

**Sicherheitsforschung und Monitoringmethoden
zum Anbau von Bt-Mais:
Expression, Nachweis und Wirkung von rekombinantem Cry1Ab
in heterologen Expressionssystemen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Agrarwissenschaften
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Hang Nguyen Thu
geboren in Hanoi, Vietnam

Göttingen, November 2004

D 7

1. Referent: Prof. Dr. G.A. Wolf

2. Korreferent: Prof. Dr. S. Vidal

Tag der mündlichen Prüfung: 08 November 2004

Für meine Eltern

Abkürzungen

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
<i>B. thuringiensis; Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
bidest.	zweifach destilliert(es)
Bis-AA	N, N'-Methylen-bis-acrylamid
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
cm	Zentimeter
DAS-ELISA	Double antibody sandwich-ELISA
DTT	1,4-Dithiothreit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E ₄₅₀	Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm
EC	Entwicklungscode
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
<i>et al.</i>	und andere
Fa.	Firma
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
FG	Frischgewicht
g	Gramm
h	Stunde(n)
ha	Hektar
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IB(s)	Inklusion Body (-ies)
IgG	Immunoglobulin Gamma
IgY	Immunoglobulin in Hühnerserum und Eidotter (egg yolk)

IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactosid
k. A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervalle
l	Liter
L1	Larvenstadium
LB	Luria-Bertani
LC _x	Letalkonzentration bei der x% sterben
M	Molar
-m	Meter
m-	Milli (10^{-3}) (in Verbindung mit g, l, m, M)
mA	Milliampere
mAK	monoklonaler Antikörper
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
Mio.	Millionen
msAK	Monospezifischer Antikörper
μ -	micro (10^{-6}) (in Verbindung mit g, l, m, M)
N	Normal
n-	nano- (10^{-9} in Verbindung mit g, m)
n.v.	nicht vorhanden
o.g.	oben genannt
<i>O. nubilalis</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>
OPD	o-Phenylendiaminhydrochlorid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate-buffered saline)
pers. Mitt.	persönliche Mitteilung
PFG	Pflanzenfrischgewicht
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTG	Pflanzentrockengewicht
PVDF	Polyvinylidenefluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)

RSA	Rinderserumalbumin
sec	Sekunde
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
STABW	Standardabweichung
t	Tonnen
Tab.	Tabelle
TB	Terrific Broth
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TG	Trockengewicht
TPCK	1-chloro-3(4-tosylamido)-4-phenyl-2-butanon; N-tosyl-L-phenylalanin chloromethyl keton
USDA	United States Department of Agriculture
usw.	undsoweiter
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vs.	versus
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
× g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (g)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Chemikalien	9
2.2	Medien und Zusätze	9
2.3	Produktion und Reinigung des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins	11
2.3.1	Bakterien	11
2.3.2	Anzucht der <i>E. coli</i> -Expressionsstämme	11
2.3.3	Lagerung der <i>E. coli</i> -Expressionsstämme	12
2.3.4	Time-Course-Experiment	12
2.3.5	Reinigung des Cry1Ab-Protoxins	13
2.3.6	Trypsinisierung von Cry1Ab	14
2.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	14
2.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	15
2.5.1	Herstellung der Gele	15
2.5.2	Probenvorbereitung	16
2.5.3	Elektrophorese	17
2.5.4	Färbung der Gele	17
2.6	Bestimmung des Reinheitsgrads von Cry1Ab-Protoxin und -Toxin	17
2.7	Lagerung des Cry1Ab-Toxins	18
2.8	Herstellung und Reinigung eines Antikörpers	18
2.8.1	Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen Cry1Ab-Toxin	18
2.8.2	Herstellung monospezifischer Antikörper gegen das Cry1Ab-Protoxin und Cry1Ab-Toxin	19
2.8.3	Reinigung monoklonaler Antikörper aus Ascitesflüssigkeit mittels Protein G-Säule	20
2.9	Entwicklung und Optimierung eines indirekten ELISA zur Quantifizierung von Cry1Ab-Toxin	21
2.9.1	Allgemeine Methodik	21
2.9.2	Durchführung des indirekten ELISA	21
2.9.3	Optimierung eines indirekten ELISA	23
2.10	Western-Blot	24
2.10.1	Semi-dry-Blotting	24

2.10.2	Immuno-Detektion	24
2.10.3	Rehybridisierung	26
2.11	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	26
2.12	Nachweis der biologischen Aktivität des Cry1Ab-Protoxins und -Toxins	27
2.12.1	Insekten	28
2.12.2	Biotest mit oberflächlich appliziertem Cry1Ab	28
2.12.3	Biotest mit transgenem Maispulver	29
2.13	Expressionsmonitoring von transgenem Mais (Bt176 und Mon810)	30
2.13.1	Pflanzensorten	30
2.13.2	Versuchsanlage	30
2.13.3	Probennahme	33
2.13.4	Probenaufbereitung im Labor	34
2.13.5	Trockengewichtsbestimmung	34
2.13.6	Bestimmung des Cry1Ab-Gehaltes in transgenen Maisproben mittels DAS-ELISA	34
2.14	Statistische Auswertung	35
3	ERGEBNISSE	37
A.	Produktion und Qualitätskontrolle von standardisiertem Cry1Ab-Toxins in E. coli	37
3.1	Expression von Cry1Ab	37
3.1.1	Time-Course-Experiment	37
3.1.2	Produktion und Reinigung des Cry1Ab-Protoxins	38
3.1.3	Herstellung von aktivem Cry1Ab-Toxin mittels Trypsin-Behandlung	40
3.2	Qualitätskontrolle des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins	43
3.2.1	Reinheitsgrad des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins	43
3.2.2	Stabilität des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins bei verschiedenen Lagerungsbedingungen	45
3.3	Entwicklung und Optimierung eines indirekten ELISA zur Quantifizierung von Cry1Ab-Toxin	46
3.3.1	Titration der Antigene und des polyklonalen Antikörpers	47
3.3.2	Titration des Antikörper-Konjugates	49
3.3.3	Spezifität und Sensitivität des polyklonalen Antikörpers	50
3.3.4	Vergleich der Sensitivität des indirekten ELISA mit dem Quantiplate™-Kit	52

3.4	Immunologischer Nachweis des rekombinanten Cry1Ab-Toxins aus <i>E. coli</i> mittels Westernblotting	54
3.4.1	Optimierung der Western-Blot-Parameter	54
3.4.2	Bestimmung der Nachweisgrenze	54
3.4.3	Überprüfung der Sensitivität des monospezifischen Antikörpers	55
3.5	Biologische Aktivität verschiedener rekombinanter Cry1Ab-Toxine mittels eines Bioassays mit <i>O. nubilalis</i>	56
3.5.1	Bioaktivität verschiedener Protoxin-Chargen	56
3.5.2	Bioaktivität verschiedener Toxin-Chargen	58
3.5.3	Vergleich der Bioaktivität des Toxins aus rekombinantem Cry1Ab und aus getrocknetem transgenen Mais	60
B.	Analyse transgener Maispflanzen der Linien Mon810 und Bt176 an zwei Versuchsstandorten in Deutschland - Saison 2001 bis 2003	63
3.6	Immunologischer Nachweis des Cry1Ab-Toxins in transgenen Maispflanzen	63
3.6.1	Immunoblot mit polyklonalem und monospezifischem Antikörper	63
3.6.2	Immunoblot mit monoklonalen Antikörpern	65
3.6.3	Einfluss des Pflanzenextraktes auf die Affinität des Antikörpers und des Cry1Ab-Toxins	66
3.6.4	Test des optimierten indirekten ELISA mit transgenem Pflanzenmaterial	67
3.7	Expressionsmonitoring von Cry1Ab in den Maislinien Mon810 und Bt176	67
3.7.1	Cry1Ab-Expression in Mon810	69
3.7.1.1	Standort Bonn	69
3.7.1.1.1	Vergleich der Cry1Ab-Gehalte zwischen den Entwicklungsstadien	69
3.7.1.1.2	Vergleich der Cry1Ab-Gehalte zwischen den Versuchsjahren	72
3.7.1.1.3	Korrelation der Cry1Ab-Gehalte innerhalb einer einzelnen Pflanze	73
3.7.1.2	Standort Halle	74
3.7.1.2.1	Vergleich der Cry1Ab-Gehalte zwischen den Entwicklungsstadien	74
3.7.1.2.2	Vergleich der Cry1Ab-Gehalte zwischen den Versuchsjahren	78
3.7.1.2.3	Korrelation der Cry1Ab-Gehalte innerhalb einer einzelnen Pflanze	79
3.7.1.2.4	Vergleich der Cry1Ab-Gehalte in Mon810 zwischen den Standorten Bonn und Halle	80
3.7.2	Cry1Ab-Expression in Bt176	83
3.7.2.1	Vergleich der Cry1Ab-Gehalte zwischen den Entwicklungsstadien	83
3.7.2.2	Vergleich der Cry1Ab-Gehalte zwischen den Versuchsjahren	86

3.7.3	Cry1Ab-Expression - Spezielle Betrachtungen	86
3.7.3.1	Cry1Ab-Verteilung im Kolben	86
3.7.3.2	Cry1Ab-Verteilung in Antheren und Pollen	87
3.7.4	Cry1Ab-Nachweis in Wurzeln des Vorjahres	88
4	DISKUSSION	90
4.1	Produktion und Reinigung des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins	90
4.2	Proteolytischer Prozeß des aktiven Cry1Ab-Toxins	91
4.3	Stabilität des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins	93
4.4	Biologische Wirkungskontrolle	94
4.4.1	Aktivität des Cry1Ab-Protoxins und des -Toxins aus rekombinanten <i>E. coli</i>	94
4.4.2	Aktivität des Cry1Ab-Toxins aus transgenem Mais	96
4.5	Immunologischer Nachweis des Cry1Ab-Toxins: ELISA und Western-Blot	97
4.6	Expressionsmonitoring des Cry1Ab-Toxins in transgenem Mais	100
5	ZUSAMMENFASSUNG	110
6	LITERATURVERZEICHNIS	113
7	ANHANG	127
7.1	Trockengewichte verschiedener Pflanzengewebe der Linie Mon810 und Bt176	127
7.2	Wetterdaten	130

1 EINLEITUNG

Mais (*Zea mays* L.) ist eine weltweit verbreitete landwirtschaftlich genutzte Pflanzenart und wird in mehr als hundert Ländern kommerziell angebaut. Der Maisanbau in Deutschland beträgt 1,5 Mio. ha, was ca. 13% der Ackerflächennutzung entspricht. In Europa nimmt der Maisanbau entsprechend dem Anbauumfang nach Weizen und Gerste den dritten Platz in der Rangfolge aller Ackerkulturen ein. Insgesamt werden 8,3 Mio. ha Mais in Europa angebaut und damit 11,3% der Ackerfläche mit Mais bestellt (Janinhoff, 2003). Jährlich werden weltweit ca. 600 Mio. t Mais erzeugt, davon liefern die USA etwa 40%.

Etwa 5-7% des potenziellen Maisertrages gelangen weltweit infolge von Ernteschäden nicht auf dem Markt (Transgen, 2001; Brookes, 2002). Hauptschädling sind die Larven des Maiszünslers, *Ostrinia nubilalis* (Hübener) (englisch: European corn borer - ECB). Sie verursachen durch Stängel- und Kolbenfraß erhebliche Ertrags- und Qualitätsverluste. Der Maiszünsler stammt aus Europa und wurde erstmals Ende des 18. Jahrhunderts als Schädling im Mais beschrieben. Er gehört zu den Schmetterlingen (Lepidoptera: Pyralidae) und befällt überwiegend Mais, aber auch andere Nutz- und Wildpflanzenarten wie Sonnenblumen, Hanf und Hopfen. Schon zu Beginn des 19. Jahrhunderts trat der Maiszünsler in den meisten europäischen Maisanbaugebieten auf (Gianessi *et al.*, 2003). Um das Jahr 1900 wurde der Maiszünsler von Europa in die USA eingeschleppt und verbreitete sich dort rasch. Nach Erhebungen des amerikanischen Landwirtschaftsministeriums (USDA) verursachte der Maiszünsler in den USA Ernteverluste von 838.000 t (1952) bis zu 7,6 Mio. t (in den Jahren 1949 und 1971) (Gianessi *et al.*, 2003).

Heute tritt der Maiszünsler regional unterschiedlich in Europa, Ostasien, Nordafrika und Nordamerika auf. In Frankreich sind ungefähr 40% der Anbaufläche mit Maiszünsler befallen. In Spanien sind 25% der Anbaufläche stark von Maiszünsler befallen, 40% der Gebiete sind einem mittleren Befall zuzuordnen (Brookes, 2002). In Deutschland breitet sich der Maiszünsler stetig aus. Von den klassischen Befallsgebieten südlich der Mainlinie und einigen günstigen Lagen Ostdeutschlands (z.B. Oderbruch) ausgehend, wird in jüngster Vergangenheit eine deutliche Zunahme des Befalls vor allem in Nordrhein-Westfalen, Thüringen, Sachsen, Sachsen-Anhalt und Brandenburg beobachtet. Heute sind in Deutschland bereits ca. 300.000 ha Anbaufläche (~25% Maisanbaugebiet) betroffen. (Degenhardt *et al.*, 2003).

Die Larven des Maiszünslers fressen zunächst auf den Blättern und bohren sich dann in die Stängel und Kolben ein. Der Fraß der Zünsler schränkt die Wasser- und Nährstoffversorgung der Maispflanzen ein. Der Schaden entsteht durch Verminderung des Pflanzenwachstums, kleineren Maiskörnern, Missbildung der Maiskolben und Stängelbruch (Melchinger *et al.*, 1998; Bohn *et al.*, 1999). Im Frühjahr verpuppen sich die Diapause-Larven, die in Stoppeln oder im Wurzelbereich überwinterten. Die geschlüpften Falter fliegen und legen die Eier an der Unterseite der Maisblätter ab. Ein Weibchen kann ungefähr 15 bis 20 Eigelege, mit jeweils 10-40 befruchteten Eiern, ablegen. Etwa eine Woche später schlüpfen die Larven und der Zyklus beginnt von vorn (Melchinger *et al.*, 1998). In Deutschland bildet der Maiszünsler nur eine Generation pro Jahr aus, in mediterranen Gebieten kommt es zu mehreren Generationen pro Jahr (Müller, 2000).

Bei einem Maiszünslerbefall tritt häufig die Gefahr von Pilz- und Bakterien-Infektion als Sekundärschaden auf. Die Larven verschleppen die Sporen des pathogenen Pilzes *Fusarium* und erhöhen dadurch die Wurzel-, Stängel- und Kolbenfäule im Mais (Melchinger *et al.*, 1998; Balkan *et al.*, 2002; Magg *et al.*, 2002). Der Erreger *Fusarium* kann darüber hinaus im Maispflanzengewebe ein Mykotoxin, das sogenannte Fumonisin bilden, welches eine für Menschen und Tiere gesundheitsschädliche Substanz darstellt. Die Futter- und Lebensmittel werden hierdurch erheblich belastet (Magg *et al.*, 2002).

Zur Bekämpfung des Maiszünslers wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Sie zeigen nicht immer eine ausreichende Wirkung und bedeuten einen hohen Aufwand für den Landwirt. Als präventive Maßnahmen werden die Bodenbearbeitung, das Unterpflügen der Stoppeln, Fruchtfolge und Sortenwahl empfohlen (Hoffmann *et al.*, 1985). Die chemische Bekämpfung mit Insektiziden (Pyrethroid-, Phosphorsäureester- und Methylcarbamt-Insektizid) ist nur während der kurzen Zeit wirksam, in der die Larven auf dem Weg vom Schlüpfen aus den Eiern bis zum Einbohren in die Maispflanzen erreichbar sind (Syngenta; Roberts und Guillebeau, 2004). Jedoch haben die Pyrethroid-Insektizide keine selektive Wirkung gegen *O. nubilalis*, sondern treffen auch andere Insekten. Ab 2004 gibt es daher in Deutschland kein registriertes Insektizid mehr, welches für die Maiszünslerbekämpfung zugelassen ist (Gianessi *et al.*, 2003).

Eine Alternative stellt die Behandlung des Maiszünslers durch eine gezielte Freisetzung der Schlupfwespe *Trichogramma* dar, die in Deutschland seit 1980 kommerziell eingesetzt wird (Melchinger *et al.*, 1998). *Trichogramma* parasitiert die Eier des Maiszünslers und verhindert somit die Entwicklung der Maiszünsler-Larven. Entscheidend für den Erfolg

sind der richtige Zeitpunkt, zu dem die Schlupfwespenlarven ausgebracht werden sowie die Witterungsverhältnisse (Chihrane und Laugé, 1996).

Ein weiteres, ebenfalls im ökologischen Landbau zulässiges Konzept ist die Verwendung von Präparaten mit *Bacillus thuringiensis* (Bt). Es wird seit über 40 Jahren zur biologischen Bekämpfung verschiedener Schadinsekten wie z.B. Kartoffelkäfer, Maiszünsler, Plutella usw. eingesetzt. *B. thuringiensis* ist ein stäbchenförmiges, sporenbildendes Bodenbakterium, das während der Sporulierung große Kristalle aus sogenannten δ -Endotoxinen bildet. δ -Endotoxine zeigen eine spezifische insektizide Wirkung. Nach Aufnahme des Toxinkristalls durch Insektenlarven, wird das Protoxin im Darm gespalten und das aktive Toxin (60-65 kDa) freigesetzt. Bei anfälligen Insekten bindet das aktive Toxin Rezeptormoleküle des Darmepithels. Sechs Toxinmoleküle bilden eine Membranpore aus. Dies führt zur Lyse der Epithelzellen und letztlich zum Tod der Insekten (Oddou *et al.*, 1993; Archer *et al.*, 2000). Im Vergleich zu klassischen Insektiziden besitzt das Bt-Präparat besondere Eigenschaften, welche es für den Einsatz in der Landwirtschaft wertvoll machen. Die Bt-Toxine wirken sehr spezifisch und sind harmlos für Säugetiere und Menschen. Sie werden schnell durch UV-Licht zerstört, so dass es zu keiner Akkumulation kommt. Aber wie bei anderen Bekämpfungsverfahren auch, wirken Bt-Präparate nur dann, wenn sie die Zünslerraupen außerhalb des Stängels erreichen können (Obukowicz *et al.*, 1986; Van Rie, 2000; Müller, 2000).

Mittels aminoterminaler Sequenzierung konnten Höfte *et al.* (1986) nachweisen, dass bei der Aktivierung des Protoxins (1155 Aminosäuren) durch tryptischen Verdau im Mitteldarm von Lepidopteren am N-terminalen Ende des Protoxins 28 Aminosäuren abgespalten werden. Die Größe des kleinsten aktiven Toxinfragments variiert zwischen 601 und 607 Aminosäuren. Weitere Studien zum proteaseresistenten toxischen Kern des Cry1 δ -Endotoxins weisen ebenfalls auf, dass das aktive Toxin durch die Abspaltung des Protoxins von ungefähr 500 bis 600 Aminosäuren eines C-terminalen Peptids und den ersten 27 bis 29 Aminosäuren des N-terminalen Endes entsteht (Nagamatsu *et al.*, 1984; Schnepf und Whiteley, 1985; Wabiko *et al.*, 1986; Aronson und Arvidson, 1987; Bietlot *et al.*, 1989a; Ogiwara *et al.*, 1992; Lightwood *et al.*, 2000) (Abb. 1).

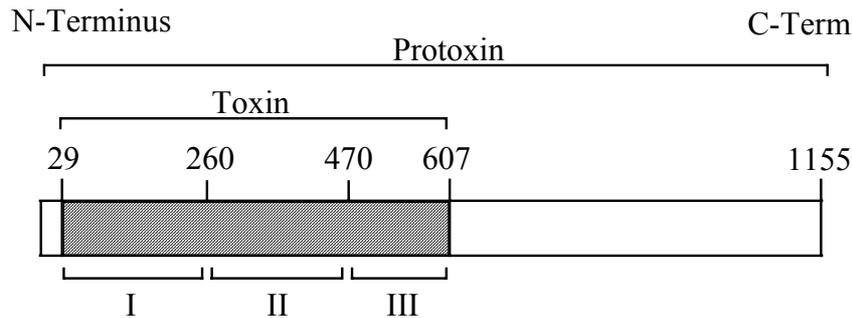


Abb. 1: Schematische Darstellung des Cry1Ab-Protoxins (1-1155 Aminosäuren), des aktiven Toxins (29-607 Aminosäuren) und seine Domänen I, II, III (nach Martens *et al.*, 1995).

Das Cry1-Toxin besteht aus drei strukturellen Domänen (Li *et al.*, 1991). Domäne I befindet sich am N-terminalen Ende des aktivierten Proteins und besteht aus sieben hydrophoben und amphipathischen α -Helices. Sie ist für die Porenbildung in der Membran der Epithelzellen verantwortlich (Ballester *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2002). Die Domäne II besteht aus drei anti-parallelen β -Faltblattstrukturen, ähnlich den der Antigenbindungsregionen des Immunoglobulins. Diese Domäne bindet an den Rezeptor des Mitteldarms der Insekten und ist für die Spezifität des Toxins entscheidend (Rajamohan *et al.*, 1996; Ballester *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Jenkins und Dean, 2001). Die Domäne III basiert auf einem β -Sandwich von zwei β -Faltblattstrukturen. Die Funktion der C-terminalen Domäne III konnte lange Zeit nicht vollständig aufgeklärt werden. Zuerst wurde vermutet, dass sie für den Schutz vor der weiteren proteolytischen Abspaltung verantwortlich ist. In den letzten Jahren wurde nachgewiesen, dass Domäne III auch bei anderen Funktionen wie z.B. an der Rezeptorbindung (Insekten-Spezifität), bei der Regulation der Aktivität der Porenbildung beteiligt ist (de Maagd *et al.*, 1996; Schnepf *et al.*, 1998; Rang *et al.*, 1999; Ballester *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001).

Verschiedene *B. thuringiensis* Stämme produzieren ein oder mehrere δ -Endotoxine. Im Jahr 1989 wurden die δ -Endotoxine nach ihrem Wirtsspektrum, der Homologie ihrer Gensequenzen und ihrer Molekülgröße (MG) in vier Hauptklassen eingeteilt: CryI (gegen Lepidopteren, MG ~130-140 kDa), CryII (gegen Dipteren und Lepidopteren, MG ~70kDa), CryIII (gegen Coleopteren; MG ~70 kDa), CryIV (gegen Dipteren; MG ~130 kDa) (Höfte und Whiteley, 1989). Bisher wurden noch weitere Toxingene entdeckt, so dass nach dem aktuellen Stand der neuen Nomenklatur, die nur auf der Homologie der

Aminosäuresequenz beruht, Cry-Toxine bis zu der Toxinklasse Cry45 beschrieben wurden (Crickmore *et al.*, 1998; Crickmore, 2004). Neben den Cry δ -Endotoxinen produzieren einige *B. thuringiensis* Stämme noch andere cytolytische Endotoxine (Cyt-Endotoxin) mit einem kleinerem Molekulargewicht von ca. 25-28 kDa (Glare und O'Callaghan, 2000).

Bis zum Jahr 2000 konnten mehr als 170 cry-Gene identifiziert werden (Crickmore *et al.*, 2000), viele davon wurden mittels Klonierung, Sequenzierung und heterologer Expression charakterisiert (Schnepf und Whiteley, 1981; Whiteley und Schnepf, 1986). Die Expression des Protoxins erfolgte in verschiedenen Wirtsvektorsystemen wie *B. subtilis*, *B. megaterium* und *Pseudomonas fluorescens* (Shivakumar *et al.*, 1986; Obukowicz *et al.*, 1986). Nur wenige Studien beschreiben die Klonierung des Protoxingens aus *B. thuringiensis* und den Einbau dieses Gens wieder in *B. thuringiensis* (Klier *et al.*, 1983, Garduno *et al.*, 1988). Nachdem cry-Gene Mitte der 1980er Jahre auch erfolgreich in Pflanzen (zuerst in Tabak und Tomaten) (Barton *et al.*, 1987) exprimiert werden konnten, eröffnete sich ein neuer Ansatz zur Bekämpfung des Maiszünslers. Bisher wurden die cry-Gene in viele wichtige Kulturarten transformiert (Perlak *et al.*, 1990; Adang *et al.*, 1993; Fujimoto *et al.*, 1993; Koziel *et al.*, 1993; Perlak *et al.*, 1993; Van der Salm *et al.*, 1994). Mitte der neunziger Jahre wurden die ersten Bt-Toxin-exprimierenden Pflanzen in den USA kommerzialisiert (Bolin *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2000). Beispiele dafür sind Bt-Baumwolle (Cry1Ac) zur Kontrolle der Tabakeule (*Heliothis virescens*), des Baumwollkapselwurms (*Helicoverpa armigera*), der Roten Kapselraupe (*Pectinophora gossypiella*) und Bt-Mais (Cry1Ab und Cry1F) gegen die Insektenschädlinge des Mais, wie Maiszünsler (*O. nubilalis*), Corn earworm (*Helicoverpa zea*) und Southwestern corn borer (*Diatrea grandiosella*). Folgende Bt-Maislinien wurden entwickelt und durch verschiedenen Firmen vertrieben: Event176 (KnockOutTM) von der Firma Syngenta Seeds (früher Ciba Geigy, Novartis), Bt176 (NatureGardTM) von der Firma Mycogen/Dow, Mon810 (YieldGradTM) von Monsanto; Bt11 (YieldGardTM) von Northrup King; Syngenta Seeds (früher Novartis) und Bt-ExtraTM von DEKALB. Außer Bt-ExtraTM enthalten alle o.g. Bt-Maisprodukte das Cry1Ab-Toxingen (Carpenter, 2001; Transgen, 2003).

In transgenem Mais ist die ursprüngliche cry1Ab-Nukleotidsequenz an den Kodongebrauch der Pflanzen angepasst (Perlak *et al.*, 1991). Zudem liegen die Gene in einer verkürzten Form vor und werden als lösliche Form in den Pflanzengewebe exprimiert. Die Linie Bt176 besitzt das Cry1Ab-Toxin mit einer Größe von 65 kDa und die Linie Mon810 eines mit 92 kDa (Essential Biosafety, 2001; Monsanto Corn, 1995 in

Freese, 2001). Zum Nachweis von Bt-Mais oder Bt-Maisprodukten wurden verschiedene molekularbiologische Methoden wie z.B. PCR und ELISA etabliert (Hübner *et al.*, 1999; Stave, 1999; Chiueh *et al.*, 2002; Yamaguchi, *et al.*, 2003). In Abb. 2 sind verschiedene Cry1Ab-Toxine aus Bakterien bzw. aus transgenem Mais und deren Wirkmechanismus dargestellt. Die Eigenschaften der beiden Bt-Maislinien sind in Tab. 1 zusammengestellt.

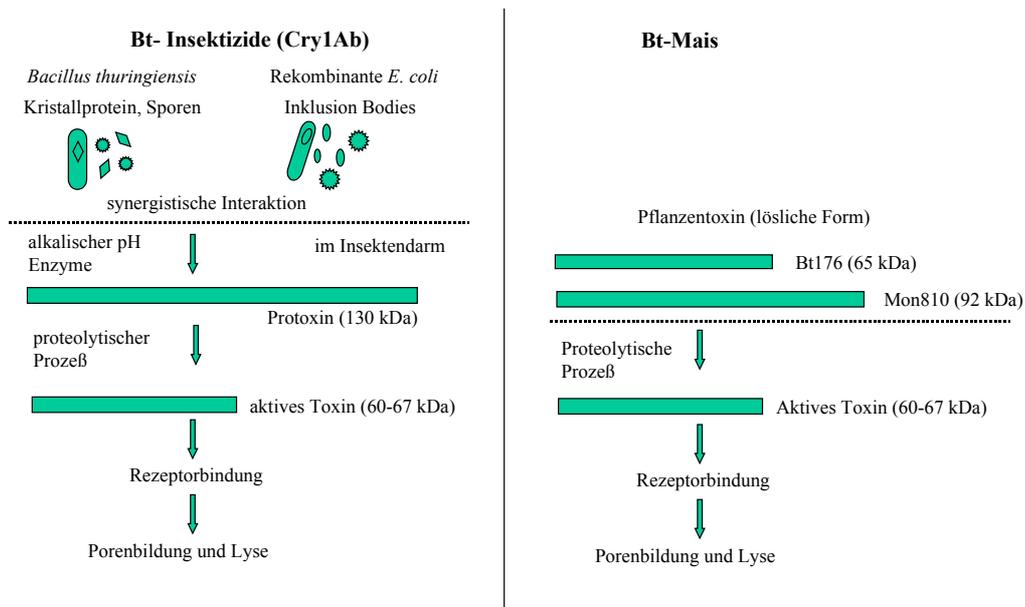


Abb. 2: Darstellung des Wirkmechanismus des Cry1Ab-Toxins in mikrobiell hergestelltem Insektizid und in gentechnisch verändertem Mais (modifiziert nach Hilbeck *et al.*, 2000).

