen bzw. Transportvesikeln. In Kombination mit den generierten Daten der Sekretions- und Membranisolierungsexperimente (III.1.3.2.5 und III.1.3.2.6) konnte jedoch die Funktionalität, d.h. die generelle Eignung der TCRCys-Membranankervariante zur Verankerung rekombinanter Proteine in pflanzlichen Membranen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit bestätigt werden. Obwohl die Membranverankerung *in vivo* ausreicht, um die Sekretion fusionierter Proteine zu verhindern, scheint sie jedoch relativ instabil zu sein, da mechanische

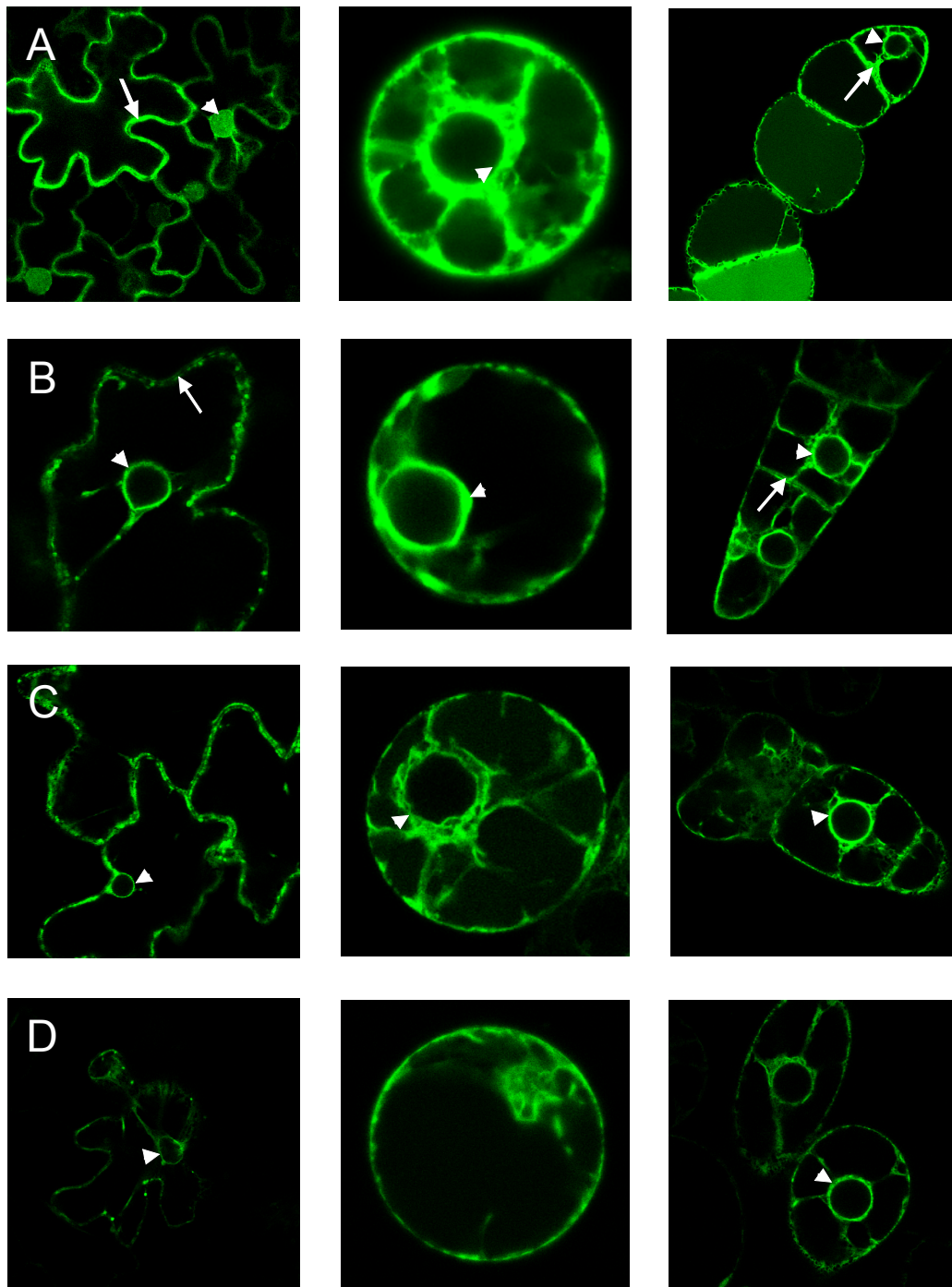


Abbildung III.13: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von GFP_{Papo}, GFP-TCRCys, CTB-HVR1-TCRCys-GFP und CTB-MPT64-TCRCys-GFP.

Die Akkumulation des Fluoreszenzsignals von GFP_{Papo} (A), GFP-TCRCys (B), CTB-MPT64-TCRCys-GFP (C) und CTB-HVR1-TCRCys-GFP (D) in Epidermiszellen transient transformierter Tabakblätter (linke Reihe), Protoplastenpräparationen aus BY-2 Zellen (II.6.1.1) bzw. Tabakblättern (II.6.1.2) (mittlere Reihe) und BY-2 Zellen (rechte Reihe) ist gezeigt. Die Visualisierung des Fluoreszenzsignals in ca. 1 μm dicken konfokalen Z-Sektionen erfolgte mit Hilfe von konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie nach Anregung mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm und Aufnahme der Lichtemission bei 500-530 nm (II.6.4). Die Pfeile markieren die GFP-Akkumulation im Bereich des Interzellularraumes, die Pfeilspitzen die im Bereich des Nukleus.

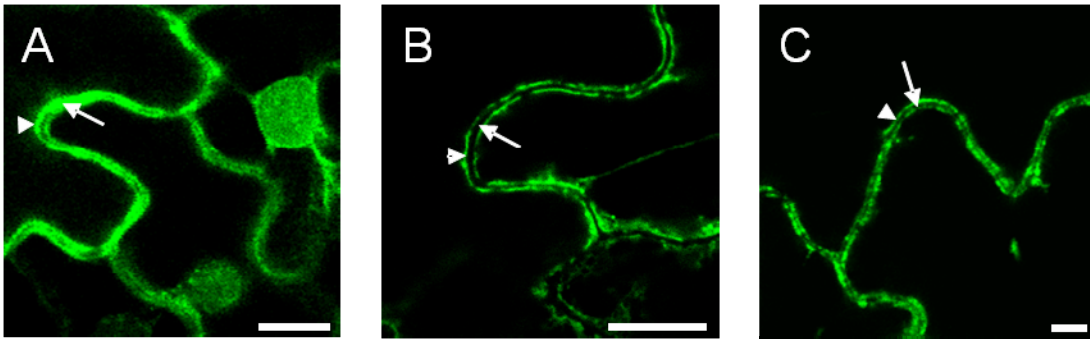


Abbildung III.14: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der GFP-Akkumulation im Bereich der Interzellularräume benachbarter Blattepidermiszellen.

Die Akkumulation des Fluoreszenzsignals von GFPpapo (A), GFP-TCRCys (B) und CTB-MPT64-TCRCys-GFP (C) in ca. 1 μm dicken konfokalen Z-Sektionen von Epidermiszellen transient transformierter Tabakblätter nach Anregung mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm und Aufnahme der Lichtemission bei 500-530 nm ist gezeigt (II.6.4). Die Pfeile markieren den Apoplast, die Pfeilspitzen den Bereich des Cytoplasmasaums. Skalierungsbalken: 10 μm .

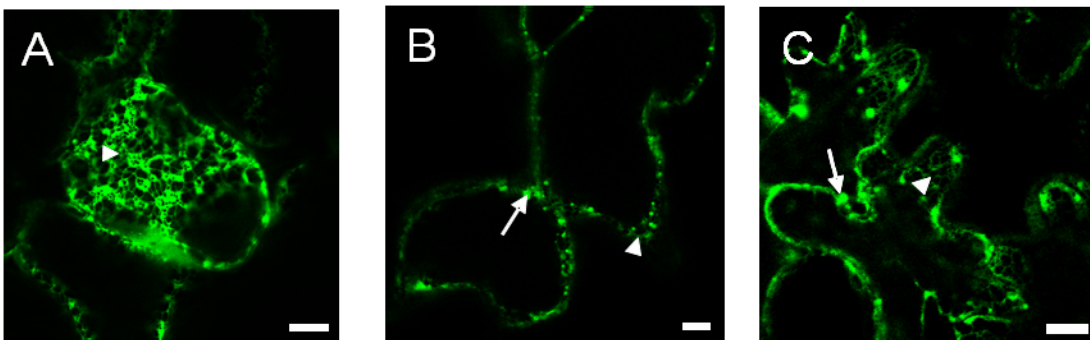


Abbildung III.15: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären GFP-Akkumulation im Cytoplasmasaum.

Die Akkumulation des Fluoreszenzsignals von GFPpapo (A), GFP-TCRCys (B), CTB-HVR1-TCRCys-GFP (C) und CTB-MPT64-TCRCys-GFP (C) in ca. 1 μm dicken konfokalen Z-Sektionen von Mesophyll- (A) bzw. Epidermiszellen (B und C) transient transformierter Tabakblätter nach Anregung mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm und Aufnahme der Lichtemission 500-530 nm ist gezeigt (II.6.4). Die Pfeile markieren die GFP-Akkumulation im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums, die Pfeilspitzen die im Bereich nicht identifizierter partikulärer Strukturen. Skalierungsbalken: 10 μm .

Einflüsse, wie sie z.B. bei Präparation von Membranen entstehen, ausreichen, um mehr oder weniger signifikante Anteile der Fusionsproteine aus der Membran freizusetzen (III.1.3.2.6).

III.2 Evaluierung von Tabak als Produktionssystem für essbare Impfstoffe

In Bezug auf die hohe Biomasseproduktion und der einfachen genetischen Manipulation bzw. dem Vorhandensein zahlreicher etablierter Transformationsprotokolle hat die Verwendung von Tabak als Produktionssystem für rekombinante Proteine Vorteile im Vergleich zu anderen Pflanzensystemen (I.2.3). Besonders durch den verhältnismäßig hohen Anteil an

Nikotin (III.2.1) ist Tabak jedoch nur begrenzt für die Produktion von oral verfügbaren Impfstoffen geeignet.

Obwohl die orale Verabreichung von Tabakextrakt in früheren Studien auf eine generelle Verträglichkeit von Tabak im Rahmen einer oraler Immunisierungen schließen läßt (IV.4.2.7), sollte in der vorliegenden Arbeit erstmals der Nikotingehalt von Gewächshaus-Tabak bestimmt werden, der in den nachfolgenden Fütterungs- (III.2.2) bzw. Immunisierungsstudien (III.3.2) in Mäusen zum Einsatz kommen sollte.

III.2.1 Nikotinbestimmung

Da die akute Toxizität (LD50) von Nikotin maßgeblich von seiner chemischen Form und der Verabreichungsrouten abhängt, findet man diesbezüglich in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. Während für die intravenöse Injektion von Nikotin publizierte LD50 Werte von 300 µg/kg Körpergewicht vorliegen [285] ist die akute Toxizität bei einer oralen Verabreichung von Nikotinsalz, der Form in der Nikotin sehr wahrscheinlich im eher sauren Milieu (pH 5,5) von Tabakblättern vorliegt, mit einer LD50 von 230mg/kg Körpergewicht wesentlich niedriger [285]. Das liegt vermutlich daran, dass die Aufnahme von Nikotin in die Zellen über den oralen Weg wesentlich langsamer und unvollständig geschieht und Nikotin zu einem gewissen Prozentsatz ausgeschieden wird. Aufgrund einer erleichterten Resorption im Bereich des Naso-Pharynx ist die orale Toxizität der Nikotinbase im Vergleich zum Nikotinsalz mit einer LD50 von 3,3 mg/kg signifikant höher [286].

Der Nikotingehalt von Tabakblättern kann je nach Kultivar, Alter und Kultivierungsbedingungen stark variieren. Für die bekanntesten Freiland Tabakvarietäten werden in der Literatur Werte zwischen 0,1-4% (1 bis 30 mg/g Trockengewicht) bezogen auf die Trockenmasse angegeben [287-289]. Da Nikotin vorwiegend in der Wurzel gebildet und anschließend in die Blätter transportiert wird [290], ist seine Synthese stark von der Wurzelmasse abhängig. Daher ist bei einer Gewächshausproduktion von Tabak in vergleichsweise kleinen Töpfen im Unterschied zur Freilandkultivierung eine deutlich geringere Nikotinakkumulation zu erwarten.

Aufgrund der genannten Vorteile als Expressionssystem (I.2.3), der erwartungsgemäß niedrigeren, mit den geplanten Versuchsvorhaben konform gehenden Nikotinkonzentrationen der eingesetzten Tabakkultivare sowie des zeit- und kosteneffektiven Aufwands, den die Etablierung der Protokolle zur Transformation alternativer essbarer Pflanzensysteme impliziert, wurde Tabak im Rahmen dieser Arbeit schmackhafteren, bekömmlicheren Kulturpflanzen vorgezogen. Als Alternative zur Expression der Genkonstrukte im Kultivar Petit Havana SR1 wurde die Variante Nft51, die nach Trocknung durch Aktivierung Nikotin-

abbauender Enzyme weitestgehend nikotinfrei sein sollte [248], zur Produktion der Antigenkonstrukte herangezogen. Es sei in diesem Zusammenhang jedoch noch einmal darauf hingewiesen, dass Tabak als reine Modellpflanze für ein „proof-of-concept“ der geplanten Strategien zur Optimierung essbarer pflanzenproduzierter Subunit-Impfstoffe diene.

III.2.1.1 HPLC-MS-MS Analyse des Nikotingehaltes

Die quantitative Extraktion von Nikotin aus Tabakblättern erfolgte mit Hilfe von Methanol als organischem Lösungsmittel (II.8.1). Aufgrund der altersbedingten Schwankung der Nikotinkonzentration wurden die Extraktionen von Blätter gleichen Blattalters von drei individuellen Pflanzen der Tabakkultivare *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1, cv. Nft51, cv. Maryland Mammoth und *N. benthamiana* sowie zwei Proben einer BY-2 Suspensionszellkultur zur quantitativen Analyse des Nikotingehaltes in einem HPLC-MS-MS (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-) System eingesetzt (II.8.2). Dabei wurde jeweils die Nikotinkonzentration von zwei identischen Blatthälften, von denen eine frisch extrahiert und die andere vor der Extraktion lyophilisiert wurde, ermittelt. Im Fall des Kultivars Petit Havana SR1 wurde zusätzlich analysiert, ob die Entfernung eines gewissen Anteils des Nikotins durch Entsaften der Blätter möglich ist. Diese Vorbehandlung sollte das Verhältnis von rekombinantem Protein zum Nikotingehalt der in den Immunisierungen eingesetzten Blätter erhöhen und damit die Nikotinbelastung der Versuchstiere minimieren. Dazu wurde jeweils eine Blatthälfte der zwei getesteten Blätter normal prozessiert, während die zweiten Blatthälften vor der Extraktion entsaftet wurden (II.8.1).

Die gemessenen Nikotinkonzentrationen im Blattmaterial der untersuchten Pflanzen der verschiedenen *Nicotiana* Spezies lagen je nach Trocknungszustand zwischen ~450 und ~900 µg Nikotin pro Gramm Trockengewicht und damit am unteren Ende der für *N. tabacum* publizierten Werte (Abb. III.16). Für *N. benthamiana* wurden erwartungsgemäß die niedrigsten Nikotinkonzentrationen ermittelt. Da Nikotin überwiegend gewebespezifisch in den Wurzeln synthetisiert wird, konnten in BY-2 Zellextrakten nur sehr geringe Mengen Nikotin nachgewiesen werden. Durch Entsaftung kam es zu keiner deutlichen Nikotinreduktion; vermutlich liegt Nikotin nicht löslich, sondern an Zellstrukturen gebunden vor. Durch Lyophilisieren konnte der Nikotingehalt des Kultivars Maryland Mammoth mit weniger als 25 % im Vergleich zum frischen Blattmaterial am deutlichsten reduziert werden. Der ermittelte Nikotingehalt des Frischmaterials des Kultivars Nft51, das laut Herstellerangaben im getrockneten Zustand nahezu nikotinfrei sein sollte (II.1.5), war im Vergleich zu Petit Havana SR1 und Maryland Mammoth im Durchschnitt 23 bzw. 25% höher und konnte selbst nach Trocknung im Durchschnitt nur um weniger als 20 % reduziert

werden. Vermutlich wurden die Enzyme, die das Nikotin im Trocknungs- und Fermentationsprozess abbauen, unter den Bedingungen der Gefriertrocknung nicht aktiviert. Das Kultivar Petit Havana SR1 wies mit weniger als 10% den geringsten Trocknungsverlustes auf. Dennoch wurden im getrockneten Petit Havana SR1 Blattmaterial im Vergleich zu Nft51 mit $\sim 700 \mu\text{g/g}$ Trockengewicht ($\sim 10\%$ des Frischgewichtes) im Durchschnitt 2,4% geringere Nikotinkonzentrationen gemessen. Um die Nikotinbelastung der Versuchstiere möglichst gering zu halten, erfolgten die unter III.3 aufgeführten oralen Immunisierungen daher ausschließlich mit transgenen Blattmaterial der Tabaksorte Petit Havana SR1, die die höchste Akkumulation des in dieser Arbeit evaluierten membranständigen Modellantigens CTB-HVR1-TCRCys und damit das beste Verhältnis zwischen Nikotingehalt und Antigenakkumulation aufwies (III.1.2.2; Tab. III.2). Gemäß früherer Studien ist die Verfütterung von 1 g getrocknetem Blattmaterial der bestproduzierenden Pflanzenlinie ausreichend (IV.4.2.4) und sollte zu einer Nikotinbelastung von ca. 0,07 mg pro Immunisierungsschritt führen und in Bezug auf die Antigenosis grundsätzlich im Einklang mit einer oralen Verfütterung von unprozessiertem transgenem Pflanzenmaterial stehen. Für die orale Verabreichung von Nikotinsalz entspricht das bei einem ermittelten mittleren Körpergewicht der eingesetzten Mäuse von 27 g nur ca. 1,2% des realistischen LD50 Wertes von 230 mg/kg (~ 6 mg/Maus).

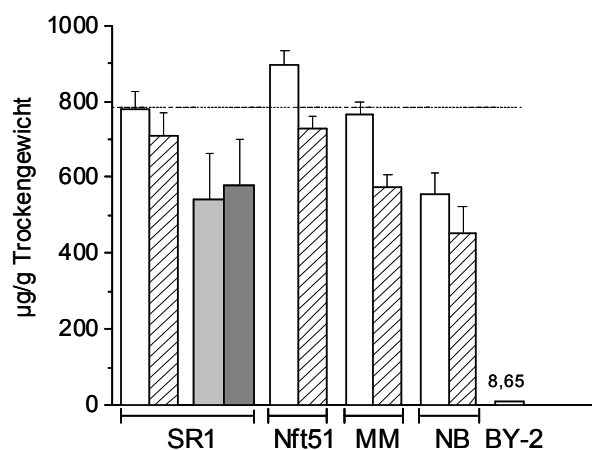


Abbildung III.16: Quantitative HPLC-MS-MS Analyse der Nikotinakkumulation in Tabakblattmaterial und Tabaksuspensionszellen (II.8.2).

Die einzelnen Säulen repräsentieren den Mittelwert der Nikotinkonzentration in $\mu\text{g/g}$ (\pm SEM) Trockengewicht in den Blättern von drei individuellen Pflanzen der Kultivare *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 (SR1), *N. tabacum* cv. Nft51 (Nft51), *N. tabacum* cv. Maryland Mammoth (MM) und *Nicotiana benthamiana* (NB) bzw. zwei Proben einer BY-2 Zellsuspension (BY-2). Jeweils der Nikotingehalt einer frischen (ohne Füllung) und der korrespondierenden lyophilisierten Blatthälfte (schraffierte Füllung) wurde ermittelt. Im Fall von *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 wurde zusätzlich der mittlere Nikotingehalt von zwei frischen (hellgraue Füllung) und zwei entsafteten Blatthälften (dunkelgraue Füllung) von zwei Tabakblättern bestimmt.

III.2.2 Studien zur oralen Aufnahme und Verträglichkeit von prozessiertem und unprozessiertem Tabakmaterial

Tabak ist aufgrund des hohen Gehaltes an Alkaloiden, Tanninen u.a. Bitterstoffen ungenießbar. Des Weiteren sind Mäuse die Aufnahme von trockener Nahrung gewohnt. Um einen komplikationsfreien und vollständigen Verzehr des Tabak-produzierten Impfstoffes in den nachfolgenden oralen Immunisierungen zu garantieren, wurden in einem Vorversuch Fütterungsstudien zur Analyse der oralen Aufnahme und Verträglichkeit von unprozessiertem und gering prozessiertem Tabakblattmaterial durchgeführt. Dazu wurden jeweils einer von insgesamt drei Mäusen nach einer Hungerperiode von ca. 14 Stunden entweder 2 g (Frischgewicht) frisches, im Lyophilisator getrocknetes, oder zu Futterpellets (II.7.1) verarbeitetes Wildtyp-Blattmaterial der Tabakkultivare Petit Havana SR1 und Nft51 verabreicht und die Nahrungsaufnahme der Versuchstiere über einen Zeitraum von 12 Stunden dokumentiert. Während im Fall von frischen und getrockneten Tabakblättern unabhängig vom Kultivar nur ein geringfügiger Verzehr beobachtet werden konnte und Frischmaterial in zwei unabhängigen Versuchsansätzen vollständig verschmäht wurde (Verzehr von 0-30% des Ausgangsmaterials), erfolgte innerhalb von 12 Stunden eine vollständige Aufnahme der verabreichten Tabakfutterpellets. Die Versuchstiere zeigten mit Ausnahme einer gesteigerten Nervosität während der Fütterung, die auch auf den Nahrungsentzug sowie die Separation der Mäuse vor Versuchsbeginn und die Haltung ohne Einstreu über den Versuchszeitraum zurückzuführen sein konnte, keine auffälligen Symptome einer Intoxifikation.

Aufgrund der zeitlichen Limitierung erwies sich eine Verfütterung von 1 g Tabakmaterial (Frischgewicht) in Form von Futterpellets im Rahmen der geplanten oralen Immunisierungen als praktikabel und entsprach in Korrelation mit den ermittelten Akkumulationsmengen einer angemessenen Dosierung von CTB-HVR1-TCRCys (Tab. III.1; IV.4.2.4).

III.2.3 Studien zur Antigenstabilität in Tabakfutterpellets

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten oralen Immunisierungen basierten auf mehrfachen oralen Booster-Immunisierungen und sollten über einen Zeitraum von sieben Wochen durchgeführt werden (Abb. III.19). Um eine relativ konstante Dosierung zu garantieren, wurde im Vorfeld der Vakzinierungen der Aktivitätsverlust von CTB-HVR1-TCRCys bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen über den geplanten Immunisierungszeitraum dokumentiert.

Die Tabakfutterpellets wurden wie unter III.3.1 für Präparationsvariante 1 beschrieben hergestellt (II.7.1) und bei -20°C sowie bei Raumtemperatur (RT) über einen Zeitraum von

einem bzw. acht, 13, 21 und 57 Tagen gelagert. Nach der Extraktion von Gesamtprotein aus jeweils zwei Tabakfutterpellets (II.3.1) wurden die Antigenmengen mittels GM1-ELISA (II.3.6) quantifiziert (Abb. III.17). Die Ergebnisse zeigten, dass eine Lagerung der Pellets bei RT bereits nach 21 Tagen zu einem signifikanten Verlust (~36 %) von funktionalem CTB-HVR1-TCRCys führte (Abb. III.17.B). Im Vergleich dazu konnte nach einer Lagerung bei -20°C über einen Zeitraum von 21 Tagen noch ca. 87,5% (SEM \pm 0,81%) der Startkonzentration nachgewiesen werden (Abb. III.17.A). Da die Antigenmenge über einen Zeitraum von drei Wochen im akzeptablen Maß abnahm, nach 57 Tagen jedoch nur noch 66,1 % (SEM \pm 0,065%) der Anfangskonzentration nachzuweisen war, erforderte die kontrollierte Verabreichung von mehr oder weniger definierten Antigenmengen die Prozessierung von frischem Pflanzenmaterial direkt vor der 1. und ebenfalls direkt vor der 4. Immunisierung (III.3.1).

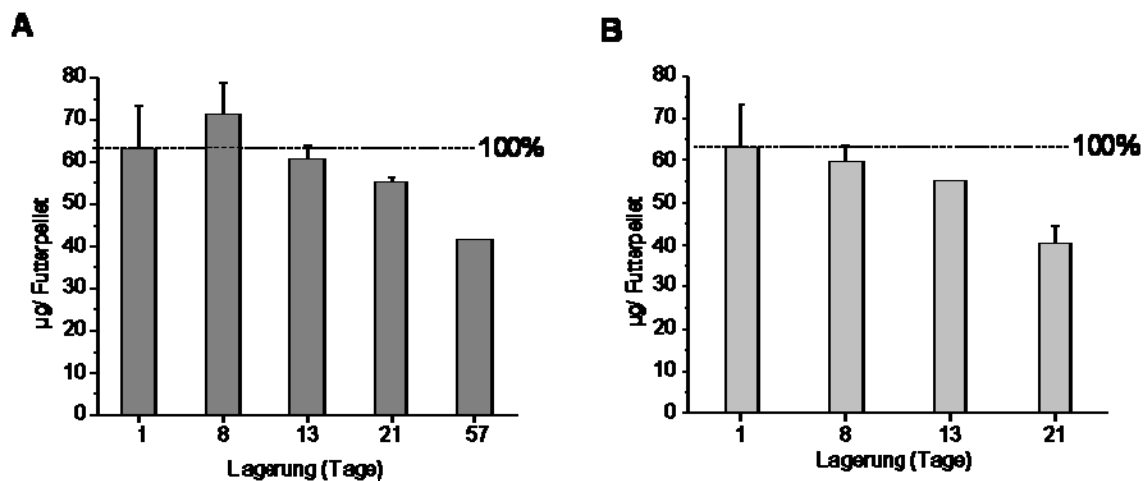


Abbildung III.17: GM1 ELISA zur Analyse des quantitativen Verlustes von funktionalem CTB-HVR1-TCRCys in Tabakfutterpellets nach Lagerung bei -20°C und RT.

Die Konzentration von CTB-HVR1-TCRCys in µg pro Futterpellet (0,5 g Blattmaterial des Kultivars Petit Havana SR1) wurde nach Isolierung von Gesamtprotein aus den Pellets in 5 Volumen Extraktionspuffer (II.3.1) nach 1-, 8-, 13-, 21- und 57-tägiger Lagerung bei -20°C (A) und RT (B) mittels GM1-ELISA (II.3.6) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte nach Detektion des funktionalen CTB-Fusionspartners mittels M α -CTB und Z α M^{HRPO} und photometrischer Absorptionsmessung des Substratumschlags anhand bekannter Standardkonzentrationen (bakteriell exprimiertes CTB, 100 ng/ml). Als Negativkontrolle wurde Wildtyp-Tabakextrakt eingesetzt. Die einzelnen Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von jeweils zwei analysierten Futterpellets.

III.3 Orale Immunisierungen

Der große, stetig wachsende Bedarf an neuen Impfstoffen, die effektiv, sicher, kosteneffizient und leicht handhabbar sind, erfordert die Entwicklung alternativer Herstellungsverfahren und Vakzinierungsstrategien. Die Möglichkeit der Produktion von Subunit-Impfstoffen in

transgenen Pflanzen ist einer der Meilensteine auf dem Weg zur Entwicklung alternativer Vakzine, die durch die direkte Verabreichung ganzer essbarer Pflanzenteile kosteneffizient und praktikabel sind. Aufgrund einer erhöhten Instabilität löslicher Protein- und Peptidimpfstoffe im GIT sowie ihrer unzureichenden Aufnahme über das Darmepithel ist jedoch die Wahrscheinlichkeit nach ihrer oralen Verabreichung protektive Immunantworten zu induzieren generell sehr gering (I.3.1). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die endozytotische Aufnahme des Modellantigens CTB-HVR1 durch M-Zellen des Darmepithels (IV.1) durch die Fusion an die Membranankervariante TCRCys und Integration in die Pflanzenzellmembran im Vergleich zu löslichen Antigenen optimiert werden. Das Potential der Verwendung der beta-Kette des humanen T-Zell-Rezeptors (TCR β) als heterologen Transmembrananker zur Optimierung der Produktivität des pflanzlichen Expressionssystems wurde bereits in den Abschnitten III.1.2.1 und III.1.2.2 analysiert. Im Rahmen der nachfolgenden Immunisierungsstudien sollte evaluiert werden, ob eine Membranverankerung von Vakzinantigenen ebenfalls auf immunologischer Ebene ein viel versprechender Ansatz zur Optimierung essbarer pflanzenproduzierter Impfstoffe ist. Aufgrund der geringen Akkumulation der apoplastisch exprimierten Antigene, war eine vergleichende Studie löslicher und potentiell partikulärer Antigene im Kleinterversuch jedoch nicht möglich. Eine vergleichbare Dosierung mit entsprechend hohen Mengen an transgenen Tabakmaterial war sowohl unter toxikologischen Gesichtspunkten (III.2.1.1) als auch aufgrund der begrenzten Nahrungsaufnahme der Versuchstiere über eine adäquate Verabreichungsdauer (III.2.2) nicht realisierbar.

In den nachfolgenden Immunisierungen und der anschließenden Analyse der Immunantworten wurde das immunogene Potential der bestexprimierten Antigenvariante, dem membranverankerten Modellantigen CTB-HVR1-TCRCys, im Rahmen einer oralen Verabreichung von prozessierten Pflanzenmaterial des Kultivars *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 in Form von Futterpellets mit und ohne die intranasal applizierten mukosalen Adjuvantien BPPCysPEG (modifiziertes MALP-2) und PQS-PEG (modifiziertes PQS) (I.3.1.2, I.3.1.3) auf mukosaler und systemischer Ebene charakterisiert.

III.3.1 Herstellung von Futterpellets und Quantifizierung der Antigenmenge

Die Ergebnisse der Fütterungsstudien hatten gezeigt, dass für eine effiziente orale Verabreichung von Tabak an Mäuse eine Prozessierung des Blattmaterials in Form von Tabakfutterpellets essentiell ist (III.2.2). Da Vorversuche zum quantitativen Nachweis von funktionalem CTB-HVR1-TCRCys in Tabakfutterpellets (III.2.3) zeigten, dass eine ausreichende Antigenstabilität nicht über den gesamten Immunisierungszeitraum (Abb.III.19)

garantiert werden konnte, wurden zwei Chargen von Tabakfutterpellets mit frisch geerntetem Blattmaterial jeweils direkt vor der 1. (Charge 1) bzw. der 4. Immunisierung (Charge 2) hergestellt. Da Vorversuche zur Stabilität der Membranverankerung auf eine mehr oder weniger instabile Verankerung der Antigene in der Pflanzenzellmembran hinwiesen (III.1.3), sollte für die nachfolgenden oralen Immunisierungen unterschiedlich stark prozessiertes Blattmaterial eingesetzt werden. Futterpellets der Präparationsvariante 1 enthielten je 0,5 g (Frischgewicht) zu Blattpulver gemörsertes Pflanzenmaterial (II.7.1). Da eine Membrintegrität des Antigens in immunrelevanten Abschnitten des Dünndarms vermutlich maßgeblich von einer intakten Zellwand im Bereich des Duodenums abhängt, erfolgte im Fall der Futterpellets der Präparationsvariante 2 eine geringere Prozessierung des Pflanzenmaterials zu kleinen Blattstückchen (II.7.1). Die Prozessierung von Blattmaterial von Wildtyp-Tabak erfolgte analog zur Präparationsvariante 1. Eine proteinschonende Trocknung der Futterpellets im Lyophilisator erwies sich aufgrund mangelnder Kapazitäten als nicht praktikabel und sehr zeitintensiv; entgegen der Vorgehensweise der Trocknung der Blätter für die Nikotinbestimmung (III.2.1.1) erfolgte die Trocknung der Futterpellets im Vakuumexsikkator. Generell sollte der Trocknungsprozess jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Nikotinkonzentration in getrockneten Blättern des Kultivars Petit Havana SR1 ausüben.

Im Vorfeld der Immunisierungen erfolgte die Quantifizierung der Antigenmenge im GM1-ELISA (Abb. III.18). Von jeder Charge wurden jeweils vier Pellets der Präparationsvariante 1 und aufgrund einer limitierten Anzahl ein Pellet der Präparationsvariante 2 analysiert. Laut GM1-ELISA Analysen entsprachen die Antigenmengen in Pellets der Charge 1 für Präparationsvariante 1 im arithmetischen Mittel $57,4 \mu\text{g}$ ($\text{SEM} \pm 1$) bzw. $76 \mu\text{g}$ für Präparationsvariante 2, sowie in Pellets der Charge 2 $41,2 \mu\text{g}$ ($\text{SEM} \pm 3,7$) (Präparationsvariante 1) bzw. $45,4 \mu\text{g}$ (Präparationsvariante 2). Die geringen Standardabweichungen der analysierten Futterpellets verdeutlichten die homogene Verteilung des Antigens in den Futterpellets, die eine relativ konstante Dosierung des Impfstoffes garantierte. Ausschließlich in Charge 1 wich die ermittelte Antigenkonzentration für das analysierte Futterpellet der Präparationsvariante 2 um mehr als 20% vom arithmetischen Mittel der Präparationsvariante 1 ab. Aufgrund der limitierten Pelletanzahl musste jedoch auf eine wiederholte Quantifizierung des Ausreißers verzichtet werden.

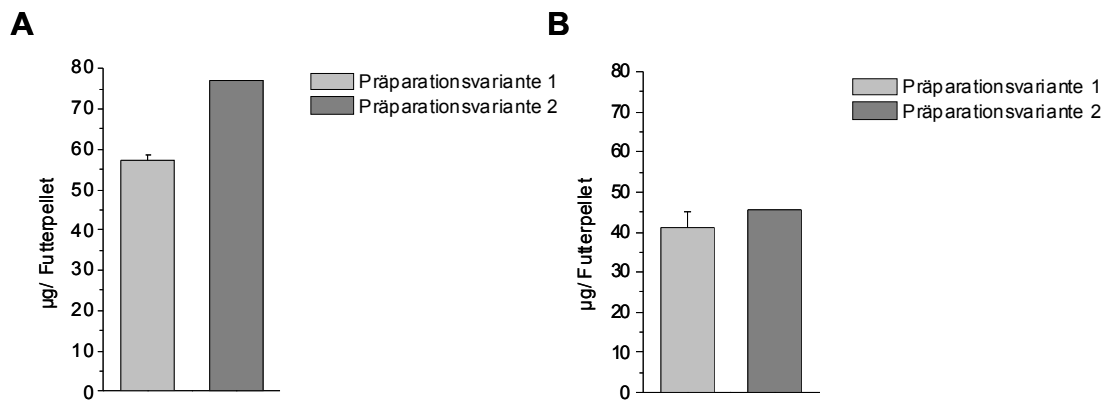


Abbildung III.18: GM1-ELISA zur Bestimmung der Antigenkonzentration in Futterpellets der Präparationsvarianten 1 und 2.

Die Konzentration von CTB-HVR1-TCRCys in µg pro Futterpellet (0,5 g Blattmaterial des Kultivars *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1) in den Präparationsvarianten 1 und 2 der ersten (A) und zweiten Charge (B) wurde nach Isolierung von Gesamtprotein (II.3.1 und II.7.1) mittels GM1-ELISA (II.3.6) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte nach Detektion des funktionalen CTB-Fusionspartners mittels $M\alpha$ -CTB und $Z\alpha M^{HRPO}$ (II.1.2) und photometrischer Absorptionsmessung des Substratschlags anhand bekannter Standardkonzentrationen (bakterielles CTB). Die individuellen Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SEM der CTB-HVR1-TCRCys-Konzentration in vier Futterpellets der Präparationsvariante 1 (hellgraue Füllung) bzw. die Konzentration von einem Futterpellet der Präparationsvariante 2 (dunkelgraue Füllung).

