

Rasche Entwicklung neuer Diagnostikwerkzeuge für die Landwirtschaft

Christophe Debonneville, Jean-Sébastien Reynard, Olivier Schumpp und Santiago Schaerer
Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 1260 Nyon, Schweiz

Auskünfte: Christophe Debonneville, E-Mail: christophe.debonneville@agroscope.admin.ch, Tel. +41 22 363 43 71



Isolierung von Antikörpern, welche mit Phagen-Display ausgewählt wurden.

Angesichts des stetigen Auftretens neuer Krankheiten sowie neuer Stämme von Viren, Bakterien oder Pilzen müssen rasch und kostengünstig neue Diagnostikmethoden entwickelt werden. Die «Phagen-Display» genannte Methode ermöglicht die schnelle und verlässliche Isolierung neuer Antikörper. Dies erlaubt es, ein breites Spektrum von Zielorganismen bei Pflanzenkrankheiten, im Veterinärwesen oder im Lebensmittelbereich zu analysieren. Ein nachfolgend dargestelltes Beispiel eines Zielorganismus ist das Virus, welches die viröse Kleinfrüchtigkeit der Kirsche hervorruft.

Der hohe Stand der Landwirtschaft in der Schweiz beruht zu einem grossen Teil auf der Wissenschaft und der technischen Innovation. Im Gebiet des Pflanzenschutzes trägt die wissenschaftliche Entwicklung in

massgebender Weise dazu bei, dass schnelle und präzise Diagnostikmethoden für Infektionskrankheiten verfügbar werden, welche die Wahl der wirksamsten Bekämpfungsstrategien ermöglichen.

Die Entdeckung der Methode zum immunologischen Nachweis mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*; Abb. 1) und deren Anwendung für die Diagnose von kultivierten Pflanzen (Clark und Adams 1977) waren wegweisende Etappen. Seit mehr als dreissig Jahren wird die Qualität bei der Zertifizierung diverser wichtiger Kulturpflanzen (Gugerli 1978), die in der Schweiz erzeugt und verkauft werden, durch die Anwendung dieser Methode gewährleistet.

Die Intensivierung des globalen Austausches von Pflanzenmaterial, die Zunahme der Gesetzgebung und der Kontrollen sowie das Auftreten neuer Krankheiten

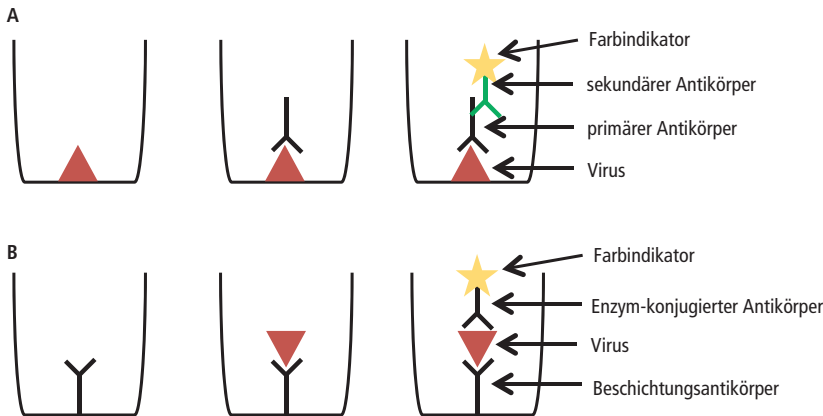


Abb. 1 | Schematische Darstellung der Methode ELISA.
A: ELISA «indirekt»: das Virus wird auf einer stabilen Oberfläche festgehalten, danach wird ein primärer Antikörper verwendet, um das Virus zu detektieren. Ein angehängter, sekundärer Antikörper erlaubt das Erkennen der Proben (Änderung der Farbe bei den positiven Proben).
B: ELISA «Sandwich Doppelantikörper» (DAS): Der Beschichtungsantikörper wird auf einer soliden Unterlage festgehalten, danach wird die Probe angesetzt. Ein damit verbundener Enzym-konjugierter Antikörper erlaubt es, die Proben zu identifizieren (Änderung der Farbe bei den positiven Proben).