Gentechnisch veränderter Mais wird in größerem Umfang in den USA, Argentinien und Kanada angebaut. In den USA wurde im Jahr 2003 auf ca. 12 Mio. ha (40% der Gesamtanbaufläche Mais) Bt-Mais angebaut (Transgen, 2004). In der EU wurden die Linie Bt176 im Jahr 1997 und Mon810 im Jahr 1998 in den Verkehr gebracht (Degenhardt *et al.*, 2003). Seitdem ist Spanien das einzige EU-Land, das Bt-Mais in der Landwirtschaft nutzt. Die Anbaufläche hat dort von 18.000 ha (1998) auf über 32.000 ha (2003) zugenommen. In Deutschland stieg sie von ca. 350 ha im Jahr 1998 auf 500 ha im Jahr 2002, jedoch handelt es sich nur um Versuchsanbau (Transgen, 2003). Ab 2004 hat ein sogenannter Erprobungsanbau von Bt-Mais auf 300 ha (ca. 0,02% der Maisanbaufläche) in verschiedenen Bundesländern begonnen (Transgen, 2004).

Tab. 1: Eigenschaften der Maislinien Bt176 und Mon810. Nach Koziel, *et al.*, 1993; Schrijver und Moens, 2003; Agbios, 2001; Essential Biosafety, 2001)

	Bt176 (Syngenta)	Mon810 (Monsanto)
Eigenschaft	Resistenz gegen Maiszünsler	Resistenz gegen Maiszünsler
Plasmid	1) pCIB4431 2) pCIB3064	1) PV-ZMBK07 2) PV-ZMGT10
Promotor	1) P-PEPC ^a + P-CDPK ^b 2) P-35S ^c	P-35S ^c mit hsp70-int.1 ^d
gentechnisch eingeführte Gene	1) Zwei verkürzte <i>CryIAb</i> ^e 2) <i>bar</i> ⁱ	<i>CryIAb</i> ^e
Terminator	I9 ^f , T-35S ^g	Nos 3 ^h
Anzahl der Aminosäuren	648	816

a) P-PEPC: Phosphoenolpyruvate Carboxylase- grüner pflanzenteilspezifischer Promotor

b) P-CDPK: Calcium-dependent protein kinase- pollenspezifischer Promotor

c) P-35S: Promotor aus Cauliflower Mosaic Virus

d) hsp70-int.1: Nummer 1 der Intronsequenz aus hsp70 Gen des Mais

e) *CryIAb*: Delta-Endotoxin Gen aus *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, angepasster Kodongebrauch

f) I9: Intron 9 aus PEPC-Gen des Mais

g) T-35S: Terminator des 35S Gens aus Cauliflower mosaic virus

h) Nos 3': Terminator des Nopaline synthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*

i) *bar*: Gen kodiert für Phosphinothricin acetyltransferase aus *Streptomyces hygroscopicus*

Aufgrund dieses steigenden Anbaus und der kontinuierlichen Exposition wird eine verschärfte Gefahr der Resistenzbildung bei *O. nubilalis* befürchtet (Hutchinson und Andow, 1998; Bolin *et al.* 1998; Tabashnik *et al.*, 2003). Nach umfangreichen Anwendungen von *Bt*-Preparation wurden Resistenzen in Feldpopulationen beobachtet (Kohlmotte, *Plutella xylostella* L.) (Ferré *et al.*, 1991; Tabashnik *et al.*, 1990; 2003; Ibiza-Palacios *et al.*, 2004). Zwar wurde über eine Resistenz beim Maiszünsler bisher nicht berichtet, sie kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da der *Bt*-Mais erst seit einigen Jahren angebaut wird (de Maagd *et al.*, 1999). Ebenfalls könnten Auswirkungen von *Bt*-Mais auf Nicht-Zielorganismen zu erwarten sein. Zahlreiche Studien über die Wirkung auf Nicht-Zielorganismen, wie pollenfressende Insekten (Honigbiene, *Apis mellifera* L.), Nützlinge (Grüne Florfliegenlarve, *Chrysoperla carnea*; Marienkäfer, *Coccinella*)

(Hilbeck *et al.*, 1998a, 1998b, 1999) und Parasiten von Schädlingen (Erzwespe, *Meteorus laeviventris*) (Hafez *et al.*, 1997) wurden im Labor mit mikrobiellen Präparaten von *B. thuringiensis* durchgeführt. Eine erhöhte Mortalität einiger Insektenarten wurde festgestellt, z.B. bei der Florfliegenlarve stieg die Mortalität von 37% auf 62% (Hilbeck *et al.*, 1998a). Hingegen zeigten Romeis *et al.* (2004) keinen direkten Effekt von Cry1Ab (eingemischt in Zuckerlösung) auf die Larven der Florfliege.

In Deutschland fördert das BMBF seit 2001 wissenschaftliche Untersuchungen zum Thema: "Sicherheitsforschung und Monitoring zum Anbau von Bt-Mais". Ein Teilziel des Projektes war die vorliegende Untersuchung, die Produktion eines standardisierten Bt-Toxins, das zu Suszeptibilitätsstudien, Toxizitätsuntersuchung und zum Resistenzmonitoring verwendet werden kann. Da die Reinigung des Toxins aus transgenem Mais zu aufwändig war, wurden im ersten Teil der Arbeit eine standardisierte Toxinproduktion aus rekombinanten Bakterien etabliert. Die biochemischen Eigenschaften und die Stabilität dieser Toxine wurden überprüft. Dabei wurden immunologische Nachweismethoden (ELISA und Western-Blot) des Cry1Ab-Toxins entwickelt und optimiert. Die biologische Aktivität des rekombinant in *E. coli* produzierten Cry1Ab-Toxins wurde anhand von Biotests mit *O. nubilalis* bestimmt und mit dem in Pflanzen vorkommenden Toxin verglichen.

Bisher liegen so gut wie keine Erfahrungen über die Expression des Cry1Ab-Toxins einer Vegetationsperiode des transgenen Mais aus den europäischen Anbaugebieten vor. Des Weiteren wurden derzeit noch keine genaueren Untersuchungen mit den angemeldeten Sorten Novelis und Valmont in Deutschland vorgenommen. Detaillierte Kenntnisse der Cry1Ab-Expressionsmuster dieser Sorten sind für eine Beurteilung möglicher ökologischer Auswirkungen bedeutsam. Diese Datengrundlage wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit anhand eines dreijährigen Expressionsmonitoring der o.g. Sorten erarbeitet. Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund: Bestehen unterschiedliche Cry1Ab-Gehalte zwischen verschiedenen Pflanzenorganen, Entwicklungsstadien, Linien, Standorten und Jahren?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien und Substanzen wurden von folgenden Firmen bezogen:

Butanol, Zitronensäure Monohydrat, Diethanolamin, APPLICHEM

Triton[®]X-100

AffiniPure Donkey Anti-Chicken IgY

JACKSON IMMUNORESEARCH

Bacto-Hefeextrakt, Bacto-Trypton, Micro Agar

DUCHEFA

Magermilchpulver

GLÜCKSKLEE

Bench Marker

INVITROGEN

Eisessig, Natriumhydroxid, Tween 20

MERCK DARMSTADT

Natriumdodecylsulfat (SDS)

MERCK SCHUCHARDT

Ammonium Persulfat

PROMEGA

DNaseI

ROCHE

Bromphenol blau, o-Phenylendiamin, Sorbinsäure, SIGMA

TEMED, Trypsin (TPCK treated from Bovine Pancreas), Vanderzant gemischte Vitamine für Insekten

Alle anderen Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, von der Firma Roth bezogen.

2.2 Medien und Zusätze

Alle Lösungen, Puffer und Nährmedien wurden in H₂O bidest. angesetzt und autoklaviert (121°C, 1 bar, 20 min) oder sterilfiltriert (0,22 µm Millipore-Filter).

LB-Agar (Luria-Bertani Medium):

10 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefeextrakt

10 g NaCl

15 g Agar

auf 1 Liter H₂O bidest.

TB-Medium (Terrific Broth Medium):Teil 1: Medium:

12 g Bacto-Trypton
 24 g Bacto-Hefeextrakt
 4 ml Glycerol
 auf 900 ml H₂O bidest.

Teil 2: Kalium-Phosphat-Salz Puffer:

2,31 g KH₂PO₄
 12,54 g K₂HPO₄
 auf 100 ml H₂O bidest.

Teil 1 und Teil 2 wurden getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen unter Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration: 50 µg/ml) zusammengegeben.

Nährmedium für Biotests (modifiziert nach dem Protokoll der EU-Expertenkommission zum Monitoring des Maiszünslers - Scientific Committee on Plants at the EU-Commission, 1998). Es bestand aus zwei Komponenten: Einer Agarlösung und einer Nährstoffsuspension.

Zutaten: für 5 Raster Bio-ba-128:

Agarlösung		Nährstoffsuspension	
Leitungswasser	340 ml	Leitungswasser	340 ml
Benzoessäure	2 g	Weizenkeime (Vollgram, Reformhaus)	28 g
Nipagin	1 g	Bierhefe (Cenovis, Reformhaus)	30 g
Sorbinsäure	1 g	Maisgrieß (Seeberger, Reformhaus)	112 g
Micro-Agar	8 g	Ascorbinsäure	6 g
		Vanderzant gemischte Vitamine für Insekten	2 g

Für die Agarlösung wurden Benzoessäure, Nipagin und Sorbinsäure in Alkohol gelöst und mit 340 ml Leitungswasser erhitzt bis der Alkohol vollständig verdampft war. Die aufgekochte Flüssigkeit wurde anschließend auf das ursprüngliche Volumen (340 ml) aufgefüllt. Der Agar wurde nach dem Abkühlen der Lösung dazugegeben, eingerührt und kurz aufgekocht.

Für die Nährstoffsuspension wurden Weizenkeime, Bierhefe und Maisgrieß in einem zweiten Becherglas zusammengefügt und mit 250 ml Wasser gut gemischt. Die Mischung wurde mit einem Teigschaber in das Agar-Becherglas gegeben. Das Becherglas wurde mit 50 ml Wasser von der abgemessenen Menge nachgespült. Ascorbinsäure und Vitamine wurden mit dem Rest des abgemessenen Wassers gelöst und zur Agarlösung zugegeben, sobald dieses auf 50°C abgekühlt war. Das Medium wurde nochmals mit einem Mixstab gut gemischt und je 1 ml pro Zelle in Biotest-Raster pipettiert. Nach dem Abkühlen wurden die Raster bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.3 Produktion und Reinigung des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins

2.3.1 Bakterien

Zur Produktion des Cry1Ab-Protoxins wurden zwei *E. coli*-Expressionsplasmide verwendet. Plasmid pMP, welches das offene Leseraster von Cry1Ab aus *B. thuringiensis* HD1 enthält (Masson *et al.*, 1989) wurde in *E. coli* HB101 vermehrt und in TB-Medium mit Ampicillin bei 37°C zur Expression gebracht. Dieser Expressionsstamm wurde freundlicherweise von Dr. W. Moar (Auburn University, USA) zur Verfügung gestellt.

Daneben wurde auch das Plasmid pBD140 verwendet. Dieses enthält die volle Länge des Cry1Ab-Gens unter der Kontrolle des tac-Promotors (de Maagd *et al.*, 1996). Das Plasmid wurde in *E. coli* XLI-Blue-Zellen in TB-Medium mit Ampicillin bei 28°C exprimiert. Dieser Expressionsstamm wurde freundlicherweise von Dr. R. de Maagd (Wageningen University, Niederlande) überlassen.

2.3.2 Anzucht der *E. coli*-Expressionsstämme

Vorkultur:

Um eine Startkultur der Expressionsstämme anzulegen, wurden 25 ml TB-Medium unter Zugabe von Ampicillin (50 µg/ml Endkonzentration) in einem 100 ml Kolben mit einer Einzelkolonie des Stamms HB101/pMP von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Rotationsschüttler (220 rpm) inkubiert.

Die Vorkultur des Stamms XLI-Blue/pBD140 erforderte 2% (w/v) Glucose im TB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 28°C auf

einem Rotationsschüttler (220 rpm). Die Glucose diente zur Unterdrückung des tac-Promotors während der Wachstumsphase.

Hauptkultur:

Zur Gewinnung und Aufarbeitung des Cry1Ab-Protoxins wurden 0,5 ml der Vorkultur der Stämme HB101/pMP bzw. XL1-Blue/pBD140 in 500 ml TB-Medium unter Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml), aber ohne Glucose, in einem Zwei-Liter-Kolben angeimpft und dieser entsprechend bei 37°C bzw. 28°C schüttelnd inkubiert. Für die Induktion der Toxin-Produktion wird kein IPTG benötigt.

2.3.3 Lagerung der *E. coli*-Expressionsstämme

Zu der Bakteriensuspension wurde steriles Glycerol (50%, v/v) mit einer Endkonzentration von 12,5% (v/v) zugegeben. Die Kultur wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Um die Bakterien wiederzugewinnen, wurde mit einer sterilen Impföse die gefrorene Oberfläche der Kultur abgekratzt und sofort auf einer LB-Agar Platte (mit Ampicillin) ausgestrichen. Die restliche gefrorene Kultur wurde wieder bei -80°C gelagert. Das beimpfte Medium wurde über Nacht bei 37°C bzw. bei 28°C inkubiert.

2.3.4 Time-Course-Experiment

Um den optimalen Zeitpunkt der Toxinproduktion zu bestimmen, wurde die Expression des Cry1Ab-Toxins bei verschiedenen Inkubationszeiten verglichen. Die Bildung der Proteineinschlusskörper (Inclusion Bodies, IBs) in den *E. coli*-Zellen wurde mikroskopisch (Leica DMRBE, Phasenkontrast, 1000×, Ölimmersion) kontrolliert. Ein ml Probe der Kultur wurde zu bestimmten Zeitpunkten (1, 2, 3, 4 und 5 Tage nach Inokulation) genommen und für 1 min bei 20.800×g (Eppendorf Centrifuge 5417C) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS-Puffer bis zu 1/20 verdünnt; jeweils 30 µl davon wurden direkt mit 10 µl 4×Ladepuffer und 4 µl β-Mercaptoethanol bei 100°C für 10 min erhitzt. Die Proben wurden bei -20°C gelagert, bis alle Proben der nächsten Probennahme-Zeitpunkte vorhanden waren. Schließlich wurden die Proben nebeneinander auf ein 7%-iges SDS-PAGE (Kap. 2.5) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

2.3.5 Reinigung des Cry1Ab-Protoxins

Zell-Lyse

Lysepuffer:

50 mM Tris-HCl, pH 8,0

5 mM EDTA

100 mM NaCl

Die *E. coli*-Suspensionskulturen wurden zum optimalen Expressionszeitpunkt in 250-ml Zentrifugenbecher aufgeteilt und bei 8200×g und 4°C für 10 min abzentrifugiert (Sorvall RC 5B Plus, SLA-15000 Rotor). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde gewogen und für mindestens 30 min bei -20°C eingefroren. Danach wurde der Lysispuffer zum Pellet (3 ml pro Gramm *E. coli*) gegeben und durch Vortexen resuspendiert. Nach der Zugabe von Lysozym (800 µg pro Gramm *E. coli*) wurde die Suspension für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 4 mg Desoxycholsäure Natriumsalz pro Gramm *E. coli* hinzugefügt, um die bakteriellen Zellen komplett aufzulösen. Nach 10-minütigem Schütteln bei 37°C wurde die Suspension viskos, da die lysierten Zellen ihre Nukleinsäuren freisetzen. Durch eine Behandlung mit DNase I (200 µg Dnase I pro Gramm *E. coli*) für 30 min bei 37°C, nahm die Viskosität ab. Um die letzten Zellen aufzubrechen, wurde die Suspension auf Eis abgekühlt und für 30 sec mit Ultraschall (Sonorex RK 255H) behandelt.

Waschen der IBs

Waschpuffer:

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

1 M NaCl

1% (v/v) Triton X-100

PBS:

10 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,4

0,8% (w/v) NaCl

Die lysierten Zellen mit den Proteineinschlusskörpern wurden bei 8200×g für 20 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Waschpuffer resuspendiert und für 10 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurde das Pellet mit PBS (dreimal) und anschließend mehrfach mit Wasser gewaschen. Das weiße

Proteineinschlusskörper-Pellet wurde nach der Zentrifugation (bei 8200×g, 4°C für 10 min) gesammelt.

Lösen der IBs

Um das Cry1Ab-Protoxin freizusetzen, wurden die Proteineinschlusskörper in Solubilisierungspuffer (50 mM CAPS-Puffer, pH 10,5 und 0,25% (v/v) β -Mercaptoethanol) resuspendiert und bei 37°C für 2 h inkubiert. Das Cry1Ab-Protoxin (130 kDa) befand sich nach der Zentrifugation (bei 8200×g, 4°C für 20 min) im Überstand.

Ultrafiltration des Cry1Ab-Protoxins

Zur Ultrafiltration des Cry1Ab-Protoxins wurde die "Rührzelle" (Millipore, Model 8200) und eine Regeneratcellulose-Membran (Millipore) mit einer Trenngrenze von 100 kDa verwendet. Die Rührzelle wurde nach der Bedienungsanleitung des Herstellers verwendet. Die jeweilige Membran wurde vor Verwendung für eine Stunde mehrfach in H₂O dest. gewaschen und anschließend in die Rührzelle eingesetzt. Das in CAPS-Puffer gelöste Protoxin wurde in die Zelle gegeben. Das Ventil an der Rührzelle wurde soweit geschlossen, dass das Filtrat (Wasser, Salze und die gelösten Stoffe, die ein geringeres Molekulargewicht als 100 kDa haben) tröpfchenweise durch die Membran gelangten. Das gereinigte, aufkonzentrierte Protoxin wurde nach der Filtration mit etwas CAPS-Puffer, pH 10,5, von der Membran gespült. Die Proteinkonzentration wurde mit einem Bradford Protein-Assay (Bio-Rad) bestimmt.

2.3.6 Trypsinisierung von Cry1Ab

Das gelöste Cry1Ab-Protoxin wurde mit 1mg/ml Trypsin „TPCK treated from Bovine Pancreas“, bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert, danach durch Ultrafiltration (wie oben beschrieben) mit einer Membran aus Polyethersulfon (50 kDa Trenngrenze) (Millipore, USA) aufkonzentriert.

2.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration des Cry1Ab-Protoxins und Cry1Ab-Toxins wurde mit dem Protein-Assay, basierend auf der Bradford-Methode bestimmt. Die Bestimmung beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G250 (von 465 nm zu 595 nm) nach Bindung an ein Protein. Rinderserumalbumin in bekannten

Konzentrationen (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 mg/ml) wurde als Standard für die Eichung verwendet. Zu jeweils 10 µl Protein-Standard bzw. Toxinprobe wurden 500 µl 1/5 verdünnte Farbreagenz pipettiert und gut gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm von jedem Ansatz in Plastikkuvetten im BioPhotometer (Eppendorf) gegen dest. Wasser gemessen. Die Toxinlösungen wurden so verdünnt, dass die Messwerte im linearen Bereich der Eichkurve lagen. Die Extinktionswerte wurden anhand der Eichreihe in Proteingehalte umgerechnet.

2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Bestimmung der Molekulargewichte sowie zur Analyse des gereinigten Cry1Ab-Protoxins und Cry1Ab-Toxins wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt.

2.5.1 Herstellung der Gele

Die Elektrophorese wurde mit dem Gerät Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad) und Gelen der Größe 83 × 73 × 0,75 mm durchgeführt.

Lösungen:

- Acrylamid 30% (w/v)/Bisacrylamid 0,8% (w/v)-Lösung
- 10% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in H₂O
- 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS), frisch angesetzt
- TEMED (N,N,N',N', Tetramethylethylenamin)

Ladepuffer (4x):

- 40 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 4 mM EDTA
- 10% (w/v) SDS
- 40% (v/v) Glycerol
- 0,004% (w/v) Bromphenolblau

Elektrophorese-Laufpuffer(1×):

25 mM Tris

250 mM Glycine

0,1% (w/v) SDS

Dieser Puffer hat einen natürlichen pH-Wert von 8,3, der nicht mit HCl eingestellt werden darf.

Für die optimale Auftrennung der nachzuweisenden Proteine mit einer Größe von ca. 130 und 65 kDa wurden ein 7%-iges und 10%-iges Trenngel verwendet. Für zwei Gele wurden folgende Lösungen verwendet:

Stammlösung		Acrylamidkonzentration im Gel		
		Trenngel		Sammelgel
		7%	10%	3%
H ₂ O bidest.	[ml]	5,1	4,1	3,7
Tris-HCl, 1,5 M, pH 8,8	[ml]	2,5	2,5	-
Tris-HCl, 1 M, pH 6,8	[ml]	-	-	0,625
SDS 10% (w/v)	[ml]	0,1	0,1	0,05
AA 30% (w/v)/Bis-AA 0,8% (w/v)	[ml]	2,3	3,3	0,67
APS 10% (w/v)	[μl]	50	50	25
TEMED	[μl]	5	5	5
Volumen Total	[ml]	10,055	10,055	5,075

Mit einer Pasteur-Pipette wurde das Trenngel in die Gelkammer gegossen. Das Trenngel wurde zum Polymerisieren vorsichtig mit n-Butanol überschichtet (ca. 10 min). Danach wurde das Butanol entfernt. Das Sammelgel wurde über das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingeführt. Nach Abschluss der Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt und die Puffer-Reservoirs mit Elektrophorese-Puffer befüllt. Danach wurde der Kamm aus dem Gel entfernt.

2.5.2 Probenvorbereitung

Zu den Proteinproben wurden 0,25 Volumina 4×SDS-Ladepuffer und 0,15 Volumina β-Mercaptoethanol gegeben. Diese wurden gut gemischt, für 10 min auf 100°C erhitzt und in die Geltaschen pipettiert.

2.5.3 Elektrophorese

Nach dem Beladen des Gels und dem Verschließen der Gel-Apparatur wurde die Elektrophorese zuerst bei einer Spannung von 75 V, 400 mA durchgeführt, bis die Proteine das Trenngel erreicht hatten. Danach wurde die Spannung auf 150 V, 400 mA erhöht. Durch einen diskontinuierlichen, zweiphasigen Gelaufbau wurde eine schärfere Trennung der Proteinbanden erreicht. Im Sammelgel wurde nach Anlegen eines elektrischen Feldes die Protein-Lösung nicht getrennt, sondern am Übergang zum Trenngel zunächst konzentriert. Erst nach dem Übergang ins Trenngel erfolgte die Trennung nach Molekulargewichten. Als Größenstandard wurde ein Protein Marker (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde beendet, als der Markierungsfarbstoff Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreichte (1-1,5 h).

2.5.4 Färbung der Gele

Färbelösung

- 10% (v/v) Eisessig
- 25% (v/v) Isopropanol
- 65% (v/v) H₂O
- 0,004% (w/v) Coomassie Blue

Entfärbelösung

- 0,5% (v/v) Eisessig
- 0,75% (v/v) Methanol
- 98,75% (v/v) H₂O

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel entweder für einen Western-Blot verwendet oder direkt in der Färbelösung in einer Plastik-Box auf einem Schüttler (80 rpm) bei Raumtemperatur für 30 min angefärbt. Danach wurde das Gel mindestens 30 min (bis zu einem Tag) entfärbt. Nicht an die Proteinbanden gebundener Farbstoff wurde durch Schütteln des Gels in der Entfärbelösung herausgewaschen, bis der Hintergrund fast farblos war. Zum Schluss wurde das Gel gescannt (Epson 1640 SU).

2.6 Bestimmung des Reinheitsgrads von Cry1Ab-Protoxin und -Toxin

Gescannte SDS-Gele wurden mit dem Programm ImageMaster (Pharmacia System) analysiert. Nach dem Einlesen der Proteinbanden erfolgte die Quantifizierung der Banden

auf Basis des Volumens (Summe der Intensität von allen Pixels in einer Bande), der Peakhöhe (maximale Werte von dem Profil einer Bande), der Bandenbereich (zweidimensionale Ausdehnung der Bande) und der X/Y Koordinate der Bande. Als Reinheitsgrad des Cry1Ab-Protein wurde das Pixel-Volumen der Cry1Ab-Bande durch das Gesamtvolumen aller Banden in einer Spur geteilt.

2.7 Lagerung des Cry1Ab-Toxins

Zur Lagerung des Cry1Ab-Toxins wurde 0,02% (w/v) Na-Azid (NaN_3) dazu gegeben. Die Stabilität des Protoxins und Toxins wurde in Abhängigkeit der Lagerungstemperatur und -dauer überprüft. Die Toxinlösungen wurden in CAPS-Puffer (pH 10,5) bis zu 200 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Von den Toxinlösungen wurden jeweils 60 μl in zehn 1,5-ml Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Fünf Reaktionsgefäße von jeder Lösung wurden im Kühlschrank (+4°C) und bei -20°C gelagert. Die Lagerung erfolgte über einen Zeitraum von 8 Monaten. Nach jeweils 2 Monaten wurden sowohl Cry1Ab-Protoxin als auch aktives Cry1Ab-Toxin entnommen, mit 20 μl 4×SDS Ladepuffer und 8 μl β -Mercaptoethanol versetzt und für 10 min bei 100°C erhitzt und wieder eingefroren. Nach einer Langzeitlagerung von 8 Monaten wurden alle Proben gemeinsam auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Intensität der Toxinbanden der verschiedenen Proben verglichen.

2.8 Herstellung und Reinigung eines Antikörpers

2.8.1 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen Cry1Ab-Toxin

Ein polyklonales Antiserum (pAK-NTH1) gegen aktives Cry1Ab-Toxin (65 kDa) wurde in einem Huhn produziert. Für die Antigenpräparation wurde das Cry1Ab-Protoxin in *E. coli* HB101/pMP exprimiert und gereinigt, danach zum aktiven Toxin trypsinisiert (siehe Kapitel 2.3). Zum Immunisieren wurden 1 mg Antigen verwendet. Die Immunisierung eines Huhn und die AK-Reinigung aus Hühnereiern wurde von der Fa. David Biotechnologie, Regensburg, entsprechend folgendem Protokoll durchgeführt:

Immunisierung:

0. Tag:	Erste Immunisierung mit 75 µg Protein
nach 14 Tagen:	Zweite Immunisierung mit 75 µg Protein
nach 35 Tagen:	Dritte Immunisierung mit 50 µg Protein
nach 45-55 Tagen:	Sammlung von 10 Immuno-Eiern

Die Gewinnung des pAKs erfolgte durch die Reinigung des Eidotters, da nur im Eigelb Immunoglobuline in hoher Konzentration vorkommen. Die pAK-Konzentration betrug 7,5 mg/ml nach der Reinigung. Der pAK-NTH1 wurde mit 0,02% NaN₃ versetzt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.8.2 Herstellung monospezifischer Antikörper gegen das Cry1Ab-Protoxin und Cry1Ab-Toxin

Um die Spezifität des AKs zu erhöhen, wurden aus pAK-NTH1 monospezifische AK (msAK-NTH1 und msAK-NTH2), gegen Cry1Ab-Protoxin und aktives Toxin hergestellt. Nach der Ultrafiltration wurden Cry1Ab-Protoxin bzw. Cry1Ab-Toxin in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend ein Elektroblothing durchgeführt (siehe Kap. 2.10.1). Von der geblotteten PVDF-Membran wurden zwei Auftragebahnen von der linken und rechten Seite abgetrennt und diese weiter als Immuno-Detektion behandelt (siehe Kap. 2.10.2). Der Mittelteil der Membran wurde bis zur Weiterverarbeitung in Frischhaltefolie im Kühlschrank aufbewahrt.

Anhand der angefärbten Seitenteile wurde die gewünschte Bande aus dem Mittelteil der Membran ausgeschnitten. Dieser PVDF-Streifen wurde 1 h mit Blockingpuffer (siehe Kap. 2.10.2) behandelt, danach 1 h bei Raumtemperatur mit pAK-NTH1 inkubiert (leichtes Schütteln). Der Streifen wurde zuerst 10 min mit 1×PBS + 0,5% Tween 20, danach 10 min mit 1×PBS gewaschen, um die unspezifisch gebundenen AK zu entfernen. Zur Elution wurde der PVDF-Streifen in einem 2-ml Eppendorfreaktionsgefäß mit 1 ml Glycin-HCl Puffer (pH 2,2) + 1% RSA versetzt und 1 min geschüttelt.

Glycin-HCl Puffer, pH 2,2:

4,3 g/l Glycin

3,4 g/l NaCl

pH-Wert mit 1N HCl auf 2,2 einstellen

Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Um eine Schädigung der AK zu vermeiden, wurde der pH-Wert der gewonnenen monospezifischen AK sofort nach der Elution auf pH 7,0 durch Zugabe von 1 N NaOH eingestellt. Die AK-Lösungen wurden mit 0,02% (v/v) NaN₃ versetzt und bei 4°C gelagert.

2.8.3 Reinigung monoklonaler Antikörper aus Ascitesflüssigkeit mittels Protein G-Säule

In Maus-Hybridomazellen erzeugte Ascitesflüssigkeiten der Klone 3A11C3, 2C4G11 und 3E7E9 wurden von Herrn Walschus (Fachhochschule Neubrandenburg, Abteilung Technologie) (Walschus *et al.*, 2002) zur Verfügung gestellt.