III.3.2 Immunisierungsprotokoll

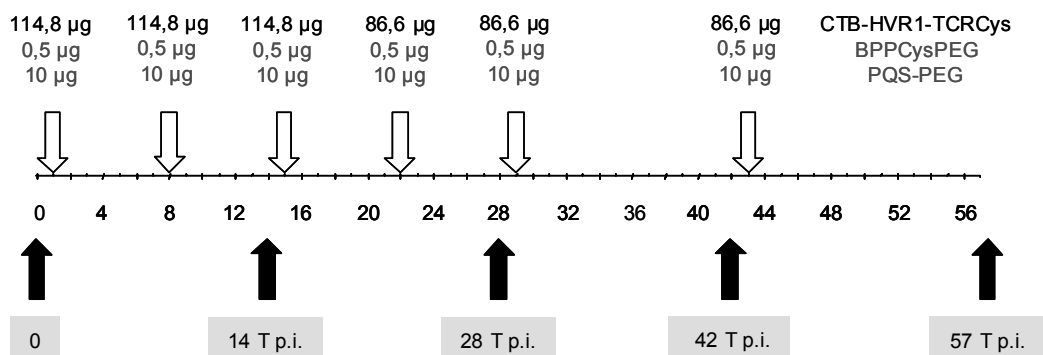
Vier Immunisierungsgruppen (Gruppe I-IV), bestehend aus jeweils sechs Mäusen, wurden eingesetzt (Tab. III.4). Die oralen Immunisierungen erfolgten mit Futterpellets, die entweder gemörsertes (Präparationsvariante 1, Gruppe I), oder zu Blattstückchen verarbeitetes Blattmaterial (Präparationsvariante 2, Gruppe II) enthielten (II.7.1). Präparationsvariante 1 wurde zusätzlich in Kombination mit den intranasal applizierten mukosalen Adjuvantien BppCysPEG (Gruppe III) oder PQS-PEG (Gruppe IV) verabreicht (Tab. III.4). Die Adjuvantizität des MALP-2 hängt maßgeblich von der R-Konfiguration des C_2 -Atoms des Glycerols des Lipidanteils ab (I.3.1.2). Da oral verabreichtes MALP-2 schwächer wirkt, weil es möglicherweise während der Passage durch den Magen-Darm-Trakt teilweise abgebaut wird und/oder das proteolytische Milieu einen Einfluss auf die stereoisomere Konfiguration ausüben könnte (I.3.1.2), wurde eine intranasale Verabreichung einer oralen Adjuvansgabe vorgezogen (II.7.3). Die orale Immunisierung erfolgte mit jeweils zwei Tabakfutterpellets pro Maus und Immunisierungsschritt, dementsprechend mit 1 g CTB-HVR1-TCRCys-transgenen Blattmaterial. Für die Immunisierungsschritte 1-3 wurden jeweils zwei Futterpellets der Charge 1, eingesetzt; das entsprach laut GM1-ELISA Analyse einer Antigenkonzentration von durchschnittlich 114,8 µg pro Immunisierungsschritt (III.3.1). Die ermittelte Konzentration der Präparationsvariante 2 wurde nicht in die Berechnung einbezogen, da sie um mehr als

20% vom arithmetischen Mittel abwich. Die Booster-Immunisierungen 4-6 erfolgten mit jeweils zwei Futterpellets der Charge 2, d.h. Antigendosen von durchschnittlich 86,6 µg pro Immunisierungsschritt (III.3.1). Über den Fütterungszeitraum von max. acht Stunden waren aufgrund der relativ hohen Proteinstabilität bei RT über kürzere Zeiträume (III.2.3) keine bzw. vernachlässigbar geringe Konzentrationsverluste des Antigens zu erwarten. Aufgrund unzureichender Kapazitäten wurden nur zwei Kontrollmäusen (Maus 25, 26) oral Wildtyp-Futterpellets verabreicht; eine Maus erhielt zusätzlich intranasal BppCysPEG (Maus 25) und die andere PQS-PEG (Maus 26) (Tab. III.4). Die exakten Zeitpunkte der oralen Immunisierungen können dem in Abbildung III.19 dargestellten Impfschema entnommen werden, das in Anlehnung an erfolgreiche Protokolle zur oralen Immunisierung mit Pflanzenmaterial erstellt wurde [44, 65, 108, 195, 291].

Tabelle III.4: Immunisierungsgruppen.

Pro Gruppe wurden sechs ca. acht Wochen alte weibliche Versuchstiere des Maus-Inzuchtstammes Balb/c eingesetzt. Die oralen Immunisierungen erfolgten durch freiwillige Aufnahme von Tabakfutterpellets nach einer Hungerperiode von ca. 14 Stunden (II.7.2). Etwa vier Stunden nach Immunisierungsbeginn wurden die mukosalen Adjuvantien durch vorsichtiges Pipettieren in das linke oder das rechte Nasenloch coappliziert (II.7.3).

Immunisierungsgruppe	Anzahl Mäuse	Impfstoffkomposition
I (Maus 1-6)	6	Präparationsvariante 1 (Blattpulver, transgen)
II (Maus 7-12)	6	Präparationsvariante 2 (Blattstückchen, transgen)
III (Maus 13-18)	6	Präparationsvariante 1 (Blattpulver, transgen) + BPPCysPEG
IV (Maus 19-24)	6	Präparationsvariante 1 (Blattpulver, transgen) + PQS-PEG
Kontrollen		
Maus 25	1	Präparationsvariante 1 (Blattpulver, WT) + BPPCysPEG
Maus 26	1	Präparationsvariante 1 (Blattpulver, WT) + PQS-PEG

**Abbildung III.19: Immunisierungsverlauf und Probenentnahme.**

Die oralen Immunisierungen erfolgten an den Tagen 1, 8, 15, 22, 29 und 43 über einen Zeitraum von insgesamt sieben Wochen (Pfeile ohne Füllung). Die orale Antigendosis pro Versuchstier betrug 114,8 µg (Immunisierungen 1-3) bzw. 86,6 µg (Immunisierungen 4-6). Versuchstieren der Immunisierungsgruppen III und IV wurde pro Immunisierungsschritt zusätzlich intranasal 0,5 µg BPPCysPEG bzw. 10 µg PQS-PEG verabreicht (Tab. III.4). Die Entnahme von Stuhl- und Blutproben erfolgte vor der ersten Immunisierung (0) sowie jeweils 6 Tage nach der 2. (14 Tage p.i.) und 4. (28 Tage p.i.) sowie 13 Tage nach der 5. (42 Tage p.i.) und 14 Tage nach der 6. Immunisierung (57 Tage p.i.) (Pfeile mit schwarzer Füllung). T: Tage, p.i.: post Immunisierung.

III.3.3 Analyse der Immunantworten

Mukosal verabreichte Antigene führen primär zur Produktion von sekretorischem Immunglobulin A (sIgA), dem wichtigsten Effektormechanismus des mukosalen

Immunsystems (IV.4.1), durch B-Zellen der Lamina Propria [292]. Da sekretorisches IgA eine hohe Affinität zum Mukus aufweist, wird es verstärkt mit dem Schleim ausgeschieden [293] und die Analyse mukosaler Immunantworten nach Isolierung von sIgA aus Stuhlproben ermöglicht (III.3.3.3). Neben sIgA kann grundsätzlich auch IgA ohne sekretorische Komponente, das über einen parazellulären passiven Transfer das Schleimhautepithel passiert, in Sekreten nachgewiesen werden [294]. Da orale Impfstoffe das Potential besitzen neben der Induktion lokaler mukosaler Immunität ebenfalls systemische Immunantworten in den peripheren Lymphorganen des gesamten Organismus zu induzieren wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls antigenspezifische Serum IgG-Antikörperantworten charakterisiert.

Die Detektion der antigenspezifischen Antikörperantworten sowie die erforderliche Quantifizierung der Gesamt IgA-Konzentrationen (III.3.3.2) erfolgte nach der Probenvorbereitung (II.7.4) mit Hilfe von ELISA in einem automatisierten Verfahren (Beckmann Biomek Robots) (II.7.5). Durch diese Vorgehensweise sollte die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der ELISA-Ergebnisse, u.a. durch die Eliminierung des Einflusses von Pipettierfehlern, optimiert werden. Aufgrund mangelnder Kapazitäten wurde jede Probe in Einfachbestimmung analysiert. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurden in unabhängigen Experimenten ausgewählte Proben sowie Ausreißer nachgetestet. Zur Bestätigung einer erfolgreichen Beschichtung der Platten mit den entsprechenden Antigenen (CTB, GST-R9R9 und CTB-HVR1-TCRCys, II.7.5.2 und II.7.5.3) sowie der Standardisierung der individuellen Proben aller Immunisierungsgruppen wurde auf allen Platten ein entsprechendes antigenspezifisches kommerzielles Antiserum als Positivkontrolle und Standard mitgeführt. Die antigenspezifischen Antikörperantworten wurden in relativen Einheiten angegeben, die, soweit nicht anders vermerkt, aus dem Quotienten des linearen Bereichs der Absorptionssteigungen der Probenverdünnungen und dem der Standardkurve ermittelt wurden ($m_{\text{Probe}} / m_{\text{Standard}}$). Die Standardisierung der relativen Reaktivitäten der individuellen Proben erlaubte einen quantitativen Vergleich der Antikörperantworten der individuellen Proben der Versuchstiere aller Immunisierungsgruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Probenentnahme. Die mukosale IgA Aktivität wurde, soweit nicht anders vermerkt, in Relation zum ermittelten Gesamtgehalt an lokalem IgA angegeben ($m_{\text{Probe}} / m_{\text{Standard}} / C_{\text{Gesamt IgA}}$), um den Einfluss von Variationen der Gesamt-IgA Konzentrationen der individuellen Proben auf die relative Reaktivität zu eliminieren (III.3.3.2).

III.3.3.1 Isolierung von Gesamt IgA aus Stuhlproben

Im Vorfeld der IgA-Konzentrationsbestimmungen wurde in Anlehnung an etablierte Protokolle der Einfluss verschiedener Puffer zu Isolierung von Gesamt-IgA (II.7.4) aus bei -20°C gelagerten Stuhlproben (PBS-T (0,05% (v/v) Tween), 2% RSA; PBS-T (0,02% (v/v) Tween; PBS-T (0,05% (v/v) Tween); PBS-T (0,05% (v/v) Tween, Complete Proteaseinhibitor (Roche, nach Herstellerangaben) auf die Extraktionseffizienz bzw. die Stabilität von IgA im ELISA und im Western Blot unter denaturierenden und nicht denaturierenden Bedingungen analysiert (Daten nicht gezeigt).

Da sich die eingesetzten Puffer in Bezug auf die Extraktionseffizienz nicht unterschieden, die Stabilität von IgA durch Zugabe von Proteaseinhibitoren nicht weiter gesteigert werden konnte und die Detektionsantikörper eine hohe Kreuzreaktivität mit RSA aufwiesen, wurden die Isolierungen von Gesamt IgA im Rahmen dieser Arbeit mit PBS-T (0,05% (v/v)Tween) durchgeführt (II.7.4).

III.3.3.2 Gesamt IgA-Konzentrationsbestimmungen

Die Gesamt IgA-Konzentration in den Stuhlproben von Versuchstieren kann u.a. durch Streß, z.B. bedingt durch eine suboptimale Haltung, oder unbemerkten Infektionen stark variieren (IV.4.2.10). Die Konzentration nach Isolierung der Immunglobuline (II.7.4) kann durch Unterschiede in der Reinigungseffizienz, einer unterschiedlichen Konsistenz der gesammelten Kotballen sowie einem potentiellen proteolytischen Abbau von Antikörpern während der Probenentnahme und der Lagerung zusätzlichen Schwankungen unterworfen sein. Starke IgA-Konzentrationsschwankungen können einen nicht unwesentlichen Einfluss auf den Verlauf und die Interpretation von Antikörperantworten ausüben. Für die Ermittlung von spezifischen mukosalen Antikörperantworten ist daher eine Korrelation der ermittelten antigenspezifischen Antikörperantworten (III.3.3.3) mit der Gesamt IgA-Konzentration essentiell.

III.3.3.2.1 Etablierung der ELISA Setups zur Quantifizierung von Gesamt IgA

Die Quantifizierung des Gesamt IgA in Stuhlextrakten erfolgte nach Isolierung der Immunglobuline aus Stuhlproben von Maus 1 (Gruppe I, Tab. III.4) vor (0) sowie 14, 28, 42 und 57 Tage nach der ersten Immunisierung mittels PBS-T (0,05 % (v/v) Tween) (II.7.4) im Sandwich-Verfahren. Drei ELISA-Varianten, die sich durch die verwendeten Immobilisierungs-Antikörper unterschieden, wurden bezüglich der Qualität und Quantität, sowie der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse evaluiert. Dazu wurden die zu analysierenden Stuhlextrakte jeweils mit einer Startverdünnung von 1:50 in einer seriellen 1:2 Verdünnung

auf die beschichteten Mikrotiterplatten aufgetragen. Zur Erstellung einer Eichgerade wurde ein kommerzieller IgA κ Standard (Sigma) in einer Startkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ mitgeführt. Der Nachweis immobilisierter IgA-Antikörper erfolgte in allen Fällen mit Hilfe eines schwere (α -) Kette-spezifischen Antiserums aus Kaninchen (K α -IgA, II.1.2). Aufgrund einer hohen Hintergrundaktivität durch unspezifische Bindung der Nachweisantikörper an RSA (III.3.3.1) wurde zum Abblocken freier Proteinbindestellen ausschließlich Milchpulver verwendet (II.7.5.1).

Im ersten ELISA-Setup wurde eine Mikrotiterplatte mit polyklonalen Ziegenantikörpern (Z α -IgG,-IgA,-IgM, II.1.2) beschichtet, die neben IgA ebenfalls mit Immunglobulinen der Klassen G und M reagieren und sich in Western Blot Analysen als vorwiegend leichte Kette-spezifisch erwiesen hatten (s.u., Abb. III.21.A). Die erstellten Balkendiagramme zeigten eine auffällige Abnahme der ermittelten Gesamt-IgA-Konzentration nach der ersten oralen Immunisierung (Abb. III.20.A, Setup 1). Die Verwendung des polyspezifischen Antiserums gegen verschiedene Immunglobulinklassen zur Immobilisierung von IgA erwies sich als problematisch. Die aus den seriellen Probenverdünnungen erstellten Absorptionskurven erreichten im Vergleich zum IgA-Standard, vermutlich aufgrund einer potentiellen Immobilisierung von IgG und IgM, die in geringen Mengen in mukosalen Sekreten vorkommen können, schon bei OD-Werten von $\sim\text{max. } 2,5$ die Sättigung (Abb. III.20.B, Setup 1). Der beobachtete kompetitive Effekt erschwerte eine exakte und reproduzierbare Kalkulation der IgA-Konzentrationen.

Alternativ erfolgte die Beschichtung von Mikrotiterplatten mit einem α -Kette-spezifischen Antiserum aus Ziege (Z α -IgA, II.1.2). Im Vergleich zu Konzentrationsbestimmungen mit Setup 1 wurden eine 1,7-fach höhere Konzentration in der Präimmunprobe (0) bzw. durchschnittlich 1,2–fach höhere Konzentrationen in den Postimmunproben (14-57 Tage p.i) ermittelt. Im Unterschied zu Setup 1 erwies sich Setup 2 offensichtlich als weniger störanfällig für kompetitive Effekte. Die erstellten Absorptionskurven zeigten, dass wesentlich höhere Sättigungswerte erreicht werden konnten (Abb. III.20.B, Setup 2). Als kritisch erwies sich jedoch der im Western Blot beobachtete selektive Abbau der leichten Kette nach der ersten und zweiten oralen Immunisierung (s.u., Abb. III.21.A). Da Setup 2 ausschließlich die Konzentration der schweren Kette des IgA-Moleküls berücksichtigte, die schwere und leichte Kette nach Lagerung und IgA-Isolierung jedoch offensichtlich, zumindest unter denaturierenden Bedingungen im Western Blot, eine abweichende Sensitivität gegenüber proteolytischem Abbau aufwies, erwies sich Setup 2 als ungeeignet,

um in direkte Relation mit den unter III.3.3.3 aufgeführten antigenspezifischen Immunantworten gesetzt zu werden.

Setup 3 basierte durch die Verwendung eines Fab-spezifischen Antiserums ($Z\alpha M$ (Fab), II.1.2) auf der Immobilisierung ausschließlich vollständig assoziierter Antikörpermoleküle und berücksichtigte somit die beobachtete Instabilität der leichten Kette. Im Vergleich zu Setup 2, das ausschließlich die Konzentration der schweren Kette des IgA-Moleküls reflektierte, wurden durchschnittlich 1,5-fach geringere Gesamt IgA-Konzentrationen in den Postimmunproben (14-57 Tage p.i.) ermittelt (Abb. III.20.A, Setup 3). Trotz einer potentiellen Immobilisierung von Antikörpermolekülen anderer Immunglobulinklassen konnte, mit Ausnahme von Probe 14 Tage p.i., ein vernachlässigbar geringer kompetitiver Einfluss auf die IgA-Bindungsaktivität beobachtet werden (Abb. III.20.B, Setup 3).

Aufgrund der vorliegenden Daten, die in zwei weiteren unabhängigen Untersuchungen reproduziert werden konnten (Ergebnisse nicht gezeigt), wurde der geringste Einfluß auf die Präzision und Verlässlichkeit der im Nachfolgenden ermittelten Gesamt IgA-Konzentrationen für Setup 3 erwartet.

Die Quantifizierung des Gesamt IgA mit Hilfe von ELISA-Analysen ergab, unabhängig vom ELISA-Setup, eine unerwartet signifikante Konzentrationsabnahme nach oraler Immunisierung. Der Nachweis der schweren und leichten Kette der IgA-Moleküle im Western Blot sollte Aufschluss über den potentiellen Einfluss proteolytischer Aktivität auf die Integrität der Antikörperketten geben und ein systemimmanentes Problem im ELISA ausschließen (Abb. III.21). Der immunologische Nachweis von IgA im Western Blot erfolgte unter Verwendung der Antiseren $Z\alpha$ -IgG, IgA, IgM (Abb. III.21.A) bzw. $K\alpha$ -IgA (Abb. III.21.B). Wie bereits erwähnt erwies sich $Z\alpha$ -IgG, IgA, IgM als vorwiegend leichte Kette-spezifisch und führte im Fall der Prä- sowie der Postimmunprobe 14 Tage p.i. zur Detektion einer signifikanten Proteinbande, die dem Molekulargewicht von leichten Immunglobulinketten entsprach (Abb. III.21.A). Die Konzentrationen der leichten Kette in den Postimmunproben 28-57 Tage p.i. befanden sich unterhalb des Detektionslimits. Diese Beobachtung korrelierte mit der Tendenz der überwiegenden Anzahl aller stichprobenartig im Western Blot analysierten Proben (Ergebnisse nicht gezeigt) sowie mit den signifikanten IgA-Verlusten im ELISA (s.o.). Ein möglicher Isotypenwechsel der leichten Kette während des Immunisierungsverlaufs sollte durch die Verwendung eines λ -Kette-spezifischen monoklonalen Antikörpers aus Ratte im Western Blot untersucht werden. Aufgrund von Kreuzreaktivitäten des eingesetzten enzymkonjugierten Sekundärantikörpers mit der leichten

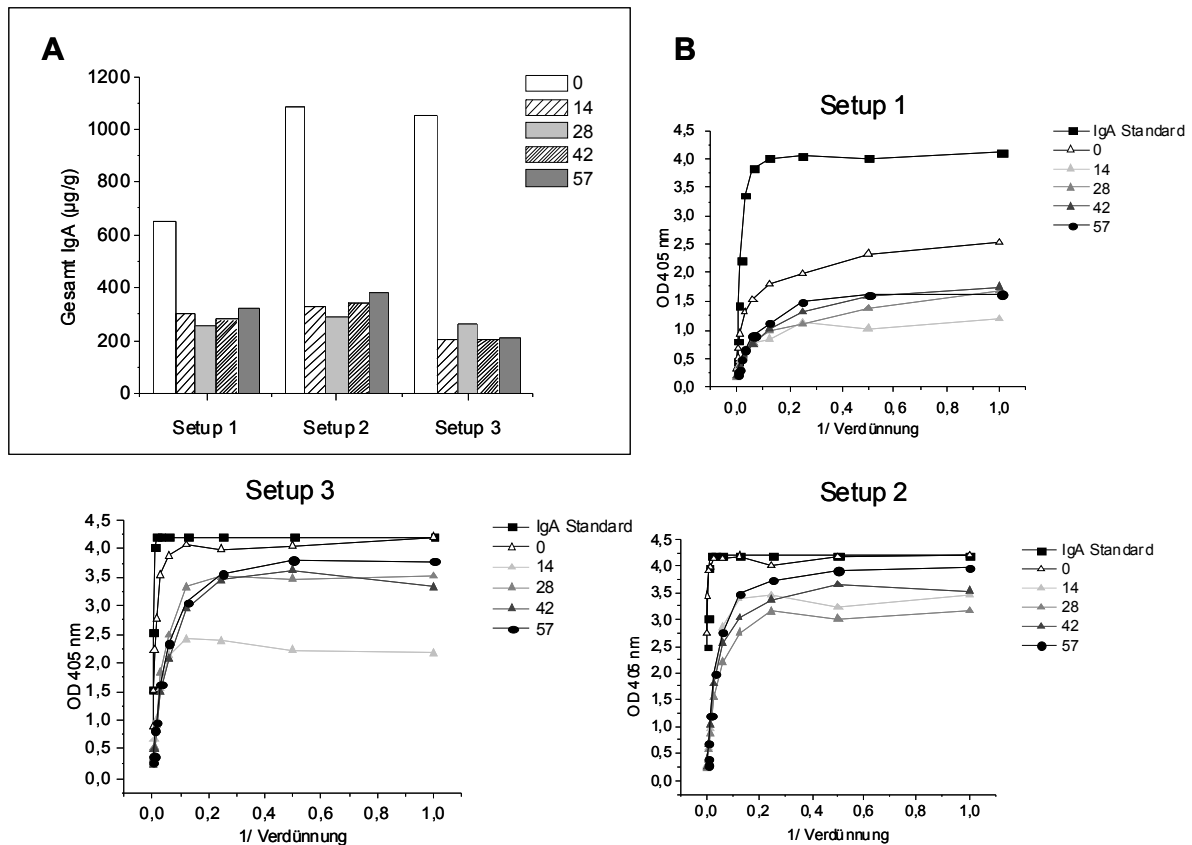


Abbildung III.20: Evaluierung von drei verschiedenen ELISA Setups zur Quantifizierung des Gesamt IgA.

A: Die IgA-Konzentration in Stuhlproben von Maus 1 (Gruppe I) vor (0) sowie 14, 28, 42 und 57 Tage nach der ersten Immunisierung ist gezeigt. Die Quantifizierung erfolgte nach Isolierung von Gesamt IgA (II.7.4), Immobilisierung von IgA mit Hilfe von drei verschiedenen Antisera (Setup 1: $Z\alpha$ -IgG, IgA, IgM), Setup 2: $Z\alpha$ -IgA (α -Kette-spezifisch), Setup 3: $Z\alpha$ M (Fab)), Detektion mittels $K\alpha$ -IgA (α -Kette-spezifisch) und $Z\alpha$ K^{HRPO} und photometrischer Absorptionsmessung des Substratschlags anhand bekannter Konzentrationen eines kommerziellen IgA κ Standards (10 μ g/ml) (II.7.5.1). B: Die korrespondierenden Absorptionskurven zeigen die lineare Darstellung des Kurvenverlaufs des kommerziellen IgA κ -Standards sowie der individuellen Proben vor der Festlegung der Regressionsgeraden. Die gemessenen OD-Werte wurden gegen den reziproken Wert der Probenverdünnung aufgetragen.

Kette des verwendeten IgA κ Kontrollantikörpers und der Proben lieferten die generierten Daten jedoch keinen weiteren Informationsgewinn (Ergebnisse nicht gezeigt).

Der Nachweis der schweren Kette mit Hilfe von $K\alpha$ -IgA (II.1.2) war dagegen in allen analysierten Proben möglich (Abb. III.21.B). Die höchsten Konzentrationen konnten in den Proben 42 und 57 Tage p.i. detektiert werden, die keine nachweislichen Mengen der leichten Kette aufwiesen (Abb. III.21.A). In der Präimmunprobe (0) sowie der Probe 14 Tage p.i. konnten verstärkt Abbauprodukte nachgewiesen werden. Im Allgemeinen divergierten die Konzentrationen der schweren Kette in allen analysierten Proben jedoch sehr stark (Ergebnisse nicht gezeigt), möglicherweise aufgrund eines nicht zu vernachlässigen Einflusses der Probenlagerung und -konsistenz auf ihre Stabilität, und hatten damit einen

signifikanten Einfluss auf die Ermittlung und Interpretation der antigenspezifischen Immunantworten (III.3.3.3).

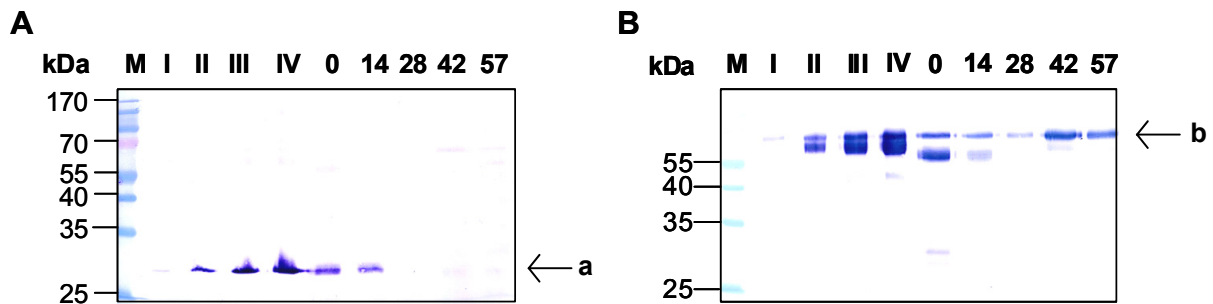


Abbildung III.21: Western Blot Analyse zum qualitativen Nachweis der schweren und leichten Kette in Stuhlproben nach Isolierung von Gesamt IgA.

Der immunologische Nachweis der schweren und leichten Kette erfolgte in jeweils 10 μ l Stuhlextrakt von Maus 17 (Tab. III.4) vor (0) sowie 14, 28, 42 und 57 Tage nach der ersten Immunisierung mittels $Z\alpha$ -IgG, IgA, IgM und $K\alpha Z^{AP}$ (A) bzw. $K\alpha$ -IgA und $Z\alpha K^{AP}$ (B) und nachfolgender Visualisierung in einer AP-Substratreaktion (II.3.5). M: „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB); I-IV: IgA κ , I: 10 ng; II: 50 ng, III: 100 ng, IV: 200 ng; 0: Präimmunprobe; 14: Postimmunprobe 14 Tage p.i.; 28: Postimmunprobe 28 Tage p.i.; 42: Postimmunprobe 42 Tage p.i.; 57 Postimmunprobe 57 Tage p.i.. Die Pfeile markieren die Position der leichten (a) und schweren Kette (b).

III.3.3.2.2 Analyse des Gesamt IgA in den Stuhlproben

Die Abbildungen III.22.A und III.22.B zeigen die im ELISA (III.3.3.2.1, Setup 3) (II.7.5.1) ermittelten Gruppenmittelwerte der Gesamt IgA-Konzentration in den Prä- sowie Postimmunproben von jeweils sechs Mäusen der Immunisierungsgruppen I-IV (Tab. III.4). Die durchschnittliche Entwicklung der Gesamt IgA-Konzentration der Prä- und Postimmunproben von Versuchstieren der Immunisierungsgruppe I, denen Futterpellets mit gemörserten Tabakblattmaterial verabreicht wurde, korrelierten erwartungsgemäß mit den unter III.3.3.2.1 aufgeführten Vorversuchen zur Evaluierung der ELISA-Setups, die mit Probenmaterial von Maus 1 (Gruppe I) durchgeführt wurden. Der ermittelte Gruppenmittelwert für die Präimmunproben lag mit 1136 μ g/g (SEM \pm 147,8) deutlich (5,2-fach) oberhalb des durchschnittlichen Gruppenmittelwertes der Postimmunproben 14-57 (218 μ g/g (SEM \pm 28,4)) (Abb. III.22.A). Während die ermittelten Durchschnittswerte der Präimmunproben von Mäusen der Gruppe II, die zu Blattstückchen verarbeitetes Material erhielten, mit denen von Gruppe I korrelierten (1264,1 μ g/g (SEM \pm 108,8)) wurden in den Postimmunproben generell deutlich höhere IgA-Konzentrationen ermittelt. In den Postimmunproben 14 Tage p.i. wurde mit durchschnittlich 5,2-fach höheren Gesamt IgA-Konzentrationen der signifikanteste Unterschied im Vergleich zu den zeitgleich entnommenen Proben der Gruppe I beobachtet. Die Postimmunproben 28-57 Tage p.i. wiesen mit einer mittleren Konzentration von 522 μ g/g (SEM \pm 69,6) im Vergleich zu Gruppe I eine

mit durchschnittlich 2,4-fach deutlich geringere Reduktion der Gesamt IgA-Konzentration auf. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass der unterschiedliche Prozessierungsgrad des nikotinhaltigen Pflanzenmaterials einen Einfluss auf den Gesamt IgA-Gehalt der Stuhlproben ausüben könnte. Möglicherweise führte der stärkere Aufschluss des Blattmaterials in Präparationsvariante 1 zu einer vermehrten Freisetzung des toxischen Sekundärmetabolits Nikotin, das einen potentiell immunsuppressiven Effekt auf das mukosale Immunsystem ausüben könnte (IV.4.2.7).

Abbildung III.22.B zeigt den Einfluss der coapplizierter mukosalen Adjuvantien BPPCysPEG und PQS-PEG auf die durchschnittliche Entwicklung der Gesamt IgA-Konzentration der Prä- und Postimmunproben der Gruppen III und IV (Tab. III.4) durch den direkten Vergleich mit den Gruppenmittelwerten von Mäusen der Gruppe I. Mit einem mittleren Gesamt IgA-Gehalt von 1431,9 $\mu\text{g/g}$ (SEM \pm 147,8) wurden für die Präimmunproben der Mäuse aus Gruppe III, denen intranasal BPPCysPEG appliziert wurde, die höchsten Werte ermittelt. Auffällig war eine deutlich geringere Abnahme des lokalen Gesamt IgA in den Postimmunproben im Vergleich zu Mäusen der Gruppe I, die Futterpellets der identischen Präparationsvariante ohne intranasale Coapplikation von Adjuvans erhielten. Im Vergleich zu Gruppe I konnten mit einer mittleren IgA-Konzentration von 527,8 $\mu\text{g/g}$ (SEM \pm 94,1) in den Postimmungruppen 14-57 durchschnittlich 2,4-fach höhere Werte ermittelt werden. In Übereinstimmung mit Gruppe III lag die durchschnittliche IgA-Konzentration der Postimmunproben 14-57 von Versuchstieren der Gruppe IV, denen PQS-PEG appliziert wurde, mit 405,9 $\mu\text{g/g}$ (SEM \pm 79,4) deutlich über der der Gruppe I (Abb. III.22.B). Im Vergleich zu den übrigen Immunisierungsgruppen wurden mit durchschnittlich 819,6 $\mu\text{g/g}$ (SEM \pm 51,0) die niedrigsten IgA-Konzentrationen in den Präimmunproben nachgewiesen.

Der Vergleich der mittleren Gesamt IgA-Konzentrationen der Versuchstiere der Immunisierungsgruppen I, III und IV ergab, dass die intranasale Coapplikation der mukosalen Adjuvantien zu einer deutlich höheren durchschnittlichen IgA-Konzentration in den Postimmunproben von Mäusen der Gruppen III und IV führte.

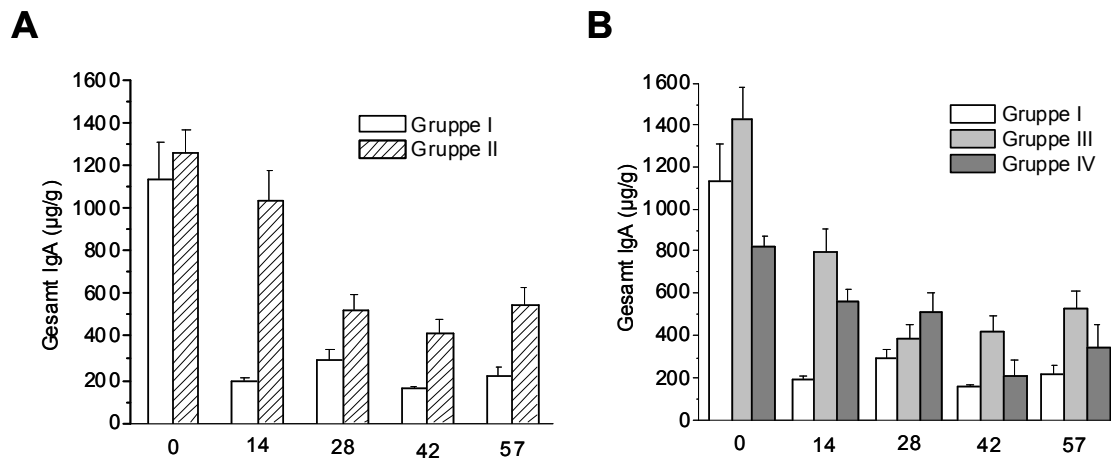


Abbildung III.22: ELISA zur Analyse des quantitativen Einflusses der Vakzinformulierungen auf die Gesamt IgA-Konzentration.

Die mittlere IgA-Konzentration in Stuhlextrakten der Immunisierungsgruppen I (Präparationsvariante 1, Blattpulver) und II (Präparationsvariante 2, Blattstückchen) (A) bzw. I, III (Präparationsvariante 1 + BPPCysPEG) und IV (Präparationsvariante 1 + PQS-PEG) (B) vor (0) sowie 14, 28, 42 und 57 Tage nach der ersten Immunisierung ist dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte nach Isolierung von Gesamt IgA aus den Stuhlproben (II.7.4) und Immobilisierung mit Hilfe von $Z\alpha M$ (Fab) mittels der Antiseren $K\alpha$ -IgA (α -Kette spezifisch) und $Z\alpha K^{HRPO}$ und photometrischer Absorptionsmessung des Substratumschlags anhand bekannter Konzentrationen eines $IgA_{K\alpha}$ Standards (II.7.5.1). Die individuellen Säulen repräsentieren den Gruppenmittelwert \pm SEM von jeweils sechs Mäusen der Immunisierungsgruppen I-IV.

III.3.3.3 Analyse der mukosalen Immunantwort

III.3.3.3.1 Bestimmung CTB-spezifischer Antikörperantworten

Die quantitative Analyse der CTB-spezifischen IgA-Antikörperantworten erfolgte im direkten ELISA (II.7.5.2). Dazu wurden Mikrotiterplatten mit hoher Bindekapazität mit bakteriell exprimiertem CTB (II.3.6) in einer Konzentration von 220 ng/ml beschichtet. Eine indirekte Kopplung von CTB führte zu keiner messbaren Änderung der OD_{405} -Werte in den analysierten Stuhlproben und des Standards (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher wurde ausgeschlossen, dass durch die direkte Beschichtung möglicherweise immunrelevante Epitope nicht zugänglich waren. Die erfolgreiche Adsorption von CTB an die Platten sowie eine ausreichende Antigenkonzentration in der Beschichtungslösung wurde durch die Verwendung eines seriell verdünnten kommerziellen Kontrollserums ($K\alpha$ -CT, II.1.2) bestätigt. Der Nachweis spezifisch gebundener IgA-Antikörper erfolgte mit Hilfe von $K\alpha$ -IgA und $Z\alpha K^{HRPO}$.