hat zu einer rasanten Zunahme der Bedürfnisse nach neuen Diagnostikwerkzeugen geführt. Die immunologische Diagnostik vom Typ ELISA und die Immunochromatographie sind die am meisten verwendeten Methoden. Im Vergleich zu den Methoden der molekularen Diagnostik, welche auf der genetischen Einmaligkeit der pathogenen Stämme beruht, ist die immunologische Analyse billiger und kann von Nicht-Spezialisten wie Einzelpersonen oder Produzenten verwendet werden (De Boer und Lopez 2012). Aus denselben Gründen kommt

der immunologischen Analyse für die Bearbeitung der grossen Zahl von Proben, welche bei der Zertifizierung von Pflanzenmaterial anfällt, beträchtliche Bedeutung zu. Die immunologische Diagnostik in der Landwirtschaft beruht auf der Erzeugung spezifischer Antikörper, deren Einsatz dem Nachweis von Krankheitserregern dient. Bei Agroscope entwickelt die Gruppe Virologie und Phytoplasmologie ständig neue Antikörper für den Nachweis auftretender oder neuer Krankheiten, welche die Kulturen in der Schweiz befallen. >

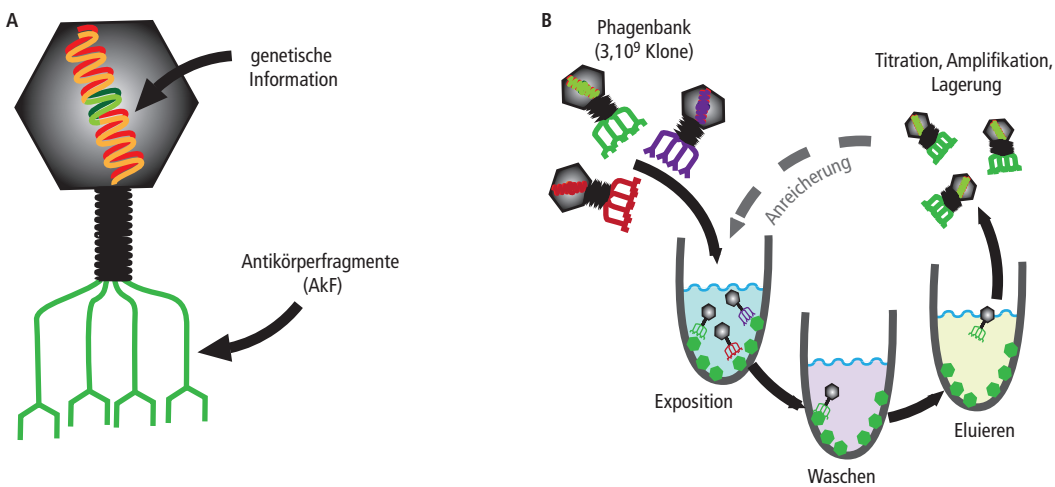


Abb. 2 | **A:** Partikel filamentöser Phagen, welche modifizierte DNA enthalten. Dies erlaubt die Expression des Antikörperfragmentes in Relation zu seiner Oberfläche (Genotyp gebunden an den Phänotyp)
B: Zyklus der Selektion – Amplifikation des «Phagen-Display». Das gesuchte Ziel wird auf einer soliden Oberfläche festgehalten und danach gegenüber der Phagenbank exponiert. Nach der Waschung werden die Phagen, die sich ans Ziel angelagert haben, eluiert, titriert und verstärkt. Nach zwei bis vier Selektionszyklen werden die Antikörperfragmente in Bezug auf die zu untersuchenden Eigenschaften analysiert.



Abb. 3 | Gesunde Kirschen (links) und von viröser Kleinfrüchtigkeit befallene Kirschen (rechts). (Foto: ACW).

Die sogenannte «Phagen-Display»-Technik, die nachstehend vorgestellt wird, kommt üblicherweise in der therapeutischen und diagnostischen Medizin zum Einsatz. Indem diese Technik an die Bedürfnisse der Landwirtschaft angepasst wird, gelingt es rasch und preiswert neue, hoch spezifische, monoklonale Antikörper zu erzeugen.

Die Technik des «Phagen-Display»

Die Entwicklung eines neuen monoklonalen Antikörpers ist ein komplexer Prozess.