Die Gewinnung des mAKs erfolgte durch die Reinigung der Ascitesflüssigkeiten mittels einer 1-ml HiTrap-Protein-G-HP-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg). Vor der Reinigung wurden die Ascitesflüssigkeiten durch einen 0,45 µm Filter (Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert, um Schwebeteilchen und zelluläre Bestandteile in den Ascitesflüssigkeiten zu entfernen. Die Filtrate wurden mit Phosphatpuffer (20 mM Natriumphosphat, pH 7,0) verdünnt. Laut Anleitung wurde eine Spritze an die Säule angeschlossen und die zu reinigende Lösung per Hand durch die Säule gedrückt. Je langsamer die Fließgeschwindigkeit, desto besser kann sich das IgG an das Protein G binden. Danach wurde die Säule mit 5-10 ml Phosphatpuffer gewaschen. Mit 2-5 ml Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7) wurden die IgG von der Säule verdrängt und in 500-µl Fraktionen aufgefangen. Anschließend wurde jede Fraktion mit 1 M Tris-HCl (pH 9,0) neutralisiert. Um zu überprüfen, welche Fraktion den AK erhielt, wurde deren Proteingehalt mittels Bradford gemessen und in einem SDS-Gel getrennt. Die Peakfraktionen wurden vereinigt, mit 0,02% NaN₃ versetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Verschiedene Klone wurden nacheinander mit der gleichen Protein-G-Säule gereinigt. Die Säule wurde zwischen den einzelnen Reinigungen gründlich mit Ethanol (20%) gespült.

2.9 Entwicklung und Optimierung eines indirekten ELISA zur Quantifizierung von Cry1Ab-Toxin

2.9.1 Allgemeine Methodik

Der ELISA-Test basiert auf einer Reaktion von Antigen und AK zu einem stabilen Komplex an einer Festphase (Mikrotiterplatte) (Crowther, 2001). Beim indirekten ELISA wurde zunächst das Antigen an die Mikrotiterplatte gebunden. Danach wurde der anti-Cry1Ab-AK hinzugefügt. Anschließend wurde der Antigen-Antikörper-Komplex mit einem enzymmarkierten Anti-Huhn-Fab-Fragment, der spezifisch für den gebundenen AK ist, inkubiert. Die Detektion erfolgte über kovalent gebundene Meerrettich-Peroxidase als Enzym und Wasserstoffperoxid als Substrat. Die Enzymaktivität wurde photometrisch gemessen.

2.9.2 Durchführung des indirekten ELISA

Folgende Reagenzien und Pufferlösungen wurden verwendet:

Carbonat/Bicarbonat-Beschichtungspuffer (nach Clarck und Adams, 1977):

1,59 g Na₂CO₃
2,93 g NaHCO₃
0,02% (w/v) NaN₃
pH 9,6; auf 1 Liter H₂O bidest.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

8,0 g NaCl
0,2 g KH₂PO₄
1,15 g Na₂HPO₄
0,2 g KCl
0,02% (w/v) NaN₃
pH 7,4; auf 1 Liter H₂O bidest.

Waschpuffer (PBST), pH 7,4:

PBS + 0,05% (v/v) Tween 20

Probenextraktionspuffer, pH 7,4:

PBST + 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP) + 0,02 M Na₂SO₃

Blockingpuffer:

PBST + 0,2% (w/v) Rinderserumalbumin (RSA)

Konjugatpuffer:

3,8 g Na_3PO_4

14,6 g NaCl

In 900 ml H_2O ; pH 7,6 einstellen und auf 1 l auffüllen

Zitrat/Phosphat-Puffer:

48,5 ml der 0,1 M Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)

51,5 ml der 0,2 M Na_2HPO_4

pH 5,0

OPD-Substratpuffer (o-Phenylendiamin):

0,4 mg o-Phenylendiaminhydrochlorid

0,4 μl H_2O_2 / ml Zitrat-Phosphatpuffer pH 5,0

Das Substrat sollte erst ca. 10 min vor Gebrauch angesetzt werden.

Wasserstoffperoxid wird unmittelbar vor der Anwendung zugesetzt.

Die Durchführung des indirekten ELISA-Tests erfolgte in Mikroplatten-96-F (Diagonal).

Folgende Inkubationsschritte wurden angewendet:

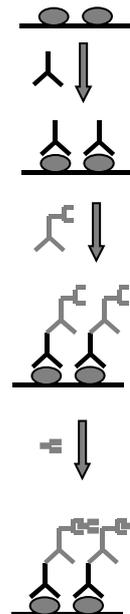
1. Beschichtung der Mikrotiterplatten mit 50 μl **Antigen** (Proben) in Beschichtungspuffer, über Nacht, 4°C

2. Inkubation mit 50 μl **Antikörper**, für 2h, 37°C (Antikörper wurde in Blockingspuffer verdünnt)

3. Inkubation mit 50 μl **Antikörper-Konjugat**, für 2h, 37°C (Antikörper-Konjugat wurde in Konjugatpuffer + 0,2% RSA verdünnt)

4. Zugabe von 50 μl **OPD-Substratpuffer**, 20 min, Raumtemperatur

5. Absorbionsmessung bei 450 nm, 20 min nach der Substratzugabe oder bei 490 nm nach der Stopp-Reaktion innerhalb von 40 min (**Stopp-Reaktion** durch Zusatz von 50 μl 1,25 M H_2SO_4)



Nach jedem der ersten drei Schritte wurden die ungebundenen Reaktionsansätze durch dreimaliges Waschen mit PBST (je 3 min) entfernt.

2.9.3 Optimierung eines indirekten ELISA

Die Spezifität des polyklonalen anti-Cry1Ab-AKs wurde mittels indirektem ELISA überprüft. Bevor der ELISA routinemäßig zum Einsatz kam, wurde der Testablauf optimiert. Die Optimierung des indirekten-ELISA erfolgte in drei Schritten:

1. Ermittlung der optimalen Antigen-Konzentration

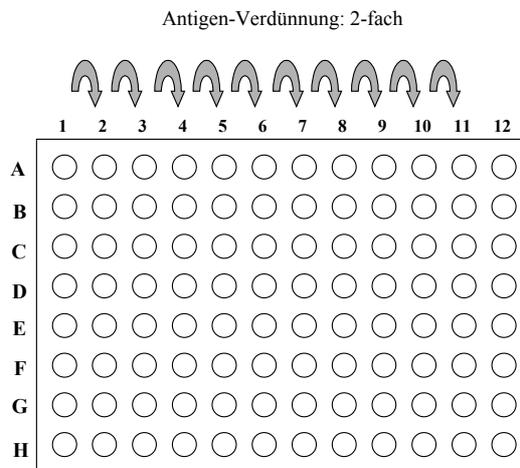


Abb. 3: Verdünnung des Antigens in der Platte von Reihe 1 bis 11. Reihe 12 wurde nur mit Puffer versetzt.

2. Ermittlung der optimalen AK-Konzentration

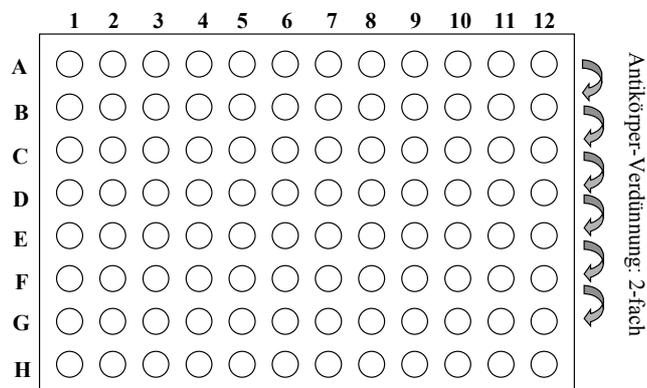


Abb. 4: Verdünnung des AKs von Reihe A - G, Reihe H wurde nur mit Puffer versetzt.

3. Ermittlung der optimalen AK-Konjugat-Konzentration.

2.10 Western-Blot

2.10.1 Semi-dry-Blotting

Um einen Western-Blot vorzubereiten, wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran (HybondTM-P Transfermembran, Fa. Amersham Pharmacia) übertragen. Das Elektroblothing erfolgte nach dem "semi-dry"-Verfahren mit dem Tranfer-Cell Gerät der Firma Bio-Rad.

Blottingpuffer:

39 mM Glycin

48 mM Tris

0,0375% (w/v) SDS

20% Methanol

Beim "semi-dry"-Blotting wurden die Filterpapiere (Whatmann Papier, Bio-Rad) und die PVDF-Membran genau auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Die Filterpapiere wurden in Blottingpuffer getränkt und auf die Graphitplatten-Elektrode gelegt.

Die Membran wurde zunächst für 1 min in Methanol gespült, in Blottingpuffer für 15 min equilibriert, dann wurde die Membran auf das Filterpapier gelegt. Nach 5 min Inkubation in Blottingpuffer wurde das Gel vorsichtig auf die Membran gelegt. Auf das Gel kam eine weitere Lage mit Blottingpuffer getränktes Filterpapier. Luftblasen wurden vorsichtig durch Rollen einer Pasteurpipette über das Filterpapier entfernt. Schließlich wurde das Tranfer-Cell-Gerät mit der oberen Graphitplatte (Anode) verschlossen. Der Blot erfolgte bei konstanter Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ (20 V) für 60 min mit dem Labornetzgerät Bio-Rad Powerpac-200.

2.10.2 Immuno-Detektion

Mittels Immunodetektion wurden Proteine, die mit den spezifischen AK reagierten, auf der immobilisierenden Membran detektiert.

PBST :

- 80 mM Na₂HPO₄
- 20 mM NaH₂PO₄ × 2 H₂O
- 100 mM NaCl
- 0,1% Tween-20

Durchführung des Immunodetektion:

1. Blocking:

Um unspezifische Reaktionen der AK mit der Membranoberfläche zu vermeiden, wurde die geblottete Membran in Blockingpuffer (PBST-Puffer + 5% Magermilch) über Nacht bei 4°C inkubiert.

2. Waschen:

Danach wurde die Membran dreimal mit PBST-Puffer 5 min unter leichtem Schütteln gewaschen.

3. Inkubation mit primärem AK:

Die primären AK wurden in PBST-Puffer + 5% Magermilch bis zu 1/6000 verdünnt. Die Membran wurde in der AK-Lösung für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert und dabei leicht geschwenkt.

4. Waschen:

Die überschüssigen und nicht spezifisch gebundenen AK wurden durch dreimaliges Waschen (je 5 min) mit PBST-Puffer entfernt.

5. Inkubation mit sekundärem AK:

Meerrettich-Peroxidase-Konjugierte AffiniPure Donkey Anti-Chicken IgY++ (Jackson ImmunoResearch) wurden in PBST-Puffer + 5% Magermilch bis zu 1/5000 verdünnt und mit der PVDF-Membran für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert.

6. Waschen:

Die Membran wurde 1 × 15 min, dann 4 × 5 min mit PBST-Puffer gewaschen.

7. Immuno-Detektion:

Für die Immuno-Detektion des immobilisierten Antigens wurde der ECL Western-Blotting Kit (Amersham Pharmacia) verwendet, der auf einer lichtemittierenden

sehr empfindlichen Chemolumineszenz beruht. Die Detektionslösungen 1 und 2 des Kits wurden zusammengemischt (1/1, v/v) und auf die Blotting-Membran pipettiert. Der Blot wurde für 1 min in der Luminollösung inkubiert, mit Frischhaltefolie abgedeckt und in der Röntgenfilmkassette mit einem Autoradiographiefilm (Kodak[®] Bio Max Light Film, Kodak) bis zu 1 min belassen. Der erste Film wurde sofort entwickelt. Auf Basis der Signalstärke wurde der zweite Film bis zu 30 min exponiert.

2.10.3 Rehybridisierung

Um eine Membran, mit der bereits ein Western-Blot durchgeführt worden ist, erneut mit einem AK zu inkubieren, wurde der gebundene AK von der Membran entfernt. Das „Stripping“ und die Rehybridisierung wurden folgendermaßen durchgeführt:

Strippingpuffer:

100 mM β -Mercaptoethanol

2% SDS

62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7

Die Membran wurde in Strippingpuffer getaucht und für 30 min bei leichtem Schütteln bei 50°C inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen der Membran mit PBST-Puffer für jeweils 10 min bei Raumtemperatur. Die gestrippte Membran wurde dann in Blocking-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Weitere Immuno-Detektionen wurde wie in Kap. 2.10.2 beschrieben durchgeführt.

2.11 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Um das Cry1Ab-Toxin aus frischen und getrockneten transgenen Maisproben mittels Western-Blot nachzuweisen, wurden verschiedene Extraktionspuffer (HEPES, PBS, Extraktionspuffer des QuantiplateTM-Kits) und -methoden (Aceton-Fällung, Amoniumsulfat-Fällung) verwendet.

Der HEPES-Extraktionspuffer bestand aus 50 mM HEPES, 2 mM Na-Sulfit, 1% SDS, 2,5 mM PMSF, eingestellt auf pH 7,0.

Durchführung:

1 g **frisches Blattmaterial** wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Zum Blattpulver wurden 2 ml Extraktionspuffer (HEPES bzw. PBS) gegeben. Die Suspension wurde für 30 sec gevortext und bei 4°C für 10 min bei 20.800×g (Eppendorf Centrifuge 5417C) zentrifugiert. Wurde die **Aceton-Fällungs-Methode** durchgeführt, dann wurde der Überstand mit der doppelten Menge eiskaltem Aceton (+ 0,07% β-Mercaptoethanol) versetzt. Nach der Proteinfällung bei -20°C für 1 h wurde die Extraktion bei 4°C für 20 min bei 20.800×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl Aceton (+ 0,07% β-Mercaptoethanol) gewaschen und auf Eis gestellt bis das Pellet trocken war.

Bei der Ammoniumsulfat-Fällungs-Methode wurde zu 1 ml Überstand (s.o.) unter ständigem Vortexen tropfenweise 500 µl gesättigte Ammoniumsulfatlösung hinzugegeben, bis eine Endkonzentration von 33% erreicht war. Der Ansatz wurde für 30 bis 60 min auf Eis inkubiert, zwischendurch gevortext und bei 20.800×g abzentrifugiert.

Anschließend wurde das Pellet mit 100 µl SDS-4×Ladepuffer und 40 µl β-Mercaptoethanol versetzt und für 30 min bei 100°C gelöst.

Um Proteine aus **getrocknetem Pflanzenmaterial** (Blatt bzw. Wurzel) zu extrahieren, wurde 1 g Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff zermörsert und in 2 ml Extraktionspuffer des Quantiplate™-Kits über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation (20.800×g, 10 min, bei 4°C) wurde 30 µl Überstand mit 10 µl 4xSDS-Ladepuffer und 4 µl β-Mercaptoethanol für 10 min gekocht.

Die Proteinextrakte wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und für Western-Blots verwendet.

2.12 Nachweis der biologischen Aktivität des Cry1Ab-Protoxins und -Toxins

Zur Überprüfung der Toxizität der produzierten Cry1Ab-Toxine wurden Biotests mit Larven des Maiszünsler (*O. nubilalis*) durchgeführt. Die Wirkung des in *E. coli* produzierten Cry1Ab-Toxins wurde mit jener des Cry1Ab-Toxins aus getrockneten transgenen Maispflanzen verglichen.

2.12.1 Insekten

Maiszünlereier wurden vom Laborstamm des Instituts für biologischen Pflanzenschutz der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Darmstadt (BBA-Darmstadt) zur Verfügung gestellt. Die Eigelege waren auf Filterpapier abgelegt und wurden in Petrischalen aufbewahrt. Die Petrischalen waren mit angefeuchtetem Handtuchpapier verschlossen und per Post an das DLR-Rheinpfalz in Neustadt geschickt worden. Um eine Pilzinfektion in den Petrischalen zu verhindern, wurde das angefeuchtete Handtuchpapier entfernt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen, in eine Plastiktüte mit angefeuchtetem Handtuchpapier gelegt und in einem Brutschrank bei 22°C inkubiert. Nach ca. fünf Tagen schlüpfen die Larven. Die Larven wurden innerhalb von 24 h nach dem Schlüpfen für die Biotests eingesetzt.

2.12.2 Biotest mit oberflächlich appliziertem Cry1Ab

Biotests zur Bestimmung der mittleren Letalkonzentration (LC_{50}) wurden in Rasterplatten mit 128 Zellen (Bio-ba-128, Color-Dec, Italy) entsprechend der Methode von Meise (2003) durchgeführt. Die Zusammenstellung des Nährmediums ist im Kapitel 2.2 beschrieben. Die einzelnen Rasterzellen wurden jeweils mit 1 ml des Nährmediums befüllt. Die Rasterzellen haben einen Durchmesser von $1,50 \pm 0,03$ cm und eine Fläche von $1,77 \pm 0,08$ cm². In einer Rasterplatte wurden sechs verschiedene Konzentrationen des Cry1Ab-Toxins getestet. Aliquotiertes Cry1Ab-Protoxin bzw. aktives Cry1Ab-Toxin wurden nach der Herstellung für 3 bzw. 4 Monate bei -20°C gelagert, bevor sie für die Biotests verwendet wurden. Nach einem einmaligen Auftauen wurden sie bei 4°C bis zum Ende der Biotest gelagert. Um den Abbau des Proteins auszuschließen, wurden die Verdünnungsreihen des Protoxins bzw. Cry1Ab-Toxins direkt vor Versuchsbeginn aus der Stammlösung mit 0,5 mM CAPS-Puffer (pH 10,5) angesetzt.

Jeweils 100 µl der Toxinverdünnungsstufen wurden auf die Oberfläche des Nährmediums einer Zelle pipettiert. Als Kontroll-Lösung diente 0,5 mM CAPS-Puffer, pH 10,5. Die Rasterschalen wurden geschwenkt, bis die Toxine gleichmäßig über die gesamte Oberfläche der Zellen verteilt waren. Anschließend wurden sie zum Antrocknen unter einen Abzug gestellt.

Nach dem Antrocknen der Oberfläche wurden die frisch geschlüpften Larven auf die Rasterzellen verteilt. Je Rasterzelle wurde eine Larve gesetzt, insgesamt 16 Larven je

Konzentration pro Raster. Als Kontrolle wurden bis zu 32 Larven pro Rasterplatte angesetzt. Die Rasterplatten wurden im Klimaschrank bei 22°C bei Dunkelheit inkubiert. Nach 7 Tagen wurde die Anzahl der toten Larven bestimmt. Diejenigen Larven, die nach Berührung mit einer Nadel keine Reaktion mehr zeigten, wurden als tote Larven gezählt. Je Konzentrationsstufe wurden 112 bis 128 Larven im Biotest eingesetzt. Die mittlere Letalkonzentration wurde mittels der Probit-Analyse (SAS Institut Inc., Cary; NC, USA, 2001) berechnet.

2.12.3 Biotest mit transgenem Maispulver

In diesem Biotest wurde statt Cry1Ab-Toxin aus *E. coli* getrocknetes transgenes Maispulver im Nährmedium eingesetzt. Zuerst wurden die getrockneten Maisblätter der isogenen bzw. transgenen Maislinie Mon810 mit Hilfe einer elektrische Mühle (Retsch, SM 2000) mit einem 2-mm Messer zerkleinert. Das Pulver erhielt man durch Sieben (1 mm Maschenweite) der gemahlene Maisblätter. Der Cry1Ab-Gehalt des Maispulvers wurde mittels DAS-ELISA bestimmt (Kap. 2.13.6).

Die Zusammensetzung des Nährmediums (Kap. 2.2) wurde für diesen Biotest modifiziert: Statt Maisgrieß wurde eine entsprechende Menge Maispulver von isogenem bzw. transgenem Mais verwendet. Die Menge an Wasser und Agar wurde modifiziert (Erhöhung des Wasseranteils um 20%, Erniedrigung des Agar-Anteils um 40% im Vergleich zum Nährmedium für Insekten, siehe Kap. 2.2), um die Feuchtigkeit des Mediums dem Originalmedium anzugleichen. Andere Bestandteile wurden nicht verändert. Um eine Denaturierung des Cry1Ab-Toxins im Maispulver zu vermeiden, wurde die Zugabe des Maispulvers sowie der Vitamine und Ascorbinsäure zu den anderen Bestandteilen des Mediums bei einer Temperatur unter 50°C durchgeführt. Das Medium wurde mindestens einen Tag vor den Versuchen hergestellt und nach dem Trocknen bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Frisch geschlüpfte L1-Larven wurden auf dem Biotest-Raster angesetzt. Die Biotests wurden im Klimaschrank bei 22°C bei Dunkelheit inkubiert. Die Mortalität wurde nach sieben Tagen bestimmt. Das Gewicht der einzelnen überlebenden Larven wurde ebenfalls nach sieben Tagen bestimmt und zum Gewicht der Kontrolllarven ins Verhältnis gesetzt.

2.13 Expressionsmonitoring von transgenem Mais (Bt176 und Mon810)

2.13.1 Pflanzensorten

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei transgene Mais-Linien Mon810 (Sorte Novelis) und Bt176 (Sorte Valmont) der Firmen Monsanto und Sygenta betrachtet. Als Kontrollpflanzen dienten die jeweils isogenen konventionellen Sorten Nobilis und Prelude (Tab. 2).

Tab.2: Gentechnisch veränderte Bt-Maissorten und ihre isogene Linien

Standort	Konventionell (Bt-)	Transgen (Bt+)
Halle, Bonn	Nobilis	Novelis (Mon810)
Halle	Prelude	Valmont (Bt176)

2.13.2 Versuchsanlage

In den Jahren 2001 bis 2003 wurde im Rahmen des Verbundprojektes „Sicherheitsforschung und Monitoring zum Anbau von Bt-Mais“ zwei Versuchsfelder bei Bonn und Halle angelegt. Die Versuchsfelder bestanden aus Parzellenanlagen mit jeweils sechs bzw. acht Wiederholungen. Jede Parzelle bestand aus 72 Reihen, der Abstand zwischen zwei Reihen war 75 cm und der Abstand zwischen den Maispflanzen in den Reihen 17 cm. Dabei wurden pro Parzelle jeweils Maissorten mit konventionellem (isogener Mais), gentechnisch verändertem insekten-resistenten (transgener Mais) sowie konventionellem Mais mit einer Insektizidbehandlung angebaut. Außer der Insektizidbehandlung im Versuchsglied 3 waren Anbau, Düngung und Ernte betriebsüblich und für alle Versuchsglieder gleich.

Versuchsanlage bei Halle

Das Versuchsfeld lag etwa 25-30 km nördlich von Halle und bestand aus insgesamt 48 Parzellen. Jede Parzelle hatte eine Größe von $67,5 \times 54$ m. Insgesamt wurden sieben verschiedene Maissorten angebaut. Weitere Einzelheiten des Versuchsplans sind in der Abb. 5 dargestellt.

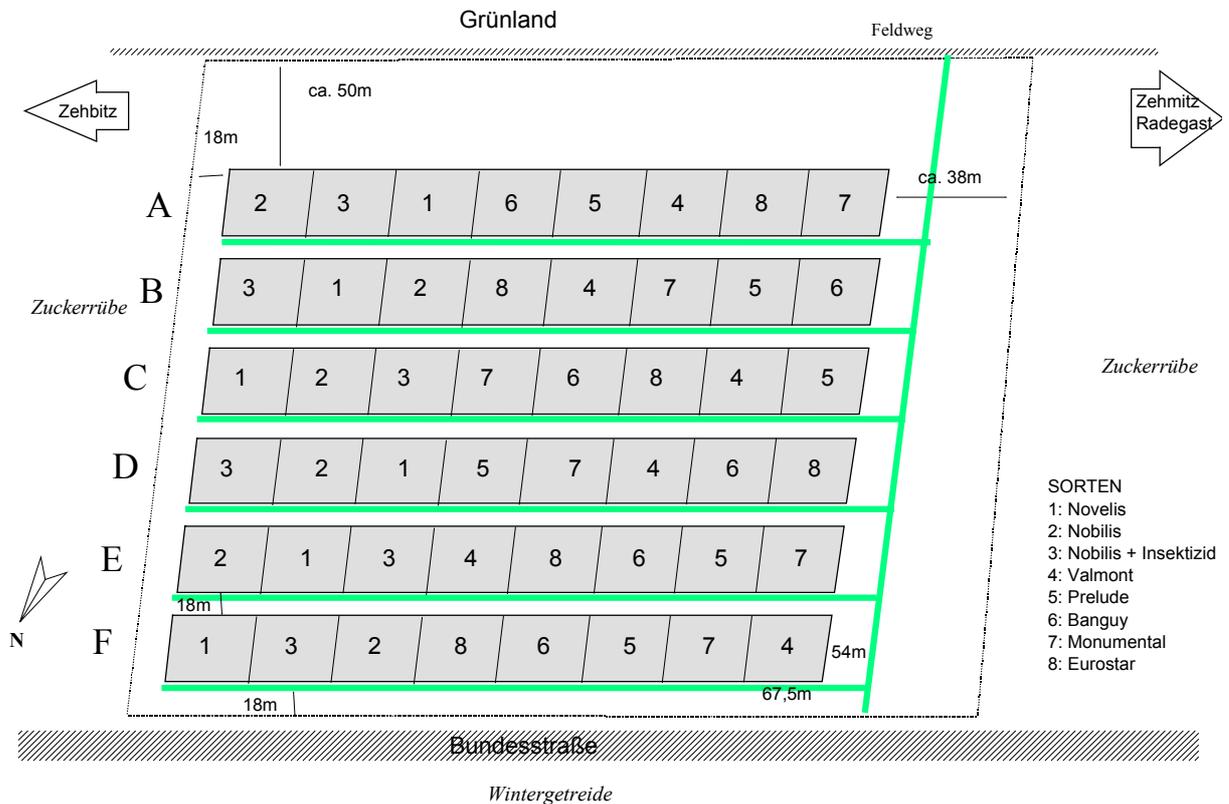


Abb. 5: Versuchsanlage bei Halle (nach Versuchs- und Auswertungsplan des BMBF-Verbundprojektes „Sicherheitsforschung und Monitoring zum Anbau von Bt-Mais“ (A-F: Bezeichnung der 6 Blöcke; 1-8: Bezeichnung der Sorte)).

Versuchsanlage bei Bonn

In der Nähe von Rheinbach bei Bonn wurden zwei Versuchsfelder angelegt. Die größere Anlage hatte 15 Parzellen (Schlag West) und die kleinere Anlage umfasste 9 Parzellen (Schlag Ost). Jede Parzelle hatte eine Größe von 54×45 m. In den Jahren 2001 bis 2003 wurden die Maislinie Mon810 (Novelis) und die isogene Sorte (Nobilis) angebaut. Weitere Einzelheiten der Versuchsfelder sind Abb. 6 zu entnehmen.

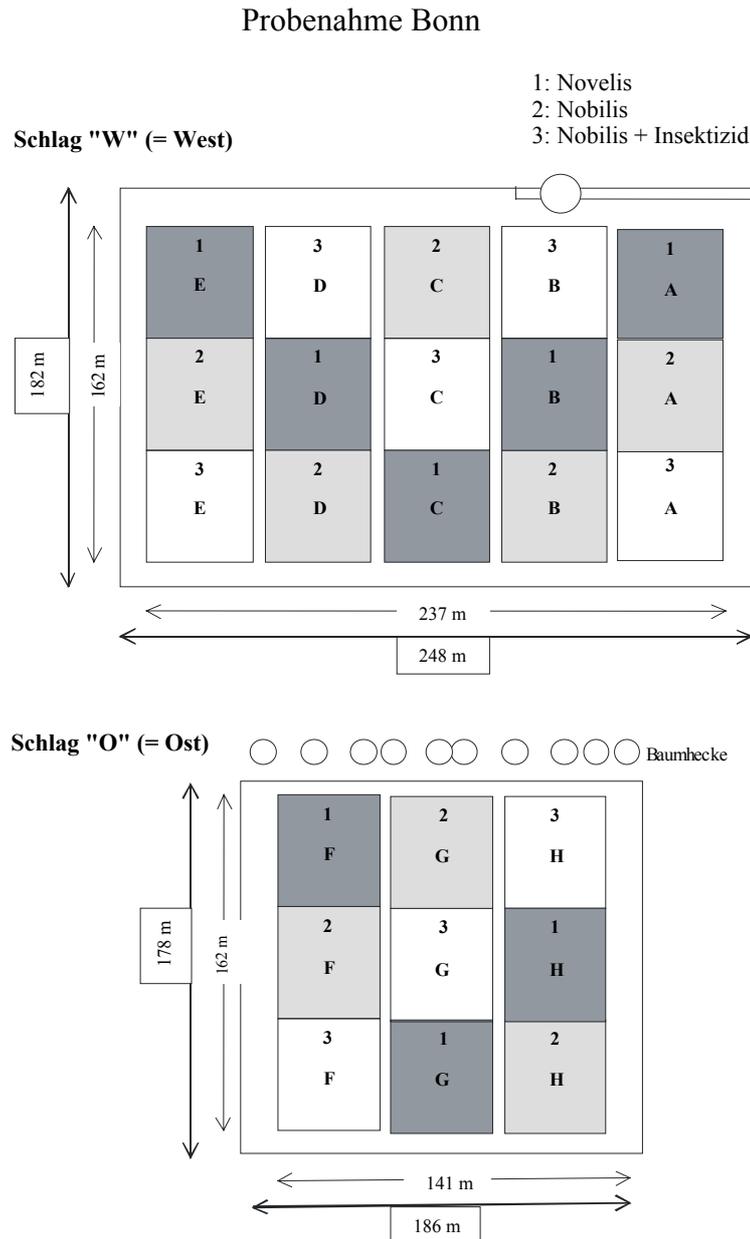
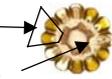


Abb. 6: Versuchsanlage bei Bonn (nach Versuchs- und Auswertungsplan des Verbundprojectes „Sicherheitsforschung und Monitoring zum Anbau von Bt-Mais“ (A-H: Bezeichnung der 8 Blöcke; 1-3: Bezeichnung der Sorte)).