Die ermittelten OD -Werte der Probenverdünnungen der überwiegenden Anzahl aller Versuchstiere waren im Vergleich zum verwendeten Kontrollserum generell sehr gering ($\sim 0,4$ bis $0,8$) (IV.4.2.11). Sie lagen teilweise nur knapp über dem für den Blank ermittelten Mittelwert und konnten in einigen Fällen nicht als positiv bewertet werden (Ergebnisse nicht

gezeigt). Sie wurden jedoch zugunsten einer besseren Dokumentation des durchschnittlichen Verlaufs der Reaktivitäten in Stuhlproben der individuellen Immunisierungsgruppen über die gesamte Immunisierungszeitdauer ebenfalls in die Berechnungen der Gruppenmittelwerte (s.u.) einbezogen. Unerwartet waren die im Vergleich zu den Postimmunproben auffällig hohen OD-Werte der individuellen seriell verdünnten Präimmunproben (Ergebnisse nicht gezeigt). Da die Versuchstiere im Vorfeld der Immunisierungen unter sterilen Bedingungen nach SPF (Specified Pathogen Free) gezüchtet und gehalten wurden, war ein Kontakt mit CTB bzw. antigenetisch homologen Proteinen als äußerst gering einzuschätzen. Aufgrund der sehr komplexen Zusammensetzung von Stuhlproben (Mikroorganismen und bakterielle Komponenten, Nahrungsbestandteile, Proteasen, etc.) und der hohen Affinität von sIgA zu Glykanstrukturen im Mukus, die eine unspezifische Bindung an gecoatete Antigene bewirken können, werden beim Einsatz proteinanalytischer Nachweisverfahren zur Bestimmung mukosaler IgA-Antikörperantworten generell häufig Kreuzreaktivitäten beobachtet. Dies erschwert eine Auswertung und Interpretation der Ergebnisse oder macht sie gar unmöglich (IV.4.2.11). Eine unspezifische Bindung von IgA an die Blockierungslösung (Milchpulver) konnte jedoch ausgeschlossen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Auf die Darstellung der relativen Reaktivitäten in den Proben der individuellen Versuchstiere nach Standardisierung und Korrelation mit dem ermittelten Gesamt IgA wurde verzichtet, da sie keinen weiteren Aufschluss über die Immunogenität des CTB-Fusionspartners lieferten. Obwohl in den Postimmunproben einiger Versuchstiere der Immunisierungsgruppen I und III nach Korrelation mit dem Gesamt IgA ein Anstieg der relativen Reaktivität ($m_{\text{Probe}}/m_{\text{Standard}}/C_{\text{Gesamt IgA}}$) beobachtet werden konnte, der außerhalb des natürlichen Schwankungsbereich biologischer Analyseverfahren lag, wurde eine CTB-spezifische Antikörperantwort aufgrund der signifikanten Heterogenität der ermittelten relativen Reaktivitäten sowohl innerhalb einer Immunisierungsgruppe als auch über die Immunisierungsdauer und der mitunter hohen Reaktivität in den Präimmunproben ausgeschlossen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Ermittlung des arithmetischen Gruppenmittelwertes der Prä- und Postimmunproben sollte Aufschluss über die Tendenz der relativen Reaktivitäten über den gesamten Immunisierungszeitraum innerhalb einer Gruppe geben. Abbildung III.23 verdeutlicht, dass für keine der Immunisierungsgruppen ein eindeutiger Anstieg der relativen Reaktivität zu verzeichnen war. Der oral applizierte pflanzenproduzierte Impfstoff führte, unabhängig von der eingesetzten Präparationsvariante und der Coapplikation mukosaler Adjuvantien, entgegen früherer Beobachtungen nicht zur Induktion mukosaler CTB-spezifischer Antikörperantworten (IV.4.2.3). Die signifikant hohe mittlere Reaktivität in den

Stuhlextrakten der Kontrollmäuse vor der Immunsisierung konnte in einem unabhängigen Versuchsansatz reproduziert werden und war auf eine hohe Reaktivität in der Präimmunprobe von Kontrollmaus 25 zurückzuführen (Tab. III.4).

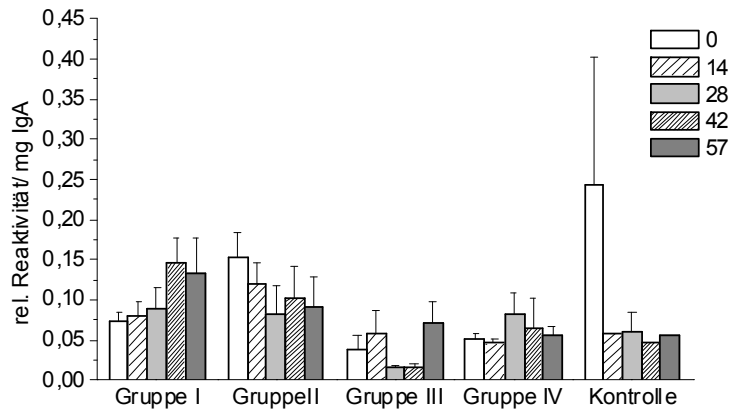


Abbildung III.23: Verlauf mukosaler CTB-spezifischer Antikörperantworten.

Die CTB-spezifische lokale IgA-Antikörperantwort im direkten ELISA (II.7.5.2) unter der Verwendung von bakteriell exprimierten CTB vor (0) sowie 14, 28, 42 und 57 Tage nach der ersten Immunsisierung ist gezeigt. Die individuellen Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SEM der CTB-spezifischen IgA-Antworten in individuellen Stuhlproben von jeweils sechs Mäusen der Immunsierungsgruppen I-IV bzw. zwei Mäusen der Kontrollgruppe. Im Fall der Versuchstiere 15, 19, 21 und 26 konnten nur jeweils die Proben 0-28 arithmetisch gemittelt werden, da sie vor Abschluss der Immunsierungen verendeten bzw. nicht ausreichend Probenmaterial zur Verfügung stand. Die Stuhlproben der individuellen Versuchstiere wurden in einer Startverdünnung von 1:100 eingesetzt und seriell 1:2 verdünnt. Die Detektion CTB-spezifischer IgA Antikörper erfolgte mittels $\text{K}\alpha$ -IgA (α -Kette spezifisch) und $\text{Z}\alpha\text{K}^{\text{HRPO}}$ und nachfolgender Substratreaktion (II.7.5.2). Die durchschnittlichen IgA-Antworten wurden als relative Reaktivität angegeben, die als Mittelwert der linearen Regressionssteigung der Probenverdünnungen einer Immunsierungsgruppe nach Standardisierung mit einem kommerziellen Kontrollserum ($\text{K}\alpha$ -CT) definiert ist ($m_{\text{Probe}}/m_{\text{Standard}}$) und mit dem durchschnittlichen Gesamt IgA der Prä- und Postimmunproben der individuellen Gruppen (III.3.3.2.2) korreliert wurde (rel. Reaktivität/ mg IgA).

III.3.3.3.2 Bestimmung HVR1-spezifischer Antikörperantworten

Zur Analyse HVR1-spezifischer Immunantworten erfolgte eine Beschichtung der ELISA-Platten mit dem HVR1-Konsensus epitop R9 (I.4.1). Da HVR1 aufgrund des geringen Molekulargewichts (2,7 kDa, Tab. III.1) ungeeignet ist, bei einer direkten Beschichtung der ELISA-Platten eine Zugänglichkeit der immunrelevanten Epitope zu gewährleisten, erfolgte die Beschichtung der Platten mit dem bereits als GST-Fusionsprotein vorliegenden bakteriell exprimierten R9-Tandemkonstrukt GST-R9R9 (Dr. K. Uhde-Holzem, Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen, II.7.5.2). Als Positivkontrolle wurde ein Antiserum gegen R9 ($\text{K}\alpha$ -R9 (R208), II.1.2) eingesetzt. Da die Analyse der Reaktivität gegen indirekt gecoatetes GST-R9R9 keinen messbaren Unterschied in der Absorption ergab, wurde die direkte Beschichtung der Platten einer indirekten vorgezogen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Analyse HVR1-spezifischer mukosaler Immunantworten wurde aus Kapazitäts- und Zeitgründen nicht mit der Gesamtheit der gesammelten Stuhlproben, sondern vorwiegend mit Stuhlproben von Mäusen durchgeführt, die in Abschnitt III.3.3.1 den höchsten Anstieg der relativen Reaktivität aufwiesen. Abbildung III.24.A zeigt die relative Reaktivität ($m_{\text{Probe}}/m_{\text{Standard}}/C_{\text{Gesamt IgA}}$) von IgA gegen GST-R9R9 am Beispiel der Versuchstiere 13 und 18 (Gruppe III, Tab. III.4.). Nach oraler Immunisierung konnte insbesondere im Fall von Maus 13 ein signifikanter Anstieg der Reaktivität beobachtet werden (Abb. III.24.A). In einem weiteren Experiment sollte durch die Immobilisierung von sowohl GST-R9R9 als auch GST auf der identischen Mikrotiterplatte analysiert werden, ob die beobachteten Signalanstiege in Abbildung III.24.A auf eine Reaktivität gegen R9R9 oder aber gegen den Fusionspartner GST zurückzuführen waren (Abb. III.24.B). Als Positivkontrolle diente ein GST-spezifisches Antiserum aus Kaninchen ($K\alpha$ -GST, II.1.2). Die Analyse der Reaktivität ($m_{\text{Probe}}/C_{\text{Gesamt IgA}}$) gegen GST und GST-R9R9 zeigte, dass die beobachteten Signalanstiege (ausgefüllte Säulen) ausschließlich auf einer Reaktivität von mukosalem IgA gegen GST beruhten (schraffierte Säulen) (Abb. III.24.B), ein Phänomen das zuvor schon häufig in der Literatur beschrieben wurde [295].

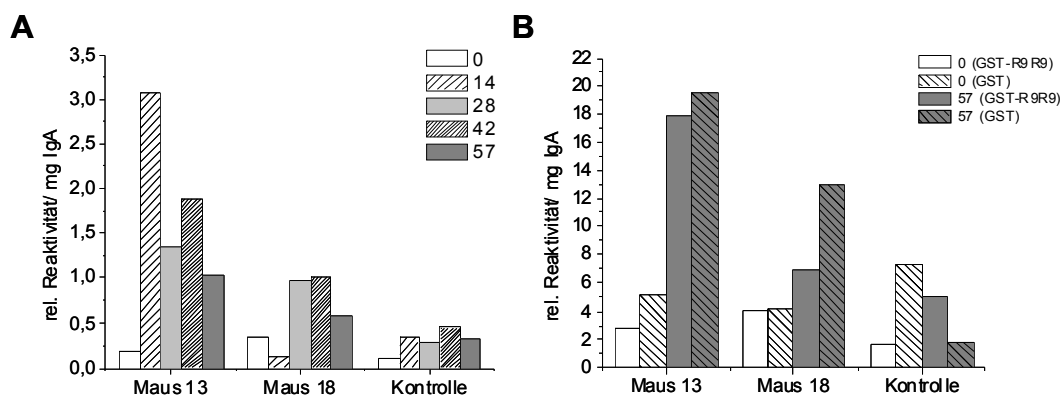


Abbildung III.24: Verlauf mukosaler HVR1-spezifischer Antikörperantworten.

Die HVR1-spezifische lokale IgA Antikörperantwort im direkten ELISA (II.7.5.2) unter der Verwendung von bakteriell exprimiertem GST-R9R9 vor (0) sowie 14, 28 und 57 Tage nach der ersten Immunisierung (A) sowie die Analyse einer potentiellen Reaktivität gegen den GST-Fusionspartner im direkten Vergleich zu GST-R9R9 vor (0) sowie 57 Tage nach der ersten Immunisierung (B) ist am Beispiel von zwei Mäusen der Immunisierungsgruppe III (Maus 13 und Maus 18, Tab.III.4) dargestellt. Als Negativkontrolle diente Maus 25. Die Stuhlproben der individuellen Versuchstiere wurden in einer Startverdünnung von 1:100 eingesetzt und seriell 1:2 verdünnt. Die Detektion HVR1-spezifischer IgA-Antikörper erfolgte mittels $K\alpha$ -IgA (α -Kette spezifisch) und $Z\alpha K^{\text{HRPO}}$ und nachfolgender Substratreaktion (II.1.2). Die IgA-Antworten wurden als relative Reaktivität angegeben, die als Steigung der linearen Regressionsgeraden der seriell verdünnten Proben mit ($m_{\text{Probe}}/m_{\text{Standard}}$) (A) und ohne (m_{Probe}) (B) Standardisierung mit dem eingesetzten Kontrollserum $K\alpha$ -R9 (R208) definiert ist und wurde mit dem durchschnittlichen Gesamt IgA der Prä- und Postimmunproben der individuellen Gruppen (III.3.3.2.2) korreliert (rel. Reaktivität / mg IgA).

Analog zu den Beobachtungen der Bestimmung CTB-spezifischer mukosaler Immunantworten konnten demnach selbst nach Substitution eines mukosalen Adjuvans keine messbaren HVR1-spezifischen IgA-Antikörperantworten in den stichprobenartig getesteten Stuhlproben der Versuchstiere nachgewiesen werden, obwohl publizierte Daten die Immunogenität von pflanzenproduzierten HVR1 im Rahmen einer mukosalen Immunisierung von Mäusen belegen (IV.4.2).

III.3.3.3 Analyse mukosaler Antikörperantworten gegen pflanzenexprimiertes CTB-HVR1-TCRCys

Durch die Präsentation von CTB und HVR1 als Fusionsprotein mit der Membranankervariante TCRCys können einerseits neue Epitope entstehen, gegen die potentielle Antikörperantworten induziert werden. Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, dass native Epitope aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Aminosäureresten der Fusionspartner nicht mehr ausgeprägt werden bzw. nicht mehr zugänglich sind. Das könnte besonders auf das mit einem Molekulargewicht von 2,7 kDa sehr kleine HVR1 zutreffen (IV.4.2.5). Da im ELISA keine eindeutigen mukosalen Antikörperantworten gegen die bakteriell exprimierten Antigene CTB und HVR1 ermittelt werden konnten (III.3.3.3.1 und III.3.3.3.2), wurde in einem weiteren Ansatz die Bindungsaktivität von lokalem IgA gegen das pflanzenexprimierte Fusionsprotein CTB-HVR1-TCRCys analysiert. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit Gangliosid GM1 beschichtet und CTB-HVR1-TCRCys aus dem Pflanzenrohextrakt immobilisiert (II.7.5.3). Als Negativkontrolle diente Wildtyp-Pflanzenextrakt der analog zum transgenen Material in identischen Gesamtproteinkonzentrationen jeweils auf der identischen GM1-beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert wurde. Die erfolgreiche Immobilisierung von CTB-HVR1-TCRCys wurde durch die Verwendung eines kommerziellen Antiserums (K α -CT, II.1.2) bestätigt. Abbildung III.25.A zeigt am Beispiel der Versuchstiere der Gruppe III (Tab. III.4) die mit Hilfe von ELISA ermittelte durchschnittliche relative Reaktivität von lokalem IgA gegen CTB-HVR1-TCRCys in den Präimmunproben und der letzten Postimmunprobe (57 Tage p.i.) nach Korrelation mit dem durchschnittlichen Gesamt IgA. Im Fall des transgenen Setups konnte in den gemittelten Postimmunproben durchschnittlich ein 2,6-facher Anstieg der Reaktivität im Vergleich zu den Präimmunproben beobachtet werden (ausgefüllte Säulen). Ein Standardfehler (SEM) von $\pm 0,9$ verdeutlicht die relativ heterogene Stärke der Immunantworten der individuellen Versuchstiere. In allen Fällen konnte jedoch ein Anstieg der relativen Reaktivität beobachtet werden. Der parallele Ansatz mit Wildtyp-Pflanzenextrakt verdeutlichte, dass im Durchschnitt 57,7% der Reaktivität in den

Präimmunproben bzw. 48,4% in den Postimmunproben nicht auf einer spezifischen Bindung an CTB-HVR1-TCRCys zurückzuführen war.

Die Inkubation von Stuhlextrakte vor bzw. nach der letzten Immunisierung von Maus 15 (Gruppe III, Tab. III.4) auf GM1-beschichteten Platten sowie solchen, die anschließend mit Wildtyp-Tabakextrakt inkubiert wurden, zeigten, dass das beobachtete Signal in der Wildtyp-Kontrolle nicht auf eine unspezifische Bindung an GM1, sondern offensichtlich auf eine Reaktivität gegen Pflanzenkomponenten zurückzuführen war, die durch eine Affinität gegen GM1 oder wahrscheinlicher gegen die Blockierungslösung (Milchpulver) auf der ELISA-Platte immobilisiert wurden (Abb. III.25.B). Dabei konnte nicht geklärt werden, ob es sich dabei um eine unspezifische oder spezifische Bindung handelte. Eine Induktion mukosaler Immunantworten gegen Tabakkomponenten ist nicht abwegig, da die Versuchstiere im Rahmen ihrer normalen Diät nicht mit Pflanzenkomponenten konfrontiert werden und daher vermutlich auch keine orale Toleranz ausbilden (IV.4.2.6).

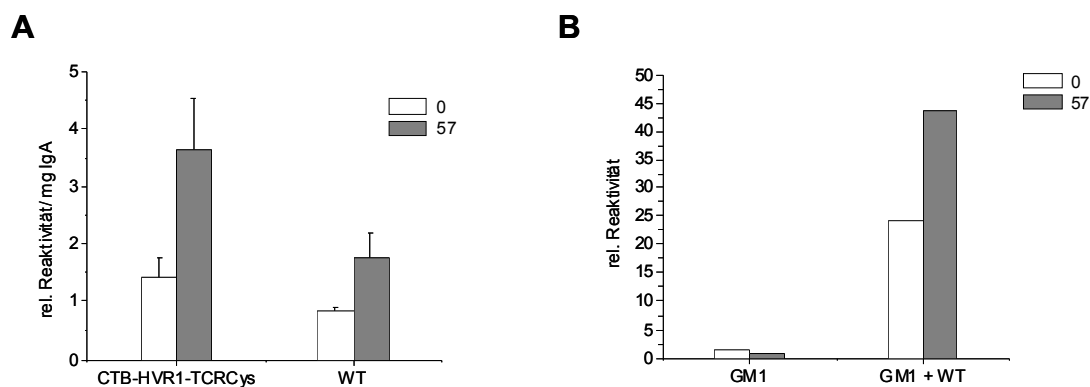


Abbildung III.25: GM1-ELISA zur Bestimmung der mukosalen IgA-Antikörperantworten gegen pflanzenexprimiertes CTB-HVR1-TCRCys.

A: Die IgA-Antikörperantworten in Stuhlproben von Mäusen der Immunisierungsgruppe III vor (0) und 57 Tage nach der ersten Immunisierung (57) pro mg Gesamt IgA sind gezeigt. Die individuellen Säulen repräsentieren den Gruppenmittelwert \pm SEM der Antikörperantworten in Stuhlextrakten von sechs Mäusen der Gruppe III (Tab. III.4) gegen immobilisiertes CTB-HVR1-TCRCys (A) bzw. Wildtyp-Pflanzenextrakt (B). Die Detektion immobilisierter IgA-Antikörper erfolgte mittels $K\alpha$ -IgA (α -Kette spezifisch) und $Z\alpha K^{HRPO}$ und nachfolgender Substratreaktion (II.7.5.3). Die durchschnittlichen IgA-Antikörperantworten wurden als relative Reaktivität angegeben, die als Mittelwert der linearen Regressionssteigung der seriell verdünnten Proben definiert ist (m_{Probe}) und mit dem mittleren Gesamt IgA der individuellen Proben (III.3.3.2.2) korreliert wurde (rel. Reaktivität/ mg IgA). B: Die Reaktivität (m_{Probe}) in Stuhlproben von Maus 15 (Gruppe III) gegen GM1 bzw. Pflanzenkomponenten wurde nach Immobilisierung von GM1 (links) und anschließender Inkubation mit Wildtyp-Pflanzenextrakt (rechts) bestimmt.

III.3.3.4 Analyse systemischer humoralen Immunantworten

Da die orale Verabreichung von Antigenen grundsätzlich das Potential besitzt, neben der Aktivierung lokaler Mechanismen der Infektabwehr eine periphere Immunität in Form von

Serum IgG und auch IgA zu induzieren (I.1.6), erfolgte ebenfalls die Analyse der antigenspezifischen Aktivität im Serum (II.7.5.2).

Analog zur lokalen IgA-Reaktion konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen für keines der analysierten Versuchstiere eine antigenspezifische systemische IgG- bzw. IgA-Antikörperantwort nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Zudem erwies sich die Analyse spezifischer Serum IgA-Antikörperantworten aufgrund einer Kreuzreaktivität gegen eine Reihe von Blockierungslösungen, die zuvor bei der Analyse lokaler Immunantworten nicht beobachtet wurde, als problematisch. Da die generierten Daten keinen weiteren Aufschluß über die potentielle Immunogenität des pflanzenproduzierten Impfstoffes auf systemischer Ebene lieferten, wurde auf ihre Darstellung verzichtet.

IV. DISKUSSION

Eine Vielzahl der weltweit relevanten Krankheitserreger wird über die Schleimhäute des Gastrointestinal-, Respirations-, und Urogenitaltrakts übertragen. Da systemische Immunisierungen keinen mukosalen Impfschutz vermitteln, sollten Impfstoffe gegen mukosal übertragbare Pathogene über die Schleimhäute applizierbar sein. Oral applizierbare Impfstoffe besitzen das Potential, neben einer lokalen Infektabwehr an den Schleimhäuten des Darms eine spezifische Immunabwehr in entfernten mukosalen Geweben, sowie eine systemische Immunität zu induzieren. Die Produktion rekombinanter Vakzinantigene in gentechnisch modifizierten Pflanzen ist im Vergleich zu klassischen Produktionsverfahren aufgrund von produktions-, handhabungs- und sicherheitstechnischen Vorzügen vorteilhaft. Häufig ist jedoch die geringe Produktivität pflanzlicher Expressionssysteme inkompatibel mit einer direkten Verabreichung von unprozessiertem Pflanzenmaterial. Frühere Studien haben gezeigt, dass ein gezieltes Targeting in Kompartimente, die eine höhere Proteinstabilität garantieren, pflanzenbiotechnologische Produktionsverfahren zur Herstellung pharmazeutisch relevanter Proteine entscheidend optimieren können (I.2.2). Der Einsatz oral applizierbarer Impfstoffe ist jedoch durch die Sensitivität vieler löslicher Vakzinantigene gegenüber proteolytischem Abbau im Gastrointestinaltrakt (GIT) limitiert. Ihre Wirksamkeit setzt jedoch nicht nur eine Stabilität des Zielantigens während der Passage durch den GIT, sondern ebenfalls eine effiziente Aufnahme über das Schleimhautepithel voraus. Dies beruht auf der Affinität des Impfstoffes zu apikalen Oberflächenstrukturen von Epithelzellen im Bereich des FAE (Follikel-assoziiertes Epithelium), genauer gesagt, auf dem Potential, im Bereich des darmassoziierten Immunsystems von immunrelevanten Zellen der Schleimhaut (M-Zellen und spezialisierten DC's) aufgenommen zu werden (IV.4.1). Das immunogene Potential oraler Impfstoffe kann durch eine Präsentation der Antigene in partikulärer Form entscheidend optimiert werden [144-146, 296]. Verschiedene Strategien, die eine partikuläre Präsentation und/oder ein Targeting von Vakzinantigenen zum Mukosaepithel bzw. M-Zellen bewirken, wurden bereits erfolgreich im Tierversuch und in klinischen Studien getestet (I.3.1). Zum größten Teil setzt die im Anschluss an die Produktion erfolgende Formulierung der Impfstoffe jedoch die kostenintensive Reinigung der Antigene voraus und ist daher unter ökonomischen Aspekten unvorteilhaft. In dieser Arbeit wurde erstmals die Integration von zwei Modellantigenen, dem synthetischen Consensus epitop R9 der hypervariablen Region 1 (HVR1) des Hepatitis C Virus und die des immunologisch relevanten sekretorischen Proteins MPT64 aus *Mycobacterium tuberculosis*, in die Pflanzenzellmembran angestrebt. Dadurch sollten zwei der relevantesten Probleme, die die Etablierung effektiver essbarer Impfstoffe

massiv erschweren, umgangen werden: 1. geringe Akkumulation der Proteinantigene im Pflanzensystem und 2. unzureichende Immunogenität löslicher Subunit-Vakzine. Als heterologe Transmembrananker wurden definierte Bereiche einer verkürzten konstanten Region der beta-Untereinheit des humanen T-Zell-Rezeptors (TCR β) verwendet, die C-terminal fusioniert zu einer Integration in die Plasmamembran und Präsentation der Antigene auf der Pflanzenzelle führen sollten (III.1.1.1 und III.1.3). Die funktionale rekombinante Expression der vollständigen konstanten TCR β in Säugetier- und Pflanzenzellen wurde bereits in der Literatur beschrieben und resultierte in einer signifikanten Akkumulationssteigerung eines fusionierten scFv-Fragmentes in Tabak [123]. Die zielgerichtete Expression rekombinanter Antigene als membranständige Fusionsproteine besitzt demnach das Potential, sowohl auf produktionstechnischer als auch auf immunologischer Ebene, zur Optimierung oral applizierbarer Impfstoffe beizutragen. Die Präsentation der Antigene als genetische Fusion mit der B-Untereinheit des Cholera Toxins (CTB) sollte durch ein gezieltes Targeting des Impfstoffes zum Mukosaepithel, bedingt durch die Affinität des CTB-Fusionspartners zu seinem nativen Rezeptor Monosialgangliosid GM1 auf der apikalen Zelloberfläche von Epithelzellen, die Antigenaufnahme über die Darmschleimhaut verbessern (I.3.1.1). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die chimären Modellantigene CTB-HVR1 und CTB-MPT64 an unterschiedliche Versionen der TCR β -Kette mit verkürzter extrazellulärer Domäne fusioniert (TCRCys, TCRhinge und TCR, III.1 und III.1.1.1), um den Einfluß der extrazellulären Linkerregionen auf die Stabilität der Antigene in der Zellmembran von zwei Tabakvarietäten zu evaluieren. Das immunogene Potential des vielversprechendsten membranständigen Vakzinkandidaten CTB-HVR1-TCRCys wurde nach oraler Verabreichung des essbaren Impfstoffes an Mäuse auf mukosaler und systemischer Ebene analysiert. Desweiteren wurde der Einfluss zweier intranasal coapplizierter, mukosaler Adjuvantien (modifiziertes MALP-2 und PQS; I.3.1.2, I.3.1.3 und II.1.7) auf das immunogene Potential des oral applizierbaren Impfstoffes aus Tabak evaluiert.

IV.1 Akkumulation der löslichen und membranständigen Antigene

Die löslichen und membranständigen Modellantigene CTB-HVR1 und CTB-MPT64 wurden, im Fall von HVR1 unter der Verwendung einer synthetischen pflanzenkodonoptimierten Gensequenz, unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors über *Agrobacterium*-vermittelte Transformation transient und stabil in den Tabakkultivaren *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 und cv. Nft51 sowie BY-2 Suspensionszellen exprimiert. Western Blot bzw. GM1-ELISA Analysen bestätigten die funktionale Expression der rekombinanten Fusionsproteine.

Die Ergebnisse im GM1-ELISA unter der Verwendung CTB-spezifischer Antikörper zeigten, dass die Fusion von CTB-HVR1 bzw. CTB-MPT64 an die verkürzte TCRCys Version der β -Kette des humanen TCR zu einer durchschnittlich 186- bzw. 1,6-fachen Steigerung der Akkumulation pentamerer CTB-Chimäre im transienten System führte. Unter der Berücksichtigung der jeweils drei bestproduzierenden Pflanzen der Generationen T_0 bis T_2 , resultierte die Expression in transgenem Tabak in eine durchschnittlich 25- bzw. 20-fache Steigerung der Akkumulation (Abb. III.3 und Tab. III.2). Ein potentiell toxischer Effekt der sekretierten Antigene, den die geringe Regenerationseffizienz zunächst vermuten ließ (III.1.2.2), konnte durch den Vergleich der Ergebnisse mit den transienten Ansätzen sowie die beobachtete Steigerung der Akkumulation in den Tochtergenerationen (Tab. III.2) ausgeschlossen werden. Der direkte quantitative Vergleich der Membranankervarianten TCRhinge und TCRCys im GM1-ELISA zeigte erstmals, dass nicht ausschließlich der Einfluss der Membranintegration durch Verknüpfung mit TCR β für die beobachtete Akkumulationssteigerung verantwortlich ist. Der stabilisierende Effekt wurde sehr wahrscheinlich durch die Dimerisierung zweier verkürzter TCR β -Ketten, die auf der Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke durch Oxidation der Sulfhydrylgruppen der Cysteine im hinge-Bereich beruht, signifikant verstärkt. Vermutlich wurden potentiell exponierte Proteaseerkennungssequenzen im Fusionskonstrukt durch die Dimerisierung zweier CTB-Moleküle maskiert. Dieser Effekt könnte durch eine Pentamerisierung des CTB-Fusionspartners weiter verstärkt worden sein. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die finale Konfiguration der Antigene im Mikromilieu biologischer Membranen auf der Stufe eines Dimers persistiert, oder ob die Dimerisierung eine Pentamerisierung der CTB-Fusionsproteine begünstigte (IV.2).

Unabhängig von der Proteinversion konnte eine generell höhere Produktivität des Kultivars *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 beobachtet werden. Die beobachteten Akkumulationssteigerungen durch die Membranintegration von CTB-HVR1 und CTB-MPT64 stehen im Einklang mit generierten und teilweise publizierten Daten der membranständigen Expression des scFv24 in Tabak. Die Fusion an die vollständige konstante extrazelluläre Domäne der TCR β -Kette resultierte in eine 36-fache Akkumulationsteigerung [123, 262]. Dies bestätigt die prinzipielle Eignung der TCR β -Kette zur Steigerung der Akkumulation rekombinanter Proteine unterschiedlicher Herkunft (Antikörperfragmente, virale und bakterielle Antigene) und Molekulargewichte im Pflanzensystem.

Im Unterschied zur Akkumulation der Modellantigene in Tabakpflanzen ergaben Western Blot Analysen der Expression von sekretiertem und membranverankerten GFP in BY-2 Zellen

eine 5- bis 10-fach höhere Akkumulation der löslichen Variante (III.1.3.2.5). Diese Beobachtung korrelierte mit der Abnahme der Akkumulation von TCRCys bzw. TCR β -membranverankertem Interleukin-10 und scFv29 im Vergleich zur ER-retardierten bzw. sekretierten Variante [129] (persönliche Mitteilung L. Bortesi, Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen). Auffällig war zudem, dass im Unterschied zu CTB-HVR1-TCRCys, das unter denaturierenden Bedingungen im Western Blot relativ stabil vorlag (Abb. III.4), mehr als 50% des GFP-Fusionspartners vom Membrananker abgespalten wurde. Dies basierte vermutlich auf einer Sensitivität gegenüber proteolytischem Abbau im Fusionsbereich (Abb. III.10-III.12). Offensichtlich ist durch die Fusion von rekombinanten Proteinen an potentiell geeignete Plasmamembrananker keine generelle Akkumulationssteigerung zu erwarten. Vermutlich hängt eine potentielle Proteinstabilisierung in pflanzlichen Membranen nicht nur von den physikochemischen Eigenschaften des Zielproteins, sondern von weiteren Faktoren, wie dem Mikromilieu der Ziellmembran und der Wahl des Transmembrananker, die einen signifikanten Einfluss auf die korrekte Faltung und Stabilität heterologer Proteine im Bereich der Membran ausüben können, ab.

Quantifizierungen der Antigenmenge mit Hilfe von GM1-ELISA und Oberflächenplasmonresonanz (SPR) ergaben Differenzen, die außerhalb des Schwankungsbereichs bioanalytischer Messverfahren lagen (III.1.2.4). Kontrollen mit Hilfe von GM1-ELISA ergaben, dass die zum Zeitpunkt der Analyse bis zu 10-fach geringer gemessenen Konzentrationen mittels SPR auf einer Konzentrationsabnahme des im ELISA eingesetzten CTB-Standards basierten. Dies wurde auf unterschiedliche Lagerungsbedingungen und verschiedene Puffersysteme zur Verdünnung des verwendeten Standards zurückgeführt (III.1.2.4).

Der Vergleich der erzielten CTB-HVR1-TCRCys-Proteinmengen in *N. tabacum* (Tab. III.2) mit publizierten Daten der Akkumulation eines transient in *N. benthamiana* exprimierten CTB-HVR1-Fusionsproteins durch den Einsatz eines viralen Vektorsystems [244] ergab, trotz einer potentiellen Überbewertung der Proteinmengen im GM1-ELISA, eine vergleichbare Antigenkonzentration. Selbst unter der Berücksichtigung einer 10-fachen Konzentrationsüberschätzung konnten im Fall von CTB-HVR1-TCRCys Antigenmengen angereichert werden, die einerseits mit transienten viralen Systemen konkurrieren können und andererseits prinzipiell mit einer oralen Verabreichung von unprozessiertem Pflanzenmaterial im Einklang stehen (III.2.1.1). Der Einsatz des in dieser Arbeit evaluierten Membranankers TCRCys als Fusionspartner von Vakzinantigenen könnte damit die erste Hürde auf dem Weg zur Entwicklung essbarer Impfstoffe überwinden.

IV.2 Funktionalität des CTB-Fusionspartners

Die Adjuvansfunktion der Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB) basiert auf der rezeptorvermittelten Aufnahme von CTB und fusionierten Antigenen in Epithelzellen der Schleimhäute (I.3.1.1), die auf einer hochspezifischen, multivalenten Bindung an das Glycosid-Motiv der Pentasaccharidkette des Gangliosid GM1 (Gal(β 1-3)GalNAc(β 1-4)(NeuAc(α 2-3))Gal(β 1-4)Glc(β 1-1)-Ceramid) auf ihrer apikalen Membran beruht [297]. Mittels kristallographischer Analysen wurden insgesamt fünf Bindestellen auf dem B-Pentamer identifiziert, die eine kooperative Bindung mit fünf GM1 Kopien eingehen [298, 299]. Die individuellen Bindungstaschen werden vorwiegend durch Aminosäurereste eines Monomers ausgebildet. Der Glycinrest an Position 33 (Gly-33) der benachbarten Polypeptidkette ist jedoch an der GM1-Bindung beteiligt, was eine Pentamerisierung von CTB voraussetzt, und ist, wie auch Trp-88, essentiell für die Rezeptorbindung [300, 301]. Gemäß vorliegender 3-D Strukturmodelle konnten mehr als ein Dutzend weiterer Aminosäurereste des CTB identifiziert werden, die direkt oder indirekt an der Pentasaccharidbindung beteiligt sind [298]. Ihr genauer Beitrag zur GM1-Bindungsaffinität konnte aber noch nicht vollständig aufgeklärt werden [302].

Die Carrierfunktion von CTB im Kontext genetischer CTB-Antigen-Konjugate basiert auf der Fähigkeit der CTB-Einheiten, trotz N- oder C-terminaler Antigenfusionen, in die pentamere Form zu assemblieren (s.u.). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Funktionalitätsanalysen mittels GM1-ELISA und SPR bestätigten die GM1-Bindungsaffinität des CTB-Fusionspartners der löslichen und membranständigen CTB-Fusionsproteine nach Extraktion aus transient sowie stabil transformierten Tabakpflanzen (III.1.2.1 und III.1.2.2). In Übereinstimmung mit früheren Befunden war pflanzenexprimiertes CTB befähigt, unabhängig vom C-terminalen Fusionspartner, seine funktionale Konfiguration einzunehmen (s.u.). Die Funktionalität von CTB-HVR1 in *Nicotiana* Spezies wurde bereits von Nemchinov *et al.* (2000) gezeigt. Frühere Beobachtungen der Biogenese des Holotoxin-Komplexes von CT und des nah verwandten hitzelabilen Enterotoxins aus *E. coli* (Etx) weisen darauf hin, dass sowohl die Ausbildung der Tertiärstruktur der individuellen Polypeptidketten als auch ihre Zusammenlagerung in die pentamere B-Untereinheit bzw. den heterohexameren Holotoxin-Komplex im Periplasma erfolgen [303-305]. Analog zur nativen Expression in *V. cholerae* erfolgte in dieser Arbeit durch die Verwendung einer murinen Signalsequenz ein heterologes Targeting der CTB-Fusionsproteine in den sekretorischen Weg (III.1.1.1 und III.1.1.2). Im pflanzlichen ER erfolgte offensichtlich die korrekte Faltung und Zusammenlagerung der monomeren Polypeptidketten in die pentamere Struktur, die

Voraussetzung für die Bindung an GM1 ist. Die Sekretion von CTB ist jedoch offensichtlich nicht essentiell für die Assemblierung der monomeren CTB-Untereinheiten in die oligomere Form. Die funktionale ER-retardierte [187, 306] sowie plastidäre Expression von CTB nach stabiler Integration in das Chloroplasten-Genom [100, 307-310] bestätigt die korrekte Faltung und offeriert die Möglichkeit der Nutzung alternativer Expressionstrategien zur Akkumulationssteigerung von CTB. Das Cytosol ist generell aufgrund der vorherrschenden reduzierenden Bedingungen weniger für die Expression multimerer Proteine geeignet. Eine effiziente Pentamerisierung von CTB konnte weder im Cytoplasma von *E. coli* noch von *Pichia pastoris* nachgewiesen werden [274, 311, 312]. Offensichtlich wird die Zusammenlagerung der monomeren Untereinheiten durch eine Aufkonzentrierung im Apoplast bzw. Lumen von Organellen begünstigt [274], ein Mechanismus, der der Assemblierung des Holotoxins im Periplasma des Gram-negativen Bakteriums *V. cholerae* ähnelt [303].