Bisher wurden mehrere Methoden erfolgreich eingesetzt, insbesondere die Erzeugung von Hybridomzellen und die «Phagen-Display»-Technik. Mit der letztgenannten Technik werden exogene Peptide (in unserem Falle ein Antikörperfragment oder AkF) an die Oberfläche eines faserförmigen Bakteriophagen angebracht, wodurch verschiedene Zielorganismen angepeilt werden können (Abb. 2a). Dies erlaubt *in vitro* die natürliche Selektion von Immunglobulinen. Ausgangspunkt ist üblicherweise eine grosse, stark diversifizierte Bandbreite von Phagenpartikeln (genannt Bank, welche 10^6 bis 10^{10} verschiedene Kandidaten enthält). Dieses breitgefächerte Angebot wird dem zu untersuchenden Zielorganismus entgegen gestellt, damit jene Kandidaten identifiziert und isoliert werden können, die sich daran ankoppeln (Abb. 2b). Die Phagen, welche die AkF erzeugen, werden in dieser Weise isoliert und anschliessend

vermehrt sowie erneut gegen denselben Zielorganismus selektioniert. Nach zwei bis vier Selektions- und Vermehrungszyklen werden die Kandidaten auf die gesuchte Aktivität hin geprüft, wobei hauptsächlich die ELISA-Methode angewendet wird. Diese Strategie, welche auf der Selektion beruht, ist deutlich schlagkräftiger als eine Strategie, welche auf der klassischen Selektion (unter Verwendung von Zellkulturen) beruht, welche mehr zeitlichen und materiellen Aufwand erfordert. Es können 10^6 bis 10^{10} verschiedene Kandidaten dem Selektionsprozess unterworfen werden, eine Zahl, die unmöglich mit der Zellkultivierung gemäss der traditionellen Methode erreichbar wäre. Die Verbindung von Phänotyp (Antikörperfragmente an der Phagenoberfläche exprimiert) und Genotyp (DNA durch den Phagen kodiert) erlaubt einen raschen Zugriff auf die selektionierten Molekülsequenzen. Dank dieser effizienten Methode kann ein spezifischer Phage in der Originalbank selektioniert werden. Der Zugang zur genetischen Information ermöglicht auch einen nachfolgenden Optimierungsschritt in dem beispielsweise ein DNA-Abschnitt an bestimmten Stellen durch gezielte Mutagenese manipuliert wird. Damit wird die Affinität der ausgewählten Antikörperfragmente verbessert. Beispiele von monoklonalen Antikörpern, die dank dieser Technik entwickelt wurden, gibt es in der Medizin (Geyer *et al.* 2012; Hairul Bahara *et al.* 2013) sowie in der Pflanzenvirologie (Ziegler *et al.* 1995).

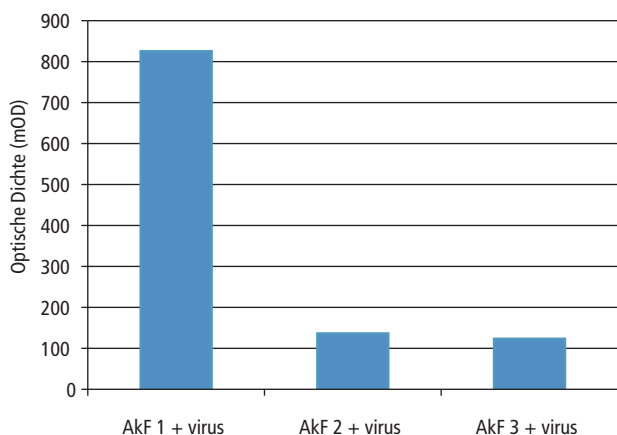


Abb. 4 | Resultate eines ELISA-Tests mit mehreren Antikörperfragmenten (AkF), welche mit «Phagen-Display» isoliert wurden. AkF 1 erkennt spezifisch das Virus, welches die viröse Kleinfrüchtigkeit der Kirsche hervorruft. AkF 2 und AkF 3 erkennen das Virus jedoch nicht. AkF 1 könnte als Basis für die Entwicklung eines Diagnostiktestes dienen, welcher erlauben würde die viröse Kleinfrüchtigkeit der Kirsche nachzuweisen.