2.13.3 Probennahme

Pflanzenproben wurden in jeder Anbausaison zu vier Terminen (EC20: Blatt- bzw. Sprossausbildung, EC30: Längenwachstum, EC60: Blüte des männlichen Blütenstandes, EC80: Reife) genommen. Je Parzelle und Entwicklungsstadium wurden zwei transgene Pflanzen (2001, 2002) bzw. eine Pflanze (2003) beprobt. Die isogenen Kontrollen wurden jeweils nur von einer Parzelle entnommen. Pflanzen der Entwicklungsstadien EC20 und EC30 wurden als Ganzpflanzenproben mit Papier umwickelt ins Labor transportiert und dort in Gewebeproben: Wurzel, Stängel, oberes Blatt, unteres Blatt geteilt. Pflanzen in den Entwicklungsstadien EC60 und EC80 wurden bereits auf dem Feld in entsprechende Gewebe aufgeteilt (Tab. 3). Zusätzlich wurden in den Jahren 2002 und 2003 noch Pollenproben und Wurzelreste des vergangenen Jahres genommen. Die Pollenproben wurden im Jahr 2002 von Mitarbeitern der Universität Göttingen und Mitarbeitern der BBA-Darmstadt zur Verfügung gestellt. Im Jahr 2003 wurde sie aus verschiedenen Pflanzen einer Maissorte in einer Parzelle gesammelt. Der Termin der Probenahmen in den drei Jahren und die Gewebeproben wurden in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Termin der Probenahme und Gewebeproben in den Versuchsjahren 2001 bis 2003.

Termin der Probenahme	2001	28. Juni ^b	28. Juni	01. August	11. September
Standort Halle	2002	03. Juni	17. Juni	15. Juli	03. September
	2003	02. Juni	18. Juni	15. Juli	18. August
Termin der Probenahme	2001	03. Juli ^b	03. Juli	25. Juli	10. September
Standort Bonn	2002	03. Juni	17. Juni	30. Juli	10. September
	2003	02. Juni	18. Juni	21. Juli	19. August
Gewebeproben		EC 20	EC 30	EC 60	EC 80
Kolben Kolbenmark ^a					×
Antheren Pollen				×	
oberes Blatt (zweit oberstes Blatt)		×	×	×	×
unteres Blatt (zweit unterstes Blatt)			×	×	×
Stängel (1/3 von unten nach oben)		×	×	×	×
Wurzel		×	×	×	×

^a) Kolbenmark wurden nur im Jahr 2003 beprobt. ^b) Beprobung erfolgte zusammen mit EC30

2.13.4 Probenaufbereitung im Labor

Die Probenaufbereitung erfolgte zuerst bei den isogenen Pflanzenproben, um eine mögliche Kontamination mit Bt-Toxin aus den transgenen Maispflanzen auszuschließen. Von den Wurzelproben wurde zuerst die Erde abgeschüttelt, danach wurden sie unter fließendem Wasser gewaschen und zwischen Papiertüchern abgetrocknet.

Die Proben von Wurzeln, Stängel, oberem Blatt, unterem Blatt, Antheren und Körnern wurden mit Hilfe einer Gartenschere präpariert (siehe Zeichnung in Tab. 3). Von jedem Pflanzengewebe wurde eine Doppelprobe hergestellt. Für den ELISA-Test wurden Einzelproben von ca. 100 mg Frischgewicht abgewogen, in Homogenisationsbeutel (Bioreba) eingepackt und bis zur Durchführung des Tests bei -80°C gelagert. Für die Trockengewichtsbestimmung wurde ca. 1 g frisches Pflanzenmaterial gewogen und getrennt in Papiertüten eingepackt. Pollenproben wurde in Eppendorfreaktionsgefäße eingewogen und bei -80°C gelagert.

2.13.5 Trockengewichtsbestimmung

Das Trockengewicht (TG) der Papiertüten wurde vor den Probennahmen bestimmt. Frisches Pflanzenmaterial wurde in Papiertüten gegeben und im Brutschrank bei 100°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Pflanzentrockengewicht (PTG) in Prozent nach dem Pflanzenfrischgewicht (PFG) wurde nach folgender Gleichung errechnet:

$$\text{PTG} = \frac{(\text{TG von Tüte und Pflanzenmaterial} - \text{TG von Tüte}) \times 100\%}{\text{PFG}}$$

2.13.6 Bestimmung des Cry1Ab-Gehaltes in transgenen Maisproben mittels DAS-ELISA

Für die Messung wurde entweder frisches oder tiefgefrorenes Pflanzenmaterial verwendet. Zu den Einzelproben wurden 2,5 ml Extraktionspuffer vom Quantiplate™-Kit pipettiert. Das Pflanzenmaterial wurde unter Verwendung eines Handrollers (Bioreba) im Homogenisationsbeutel homogenisiert. Nach dem Homogenisieren wurde der Pflanzenextrakt in 1,5-ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und weiter verdünnt. Der Beutel wurde nach der Verwendung verschlossen und entsorgt.

Für die Extraktion der Maiskörner wurde die 1×“Grain Extraction Solution“ (Quantiplate™-Kit) verwendet. Die Körner wurden zuerst mit einem Hammer zerquetscht. Dann wurden 100 mg der Körner in 2-ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und mit 1 ml Extraktionspuffer versetzt. Die Proben wurden bei 4°C für mindestens 4 h bei 100 rpm geschüttelt. Die Pollenproben wurden mit Hilfe eines Mikropistilles zerquetscht und im Extraktionspuffer über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln (100 rpm) inkubiert.

Die Pflanzenextrakte wurden bei 2700×g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden für den ELISA-Test eingesetzt, die Pellets verworfen.

Zum quantitativen Nachweis des Cry1Ab-Toxins in transgenem Maisgewebe wurde ein Double-Sandwich-ELISA-Quantiplate™ Kit für Cry1Ab/Cry1Ac (Fa. EnviroLogix) verwendet. Die Pflanzenextrakte wurden mit dem Extraktionspuffer verdünnt. Das Verhältnis des Probenfrischgewichts (g) zu Puffer (ml) variierte von etwa 1/5 bis zu 1/5000. Die optimale Probenverdünnung hing vom Pflanzengewebe und von der Pflanzensorte ab. Von den verdünnten Pflanzenextrakten wurden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 100 µl pipettiert. Als Kontrollen dienten sowohl die negative Probe des Kits, als auch Extrakte isogener Mais-Linien. Jeder Test wurde in 2-facher Wiederholung durchgeführt. Die Platten wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, während der sich das Cry1Ab-Toxin der Pflanzenextrakte mit den AK zu einem Antikörper-Antigen-Komplex verbinden konnte. Anschließend wurde ungebundenes Antigen durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Dann wurde Meerrettich-Peroxidase-Konjugierter-Cry1Ab-AK zugegeben (100 µl pro Vertiefung) und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde Substrat hinzugefügt. Die Inkubationszeit für das Substrat betrug 30 min. Danach wurde die Farbreaktion durch Zusatz der Stopp-Lösung gestoppt. Die photometrische Messung erfolgte innerhalb von 10 min mit einem Mikrotiterplatten-Reader Model 550 (Bio-Rad) bei 450 nm.

2.14 Statistische Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Statistikprogrammpaket SAS 8.2, (SAS Institut Inc., Cary; NC, USA) verwendet.

Die Berechnung der mittleren Letalkonzentrationen (LC₅₀) erfolgte mit der Prozedur PROBIT. Einen signifikanten Unterschied in der Aktivität der verschiedenen Toxinchargen

wurde durch Vergleich der jeweiligen 95%-Konfidenzintervalle geprüft (Robertson & Preisler, 1992).

Die Daten des Cry1Ab-Expressionsmonitoring in den transgenen Maispflanzen in den verschiedenen Entwicklungsstadien und in den drei aufeinander folgenden Versuchsjahren 2001 bis 2003 wurden mittels Varianzanalyse verglichen. Benutzt wurde die Prozedur GLM (Generalized Linear Model) mit dem paarweisen Mittelwertvergleich nach Scheffe (da die Anzahl der Wiederholungen nicht überall gleich war).

Um eine vertikale Korrelation der Cry1Ab-Expression zwischen verschiedenen Pflanzenteilen von Pflanze zu Pflanze zu ermitteln, wurde die Prozedur CORR mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson benutzt.

Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen der Daten aus den Analysen transgener Maispflanzen wurden mit dem Programm Excel verrechnet.

3 ERGEBNISSE

A. Produktion und Qualitätskontrolle von standardisiertem Cry1Ab-Toxins in *E. coli*

Der erste Schwerpunkt der Arbeit umfasste die Produktion von Cry1Ab in *E. coli*. Dabei wurden die Produktionsverfahrensschritte der Toxine optimiert und deren biochemische sowie biologische Qualität überprüft. Dies war nötig, damit ein standardisiertes Cry1Ab-Protoxin und Cry1Ab-Toxin den Partnern des Verbundprojektes "Sicherheitsforschung und Monitoringmethoden zum Anbau von Bt-Mais" zur Verfügung gestellt werden konnte. Zusätzlich erfolgte die Etablierung eines quantitativen Nachweises des Cry1Ab-Toxins.

3.1 Expression von Cry1Ab

3.1.1 Time-Course-Experiment

Die Expression von Cry1Ab erfolgte mit einem transformierten *E. coli*-Stamm HB101/pMP (Masson *et al.*, 1989). Dieser Stamm exprimiert das vollständige Cry1Ab-Protoxin mit 1155 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ~130 kDa. Bevor die Produktion des Cry1Ab-Prototoxins in einem größeren Maßstab erfolgen konnte, wurde untersucht, zu welcher Zeit nach der Inkubation HB101/pMP die höchste Toxinmenge exprimiert. Durch Phasenkontrast-Mikroskopie konnte zwei Tage nach Kulturbeginn die Bildung von Proteineinschlusskörpern (Inklusion Bodies, IBs) beobachtet werden. Die IBs waren ab dem dritten Tag deutlich größer als vorher. Die Expression des Cry1Ab-Prototoxins in den ersten fünf Tagen nach Kulturbeginn wurde in einem 7%-igen SDS-PAGE analysiert (Abb. 7). Dabei konnte schon einen Tag nach Kulturbeginn eine deutliche Expression beobachtet werden. Die stärkste Expression des Cry1Ab-Prototoxins war am dritten Tag, in der stationären Phase, zu sehen. Die Prototoxin-Banden am vierten und fünften Tag waren etwas schwächer als am dritten Tag. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden in den folgenden Versuchen HB101/pMP-Zellen drei Tage lang kultiviert, bevor sie für die Produktion des Cry1Ab-Prototoxins geerntet wurden.

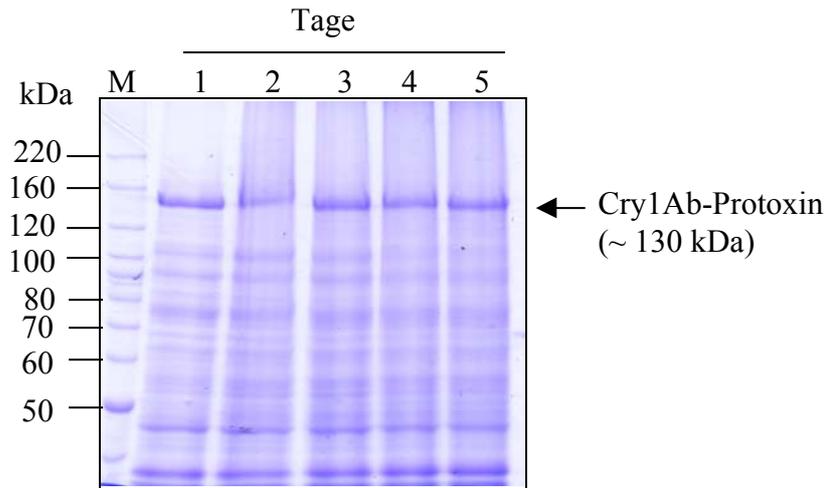


Abb. 7: Analyse der Expression des Cry1Ab-Protoxins im *E. coli*-Stamm HB101/pMP ein bis fünf Tage nach Kulturbeginn in einem 7%-igen SDS-PAGE. (M: BenchMark Protein Marker, MG in kDa; Probenvorbereitung: Kap. 2.3.4.; aufgetragene Proben: 10 μ l/Spur).

3.1.2 Produktion und Reinigung des Cry1Ab-Protoxins

Zur Isolierung von Cry1Ab aus HB101/pMP wurden die Zellen lysiert und die Protein-IBs gereinigt. Abbildung 8 zeigt die Reinigungsschritte des Cry1Ab-Protoxins, welches in den HB101 Zellen exprimiert wurde. Das rekombinante Protein (~130 kDa), welches in den IBs angereichert ist, wurde durch mehrere Waschschrte von einem großen Teil der Lipide und anderen Proteinen der Zelllysate gereinigt.

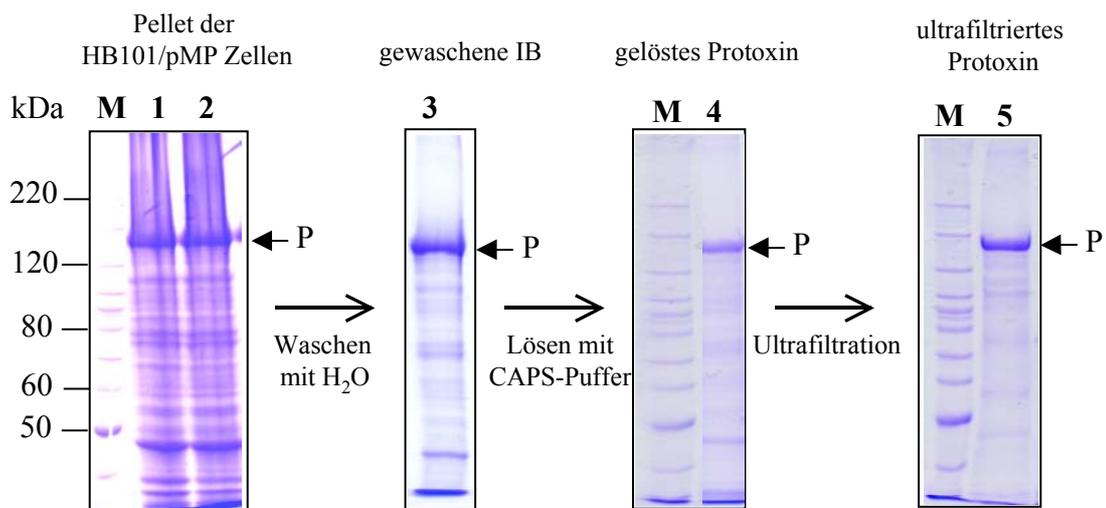


Abb. 8: Aufreinigungsschritte des Cry1Ab-Protoxins (Charge J4), (M: BenchMark Protein Marker, MG in kDa an der linken Seite. Aufgetragene Proben: 10 μ l/Spur; 7%-iges SDS-PAGE).

Ein großes Volumen von CAPS-Puffer, pH 10,5 (im Verhältnis ca. 4 ml Puffer/1 g frische *E. coli*) wurde verwendet, um die Protein-IBs zu lösen, was in einer Endkonzentration des rekombinanten Proteins von 1-2 mg/ml CAPS resultierte, so dass die Bande des Cry1Ab-Protoxins in Spur 4 schwächer ist als in Spur 3 (Abb. 8). Durch eine kontinuierliche Dialyse in der Ultrafiltrationszelle wurden Proteine mit einer Größe unter 100 kDa herausfiltriert, wodurch das Toxin wiederum konzentrierter war als vor der Ultrafiltration. Jedoch verblieben in dieser Protoxinlösung noch einige niedermolekulare Bestandteile (kleinere Banden in Spur 5, Abb. 8).

Nachdem bei verschiedenen Produktionschargen des Cry1Ab-Protoxins in HB101/pMP stark schwankende Expressionen (zwischen 1,4-7,3 mg Toxin pro Gramm frische *E. coli*-Zellen) beobachtet wurde, wurde ein weiterer *E. coli*-Expressionsstamm XL1-Blue/pBD140 getestet. Dieser exprimiert ebenfalls das vollständige Cry1Ab-Protoxin. XL1-Blue/pBD140 wurde in TB-Medium mit Ampicillin bei 28°C inkubiert. Die Reinigung der IBs und deren Solubilisierung erfolgte wie bei HB101/pMP. Die Expressionsrate von XL1-Blue/pBD140 war zwei- bis dreimal höher als bei HB101/pMP. Die Reinigung erfolgte wie für die in Abb. 8 dargestellte Charge (J4) (Ergebnisse nicht dargestellt).

In Tab. 4 sind die Mengen an Cry1Ab-Protoxin und -Toxin der verschiedenen Produktionschargen und deren Eigenschaften zusammengefasst. Die Chargen **J1** (Cry1Ab-Toxin, MG=65 kDa) und **J2** (Cry1Ab-Protoxin, MG=130kDa) wurden aus HB101/pMP im Jahr 2001 von M. Berlinghof (damals SLFA-Neustadt) hergestellt und werden in der Tab. 4 nicht aufgeführt.

Tab. 4: Produktion des Cry1Ab-Protoxins und -Toxins verschiedener Chargen (2001/2003)

Interne-Nummer	J3	J4	J5	J6A	J6B*
Herstellungsdatum	Oktober 01	März 03	Juli 03	Oktober 03	Oktober 03
<i>E. coli</i> -Stamm/	HB101/	HB101/	XL1-Blue/	XL1-Blue/	XL1-Blue/
Plasmid	pMP	pMP	pBD140	pBD140	pBD140
Volumen der Kultur [l]	6	12	6	3	0,5
Toxinmenge [mg]	264	104	1440	506	18
Toxinform	Toxin	Toxin	Protoxin	Protoxin	Toxin
Toxingröße [kDa]	65	60	130	130	60
Konzentration [mg/ml]	12	1,8	1,5	2,3	1,3
Reinheit [%]	90	86	82	82	80
Ultrafiltration	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein
Lagerung [°C]	-20 bzw. +4	-20	-20 bzw. +4	-20 bzw. +4	-20 bzw. +4

*) Durch Trypsinisierung von 70 mg Protoxin von Charge J6A. Bei der Lagerung bei 4°C wurde ein weiterer Abbau des Toxins der Charge J6B von 60 bis ca. 59 kDa während der Durchführung der Biotests beobachtet.

3.1.3 Herstellung von aktivem Cry1Ab-Toxin mittels Trypsin-Behandlung

Im Mitteldarm von Lepidopteren wird das inaktive Cry1Ab-Protoxin (130 kDa) durch spezifische Proteasen gespalten und in eine aktive Form von 60-65 kDa umgewandelt. Dabei kommt es zu einer Abspaltung von ungefähr 500 Aminosäureresten am C-terminalen Ende und von 28 Aminosäureresten am N-terminalen Ende (Bietlot *et al.*, 1989a; Höfte und Whitley, 1989). Zur Gewinnung des aktiven Cry1Ab-Toxins wurde das aus HB101/pMP oder XL1-Blue/pBD140 gewonnene Protoxin mit Trypsin über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Behandlung mit geringen Mengen von Trypsin (1/2 bzw. 1/10 w/w von Trypsin/Protoxin) bzw. zu kurzer Inkubationszeit wurde eine unvollständige Trypsinisierung beobachtet. Auf dem SDS-Gel ist eine Toxinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 67 kDa sichtbar (Abb. 9A). Bei weiterer Inkubation mit Trypsin wurde das Protein bis zu 65 kDa geschnitten (Toxincharge J3). Dies kann weiter bis zu 60 kDa abbauen (Abb. 9B). Bei späteren Produktionen (Toxincharge J4 und J6B) wurde Trypsin in einem Verhältnis Protoxin/Trypsin von 1/1 (w/w) verwendet, um eine

vollständige Trypsinisierung zu erzielen. Nach mindestens 16 h Inkubation, erreichte das Cry1Ab-Toxin eine finale Größe von 60 kDa (Abb. 9C).

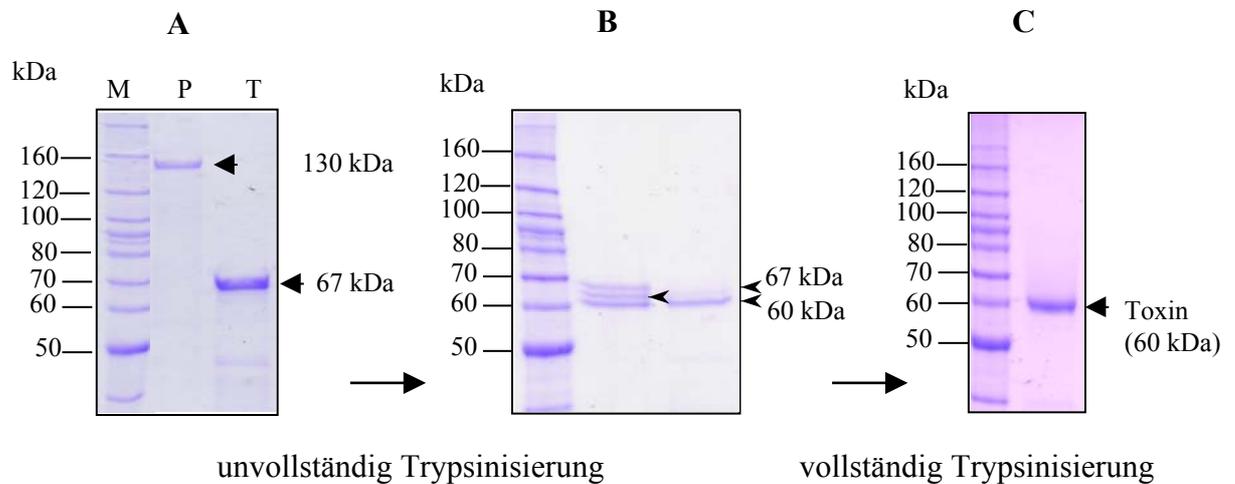


Abb. 9: SDS-PAGE von trypsinisiertem Cry1Ab-Protoxin aus HB101/pMP (Charge J2) (M: BenchMark Protein Marker und MG in kDa an der linken Seite angegeben; P: Protoxin; T: Toxin). **A:** Trypsin/Protoxin=1/2 (w/w); Inkubationsdauer: 16 h. **B:** 2. Zugabe von Trypsin: Trypsin/Protoxin=1/2 (w/w), weitere Inkubation für 8 h. **C:** Trypsin/Protoxin=1/1 (w/w); Inkubationsdauer: 16 h.

Um zu überprüfen, ob sich die aktiven Cry1Ab-Toxine aus den zwei Produktionsstämmen hinsichtlich ihres Molekulargewichtes unterscheiden, wurden die trypsinisierten Proteine einer SDS-PAGE unterworfen (Abb. 10). Bereits 2 h nach der Trypsin-Behandlung waren die Cry1Ab-Protoxine aus HB101/pMP und XL1-Blue/pBD140 mit einer kleinen Menge von 1 mg vollständig bis zu einer Größe von ca. 60 kDa gespalten (Abb. 10). Auf dem SDS-Gel waren keine Protoxin-Banden mehr zu erkennen. Im Molekulargewichtsbereich zwischen 25-50 kDa zeigten sich beim aktiven Toxin aus HB101/pMP-Zellen zusätzlich zu der Trypsin-Bande (~25 kDa) mindestens noch vier weitere Banden, während beim Toxin aus XL1-Blue/pBD140-Zellen nur drei Banden zu sehen waren. Die Trypsinisierung wurde bis zu 24 h durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die beiden aktiven Toxine ein konstantes Molekulargewicht von ca. 60 kDa besaßen (Abb. 10). Dieser 60 kDa trypsinisierte Kern ist relativ resistent gegen eine weitere Abspaltung durch Trypsin.

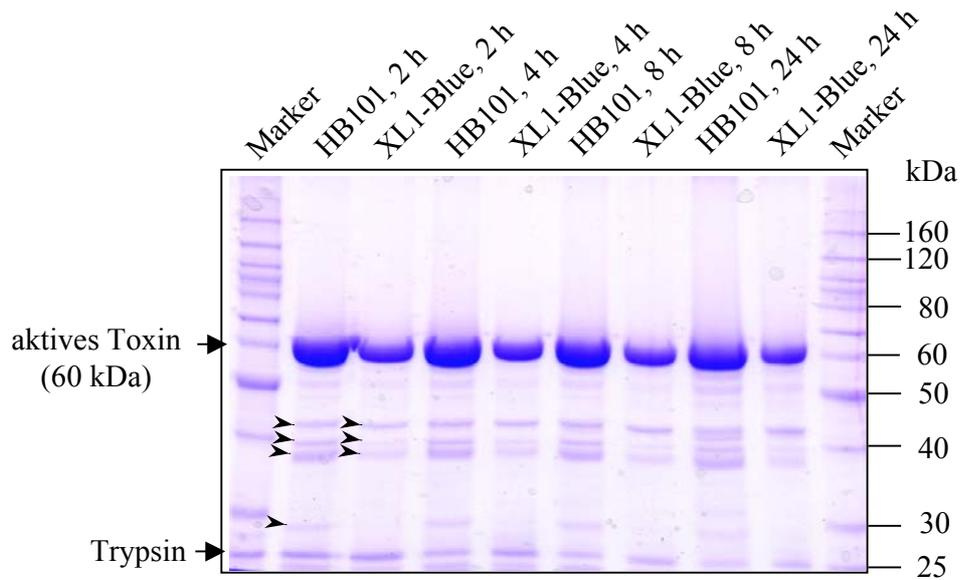


Abb. 10: SDS-PAGE-Analyse der Trypsinisierung des Protoxins aus HB101/pMP (Charge J2) und XL1-Blue/pBD140 (Charge J5). Trypsin/Protoxin=1/1 (w/w). (M: BenchMark Protein Marker, MG in kDa an der rechten Seite angegeben; 10%-iges Gel).

Bei einer längeren Trypsinisierung bis zu 72 h stellte sich heraus, dass die Intensität der Proteinbanden beider Toxine erheblich abnahm. Während das Molekulargewicht des aktiven Toxins aus HB101/pMP bei 60 kDa (Abb. 11A) blieb, waren bei XL1-Blue/pBD140 zwei Banden, von 60 kDa und 59 kDa zu beobachten (Abb. 11B).

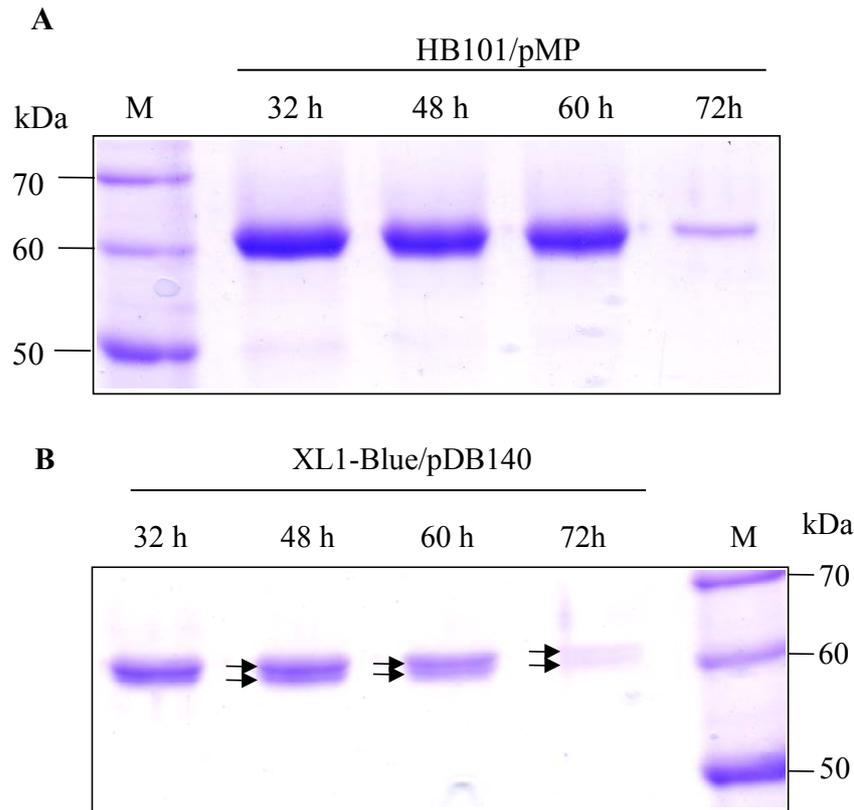


Abb. 11: Effekte der Trypsinbehandlung [Trypsin/Protoxin=1/1 (w/w)] auf den trypsinresistenten Kern des Cry1Ab-Toxins aus **(A)** HB101/pMP und **(B)** XL1-Blue/pDB140 von 32 h bis 72 h (M: BenchMark Protein Marker und MG in kDa; 7%-iges Gel).

3.2 Qualitätskontrolle des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins

3.2.1 Reinheitsgrad des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades des gereinigten Cry1Ab-Protoxins und Cry1Ab-Toxins wurden jeweils vier verschiedene Mengen zwischen 0,3-2,6 µg/Spur im 7%-igen SDS-PAGE getrennt. Das Gel wurde mit Coomassie Blue angefärbt, gescannt und mit der Software „ImageMaster 1D“ (Pharmacia System) analysiert (Abb. 12). Hierbei wurde die Pixel-Intensität der Einzelbande zur Gesamtintensität aller Banden ins Verhältnis gesetzt. Die Cry1Ab-Bande hatte eine prozentuale Pixel-Intensität von 82,2%, woraus ein ungefährender Reinheitsgrad des Cry1Ab-Protoxins von ca. 82% abgeleitet wurde (Abb. 12a). Die Reinheitsgrad von Cry1Ab-Toxin (60 kDa) wurde ebenfalls gemessen und beträgt bis zu ~86% (Abb. 12b).