Da die Funktionalitätsanalysen ausschliesslich nach der Extraktion von Gesamtprotein mit detergentenhaltigem Puffer, d.h. nach der Solubilisierung von Membranproteinen erfolgten, erlaubten die GM1-ELISA Analysen keinen Rückschluss auf die Pentamerisierung der CTB-Fusionsproteine im Pflanzensystem bzw. in pflanzlichen Membranen. Erste Hinweise auf die Funktionalität von CTB im Kontext pflanzlicher Membranen lieferte die Immobilisierung von in Membranfraktionen enthaltenen CTB-Fusionsproteinen auf GM1-beschichteten Mikrotiterplatten im Rahmen von GM1-ELISA Analysen (Ergebnisse nicht gezeigt). In der Literatur liegen bislang jedoch keine Daten vor, die die Funktionalität von CTB im Mikromilieu pflanzlicher Membranen bestätigen könnten.

Der Einfluss einer potentiellen N-Glykosylierung auf die Funktionalität des CTB-Fusionspartners wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert. Publierte Daten weisen darauf hin, dass eine pflanzentypische Glykosylierung der potentiellen N-Glykosylierungsstelle innerhalb der CTB-Proteinsequenz (III.1.2.3) zu einer erhöhten GM1-Bindungsaffinität führt [273]. Größenbestimmungen im Western Blot ergaben jedoch, dass CTB-HVR1-TCRCys vermutlich überwiegend in der unglykosylierten Form vorliegt (III.1.2.3; Abb. III.4).

Der Vergleich der Akkumulation der Modellantigene CTB-HVR1-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys ergab im Fall von CTB-HVR1 einen deutlich höheren Einfluss der Membranverankerung auf die Antigenmenge (III.1.2.2). Der signifikante Größenunterschied zwischen HVR1 und MPT64 (Tab. III.1) gab Anlass zu der Fragestellung, ob die beobachteten Konzentrationsunterschiede der im GM1-ELISA berücksichtigten pentameren

Formen auf einem differentiellen Einfluss der Membranverankerung auf die Proteinstabilität oder auf einer sterischen Behinderung der Pentamerisierung durch den größeren Fusionspartner MPT64 beruhen. Gemäß vorliegender Forschungsergebnisse können größere Fusionspartner einen massiven Einfluss auf die Funktionalität der CTB-Einheit ausüben, was den Einsatz von CTB als mukosales Carriermolekül für höhermolekulare Antigene einschränkt [274]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen im GM1-ELISA und mittels SPR lieferten jedoch keinen Hinweis auf einen negativen Einfluss von MPT64 auf die Funktionalität des CTB-Fusionspartners. Desweiteren bestätigen zahlreiche Beispiele in der Literatur das Potential einer funktionalen Expression von chimärem CTB mit größeren C-terminalen Fusionspartnern [195, 307, 313, 314].

Neben der Größe des Fusionspartners kann offensichtlich auch der Insertionsort einen signifikanten Einfluss auf die Funktionalität des rekombinanten CTB-Moleküls ausüben [312, 315]. Generell scheinen C-terminale Fusionen im Vergleich zu N-terminalen und dualen Fusionen jedoch eine wesentlich geringere Auswirkung auf die Pentamerisierungseffizienz auszuüben. Offensichtlich spielt auch hier die Größe des Fusionspartners eine Rolle, da die Wahrscheinlichkeit des Auftretens sterischer Probleme bei kleineren Molekülen wesentlich geringer ist. So bestätigen zahlreiche publizierte Befunde die Assemblierung chimärer CTB-Fusionsproteine mit niedermolekularen Fusionspartnern in die GM1 Rezeptor-bindende Form [196, 316-319]. Selbst die Insertion eines HIV-1-gp120-Epitopes innerhalb der CTB-Proteinsequenz erlaubte die Assemblierung der monomeren CTB-Chimäre in die funktionale, pentamere Form [320].

Die eingeschränkte Nutzung von CTB für die genetische Konjugation größerer Zielproteine limitiert den Einsatz des mukosalen Carriermoleküls für eine Vielzahl höhermolekularer medizinisch relevanter Antigene, deren potentiell protektive Epitope noch nicht identifiziert sind bzw. für die Induktion spezifischer Immunität gegen konformationelle Epitope, die nur im Kontext des Volllängenproteins gewährleistet ist. Die Optimierung der CTB-Carrier-Technologie ist derzeit Gegenstand aktueller Forschung. Die genetische Fusion von Zielantigenen an detoxifizierte Versionen der A2-Untereinheit des Cholera Toxins mit dem Ziel der Assemblierung in Holotoxin-ähnlicher Komplexe hat sich in einigen Fällen als erfolgreich erwiesen [321, 322]. Dies ist jedoch aufgrund der häufig beobachteten niedrigen Assemblierungseffizienz der A- und B-Untereinheiten nur eingeschränkt einsetzbar [195, 323]. Weitere Studien verfolgen die Reduktion der sterischen Behinderung durch die Coexpression von unfusioniertem CTB und resultierten in die erfolgreiche Steigerung der

Pentamerisierungseffizienz heteropentamerer CTB-Moleküle im Vergleich zur homopentameren Version [274].

IV.3 Funktionalität der TCRCys-Membranankervariante

Neben der Funktionalität der konstanten Region der humanen TCR β -Kette *in planta* [123] wurde ebenfalls die funktionale Expression weiterer Transmembrananker nicht pflanzlichen Ursprungs im Pflanzensystem nachgewiesen. Immunfluoreszenzmikroskopische und elektronenmikroskopische Analysen der Lokalisation der transmembranen schweren Kette des murinen $\gamma 1$ Immunglobulins [122] sowie der chimären scFv29-pIgR und scFv29-pIgR_{mut}, Fusionsprodukte aus dem anti-TMV spezifischen scFv29 und dem humanen poly-Ig-Rezeptor (pIgR) bzw. einer Variante mit mutiertem Endozytosesignal [129], und scFv24-PDGFR basierend auf der Transmembrandomäne des humanen „platelet-derived growth factor receptor“ (PDGFR) [123] bestätigten die korrekte Lokalisation der Proteinkonstrukte.

In der vorliegenden Arbeit wurden ein murines Signalpeptid (LPH) und verkürzte Versionen der humanen TCR β -Kette verwendet, um ein heterologes Targeting der Modellantigene CTB-HVR1 und CTB-MPT64 zur Pflanzenzellmembran zu bewirken (III.1.1.1 und III.1.1.2). Die Funktionalität der vielversprechensten Membranankervariante TCRCys wurde durch biochemische und konfokal-fluoreszenzmikroskopische Arbeiten analysiert. Nachdem die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von Protoplasten CTB-HVR1-TCRCys- und CTB-MPT64-TCRCys-exprimierender BY-2 Zellen keine eindeutigen Hinweise auf die Membranintegrität der Proteinkonstrukte lieferte (III.1.3.1), erfolgte die Generierung von löslichen und membranständigen GFP-Fusionskonstrukten, die weiteren Aufschluss über die Funktionalität des TCRCys-Membranankers geben sollten (III.1.3.2).

Erste Hinweise auf die funktionale Expression der TCRCys-Membranankervariante in Tabak lieferte die Abwesenheit intakter membranständiger Fusionsproteine im Kulturüberstand GFP-TCRCys- und CTB-MPT64-TCRCys-GFP-produzierender transgener BY-2 Zellkulturen im Western Blot, obwohl ein eindeutiger Nachweis der intakten Fusionsproteine im Zellextrakt möglich war (Abb. III.11). In Western Blot Analysen von BY-2 Zellextrakten und Kulturüberständen konnten selbst nach 10-tägiger Inkubation ausschliesslich im Kulturüberstand GFPapo-produzierender BY-2 Zellen spezifische Proteinbanden detektiert werden, die vorwiegend GFPapo ohne N-terminalen 20aa Linker entsprachen. Der Linker wurde bereits in früheren Studien eingesetzt und sollte die korrekte Faltung der individuellen Fusionspartner garantieren [280]. Ein schneller proteolytischer Abbau von GFP nach einer möglichen Freisetzung der membranständigen Konstrukte in den Kulturüberstand wurde

durch die beobachtete Inkubationszeit-abhängige Zunahme des GFP-Signals im Überstand GFPapo-exprimierender BY-2 Zellen ausgeschlossen (Abb. III.11.A-III.C).

Das signifikant hohe intrazelluläre Signal im Vergleich zur extrazellulären GFP-Konzentration nach 4-tägiger Inkubation GFPapo-produzierender BY-2 Zellkulturen zeigte, dass GFPapo auffällig langsam in den Kulturüberstand sekretiert wurde (Abb. III.11.A). Einerseits ist eine enzymatische Abspaltung des Linkers durch Proteasen im Kulturüberstand denkbar. Andererseits könnte die langsame Sekretion von GFP jedoch auch ein Anzeichen dafür sein, dass die hydrophoben Sequenzanteile des Linkers, vermutlich aufgrund einer Interaktion mit lipophilen Komponenten biologischer Membranen, mit der schnellen Freisetzung von löslichem GFP in den Kulturüberstand interferierten. Obwohl die Analyse der Proteinsequenz mit Hilfe des „Transmembran Prediction Server`s“ TMHMM GFPapo als lösliches Protein klassifizierte, besteht die Möglichkeit, dass der überwiegende Anteil von GFPapo aufgrund einer erhöhten Affinität des 20aaLinkers zu Membranstrukturen so lange in Kompartimenten des sekretorischen Weges bzw. an der Zellmembran zurückgehalten wird, bis es zur proteolytischen Abspaltung der Linkersequenz kommt. Die zweite Theorie wurde durch die Analyse der Membranfraktion GFPapo-produzierender BY-2 Zellen im Western Blot bekräftigt, die ausschliesslich den Nachweis des intakten 20aaLinker-GFP erlaubte (Abb. III.12.A). Der Einsatz des 20aaLinker-GFP-Konstruktes als sekretiertes Kontrollprotein erwies sich demnach im Nachhinein als ungünstig, da die hydrophoben Reste des Linkers die Aussagekraft der biochemischen und fluoreszenzmikroskopischen (s.u.) Funktionalitätsanalysen des gewählten Transmembranankers abschwächten.

Der Nachweis intakter GFP-Fusionsproteine im Western Blot durch den Einsatz eines GFP-spezifischen Antikörpers wurde durch die Generierung von Proteaseschnittstellen im Fusionsbereich erschwert, die in die Abspaltung signifikanter GFP Mengen vom Membrananker und die nachfolgende Sekretion des löslichen GFP ohne 20aaLinker in den Kulturüberstand GFP-TCRCys-produzierender BY-2 Zellen resultierte (Abb.III.11.D). Konzentrationsabschätzungen anhand von Western Blots ergaben, dass bereits nach 4-tägiger Inkubation bis zu 50% des GFP-Reporterproteins vom Membrananker abgespalten wurden, während nach zehn Tagen ausschließlich abgespaltenes GFP detektiert werden konnte (Abb. III.11.C). Die Inkubationszeitabhängige Freisetzung des GFP-Reporters vom Membrananker bestätigte, dass die GFP-Abspaltung *in vivo* erfolgte und nicht erst nach der Gesamtproteinextraktion.

Die Analyse der Überstände und Membranfraktionen nach Ultrazentrifugation von Zellhomogenaten transgener GFPapo-, GFP-TCRCys- und CTB-MPT64-TCRCys-GFP-

exprimierender BY-2 Zellen im Western Blot (Abb. III.12.A-III.12.C). ergab, dass erstaunlicherweise nicht nur die membranständigen Proteinkonstrukte, sondern ebenfalls das sekretorische Kontrollkonstrukt GFP_{Papo} in der Membranfraktion nachgewiesen werden konnte (Abb. III.12.A). Während im Fall von GFP_{Papo} jedoch ausschliesslich intaktes 20aaLinker-GFP in der Membranfraktion akkumulierte, vermutlich aufgrund seiner Affinität zu Membranstrukturen (s.o.), konnte zumindest im Fall von GFP-TCRCys-produzierenden BY-2 Zellen überwiegend GFP-TCRCys ohne 20aaLinker detektiert werden (Abb. III.12.B). Im Fall CTB-MPT64-TCRCys-GFP-produzierender BY-2 Zellen konnte eine Anreicherung des intakten Membranproteins ausschliesslich in der Membranfraktion beobachtet werden (Abb. III.12.C), während ein gewisser Anteil von GFP-TCRCys in den Überstand nach Ultrazentrifugation sowie in die Waschfraktion freigesetzt wurde (Abb. III.12.B). Diese Beobachtung konnte durch den Vergleich mit GM1-ELISA Analysen der Überstände nach Ultrazentrifugation und Membranfraktionen CTB-HVR1-TCRCys- und CTB-MPT64-TCRCys-produzierender BY-2 Zellen bestätigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies lieferte Hinweise auf eine relativ instabile Membranverankerung der Proteinkonstrukte durch Verknüpfung mit TCRCys.

Der T-Zell-Rezeptor-Komplex besteht ursprünglich aus insgesamt sieben integralen Proteinen, der TCR α - und β -Kette mit variablen Regionen, die für die spezifische Antigenerkennung verantwortlich sind, und den invarianten Proteinen des CD3-Komplexes. Dieser besteht aus CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ und dem über Disulfidbrücken assoziierten ζ -Dimer, welche den intrazellularen Transport von TCR α und TCR β und die Kommunikation mit dem Signaltransduktionsweg kontrollieren [324]. Die Transmembrandomänen der CD3 Proteine [325] und der α - und β -Kette enthalten unüblicherweise geladene Aminosäurereste mit entgegengesetzter Ladung, die für die Assemblierung und den Transport des Rezeptor-Komplexes zur Zelloberfläche essentiell sind [326, 327]. In T-Zellen erfolgt während der Assemblierung des Rezeptor-Komplexes die Neutralisierung des basischen Lysinrestes der β -Kette bzw. des basischen Lysin- und Argininrestes der α -Kette durch die sauren Aminosäurereste der CD3-Proteine [328, 329]. Der fehlende Ladungsausgleich durch die Expression von TCR β ohne Anwesenheit der CD3-Proteine könnte durch die positive Ladung innerhalb des lipophilen Milieus der Membran für die beobachtete Instabilität der Membranverankerung verantwortlich sein. Der semiquantitative Vergleich der Überstände und Membranfraktionen nach Ultrazentrifugation GFP-TCRCys- und CTB-MPT64-TCRCys-GFP-exprimierender BY-2 Zellen gibt einen Hinweis darauf, dass die Membranverankerung

möglicherweise durch das C-terminal an TCRCys fusionierte 20aaLinker-GFP Fusionskonstrukt stabilisiert werden konnte (Abb. III.12.B und III.12.C).

Obwohl die Fusion an TCRCys eher zu einer instabilen Verankerung in die Membran führte, offeriert die erfolgreiche Anreicherung der membranständigen Proteine in der Membranfraktion die generelle Möglichkeit zur kosteneffektiven Reinigung und Aufkonzentrierung von rekombinanten Transmembranproteinen ohne den Einsatz kosten- und zeitintensiver chromatographischer Techniken und anschließender Entfernung von Affinitätstags.

Der Einsatz von GFP als Reporterprotein ermöglichte durch den Vergleich der subzellulären Signalakkumulation in GFPapo-, GFP-TCRCys- und CTB-MPT64-TCRCys-GFP- und CTB-HVR1-TCRCys-GFP-produzierendem Tabak sowie BY-2 Zellen in *in vitro* und *in vivo* Analysen weitere Aussagen über die Funktionalität des Membranankers. Die durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Analysen bestätigten die Sekretion von GFPapo in den Apoplast (Abb. III.14.A) sowie den Ausschluss von Fluoreszenz im Interzellularraum angrenzender GFP-TCRCys- und CTB-MPT64-TCRCys-GFP-produzierender Blattepithelzellen (Abb. III.14.B und III.14.C). Die Abwesenheit des membranständigen GFP im Apoplast sowie der schmale Cytoplasmasaum in Kombination mit dem geringen Auflösungsvermögen des konfokalen Mikroskopes, erlaubten jedoch keinen direkten Nachweis der Membranintegration. Zudem wurde, mit Ausnahme einer Inkubationszeit-abhängigen Akkumulation von löslichem GFPapo in der Vakuole transgener BY-2 Zellen sowie einem Nachweis des GFP-Signals im Nukleoplasma transient transformierter Blattepidermiszellen, ein relativ ähnliches Fluoreszenzmuster in allen analysierten Zell- bzw. Pflanzenlinien beobachtet (Abb. III.13). Die Signalanreicherung im Nukleoplasma infiltrierter GFPapo-produzierender Blattepidermiszellen (Abb. III.13.A, rechts und Abb. III.14.A) wurde aufgrund von fehlenden Fluoreszenzsignalen im Zellkern von BY-2 Zellen und Protoplasten auf eine stressinduzierte Autofluoreszenz im Bereich des Zellkerns zurückgeführt. Ein retrograder Transport fehlgefalteter Proteine aus dem ER ins Cytosol im Rahmen eines Qualitätskontroll-Mechanismuses („**ER-associated degradation (ERAD) pathway**“), der in früheren Studien in Tabak für die Akkumulation von sekretorischem GFP im Nukleoplasma verantwortlich gemacht wurde, wurde als eher unwahrscheinlich angesehen [330]. Unabhängig von einer Fusion an die Membranankervariante TCRCys akkumulierte das intrazelluläre GFP-Signal sowohl im Randbereich der Zellen als auch im Bereich der Cytoplasmastränge sowie im Bereich der Nukleusmembran und erschwerte eine exakte Aussage über die Membranintegration der Proteinkonstrukte (Abb. III.13.A-III.13.D). Eine Lokalisation im

Cytoplasma wurde ausgeschlossen, da die Fusionsproteine mit einem funktionalen Signalpeptid ausgestattet sind, das einen cotranslationalen Transport ins ER garantiert. Die Analyse verschiedener konfokaler Zellebenen zeigte sowohl für lösliches als auch membranständiges GFP eine Akkumulation des GFP-Signals im Bereich der Nukleusmembran (Abb. III.13.A-III.13.D). Der elektronenmikroskopische Nachweis von scFv24-TCR β in der Nukleusmembran in früheren Arbeiten lieferte Hinweise auf eine Integration in die Kernmembran [123]. Die Anfärbung von charakteristischen netzartigen und feinpartikulären Strukturen (Abb. III.15.A-III.15.C) konnte durch den Vergleich mit früheren Studien auf eine Lokalisation im ER-Netzwerk und vermutlich in Golgi-Stapeln zurückgeführt werden [331-333]. Die signifikante Fluoreszenzakkumulation in Kompartimenten des sekretorischen Apparates erschien im Fall GFPapo-exprimierenden Zellen nicht verwunderlich, da die Analyse der Kulturüberstände auf eine relative langsame Sekretion hinwies (Abb. III.11) und sich somit ein signifikanter Anteil des apoplasmatisch exprimierten GFP zum Zeitpunkt der Analyse noch in den Kompartimenten des sekretorischen Wegs befunden haben könnte. Die Akkumulation der membranständigen GFP-Konstrukte im ER-Netzwerk erschien im Vergleich zu publizierten Befunden der membranständigen Expression heterologer transmembranärer Proteine im Pflanzensystem ungewöhnlich hoch [331]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vergleichende immunfluoreszenzmikroskopische Studien der Signalakkumulation in Protoplasten CTB-HVR1-TCRCys- bzw. CTB-MPT64-TCRCys- und scFv29-pIgR_{mut}-produzierenden BY-2 Zelllinien durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt). Dabei akkumulierte scFv29-pIgR_{mut} vorwiegend im Randbereich der Protoplasten, während das von CTB-HVR1-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys ausgehende Fluoreszenzsignal, vergleichbar mit scFv29-TCR β [129], vorwiegend in cytoplasmatischen Strängen beobachtet wurde. Dies deutete auf eine Lokalisation der TCRCys-basierten Proteinkonstrukte in Membranen von Zellkompartimenten des Proteinexportapparates hin.

Frühere fluoreszenz- und immunelektronenmikroskopische Studien zur Lokalisation von artifiziellen Transmembranproteinen mit unterschiedlich verkürzter TMD haben gezeigt, dass die finale Lokalisation von Membranproteinen in Pflanzenzellen von der Länge der Transmembrandomäne abhängt. Dabei konnten Membranproteine mit einer 22 und 23 Aminosäuren umfassende Transmembrandomäne nachweislich in der Pflanzenzellmembran verankert werden, während Membranproteine mit verkürzten Transmembrandomänen von 17 und 20 Aminosäuren in Membranen des ER bzw. Golgi-Apparates zurückgehalten wurden [331]. Vorhersagen einer potentiellen Membranintegration und Abschätzungen der Länge der

Transmembrandomänen durch die Analyse der Proteinsequenzen im TMHMM Programm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) prognostizierten für CTB-HVR1-TCRCys, CTB-MPT64-TCRCys und GFP-TCRCys eine 23 Aminosäuren umfassende Transmembrandomäne und stimmten daher nicht eindeutig mit den Ergebnissen der fluoreszenzmikroskopischen Analysen überein. Da subzelluläre Strukturen im schmalen Cytoplasmasaum von Pflanzenzellen im konfokalen Mikroskop nicht aufgelöst werden können, konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein gewisser Anteil des GFP-Signals im Randbereich der Zellen ebenfalls auf eine partielle Akkumulation der membranständigen GFP-Konstrukte in der Zellmembran zurückzuführen war. Über die Ursachen der Zurückhaltung der TCRCys und TCR β -basierenden Proteinkonstrukte in Kompartimenten des sekretorischen Apparates kann nur spekuliert werden. In früheren Studien der heterologen Expression der TCR β -Kette in Säugetierzellen wurde eine ER-Retention und ein proteolytischer Abbau der TCR β -Kette beobachtet, wenn diese ohne die Proteine des CD3 Komplexes exprimiert wurde [334, 335]. Übereinstimmende Resultate ergab die Expression der TCR α -Kette in „Knock-out“ T-Zellen und Fibroblasten [336, 337]. Weiterhin konnte die Stabilität und ein korrektes Targeting der TCR β -Kette durch die Coexpression von CD3 Proteinen in Säugetierzellen signifikant gesteigert werden [338], vermutlich aufgrund der Maskierung intrinsischer Proteaseerkennungssequenzen durch das Rezeptor-Assembly [336].

Obwohl ein elektronenmikroskopischer Nachweis der membranständigen Antigene nicht möglich war, konnte unter der Berücksichtigung aller Befunde eine funktionelle *in planta* Expression des TCRCys-Membranankers als sehr wahrscheinlich angesehen werden. Dies bestätigt generell die Eignung des heterologer Membranankers TCRCys zur Verankerung von Zielproteinen in pflanzlichen Membranen. Im Vergleich zu anderen Membranankern führt die Fusion von Zielproteinen an TCRCys (und TCR β) jedoch eher zu einem heterologen Targeting in die ER- und evtl. auch Golgi-Membran als zu einer finalen Lokalisation in der Zellmembran.

IV.4 **Orale Immunisierungen**

IV.4.1 **Mukosales Immunsystem im Darm**

Die Schleimhautoberflächen des Gastrointestinal-, Respirations- und Genitaltraktes stellen die wichtigsten Eintrittspforten für infektiöse Erreger dar. Dabei bildet die Darmschleimhaut die weitaus größte Kontaktfläche mit der Außenwelt. Die spezifische morphologische

Struktur der intestinalen Mukosa erlaubt auf der einen Seite die Resorption und den effizienten Transport von Nahrungsbestandteilen und Wasser ins Gefäßsystem, verhindert aber gleichzeitig den unphysiologischen Durchtritt pathogener Antigene und Mikroorganismen [339]. Das Darmepithel besteht überwiegend aus resorptiven Enterozyten, die über Tight junctions verbunden sind. Darin eingebettet liegen Mukus-produzierende Becherzellen, endokrine Zellen, die regulatorische Funktionen ausüben, M-Zellen (s.u.), undifferenzierte Stammzellen, sowie Panethsche Körnerzellen, die Bestandteile des angeborenen mukosalen Immunsystems sind. Im menschlichen Organismus ist das Epithelium durch intestinale Ausstülpungen der Lamina propria (Villi) und den dichten Besatz der Epithelzellen mit Mikrovilli auf eine Resorptionsfläche von bis zu 400 m² vergrößert [296]. Dieses sogenannte Villus-Epithelium wird von einer Schicht aus sekretiertem Mukus und einer relativ dicken Glykocalyx aus Glykoproteinen und Glykolipiden überlagert. Unter physiologischen Bedingungen wird, mit Ausnahme von enteroinvasiven Pathogenen, die spezielle Strategien entwickelt haben um ihre Endozytose durch Epithelzellen zu induzieren, die transzelluläre Aufnahme von größeren partikulären Antigenen in Enterozyten durch die stark ausgeprägte Glykocalyx verhindert [138].

Das Darmepithel steht sowohl räumlich als auch funktionell in engem Kontakt mit den Komponenten des darmassoziierten Immunsystems (GALT, **gut-associated lymphoid tissue**) [340]. Es kann prinzipiell in zwei Bereiche gegliedert werden: organisierte Lymphozytenpopulationen wie die Peyer'schen Plaques, die mesenterialen Lymphknoten (MLN) und der Appendix (O-MALT, **organized mucosa-associated lymphoid tissue**) sowie diffuse, nicht organisierte Zellpopulationen (D-MALT, **diffuse mucosa-associated lymphoid tissue**) zu denen die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) und die Lymphozytenpopulationen der Lamina Propria (LPL) zählen, die sich phänotypisch und funktionell von den peripheren zirkulierenden T-Zellen unterscheiden und unabhängig vom systemischen Immunsystem agieren [292, 341]. Durch den permanenten Antigenstimulus sind über 95% der Lymphozyten im Darm Gedächtniszellen [342]. Zentrale Aufgabe des intestinalen Immunsystems ist es mit hoher Selektivität pathogene von apathogenen Substanzen zu unterscheiden, um einerseits die Kolonisation und Penetration pathogener Mikroorganismen und Antigene zu verhindern, andererseits aber kommensale Bakterien der Darmflora und Nahrungsantigene als harmlos zu erkennen und zu tolerieren [343, 344]. Aufgrund des starken Vorkommens anti-inflammatorischer Cytokine wie IL-4 und IL-10 werden an mukosalen Oberflächen überwiegend Th2-vermittelte Immunantworten induziert, zelluläre Immunantworten spielen eher eine untergeordnete Rolle [345]. Der wichtigste Mediator mukosaler Immunität ist

sekretorisches IgA (sIgA) und bedingt auch IgM. Die Funktion von IgM beschränkt sich vorwiegend auf die Inhibition der Kolonisation und Invasion von Erregern und Antigenen über das Mukosaepithelium durch Agglutination und Neutralisierung [346], sowie deren Rücktransport aus der Lamina Propria in das Darmlumen [347, 348]. Antikörper der IgA-Immunglobulinklasse liegen als dimere Moleküle vor, die über eine einzelne J („Joining“) Kette assoziiert sind. IgA gelangt nach selektiver Bindung an polymere Immunglobulin-Rezeptoren (**Poly-Ig-Rezeptor**, pIgR) auf der basalen Membran von Epithelzellen des Villus-Epitheliums, Internalisierung und Transport in transzytotischen Vesikeln über das Epithelium und wird in mukosalen Sekretionen freigesetzt [349]. Der extrazelluläre Anteil des pIgR, die sekretorische Komponente, verbleibt nach enzymatischer Spaltung am Antikörper-Molekül und erhöht die Resistenz von sIgA gegenüber proteolytischer Spaltung durch Verdauungsenzyme. Antikörper der IgG-Klasse spielen bei der Infektabwehr an den Schleimhäuten nur eine untergeordnete Rolle und werden aufgrund einer hohen Sensitivität gegenüber proteolytischer Aktivität in mukosalen Sekreten in bis zu 100-fach geringeren Konzentrationen nachgewiesen [20].

Die transepitheliale Aufnahme luminaler Antigene erfolgt im Bereich des Follikel-assoziiertes Epitheliums (FAE). Dies überlagert Darmabschnitte in denen die Lymphozytenansammlungen der Peyer'schen Plaques lokalisiert sind und ist durch das Vorkommen spezialisierter M(**m**icrofold, **m**embraneous)-Zellen charakterisiert. M-Zellen haben sich morphologisch und funktionell an die endozytotische Aufnahme vorwiegend partikulärer Antigene angepasst. So weisen M-Zellen im Gegensatz zu Enterozyten keinen Bürstensaum und kein starres Cytoskelet auf. Sie sind auf ihrer apikalen Oberfläche von einer relativ dünnen Glykocalyx überlagert und durch Einstülpungen der basolateralen Zellmembran, in denen immunologisch relevante Zellen des GALT lokalisiert sind, charakterisiert [350, 351]. Die Antigenaufnahme erfolgt durch rezeptorvermittelte oder rezeptor-unabhängige Endozytose, wobei die Antigenaufnahme durch vorherige Rezeptorbindung begünstigt wird. Die Antigene werden vorwiegend unprozessiert in Richtung Lamina Propria abgegeben, von dendritischen Zellen aufgenommen und anschliessend naiven T-Zellen der Peyer'schen Plaques präsentiert [352]. Ein Teil der aktivierten Lymphozyten tritt in die Zirkulation ein und erlaubt, durch die selektive Bindung von spezifischen Adhäsionsmolekülen auf ihrer Oberfläche an mukosale Adressine, die Rezirkulation in lokale, aber auch entfernte mukosale Effektorregionen („Homing“) [353]. Lymphozyten, die in den MLN's aktiviert wurden, können nach Eintritt in die Blutgefäße

ebenfalls systemische Abwehrreaktionen in den peripheren Lymphorganen des gesamten Organismus induzieren [354].

IV.4.2 **Wirksamkeit des CTB-HVR1-TCRCys-basierten oralen Impfstoffes**

Die Immunisierungsstrategie der vorliegenden Arbeit basierte auf einer potentiell partikulären Präsentation des oral applizierten Modellantigens CTB-HVR1-TCRCys durch Fusion an die Membranankervariante TCRCys. Dies sollte die Akkumulation und Aufnahme des Impfstoffes durch M-Zellen optimieren. Die rezeptorspezifische Bindung des genetisch konjugierten mukosalen Carriers CTB an den Zelloberflächenrezeptor Gangliosid GM1 sollte zu einem selektiven Targeting des Vakzinantigens zur intestinalen Epithelmembran führen. Der Tabak-basierte Impfstoff der vorliegenden Arbeit wurde in verschiedenen Präparationsvarianten mit und ohne die mukosalen Adjuvantien BPPCysPEG (modifiziertes MALP-2) und PQS-PEG in einer Prime-Boost-Impfstrategie in Form von Tabakfutterpellets Mäusen verabreicht. Zu definierten Zeitpunkten wurden Stuhl- und Serumproben entnommen (Abb. III.19) und die Effektivität der Impfstoffkompositionen auf mukosaler und humoraler Ebene durch Ermittlung der antigenspezifischen lokalen IgA- und Serum-IgG-Antikörperantworten gegen CTB und HVR1 evaluiert.

Trotz mehrfacher Boosterung konnten, unabhängig von der Impfstoffkomposition, weder auf systemischer noch auf lokaler Ebene CTB- bzw. HVR1-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (III.3.3.3.1, III.3.3.3.3 und III.3.3.4), obwohl zahlreiche Studien die generelle Immunogenität pflanzenproduzierter Antigene belegen (I.2.1) und die grundsätzliche Immunogenität beider Antigene im Rahmen einer mukosalen Verabreichung bereits bestätigt wurde (s.u.). In früheren Studien konnte die Induktion einer mukosalen und systemischen Immunität nach intranasaler Applikation eines auf CTB-HVR1 basierenden Impfstoffes aus *Nicotiana benthamiana* in Mäusen nachgewiesen werden. Dies bestätigt das Vorhandensein definierter muriner Th2-Epitope und die grundsätzliche Erhaltung der biochemischen und immunogenen Eigenschaften von HVR1 im Fusionskonstrukt mit CTB und damit die generelle Eignung von HVR1 im Rahmen einer mukosalen Immunisierung von Mäusen [244]. Desweiteren führte die orale Applikation von in Feldsalat produziertem R9(HVR1)-VLP's zur Induktion humoraler Immunantworten in Kaninchen [355].

Generell wirken intranasale Immunisierungen jedoch effektiver als orale Immunisierungen, da sie unabhängig von einer potentiellen Sensitivität der Vakzinantigene gegenüber proteolytischer Aktivität im Gastrointestinaltrakt sind. Des Weiteren wird im Vergleich zum Darmepithel eine erhöhte Permeabilität des Epitheliums im Respirationstrakt angenommen

[22] (IV.4.2.1). Zudem belegen einige Publikationen die Immunogenität von pflanzenproduziertem CTB nach oraler Verabreichung (IV.4.2.3).

Grundsätzlich können folgende Faktoren zu der beobachteten Ineffizienz des oralen Modellimpfstoffes geführt haben: ineffiziente Aufnahme des Impfstoffantigens über das Schleimhautepithel (1), Sensitivität gegenüber proteolytischem Abbau durch gastrointestinale Proteasen (2), Unwirksamkeit des mukosalen Carriers CTB durch proteolytische Abspaltung von HVR1 im GIT und/oder verminderte bzw. fehlende Funktionalität des CTB-Fusionspartners im Mikromilieu pflanzlicher Membranen (3), unzureichende Antigendosis (4), Unzugänglichkeit immunrelevanter Epitope (5), Induktion von oraler Toleranz (6), negativer Einfluß von Tabak auf das murine Immunsystem (7) und Unwirksamkeit der intranasal coapplizierten Adjuvantien (8). Des Weiteren können die Probenentnahme und -lagerung (9), die Haltung der Versuchstiere (10) sowie die grundsätzliche Schwierigkeit des Monitorings mukosaler Immunantworten (11) einen signifikanten Einfluß auf die Detektion und Interpretation mukosaler Immunantworten ausüben. Alle 11 Faktoren werden nachfolgend ausführlich diskutiert.

IV.4.2.1 Antigenaufnahme

Nach dem heutigen Wissensstand hängt die Effektivität oraler Impfstoffe, d.h. die Induktion mukosaler Immunität, von einer effektiven M-Zell-vermittelten Aufnahme des Impfstoffes über das Darmepithel ab. Dabei ist die Partikelgröße in hohem Maße entscheidend für die Induktion mukosaler Immunantworten [356]. Epithelzellen können neben löslichen Antigenen in gewissem Umfang ebenfalls kleinere Nanopartikel (ϕ 6,4 nm) aufnehmen, größere Partikel werden jedoch ausschliesslich von M-Zellen endozytiert [143, 296]. Veröffentlichte Studien belegen jedoch, dass eine relativ dünne Glycocalyx (20 nm) bereits den Durchtritt von Partikeln im μ m-Bereich verhindern kann [296]. Die eingeschränkte Permeabilität der Glykocalyx könnte eine transepitheliale Aufnahme des membranständigen pflanzenproduzierten Impfstoffes durch M-Zellen verhindert haben. Da keine Forschungsergebnisse vorliegen, die den Grad des Abbaus bzw. der Emulgation pflanzlicher Membranen im murinen Darm darstellen, kann jedoch keine Vermutung über die Größe der nach einer potentiellen Emulgation durch Gallensäuren entstehenden Partikel oder Membranfragmente im Bereich der induktiven Regionen des darmassoziierten Immunsystems angestellt werden. Grundsätzlich ist auch eine Freisetzung des Modellantigens aus der Pflanzenmembran denkbar, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Induktion von oraler Toleranz signifikant erhöht wird (IV.4.2.6).