Die viröse Kleinfrüchtigkeit der Kirsche

Die viröse Kleinfrüchtigkeit der Kirsche ist eine komplexe und noch wenig bekannte Krankheit, die mit mehreren faserartigen Viren der Familie der *Closteroviridae* (Hadidi *et al.* 2011) in Verbindung gebracht wird. Diese Viruskrankheit verringert bei befallenen Bäumen die Qualität der zu erntenden Früchte in erheblichem Masse. Anfällige Sorten erzeugen kleine, farblose, fade Kirschen, welche unverkäuflich sind (Abb. 3). Ein vorzeitiges, herbstliches Verfärben des Blattwerkes und eine Verringerung der Wuchskraft der Bäume sind weitere Symptome der Krankheit. Die Krankheit wird beim Pfropfen sowie durch natürliche Vektoren wie Schildläuse übertragen. Die Krankheit ist allein anhand der Symptome schwierig zu diagnostizieren. Die Indizierung, die erlaubt Krankheiten virösen Ursprungs nachzuweisen, stellt das klassische diagnostische Hilfsmittel dar, was jedoch jahrelange Studien erfordert. Es ist daher unabdingbar, über zuverlässige und schnelle diagnostische Werkzeuge zu verfügen, damit wirksam gegen diese Krankheit vorgegangen werden kann. Mit Hilfe der Phagen-Display-Technik werden gegenwärtig Antikörper erzeugt, damit ein schneller und spezifischer Nachweistest für diese Krankheit entwickelt werden kann. Es sind bereits mehrere Antikörperfragmente selektioniert worden, welche das Eiweiss der Virusumhüllung erkennen können (Abb. 4). Die Entwicklung eines ELISA-Tests mit diesem neuen Antikörper wird die Diagnose dieser Krankheit beschleunigen und die Kenntnisse zur virösen Kleinfrüchtigkeit der Kirsche in der Schweiz verbessern.

Schlussfolgerungen

Die Technik des «Phagen-Display» ist nicht nur schnell und billig, sie eröffnet auch ein weites Spektrum von Anwendungen bei der Entwicklung diagnostischer Werkzeuge für die Landwirtschaft. Es ist nicht mehr nötig, dass man Krankheitserreger anreichern und reinigen kann, da es jetzt möglich ist, ein Protein des *in vitro* erzeugten Zielorganismus zu verwenden. Die Technik kann somit nicht nur in der Virologie eingesetzt werden, sondern auch in der Bakteriologie und der Phytoplasmologie (zum Beispiel bei der phytoplasma-bedingten Vergilbungskrankheit der Rebe). Es sei daran erinnert, dass Phytoplasmen Organismen sind, die nicht *ex vivo* (ausserhalb des Lebendigen) kultiviert werden können. Die «Phagen-Display»-Technik ermöglicht auch die Isolierung eines Antikörpers, der gegen ein Toxin oder eine ganz andere Zielsubstanz mit potenzieller Anwesenheit in Lebensmitteln gerichtet ist. Es ist theoretisch möglich, einen Antikörper gegen irgend eine Zielsubstanz oder einen Zielorganismus zu erhalten, was diese Technik zu einem bemerkenswert schlagkräftigen Werkzeug macht. ■

Literatur

- Clark M. F. & Adams A. N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475–483.
- De Boer S. H. & Lopez M. M., 2012. New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 197–218.
- Engvall E. & Perlmann P., 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871–874.
- Geyer C. R., McCafferty J., Dubel S., Bradbury A. R. & Sidhu S. S., 2012. Recombinant antibodies and in vitro selection technologies. *Methods Mol Biol* **901**, 11–32.
- Gugerli P., 1978. Detection of 2 Potato Viruses by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa). *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology* **92**, 51–56.
- Hadidi A., Barba M., Candresse T. & Jelkmann W., 2011. Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits. *American Phytopathological Society*. 429 p.
- Hairul Bahara N. H., Tye G. J., Choong Y. S., Ong E. B., Ismail A. & Lim T. S., 2013. Phage display antibodies for diagnostic applications. *Biologicals* **41**, 209–216.
- Ziegler A., Torrance L., Macintosh S. M., Cowan G. H. & Mayo M. A., 1995. Cucumber mosaic cucumovirus antibodies from a synthetic phage display library. *Virology* **214**, 235–238.