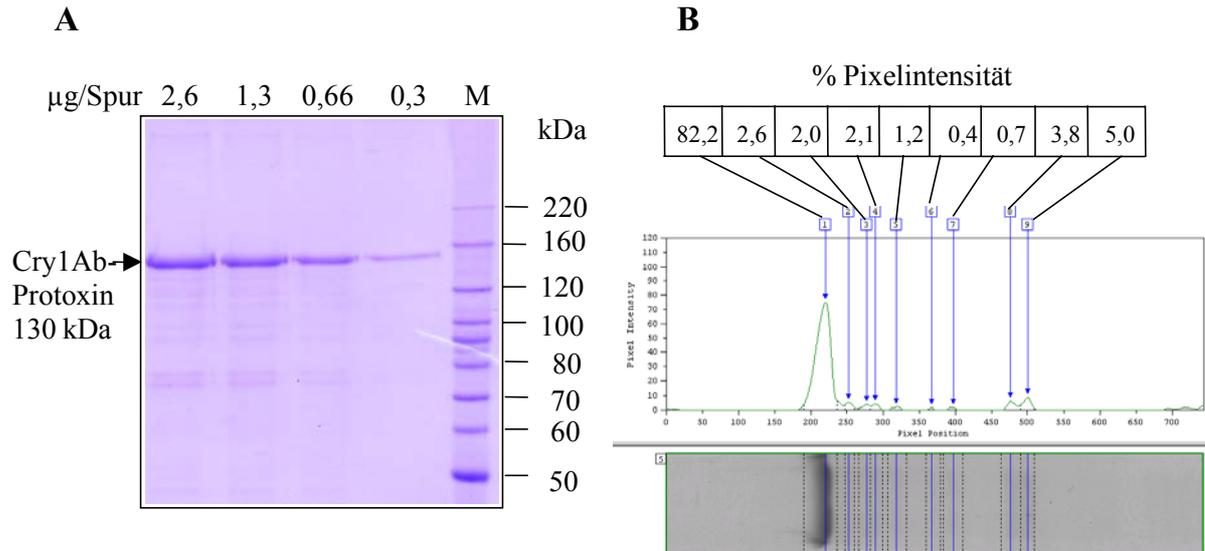


Abb. 12a: Reinheitsbestimmung des gereinigten Cry1Ab-Protoxins. **A:** SDS-PAGE der Protoxin-Charge J5 (M: BenchMark Protein Marker; MG in kDa; 7%-iges Gel). **B:** % Pixelintensität der Spur mit 2,6 µg Protoxin berechnet mit ImageMaster 1D (Pharmacia System).

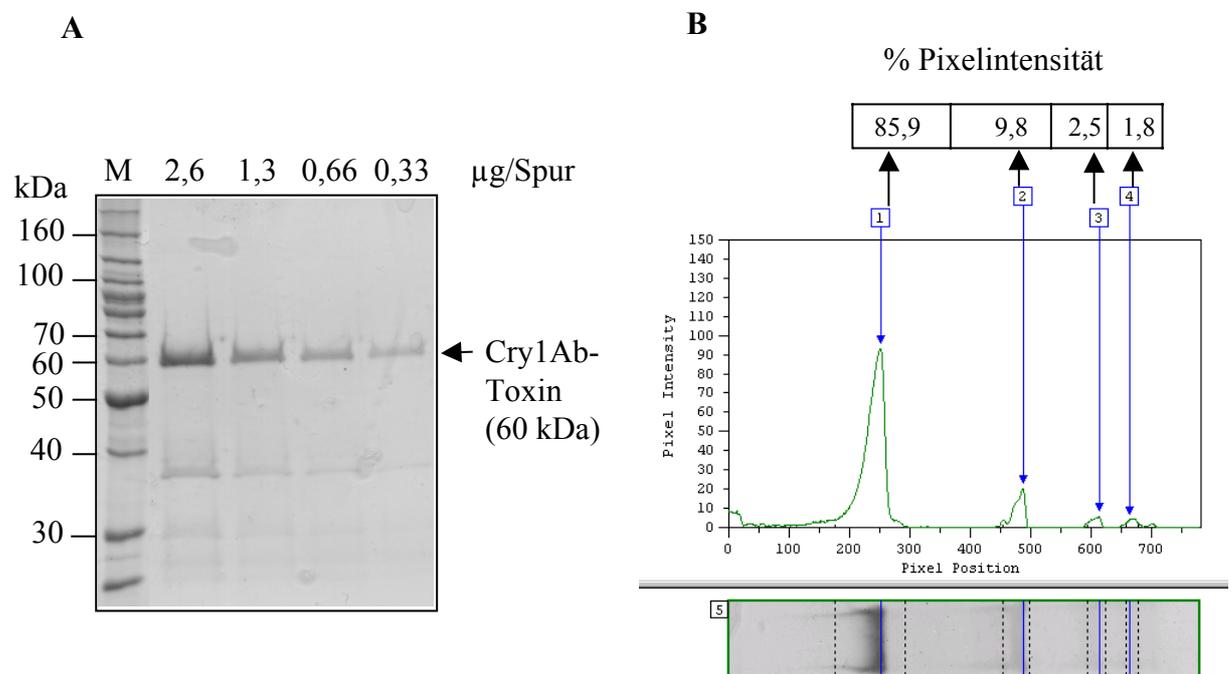


Abb. 12b: Reinheitsbestimmung des gereinigten Cry1Ab-Toxins. **A:** SDS-PAGE der Toxin-Charge J4 (M: BenchMark Protein Marker; MG in kDa; 10%-iges Gel). **B:** % Pixelintensität der Spur mit 2,6 µg Toxin berechnet mit ImageMaster 1D (Pharmacia System).

3.2.2 Stabilität des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Die Stabilität des erzeugten Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins wurde bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (-20°C und $+4^{\circ}\text{C}$) und -zeiträumen (2, 4, 6 und 8 Monate) überprüft. In Abb. 13a und b sind die SDS-Analysen des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins dargestellt. Bei -20°C waren beide Toxine über einen Zeitraum von 8 Monaten stabil. In dem SDS-Gel konnte keine Veränderung in der Intensität sowie der Anzahl der Toxin-Banden nach 2, 4, 6 und 8 Monaten beobachtet werden (Abb. 13a, Gel A und Abb. 13b, Gel C).

Eine Lagerung bis zu zwei Monaten bei 4°C führte nur zu einem geringfügigem Abbau des Protoxins. Die Intensität der Cry1Ab-Protoxin-Bande nahm nach 2, 4 und 6 Monaten stetig ab. Nach 8 Monaten Lagerung bei 4°C war das Protoxin vollständig abgebaut (Abb. 13a, Gel B). Dagegen war der Abbau des Toxins sehr gering (Abb. 13b, Gel D). Im Vergleich zur -20°C -Lagerung waren die Banden der niedermolekularen Proteine während der 8-monatigen Lagerung des aktiven Toxins bei 4°C immer deutlich sichtbar.

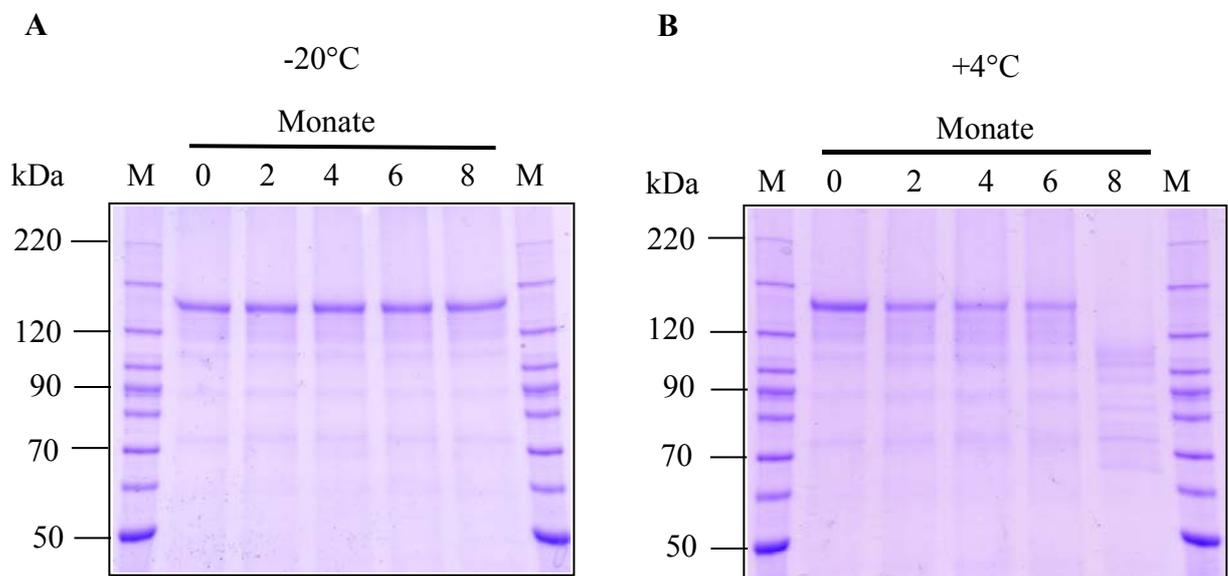


Abb. 13a: Stabilität des Cry1Ab-Protoxins (130 kDa) (Charge J6A, aus XL1-Blue/pBD140) bei (A) -20°C und (B) $+4^{\circ}\text{C}$ über einen Zeitraum von 8 Monaten. (M: BenchMark Protein Marker und MG in kDa an der linken Seite angegeben; 7%-iges Gel).

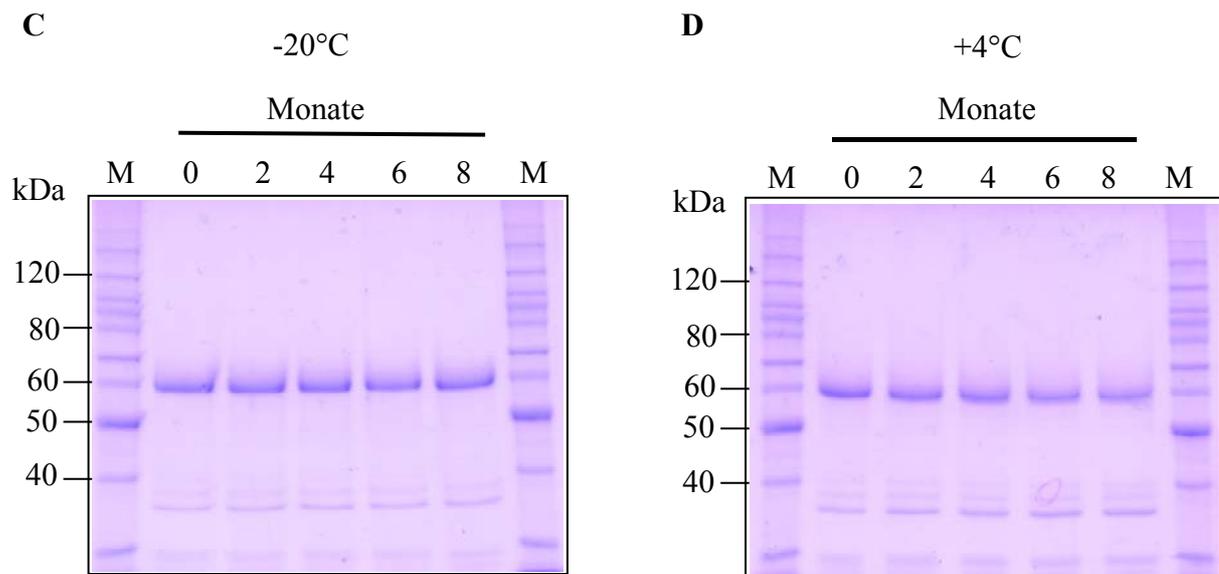


Abb.13b: Stabilität des Cry1Ab-Toxins (60 kDa) (Charge J4, aus HB101/pMP) bei **(C)** -20°C und **(D)** $+4^{\circ}\text{C}$ über einen Zeitraum von 8 Monaten. (M: BenchMark Protein Marker und MG in kDa an der linken Seite angegeben; 10%-iges Gel).

Aufgrund dieser Versuchsergebnisse wurde das Cry1Ab-Protoxin und -Toxin nur innerhalb von 4-6 Wochen bei 4°C aufbewahrt. Für einen längeren Zeitraum erfolgte die Lagerung bei -20°C .

Das wiederholte Auftauen und erneute Einfrieren des Protoxins und des aktiven Toxins konnte zu einer Präzipitation des Toxins führen. Der gleiche Effekt konnte ebenfalls bei der längeren Lagerung des Protoxins bei 4°C beobachtet werden, wobei die Proteinkonzentration bei $>2\text{ mg/ml}$ lag (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.3 Entwicklung und Optimierung eines indirekten ELISA zur Quantifizierung von Cry1Ab-Toxin

Da die Spezifität eines AKs eine relative, von der Struktur des Antigens abhängige Eigenschaft ist, können AKs in der Regel nur mit einem bestimmten Protein oder einem Protein, welches strukturell mit diesem sehr eng verwandt ist, reagieren. In dieser Arbeit wurde ein pAK gegen das Cry1Ab-Toxin hergestellt. Bei der Immunisierung von Huhn wurde das gereinigte Cry1Ab-Toxin mit einer Größe von 65 kDa der ersten Produktionscharge (J1) als Antigenpräparat verwendet. Das Cry1Ab-Toxin bei den weiteren Produktionschargen hatte ein Molekulargewicht von 60 kDa. Zum immunologischen Nachweis von Cry1Ab sollte ein ELISA-Test entwickelt und optimiert

werden. Als Probenmaterial dienten das in *E. coli* exprimierte Cry1Ab-Protoxin (130 kDa), das trypsinisierte Cry1Ab-Toxin (60 kDa), sowie Cry1Ab-Toxine aus transgenen Maislinien Mon810 (~92 kDa) und Bt176 (~65 kDa).

3.3.1 Titration der Antigene und des polyklonalen Antikörpers

Die in Hühnern erzeugten pAK (pAK-NTH1) gegen das Cry1Ab-Toxin (65 kDa) wurde in einem ELISA getestet. Dazu wurde eine indirekte ELISA-Methode ausgewählt. Bevor der ELISA mit den transgenen Pflanzenproben getestet werden konnte, wurden methodische Versuche zur Ermittlung der optimalen Verdünnung der Antigene sowie des Antikörpers durchgeführt. Zur Optimierung und Standardisierung des ELISA-Tests wurden rekombinantes Cry1Ab-Protoxin und -Toxin aus *E. coli* als Antigen verwendet.

Abb. 14a und Abb. 14b zeigen den Einfluss der Antigen- und AK-Verdünnung auf die Extinktion im indirekten ELISA. Die Antigene wurden in einer jeweils zweifachen Verdünnungsreihe eingesetzt (von 6-0,19 µg/ml für Cry1Ab-Toxin und 7,5-0,31 µg/ml für Cry1Ab-Protoxin) und an die Mikrotiterplatte angelagert. Als negative Kontrolle diente der Beschichtungspuffer. Die Titration des pAK-NTH1 erfolgte bei einer Verdünnung von 1/100 bis 1/3200. Für das AK-Konjugat wurde eine Verdünnung von 1/5000 für den Test ausgewählt.

Abb. 14a zeigt, dass die Extinktionswerte der Linien AK1, AK2 und AK3 bei einem Verdünnungsbereich des aktiven Cry1Ab-Toxins von 6 bis 3 µg/ml (AG1-AG2) die gleichen maximalen Werte (OD Wert ≥ 2) aufwiesen. In diesem Plateau-Bereich waren das Antigen und der AK in einem Sättigungszustand. Die Extinktionswerte des Antigens von 6 µg/ml waren bei manchen Verdünnungen des AKs (1/200; 1/400) sogar noch kleiner als die entsprechenden Werte der Antigene mit geringerer Konzentration (3 µg/ml), da eine Sättigung in der Bindungskapazität der beschichteten Mikrotiterplatte einsetzte.

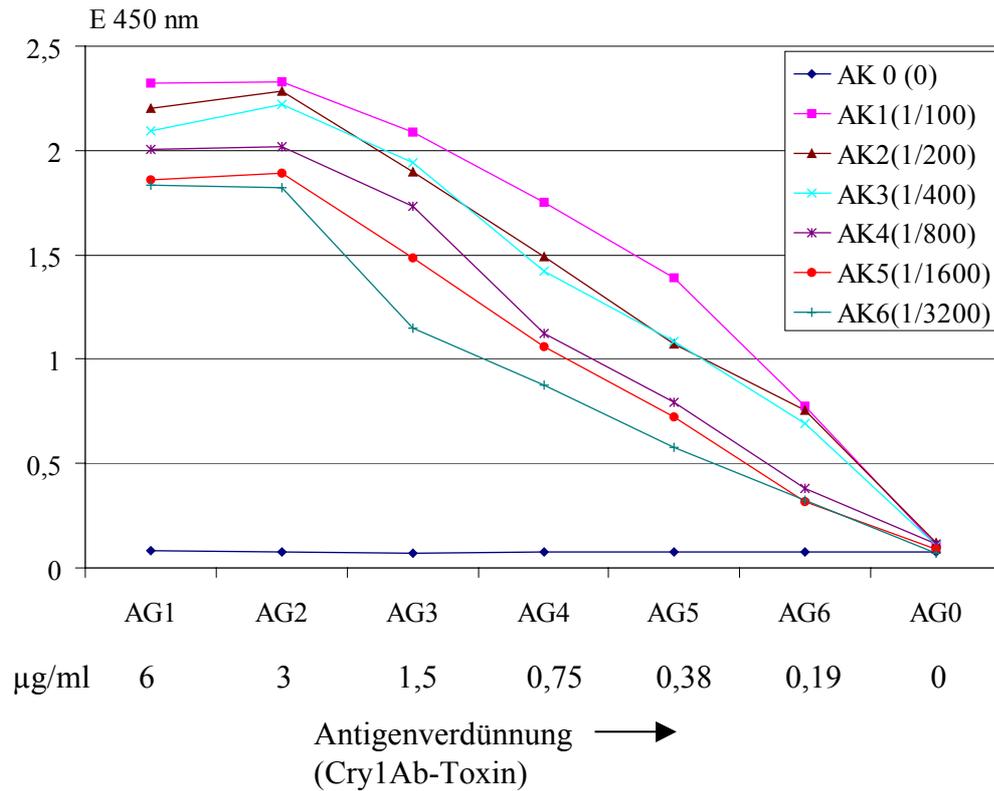


Abb. 14a: Relative Extinktionswerte der verschiedenen Antigenkonzentrationen (Cry1Ab-Toxin, Charge J3) in Bezug auf die Verdünnungsreihen des pAKs-NTH1 im indirekten ELISA.

Ab einer Konzentration von 1,5 µg/ml des Antigens sanken die Extinktionswerte und gaben eine optimale Titration der AK, in der die maximalen Extinktionswerte von 1,6 OD nicht überschritten wurden. Bei der Wahl der optimalen Verdünnung von pAK-NTH1 war zu berücksichtigen, dass die Konzentration nicht zu hoch sein sollte, um eine unspezifische Reaktion zu eliminieren. Andererseits durfte sie nicht zu gering sein, damit die Sensitivität des AKs erhalten blieb. In diesem Test war die Verdünnung von pAK-NTH1 von 1/1600 optimal, um das Cry1Ab-Toxin nachzuweisen. Bei einer weiteren Verdünnung des pAKs (1/3200) verlor der AK seine Sensitivität (Linie AK6). Bei der Kontrolle (AG0) waren die Extinktionswerte minimal (ca. 0,06).

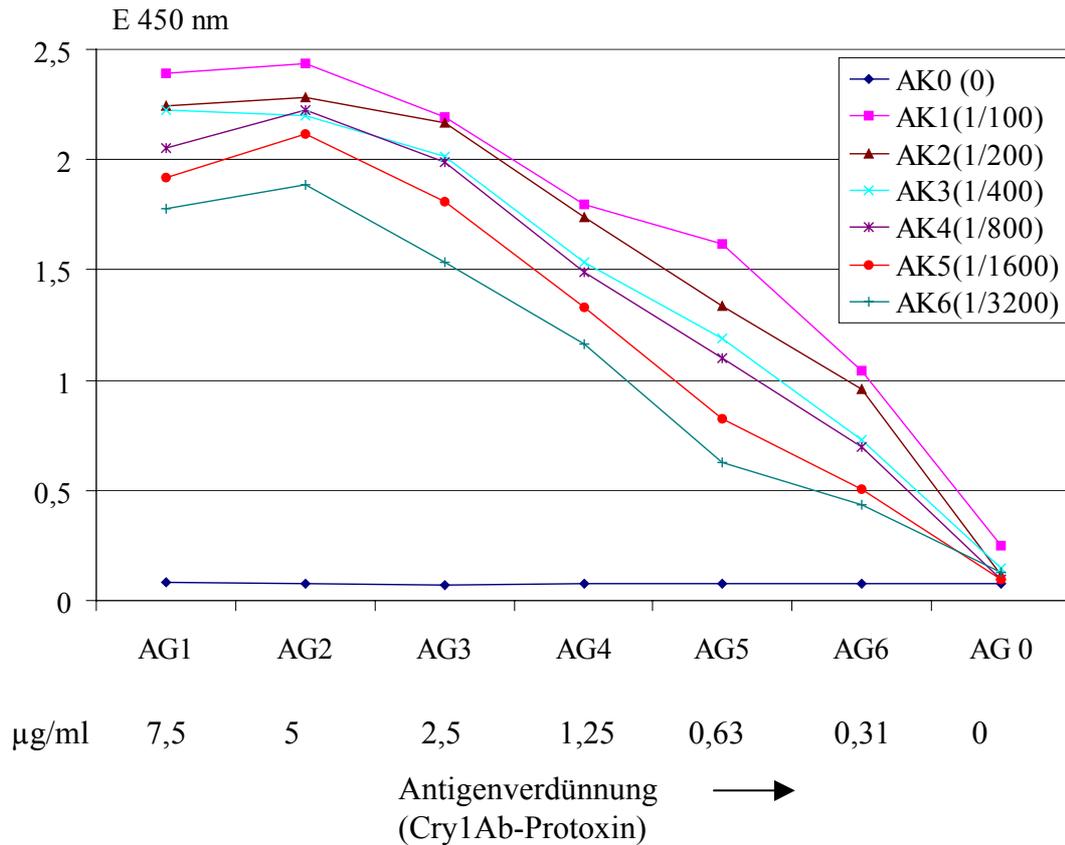


Abb.14b: Relative Extinktionswerte der verschiedenen Antigenkonzentrationen (Cry1Ab-Protoxin, Charge J2) in Bezug auf die Verdünnungsreihen des pAKs-NHT1 im indirekten ELISA.

Wurde das Protoxin als Antigen verwendet, konnten ähnliche Ergebnisse bei der Titration des polyklonalen AKs nachgewiesen werden (Abb. 14 b). Aufgrund der Untersuchungen zur Titration der Antigene und AK zeigte sich, dass eine 1/1600 Verdünnung des AKs der optimale Verdünnungsbereich für den Einsatz im indirekten ELISA war. Für weitere Untersuchungen wurden Antigen-Verdünnungen von $<1,5 \mu\text{g/ml}$ (Cry1Ab-Toxin) bzw. $<2,5 \mu\text{g/ml}$ (Cry1Ab-Protoxin) verwendet. Mit pAK-NHT1 konnte bei einer Verdünnung das Cry1Ab-Toxin bis zu $0,19 \mu\text{g/ml}$ und das Protoxin bis zu $0,31 \mu\text{g/ml}$ noch gut nachgewiesen werden.

3.3.2 Titration des Antikörper-Konjugates

Als weiteren Schritt zur Optimierung eines indirekten ELISA erfolgte die Ermittlung der optimalen Antihuhn-Konjugat-Konzentration. Dazu wurde eine konstante Menge des Antigens (Cry1Ab-Toxin und -Protoxin) von 500 ng/ml und eine 1/1600 Verdünnung des

pAK-NTH1 verwendet. Insgesamt wurden vier Verdünnungen des Antihuhn-Konjugats (1/5000, 1/10.000, 1/20.000 und 1/50.000) getestet. Wie aus Abb. 15 ersichtlich, nahmen die ELISA-Werte mit zunehmender Verdünnung des Antihuhn-Konjugats ab. Der maximale Extinktionswert wurde beim Einsatz einer 1/5000 Antihuhn-Konjugat-Verdünnung erreicht.

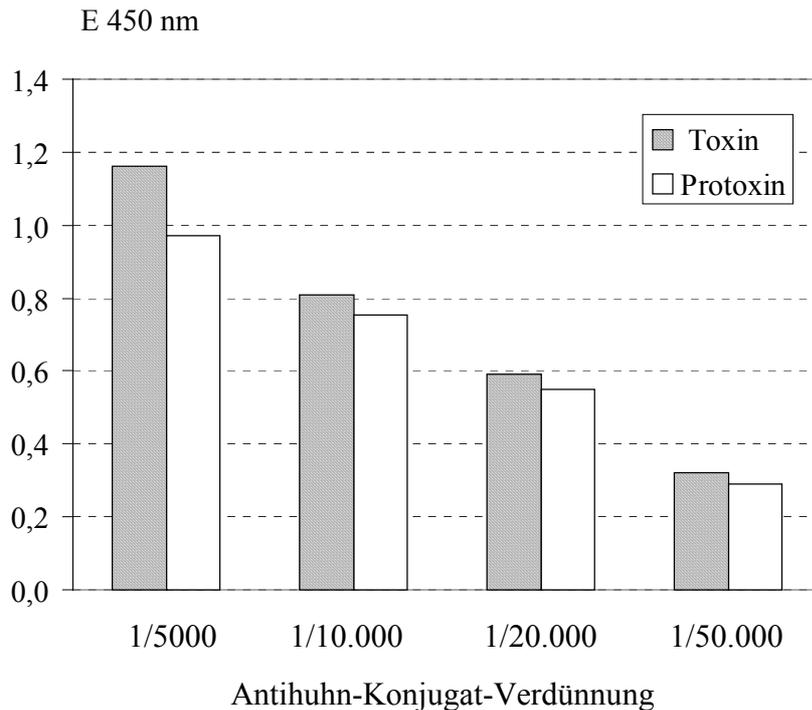


Abb. 15: Einfluss der Titration des Antihuhn-Konjugats auf die Extinktionswerte (Cry1Ab-Toxin- und Protoxin-Konzentration: 500 ng/ml; 1. AK-Verdünnung: 1/1600).

Die verschiedenen Antigene, Cry1Ab-Protoxin und -Toxin, führten zu unterschiedlichen Reaktionen mit dem polyklonalen AK. Bei der Anwendung von 500 ng/ml zeigte das Cry1Ab-Toxin etwas höhere Extinktionswerte im Vergleich zum Cry1Ab-Protoxin (Abb. 15). Dieser Unterschied war bei der 1/5000 Verdünnung des Antihuhn-Konjugats am deutlichsten zu sehen. Es ist zu berücksichtigen, dass bei gleicher Konzentration das Toxin eine höhere Molarität als das Protoxin besitzt.

3.3.3 Spezifität und Sensitivität des polyklonalen Antikörpers

Die wichtigsten Qualitätsparameter eines ELISA sind die Spezifität und Sensitivität des eingesetzten AK. Diese Parameter wurden für das Cry1Ab-Protoxin und -Toxin überprüft

und verglichen. Anhand der zuvor durchgeführten Optimierung, wurden hierzu eine 1/1600 Verdünnung des AKs und eine 1/5000 Antihuhn-Konjugat-Verdünnung ausgewählt. Die untere Nachweisgrenze der Messwerte bei verschiedenen Konzentrationen der beiden Antigene wurde exakt ermittelt. Dazu wurde jeweils eine Verdünnungsreihe der beiden Antigene von 5 µg/ml bis zu 4,8 ng/ml eingesetzt (5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,15; 0,078; 0,039; 0,0195; 0,0097; 0,0048 µg/ml). Beschichtungspuffer wurde als Negativkontrolle verwendet. Als untere Nachweisgrenze galten diejenigen Werte, die größer als der Mittelwert der Negativkontrolle plus seiner dreifachen Standardabweichung waren (Vogelgesang und Hädrich, 1998). Dies entsprach 7 ng/ml für das Toxin (Abb.16a) und 50 ng/ml für das Cry1Ab-Protoxin (Abb.16b).