IV.4.2.2 Proteolytischer Abbau

Die mukosale Verabreichung von Impfstoffen kann grundsätzlich über den oralen, intranasalen, urogenitalen und rektalen Weg erfolgen. Am populärsten ist die orale oder intranasale Applikation. Während intranasale Immunisierungen häufig stärkere Immunantworten induzieren und weitaus geringere Antigendosen erfordern als für die orale Verabreichung von Impfstoffen notwendig ist [22, 357], ist ihr Einsatz, der die kosteneffektive Reinigung der Vakzinantigene erfordert, jedoch sowohl unter ökonomischen als auch praktischen Gesichtspunkten v.a. im Bereich der Tiermedizin und in Entwicklungsländern ungünstig. Desweiteren setzt die Induktion protektiver Immunantworten bei einer mukosalen Antigenverabreichung häufig die Co-Administration effektiver Adjuvantien voraus (I.3.1). Die intranasale Adjuvansgabe in der Nähe des zentralen Nervensystems und der Riechkolben (Bulbus olfactorius) ist jedoch risikoreich und daher unter Sicherheitsaspekten unvorteilhaft [358]. Im Gegensatz zu intranasalen Immunisierungen setzt der Einsatz oraler Impfstoffe eine hohe Stabilität der Vakzinantigene im GIT voraus. Besonders lösliche Antigene weisen jedoch eine hohe Sensitivität gegenüber gastrointestinalen Proteasen auf, da potentielle Proteaseerkennungssequenzen leichter zugänglich sind. Dies stellt ein grundsätzliches Problem bei der Entwicklung effektiver oraler Subunit-Vakzine dar. Beispiele aus der Literatur bestätigen die Unwirksamkeit löslicher oraler Proteinimpfstoffe aufgrund einer Instabilität der Antigene im GIT [95]. Pflanzen besitzen im Vergleich zu tierischen Zellen eine äußerst stabile Zellwand, die in gewissem Umfang einen natürlichen Schutz der Antigene gegenüber Säuredenaturierung und proteolytischen Abbau während der Magenpassage vermitteln kann und die Antigene erst im Darm nach Abbau des Pflanzengewebes freisetzt (I.2.1). Die Optimierung essbarer Impfstoffe durch Verminderung des proteolytischen Abbaus im GIT, kann weiterhin durch die Einkapselung in biologisch abbaubare Polymere, die eine kontrollierte Freisetzung der Antigene in induktiven Regionen des darmassoziierten Immunsystems gewährleisten sollen (Controlled Release Systems, CRS) erzielt werden [359-361].

Die Pathogenität von *V. cholerae* setzt eine Aufnahme von Cholera Toxin über die Darmschleimhaut voraus, d.h. das Holotoxin sollte eine natürliche Resistenz gegenüber proteolytischer Aktivität im menschlichen Verdauungstrakt aufweisen. Einige Studien geben jedoch Hinweise auf eine Sensitivität von CTB gegenüber proteolytischen Abbau im murinen Verdauungstrakt [188, 191]. Durch die Analyse der Proteinsequenz von CTB-HVR1-TCRCys im ExPASy (Expert Protein Analysis System) Proteomic Server (<http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter/>) konnten zahlreiche potentielle Trypsin- und

Pepsinerkennungssequenzen identifiziert werden, die zu einem potentiellen Abbau des Modellantigens im murinen GIT führen könnten (Ergebnisse nicht gezeigt). Der protektive Effekt des Pflanzengewebes kann je nach Prozessierungsgrad aufgehoben werden und damit die Stabilität und das immunogene Potential von Antigenen beeinflussen [188, 191, 362]. Es kann nur spekuliert werden, ob die Prozessierung von transgenem CTB-HVR1-TCRCys-exprimierendem Tabakblattmaterial zu Blattpulver zu einer partiellen Zerstörung von Zellwand- und Membranstrukturen und damit, im Vergleich zu intaktem Pflanzenmaterial, zu einer potentiell verstärkten Freisetzung und proteolytischem Abbau des Antigens führte, bevor der Impfstoff die induktiven Regionen des darmassoziierten Immunsystems erreichen konnte. Trotz der alternativen geringeren Prozessierung in Präparationsvariante 2 (II.7.1) kam es zu keiner messbaren antigenspezifischen Immunität. Da Pellets der Präparationsvariante 2 jedoch ohne die intranasale Coapplikation von modifiziertem MALP-2 und PQS-PEG verabreicht wurden, muß der fehlende immunstimulatorische Effekt der mukosalen Adjuvantien in die Bewertung des eingesetzten Vakzinformats einbezogen werden.

Die intranasale Verabreichung von pflanzenexprimierten CTB-HVR1 führte in früheren Studien zur Induktion von CTB- und HVR1-spezifischen Antikörperantworten [244]. Obwohl CTB gemäß weiterer Studien bei einer intranasaler Verabreichung effektiver wirkt [363-365], ist die alternative Applikation über die oberen Atemwege als kritisch zu bewerten, da in früheren Studien starke Nebenwirkungen von einer Veränderung der Nasenschleimhaut bis hin zu entzündliche Reaktionen der Hirnhaut auftraten [366].

IV.4.2.3 Funktionalität und Immunogenität des mukosalen Carriers CTB

Die Induktion effektiver Immunantworten durch die orale Verabreichung von löslichen, nicht partikulären Antigenen führte in der Vergangenheit überwiegend zu enttäuschenden Ergebnissen (I.3.1). Eine Ausnahme in diesem Zusammenhang stellen u.a. Cholera Toxin und seine nichttoxische B-Untereinheit dar (I.3.1). Während die immunstimulatorische Wirkung des Holotoxins vorwiegend auf die immunmodulatorischen Eigenschaften der A-Untereinheit zurückzuführen sind, wurde die Carrierfunktion des CTB, die auf einer erhöhten Aufnahme konjugierter Impfstoffes durch die Affinität des CTB-Fusionspartners zum Mukosaepithel basiert, bereits erfolgreich eingesetzt, um die Aufnahme konjugierter Impfantigene über die Darmschleimhaut zu optimieren (I.3.1.1). Die Aufnahme von Cholera Toxin und des nah verwandten hitzelabilen Enterotoxins aus *E.coli* in die Zielzelle erfolgt im Gegensatz zu anderen bakteriellen Toxinen nicht über die Ausbildung von Poren, sondern das Toxin wird über einen komplexen Mechanismus, der apikale Endozytose und einen retrograden Membrantransport durch Golgi-Zisternen zum ER involviert, aufgenommen [182]. Während

das toxische A1-Peptid nach enzymatischer Abspaltung der A2-Untereinheit und Translokation über die ER-Membran im Cytosol enzymatisch aktiv wird, bleibt die B-Untereinheit membranassoziiert und wird vermutlich über anterograden Vesikeltransport zurück in den sekretorischen Weg geschleust. Vesikel, die mit Membranen auf der basolateralen Seite verschmelzen, könnten so CTB konjugierte Antigene freigegeben (indirekte Transzytose) [182].

CTB wurde bereits erfolgreich als mukosaler Carrier zahlreicher Proteine, Peptide, Haptene sowie immunstimulatorischer Adjuvantien und auch Polysaccharide eingesetzt [193, 310, 320, 367-370]. Weitere Befunde liefern Hinweise darauf, dass die immunstimulatorische Wirkung von CTB nicht nur auf seiner GM1-Bindungsaktivität beruht, sondern CTB ebenfalls Adjuvansaktivität im klassischen Sinne aufweist, d.h. eine Optimierung der Antigenpräsentation sowie die Aktivierung immunrelevanter Zellen bewirkt, die die Produktion von Cytokinen und einen Isotypenwechsels zu IgA-produzierenden B-Zellen induziert [183, 184, 371-373]. Während die Carrierfunktion des CTB unumstritten ist, wird die immunmodulatorische Wirkung von CTB seit Jahren kontrovers diskutiert und beim Einsatz von nativem CTB von einigen Autoren auf eine Restaktivität von kontamierenden Holotoxin zurückgeführt [374, 375].

CTB stellt nicht nur einen effektiven mukosalen Carrier und potentiellen Immunmodulator dar, sondern ist ebenfalls ein potentes mukosales Immunogen. Zahlreiche Studien der heterologen *in planta* Expression von CTB belegen die Erhaltung seiner antigenen Eigenschaften und seines immunogenen und protektiven Potentials im Rahmen einer oralen Immunisierung [74, 188, 191, 369, 376-378]. Diese Beobachtungen ließen es sinnvoll erscheinen CTB nicht nur zur optimierten transmukosalen Aufnahme des Modellantigens HVR1 zu nutzen, sondern, anhand der Analyse potentieller CTB-spezifischer Antikörperantworten, ebenfalls die generelle Wirksamkeit der gewählten Immunisierungsstrategien bzw. die Eignung von Tabak zur Herstellung experimenteller oral verfügbarer Impfstoffe zu evaluieren. Frühere Forschungsaktivitäten belegen, dass es grundsätzlich möglich ist Multikomponentenimpfstoffe in Pflanzen zu produzieren. Diese besitzen das Potential einen Immunschutz gegen multiple Pathogene zu induzieren [195, 379]. Trotz des großen immunologischen Potentials von CTB konnten in Analogie zu HVR1 trotz mehrfacher Boosterung weder in den Serum- noch in den Stuhlproben der Versuchstiere aller Immunisierungsgruppen CTB-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. (III.3.3.3.1 und III.3.3.3.4).

Sowohl die Adjuvansfunktion als auch die Immunogenität von CTB hängen maßgeblich von seiner Fähigkeit zur Pentamerisierung, genauer gesagt von seiner Rezeptor-vermittelten Aufnahme über das Mukosaepithel ab [274]. In Abhängigkeit von ihrer Größe, ihren physikochemischen Eigenschaften und dem Integrationsort können genetisch konjugierte Antigene einen massiven Einfluss auf die Funktionalität der CTB-Einheit ausüben (IV.2). Bezüglich der Immunogenität von CTB nach Fusion an Zielantigene finden sich widersprüchliche Angaben in der Literatur. Zahlreiche Befunde belegen, dass N- oder C-terminale und selbst duale Antigenfusionen keinen, oder nur einen geringen Einfluss auf die antigenen bzw. immunogenen Eigenschaften von CTB ausüben [315, 320, 380, 381]. Andere Studien belegen eine Reduktion der oralen Immunogenität [316]. Dies beruht vermutlich auf einer eingeschränkten Funktion des Carriers und der damit assoziierten reduzierten Aufnahme über das Mukosaepithel. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten *in vitro* Studien mit CTB-HVR1-TCRCys, dass die C-terminale Fusion von HVR1 inklusive TCRCys-Membrananker die Funktionalität des Carriermoleküls nicht beeinträchtigt (IV.2). Die Ergebnisse reflektieren jedoch nicht die *in vivo* Situation, zumal eine potentielle Membranverankerung der Antigene eine Assemblierung der monomeren CTB-Untereinheiten in die funktionale pentamere Form verhindern könnte.

IV.4.2.4 Antigenosis

Zahlreiche Beispiele aus der Literatur belegen die grundsätzliche Wirksamkeit pflanzenbasierter essbarer Impfstoffe (I.2.1). Im Gegensatz zu klassischen Impfstoffen, die injiziert werden, induzieren Impfstoffe die mukosal appliziert werden eine antigenspezifische lokale Infektabwehr an den Schleimhäuten. Sie sind daher besonders zur Prävention von Infektionskrankheiten, die durch mukosal übertragbare Pathogene ausgelöst werden, geeignet. Generell verlangt jedoch die orale Impfstoffgabe im Vergleich zur Injektion eine wesentlich höhere Dosierung und wiederholte Verabreichung des Antigens (I.2.1 und I.3.1). Im Fall einer pflanzenbiotechnologischen Produktion werden ausreichende Antigenmengen, die eine direkte Verabreichung von unprozessiertem Pflanzenmaterial erlauben, häufig nicht erzielt (I.2.1 und IV.1). Des Weiteren erschweren äußere Faktoren wie Licht, Feuchtigkeit und Temperatur sowie ein potentieller proteolytischer Abbau der Vakzinantigene im GIT (IV.4.2.2) eine konstante Dosierung essbarer Impfstoffe.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Modellantigen CTB-HVR1 durch Fusion an die Membranankervariante TCRCys in Konzentrationen in Tabak angereichert werden, die eine direkte Verabreichung des Impfstoffes in Form von geringfügig prozessierten Futterpellets erlaubten (III.3.1 und IV.1). Quantifizierungen im GM1-ELISA im Vorfeld der

Immunisierungen ergaben eine durchschnittliche Antigendosis von $\sim 114,8 \mu\text{g}$ für die Immunisierungsschritte 1-3 sowie $\sim 86,6 \mu\text{g}$ für die Immunisierungsschritte 4-6 (Abb. III.18 und III.19). Gemäß früherer Studien zur direkten oralen Immunisierung mit unprozessierten Pflanzenmaterial ist eine multiple Verabreichung einer Antigenmenge von $\sim 10\text{-}300 \mu\text{g}$ pro Dosis ausreichend, um mukosale und systemische Immunantworten in Mäusen zu induzieren [44, 72, 75, 190, 195, 291, 382, 383]. Die Effizienz eines Impfstoffes hängt jedoch immer von den biochemischen und immunogenen Eigenschaften des individuellen Antigens und seiner Stabilität im GIT sowie von der gewählten Impfstoffkomposition und dem Immunisierungsprotokoll ab. Die deutliche Heterogenität der im GM1-ELISA und mittels SPR-Analysen ermittelten Antigenkonzentrationen war ein Hinweis auf eine mögliche Überschätzung der eingesetzten Antigendosis (III.1.2.4). Möglicherweise war der Einsatz einer potentiell 10-fach geringeren Antigenmenge im Fall der gewählten Immunisierungsstrategien nicht ausreichend, um eine mukosale Immunität in Mäusen zu induzieren.

IV.4.2.5 Erhaltung immunrelevanter Epitope

Die Wirksamkeit rekombinanter Subunit-Vakzine hängt maßgeblich von der Erhaltung und Zugänglichkeit immunologisch relevanter Epitope im rekombinanten Proteinimpfstoff ab. Besonders Proteinimpfstoffe, die auf konformationellen Epitopen basieren, die sich im Gegensatz zu linearen Epitopen nicht aus der Primärsequenz ergeben, sondern erst nach korrekter Zusammenlagerung von Proteinuntereinheiten bzw. Faltung durch Wechselwirkungen nicht-benachbarter Proteinsequenzen entstehen, sind oft nur wirksam, wenn geeignete Chaperone im heterologen Expressionssystem vorhanden sind [14, 384]. Besonders die rekombinante Impfstoffproduktion in bakteriellen Systemen führt häufig aufgrund von Fehlfaltungen und inkorrekten Prozessierungen zu Einbußen der Antigenstabilität und Immunogenität [14].

Innerhalb der HVR1-Proteinsequenz wurden zahlreiche B-Zell-Epitope identifiziert [385-387]. Western Blot- und GM1-ELISA-Analysen im Vorfeld der oralen Immunisierungen in dieser Arbeit lieferten Hinweise auf eine potentiell eingeschränkte Zugänglichkeit immunrelevanter B-Zell-Epitope innerhalb der HVR1-Sequenz. Der Nachweis aller Antigenkonstrukte erwies sich unter der Verwendung CTB-spezifischer Antikörper im GM1-ELISA und nach Optimierung der Versuchsbedingungen, zumindest im Fall von CTB-HVR1-TCRCys, ebenfalls im Western Blot als erfolgreich (Abb. III.4). Der Einsatz von zwei R9(HVR1)-spezifischen polyklonalen Antiseren (R208 und R9) [239] erlaubte jedoch unabhängig vom Proteinkonstrukt weder im GM1-ELISA noch im Western Blot einen

Nachweis des HVR1-Fusionspartners (Ergebnisse nicht gezeigt), obwohl die Integrität von CTB-HVR1-TCRCys im Western Blot bestätigt wurde. Der Nachweis von bakteriell exprimierten HVR1 im Tandemkonstrukt GST-R9R9 mit R208 (II.1.2) im ELISA (III.3.3.2) und im Western Blot bestätigte weiterhin die Funktionalität des Antiserums (persönliche Mitteilung Dr. K. Uhde-Holzem, Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen). Diese Ergebnisse stehen ebenfalls im Widerspruch zu publizierten Daten, die einen eindeutigen Nachweis von pflanzenexprimierten CTB-HVR1 mittels dreier monoklonaler anti-HVR1 Antikörper unterschiedlicher Spezifitäten im Western Blot erlaubten [244]. Im Unterschied zum löslichen CTB-HVR1 könnte durch die C-terminale Fusion an TCRCys die Zugänglichkeit immunrelevanter Epitope des niedermolekularen HVR1 im Konstrukt CTB-HVR1-TCRCys unter nativen Bedingungen eingeschränkt worden sein. Dabei könnte die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Aminosäureresten des C-terminalen Transmembranankers selbst, aber auch mit HVR1, das ebenfalls eine verhältnismäßig hohe Anzahl hydrophober Reste aufweist [217], eine Rolle spielen. Kristallographisch generierte Daten der 3D-Struktur der B-Untereinheit zeigten, dass der C-Terminus der monomeren Polypeptidketten im pentameren Komplex eine helikale Struktur ausbildet, die sich im Bereich der zentralen Pore befindet (IV.2). Demnach könnte die „Verpackung“ von HVR1 und TCRCys im Innern der pentameren Ringstruktur, mit dem Ziel der Einnahme eines energieärmeren und stabileren Zustandes, eine Präsentation von HVR1 in exponierten Bereichen des Fusionsproteins verhindert haben. Dies verhinderte möglicherweise eine Bindung der Antikörper in den enzymatischen Nachweisverfahren. Während die geringen Akkumulationsraten von löslichem CTB-HVR1 (III.1.2.2) vermutlich einen Nachweis im Western Blot verhinderten, blieb unklar, warum eine Detektion von CTB-HVR1-TCRCys, das in ausreichender Menge im Rohextrakt vorlag, unter denaturierenden Bedingungen im Western Blot mittels R9-spezifischer Antiseren nicht möglich war. Denkbar wäre, dass die schnelle Reassemblierung des CTB-Fusionspartners während der elektrophoretischen Auftrennung die Identifizierung des HVR1 im Western Blot verhinderte (III.1.2.3).

Obwohl die Zugänglichkeit immunologisch relevanter HVR1 B-Zell-Epitope durch die Fusion an die Membranankervariante TCRCys möglicherweise eingeschränkt wurde, kann aus den bisherigen Daten nicht geschlossen werden, dass die Unwirksamkeit des experimentellen Impfstoffes auf einem Verlust immunogener Eigenschaften beruht. Zudem liegen Befunde der Erhaltung immunologisch relevanter Epitope innerhalb der Peptidsequenzen von Fusionspartnern ähnlicher Molekulargewichte nach C-terminaler Fusion

an CTB vor [196, 308, 318]. Dabei sei jedoch zu erwähnen, dass die individuellen physikochemischen Eigenschaften fusionierter Peptidantigene einen unterschiedlichen Einfluss auf die Ausbildung nichtkovalenter intra- und intermolekularer Wechselwirkungen ausüben. Es wurde in diesem Zusammenhang keine vergleichbare Literatur gefunden die den Einfluss eines zusätzlichen C-terminalen Membranankers bzw. einer Membranverankerung auf die Immunogenität von Peptidantigenen in CTB-Fusionskonstrukten beschreibt. Eine nicht optimale Präsentation von HVR1-Epitopen des Modellimpfstoffes CTB-HVR1-TCRCys in immunrelevanten Regionen des Dünndarms ist jedoch nicht unwahrscheinlich, v.a. wenn die Präsentation in einem partikulären, d.h. in einem membranverankerten Format erfolgt. Das Format zellulärer und partikulärer Antigene bleibt während der Transcytose durch M-Zellen erhalten, da keine Prozessierung der internalisierten Antigene erfolgt (IV.4.1). D.h. eine effiziente B-Zell-Präsentation oraler Antigene setzt im Gegensatz zur T-Zell-Präsentation, die nach der Prozessierung der Antigene durch APC's erfolgt, immer eine optimale Präsentation immunologisch relevanter Epitope voraus.

IV.4.2.6 Orale Toleranz

Das intestinale Immunsystem wird permanent mit einer Vielzahl von potentiell pathogenen Antigenen konfrontiert. Dabei werden exogen aufgenommene Stoffe aus der Nahrung sowie der physiologischen Darmflora in der Regel immunologisch toleriert (orale Toleranz), während spezifische Abwehrreaktionen gegen Pathogene induziert werden [343, 388, 389]. Um Überreaktionen gegen körpereigene und apathogene Antigene zu unterdrücken, befindet sich das Immunsystem des Darms durch die Produktion von anti-inflammatorischen Cytokinen durch eine Vielzahl regulatorischer T-Zellen, die geringe Anzahl an co-stimulatorischen Molekülen auf APC's (I.3.1) sowie der verminderten Proliferationsfähigkeit von T-Zellen nach ihrer Aktivierung in einem dauerhaften Zustand immunologischer Hyporeaktivität. Dies stellt einerseits ein großes therapeutisches Potential zur Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen und Allergien durch die Suppression systemischer Immunantworten nach oraler Verabreichung von Selbstantigenen und Allergenen (orale Immuntherapie) dar [390, 391], ist aber andererseits nachteilig bei der Entwicklung oraler Impfstoffe.

Nach dem heutigen Wissensstand beruht die Induktion von oraler Toleranz auf einem komplexen Zusammenspiel verschiedener immunregulatorischer Mechanismen [343, 392]. Dies schließt die selektive Eliminierung antigenspezifischer T-Zellen (klonale Deletion) [393], die Induktion von klonaler Anergie, d.h. Inaktivierung von antigenspezifischen T-Zellen aufgrund fehlender costimulatorischer Signale [394] (I.3.1 und IV.4.1) und eine aktive

Suppression (Bystander-Suppression) durch antigenspezifische regulatorische T-Zellen, die aktiv supprimierende Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF- β ausschütten, ein [343, 395]. Ob die orale Verabreichung von Antigenen in eine lokale bzw. systemische Abwehr, oder in die Induktion einer systemischen Immuntoleranz resultiert, hängt von der Zusammensetzung einer Vielzahl von Faktoren, die die Richtung einer antigeninduzierten Immunantwort bestimmen können, ab. Es gibt Hinweise darauf, dass die Natur und Größe des Antigens einen signifikanten Einfluss auf die Art der Immunreaktion ausüben kann. Lösliche, orale Antigene sind oft nur schwach immunogen und induzieren mit höherer Wahrscheinlichkeit Toleranz, während gegen lebende und komplexe Antigene spezifische Abwehrreaktionen induziert werden [19]. Die Antigenosis und Häufigkeit der Antigenstimulation [343, 394], die Antigenaufnahme und –prozessierung [396] sowie das immunologische Milieu des Gewebes in dem die Immunreaktion ablaufen soll, wie die lokale Zytokinumgebung [389, 397] und gewebespezifische Populationen immunologisch relevanter Zellen [398], können die Richtung der induzierten Immunreaktion beeinflussen. Dies verdeutlicht im Hinblick auf die Entwicklung effektiver oraler Impfstoffe die Relevanz eines geeigneten Immunisierungsprotokolls sowie einer adäquaten Impfstoffformulierung, um die Induktion schützender Immunantworten zu begünstigen.

Neben IEL's und professionellen APC's sind möglicherweise ebenfalls intestinale Epithelzellen des Villus-Epitheliums (Enterozyten) in Mechanismen der oralen Toleranzinduktion involviert. Die Produktion von TGF- β und IL-10, die konstitutive Expression geringer Mengen an MHC Klasse II Molekülen und die fehlende Expression von co-stimulatorischen Molekülen, die essentiell für die Aktivierung von T-Zellen sind (I.3.1 und IV.4.2.8), lassen auf eine Beteiligung von Enterozyten an der Induktion von oraler Toleranz schließen [339, 399].

In der vorliegenden Studie sollte durch die genetische Verknüpfung von CTB-HVR1 mit definierten Bereichen der humanen TCR β -Kette eine Verankerung des Antigens in der Pflanzenzellmembran und damit die Erzeugung eines potentiell partikulären Formats erzielt werden. Dadurch sollte eine Passage durch die stark verzweigte Glykocalyx oberhalb von Enterozyten (IV.4.1) ausgeschlossen und damit die Wahrscheinlichkeit einer Toleranzinduktion möglichst gering gehalten werden. Eine Membranverankerung von CTB-HVR1-TCRCys konnte aufgrund der vorgenommenen Funktionalitätsanalysen als sehr wahrscheinlich angenommen werden (III.1.3 und IV.3). Sie lieferte aber keinen Hinweis auf die Membranintegrität nach der Passage des Impfstoffes durch den GIT. Da Experimente zur Funktionalität der Membranankervariante TCRCys auf eine relativ instabile

Membranverankerung des Modellantigens hinwies (III.1.3.2.6), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Antigene im Bereich des FAE in löslicher Form vorlagen. Dies könnte eine Aufnahme durch Enterozyten und damit die Induktion von oraler Toleranz begünstigt haben. Dieser Effekt könnte durch die tolerogene Wirkung des C-terminal fusionierten CTB noch verstärkt worden sein. Die mukosale Verabreichung von CTB kann auf der einen Seite zur Induktion spezifischer lokaler und systemischer Immunität gegen konjugierte und auch coapplizierte Antigene führen [377] (IV.4.2.3) und andererseits, in Abhängigkeit von den Eigenschaften des konjugierten Proteins sowie der Dosis und Häufigkeit der Boosterung, in die Induktion einer systemischen anti-inflammatorischen Toleranz gegenüber Autoantigenen oder Allergenen resultieren [400-402]. Über den Einfluss von oraler Toleranz auf die Wirksamkeit des in dieser Arbeit evaluierten Modellimpfstoffes kann jedoch nur spekuliert werden.

Das grundsätzliche Problem, das die Effizienz oraler Subunit-Impfstoffe einschränkt, ist, dass Proteinimpfstoffen strukturelle Komponenten der authentischen Erreger fehlen und sie deshalb sowohl auf den Schleimhautoberflächen des FAE als auch von anderen relevanten Zellen der körpereigenen Immunabwehr nicht erkannt werden (I.3.1). Die Optimierung oraler Impfstoffe durch die Entwicklung von effektiven mukosalen Adjuvantien und das bessere Verständnis der Mechanismen die orale Toleranz erzeugen sind Voraussetzung für die Entwicklung effektiver oraler Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten und daher Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

IV.4.2.7 Orale Immunisierungen mit Nicht-Nahrungs- bzw. -Futtermittelpflanzen

Für die Produktion essbarer Impfstoffe sollte die Wahl des Expressionssystems nicht nur unter dem Aspekt der genetischen Manipulierbarkeit, der Kultivierbarkeit und Biomasseproduktion sowie der Authentizität, Anreicherung und Stabilität des Zielproteins im Pflanzensystem, sondern ebenfalls unter toxikologischen Gesichtspunkten erfolgen. Da der Einsatz von Nicht-Nahrungspflanzen selbst im Bereich der Tiermedizin eine umfangreiche toxikologische Prüfung erfordert, beschränkt sich der Einsatz von essbaren Impfstoffen im Tiermodell bislang vorwiegend auf Lebensmittel- bzw. Futtermittelpflanzen wie beispielsweise Kartoffel, Tomate, Mais, oder Reis (I.2.1). Während für die Modellpflanze Kartoffel, die durch den hohen Gehalt an Blausäure im rohen Zustand in Abhängigkeit von der verabreichten Menge toxisch ist, Ergebnisse vorlagen, die im begrenzten Umfang die orale Verabreichung von ungekochten Kartoffelknollen sowohl im Tierversuch [44, 195] als auch in klinischen Studien [77, 78] erlaubten, war zu Beginn dieser Arbeit keine Studie bekannt in der unprozessiertes Tabakmaterial direkt verfüttert wurde. Die Verwendung von Tabak-produzierten Vakzinen im

Rahmen einer oralen Vakzinierung beschränkte sich vorwiegend auf die orale Verabreichung von aus Pflanzenextrakt isolierten Antigenen [403-405], Tabakrohextrakt mittels Magensonde [66, 134, 369, 406], Tabaksuspensionszellen [72, 407] oder „low-alkaloid“-Tabakkultivaren [67]. Geringfügig prozessiertes Tabakblattmaterial wurde erstmals im Jahre 2004 in Form von Käseballchen, die getrocknete und anschließend zu Blattpulver gemörserte Tabakblätter enthielten, verabreicht [95].

Die Verfütterung von unprozessierten Pflanzenmaterial von Nicht-Nahrungspflanzen wie Tabak setzt eine Verträglichkeit im Tiermodell voraus (III.2). Die Verträglichkeit von Tabakblättern in Mäusen, zumindest nach Prozessierung zu Futtermittelpellets, wurde im Vorfeld der durchgeführten Immunisierungen anhand von Fütterungsstudien bestätigt (III.2.2). Des Weiteren konnte mit Hilfe der vorliegenden Daten der HPLC-MS-MS Analysen gezeigt werden, dass eine Verfütterung von Gewächshaus-Tabak an Mäuse unter toxikologischen Gesichtspunkten grundsätzlich unbedenklich ist (III.2.1.1). Dies schließt jedoch einen potentiellen Einfluß von Nikotin auf das murine Immunsystem nicht aus [408, 409]. Letzteres stellt jedoch ein immanentes Problem bei der Entwicklung von pflanzenbasierten Impfstoffen dar, da Pflanzen überwiegend eine Vielzahl von potentiell toxischen Sekundärmetaboliten synthetisieren, deren Struktur und Funktion sowie Einfluss auf das Immunsystem bislang noch nicht charakterisiert wurde. Hinweise auf einen potentiell negativen Einfluss von Nikotin lieferte die signifikante Reduktion der Gesamt IgA-Konzentration nach Nikotinexposition durch die orale Verabreichung von Tabakfutterpellets (III.3.3.2). Dabei hatte offensichtlich der Prozessierungsgrad der Blätter einen nicht unwesentlichen Einfluss auf die Nikotinexposition. Vermutlich führte die stärkere Prozessierung im Fall des gemörserten Blattmaterials im Vergleich zu den zu Blattstückchen verarbeiteten Tabakblättern zu einer verstärkten Freisetzung und Aufnahme von Nikotin.

Der potentiell immunsuppressive Effekt von Nikotin oder anderen toxischen Sekundärmetaboliten auf das murine Immunsystem stellt die Eignung von Tabak zur Produktion oral applizierbarer Impfstoffe, auch im Rahmen experimenteller Anwendungen, in Frage und sollte im Hinblick auf die Evaluierung weiterer Tabak-basierter essbarer Impfstoffe berücksichtigt werden. Eine exakte Aussage über die Wirkung von Tabak auf das mukosale Immunsystem bedarf jedoch einer genauen Untersuchung. In diesem Zusammenhang sei auch darauf hingewiesen, dass die Genehmigung der in dieser Arbeit durchgeführten oralen Immunisierungen mit nikotinhaltigem Tabakmaterial durch die Landesbehörde die zeitaufwendige Analyse des Nikotingehaltes voraussetzte. Für eine zeiteffektive Planung und Durchführung von Immunisierungsvorhaben mit toxikologisch bedenklichem

Pflanzenmaterial oder Vorhaben die Tierversuche implizieren, die nicht auf etablierten Standardprotokollen basieren, sollten Verzögerungen künftig durch die rechtzeitige Einleitung von Genehmigungsverfahren vermieden werden.

IV.4.2.8 Intranasale Coapplikation mukosaler Adjuvantien

Höhere Vertebraten verfügen über ein angeborenes, unspezifisches und ein phylogenetisch jüngerer erworbenes, spezifisches Immunsystem (Medzhitov und Janeway, 2000). Mechanismen der angeborenen Immunität, wie der niedrige pH-Wert der Magensäure, die epitheliale Barriere und Sekretion von Mukus und antimikrobiellen Substanzen durch Epithelzellen, wie Lysozym und Defensine, spielen eine wichtige Rolle in sehr frühen Phasen der Bekämpfung von Krankheitserregern. Sie verhindern die Ausbreitung und Invasion von Pathogenen bevor spezifische adaptive Immunreaktionen induziert werden [410, 411].

Die erste Kontaktaufnahme und Identifizierung von Mikroorganismen erfolgt über eine relativ heterogene Familie von phylogenetisch konservierten, keimbahnkodierten Rezeptoren auf der Zelloberfläche nicht-professioneller (Epithelzellen) und professioneller APC's, sogenannte Pathogenerkennungsrezeptoren (PRR's, **P**attern **R**ecognition **R**eceptors). Dazu zählen beispielsweise die cytosolischen Nod(**n**ucleotide-binding **o**ligomerisation **d**omain)-1 und Nod-2 [412] sowie Rezeptoren der **T**oll-like receptor (TLR) Familie [413]. Sie erkennen im Gegensatz zu den Antigen-spezifischen B- und T-Zell-Rezeptoren nicht jedes spezifische Antigen, sondern grobe, hochkonservierte Antigenmuster von Pathogenen. Dabei handelt es sich um sogenannte PAMPs (**P**athogen **A**ssociated **M**olecular **P**atterns) [410], wie Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, Flagellin, bakterielle CpG-DNA, virale dsRNA und ssRNA und Peptidoglycan [414].

Die Kommunikation zwischen angeborener und adaptiver Immunität erfolgt im Wesentlichen über DC's, die eine große Vielfalt von PRR's aufweisen und als komplexes Netzwerk in den subepithelialen Domregionen der Mukosa agieren [340, 415]. Die Bindung bakterieller und viraler Bestandteile an die PRR's der DC's vermittelt, neben der Freisetzung von Cytokinen, die weitere Immunzellen an den Entzündungsort rekrutieren sowie einer verstärkten Expression von MHC-Molekülen, ebenfalls die Expression der co-stimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Die Aktivierung der Effektorfunktion von T-Zellen erfordert neben der spezifischen Erkennung der über MHC Klasse I- oder Klasse II-Moleküle präsentierten Epitope durch ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) und der Bindung der auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimierten Co-Rezeptoren CD4 bzw. CD8 an die entsprechenden MHC-Moleküle, ein weiteres unspezifisches co-stimulatorisches Signal. Dies wird durch die Bindung von B7.1 und B7.2 an den konstitutiv auf der Oberfläche von T-

Zellen exprimierten CD28 Rezeptor vermittelt [415] und ist essentiell für die klonale Expansion der antigenspezifischen T-Zellen. Die Stimulation naiver T-Zellen mit einem spezifischen Signal in Abwesenheit co-stimulatorischer Moleküle führt zur Inaktivierung des entsprechenden T-Zell-Klons (Anergie). Subunit-Vakzine denen Komponenten authentischer Erreger fehlen, die die angeborene Immunität stimulieren, benötigen daher oft die unterstützende Wirkung geeigneter Adjuvantien (I.3.1).

Die im Rahmen dieser Arbeit intranasal coapplizierten mukosalen Adjuvantien modifiziertes MALP-2 (BPPCysPEG) und PQS (PQS-PEG) sollten über die Bindung an TLR's das essentielle co-stimulatorische Signal bereitstellen. Die Analyse lokaler IgA- und Serum-IgG Antikörperantworten ergab jedoch weder auf lokaler noch auf systemischer Ebene einen meßbaren Einfluß der intranasal verabreichten Adjuvantien auf die Wirksamkeit des oralen Modellimpfstoffes (III.3.3.3 und III.3.3.4).

Eine effiziente Stimulierung des nasal-assoziierten lymphoiden Gewebes (NALT) durch die intranasale Coapplikation von MALP-2 wurde bereits in früheren Studien gezeigt [202-206]. Dabei wurden nach intranasaler Applikation des Impfstoffes sowohl lokal, als auch in entfernten Schleimhautregionen antigenspezifische Immunantworten detektiert. In der Literatur liegen jedoch bislang keine Daten vor, die die Effektivität von Immunisierungsstrategien, die auf einer Anwendung von Antigen und Adjuvans in unterschiedlichen Regionen des MALT basieren, bestätigen. Grundsätzlich erlaubt die Verbindung entfernter mukosaler Gewebe durch den effizienten Austausch von Immunzellen die Kommunikation des GALT mit dem lymphatischen Gewebe des oberen Respirationstraktes (IV.4.1) Zudem liefert die Analyse der Gesamt IgA-Konzentration der unterschiedlichen Immunisierungsgruppen einen Hinweis auf die grundsätzliche Wirksamkeit der eingesetzten Adjuvantien. Der Vergleich der Gruppenmittelwerte der Immunisierungsgruppen III und IV, denen intranasal modifiziertes MALP-2 bzw. PQS verabreicht wurde, mit den Versuchstieren aus Immunisierungsgruppe I, die ohne zusätzliche Adjuvansgabe immunisiert wurden, bestätigte einen eindeutigen Einfluss beider Adjuvantien auf die Gesamt IgA-Konzentration und lässt eine verstärkte B-Zell-Proliferation vermuten, die in eine verstärkte Neubildung von IgA resultierte (III.3.3.2.2., Abb. III.22.B). Da die durchgeführten oralen Immunisierungen jedoch zu keiner im ELISA messbaren CTB- bzw. HVR1-spezifischen Antikörperbildung führten (III.3.3.3), könnten die produzierten Antikörper eine andere Spezifität, beispielsweise für Pflanzenkomponenten, aufweisen. Hinweise darauf lieferte die gesteigerte Reaktivität in den Proben nach der letzten Immunisierung im Vergleich zu den Präimmunproben im GM1-ELISA zur Bestimmung der

lokalen IgA-Antikörperantworten gegen pflanzenproduziertes CTB-HVR1-TCRCys. Diese resultierte vermutlich aus einer unspezifischen Bindung von Pflanzenkomponenten aus dem eingesetzten Pflanzenrohextrakt an die GM1-beschichtete Mikrotiterplatte (III.3.3.3.3). Andererseits ergab der Vergleich mit publizierten Daten vornehmlich eine ca. 6-fach höhere Gesamt IgA-Konzentration in den Präimmunproben [294, 416], obwohl gelegentlich auch schon wesentlich höhere Werte für Balb/c Mäuse beobachtet wurden [417]. Die erhöhten Werte zu Beginn der Immunisierungen konnten demnach ebenfalls auf eine akute Infektion zurückzuführen sein, die im Verlauf der Vakzinierungen zurückging (IV.4.2.10).

Die intranasale Applikation der mukosalen Adjuvantien erfolgte nach dem Verzehr von etwa der Hälfte des oral verabreichten Impfstoffes (II.7.3). Möglicherweise könnte die Wirksamkeit der oral-intranasalen Immunisierung durch eine gezielte Aktivierung des mukosalen Immunsystems im Vorfeld der oralen Immunisierung gesteigert werden, um die involvierten Immunzellen auf den nachfolgenden Antigenstimulus vorzubereiten.

IV.4.2.9 Probenentnahme und –lagerung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte aufgrund der Vielzahl der Versuchstiere keine direkte Kühlung der gesammelten Stuhlproben. Der Kot der individuellen Versuchstiere wurde über einen Zeitraum von fünf Stunden gesammelt und danach direkt bei -20°C eingefroren (II.7.4). Obwohl frühere Publikationen auf eine hohe Stabilität von Antikörpern in luftgetrockneten Stuhl- und Speichelproben hinweisen [418] und die Gesamt IgA-Konzentrationen grundsätzlich mit Werten aus der Literatur korrelierten (III.3.3.2.2), weist der mit der Lagerungsdauer zunehmende Grad an Degradationen der schweren Kette im Western Blot (III.3.3.2.1, Abb. III.21) auf eine mögliche Proteaseaktivität in den Stuhlproben hin, die einen negativen Einfluß auf die ermittelten antigenspezifischen Reaktivitäten ausüben kann. Zudem ist ein Einfluss der unterschiedlichen Konsistenz der Kotballen zum Zeitpunkt der Probenentnahme auf die Stabilität von IgA nicht auszuschliessen. Um eine vergleichbare Stabilität der Proben zu erlangen, empfiehlt sich in Zukunft eine individuelle Entnahme und direkte Kühlung der Proben auf Eis bzw. in flüssigem Stickstoff sowie die anschließende Trocknung in der Lyophylle bzw. im Vakuumexsikkator und eine Lagerung bei -70°C .

IV.4.2.10 Haltung der Versuchstiere

Die Stärke der Immunantwort hängt nicht nur von den immunogenen Eigenschaften und der Dosis des Antigens ab, sondern wird überdies maßgeblich von der genetischen Disposition des geimpften Organismus sowie Umwelteinflüssen, insbesondere Stress beeinflusst. Stresssituationen, wie sie beispielsweise durch die unphysiologische Haltung von Balb/c

Mäusen im UV-Licht sowie Käfigen ohne Einstreu während der Immunisierungen (II.7.2) entstanden sind, können im ungünstigsten Fall zu einer gesteigerten Permeabilität des mukosalen Epitheliums führen, die mit einer ungehinderten Passage von Makromolekülen assoziiert sein kann [138, 419] und damit die Induktion von oraler Toleranz begünstigen (IV.4.2.6).

Eine unsterile Haltung von Versuchstieren kann zu Infektionen führen, die sowohl die Wirksamkeit von Impfstoffen abschwächen als auch die Analyse und Interpretation antigenspezifischer Antikörperantworten erschweren können. Da in der Literatur bezüglich der murinen Gesamt-IgA Konzentration im Kot stark unterschiedliche Werte vorliegen, konnte aufgrund des signifikanten Abfalls der Gesamt IgA-Konzentration im Verlauf der durchgeführten Immunisierungen eine Infektion zu Beginn der Studie nicht ausgeschlossen werden (III.3.3.2.2, Abb. III.22). Um die Verlässlichkeit und Präzision von Versuchsergebnissen zu garantieren, sollte in zukünftigen Studien eine sterile Haltung von Versuchstieren unter SPF (Specified Pathogen Free-)Bedingungen erfolgen.

IV.4.2.11 Detektion und Monitoring mukosaler Immunantworten

Die Analyse und Bewertung mukosaler Immunantworten gestaltet sich sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene als weitaus komplizierter als die peripherer [420]. Eine mögliche Verunreinigung von mukosalen Sekreten mit Blut, Serum oder systemischen Zellen sowie ein unterschiedlicher Grad der Verdünnung des Probenmaterials kann beispielsweise die Interpretation der Ergebnisse erschweren. Verlässlichere Ergebnisse erfordern daher die Standardisierung des Analyseverfahrens durch die Normalisierung mit dem Gesamt IgA (III.3.3.2), bzw. die Quantifizierung potentieller Kontaminationen durch den Einsatz interner Standards wie beispielsweise Serumalbumin oder Hämoglobin [421]. Zudem können Mukopolysaccharide in mukosalen Proben mit der Antigen-Antikörper-Bindung im ELISA interferieren und, in Kombination mit stark schwankenden Gesamt IgA-Konzentrationen, die Präzision der ermittelten Immunantworten signifikant reduzieren bzw. eine Auswertung der generierten Daten unmöglich machen. Das Auftreten von Kreuzreaktivitäten durch das Vorhandensein sehr ähnlicher Epitope kann besonders die Detektion geringer antigenspezifischer Immunantworten verhindern, da sie durch den kompetitiven Effekt unspezifisch bindender Antikörperpopulationen überlagert werden können. Aufgrund der hohen Sensitivität quantitativer Immunoassays wie ELISA haben Störeffekte grundsätzlich einen signifikanten Einfluss auf die Präzision und Reproduzierbarkeit der Daten.

Die im Vergleich zum 32-fach stärker verdünnten Kontrollserum signifikant geringeren Steigungen der analysierten Probenverdünnungen (Daten nicht gezeigt) sowie die

überwiegend geringen maximalen Absorptionen der Postimmunproben, aber vergleichsweise hohen Reaktivitäten in den Präimmunproben und der deutlich heterogene Charakter der Reaktivitäten könnten Anzeichen für Kreuzreaktivitäten sein. Ausschließlich im Fall von pflanzenexprimiertem CTB-HVR1-TCRCys wäre es denkbar, dass die gemessenen Anstiege der Reaktivität auf eine spezifische Bindung von IgA an Pflanzenkomponenten zurückzuführen ist. Grundsätzlich können die geringen Signale auch auf Nachweismängel des ELISA-Systems zurückzuführen sein, die beispielsweise auf einer Denaturierung konformationsabhängiger Epitope beruht und gegen diese Epitope gerichtete spezifische Antikörperreaktionen nicht messbar sind. In diesem Fall konnte jedoch auch durch indirektes Beschichten kein Anstieg von lokalem antigenspezifischem IgA beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Ein Vergleich der Effizienz verschiedener Immunisierungsprotokolle durch die Gegenüberstellung der in den zahlreichen veröffentlichten Studien ermittelten humoralen mukosalen Immunantworten ist ebenfalls nur begrenzt möglich, da sich die Techniken der Probenentnahme (mukosale Sekrete, Stuhlproben, Darmspülung/Lavage) sowie die Lagerungsbedingungen und die Darstellung der antigenspezifischen Immunantworten signifikant unterscheiden können.

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass die Etablierung von ELISA-Protokollen zur Ermittlung antigenspezifischer Antikörperantworten und IgA-Konzentrationen in mukosalen Proben ebenfalls ein kritischer Punkt ist, der schon im Vorfeld von geplanten Versuchsvorhaben angegangen werden sollte.

V. AUSBLICK

Schnelle Fortschritte in der Erforschung und Entwicklung oral applizierbarer Impfstoffe aus Pflanzen werden häufig durch die geringe Produktivität pflanzlicher Produktionssysteme limitiert. Die Expression der sekretierten Antigenversionen in Tabak führte zu geringen Produktausbeuten. Erst durch das heterologe Targeting der CTB-Fusionsproteine zur Membran durch die Fusion an die Membranankervariante TCRCys konnten Antigenmengen angereichert werden, die prinzipiell die orale Verabreichung von Pflanzenmaterial erlaubten. Die Erzielung ausreichend hoher CTB-Akkumulationsraten *in planta* hatte sich bereits in früheren Studien als problematisch erwiesen [187, 306, 422]. Vermutlich führt die im Vergleich zu Pflanzengen AT-reichere Sequenz des nativen *ctb* sowie das Vorhandensein intrinsischer Sequenzen, die in den Abbau eukaryotischer RNA involviert sind, zu einer deutlich reduzierten Translationseffizienz [423]. Neben der Modifizierung des nativen *ctb*-Gens unter der Verwendung pflanzentypischer Codons [423, 424], haben sich weitere alternative Strategien zur spezifischen Akkumulationssteigerung von CTB in Pflanzen, wie die Fusion an Ubiquitin [273], die ER-retardierte Expression [187, 306], die Verwendung optimierter Pflanzenpromotoren [424] sowie Plasmidtransformation [308, 309, 314, 369, 425] als erfolgreich erwiesen.

Neben der Akkumulation unzureichender Antigenmengen im Pflanzensystem besteht das grundsätzliche Problem, dass Antigene, die oral verabreicht werden, unbeschadet den Verdauungstrakt passieren müssen bevor sie im Bereich des darmassoziierten Immunsystems ihre immunogene Wirkung entfalten können. Verschiedene Strategien, die einen Schutz der Impfantigene vor dem stark sauren pH-Wert des Magens gewährleisten sollen, wie die Formulierung von Impfantigenen in Tabletten oder magensaftresistenten Kapseln sowie Mikro- bzw. Nanopartikel, die eine gezielte Impfstofffreisetzung im Intestinaltrakt gewährleisten, könnten in Zukunft sowohl eine effiziente Reduktion des proteolytischen Abbaus im Verdauungstrakt bewirken, als auch das Targeting von Impfantigenen in immunologisch relevante Darmabschnitte optimieren [71, 145, 359, 426, 427].

Einen weiteren kritischen Faktor bei der Entwicklung effektiver oraler Impfstoffe, die nicht auf dem Einsatz von authentischen Erreger bzw. Impfstämmen beruhen, stellt offensichtlich die Antigenaufnahme durch M-Zellen dar [350, 351]. Die Identifizierung M-Zell-spezifischer Markermoleküle, die in die Adhäsion und Aufnahme von Erregern involviert sind, gestaltete sich jedoch bislang aufgrund der hohen Variation von Oberflächenmarkern und Glykosylierungsmustern als problematisch [169, 428]. Verschiedene Strategien, die ein gezieltes Antigentargeting in immunologisch relevante Regionen des darmassoziierten

Immunsystems bewirken, könnten in Zukunft die Wirksamkeit oraler Vakzine entscheidend optimieren. Dazu zählt beispielsweise der Einsatz von Lektinen, die an Glykostrukturen auf der Oberfläche von M-Zellen binden [166, 429-432] sowie die Nutzung synthetischer M-Zell-Liganden [169] oder die Verwendung von Antigen-Antikörper-Komplexen (Immunkomplexe), deren Wirksamkeit auf der selektiven Bindung von IgA an den potentiellen IgA-Rezeptor auf der apikalen Oberfläche von M-Zellen beruht [433-435].

Die Verfütterung von Tabakfutterpellets an Mäuse resultierte in eine signifikante Reduktion des Gesamt IgA, vermutlich aufgrund eines negativen Einflusses von Nikotin oder anderen toxischen Alkaloiden auf das murine Immunsystem, und stellt die Einsatzmöglichkeit von Tabak als Modellexpressionssystem zur Herstellung oral verfügbarer Impfstoffe in Frage. Eindeutige Aussagen erfordern jedoch neben der erneuten Untersuchung des potentiellen Einflusses von Nikotin auf die Gesamt IgA-Konzentration eine umfangreiche toxikologische Analyse. Bei der Herstellung von Impfstoffen für Anwendungen, die über das experimentelle Stadium hinausgehen, wird jedoch der Einsatz alternativer pflanzlicher Produktionssysteme erforderlich. Mittlerweile liegen zahlreiche Protokolle zur gentechnischen Manipulation von geeigneten Nahrungs- und Futtermittelpflanzen vor [130, 357, 436-441]. Neben der konstitutiven Expression heterologer Proteine hat sich mittlerweile ebenfalls die gewebespezifische Expression von Antigenen (beispielsweise in Speicherorganen oder essbaren Pflanzenteilen) durch den Einsatz regulierbarer Promotoren etabliert [90, 191, 442, 443]. Aufgrund ihres hohen Proteingehaltes (bis 50%) und der hohen Stabilität heterologer Proteine eignen sich besonders Samen für die Herstellung oral applizierbarer Impfstoffe. Die Möglichkeit einer ungekühlten Lagerung über einen längeren Zeitraum ohne Aktivitätsverlust vermeidet die Notwendigkeit einer Kühlkette bei Transport und Lagerung und eliminiert dadurch unnötige Kosten. Zudem vermittelt die komplexe Zellwand von Samen einen gewissen Schutz des Impfstoffes während der Passage durch den Verdauungstrakt. Zahlreiche Beispiele aus der Literatur belegen die gewebespezifische Expression von bakteriellen und viralen Antigenen in Samen verschiedener Pflanzenarten, darunter Reis und Mais oder Sojabohne, und ihre Immunogenität nach oraler Verabreichung [444-450]. In vielerlei Hinsicht stellt Tabak jedoch nach wie vor das pflanzliche Produktionssystem der Wahl dar (I.2.3). Die gewebespezifische Produktion von Vakzinantigenen in Tabaksamen könnte in Zukunft eine vielversprechende Alternative zur Herstellung oral verfügbarer Impfstoffe darstellen [451, 452]. Da Nikotin als Sekundärmetabolit in den Wurzeln exprimiert und anschließend in die Blätter transportiert wird bestehen keine toxikologischen Bedenken in Hinsicht auf eine orale Verabreichung.

Die Kommerzialisierung oral applizierbarer Impfstoffe setzt neben einer ausreichenden Produktqualität, die eine korrekte Translation und Faltung im Produktionssystem impliziert, ebenfalls eine Standardisierung des Produktionsprozesses und damit eine stabile und stets gleich bleibende Expression des Transgens, die Voraussetzung für eine konstante Impfstoffdosierung ist, voraus. Diese Voraussetzungen sind bei einer Produktion in transgenen Pflanzen u.a. aufgrund wechselnder äußerer Einflüsse und epigenetischer Effekte wie „Gene Silencing“, die zu unkontrollierbaren Expressionsschwankungen führen, nicht gegeben. Eine vielversprechende Alternative ist die Produktion von Impfantigenen in pflanzlichen Suspensionskulturen in beispielsweise Tabak- oder Sojazellen, die in Bioreaktoren kultiviert werden und damit eine definierte, kontrollierbare Herstellung von Impfantigenen unter sterilen Bedingungen ermöglichen [33, 453-455].

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Schnelle Fortschritte in der Erforschung und Entwicklung oral verfügbarer Impfstoffe werden grundsätzlich durch die häufig beobachtete unzureichende und variierende Antigenakkumulation im Pflanzensystem und die im Allgemeinen geringe Immunogenität von Subunitimpfstoffen erschwert. Letzteres basiert auf einer erhöhten Sensitivität löslicher Antigene gegenüber proteolytischem Abbau im Verdauungstrakt, dem Unvermögen Mechanismen der angeborenen Immunität zu aktivieren sowie einer unzureichenden Aufnahme durch immunrelevante Zellen des Darmepithels.

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Fusion der immunologisch relevanten Modellantigene HVR1 und MPT64 aus dem Hepatitis C Virus bzw. *Mycobacterium tuberculosis* an verkürzte Versionen der carboxyterminalen konstanten Region der beta Kette des humanen T-Zell Rezeptors (TCR β) eine Membranverankerung der Antigene zu erzielen. Dies sollte einerseits zu einer potentiellen Akkumulationssteigerung in den eingesetzten Modellexpressionssystemen *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 und Nft51 und andererseits zu einer verstärkten transcytotischen Aufnahme durch M-Zellen der Darmmukosa führen. Der N-terminal fusionierte mukosale Carrier, die Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB), sollte durch die Affinität zu dem ubiquitär auf der Zelloberfläche von Säugetierzellen vorkommenden Rezeptor Gangliosid GM1 ein gezieltes Targeting zum Darmepithel bewirken und so die Adhäsion und Aufnahme der fusionierten Antigene optimieren. Der Einfluss dreier TCR β -basierender Membranankervarianten, die im Hinblick auf die Länge der konstanten extrazellulären Domäne variierten, auf die Produktivität wurde im Vergleich zu einer löslichen, apoplasmatisch exprimierten Antigenversion evaluiert. Dabei wurde die konstante extrazelluläre Domäne der TCR β vollständig entfernt (TCR), bis auf die hinge-Region verkürzt (TCRCys) bzw. weitere N-terminale Aminosäurereste der hinge-Region inklusive dem in die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen der α - und β -Kette im authentischen T-Zell-Rezeptor-Komplex involvierten Cysteinrest entfernt (TCRhinge), um den Einfluss einer potentiellen Homodimerisierung zweier verkürzter β -Ketten auf die Antigenmenge zu evaluieren.

Im Hinblick auf die Akkumulation beider Modellantigene konnte durch das heterologe Targeting zur Pflanzenmembran sowohl im transienten als auch im transgenen Ansatz ein positiver Effekt erzielt werden. Quantifizierungen im GM1-ELISA, die die Zusammenlagerung der CTB-Fusionspartner in die funktionale pentamere GM1-bindende Form bestätigten, zeigten, dass durch die Fusion an die Membranankervariante TCRCys im

Fall von CTB-HVR1 eine durchschnittlich 185,4-fache bzw. 25-fache Akkumulationssteigerung im transienten bzw. stabilen Ansatz erfolgte, während für CTB-MPT64 mit einer durchschnittlich 1,6- bzw. 19,7-fachen Akkumulationssteigerung ein geringerer stabilisierender Effekt beobachtet werden konnte. Durch den direkten Vergleich mit der Variante TCRhinge, die zu einer deutlich geringeren Antigenakkumulation führte, konnte erstmals gezeigt werden, dass der stabilisierende Effekt des Membrantargetings durch TCR β vermutlich signifikant durch die Homodimerisierung der Rezeptoreinheit zweier Polypeptidketten gesteigert wird.

Die Funktionalität der vielversprechendsten Membranankervariante TCRCys in Tabak wurde anhand von indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie sowie nach C-terminaler Fusion des Reporterproteins GFP an die membranverankerten Modellantigene und dem direkten Vergleich einer löslichen und TCRCys-membranverankerten GFP-Version in Western Blot Analysen von Zellextrakten und Kulturüberständen transgener BY-2 Suspensionszellen sowie mit Hilfe von Membranisolierungen und direkter konfokaler Fluoreszenzmikroskopie grundsätzlich bestätigt. Die generierten Daten lieferten jedoch Hinweise auf eine relativ instabile Verankerung durch TCRCys, vermutlich bedingt durch den positiv geladenen Lysinrest in der Transmembrandomäne, der im T-Zell-Rezeptor-Komplex durch die entgegengesetzt geladenen Aminosäurereste der invarianten CD3-Proteine neutralisiert wird. Trotz einer ausreichenden Länge der Transmembrandomäne von TCR β zur Verankerung der Antigene in der Zellmembran, zeigte das deutliche Fluoreszenzsignal, das von Kompartimenten des Proteinexportapparates ausging, eine vorübergehende oder finale Lokalisation der Antigene in Membranen des ER und vermutlich des Golgi-Apparates.

Transgenes Blattmaterial der CTB-HVR1-TCRCys-produzierenden Linie *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 wies Akkumulations- und Nikotinkonzentrationsbestimmungen zufolge das beste Verhältnis zwischen Nikotingehalt und Antigenkonzentration auf. Tabakblätter wurden oral in Form von Futterpellets, die unterschiedlich stark prozessiertes Blattmaterial enthielten, Mäusen verabreicht. Unabhängig von der eingesetzten Präparationsvariante und der intranasalen Coapplikation der mukosalen Adjuvantien BPPCysPEG (modifiziertes MALP-2) bzw. PQS-PEG, konnten in den durchgeführten ELISA Analysen jedoch weder auf lokaler (sIgA) noch auf systemischer Ebene (IgG) antigenspezifische Antikörperantworten gegen CTB und HVR1 detektiert werden. Als mögliche Ursachen der ausbleibenden Immunantworten wurden eine ineffiziente Aufnahme von CTB-HVR1-TCRCys über das Darmepithel, das Unvermögen der monomeren CTB-Fusionspartner sich im Mikromilieu pflanzlicher Membranen in funktionale Pentamere zusammenzulagern, eine unzureichende

Antigendosis, ein proteolytischer Abbau der Antigene durch Verdauungsenzyme, die Unzugänglichkeit immunrelevanter Epitope, die Induktion von oraler Toleranz, ein potentiell negativer Einfluss von Nikotin auf das murine Immunsystem sowie die Unwirksamkeit der mukosalen Adjuvantien aufgrund einer Applikation in unterschiedlichen mukosalen Geweben diskutiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein heterologes Targeting von Modellantigenen zur Pflanzenzellmembran durch die Fusion an die Membranankervariante TCRCys dazu geeignet ist, Antigenmengen in Tabak anzureichern, die prinzipiell mit einer oralen Verabreichung von unprozessierten Pflanzenmaterial im Einklang stehen. Die Entwicklung eines effektiven oral applizierbaren Impfstoffes aus Pflanzen erfordert jedoch neben der Wahl eines geeigneten Produktionssystems die Optimierung der eingesetzten Impfstrategien.

VII. LITERATUR

1. Kieny, M.P., J.L. Excler, and M. Girard, *Research and development of new vaccines against infectious diseases*. Am J Public Health, 2004. 94(11): p. 1931-5.
2. Nicoll, A. and V. Murray, *Health protection--a strategy and a national agency*. Public Health, 2002. 116(3): p. 129-37.
3. Plotkin, S.A., *Vaccines, vaccination, and vaccinology*. J Infect Dis, 2003. 187(9): p. 1349-59.
4. Hansson, M., P.A. Nygren, and S. Stahl, *Design and production of recombinant subunit vaccines*. Biotechnol Appl Biochem, 2000. 32 (Pt 2): p. 95-107.
5. Bittle, J.L. and S. Muir, *Vaccines produced by conventional means to control major infectious diseases of man and animals*. Adv Vet Sci Comp Med, 1989. 33: p. 1-63.
6. Makela, P.H., *Vaccines, coming of age after 200 years*. FEMS Microbiol Rev, 2000. 24(1): p. 9-20.
7. Siegrist, C.A., *Mechanisms underlying adverse reactions to vaccines*. J Comp Pathol, 2007. 137 Suppl 1: p. S46-50.
8. Loosmore, S.M., et al., *Engineering of genetically detoxified pertussis toxin analogs for development of a recombinant whooping cough vaccine*. Infect Immun, 1990. 58(11): p. 3653-62.
9. Tizard, *Grundlagen der Immunreaktion*, in *In: Einführung in die Immunologie für Tiermediziner, Biologen und Agrarwissenschaftler*. 1981, Paul Parey Verlag: Berlin und Hamburg. p. 1-9.
10. Walmsley, A.M. and C.J. Amtzen, *Plants for delivery of edible vaccines*. Curr Opin Biotechnol, 2000. 11(2): p. 126-9.
11. Howard, J.A., *Commercialization of plant-based vaccines from research and development to manufacturing*. Anim Health Res Rev, 2004. 5(2): p. 243-5.
12. Streatfield, S.J., *Plant-based vaccines for animal health*. Rev Sci Tech, 2005. 24(1): p. 189-99.
13. Antoniukas, L., H. Grammel, and U. Reichl, *Production of hantavirus Puumala nucleocapsid protein in Saccharomyces cerevisiae for vaccine and diagnostics*. J Biotechnol, 2006. 124(2): p. 347-62.
14. Clark, T.G. and D. Cassidy-Hanley, *Recombinant subunit vaccines: potentials and constraints*. Dev Biol (Basel), 2005. 121: p. 153-63.
15. Dalemans, W., *Insect cells as a new substrate for vaccine production*. Dev Biol (Basel), 2006. 123: p. 235-41; discussion 265-6.
16. Diminsky, D., et al., *Physical, chemical and immunological stability of CHO-derived hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles*. Vaccine, 1999. 18(1-2): p. 3-17.
17. Zhang, M., et al., *Immunogenicity and protective efficacy of a vaccine prepared from 53 kDa truncated hepatitis E virus capsid protein expressed in insect cells*. Vaccine, 2001. 20(5-6): p. 853-7.
18. Schirmbeck, R., et al., *Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis*. J Virol, 1994. 68(3): p. 1418-25.
19. Lefrancois, L., et al., *Soluble antigen and CD40 triggering are sufficient to induce primary and memory cytotoxic T cells*. J Immunol, 2000. 164(2): p. 725-32.
20. Neutra, M.R. and P.A. Kozlowski, *Mucosal vaccines: the promise and the challenge*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(2): p. 148-58.

21. Goetsch, L., et al., *Influence of administration dose and route on the immunogenicity and protective efficacy of BBG2Na, a recombinant respiratory syncytial virus subunit vaccine candidate*. *Vaccine*, 2000. 18(24): p. 2735-42.
22. Gutierrez, I., et al., *Influence of dose and immunization route on the serum Ig G antibody response to BSA loaded PLGA microspheres*. *Vaccine*, 2002. 20(17-18): p. 2181-90.
23. Holmgren, J. and C. Czerkinsky, *Mucosal immunity and vaccines*. *Nat Med*, 2005. 11(4 Suppl): p. S45-53.
24. Streatfield, S.J., *Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines*. *Methods*, 2006. 38(2): p. 150-7.
25. Sutter, R.W., S. Cochi, and J. Melnick, *Live attenuated poliovirus vaccines.*, in *In: Vaccines*, S.A. Plotkin and W. Orenstein, Editors. 1999: Philadelphia. p. 364-408.
26. Kelly, H., *Evidence for a causal association between oral polio vaccine and transverse myelitis: A case history and review of the Literature*. *J Paediatr Child Health*, 2006. 42(4): p. 155-9.
27. Levine, M.M., *Immunization against bacterial diseases of the intestine*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000. 31(4): p. 336-55.
28. Levine, M.M., et al., *Attenuated Salmonella typhi and Shigella as live oral vaccines and as live vectors*. *Behring Inst Mitt*, 1997(98): p. 120-3.
29. Levine, M.M. and J.B. Kaper, *Live oral vaccines against cholera: an update*. *Vaccine*, 1993. 11(2): p. 207-12.
30. Kapikian, A.Z., et al., *Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children*. *J Infect Dis*, 1996. 174 Suppl 1: p. S65-72.
31. Belshe, R.B., et al., *The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenzavirus vaccine in children*. *N Engl J Med*, 1998. 338(20): p. 1405-12.
32. Lico, C., Q. Chen, and L. Santi, *Viral vectors for production of recombinant proteins in plants*. *J Cell Physiol*, 2008. 216(2): p. 366-77.
33. Plasson, C., et al., *Production of recombinant proteins in suspension-cultured plant cells*. *Methods Mol Biol*, 2009. 483: p. 145-61.
34. Sharma, A.K. and M.K. Sharma, *Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities*. *Biotechnol Adv*, 2009. 27(6): p. 811-32.
35. Franconi, R., O.C. Demurtas, and S. Massa, *Plant-derived vaccines and other therapeutics produced in contained systems*. *Expert Rev Vaccines*. 9(8): p. 877-92.
36. Weathers, P.J., M.J. Towler, and J. Xu, *Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 85(5): p. 1339-51.
37. Sparrow, P.A., et al., *Pharma-Planta: road testing the developing regulatory guidelines for plant-made pharmaceuticals*. *Transgenic Res*, 2007. 16(2): p. 147-61.
38. Spok, A., *Molecular farming on the rise--GMO regulators still walking a tightrope*. *Trends Biotechnol*, 2007. 25(2): p. 74-82.
39. Sijmons, P.C., et al., *Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants*. *Biotechnology (N Y)*, 1990. 8(3): p. 217-21.
40. Drossard, J., *Downstream processing of plant-derived recombinant therapeutic proteins*, in *In: Molecular Farming*, R. Fischer and S. Schillberg, Editors. 2004, Wiley-VCH Verlag: Weinheim.
41. Lal, P., et al., *Edible vaccines: current status and future*. *Indian J Med Microbiol*, 2007. 25(2): p. 93-102.
42. Loza-Rubio, E. and E. Rojas-Anaya, *Vaccine production in plant systems--an aid to the control of viral diseases in domestic animals: a review*. *Acta Vet Hung*. 58(4): p. 511-22.

43. Floss, D.M., D. Falkenburg, and U. Conrad, *Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview*. Transgenic Res, 2007. 16(3): p. 315-32.
44. Kong, Q., et al., *Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(20): p. 11539-44.
45. Rice, J., W.M. Ainley, and P. Shewen, *Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health*. Anim Health Res Rev, 2005. 6(2): p. 199-209.
46. Streatfield, S.J., *Delivery of plant-derived vaccines*. Expert Opin Drug Deliv, 2005. 2(4): p. 719-28.
47. Chavali, S.R. and J.B. Campbell, *Adjuvant effects of orally administered saponins on humoral and cellular immune responses in mice*. Immunobiology, 1987. 174(3): p. 347-59.
48. Franconi, R., et al., *Plant-derived human papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection*. Cancer Res, 2002. 62(13): p. 3654-8.
49. Granell, A., A. Fernandez del-Carmen, and D. Orzaez, *In planta production of plant-derived and non-plant-derived adjuvants*. Expert Rev Vaccines. 9(8): p. 843-58.
50. Goldstein, D.A. and J.A. Thomas, *Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants*. QJM, 2004. 97(11): p. 705-16.
51. Fischer, R., et al., *Molecular farming of recombinant antibodies in plants*. Biol Chem, 1999. 380(7-8): p. 825-39.
52. Stoger, E., et al., *Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks*. Curr Opin Biotechnol, 2002. 13(2): p. 161-6.
53. Schillberg, S., N. Emans, and R. Fischer, *Antibody molecular farming in plants and plant cells*. Phytochem Rev, 2002. 1(1): p. 45-54.
54. Nicholson, L., et al., *A recombinant multimeric immunoglobulin expressed in rice shows assembly-dependent subcellular localization in endosperm cells*. Plant Biotechnol J, 2005. 3(1): p. 115-27.
55. Schahs, M., et al., *Production of a monoclonal antibody in plants with a humanized N-glycosylation pattern*. Plant Biotechnol J, 2007. 5(5): p. 657-63.
56. Weise, A., et al., *High-level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the Physcomitrella Delta-fuc-t Delta-xyl-t mutant*. Plant Biotechnol J, 2007. 5(3): p. 389-401.
57. Sourrouille, C., et al., *Down-regulated expression of plant-specific glycoepitopes in alfalfa*. Plant Biotechnol J, 2008. 6(7): p. 702-21.
58. Castilho, A., et al., *In planta protein sialylation through overexpression of the respective mammalian pathway*. J Biol Chem. 285(21): p. 15923-30.
59. Mason, H.S., D.M. Lam, and C.J. Arntzen, *Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(24): p. 11745-9.
60. Steinkellner, H., *Plant-Based Vaccines & Antibodies 2007 - Second International Conference*. IDrugs, 2007. 10(9): p. 626-9.
61. Kalbina, I., et al., *Expression of Helicobacter pylori TonB protein in transgenic Arabidopsis thaliana: toward production of vaccine antigens in plants*. Helicobacter. 15(5): p. 430-7.
62. Tacket, C.O., *Plant-derived vaccines against diarrheal diseases*. Vaccine, 2005. 23(15): p. 1866-9.
63. Matsui, T., et al., *Production of double repeated B subunit of Shiga toxin 2e at high levels in transgenic lettuce plants as vaccine material for porcine edema disease*. Transgenic Res.
64. Daniell, H., et al., *Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals*. Trends Plant Sci, 2009. 14(12): p. 669-79.

65. Khandelwal, A., G. Lakshmi Sita, and M.S. Shaila, *Oral immunization of cattle with hemagglutinin protein of rinderpest virus expressed in transgenic peanut induces specific immune responses*. *Vaccine*, 2003. 21(23): p. 3282-9.
66. Liang, W., et al., *Oral immunization of mice with plant-derived fimbrial adhesin FaeG induces systemic and mucosal K88ad enterotoxigenic Escherichia coli-specific immune responses*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006. 46(3): p. 393-9.
67. Pogrebnyak, N., et al., *Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(25): p. 9062-7.
68. Ramirez, Y.J., et al., *Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice*. *Clin Vaccine Immunol*, 2007. 14(6): p. 685-92.
69. Wang, Y., et al., *Generation and immunogenicity of Japanese encephalitis virus envelope protein expressed in transgenic rice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 380(2): p. 292-7.
70. Rosales-Mendoza, S., et al., *Ingestion of transgenic carrots expressing the Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge*. *Plant Cell Rep*, 2008. 27(1): p. 79-84.
71. Streatfield, S.J., et al., *Plant-based vaccines: unique advantages*. *Vaccine*, 2001. 19(17-19): p. 2742-8.
72. Wen, S.X., et al., *A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(18): p. 7082-7.
73. Wigdorovitz, A., et al., *Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants*. *J Gen Virol*, 2004. 85(Pt 7): p. 1825-32.
74. Nochi, T., et al., *Development of needle-free vaccine: rice-based oral vaccine induced protective immunity against cholera toxin*. *J Immunol*, 2007. 178: p. 41-44.
75. Kapusta, J., et al., *A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus*. *FASEB J*, 1999. 13(13): p. 1796-9.
76. Tacket, C.O., et al., *Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn*. *Vaccine*, 2004. 22(31-32): p. 4385-9.
77. Tacket, C.O., et al., *Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato*. *Nat Med*, 1998. 4(5): p. 607-9.
78. Tacket, C.O., et al., *Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes*. *J Infect Dis*, 2000. 182(1): p. 302-5.
79. Kusnadi, A.R., et al., *Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn*. *Biotechnol Prog*, 1998. 14(1): p. 149-55.
80. Woodard, S.L., et al., *Maize (Zea mays)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2003. 38(Pt 2): p. 123-30.
81. Ma, J.K., P.M. Drake, and P. Christou, *The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants*. *Nat Rev Genet*, 2003. 4(10): p. 794-805.
82. Hood, E.E., et al., *Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification*. *Molecular Breeding*, 1997. 3: p. 291-306.
83. Zhong, G.Y., et al., *Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds*. *Molecular Breeding*, 1999. 5: p. 345-356.
84. Terpe, K., *Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006. 72(2): p. 211-22.