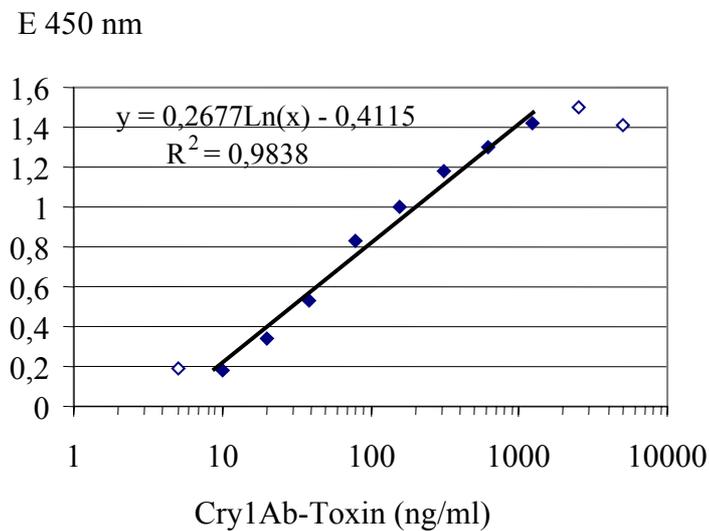


Abb. 16a: Standardgerade des optimierten ELISA-Tests zum Nachweis des Cry1Ab-Toxins Charge J3. [schwarze Punkte: innerhalb der Standardgerade (0,0097-1,25 µg/ml); weiße Punkte: außerhalb der Standardgerade (0,0048µg/ml und 2,5-5 µg/ml)].

Wie in Abb. 16a und b dargestellt, lag der lineare Bereich des Cry1Ab-Toxins zwischen 7 und 2500 ng/ml, während er für das Protoxin zwischen 50-1250 ng/ml war. Damit war der Nachweis des Cry1Ab-Toxin um das ca. 7fache sensitiver als der des Protoxins, wobei allerdings der pAK etwa gleich spezifisch, gegen beide Antigene, reagierte.

E 450 nm

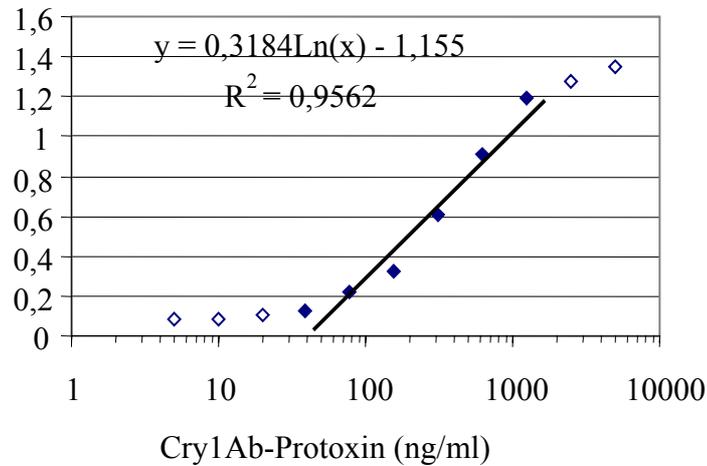


Abb. 16b: Standardgerade des optimierten ELISA-Tests zum Nachweis des Cry1Ab-Protoxins Charge J2. [schwarze Punkte: innerhalb der Standardgerade (0,0097-1,25 µg/ml); weiße Punkte: außerhalb der Standardgerade (0,0048-0,0195 µg/ml und 2,5-5 µg/ml)].

3.3.4 Vergleich der Sensitivität des indirekten ELISA mit dem Quantiplate™-Kit

Die Sensitivität des indirekten ELISA sollte mit jener des kommerziell erhältlichen Cry1Ab-Nachweistests Quantiplate™-Kit (Fa. Envirologix) verglichen werden. Der Quantiplate™-Kit ist ein DAS-ELISA zum Nachweis von Cry1Ab und Cry1Ac in transgenem Mais- und Baumwollpflanzen. Der Toxinnachweis mit dem Quantiplate™-Kit wurde entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Wie in Abb. 17 dargestellt, wurde bei der Ermittlung der Nachweisgrenze von Cry1Ab-Toxin und -Protoxin festgestellt, dass das Protoxin wesentlich schwächer erfasst wurde als das Toxin. Bei geringeren Konzentrationen (0,5; 2,5 und 5 ng/ml) wies das Cry1Ab-Toxin ähnliche Extinktionswerte auf wie der im Kit gelieferte Standard. Beim Protoxin konnte erst bei der Konzentration von 25 ng/ml ein Extinktionswert von 0,4 erreicht werden, während das Toxin diesen Wert schon bei einer Konzentration von 0,5 ng/ml erreichte.

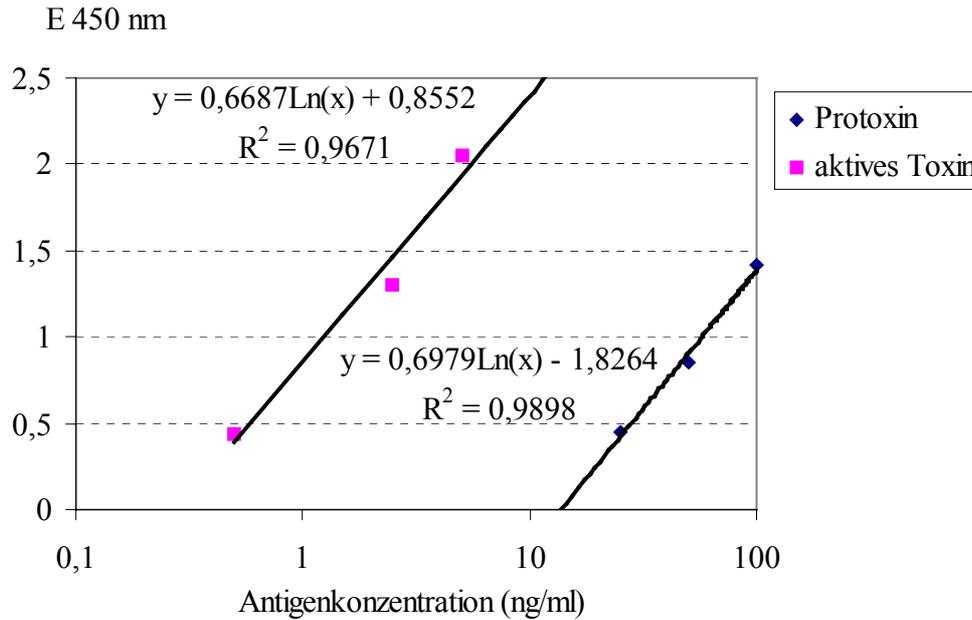


Abb. 17: Nachweis des Cry1Ab-Toxins (Charge J3) und -Protoxins (Charge J2) mit dem Quantiplate™-Kit (Envirologix).

In Tab. 5 sind die unteren Nachweisgrenzen des indirekten ELISA und des kommerziellen Quantiplate™-Kit zusammengefasst. Bei beiden Nachweisverfahren war die Sensitivität für das Cry1Ab-Toxin höher als für das Protoxin, nämlich 7fach (indirekter ELISA) bzw. 48fach (DAS-ELISA, Quantiplate™). Der DAS-ELISA wiederum war deutlich sensitiver als der indirekte ELISA, hier war der Unterschied 20fach beim Toxin (0,35 ng/ml vs. 7 ng/ml) und 3fach beim Protoxin (17 ng/ml vs. 50 ng/ml). Somit stellte der indirekte ELISA nur dann eine Alternative dar, wenn Cry1Ab-Toxine mit einem Grenzwert von mindestens 7 ng/ml (Toxin) bzw. 50 ng/ml (Protoxin) nachzuweisen waren.

Tab. 5: Vergleich der Nachweisgrenzen des Cry1Ab-Toxins und -Protoxins im indirekten ELISA und DAS-ELISA (Quantiplate™)

Testsystem	Nachweisgrenze (ng/ml)	
	Verwendetes Antigen	
	Toxin (Charge J3)	Protoxin (Charge J2)
Indirekter-ELISA	7	50
Direkter-ELISA (Sandwich Methode)	0,35	17

3.4 Immunologischer Nachweis des rekombinaten Cry1Ab-Toxins aus *E. coli* mittels Westernblotting

Im weiteren sollte untersucht werden, ob pAK-NTH1 geeignet ist, Cry1Ab im Western-Blot zu detektieren. Nachdem der ELISA einen deutlichen Unterschied in der Sensitivität gegenüber Cry1Ab-Toxin und -Protoxin gezeigt hatte, war es zudem interessant zu überprüfen, ob der AK vergleichbare Unterschiede im Western-Blot zeigte.

Die Etablierung des Western-Blots gliederte sich in drei Schritte:

1. Auswahl der optimalen Verdünnung des ersten AKs.
2. Nachweisgrenze der beiden Antigene (Cry1Ab-Toxin und -Protoxin).
3. Eliminierung unspezifischer Reaktionen des polyklonalen AKs durch Herstellung eines monospezifischen AKs.

3.4.1 Optimierung der Western-Blot-Parameter

Um die optimalen Versuchsbedingungen des Western-Blots zu ermitteln, wurden in einem Vorversuch drei verschiedene AK-Verdünnungen (1/4000; 1/6000; 1/8000) in Verbindung mit drei unterschiedlichen Antigen-Konzentrationen des Cry1Ab-Toxins und -Prototoxins (600, 60 und 12 ng Protein) eingesetzt. Zusätzlich wurden die Inkubationszeit und die Expositionszeit optimiert. Als beste Konzentration erwies sich eine 1/6000 Verdünnung des pAK-NTH1 sowie eine 1/5000 Verdünnung des Antihuhn-Konjugats. Mit dieser Kombination der beiden AKs ergab sich mit beiden Antigenen ein deutliches Signal nach 1-2 min Exposition des Röntgenfilms bei geringem Hintergrund, was den Nachweis sehr kleiner Antigenmengen erlauben sollte. Diese Verdünnungen wurden deswegen für die weiteren Western-Blots ausgewählt.

3.4.2 Bestimmung der Nachweisgrenze

Zur Untersuchung der Sensitivität des Western-Blots wurden Cry1Ab-Protoxin und aktives Cry1Ab-Toxin jeweils in vier verschiedenen Mengen (10, 20, 40, 80 ng) in einem 7%-igen SDS-Gel getrennt und das Gel auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde mit der im Vorversuch (Kap. 3.4.1) optimierten AK-Verdünnung inkubiert (Abb. 18). Sowohl beim Protoxin als auch beim aktiven Toxin konnten spezifische Banden mit einem Molekulargewicht von 130 kDa bzw. 60 kDa identifiziert werden, obwohl sehr geringe Proteinmengen eingesetzt wurden (bis 10 ng). Das Cry1Ab-Toxin hatte jedoch eine

wesentlich stärkere Affinität zu pAK-NTH1 als das Protoxin, denn die Intensität der Banden des aktiven Toxins waren deutlich stärker als die des Protoxins (Abb. 18).

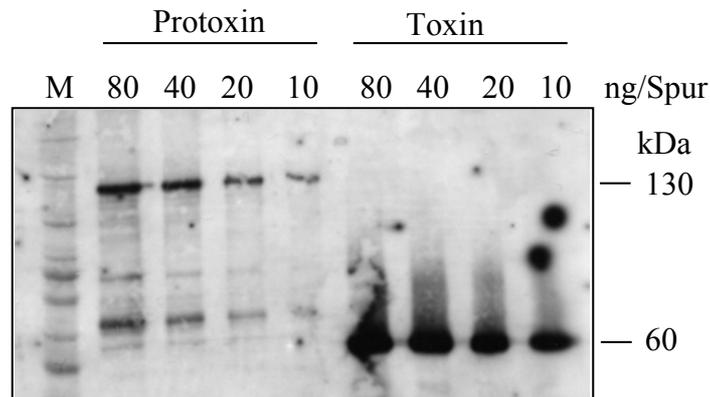


Abb. 18: Nachweis des Cry1Ab-Protoxins (Charge J5) und -Toxins (Charge J4) im Western-Blot mit dem pAK-NTH1 (1. AK 1/6000; 2. AK. 1/5000; M: Marker; Expositionsdauer: 2 min).

3.4.3 Überprüfung der Sensitivität des monospezifischen Antikörpers

Um die in Abb. 18 aufgetretenen Hintergrundreaktionen des pAK zu reduzieren, wurden zwei msAK gegen Cry1Ab-Toxin bzw. -Protoxin hergestellt. Zur Überprüfung der Spezifität und Sensitivität der msAK wurden diese auf der selben gestrippten Membran aus Abb. 18 getestet. Allerdings wurde wegen der geringen Konzentration des msAK im Eluat nach der Reinigung dessen Verdünnung auf 1/1000 anstatt 1/6000 reduziert.

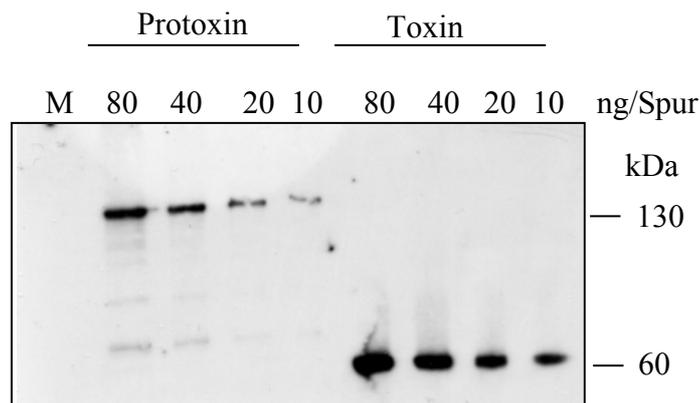


Abb. 19: Nachweis des Cry1Ab-Protoxins (Charge J5) und -Toxins (Charge J4) im Western-Blot mit dem msAK-NTH2 (1. AK: 1/1000; 2. AK 1/5000; M: Marker; Expositionsdauer: 10 min).

Die Reinigung war erfolgreich und erzielte einen guten Effekt. Abbildung 19 zeigt, dass bei der Verwendung des msAK-NTH2 gegen Cry1Ab-Toxin ein deutlich reduzierter Hintergrund vorhanden war. Obwohl die Sensitivität des Nachweises vom monospezifischen AK etwas reduziert wurde, war es noch möglich das Cry1Ab-Toxin bis zu 10 ng nachzuweisen. Das Protoxin zeigte ein schwaches Signal bei einer Konzentration von 10 ng/Spur. Bei einer Menge von 80 ng des Protoxins und 10 ng des Toxins wurden Signale mit vergleichbarer Intensität detektiert. Der gegen Cry1Ab-Protoxin gerichtete msAK-NTH1 unterschied sich in seiner Sensitivität gegenüber Protoxin und Toxin nicht vom msAK-NTH2 (Ergebnisse nicht dargestellt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Western-Blot sowohl der msAK als auch der pAK eine stärkere Affinität zum aktiven Toxin als zum Protoxin hatten. Der Nachweis des Protoxins war jeweils ca. acht- bis 10-fach schwächer als der des aktiven Toxins. Die im Western-Blot beobachtete unterschiedliche Affinität zwischen dem AK und den beiden Toxinen war mit den ELISA-Ergebnissen (Kap. 3.3.3) vergleichbar.

3.5 Biologische Aktivität verschiedener rekombinanter Cry1Ab-Toxine mittels eines Bioassays mit *O. nubilalis*

Nach der biochemischen- und immunologischen Charakterisierung der in Bakterien rekombinant erzeugten Cry1Ab-Protoxine und der aktiven Toxine wurde deren biologische Aktivität untersucht. Dazu dienten Biotests (LC_{50} -Bestimmung) mit L1-Larven von *O. nubilalis*. Die Biotests mit dem Cry1Ab-Toxin aus HB101/pMP wurden an der BBA-Darmstadt (Meise, 2003) durchgeführt, jene mit dem Cry1Ab-Protoxin und -Toxin aus XL1-Blue/pBD140 im DLR-Rheinpfalz, Neustadt/Wstr.

3.5.1 Bioaktivität verschiedener Protoxin-Chargen

Zur Bestimmung der Toxizität der zwei Protoxin-Chargen J5 und J6A wurden jeweils sechs Verdünnungsstufen angesetzt und auf die Oberfläche des Nährmediums pipettiert. Der Konzentrationsunterschied zwischen den Verdünnungsstufen betrug jeweils den Faktor von ca. 3,3 und wurde unter Berücksichtigung des Mortalitätsbereiches angepasst. In den durchgeführten Versuchen lagen die Konzentrationen der Charge J5 im Bereich von 8,6-2580 ng/cm² und der Charge J6A von 6-2000 ng/cm². Die Stammlösung des Toxins besaß eine Konzentration von 1,5 (Charge J5) bzw. 2,3 mg/ml (Charge J6A). Die

Abbildungen 20a und b zeigen die Zunahme der Mortalität von *O. nubilalis* mit steigender Konzentration des Protoxins nach der Auswertung der Probit-Analyse.

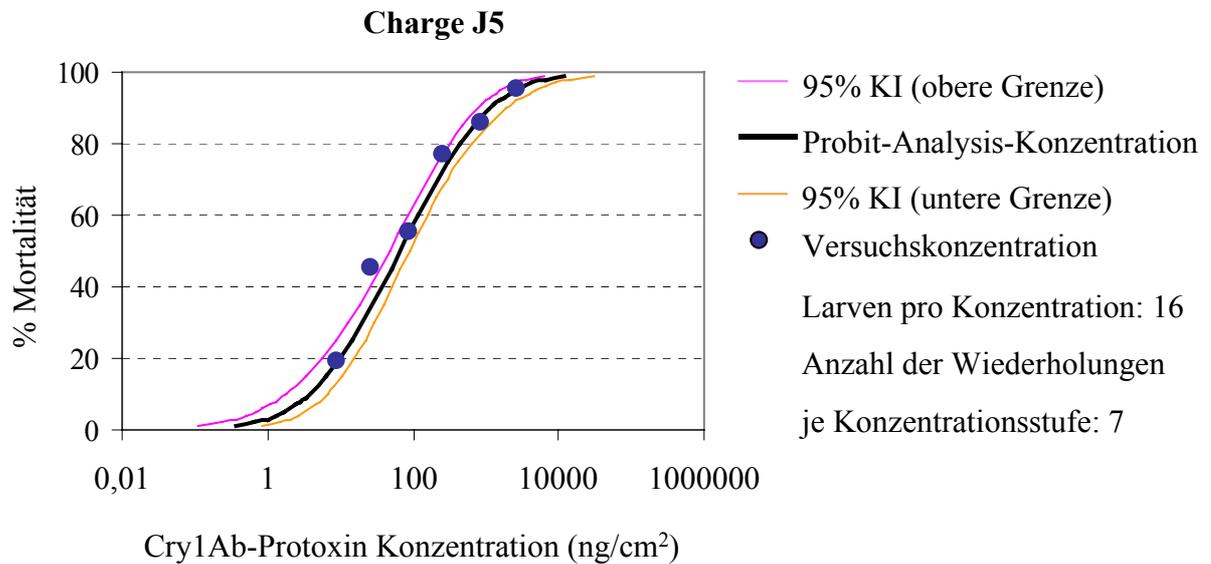


Abb. 20a: Effekte der Konzentration des Protoxins Charge J5 auf die Mortalität von *O. nubilalis* (L1) nach 7 Tagen im Biotest (Ergebnisse der Probit-Analyse).

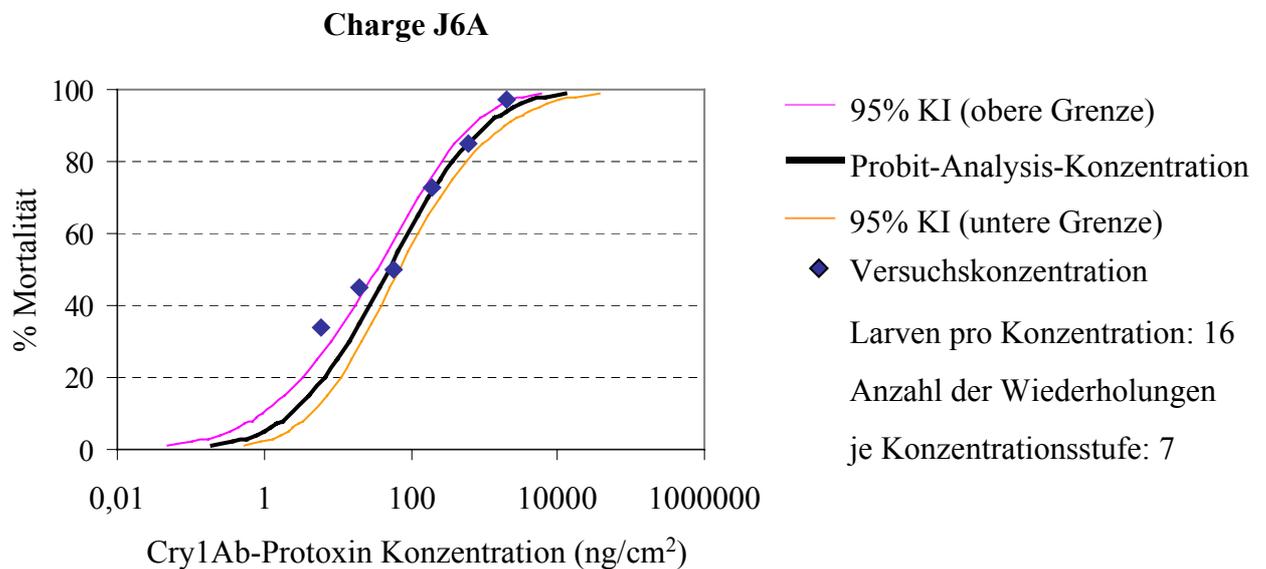


Abb. 20b: Effekte der Konzentration des Protoxins Charge J6A auf die Mortalität von *O. nubilalis* (L1) nach 7 Tagen im Biotest (Ergebnisse der Probit-Analyse).

Wie aus Tab. 6 ersichtlich, sind die LC₁₀-, LC₅₀- und LC₉₀-Werte des Protoxins der Charge J5 etwas größer als von der Charge J6A. Allerdings überschneiden sich die 95% Konfidenzintervalle der jeweiligen LC-Werte der beiden Toxinchargen, so dass ein

signifikanter Unterschied in der Aktivität zwischen den beiden Chargen nicht bestand (Robertson und Preisler, 1992).

Tab. 6: Toxizität der verschiedenen Protoxin-Chargen im Biotest mit *O. nubilalis* nach 7 Tagen (in Klammer: 95 % KI) (n: Anzahl der getestet Larven)

Protoxin-Charge	n	LC ₁₀	LC ₅₀	LC ₉₀	Steigung
J5	877	4,6 (1,9-7,9)	72 (49-100)	1190 (790-1994)	0,457±0,039
J6A	852	2,4 (1,0-4,5)	50 (34-69)	1060 (674-1932)	0,419±0,038

3.5.2 Bioaktivität verschiedener Toxin-Chargen

Die Biotests mit dem Cry1Ab-Toxin aus HB101/pMP (Charge J3) wurden in der BBA-Darmstadt durchgeführt. Sieben Konzentrationsstufen wurden mit einem Verdünnungsfaktor von 2 im Bereich von 0,9-225 ng/cm² angesetzt. Die LC₅₀-Werte von neun einzelnen Auswertungen lagen bei ca. 20 ng/cm². Während der Lagerung bei 4°C innerhalb von 142 Tagen wurde keine signifikante Veränderung in der Aktivität der Toxin-Charge J3 beobachtet (Meise, 2003; Nguyen *et al.*, 2004). Bei der Toxin-Charge J4 lag der LC₅₀-Wert bei 26 ng/cm² (im Jahr 2003) und 14 ng/cm² (im Jahr 2004) (Kaiser-Alexnat, pers. Mitt.).

Die Toxizität des Cry1Ab-Toxins aus XL1-Blue/pBD140 (Charge J6B) wurde in dem DLR-Rheinpfalz, Neustadt überprüft. Das Toxin wurde im Bereich von 6-2000 ng/cm² verdünnt. Der LC₅₀-Wert ist in Tab. 7 zusammengefasst. Es stellte sich heraus, dass die Toxizität des Cry1Ab-Toxins innerhalb von sechs Wochen stetig abnahm. Der LC₅₀-Wert lag bei 77 ng/cm² bei der Verwendung des Cry1Ab-Toxin vier Monate nach dessen Herstellung. Nach ausschließender sechswöchiger Lagerung bei 4°C stieg der LC₅₀-Wert auf 1717 ng/cm² an, was auf eine sehr starke Abnahme der Toxin-Aktivität hindeutete. Nach 16-wöchiger Lagerung wurde kein weiterer Abbau der Toxizität des Toxins beobachtet. Die Konfidenzintervalle der LC₅₀ des Toxins nach sechs- und 16-wöchiger

Lagerung überschritten sich, so dass ein signifikanter Unterschied in der Aktivität des Toxins in diesem Lagerungszeitraum nicht bestand.

Tab. 7: Effekt der Lagerungsdauer auf die Toxizität der Cry1Ab-Toxin-Charge J6B. Signifikanzen der LC₅₀-Wert nach Robertson und Preisler, 1992)

Lagerungsdauer (bei 4°C) (Woche)	Anzahl der eingesetzten Larven	LC ₅₀ (ng/cm ²)	95% Konfidenzintervall	Signifikanz *	Steigung
1	63	77	46,2-120,5	A	1,022 ± 0,22
2	221	111	56,6-200	A	0,447 ± 0,079
3	256	299	151-633	AB	0,362 ± 0,065
4	383	541	194-1794	BC	0,566 ± 0,132
6	256	1717	973-5395	C	0,610 ± 0,175
16	256	1243	684-3335	C	0,442 ± 0,0926

*) unterschiedliche Buchstaben indizieren eine Signifikanz

Zur Überprüfung, ob das Toxin innerhalb einen Zeitraums von 16 Wochen abgebaut wurde, wurden Aliquots des Toxins im SDS-PAGE untersucht. Aus Abb. 21 ist ersichtlich, dass das frisch aufgetaute Cry1Ab-Toxin der Charge J6A hauptsächlich aus einem 60-kDa- und einem kleinen Teil 67-kDa-Protein bestand (Abb. 21, erste Woche). Nach einer Lagerung von sechs Wochen bei 4°C konnte die Proteinbande von 67 kDa auf dem SDS-Gel nicht mehr beobachtet werden. Allerdings konnte nach einer Lagerungszeit von 16 Wochen eine etwas kleinere Proteinbande von ca. 59 kDa unterhalb der 60 kDa Proteinbande beobachtet werden. Es ist jedoch schwierig, diese beiden Banden auf dem Gel zu sehen, da die Unterschiede der Molekulargewichte sehr gering waren.

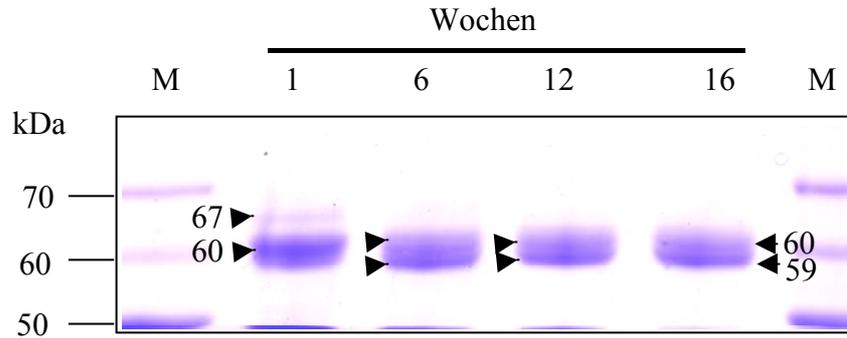


Abb. 21: Abbau des Cry1Ab-Toxins aus XL1-Blue/pBD140 während 16 Wochen bei 4°C Lagerung (M: BenchMark Protein Marker und MG in kDa an der linken Seite angegeben; 7%-iges Gel).

3.5.3 Vergleich der Bioaktivität des Toxins aus rekombinantem Cry1Ab und aus getrocknetem transgenem Mais

In diesem Versuch wurde die Möglichkeit geprüft, die Empfindlichkeit von *O. nubilalis* gegenüber Cry1Ab in Maispulver aus getrockneten Blättern der transgenen Maislinie Mon810 zu testen und mit der Empfindlichkeit gegenüber *E. coli* exprimiertem Cry1Ab zu vergleichen. Zunächst wurde die Cry1Ab-Menge in den gemahlene und getrockneten Blättern mittels ELISA (Quantiplate™-Kit) bestimmt. Sie betrug 5 µg/g Pulver. Um die Konzentration des Cry1Ab-Toxins im semi-synthetischen Medium in dem Bereich 0,025-0,45 µg/ml einzusetzen, wurden entsprechende Mengen von isogenem und transgenem Maispulver gemischt. Abbildung 22 zeigt, dass die höchste Mortalität von maximal ca. 10% bei Toxinkonzentrationen zwischen 0,325-0,45 µg/ml erreicht wurden. Zusätzliche Biotests zeigten, dass eine höhere Mortalität auch bei Verwendung höherer Mengen des transgenen Maispulvers nicht zu erzielen waren (Ergebnis nicht dargestellt).