85. Ferrer-Miralles, N., et al., *Microbial factories for recombinant pharmaceuticals*. *Microb Cell Fact*, 2009. 8: p. 17.
86. Hesse, F. and R. Wagner, *Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures*. *Trends Biotechnol*, 2000. 18(4): p. 173-80.
87. Ikononou, L., Y.J. Schneider, and S.N. Agathos, *Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003. 62(1): p. 1-20.
88. Ma, J.K., et al., *Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans*. *Nat Med*, 1998. 4(5): p. 601-6.
89. Weintraub, J.A., et al., *Clinical trial of a plant-derived antibody on recolonization of mutans streptococci*. *Caries Res*, 2005. 39(3): p. 241-50.
90. Boothe, J., et al., *Seed-based expression systems for plant molecular farming*. *Plant Biotechnol J*. 8(5): p. 588-606.
91. De Leede, L.G., et al., *Novel controlled-release Lemna-derived IFN-alpha2b (Locteron): pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial*. *J Interferon Cytokine Res*, 2008. 28(2): p. 113-22.
92. Hollak, C.E., et al., *Force majeure: therapeutic measures in response to restricted supply of imiglucerase (Cerezyme) for patients with Gaucher disease*. *Blood Cells Mol Dis*. 44(1): p. 41-7.
93. Aviezer, D., et al., *A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme--a preclinical and phase I investigation*. *PLoS One*, 2009. 4(3): p. e4792.
94. Jamal, A., et al., *Role of genetic factors and environmental conditions in recombinant protein production for molecular farming*. *Biotechnol Adv*, 2009. 27(6): p. 914-23.
95. Khattak, S., G. Darai, and A. Rosen-Wolff, *Puumala virus nucleocapsid protein expressed in transgenic plants is not immunogenic after oral administration*. *Virus Genes*, 2004. 29(1): p. 109-16.
96. Mor, T.S., M.A. Gomez-Lim, and K.E. Palmer, *Perspective: edible vaccines--a concept coming of age*. *Trends Microbiol*, 1998. 6(11): p. 449-53.
97. Mason, H.S., et al., *Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine*. *Trends Mol Med*, 2002. 8(7): p. 324-9.
98. Daniell, H., S.J. Streatfield, and K. Wycoff, *Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants*. *Trends Plant Sci*, 2001. 6(5): p. 219-26.
99. Ma, J.K., et al., *Generation and assembly of secretory antibodies in plants*. *Science*, 1995. 268(5211): p. 716-9.
100. Daniell, H., et al., *Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts*. *J Mol Biol*, 2001. 311(5): p. 1001-9.
101. Ma, J.K., *Genes, greens, and vaccines*. *Nat Biotechnol*, 2000. 18(11): p. 1141-2.
102. Pniewski, T., et al., *Low-dose oral immunization with lyophilized tissue of herbicide-resistant lettuce expressing hepatitis B surface antigen for prototype plant-derived vaccine tablet formulation*. *J Appl Genet*.
103. Kaiser, J., *Is the drought over for pharming?* *Science*, 2008. 320(5875): p. 473-5.
104. Ling, H.Y., A. Pelosi, and A.M. Walmsley, *Current status of plant-made vaccines for veterinary purposes*. *Expert Rev Vaccines*. 9(8): p. 971-82.
105. Ma, J.K., et al., *Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants*. *EMBO Rep*, 2005. 6(7): p. 593-9.
106. Ji, G., et al., *Predictive modeling of plant messenger RNA polyadenylation sites*. *BMC Bioinformatics*, 2007. 8: p. 43.

107. Kay, R., et al., *Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes*. Science, 1987. 236(4806): p. 1299-302.
108. Richter, L.J., et al., *Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization*. Nat Biotechnol, 2000. 18(11): p. 1167-71.
109. Liu, Q. and Q. Xue, *Comparative studies on codon usage pattern of chloroplasts and their host nuclear genes in four plant species*. J Genet, 2005. 84(1): p. 55-62.
110. Kawabe, A. and N.T. Miyashita, *Patterns of codon usage bias in three dicot and four monocot plant species*. Genes Genet Syst, 2003. 78(5): p. 343-52.
111. Heifetz, P.B., *Genetic engineering of the chloroplast*. Biochimie, 2000. 82(6-7): p. 655-66.
112. Tregoning, J., et al., *New advances in the production of edible plant vaccines: chloroplast expression of a tetanus vaccine antigen, TetC*. Phytochemistry, 2004. 65(8): p. 989-94.
113. Davoodi-Semiromi, A., N. Samson, and H. Daniell, *The green vaccine: A global strategy to combat infectious and autoimmune diseases*. Hum Vaccin, 2009. 5(7): p. 488-93.
114. Ruf, S., et al., *Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit*. Nat Biotechnol, 2001. 19(9): p. 870-5.
115. Scholthof, H.B., K.B. Scholthof, and A.O. Jackson, *Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants*. Annu Rev Phytopathol, 1996. 34: p. 299-323.
116. Yusibov, V., et al., *The potential of plant virus vectors for vaccine production*. Drugs R D, 2006. 7(4): p. 203-17.
117. Mor, T.S., et al., *Geminivirus vectors for high-level expression of foreign proteins in plant cells*. Biotechnol Bioeng, 2003. 81(4): p. 430-7.
118. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science, 2002. 295(5561): p. 1852-8.
119. Di Fiore, S., et al., *Targeting tryptophan decarboxylase to selected subcellular compartments of tobacco plants affects enzyme stability and in vivo function and leads to a lesion-mimic phenotype*. Plant Physiol, 2002. 129(3): p. 1160-9.
120. Jiang, L. and S.S. Sun, *Membrane anchors for vacuolar targeting: application in plant bioreactors*. Trends Biotechnol, 2002. 20(3): p. 99-102.
121. Vaquero, C., et al., *A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco*. FASEB J, 2002. 16(3): p. 408-10.
122. Vine, N.D., et al., *Assembly and plasma membrane targeting of recombinant immunoglobulin chains in plants with a murine immunoglobulin transmembrane sequence*. Plant Mol Biol, 2001. 45(2): p. 159-67.
123. Schillberg, S., et al., *Plasma membrane display of anti-viral single chain Fv fragments confers resistance to tobacco mosaic virus*. Molecular Breeding, 2000. 6: p. 317-326.
124. Drake, P.M., et al., *Transgenic plants expressing antibodies: a model for phytoremediation*. FASEB J, 2002. 16(14): p. 1855-60.
125. Gross, G. and Z. Eshhar, *Endowing T cells with antibody specificity using chimeric T cell receptors*. FASEB J, 1992. 6(15): p. 3370-8.
126. Bentley, G.A., et al., *Crystal structure of the beta chain of a T cell antigen receptor*. Science, 1995. 267(5206): p. 1984-7.
127. Fields, B.A., et al., *Crystal structure of the V alpha domain of a T cell antigen receptor*. Science, 1995. 270(5243): p. 1821-4.
128. Kears, K.P., J.L. Roberts, and A. Singer, *TCR alpha-CD3 delta epsilon association is the initial step in alpha beta dimer formation in murine T cells and is limiting in immature CD4+ CD8+ thymocytes*. Immunity, 1995. 2(4): p. 391-9.

129. Hoppmann, V., *Untersuchungen zur Endozytose in Pflanzenzellen mittels artifizierlicher Rezeptoren*. Dissertation., 2003: p. Rheinisch-Westfälisch Technische Hochschule Aachen.
130. Twyman, R.M., et al., *Molecular farming in plants: host systems and expression technology*. Trends Biotechnol, 2003. 21(12): p. 570-8.
131. Shinmyo, A. and K. Kato, *Molecular farming: production of drugs and vaccines in higher plants*. J Antibiot (Tokyo). 63(8): p. 431-3.
132. Siegmund, B., E. Leitner, and W. Pfannhauser, *Determination of the nicotine content of various edible nightshades (Solanaceae) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake*. J Agric Food Chem, 1999. 47(8): p. 3113-20.
133. Huang, Y., et al., *Immunogenicity of the epitope of the foot-and-mouth disease virus fused with a hepatitis B core protein as expressed in transgenic tobacco*. Viral Immunol, 2005. 18(4): p. 668-77.
134. Huang, Z., et al., *Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice*. Vaccine, 2001. 19(15-16): p. 2163-71.
135. Mowat, A.M. and J.L. Viney, *The anatomical basis of intestinal immunity*. Immunol Rev, 1997. 156: p. 145-66.
136. St Clair, N., et al., *Cross-linked protein crystals for vaccine delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(17): p. 9469-74.
137. Williamson, E., J.M. O'Malley, and J.L. Viney, *Visualizing the T-cell response elicited by oral administration of soluble protein antigen*. Immunology, 1999. 97(4): p. 565-72.
138. Cossart, P. and P.J. Sansonetti, *Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens*. Science, 2004. 304(5668): p. 242-8.
139. Sheikh, N.A., et al., *Generation of antigen specific CD8+ cytotoxic T cells following immunization with soluble protein formulated with novel glycoside adjuvants*. Vaccine, 1999. 17(23-24): p. 2974-82.
140. Cox, E., et al., *Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa*. Vet Res, 2006. 37(3): p. 511-39.
141. Freytag, L.C. and J.D. Clements, *Mucosal adjuvants*. Vaccine, 2005. 23(15): p. 1804-13.
142. Harandi, A.M. and D. Medaglini, *Mucosal adjuvants*. Curr HIV Res. 8(4): p. 330-5.
143. Beier, R. and A. Gebert, *Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches*. Am J Physiol, 1998. 275(1 Pt 1): p. G130-7.
144. Frey, A. and M.R. Neutra, *Targeting of mucosal vaccines to Peyer's patch M cells*. Behring Inst Mitt, 1997(98): p. 376-89.
145. Liang, M.T., et al., *Particulate systems as adjuvants and carriers for peptide and protein antigens*. Curr Drug Deliv, 2006. 3(4): p. 379-88.
146. Niedergang, F. and M.N. Kweon, *New trends in antigen uptake in the gut mucosa*. Trends Microbiol, 2005. 13(10): p. 485-90.
147. Borges, O., et al., *Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination*. J Control Release, 2006. 114(3): p. 348-58.
148. Illum, L., *Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient*. Pharm Res, 1998. 15(9): p. 1326-31.
149. Morris, W., M.C. Steinhoff, and P.K. Russell, *Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation*. Vaccine, 1994. 12(1): p. 5-11.
150. Rajkannan, R., et al., *Development of hepatitis B oral vaccine using B-cell epitope loaded PLG microparticles*. Vaccine, 2006. 24(24): p. 5149-57.
151. Rebelatto, M.C., et al., *Induction of systemic and mucosal immune response in cattle by intranasal administration of pig serum albumin in alginate microparticles*. Vet Immunol Immunopathol, 2001. 83(1-2): p. 93-105.

152. Rydell, N., L. Stertman, and I. Sjöholm, *Starch microparticles as vaccine adjuvant*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2005. 2(5): p. 807-28.
153. Migunov, A.I., O.K. Kuznetsov, and O.I. Kiselev, *[Use of liposomes for vaccines design]*. *Vopr Virusol*, 2001. 46(2): p. 4-7.
154. Furrle, E., et al., *Induction of local innate immune responses and modulation of antigen uptake as mechanisms underlying the mucosal adjuvant properties of immune stimulating complexes (ISCOMS)*. *Vaccine*, 2002. 20(17-18): p. 2254-62.
155. Mihailova, M., et al., *Recombinant virus-like particles as a carrier of B- and T-cell epitopes of hepatitis C virus (HCV)*. *Vaccine*, 2006. 24(20): p. 4369-77.
156. Shuttleworth, G., D.C. Eckery, and P. Awram, *Oral and intraperitoneal immunization with rotavirus 2/6 virus-like particles stimulates a systemic and mucosal immune response in mice*. *Arch Virol*, 2005. 150(2): p. 341-9.
157. Huang, Z., et al., *A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants*. *Biotechnol Bioeng*, 2009. 103(4): p. 706-14.
158. Herbst-Kralovetz, M., H.S. Mason, and Q. Chen, *Norwalk virus-like particles as vaccines*. *Expert Rev Vaccines*. 9(3): p. 299-307.
159. Fooks, A.R., *Live viral vectors: construction of a replication-deficient recombinant adenovirus*. *Methods Mol Med*, 2003. 87: p. 37-50.
160. He, Q., et al., *Live-attenuated influenza viruses as delivery vectors for Chlamydia vaccines*. *Immunology*, 2007. 122(1): p. 28-37.
161. Staib, C. and G. Sutter, *Live viral vectors: vaccinia virus*. *Methods Mol Med*, 2003. 87: p. 51-68.
162. Pasetti, M.F., M.M. Levine, and M.B. Sztein, *Animal models paving the way for clinical trials of attenuated Salmonella enterica serovar Typhi live oral vaccines and live vectors*. *Vaccine*, 2003. 21(5-6): p. 401-18.
163. Zheng, J.P., et al., *Construction of a novel Shigella live-vector strain co-expressing CS3 and LTb/STm of enterotoxigenic E.coli*. *World J Gastroenterol*, 2005. 11(22): p. 3411-8.
164. Autenrieth, I.B. and M.A. Schmidt, *Bacterial interplay at intestinal mucosal surfaces: implications for vaccine development*. *Trends Microbiol*, 2000. 8(10): p. 457-64.
165. Imberty, A., E.P. Mitchell, and M. Wimmerova, *Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins*. *Curr Opin Struct Biol*, 2005. 15(5): p. 525-34.
166. Jepson, M.A., M.A. Clark, and B.H. Hirst, *M cell targeting by lectins: a strategy for mucosal vaccination and drug delivery*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004. 56(4): p. 511-25.
167. Cox, E., et al., *Oral immunisation of pigs with fimbrial antigens of enterotoxigenic E. coli: an interesting model to study mucosal immune mechanisms*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2002. 87(3-4): p. 287-90.
168. Hussain, N. and A.T. Florence, *Utilizing bacterial mechanisms of epithelial cell entry: invasin-induced oral uptake of latex nanoparticles*. *Pharm Res*, 1998. 15(1): p. 153-6.
169. Higgins, L.M., et al., *In vivo phage display to identify M cell-targeting ligands*. *Pharm Res*, 2004. 21(4): p. 695-705.
170. Lavelle, E.C., et al., *Effects of cholera toxin on innate and adaptive immunity and its application as an immunomodulatory agent*. *J Leukoc Biol*, 2004. 75(5): p. 756-63.
171. Zurbriggen, R., et al., *Nonclinical safety evaluation of Escherichia coli heat-labile toxin mucosal adjuvant as a component of a nasal influenza vaccine*. *Expert Rev Vaccines*, 2003. 2(2): p. 295-304.
172. Eriksson, A.M., K.M. Schon, and N.Y. Lycke, *The cholera toxin-derived CTAI-DD vaccine adjuvant administered intranasally does not cause inflammation or accumulate in the nervous tissues*. *J Immunol*, 2004. 173(5): p. 3310-9.

173. Pine, S., et al., *Intranasal immunization with influenza vaccine and a detoxified mutant of heat labile enterotoxin from Escherichia coli (LTK63)*. J Control Release, 2002. 85(1-3): p. 263-70.
174. Tamura, S.I. and T. Kurata, *A proposal for safety standards for human use of cholera toxin (or Escherichia coli heat-labile enterotoxin) derivatives as an adjuvant of nasal inactivated influenza vaccine*. Jpn J Infect Dis, 2000. 53(3): p. 98-106.
175. Kawai, T. and S. Akira, *Pathogen recognition with Toll-like receptors*. Curr Opin Immunol, 2005. 17(4): p. 338-44.
176. Baldrige, J.R., et al., *Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration*. Vaccine, 2000. 18(22): p. 2416-25.
177. Jennemann, R., et al., *Effects of monophosphoryllipid-A on the immunization of mice with keyhole limpet hemocyanin- and muramyldipeptide-ganglioside Gfpt1 conjugates*. J Biochem, 1996. 119(2): p. 378-84.
178. Horner, A.A., et al., *Immunostimulatory DNA is a potent mucosal adjuvant*. Cell Immunol, 1998. 190(1): p. 77-82.
179. Field, M., M.C. Rao, and E.B. Chang, *Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease (I)*. N Engl J Med, 1989. 321(12): p. 800-6.
180. Hovey, B.T., et al., *Structure-based discovery of a pore-binding ligand: towards assembly inhibitors for cholera and related AB5 toxins*. J Mol Biol, 1999. 285(3): p. 1169-78.
181. Holmgren, J., et al., *Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside of small intestine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. 72(7): p. 2520-4.
182. Lencer, W.I., T.R. Hirst, and R.K. Holmes, *Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin*. Biochim Biophys Acta, 1999. 1450(3): p. 177-90.
183. Eriksson, K., et al., *Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development*. Infect Immun, 2003. 71(4): p. 1740-7.
184. George-Chandy, A., et al., *Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells*. Infect Immun, 2001. 69(9): p. 5716-25.
185. Czerkinsky, C., et al., *Cholera toxin B subunit as transmucosal carrier-delivery and immunomodulating system for induction of antiinfectious and antipathological immunity*. Ann N Y Acad Sci, 1996. 778: p. 185-93.
186. Elson, C.O., *Cholera toxin and its subunits as potential oral adjuvants*. Curr Top Microbiol Immunol, 1989. 146: p. 29-33.
187. Jani, D., et al., *Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants*. Transgenic Res, 2002. 11(5): p. 447-54.
188. Jiang, X.L., et al., *Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice*. Transgenic Res, 2007. 16(2): p. 169-75.
189. Kim, T.G. and W.H. Langridge, *Assembly of cholera toxin B subunit full-length rotavirus NSP4 fusion protein oligomers in transgenic potato*. Plant Cell Rep, 2003. 21(9): p. 884-90.
190. Li, J.T., et al., *Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations*. Virology, 2006. 356(1-2): p. 171-8.
191. Nochi, T., et al., *Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(26): p. 10986-91.
192. Bregenholt, S., et al., *The cholera toxin B subunit is a mucosal adjuvant for oral tolerance induction in type 1 diabetes*. Scand J Immunol, 2003. 57(5): p. 432-8.
193. Isaka, M., et al., *Recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) as a mucosal adjuvant enhances induction of diphtheria and tetanus antitoxin antibodies in mice by intranasal*

- administration with diphtheria-pertussis-tetanus (DPT) combination vaccine. Vaccine, 2004. 22(23-24): p. 3061-8.*
194. Stanford, M., et al., *Oral tolerization with peptide 336-351 linked to cholera toxin B subunit in preventing relapses of uveitis in Behcet's disease. Clin Exp Immunol, 2004. 137(1): p. 201-8.*
 195. Yu, J. and W.H. Langridge, *A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. Nat Biotechnol, 2001. 19(6): p. 548-52.*
 196. Yuki, Y., et al., *Production of a recombinant hybrid molecule of cholera toxin-B-subunit and proteolipid-protein-peptide for the treatment of experimental encephalomyelitis. Biotechnol Bioeng, 2001. 74(1): p. 62-9.*
 197. Muhlradt, P.F., et al., *Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from Mycoplasma fermentans acting at picomolar concentration. J Exp Med, 1997. 185(11): p. 1951-8.*
 198. Takeuchi, O., et al., *Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. J Immunol, 2000. 164(2): p. 554-7.*
 199. Link, C., et al., *The Toll-like receptor ligand MALP-2 stimulates dendritic cell maturation and modulates proteasome composition and activity. Eur J Immunol, 2004. 34(3): p. 899-907.*
 200. Rharbaoui, F., et al., *The Mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant. Eur J Immunol, 2002. 32(10): p. 2857-65.*
 201. Weigt, H., et al., *Synthetic mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 induces maturation and function of dendritic cells. Immunobiology, 2003. 207(3): p. 223-33.*
 202. Becker, P.D., et al., *The HIV-1 matrix protein p17 can be efficiently delivered by intranasal route in mice using the TLR 2/6 agonist MALP-2 as mucosal adjuvant. Vaccine, 2006. 24(25): p. 5269-76.*
 203. Borsutzky, S., et al., *Efficient systemic and mucosal responses against the HIV-1 Tat protein by prime/boost vaccination using the lipopeptide MALP-2 as adjuvant. Vaccine, 2006. 24(12): p. 2049-56.*
 204. Luhrmann, A., et al., *Improved intranasal immunization with live-attenuated measles virus after co-inoculation of the lipopeptide MALP-2. Vaccine, 2005. 23(39): p. 4721-6.*
 205. Olive, C., et al., *Enhanced protection against Streptococcus pyogenes infection by intranasal vaccination with a dual antigen component M protein/SfbI lipid core peptide vaccine formulation. Vaccine, 2007. 25(10): p. 1789-97.*
 206. Schulze, K., et al., *Intranasal vaccination with SfbI or M protein-derived peptides conjugated to diphtheria toxoid confers protective immunity against a lethal challenge with Streptococcus pyogenes. Vaccine, 2006. 24(35-36): p. 6088-95.*
 207. Diggle, S.P., et al., *4-quinolone signalling in Pseudomonas aeruginosa: old molecules, new perspectives. Int J Med Microbiol, 2006. 296(2-3): p. 83-91.*
 208. Hooi, D.S., et al., *Differential immune modulatory activity of Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecules. Infect Immun, 2004. 72(11): p. 6463-70.*
 209. Alter, M.J., *Epidemiology of hepatitis C virus infection. World J Gastroenterol, 2007. 13(17): p. 2436-41.*
 210. Shepard, C.W., L. Finelli, and M.J. Alter, *Global epidemiology of hepatitis C virus infection. Lancet Infect Dis, 2005. 5(9): p. 558-67.*
 211. Lake-Bakaar, G., *Current and future therapy for chronic hepatitis C virus liver disease. Curr Drug Targets Infect Disord, 2003. 3(3): p. 247-53.*
 212. Forns, X., J. Bukh, and R.H. Purcell, *The challenge of developing a vaccine against hepatitis C virus. J Hepatol, 2002. 37(5): p. 684-95.*

213. Korenaga, M., et al., *A possible role of hypervariable region 1 quasispecies in escape of hepatitis C virus particles from neutralization*. J Viral Hepat, 2001. 8(5): p. 331-40.
214. Lavillette, D., et al., *Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus*. Hepatology, 2005. 41(2): p. 265-74.
215. Mondelli, M.U., et al., *Variability or conservation of hepatitis C virus hypervariable region 1? Implications for immune responses*. J Biosci, 2003. 28(3): p. 305-10.
216. Callens, N., et al., *Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry*. J Virol, 2005. 79(24): p. 15331-41.
217. Kurihara, C., et al., *A highly hydrophobic domain within hypervariable region 1 may be related to the entry of hepatitis C virus into cultured human hepatoma cells*. J Med Virol, 2004. 74(4): p. 546-55.
218. Puntoriero, G., et al., *Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants*. EMBO J, 1998. 17(13): p. 3521-33.
219. Zhou, Y.H., M. Sugitani, and M. Esumi, *Sequences in the hypervariable region 1 of hepatitis C virus show only minimal variability in the presence of antibodies against hypervariable region 1 during acute infection in chimpanzees*. Arch Virol, 2002. 147(10): p. 1955-62.
220. Bermejo, M., et al., *[Epidemiology of tuberculosis]*. An Sist Sanit Navar, 2007. 30 Suppl 2: p. 7-19.
221. Brightbill, H.D., et al., *Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors*. Science, 1999. 285(5428): p. 732-6.
222. Corbett, E.L., et al., *HIV-1/AIDS and the control of other infectious diseases in Africa*. Lancet, 2002. 359(9324): p. 2177-87.
223. Garcia-Contreras, L., et al., *Evaluation of dosing regimen of respirable rifampicin biodegradable microspheres in the treatment of tuberculosis in the guinea pig*. J Antimicrob Chemother, 2006. 58(5): p. 980-6.
224. Kaufmann, S.H., *Is the development of a new tuberculosis vaccine possible?* Nat Med, 2000. 6(9): p. 955-60.
225. Burman, W.J., K. Gallicano, and C. Peloquin, *Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials*. Clin Pharmacokinet, 2001. 40(5): p. 327-41.
226. Andersen, P. and T.M. Doherty, *The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine*. Nat Rev Microbiol, 2005. 3(8): p. 656-62.
227. Doherty, T.M. and G. Rook, *Progress and hindrances in tuberculosis vaccine development*. Lancet, 2006. 367(9514): p. 947-9.
228. Langermans, J.A., et al., *Divergent effect of bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccination on Mycobacterium tuberculosis infection in highly related macaque species: implications for primate models in tuberculosis vaccine research*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(20): p. 11497-502.
229. Collins, H.L. and S.H. Kaufmann, *Prospects for better tuberculosis vaccines*. Lancet Infect Dis, 2001. 1(1): p. 21-8.
230. Brandt, L., et al., *ESAT-6 subunit vaccination against Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 2000. 68(2): p. 791-5.
231. Harth, G., B.Y. Lee, and M.A. Horwitz, *High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic mycobacteria of four major Mycobacterium tuberculosis extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets*. Infect Immun, 1997. 65(6): p. 2321-8.
232. Kravchenko, T.B., et al., *Cloning and expression of protective antigens of Mycobacterium tuberculosis Ag85B and ESAT-6 in Francisella tularensis 15/10*. Biochemistry (Mosc), 2007. 72(7): p. 735-43.

233. Oettinger, T. and A.B. Andersen, *Cloning and B-cell-epitope mapping of MPT64 from Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. Infect Immun, 1994. 62(5): p. 2058-64.
234. Roche, P.W., C.G. Feng, and W.J. Britton, *Human T-cell epitopes on the Mycobacterium tuberculosis secreted protein MPT64*. Scand J Immunol, 1996. 43(6): p. 662-70.
235. Weinrich Olsen, A., et al., *Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and esat-6*. Infect Immun, 2001. 69(5): p. 2773-8.
236. Roche, P.W., et al., *Expression of Mycobacterium tuberculosis MPT64 in recombinant Myco. smegmatis: purification, immunogenicity and application to skin tests for tuberculosis*. Clin Exp Immunol, 1996. 103(2): p. 226-32.
237. Wilcke, J.T., et al., *Clinical evaluation of MPT-64 and MPT-59, two proteins secreted from Mycobacterium tuberculosis, for skin test reagents*. Tuber Lung Dis, 1996. 77(3): p. 250-6.
238. Delogu, G., et al., *DNA vaccination against tuberculosis: expression of a ubiquitin-conjugated tuberculosis protein enhances antimycobacterial immunity*. Infect Immun, 2000. 68(6): p. 3097-102.
239. Natilla, A., et al., *Cucumber mosaic virus as carrier of a hepatitis C virus-derived epitope*. Arch Virol, 2004. 149(1): p. 137-54.
240. Breyne, P., et al., *Characterization of a plant scaffold attachment region in a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco*. Plant Cell, 1992. 4(4): p. 463-71.
241. Ruthardt, N., *Eine Untersuchung zur Endozytose in Pflanzenzellen*. Dissertation., 2005: p. Rheinisch-Westfälisch Technische Hochschule Aachen.
242. Cubitt, A.B., et al., *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. Trends Biochem Sci, 1995. 20(11): p. 448-55.
243. Mekalanos, J.J., et al., *Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development*. Nature, 1983. 306(5943): p. 551-7.
244. Nemchinov, L.G., et al., *Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against hepatitis C virus*. Arch Virol, 2000. 145(12): p. 2557-73.
245. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. 166(4): p. 557-80.
246. Koncz, C. and J. Schell, *The promotor of TI-DNA Gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector*. Molecular & General Genetics, 1986. 204: p. 383-396.
247. Maliga, P., A. Sz-Breznovits, and L. Marton, *Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco*. Nat New Biol, 1973. 244(131): p. 29-30.
248. Schiermeyer, A., et al., *Production of Desmodus rotundus salivary plasminogen activator alpha1 (DSPAlpha1) in tobacco is hampered by proteolysis*. Biotechnol Bioeng, 2005. 89(7): p. 848-58.
249. Kato, A., et al., *Liquid suspension culture of tobacco cells*. Proc. IV IFS. Ferment Technol Today, 1972: p. 689-98.
250. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. 239(4839): p. 487-91.
251. Horton, R.M., et al., *Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension*. Gene, 1989. 77(1): p. 61-8.
252. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning-a laboratory manual*. 2000.
253. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5463-7.
254. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(9): p. 4350-4.

255. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. *Anal Biochem*, 1981. 112(2): p. 195-203.
256. Aman, A.T., et al., *A mutant cholera toxin B subunit that binds GM1- ganglioside but lacks immunomodulatory or toxic activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(15): p. 8536-41.
257. Dovzhenko, A., U. Bergen, and H.U. Koop, *Thin-alginate-layer technique for protoplast culture of tobacco leaf protoplasts: shoot formation in less than two weeks*. *Protoplasma*, 1998. 204: p. 114-118.
258. Keinanen, M., N.J. Oldham, and I.T. Baldwin, *Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in Nicotiana attenuata*. *J Agric Food Chem*, 2001. 49(8): p. 3553-8.
259. Chaumont, F., et al., *Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity*. *Plant Physiol*, 2000. 122(4): p. 1025-34.
260. Marmagne, A., et al., *Identification of new intrinsic proteins in Arabidopsis plasma membrane proteome*. *Mol Cell Proteomics*, 2004. 3(7): p. 675-91.
261. DeWitt, N.D. and M.R. Sussman, *Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H(+)-ATPase) in phloem companion cells*. *Plant Cell*, 1995. 7(12): p. 2053-67.
262. Zimmermann, S., et al., *Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in Nicotiana tabacum*. *Molecular Breeding*, 1998. 4(4): p. 369-79.
263. Attar, K.S., et al., *Expression of chimeric HCV peptide in transgenic tobacco plants infected with recombinant alfalfa mosaic virus fir development of a plant-derived vaccine against HCV*. *African Journal of Biotechnology*, 2004.
264. Steinmetz, N., *Präsentation von hypervariablen antigenen Bereichen des Hepatitis C Virus in Pflanzen mittels eines viralen Vektors*. Diplomarbeit, 2004: p. Rheinisch-Westfälisch Technische Hochschule Aachen.
265. Feng, C.G., et al., *Induction of CD8+ T-lymphocyte responses to a secreted antigen of Mycobacterium tuberculosis by an attenuated vaccinia virus*. *Immunol Cell Biol*, 2001. 79(6): p. 569-75.
266. Shivprasad, S., et al., *Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors*. *Virology*, 1999. 255(2): p. 312-23.
267. You, Y.H., et al., *Expression, purification, and characterization of a two domain carcinoembryonic antigen minigene (N-A3) in pichia pastoris. The essential role of the N-domain*. *Anticancer Res*, 1998. 18(5A): p. 3193-201.
268. Yoshikai, Y., et al., *Sequence and expression of transcripts of the human T-cell receptor beta-chain genes*. *Nature*, 1984. 312(5994): p. 521-4.
269. Sonnhammer, E.L., G. von Heijne, and A. Krogh, *A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences*. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 1998. 6: p. 175-82.
270. von Heijne, G. and Y. Gavel, *Topogenic signals in integral membrane proteins*. *Eur J Biochem*, 1988. 174(4): p. 671-8.
271. May, T. and J. Soll, *Positive charges determine the topology and functionality of the transmembrane domain in the chloroplastic outer envelope protein Toc34*. *J Cell Biol*, 1998. 141(4): p. 895-904.
272. Williamson, J.D., et al., *Differential Accumulation of a Transcript Driven by the CaMV 35S Promoter in Transgenic Tobacco*. *Plant Physiol*, 1989. 90(4): p. 1570-6.

273. Mishra, S., D.K. Yadav, and R. Tuli, *Ubiquitin fusion enhances cholera toxin B subunit expression in transgenic plants and the plant-expressed protein binds GM1 receptors more efficiently*. J Biotechnol, 2006. 127(1): p. 95-108.
274. Harakuni, T., et al., *Heteropentameric cholera toxin B subunit chimeric molecules genetically fused to a vaccine antigen induce systemic and mucosal immune responses: a potential new strategy to target recombinant vaccine antigens to mucosal immune systems*. Infect Immun, 2005. 73(9): p. 5654-65.
275. Hardy, S.J., et al., *Coordinated assembly of multisubunit proteins: oligomerization of bacterial enterotoxins in vivo and in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(19): p. 7109-13.
276. von Heijne, G., *Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule*. J Mol Biol, 1992. 225(2): p. 487-94.
277. Dalbey, R.E., et al., *The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases*. Protein Sci, 1997. 6(6): p. 1129-38.
278. Klumperman, J., *Transport between ER and Golgi*. Curr Opin Cell Biol, 2000. 12(4): p. 445-9.
279. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem, 1998. 67: p. 509-44.
280. Holst, H.U., et al., *LDL receptor-GFP fusion proteins: new tools for the characterisation of disease-causing mutations in the LDL receptor gene*. Eur J Hum Genet, 2001. 9(11): p. 815-22.
281. Magnuson, N.S., et al., *Enhanced recovery of a secreted mammalian protein from suspension culture of genetically modified tobacco cells*. Protein Expr Purif, 1996. 7(2): p. 220-8.
282. Kwon, T.H., et al., *Expression and secretion of the heterodimeric protein interleukin-12 in plant cell suspension culture*. Biotechnol Bioeng, 2003. 81(7): p. 870-5.
283. Haasen, D., et al., *Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in Arabidopsis thaliana*. Plant J, 1999. 20(6): p. 695-705.
284. Brandizzi, F., M. Fricker, and C. Hawes, *A greener world: the revolution in plant bioimaging*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3(7): p. 520-30.
285. Barlow, R.B. and L.J. McLeod, *Some studies on cytosine and its methylated derivatives*. Br J Pharmacol, 1969. 35(1): p. 161-74.
286. RTECS, *Registry of toxic effects of chemical substances*. NIOSH 3A, 1986: p. 3060-3424.
287. Baldwin, I.T., et al., *Quantification, correlations and manipulations of wounding-induced changes in jasmonic acid and nicotine in Nicotiana glauca*. Planta, 1997. 201: p. 397-404.
288. Baldwin, I.T., *The alkaloidal responses of wild type tobacco to real and simulated herbivory*. Oecologia, 1988. 77: p. 378-381.
289. Ohnmeiss, T.E., et al., *Within-plant relationships among wounding, jasmonic acid, and nicotine: implications for defense in Nicotiana glauca*. New Phytologist, 1997. 137: p. 441-452.
290. Alworth, W.L. and H. Rapoport, *Biosynthesis of the nicotine alkaloids in Nicotiana glauca. Interrelationships among nicotine, nornicotine, anabasine, and anatabine*. Arch Biochem Biophys, 1965. 112(1): p. 45-53.
291. Mason, H.S., et al., *Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(11): p. 5335-40.
292. Fagarasan, S. and T. Honjo, *Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(1): p. 63-72.

293. Lamm, M.E., *Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces*. Annu Rev Microbiol, 1997. 51: p. 311-40.
294. Johansen, F.E., et al., *Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice*. J Exp Med, 1999. 190(7): p. 915-22.
295. Boland, D., et al., *A panel of CAbs antibodies recognize endogenous and ectopically expressed INGL protein*. Hybridoma, 2000. 19(2): p. 161-5.
296. Frey, A., et al., *Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting*. J Exp Med, 1996. 184(3): p. 1045-59.
297. Lauer, S., et al., *Analysis of cholera toxin-ganglioside interactions by flow cytometry*. Biochemistry, 2002. 41(6): p. 1742-51.
298. Merritt, E.A., et al., *Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide*. Protein Sci, 1994. 3(2): p. 166-75.
299. Schon, A. and E. Freire, *Thermodynamics of intersubunit interactions in cholera toxin upon binding to the oligosaccharide portion of its cell surface receptor, ganglioside GM1*. Biochemistry, 1989. 28(12): p. 5019-24.
300. Jobling, M.G. and R.K. Holmes, *Analysis of structure and function of the B subunit of cholera toxin by the use of site-directed mutagenesis*. Mol Microbiol, 1991. 5(7): p. 1755-67.
301. Ludwig, D.S., R.K. Holmes, and G.K. Schoolnik, *Chemical and immunochemical studies on the receptor binding domain of cholera toxin B subunit*. J Biol Chem, 1985. 260(23): p. 12528-34.
302. Jobling, M.G. and R.K. Holmes, *Mutational analysis of ganglioside GM(1)-binding ability, pentamer formation, and epitopes of cholera toxin B (CTB) subunits and CTB/heat-labile enterotoxin B subunit chimeras*. Infect Immun, 2002. 70(3): p. 1260-71.
303. Hirst, T.R. and J. Holmgren, *Conformation of protein secreted across bacterial outer membranes: a study of enterotoxin translocation from Vibrio cholerae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(21): p. 7418-22.
304. Hirst, T.R., L.L. Randall, and S.J. Hardy, *Cellular location of heat-labile enterotoxin in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1984. 157(2): p. 637-42.
305. Hofstra, H. and B. Witholt, *Kinetics of synthesis, processing, and membrane transport of heat-labile enterotoxin, a periplasmic protein in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1984. 259(24): p. 15182-7.
306. Arakawa, T., et al., *Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants*. Transgenic Res, 1997. 6(6): p. 403-13.
307. Limaye, A., et al., *Receptor-mediated oral delivery of a bioencapsulated green fluorescent protein expressed in transgenic chloroplasts into the mouse circulatory system*. FASEB J, 2006. 20(7): p. 959-61.
308. Molina, A., et al., *High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts*. Plant Biotechnol J, 2004. 2(2): p. 141-53.
309. Sun, M., et al., *Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in Chlamydomonas reinhardtii chloroplast*. Biotechnol Lett, 2003. 25(13): p. 1087-92.
310. Dreesen, I.A., G. Charpin-El Hamri, and M. Fussenegger, *Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from Staphylococcus aureus infection*. J Biotechnol. 145(3): p. 273-80.
311. Areas, A.P., et al., *Synthesis of cholera toxin B subunit gene: cloning and expression of a functional 6XHis-tagged protein in Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2002. 25(3): p. 481-7.

312. Sadeghi, H., et al., *Genetic fusion of human insulin B-chain to the B-subunit of cholera toxin enhances in vitro antigen presentation and induction of bystander suppression in vivo*. Immunology, 2002. 106(2): p. 237-45.
313. Choi, N.W., M.K. Estes, and W.H. Langridge, *Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit-rotavirus VP7 fusion protein in transgenic potato*. Mol Biotechnol, 2005. 31(3): p. 193-202.
314. Ruhlman, T., et al., *Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts--oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice*. Plant Biotechnol J, 2007. 5(4): p. 495-510.
315. Liljeqvist, S., et al., *Fusions to the cholera toxin B subunit: influence on pentamerization and GMI binding*. J Immunol Methods, 1997. 210(2): p. 125-35.
316. Dertzbaugh, M.T. and C.O. Elson, *Reduction in oral immunogenicity of cholera toxin B subunit by N-terminal peptide addition*. Infect Immun, 1993. 61(2): p. 384-90.
317. Dertzbaugh, M.T., D.L. Peterson, and F.L. Macrina, *Cholera toxin B-subunit gene fusion: structural and functional analysis of the chimeric protein*. Infect Immun, 1990. 58(1): p. 70-9.
318. Lebens, M., et al., *A mucosally administered recombinant fusion protein vaccine against schistosomiasis protecting against immunopathology and infection*. Vaccine, 2003. 21(5-6): p. 514-20.
319. Song, H., et al., *High-level expression of codon optimized foot-and-mouth disease virus complex epitopes and cholera toxin B subunit chimera in Hansenula polymorpha*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 315(1): p. 235-9.
320. Backstrom, M., et al., *Insertion of a HIV-1-neutralizing epitope in a surface-exposed internal region of the cholera toxin B-subunit*. Gene, 1994. 149(2): p. 211-7.
321. Martin, M., et al., *Recombinant antigen-enterotoxin A2/B chimeric mucosal immunogens differentially enhance antibody responses and B7-dependent costimulation of CD4(+) T cells*. Infect Immun, 2001. 69(1): p. 252-61.
322. Sultan, F., et al., *Mucosal immunogenicity of a holotoxin-like molecule containing the serine-rich Entamoeba histolytica protein (SREHP) fused to the A2 domain of cholera toxin*. Infect Immun, 1998. 66(2): p. 462-8.
323. Hatic, S.O., 2nd, J.A. McCann, and W.D. Picking, *In vitro assembly of novel cholera toxin-like complexes*. Anal Biochem, 2001. 292(2): p. 171-7.
324. Clevers, H., et al., *The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble*. Annu Rev Immunol, 1988. 6: p. 629-62.
325. Krissansen, G.W., et al., *Primary structure of the T3 gamma subunit of the T3/T cell antigen receptor complex deduced from cDNA sequences: evolution of the T3 gamma and delta subunits*. EMBO J, 1986. 5(8): p. 1799-808.
326. Alcover, A., et al., *Lysine 271 in the transmembrane domain of the T-cell antigen receptor beta chain is necessary for its assembly with the CD3 complex but not for alpha/beta dimerization*. J Biol Chem, 1990. 265(7): p. 4131-5.
327. John, S., et al., *Surface expression of the T cell receptor complex requires charged residues within the alpha chain transmembrane region*. Eur J Immunol, 1989. 19(2): p. 335-9.
328. Cosson, P., et al., *Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs*. Nature, 1991. 351(6325): p. 414-6.
329. Green, N.M., *Biological membranes. The semiotics of charge*. Nature, 1991. 351(6325): p. 349-50.
330. Brandizzi, F., et al., *ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants*. Plant J, 2003. 34(3): p. 269-81.
331. Brandizzi, F., et al., *The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain*. Plant Cell, 2002. 14(5): p. 1077-92.

332. Brandizzi, F., et al., *GFP is the way to glow: bioimaging of the plant endomembrane system*. J Microsc, 2004. 214(Pt 2): p. 138-58.
333. Runions, J., et al., *Photoactivation of GFP reveals protein dynamics within the endoplasmic reticulum membrane*. J Exp Bot, 2006. 57(1): p. 43-50.
334. Wileman, T., et al., *The gamma and epsilon subunits of the CD3 complex inhibit pre-Golgi degradation of newly synthesized T cell antigen receptors*. J Cell Biol, 1990. 110(4): p. 973-86.
335. Wileman, T., C. Pettey, and C. Terhorst, *Recognition for degradation in the endoplasmic reticulum and lysosomes prevents the transport of single TCR beta and CD3 delta subunits of the T-cell antigen receptor to the surface of cells*. Int Immunol, 1990. 2(8): p. 743-54.
336. Bonifacino, J.S., et al., *Pre-Golgi degradation of newly synthesized T-cell antigen receptor chains: intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly*. J Cell Biol, 1989. 109(1): p. 73-83.
337. Lippincott-Schwartz, J., et al., *Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins*. Cell, 1988. 54(2): p. 209-20.
338. Wileman, T., et al., *Associations between subunit ectodomains promote T cell antigen receptor assembly and protect against degradation in the ER*. J Cell Biol, 1993. 122(1): p. 67-78.
339. Kaiserlian, D., *Epithelial cells in antigen. Sampling and presentation in mucosal tissues*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. 236: p. 55-78.
340. Rumbo, M., et al., *How the gut links innate and adaptive immunity*. Ann N Y Acad Sci, 2004. 1029: p. 16-21.
341. Taunk, J., A.I. Roberts, and E.C. Ebert, *Spontaneous cytotoxicity of human intraepithelial lymphocytes against epithelial cell tumors*. Gastroenterology, 1992. 102(1): p. 69-75.
342. Schieferdecker, H.L., et al., *T cell differentiation antigens on lymphocytes in the human intestinal lamina propria*. J Immunol, 1992. 149(8): p. 2816-22.
343. Dubois, B., et al., *Oral tolerance and regulation of mucosal immunity*. Cell Mol Life Sci, 2005. 62(12): p. 1322-32.
344. Kaiserlian, D., N. Cerf-Bensusan, and A. Hosmalin, *The mucosal immune system: from control of inflammation to protection against infections*. J Leukoc Biol, 2005. 78(2): p. 311-8.
345. Stumbles, P.A., et al., *Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity*. J Exp Med, 1998. 188(11): p. 2019-31.
346. Snoeck, V., I.R. Peters, and E. Cox, *The IgA system: a comparison of structure and function in different species*. Vet Res, 2006. 37(3): p. 455-67.
347. Kaetzel, C.S., *Polymeric Ig receptor: defender of the fort or Trojan horse?* Curr Biol, 2001. 11(1): p. R35-8.
348. Robinson, J.K., et al., *A mucosal IgA-mediated excretory immune system in vivo*. J Immunol, 2001. 166(6): p. 3688-92.
349. Kaetzel, C.S., et al., *The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(19): p. 8796-800.
350. Buda, A., C. Sands, and M.A. Jepson, *Use of fluorescence imaging to investigate the structure and function of intestinal M cells*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. 57(1): p. 123-34.
351. Jang, M.H., et al., *Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(16): p. 6110-5.

352. Kraehenbuhl, J.P. and M.R. Neutra, *Epithelial M cells: differentiation and function*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. 16: p. 301-32.
353. Mayer, L., *Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000. 30 Suppl: p. S4-12.
354. Berlin, C., et al., *Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1*. Cell, 1993. 74(1): p. 185-95.
355. Nuzzaci, M., et al., *In vitro stability of Cucumber mosaic virus nanoparticles carrying a Hepatitis C virus-derived epitope under simulated gastrointestinal conditions and in vivo efficacy of an edible vaccine*. J Virol Methods. 165(2): p. 211-5.
356. Neutra, M.R., A. Frey, and J.P. Kraehenbuhl, *Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization*. Cell, 1996. 86(3): p. 345-8.
357. Golovkin, M., et al., *Smallpox subunit vaccine produced in Planta confers protection in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(16): p. 6864-9.
358. Del Giudice, G., A. Podda, and R. Rappuoli, *What are the limits of adjuvanticity?* Vaccine, 2001. 20 Suppl 1: p. S38-41.
359. Griffin, J.F., *A strategic approach to vaccine development: animal models, monitoring vaccine efficacy, formulation and delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. 54(6): p. 851-61.
360. Gupta, R.K., A.C. Chang, and G.R. Siber, *Biodegradable polymer microspheres as vaccine adjuvants and delivery systems*. Dev Biol Stand, 1998. 92: p. 63-78.
361. Lima, K.M. and J.M. Rodrigues Junior, *Poly-DL-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system*. Braz J Med Biol Res, 1999. 32(2): p. 171-80.
362. Zhang, X., et al., *Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein*. Plant Biotechnol J, 2006. 4(4): p. 419-32.
363. Bergquist, C., et al., *Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina*. Infect Immun, 1997. 65(7): p. 2676-84.
364. Isaka, M., et al., *Mucosal immunization against hepatitis B virus by intranasal co-administration of recombinant hepatitis B surface antigen and recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant*. Vaccine, 2001. 19(11-12): p. 1460-6.
365. Wu, H.Y. and M.W. Russell, *Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant*. Vaccine, 1998. 16(2-3): p. 286-92.
366. Hagiwara, Y., et al., *Effects of intranasal administration of cholera toxin (or Escherichia coli heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain*. Vaccine, 2001. 19(13-14): p. 1652-60.
367. Adamsson, J., et al., *Novel immunostimulatory agent based on CpG oligodeoxynucleotide linked to the nontoxic B subunit of cholera toxin*. J Immunol, 2006. 176(8): p. 4902-13.
368. Bergquist, C., et al., *Local and systemic antibody responses to dextran-cholera toxin B subunit conjugates*. Infect Immun, 1995. 63(5): p. 2021-5.
369. Davoodi-Semiromi, A., et al., *Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery*. Plant Biotechnol J. 8(2): p. 223-42.
370. Matoba, N., et al., *Biochemical and immunological characterization of the plant-derived candidate human immunodeficiency virus type 1 mucosal vaccine CTB-MPR*. Plant Biotechnol J, 2009. 7(2): p. 129-45.

371. Kawamura, Y.I., et al., *Cholera toxin activates dendritic cells through dependence on GM1-ganglioside which is mediated by NF-kappaB translocation*. Eur J Immunol, 2003. 33(11): p. 3205-12.
372. Kim, P.H., et al., *Cholera toxin and cholera toxin B subunit induce IgA switching through the action of TGF-beta 1*. J Immunol, 1998. 160(3): p. 1198-203.
373. Schnitzler, A.C., J.M. Burke, and L.M. Wetzler, *Induction of cell signaling events by the cholera toxin B subunit in antigen-presenting cells*. Infect Immun, 2007. 75(6): p. 3150-9.
374. de Geus, B., et al., *A comparison of natural and recombinant cholera toxin B subunit as stimulatory factors in intranasal immunization*. Vaccine, 1997. 15(10): p. 1110-3.
375. Spiegel, S., *Cautionary note on the use of the B subunit of cholera toxin as a ganglioside GM1 probe: detection of cholera toxin A subunit in B subunit preparations by a sensitive adenylate cyclase assay*. J Cell Biochem, 1990. 42(3): p. 143-52.
376. Arakawa, T., D.K. Chong, and W.H. Langridge, *Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine*. Nat Biotechnol, 1998. 16(3): p. 292-7.
377. Arakawa, T., J. Yu, and W.H. Langridge, *Food plant-delivered cholera toxin B subunit for vaccination and immunotolerization*. Adv Exp Med Biol, 1999. 464: p. 161-78.
378. Kozlowski, P.A., et al., *Mucosal vaccination strategies for women*. J Infect Dis, 1999. 179 Suppl 3: p. S493-8.
379. Soria-Guerra, R.E., et al., *Transgenic tomatoes express an antigenic polypeptide containing epitopes of the diphtheria, pertussis and tetanus exotoxins, encoded by a synthetic gene*. Plant Cell Rep, 2007. 26(7): p. 961-8.
380. Sanchez, J., et al., *Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination*. Res Microbiol, 1990. 141(7-8): p. 971-9.
381. Sanchez, J., A.M. Svennerholm, and J. Holmgren, *Genetic fusion of a non-toxic heat-stable enterotoxin-related decapeptide antigen to cholera toxin B-subunit*. FEBS Lett, 1988. 241(1-2): p. 110-4.
382. Karasev, A.V., et al., *Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach*. Vaccine, 2005. 23(15): p. 1875-80.
383. Modelska, A., et al., *Immunization against rabies with plant-derived antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(5): p. 2481-5.
384. McClellan, A.J., et al., *Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations*. Nat Cell Biol, 2005. 7(8): p. 736-41.
385. Kato, N., et al., *Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection*. J Virol, 1994. 68(8): p. 4776-84.
386. Kojima, M., et al., *Influence of antibodies to the hypervariable region of E2/NS1 glycoprotein on the selective replication of hepatitis C virus in chimpanzees*. Virology, 1994. 204(2): p. 665-72.
387. Zibert, A., et al., *Epitope mapping of antibodies directed against hypervariable region 1 in acute self-limiting and chronic infections due to hepatitis C virus*. J Virol, 1997. 71(5): p. 4123-7.
388. Bailey, M., et al., *The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function*. Proc Nutr Soc, 2005. 64(4): p. 451-7.
389. Strobel, S. and A.M. Mowat, *Immune responses to dietary antigens: oral tolerance*. Immunol Today, 1998. 19(4): p. 173-81.
390. Mayer, L. and L. Shao, *Therapeutic potential of oral tolerance*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(6): p. 407-19.
391. Weiner, H.L., et al., *Oral tolerance: cytokine milieu in the gut and modulation of tolerance by cytokines*. Res Immunol, 1997. 148(8-9): p. 528-33.
392. Faria, A.M. and H.L. Weiner, *Oral tolerance*. Immunol Rev, 2005. 206: p. 232-59.

393. Kim, H.J., et al., *NKT cells play critical roles in the induction of oral tolerance by inducing regulatory T cells producing IL-10 and transforming growth factor beta, and by clonally deleting antigen-specific T cells*. Immunology, 2006. 118(1): p. 101-11.
394. Friedman, A. and H.L. Weiner, *Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(14): p. 6688-92.
395. Weiner, H.L., *Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells*. Microbes Infect, 2001. 3(11): p. 947-54.
396. Kagnoff, M.F., *Oral tolerance*. Ann N Y Acad Sci, 1982. 392: p. 248-65.
397. Rizzo, L.V., et al., *IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance*. J Immunol, 1999. 162(5): p. 2613-22.
398. Mowat, A.M., et al., *The role of dendritic cells in regulating mucosal immunity and tolerance*. Novartis Found Symp, 2003. 252: p. 291-302; discussion 302-5.
399. Hershberg, R.M. and L.F. Mayer, *Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity*. Immunol Today, 2000. 21(3): p. 123-8.
400. Holmgren, J., A.M. Harandi, and C. Czerkinsky, *Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA*. Expert Rev Vaccines, 2003. 2(2): p. 205-17.
401. Sun, J.B., J. Holmgren, and C. Czerkinsky, *Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(23): p. 10795-9.
402. Langridge, W., B. Denes, and I. Fodor, *Cholera toxin B subunit modulation of mucosal vaccines for infectious and autoimmune diseases*. Curr Opin Investig Drugs. 11(8): p. 919-28.
403. Thanavala, Y., et al., *Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(8): p. 3358-61.
404. Varsani, A., et al., *Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic Nicotiana tabacum cv. Xanthi*. Arch Viro, 2003. 148(9): p. 1771-86.
405. Vieira da Silva, J., et al., *Phytosecretion of enteropathogenic Escherichia coli pilin subunit A in transgenic tobacco and its suitability for early life vaccinology*. Vaccine, 2002. 20(16): p. 2091-101.
406. Webster, D.E., et al., *Appetising solutions: an edible vaccine for measles*. Med J Aust, 2002. 176(9): p. 434-7.
407. Judge, N.A., H.S. Mason, and A.D. O'Brien, *Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of Escherichia coli O157:H7 shedding in feces*. Infect Immun, 2004. 72(1): p. 168-75.
408. Aicher, A., et al., *Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions*. Circulation, 2003. 107(4): p. 604-11.
409. Geng, Y., et al., *Effects of nicotine on the immune response. I. Chronic exposure to nicotine impairs antigen receptor-mediated signal transduction in lymphocytes*. Toxicol Appl Pharmacol, 1995. 135(2): p. 268-78.
410. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. N Engl J Med, 2000. 343(5): p. 338-44.
411. Yuan, Q. and W.A. Walker, *Innate immunity of the gut: mucosal defense in health and disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2004. 38(5): p. 463-73.
412. Philpott, D.J. and S.E. Girardin, *The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection*. Mol Immunol, 2004. 41(11): p. 1099-108.
413. Majewska, M. and M. Szczepanik, *[The role of Toll-like receptors (TLR) in innate and adaptive immune responses and their function in immune response regulation]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2006. 60: p. 52-63.

414. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2003. 21: p. 335-76.
415. Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler, *The interface between innate and adaptive immunity*. *Nat Immunol*, 2004. 5(10): p. 971-4.
416. Shimada, S., et al., *Generation of polymeric immunoglobulin receptor-deficient mouse with marked reduction of secretory IgA*. *J Immunol*, 1999. 163(10): p. 5367-73.
417. Ohashi, P.S., et al., *Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice*. *Cell*, 1991. 65(2): p. 305-17.
418. Vetvik, H., et al., *Mucosal antibodies can be measured in air-dried samples of saliva and feces*. *J Immunol Methods*, 1998. 215(1-2): p. 163-72.
419. Velin, A.K., et al., *Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats*. *Gut*, 2004. 53(4): p. 494-500.
420. Guy, B., *Evaluation of events occurring at mucosal surfaces: techniques used to collect and analyze mucosal secretions and cells*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002. 9(4): p. 753-62.
421. Raux, M., et al., *Development and standardization of methods to evaluate the antibody response to an HIV-1 candidate vaccine in secretions and sera of seronegative vaccine recipients*. *J Immunol Methods*, 1999. 222(1-2): p. 111-24.
422. Wang, X.G., et al., *Purified cholera toxin B subunit from transgenic tobacco plants possesses authentic antigenicity*. *Biotechnol Bioeng*, 2001. 72(4): p. 490-4.
423. Kang, T.J., et al., *Modification of the cholera toxin B subunit coding sequence to enhance expression in plants*. *Molecular Breeding*, 2004. 13(13): p. 143-153.
424. Kang, T.J., et al., *Expression of a synthetic cholera toxin B subunit in tobacco using ubiquitin promoter and bar gene as a selectable marker*. *Mol Biotechnol*, 2006. 32(2): p. 93-100.
425. Molina, A., J. Veramendi, and S. Hervas-Stubbs, *Induction of neutralizing antibodies by a tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from canine parvovirus*. *Virology*, 2005. 342(2): p. 266-75.
426. Borges, O., et al., *Mucosal vaccines: recent progress in understanding the natural barriers*. *Pharm Res*. 27(2): p. 211-23.
427. Foster, N. and B.H. Hirst, *Exploiting receptor biology for oral vaccination with biodegradable particulates*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005. 57(3): p. 431-50.
428. Tyrer, P., et al., *Microbial pattern recognition receptors mediate M-cell uptake of a gram-negative bacterium*. *Infect Immun*, 2006. 74(1): p. 625-31.
429. Bies, C., C.M. Lehr, and J.F. Woodley, *Lectin-mediated drug targeting: history and applications*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004. 56(4): p. 425-35.
430. Jepson, M.A., et al., *Targeting to intestinal M cells*. *J Anat*, 1996. 189 (Pt 3): p. 507-16.
431. Lavelle, E.C., et al., *Immunological implications of the use of plant lectins for drug and vaccine targeting to the gastrointestinal tract*. *J Drug Target*, 2004. 12(2): p. 89-95.
432. Roth-Walter, F., et al., *Targeting antigens to murine and human M-cells with Aleuria aurantia lectin-functionalized microparticles*. *Immunol Lett*, 2005. 100(2): p. 182-8.
433. Mantis, N.J., et al., *Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor*. *J Immunol*, 2002. 169(4): p. 1844-51.
434. Rey, J., et al., *Targeting of secretory IgA to Peyer's patch dendritic and T cells after transport by intestinal M cells*. *J Immunol*, 2004. 172(5): p. 3026-33.
435. Weltzin, R., et al., *Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins*. *J Cell Biol*, 1989. 108(5): p. 1673-85.
436. Kapusta, J., et al., *Oral immunization of human with transgenic lettuce expressing hepatitis B surface antigen*. *Adv Exp Med Biol*, 2001. 495: p. 299-303.

437. Kumar, G.B., et al., *Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants*. *Planta*, 2005. 222(3): p. 484-93.
438. Lou, X.M., et al., *Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants*. *Clin Vaccine Immunol*, 2007. 14(4): p. 464-9.
439. Twyman, R.M., S. Schillberg, and R. Fischer, *Transgenic plants in the biopharmaceutical market*. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2005. 10(1): p. 185-218.
440. Tiwari, S., et al., *Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens*. *Biotechnol Adv*, 2009. 27(4): p. 449-67.
441. Wang, M.L., et al., *Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory*. *Transgenic Res*, 2005. 14(2): p. 167-78.
442. Hood, E.E., et al., *Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize*. *Adv Exp Med Biol*, 1999. 464: p. 127-47.
443. Stoger, E., et al., *Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies*. *Plant Mol Biol*, 2000. 42(4): p. 583-90.
444. Chikwamba, R., et al., *A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against Escherichia coli heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT)*. *Transgenic Res*, 2002. 11(5): p. 479-93.
445. Lamphear, B.J., et al., *A corn-based delivery system for animal vaccines: an oral transmissible gastroenteritis virus vaccine boosts lactogenic immunity in swine*. *Vaccine*, 2004. 22(19): p. 2420-4.
446. Lamphear, B.J., et al., *Delivery of subunit vaccines in maize seed*. *J Control Release*, 2002. 85(1-3): p. 169-80.
447. Moravec, T., et al., *Production of Escherichia coli heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine*. *Vaccine*, 2007. 25(9): p. 1647-57.
448. Qian, B., et al., *Immunogenicity of recombinant hepatitis B virus surface antigen fused with preS1 epitopes expressed in rice seeds*. *Transgenic Res*, 2008. 17(4): p. 621-31.
449. Wu, J., et al., *Oral immunization with transgenic rice seeds expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus induces protective immune responses in chickens*. *Plant Biotechnol J*, 2007. 5(5): p. 570-8.
450. Rajput, Z.I., et al., *Enhancement of immune responses to infectious bursal disease vaccine by supplement of an extract made from Momordica cochinchinensis (Lour.) Spreng. seeds*. *Poult Sci*. 89(6): p. 1129-35.
451. Rossi, L., et al., *Antigenic recombinant proteins expressed in tobacco seeds as a model for edible vaccines against swine oedema*. *Vet Res Commun*, 2003. 27 Suppl 1: p. 659-61.
452. Tackaberry, E.S., et al., *Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco*. *Vaccine*, 1999. 17(23-24): p. 3020-9.
453. Fischer, R., et al., *Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999. 30 (Pt 2): p. 109-12.
454. Smith, M.L., H.S. Mason, and M.L. Shuler, *Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in plant cell culture: Kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form*. *Biotechnol Bioeng*, 2002. 80(7): p. 812-22.
455. Sunil Kumar, G.B., et al., *Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures*. *Protein Expr Purif*, 2003. 32(1): p. 10-7

VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Amp / Amp ^R	Ampicillin / Ampicillin-Resistenz
BCG	Bacillus-Calmette-Guérin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMV	„Cauliflower mosaic virus“, Blumenkohlmosaikvirus
Carb/Carb ^R	Carbenicillin / Carbenicillin-Resistenz
CHS	Chalkon Synthase
CT	Cholera Toxin
CTB	B-Untereinheit des Cholera Toxins
cv.	Kultivar
d.h.	das heißt
DC	dendritische Zelle
ddH ₂ O	„double distilled water“, bidestilliertes Wasser
dH ₂ O	„distilled water“, destilliertes Wasser
dNTP	desoxy Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
EtxB	<i>E. coli</i> hitzelabiles Enterotoxin
Fab	„fragment antigen binding“
FAE	Follikel-assoziiertes Epithelium
Fc	„fragment constant“
FuE	Forschung und Entwicklung
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetyl-Galactosamin
GALT	„gut associated lymphatic tissue“
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
GIT	Gastrointestinaltrakt
Glc	Glucose
GMP	„Good Manufacturing Practice“
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H+L	„heavy chain“ und „light chain“-spezifisch
HCV	Hepatitis C Virus
HVR1	hypervariable Region 1
IgA/G/M	Immunglobuline der Klasse A/G/M
IL-10	Interleukin 10
kDa	Kilodalton
Km / Km ^R	Kanamycin / Kanamycin-Resistenz
kV	Kilovolt
LD50	„Lethal dosis 50“, mittlere Letaldosis
LPH	Signalpeptid der schweren Kette des monoklonalen Antikörpers mAb24
M	Molar
<i>m</i>	Steigung
mA	Milliampere

Abkürzungsverzeichnis

mAk	monoklonaler Antikörper
MALP-2	Makrophagen aktivierendes Lipoprotein-2
MALT	„Mucosa-Associated Lymphoid Tissue“
max.	maximal
MCS	„multiple cloning site“
μF	Mikrofarad
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
mS	Mikrosiemens
NALT	„Nasal-Associated Lymphoid Tissue“
NBT	Nitroblautetrazolium
NeuAc	N-Acetyl-Neuraminsäure, Sialinsäure
nm	Nanometer
nmol	Nanomolar
Ω	Ohm
OD	Optische Dichte
p.i.	„post immunization“
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pIgR	poly-Ig-Rezeptor
pIgR _{mut}	pIgR mit mutiertem Endozytosesignal
Pmol	Picomol
PMP	„Plant Made Pharmaceuticals“
PP	Peyer`sche Plaques
PPM	„Prestained Protein Marker“
Rif / Rif ^R	Rifampicin / Rifampicin-Resistenz
RSA	Rinderserumalbumin
RU	„response Units“, Resonanz-Einheiten
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde(n)
SEM	„Standard Error of Means“, Standardfehler vom Mittelwert
sIgA	sekretorisches Immunglobulin A
SOE	„spliced by overlap extension“
SPF	„Specified Pathogen Free“
SRP	„Surface Plasmon Resonance“, Oberflächenplasmonresonanz
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBC	Tuberkulose
TCR	T-Zell-Rezeptor
TCR β	beta-Kette des T-Zell-Rezeptor`s
Temp.	Temperatur
TGF- β	„transforming growth factor beta“
Th2	T-Helferzellen vom Typ 2
TLR	„toll-like receptors“
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute

Abkürzungsverzeichnis

USDA	„U.S. Department of Agriculture“
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
v/v	„volume per volume“, Volumenprozent vom Gesamtvolumen
VLP	„virus-like particle“
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	„weight per volume“, Massenprozent vom Gesamtvolumen
WT	Wildtyp
z.B	zum Beispiel

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung I.1: Schematische Übersicht über den experimentellen Ablauf der durchgeführten Arbeiten.	21
Abbildung II.1: Strukturformel BPPCysPEG (modifiziertes MALP-2).....	27
Abbildung II.2: Strukturformel PQS-PEG (modifiziertes PQS-Hydroxyquinolone).....	27
Abbildung III.1: Schematische Darstellung der Klonierung von pCTB-HVR1-TCR, pCTB-HVR1-TCRhinge, pCTB-HVR1-TCRCys, und pCTB-MPT64-TCRCys.	58
Abbildung III.2: Schematische Darstellung der Klonierung von pCTB-HVR1 und pCTB-MPT64.....	59
Abbildung III.3: Quantitativer und funktioneller Nachweis transient exprimierter CTB-Fusionsproteine im GM1-ELISA.	62
Abbildung III.4: Western Blot Analyse zum qualitativen Nachweis der Akkumulation von CTB-HVR1-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys in transgenen Tabakpflanzen.	67
Abbildung III.5: SPR-Sensogramm der Assoziation von CTB-HVR1-TCRCys an die GM1-beschichtete Sensoroberfläche.....	69
Abbildung III.6: Immunofluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation der TCRCys-basierten membranständigen Antigene.	71
Abbildung III.7: Schematische Darstellung der Klonierung von pCTB-HVR1-TCRCys-GFP und pCTB-MPT64-TCRCys-GFP.	74
Abbildung III.8: Schematische Darstellung der Klonierung von pGFP-TCRCys.	75
Abbildung III.9: Schematische Darstellung der Klonierung von pGFPapo.....	75
Abbildung III.10: Western Blot Analyse zum qualitativen Nachweis der Akkumulation von GFPapo, GFP-TCRCys, CTB-HVR1-TCRCys-GFP und CTB-MPT64-TCRCys-GFP in transgenen BY-2 Suspensionszellen und T ₀ -Generationen transgener Tabakpflanzen.	79
Abbildung III.11: Western Blot Analyse zum Nachweis der Akkumulation von GFPapo, GFP-TCRCys, CTB-HVR1-TCRCys-GFP und CTB-MPT64-TCRCys-GFP in Zellextrakten und Kulturüberständen transgener BY-2 Suspensionszellen.....	81
Abbildung III.12: Western Blot Analyse nach Isolierung von Membranen GFPapo, GFP-TCRCys und CTB-MPT64-TCRCys-GFP exprimierender BY-2 Zellen.	84
Abbildung III.13: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von GFPapo, GFP-TCRCys, CTB-HVR1-TCRCys-GFP und CTB-MPT64-TCRCys-GFP.....	88
Abbildung III.14: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der GFP-Akkumulation im Bereich der Interzellularräume benachbarter Blattepidermiszellen.....	89
Abbildung III.15: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären GFP-Akkumulation im Cytoplasmasaum.	89
Abbildung III.16: Quantitative HPLC-MS-MS Analyse der Nikotinakkumulation in Tabakblattmaterial und Tabaksuspensionszellen (II.8.2).....	92
Abbildung III.17: GM1 ELISA zur Analyse des quantitativen Verlustes von funktionalem CTB-HVR1-TCRCys in Tabakfutterpellets nach Lagerung bei -20°C und RT.....	94

Abbildung III.18: GM1-ELISA zur Bestimmung der Antigendosis in Futterpellets der Präparationsvarianten 1 und 2.....	97
Abbildung III.19: Immunisierungsverlauf und Probenentnahme.....	99
Abbildung III.20: Evaluierung von drei verschiedenen ELISA Setups zur Quantifizierung des Gesamt IgA.....	104
Abbildung III.21: Western Blot Analyse zum qualitativen Nachweis der schweren und leichten Kette in Stuhlproben nach Isolierung von Gesamt IgA.....	105
Abbildung III.22: ELISA zur Analyse des quantitativen Einflusses der Vakzinformulierungen auf die Gesamt IgA-Konzentration.....	107
Abbildung III.23: Verlauf mukosaler CTB-spezifischer Antikörperantworten.....	109
Abbildung III.24: Verlauf mukosaler HVR1-spezifischer Antikörperantworten.....	110
Abbildung III.25: GM1-ELISA zur Bestimmung der mukosalen IgA-Antikörperantworten gegen pflanzenexprimiertes CTB-HVR1-TCRCys.....	112

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle II.1: Antikörper zum qualitativen bzw. quantitativen Proteinnachweis im Immunoblot (II.3.5), Dot Blot (II.3.5) bzw. im ELISA (II.3.6).	22
Tabelle II.2 : Antikörper für den immunologischen Nachweis antigenspezifischer IgA-Antikörper im Stuhl sowie IgG-Antikörper im Serum (II.7.5.2 und II.7.5.3) und die Quantifizierung von Gesamt-IgA im ELISA (II.7.5.1).....	23
Tabelle II.3: Enzymkonjugierte Sekundärantikörper.	23
Tabelle II.4: Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörper.	24
Tabelle II.5 : Klonierungsoligonukleotide.	24
Tabelle II.6 : Sequenzieroligonukleotide.....	25
Tabelle II.7: Durchführung des GM1-ELISA.	36
Tabelle II.8: Durchführung des ELISA zur Bestimmung des Gesamt-IgA.	49
Tabelle II.9: Durchführung des ELISA zur Bestimmung mukosaler und humoraler Immunantworten gegen CTB bzw. HVR1 in Stuhlextrakten und im Serum.	50
Tabelle II.10: Durchführung des ELISA zur Bestimmung mukosaler und humoraler Immunantworten gegen pflanzenexprimiertes CTB-HVR1-TCRCys in Stuhlextrakten und im Serum.	51
Tabelle III.1: Übersicht über die Größen und Molekularmassen der reifen CTB-Fusionsproteine und der individuellen Fusionspartner.	60
Tabelle III.2: Akkumulation der löslichen und membranständigen Antigene in transgenen Tabakpflanzen....	65
Tabelle III.3: Übersicht über die Größen und Molekularmassen der reifen GFP-Fusionsproteine und der individuellen Fusionspartner.	76
Tabelle III.4: Immunisierungsgruppen.	99

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben zahlreiche Personen direkt und indirekt beigetragen, denen ich auf diesem Weg danken möchte.

Prof. Dr. Rainer Fischer danke ich für die Überlassung des interessanten und anspruchsvollen Themas, für seine Unterstützung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Bei Dr. Stefan Schillberg bedanke ich mich für die Betreuung sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft und wertvollen Ratschläge, mit denen er diese Arbeit begleitet hat.

Prof. Dr. Dirk Prüfer danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Der Abteilung Vakzinologie des Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig, insbesondere Dr. Thomas Ebensen, danke ich für das Bereitstellen der mukosalen Adjuvantien.

Ich bedanke mich bei Dipl. Ing. Heinrich Jüring von der Abteilung Umwelt- und Lebensmittelanalytik des Fraunhofer IME in Schmallenberg für die Durchführung der HPLC-MS-MS Analysen.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Biologie VII für das angenehme Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere danke ich Holger Spiegel, Markus Sack, Nadia Ruthardt, Andreas Schiermeyer und Helga Schinkel, deren Erfahrung, Fachwissen und konstruktive Kritik mich durch die gesamte Zeit begleitet haben. Vielen Dank auch an Holger und Markus für die Unterstützung bei der Durchführung der SPR Messungen. Ein großes Dankeschön geht an Flora Schuster für ihren unermüdlichen Einsatz in der pflanzlichen Zellkultur.

Vielen Dank an alle Ex-„Box“-Mitbewohner der Bio VII, insbesondere Holger und Nadia für die unvergessliche Zeit im Institut und im „Infernoland“.

Mein besonderer Dank gilt Holger, nicht nur für die fachliche, tatkräftige und moralische Unterstützung, insbesondere bei den Immunisierungen und Probenentnahmen, sondern auch für die Entdeckung und Förderung meines Sportlerherzes.

Danke auch an meine „neuen“ Kollegen der PPD-Gruppe und der Pharmedartis, die nie an der Fertigstellung dieser Arbeit gezweifelt haben. Bei Christiane Püttmann möchte ich mich für die Unterstützung bei den finalen Word-Formatierungen bedanken.

Vielen Dank sage ich auch meiner Familie und Freunden, insbesondere Michael, für ihre Geduld und ihren Zuspruch. Holger, Markus und Anja Terodde sowie Julia Schmidt danke ich für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit und ihr besonderes Auge für Kommasetzung.