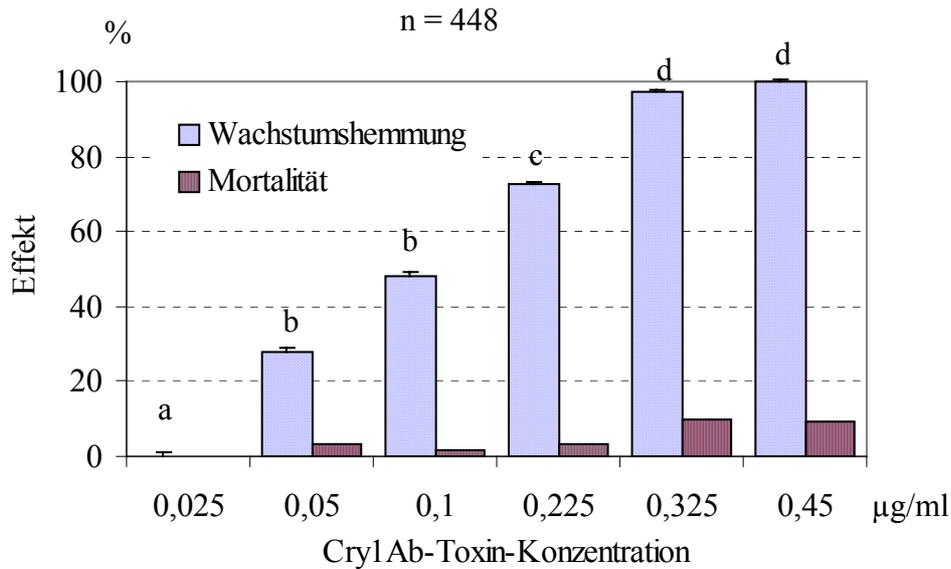


Abb. 22a: Vergleich der Mortalität und Wachstumshemmung des Maiszünslers *O. nubilalis* mit zunehmendem Anteil des getrockneten transgenen Maispulvers in Semi-synthetischem Medium (Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant mit $\alpha=0,05$, Scheffé's Test).

Hingegen konnten signifikante Unterschiede bei der Wachstumshemmung des Maiszünslers in diesem Biotest festgestellt werden (Abb. 22a und b). Mit zunehmender Toxinkonzentration nahm die Wachstumshemmung bezüglich des Gewichts der einzelnen Maiszünslerslarven zu. Das Wachstum der Larven wurde bei der Konzentration von 0,45 µg Toxin/ml vollständig gehemmt. Sieben Tage nach der Behandlung zeigten die Larven noch schwache Bewegungen, entwickelten sich allerdings nicht mehr weiter und verblieben im L1-Stadium. Bei weiterer Beobachtung zeigte sich, dass sich die Größe und das Gewicht der Larven bei den zwei höchsten Toxinkonzentrationsstufen bis zum 14. Tag nicht mehr veränderte (Abb. 22b). Zu diesem Zeitpunkt fing ein Teil des Mediums an zu schimmeln.

Trotz der niedrigen Mortalität, zeigte der Biotest mit der Verwendung des getrockneten Bt-Maispulvers eine vollständige Wachstumshemmung der Larven, so dass dies als eine Alternative zur Testung von Suszeptibilität und Resistenz geeignet ist.

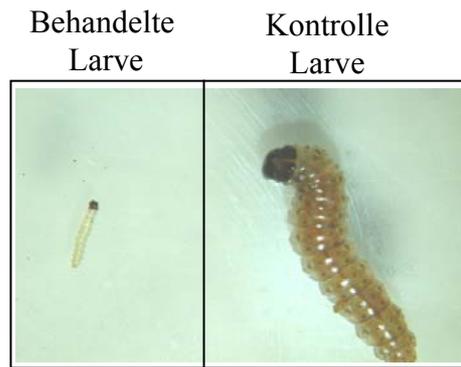


Abb. 22b: Wachstumshemmung der *O. nubilalis* Larven im zweiwöchigen Biotest mit transgenem Maispulver. Links: Larve auf Bt-Maispulver (0,09 g Maispulver/ml Medium). Rechts: Larve auf Kontrollmedium mit isogenem Bt-Maispulver.

B. Analyse transgener Maispflanzen der Linien Mon810 und Bt176 an zwei Versuchsstandorten in Deutschland - Saison 2001 bis 2003

Der zweite Schwerpunkt der Arbeit beinhaltet ein quantitatives Expressionsmonitoring des Cry1Ab-Toxins in unterschiedlichen Pflanzenorganen der transgenen Maislinien Mon810 und Bt176. Die Quantifizierung der Cry1Ab-Expression erfolgte zu den Entwicklungsstadien EC20, EC30, EC60, EC80 in den drei aufeinander folgenden Versuchsjahren 2001 bis 2003 mittels DAS-ELISA, um das Expressionsmuster von Cry1Ab in den verschiedenen Bt-Mais-Linien unter mitteleuropäischen Freilandbedingungen zu erfassen.

3.6 Immunologischer Nachweis des Cry1Ab-Toxins in transgenen Maispflanzen

3.6.1 Immunoblot mit polyklonalem und monospezifischem Antikörper

Zunächst wurde untersucht, inwiefern sich Immuno-Blotting mit pAK-NTH1 und den monospezifischen pAK (msAK-NTH1 und msAK-NTH2) eignet, um Cry1Ab in transgenen Maispflanzen zu detektieren. Getestet wurden Proteinextrakte aus Blättern der Maislinien Mon810 und Bt176. Die Proteinextraktion wurde mit der Aceton-Fällung durchgeführt. In diesem Versuch wurden 1/7 des Volumens des gesamten Proteinextrakts aus einem Gramm Maisblatt pro Spur aufgetragen. Die Toxinmengen pro Spur im SDS-Gel wurden anhand der mittels DAS-ELISA des QuantiplateTM-Kits ermittelten Toxingehalte in 1 g Blattmaterial errechnet. Als Negativkontrollen dienen die Proteinextrakte der entsprechenden isogenen Sorten Nobilis bzw. Prelude. Das aus *E. coli* gereinigte Cry1Ab-Protoxin (130 kDa) und das aktive Cry1Ab-Toxin (60 kDa) wurden als Positivkontrollen verwendet.

Mon810 und Bt176 exprimieren C-terminal verkürzte Cry1Ab-Protoxine von 92 kDa bzw. 65 kDa (Monsanto Corn, 1995 in Freese, 2001; Essential Biosafety, 2001). Wie aus Abb. 23A und B ersichtlich, konnte in den transgenen Maislinien nur eine Bande von 60 kDa detektiert werden. Diese war auch in den isogenen Linien vorhanden und dürfte eine unspezifische Reaktion mit einem pflanzlichen Protein sein. Die Immunoblots der

Proteinextrakte mittels einer Ammoniumsulfat-Fällungs-Methode zeigten ähnliche Ergebnisse wie in Abb. 23A (Ergebnisse nicht dargestellt).

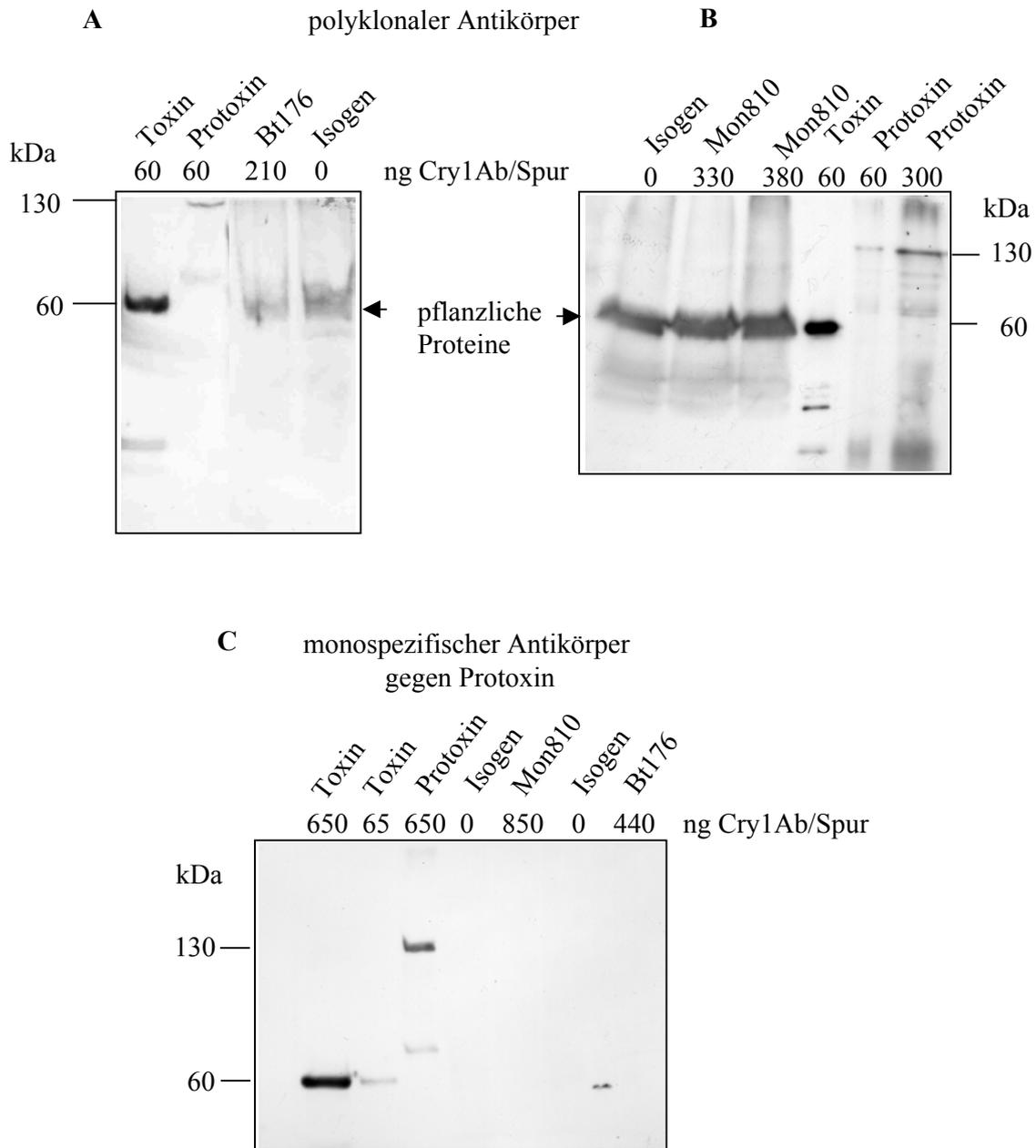


Abb. 23: Nachweis des Cry1Ab-Toxins in den transgenen Maislinien **(A)** Bt176 und **(B)** Mon810 mittels Western-Blot mit pAK-NTH1 (1/6000) und **(C)** dem msAK-NTH2 (1/1000) gegen Cry1Ab-Toxin. Die MG des aus *E. coli* gereinigten Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins sind an der linken Seite der Abbildung angegeben. Expositionsdauer: **A:** 5 min, **B** und **C:** 10 min. **A, B:** 10%-iges SDS-Gel; **C:** 7%-iges SDS-Gel.

Bei dem Immunoblotting mit dem monospezifischen AK gegen das aktive Cry1Ab-Toxin war die unspezifische Bande des Pflanzenproteins nicht mehr zu sehen (Abb. 23C). Trotz des starken Signals des Cry1Ab-Toxins und des schwächeren Signals des aus *E. coli* gereinigten Cry1Ab-Protoxins im Blot, konnte das Cry1Ab-Toxin aus transgenen Pflanzenproben weder bei der Linie Mon810 noch bei Bt176 detektiert werden.

3.6.2 Immunoblot mit monoklonalen Antikörpern

Walschus *et al.* (2002) entwickelten monoklonale Antikörper (Klone 3A11C3, 2C4G11 und 3E7E9) und konnten im ELISA eine Nachweisgrenze von 0,4 ng/ml Cry1Ab ermitteln. Diese drei mAKs wurden über eine Protein-G-Säule aus Acitesflüssigkeit gereinigt und in Western-Blots zur Detektion verschiedener Cry1Ab-Varianten getestet. Abbildung 24 stellt exemplarisch einen Immunoblot dar, bei dem der mAK 3A11C3 verwendet wurde. Auf dem Blot waren neben *E. coli* exprimiertem Cry1Ab-Protein die Extrakte aus frischem Pflanzenmaterial sowie die Extrakte aus getrocknetem Pflanzenmaterial der transgenen Linie Mon810 (Novelis) und ihrer isogenen Sorte (Nobilis). Bei den frischen Proben wurde die Proteinextraktion mit der Aceton-Fällungs-Methode durchgeführt. Die Proteine aus getrockneten Proben wurden im Extraktionspuffer des Quantiplate™-Kits extrahiert.

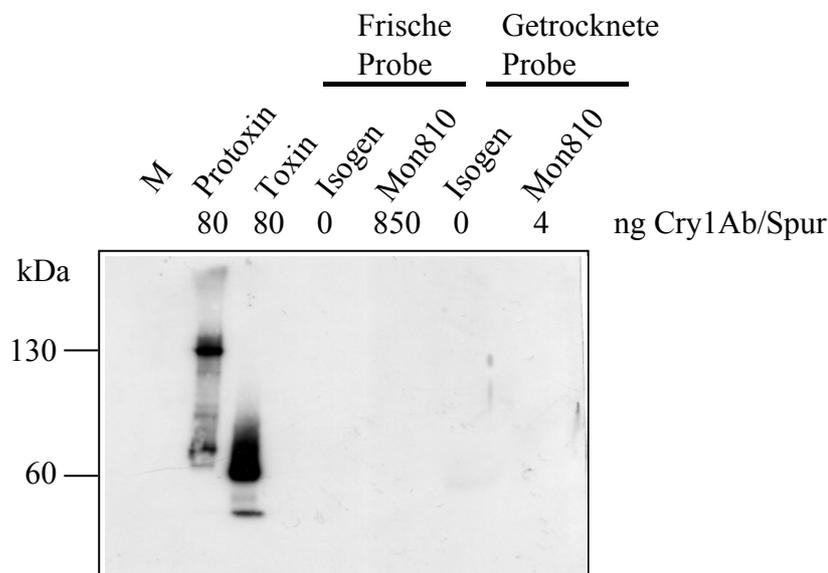


Abb. 24: Immunoblot des rekombinanten Cry1Ab-Toxins aus *E. coli* und aus den frischen und getrockneten transgenen Maispflanzen der Linie Mon810 mit dem mAK 3A11C3 (1/1000) gegen das Cry1Ab-Toxin (Expositionsdauer: 15 min; 7%-iges SDS-Gel).

Im Blot war die Intensität der Bande des Cry1Ab-Toxins wiederum stärker als die des Protoxins. Der mAK 3A11C3 konnte Cry1Ab in den Proteinextrakten der Linie Mon810 weder im frischen noch im getrockneten Pflanzenmaterial detektieren. Bei der Negativkontrolle (isogene Pflanzen) waren erwartungsgemäß keine Banden erkennbar. Die Immunoblots mit den mAKs 2C4G11 und 3E7E9 waren mit dem Blot in Abb. 24 identisch (Ergebnisse nicht dargestellt). Somit wurden mit den mAKs ähnliche Ergebnisse wie mit dem pAK gefunden: Alle AKs waren in der Lage, *E. coli* exprimiertes Cry1Ab-Protoxin und -Toxin zu binden, doch zeigten sie keine Reaktion mit Proteinextrakten aus transgenem Mais.

3.6.3 Einfluss des Pflanzenextraktes auf die Affinität des Antikörpers und des Cry1Ab-Toxins

Nachdem die Proteinextrakte aus transgenem Mais keine Reaktion mit den AKs gezeigt hatten, wurde untersucht, ob der Pflanzenextrakt die Reaktion zwischen dem Cry1Ab-Toxin und dem AK beeinflusst. Hierzu wurde ein variierendes Volumen des Pflanzenproteinextraktes (5, 10, 15, 20 μ l, entsprechend 7, 14, 21 und 28 ng Toxin) mit einer konstanten Menge des *E. coli* exprimierten Cry1Ab-Toxins (650 ng) gemischt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet und mit dem monospezifischen pAK detektiert.

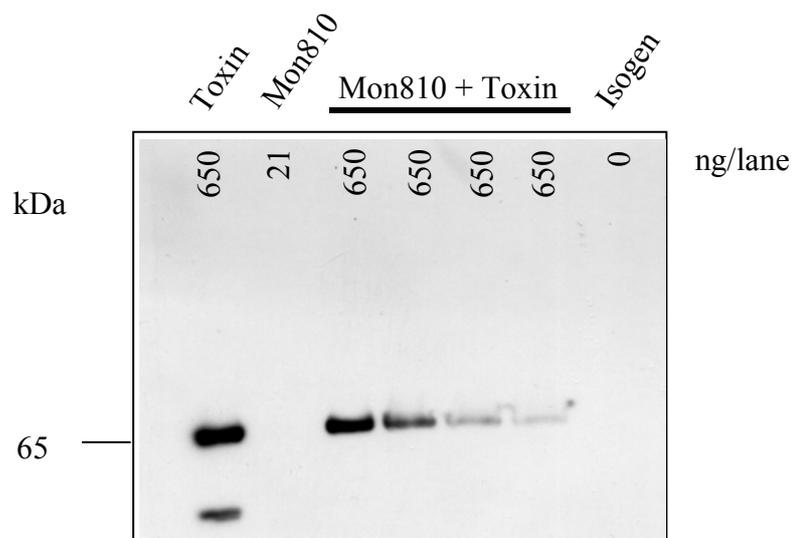


Abb. 25: Prüfung des Nachweises des aktiven Cry1Ab-Toxins nach Einmischen in verschiedene Mengen von Pflanzenproteinextrakten im Western-Blot mit msAK-NTH2 (1/1000) (Expositionszeit: 15 min).

Wie in Abb. 25 dargestellt, nahm die Intensität der Cry1Ab-Toxinbande mit steigender Menge zugemischtem Pflanzenextrakt stetig ab. Bei 28 ng zugemischtem pflanzlichen Proteinextrakt war das Cry1Ab-spezifische Signal fast völlig verschwunden. Auch im Proteinextrakt aus Mon810 war kein Signal detektierbar. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass es eine Interaktion zwischen Cry1Ab und pflanzlichem Proteinextrakt gibt, die zum Verlust des Cry1Ab-spezifischen Signals führt.

3.6.4 Test des optimierten indirekten ELISA mit transgenem Pflanzenmaterial

Anhand der Ergebnisse des optimierten indirekten ELISA-Tests in Kap. 3.3 sollte ein ELISA-Test etabliert werden, um die Reaktion zwischen dem pAK und dem Cry1Ab-Toxin in den transgenen Maislinien Mon810 und Bt176 zu erfassen. Als Negativkontrolle dienten Proteinextrakte aus isogenen Maislinien. Die ELISA-Untersuchungen zeigten eine Reaktion des pAK mit Extrakten aus den isogenen Sorten Nobilis und Prelude, wie es bereits im Western-Blot (Kap. 3.6.1) zu beobachten war (Ergebnisse nicht dargestellt). Daher wurde in den weiteren Untersuchungen zum Expressionsmonitoring des Cry1Ab im transgenem Mais der kommerziell erhältliche Quantiplate™-Kit verwendet.

3.7 Expressionsmonitoring von Cry1Ab in den Maislinien Mon810 und Bt176

In den Versuchsjahren 2001 bis 2003 wurden an den Standorten Bonn und Halle insgesamt 2023 Gewebeproben der transgenen Linien Mon810 (Novelis) und Bt176 (Valmont) und ihrer isogenen Sorten Nobilis und Prelude entnommen (Tab. 8a, 8b und 8c).

Tab. 8a: Anzahl der Gewebeproben der Maislinien Mon810 am Standort Bonn (2001 bis 2003)

Mon810	Anzahl der Proben am Standort Bonn pro Jahr		
	2001	2002	2003
Entwicklungsstadium			
EC20	54	54	27
EC30	72	72	36
EC60	90	90	54
EC80	90	90	54
Summe	306	306	171

Während in den Versuchsjahren 2002 und 2003 die Gewebeproben einzelner Pflanzen als verbundene Stichprobe entnommen und behandelt wurden, war es im Versuchsjahr 2001 aus probenahmetechnischen Gründen nicht möglich, die verschiedenen Gewebeprobe jeweils einer bestimmten Pflanze zuzuordnen (unverbundene Stichproben). Jede Pflanzenprobe wurde entsprechend der Herstellerangaben des Quantiplate™-Kits extrahiert und quantifiziert. Bei der statistischen Auswertung wurden alle Pflanzen (ca. 9% von den gesamten Pflanzenproben der drei Versuchsjahre 2001 bis 2003), in denen kein Toxin in allen Gewebe nachgewiesen werden konnte, nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund variierte die Probenanzahl zwischen den verschiedenen EC und Jahren.

Tab. 8b: Anzahl der Gewebeproben der Maislinien Mon810 und Bt176 am Standort Halle (2001 bis 2003)

Anzahl der Proben am Standort Halle pro Jahr						
Entwicklungsstadium	2001		2002		2003	
	Mon810	Bt176	Mon810	Bt176	Mon810	Bt176
EC20	42	42	42	42	21	21
EC30	56	56	56	56	28	28
EC60	70	70	70	70	36	36
EC80	70	70	70	70	42	42
Summe	238	238	238	238	127	127

Tab. 8c: Anzahl der Wurzelreste der Saison 2001 und 2002

Probenahme im Jahr 2002		Probenahme im Jahr 2003	
Standort Bonn		Standort Bonn	Standort Halle
Mon810		Mon810	Bt176
2		18	14

3.7.1 Cry1Ab-Expression in Mon810

3.7.1.1 Standort Bonn

3.7.1.1.1 Vergleich der Cry1Ab-Gehalte zwischen den Entwicklungsstadien

Die Cry1Ab-Gehalte in den verschiedenen Geweben (Wurzel, Stängel, Blatt, Antheren, Pollen und Kolben) verschiedener Entwicklungsstadien (EC20, EC30, EC60, EC80) in den drei Jahren 2001 bis 2003 der Linie Mon810 sind in Abb. 26 A-F dargestellt. Als Negativkontrolle dienten die Pflanzenproben aus der isogenen Sorte Nobilis. In allen genommenen Negativkontrollen konnten mittels ELISA-Test keine Cry1Ab-Gehalte nachgewiesen werden (Extinktionswerte $<0,1$) und wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Expression des Cry1Ab-Toxins in den Wurzeln war im Laufe der Vegetationsperiode weitgehend konstant und betrug zwischen 1,1-1,8 $\mu\text{g/g}$ FG. Die Cry1Ab-Gehalte in den EC20 bis 80 unterschieden sich, abgesehen vom EC30 der Saison 2002, nicht signifikant voneinander (Scheffe's Test; $\alpha=0,05$), (Abb. 26A, große Buchstaben).

In den Stängeln stieg der durchschnittliche Cry1Ab-Gehalt in allen Versuchsjahren während der Vegetationsperiode kontinuierlich an. Im EC80 war er doppelt bis dreifach höher als im EC20 bzw. EC30 desselben Jahres (Scheffe's Test; $\alpha=0,05$), (Abb. 26B).

Im unteren Blatt war die Cry1Ab-Expression im Laufe der Vegetation unterschiedlich. Zwischen EC30 und EC60 ergab sich kein signifikanter Unterschied der Toxingehalte (Abb. 26C, große Buchstaben). Die durchschnittliche Cry1Ab-Konzentration im EC60 war halb so hoch wie in den früheren und späteren Entwicklungsstadien EC30 und EC80. Dies könnte zum Teil durch den physiologischen Zustand der Proben bedingt sein.

Im oberen Blatt schwankten die Toxinexpressionen zwischen EC20, EC30 und EC60, unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander (außer zwischen EC30 und EC60 des Jahres 2001) (Abb. 26D, große Buchstaben). Eine signifikante Zunahme der Toxingehalte im EC80 wurde im oberen Blatt der drei Versuchsjahre festgestellt. Der Cry1Ab-Gehalt war im EC80 ca. 1,5-4fach höher als im EC20 desselben Jahres.

Insgesamt war die Expression des Cry1Ab in den Blättern gegenüber den anderen Pflanzengewebe am höchsten.

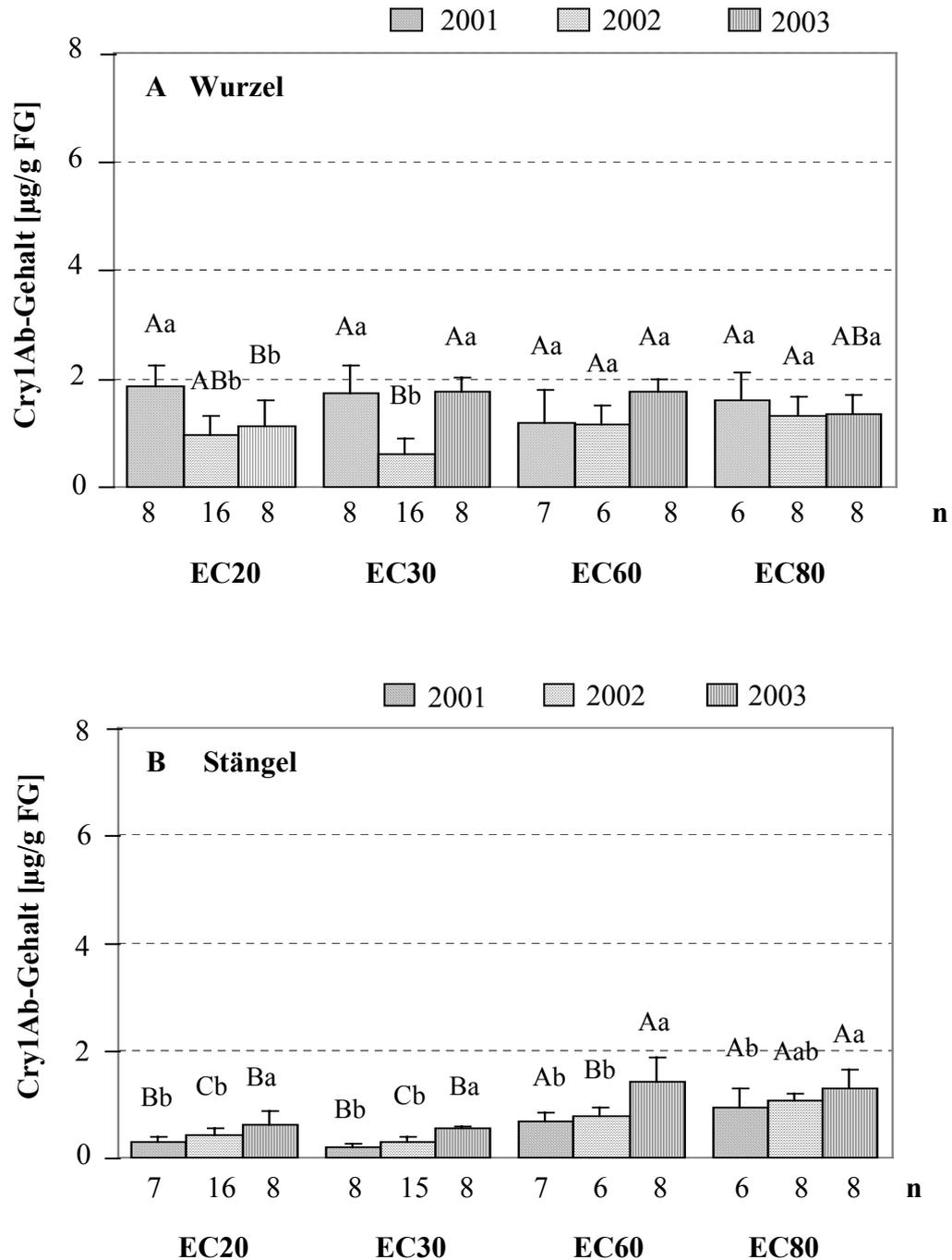


Abb. 26: **A:** Cry1Ab-Gehalte der Maislinie Mon810 am Standort Bonn in den Versuchsjahren 2001-2003 in den Wurzeln; **B:** Cry1Ab-Gehalte im Stängel. Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant mit Scheffe's Test; $\alpha=0,05$. Die großen Buchstaben indizieren den Unterschied der Cry1Ab-Expression in den verschiedenen EC getrennt nach Jahr und Pflanzengewebe. Die kleinen Buchstaben indizieren den Unterschied der Cry1Ab-Expression zwischen den Jahren 2001 bis 2003 nach EC und Pflanzengewebe (Fehlerbalken: STABW; n: Anzahl der Proben).

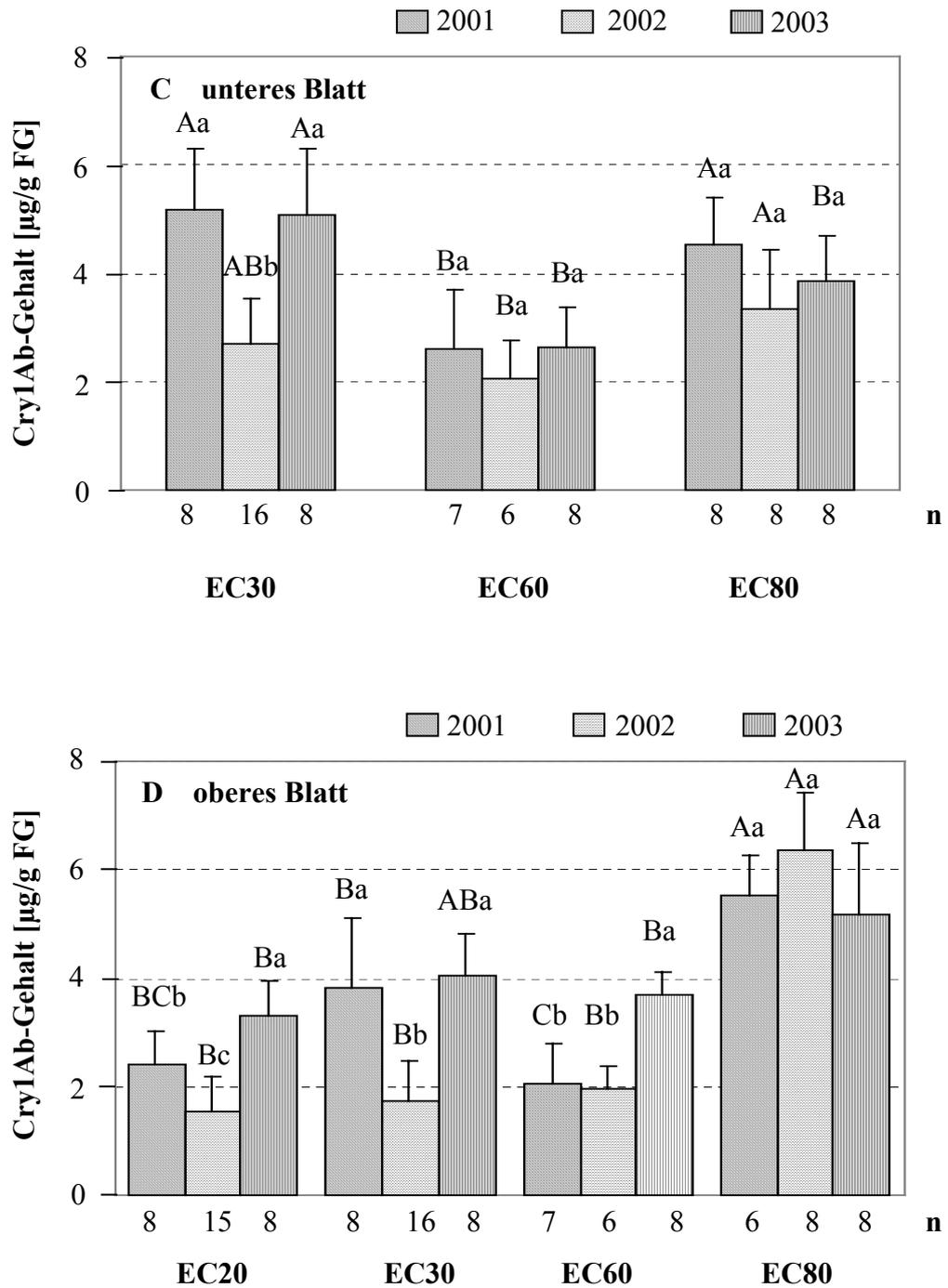


Abb.26 (Fortsetzung) **C:** Cry1Ab-Gehalte der Maislinie Mon810 am Standort Bonn im unteren Blatt; **D:** Cry1Ab-Gehalte im oberen Blatt (Legende siehe Abb. 26A und B).

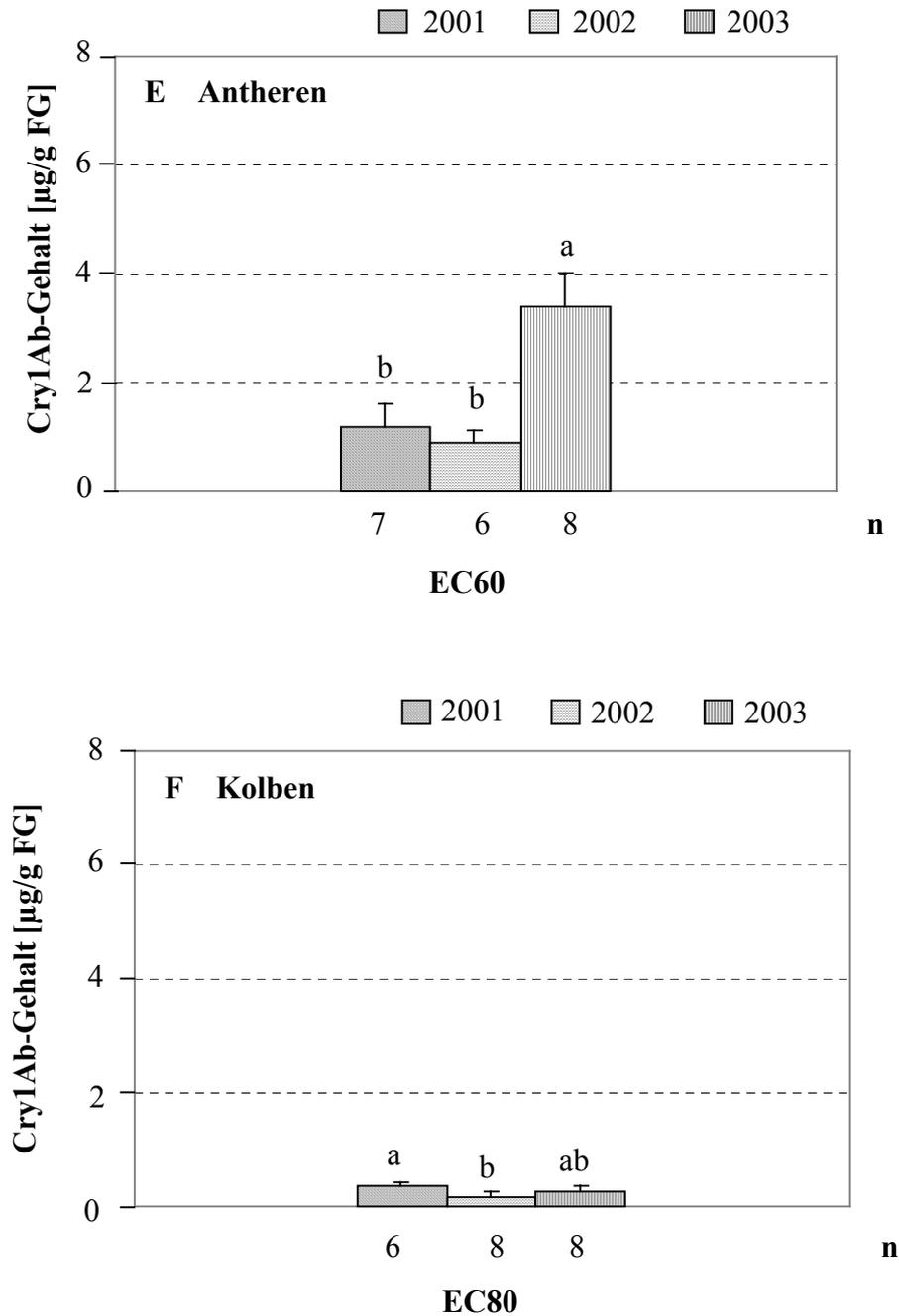


Abb. 26 (Fortsetzung) E: Cry1Ab-Gehalte der Maislinie Mon810 am Standort Bonn in den Antheren; F: Cry1Ab-Gehalt im Kolben (Legende siehe Abb. 26A und B).

3.7.1.1.2 Vergleich der Cry1Ab-Gehalte zwischen den Versuchsjahren

In den Wurzeln wurde das Cry1Ab-Toxin sowohl bei verschiedenen Entwicklungsstadien als auch in den verschiedenen Jahren annähernd in gleicher Menge exprimiert. Eine Ausnahme war im Jahr 2002 (EC20 und EC30) und im Jahr 2003 (EC20) zu sehen, als der Gehalt des Cry1Ab-Toxins etwas geringer war (0,6-1,1 $\mu\text{g/g FG}$ und 0,9 $\mu\text{g/g FG}$). Dieser

Unterschied konnte statistisch signifikant gegenüber der Saison 2001 (EC20 und EC30) abgesichert werden (Abb. 26A, kleine Buchstaben).

In den Stängeln war der Cry1Ab-Gehalt im Jahr 2003 während der ganzen Vegetationsperiode signifikant höher als in den Jahren 2001 und 2002 (Abb. 26B, kleine Buchstaben).

Aus Abb. 26C ist ersichtlich, dass der Toxingehalt im unteren Blatt des Jahres 2002 in drei EC30, EC60 und EC80 in der Tendenz niedriger war als im Jahr 2001 und 2003. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nur im EC30 abgesichert werden.

Im oberen Blatt war der Cry1Ab-Gehalt im Jahr 2002 bei EC20 und EC30 signifikant geringer als in den gleichen EC der Jahre 2001 und 2003. Im EC60 waren die Cry1Ab-Gehalte im Jahr 2003 mit 3,68 µg/g FG signifikant höher als im Jahr 2001 (2,07 µg/g FG) und 2002 (1,97 µg/g FG). Im EC80 konnte kein Unterschied zwischen den Jahren gemessen werden (Abb. 26D).

In den Antheren lag der Cry1Ab-Gehalt im Jahr 2003 um 3,4 µg/g FG und war somit ca. zwei- bis dreifach höher als im Jahr 2001 und 2002 (Abb. 26E).

In den Kolben war der Toxin-Gehalt in den Jahren 2002 und 2003 geringer als im Jahr 2001. Statistisch abgesichert werden konnte jedoch lediglich der Toxin-Gehalt des Jahres 2002 im Vergleich zu 2001 (Abb. 26F).

3.7.1.1.3 Korrelation der Cry1Ab-Gehalte innerhalb einer einzelnen Pflanze

Um zu überprüfen, ob die Expression des Toxins in den verschiedenen Geweben einer Pflanze miteinander korreliert, wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson mit der SAS-Prozedur CORR durchgeführt. Tabelle 9 enthält die ausgewerteten Korrelationskoeffizienten zwischen der Cry1Ab-Expression in der Wurzel, dem Stängel und dem unteren und oberen Blatt in den beiden Versuchsjahren 2002 und 2003. Die Daten von 2001 wurden nicht verrechnet, da die verschiedenen Pflanzengewebe nicht jeweils einer bestimmten Pflanze zugeordnet werden konnten, weshalb keine verbundene Stichprobe vorlag. Da der Toxingehalt im oberen Blatt in allen vier Entwicklungsstadien bestimmt wurde und sein Variationskoeffizient niedriger als in anderen Gewebeproben war, wurde das obere Blatt als Bezugspunkt für die Korrelationsanalyse verwendet. Die Ergebnisse in Tab. 10 zeigen, dass nur in drei der 22 Untersuchungsglieder, nämlich in

Wurzel (2002, EC80), Stängel (2002, EC20) und unteres Blatt (2003, EC30), eine Korrelation mit dem Cry1Ab-Gehalt des oberen Blattes vom selben Jahr und EC nachgewiesen werden konnte. In den meisten Fällen konnte keine Korrelation zwischen den Cry1Ab-Gehalten in den verschiedenen Pflanzenteilen ermittelt werden.

Tab. 9: Korrelation der Cry1Ab-Expression (nach Frischgewicht) in den einzelnen Pflanzen. Der Bezugspunkt war jeweils das obere Blatt in den beiden Jahren 2002 und 2003 (nach t-Test; a: Korrelationskoeffizient; b: Wahrscheinlichkeitsrate nicht korreliert; c: Anzahl der Beobachtungen)

Wachstumsstadium	Pearson Korrelation	Bonn, 2002			Bonn, 2003		
		Wurzel	Stängel	unteres Blatt	Wurzel	Stängel	unteres Blatt
EC20	a	0,054	0,572		0,474	0,224	
	b	0,848	0,025		0,235	0,594	
	c	15	15		8	8	
EC30	a	0,154	0,183	-0,148	-0,376	0,415	0,867
	b	0,57	0,513	0,583	0,359	0,306	0,005
	c	16	15	16	8	8	8
EC60	a	-0,227	0,319	0,084	-0,026	-0,111	0,272
	b	0,665	0,538	0,874	0,951	0,792	0,515
	c	6	6	6	8	8	8
EC80	a	0,804	-0,251	-0,357	0,126	0,14	0,086
	b	0,016	0,548	0,384	0,766	0,741	0,839
	c	8	8	8	8	8	8

3.7.1.2 Standort Halle

3.7.1.2.1 Vergleich der Cry1Ab-Gehalte zwischen den Entwicklungsstadien

Bei der Quantifizierung der Cry1Ab-Gehalte in verschiedenen Maisgeweben der Linie Mon810 in vier Entwicklungsstadien am Standort Halle zeigten sich folgende Ergebnisse:

Die Toxingehalte der Wurzelproben lagen zwischen 0,8-2,8 µg/g FG. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Cry1Ab-Gehalten der vier Wachstumsstadien

jeder Saison (2001 bis 2003) beobachtet (Scheffe's Test, $\alpha=0,05$), (Abb. 27A, große Buchstaben).

In den Stängeln war der Toxingehalt im EC20 der Jahre 2001 und 2002 geringfügig höher als im EC30. Dieser Unterschied wurde statistisch abgesichert (Abb. 27B, große Buchstaben). Ab EC30 bis EC80 nahm der Cry1Ab-Gehalt in allen drei Jahren stetig zu. Zum späteren Entwicklungsstadium EC80 war er am höchsten (0,86-1,97 $\mu\text{g/g}$ FG).

Aus Abb. 27C ist ersichtlich, dass der Cry1Ab-Gehalt im unteren Blatt im EC80 des Jahres 2001 gegenüber EC30 und EC60 signifikant erhöht war. Im Jahr 2002 konnte dieser Unterschied nur zwischen EC30 und EC80 festgestellt werden. Ein annähernd konstanter durchschnittlicher Toxingehalt fand sich in allen drei EC30, EC60 und EC80 des Jahres 2003. Er betrug ca. 5,5-5,9 $\mu\text{g/g}$ FG. Allerdings variierte der Wert der einzelnen Proben innerhalb des EC80 im Jahr 2003 sehr stark (zwischen 1,4-9,6 $\mu\text{g/g}$ FG).

Im oberen Blatt war der Toxingehalt in den drei Jahren im EC80 ca. 1,6-2fach höher als im EC20 desselben Jahres. Signifikante Unterschiede konnten jedoch nur in den zwei Jahren 2002 und 2003 festgestellt werden (Abb. 27D). Wie beim unteren Blatt schwankte der Gehalt in den einzelnen oberen Blattproben im EC80 ebenfalls sehr stark, der höchste Wert lag bei 11 $\mu\text{g/g}$ FG (2002).

Insgesamt ergaben sich an dem Standort Halle die gleichen Cry1Ab-Expressionsmuster der Maislinie Mon810 wie am Standort Bonn.

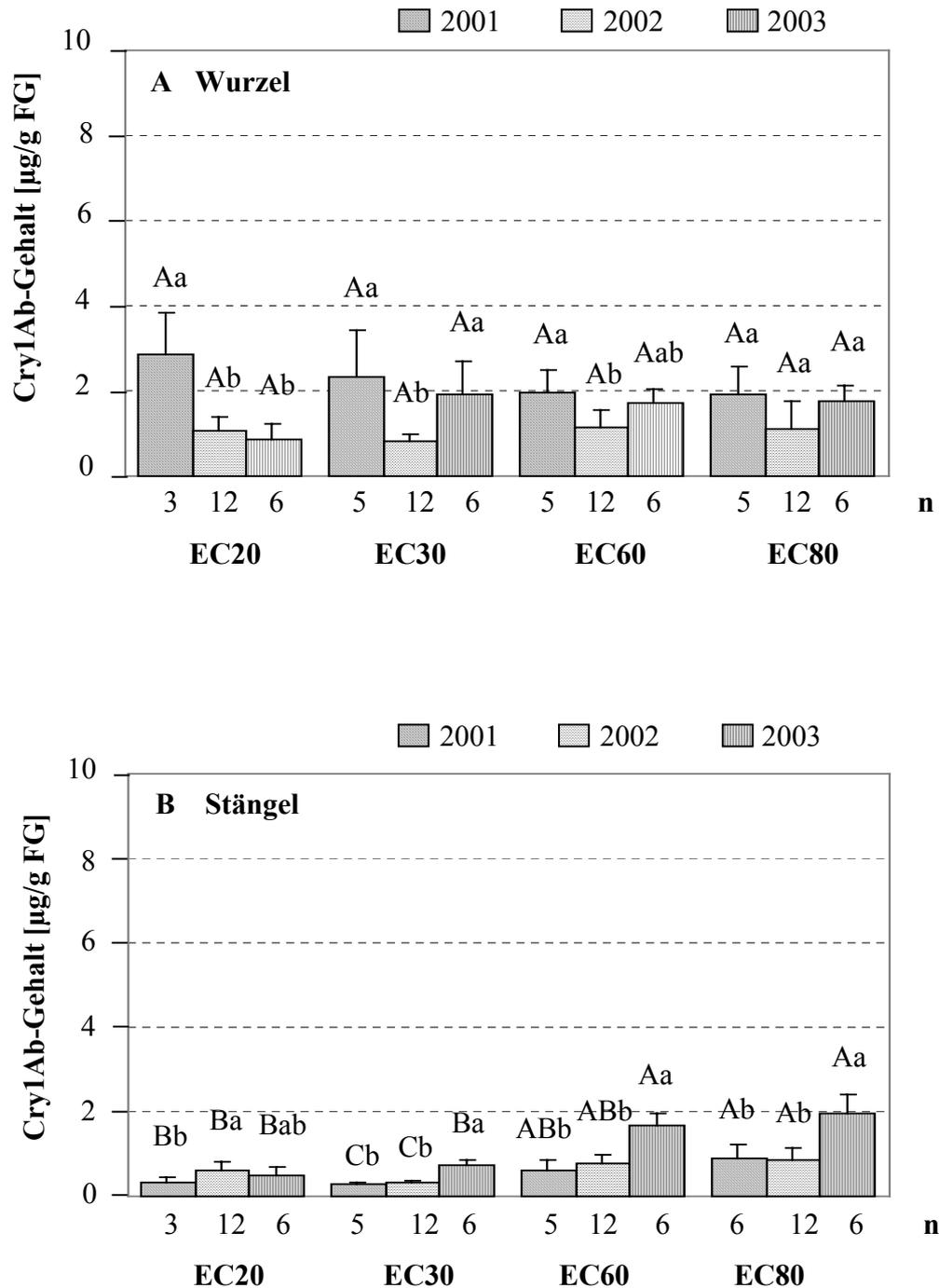


Abb. 27: **A:** Cry1Ab-Gehalte der Maislinie Mon810 am Standort Halle in den Versuchsjahren 2001 bis 2003 in den Wurzeln; **B:** Cry1Ab-Gehalte im Stängel. Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant mit Scheffé's Test; $\alpha=0,05$. Die großen Buchstaben indizieren den Unterschied der Cry1Ab-Expression in den verschiedenen EC getrennt nach Jahr und Pflanzengewebe. Die kleinen Buchstaben indizieren den Unterschied der Cry1Ab-Expression zwischen den Jahren 2001 bis 2003 nach EC und Pflanzengewebe (Fehlerbalken: STABW; n: Anzahl der Proben).

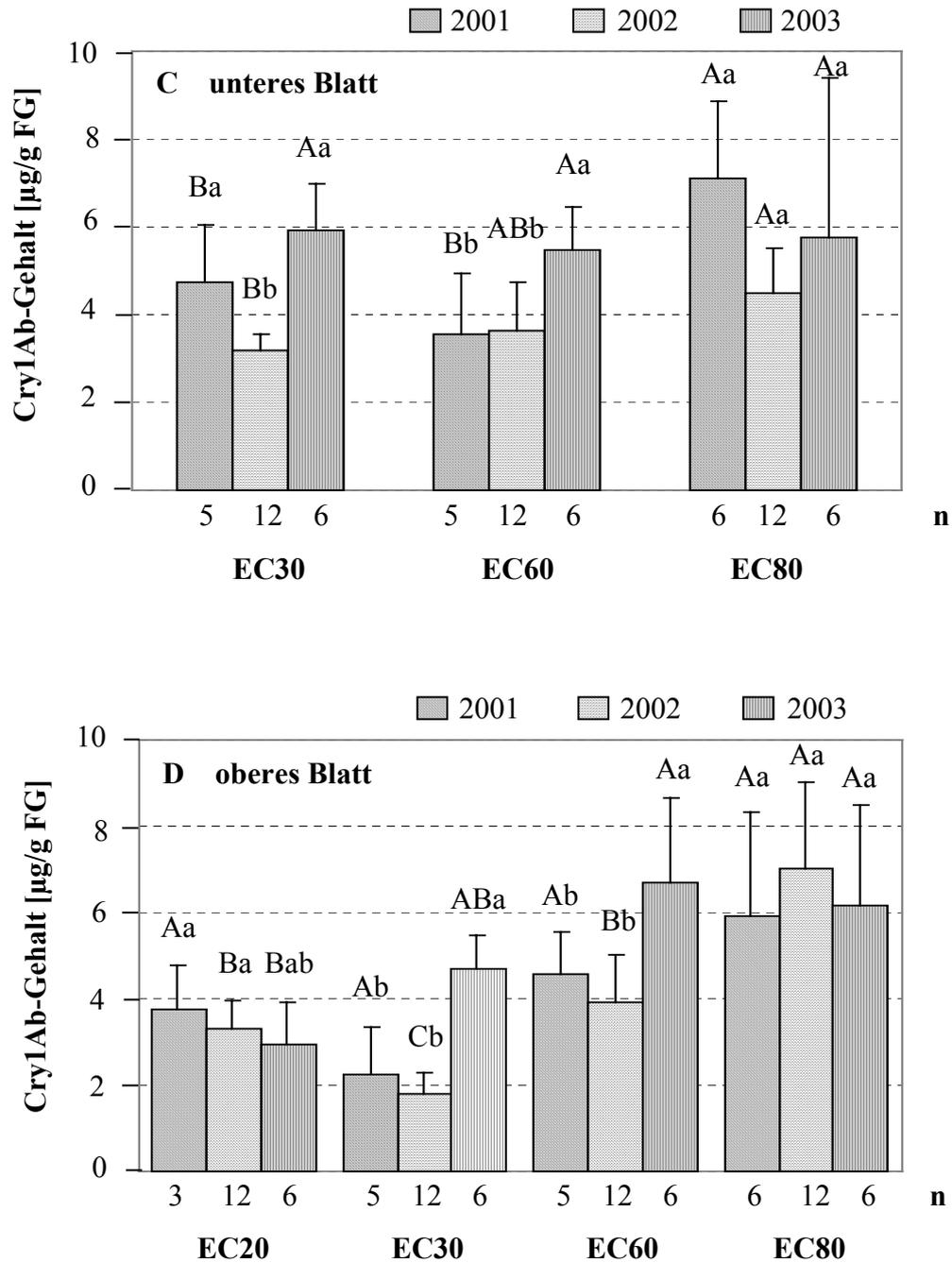


Abb. 27 (Fortsetzung) **C:** Cry1Ab-Gehalte der Maislinie Mon810 am Standort Halle im unteren Blatt; **D:** Cry1Ab-Gehalte im oberen Blatt (Legende siehe Abb. 27A und B)

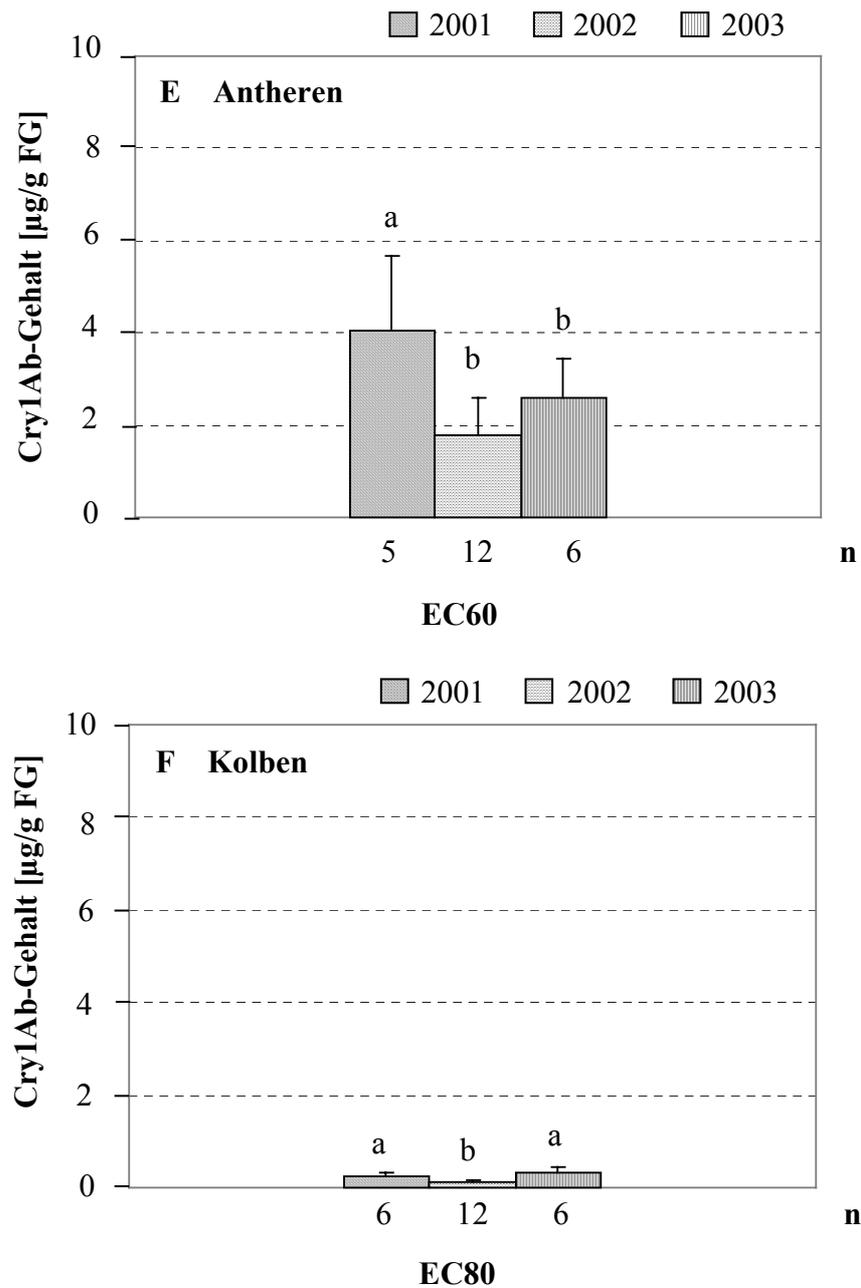


Abb. 27 (Fortsetzung) **E:** Cry1Ab-Gehalte der Maislinie Mon810 am Standort Halle in den Antheren; **F:** Cry1Ab-Gehalte in Kolben (Legende siehe Abb. 27A und B).

3.7.1.2.2 Vergleich der Cry1Ab-Gehalte zwischen den Versuchsjahren

Beim Vergleich der Toxingehalte (Mon810, Standort Halle) zwischen den Jahren 2001 bis 2003 zeigte sich folgendes Bild:

Der Cry1Ab-Gehalt der Wurzeln betrug im Jahr 2001 zwischen 1,9-2,8 $\mu\text{g/g FG}$ und lag häufig höher als in den beiden Jahren 2002 und 2003 (0,8-1,1 $\mu\text{g/g FG}$ und 0,8-1,7 $\mu\text{g/g}$

FG). Für EC20 konnte lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen den Jahren 2001 (2,87 µg/g FG) und 2002 (1,07 µg/g FG) bzw. 2003 (0,84 µg/g FG) festgestellt werden (Abb. 27A, kleine Buchstaben).

In den Stängeln waren die Toxingehalte in den EC30, EC60 und EC80 des Jahres 2003 signifikant höher als in den Versuchsjahren 2001 und 2002, deren Gehalte sich nicht voneinander unterschieden. Im Jahr 2002 war der Cry1Ab-Gehalt im EC20 (0,59 µg/g FG) signifikant höher als im Jahr 2001 (0,31 µg/g FG), jedoch unterschied er sich nicht von dem des Jahres 2003 (0,48 µg/g FG) (Scheffe's Test; $\alpha=0,05$), (Abb. 27B).

Im Jahr 2002 war der Toxingehalt im unteren Blatt in den EC30 und EC60 signifikant geringer als in den Jahren 2001 und 2003. Der durchschnittliche Cry1Ab-Gehalt des unteren Blattes im EC80 variierte zwischen 4,48 µg/g FG (2002) und 7,1 µg/g FG (2001), ein signifikanter Unterschied der Cry1Ab-Gehalte dieser Jahre konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abb. 27C, kleine Buchstaben).

Im oberen Blatt lag der Cry1Ab-Gehalt im EC 20 der Jahre 2001 und 2002 geringfügig höher als der des Jahres 2003 (1,1-1,3fach). In den EC30 und EC60 waren die Toxingehalte des Jahres 2003 signifikant höher als in den Jahren 2001 und 2002. Im EC80 konnte kein signifikanter Unterschied in den drei Versuchsjahren beobachtet werden (Abb. 27D).

Der Cry1Ab-Gehalt in den Antheren betrug im Durchschnitt im Jahr 2002 bis zu 1,78 µg/g FG. Er unterschied sich signifikant von dem Toxingehalt des Jahres 2001, jedoch nicht signifikant von dem Toxingehalt des Jahres 2003 (Abb. 27E). Der geringste Cry1Ab-Gehalt wurde in den Kolben quantifiziert, wobei sich in den Kolben des Jahres 2002 (0,12 µg/g FG) ein signifikanter Unterschied zu den Gehalten der Jahre 2001 (0,26 µg/g FG) und 2003 (0,34 µg/g FG) zeigte (Abb. 27F).

3.7.1.2.3 Korrelation der Cry1Ab-Gehalte innerhalb einer einzelnen Pflanze

Die Korrelationsanalyse der Toxingehalte in den verschiedenen Pflanzengeweben der Jahre 2002 und 2003 mit dem Bezugspunkt „oberes Blatt“ zeigte, dass nur in einem der 22 Untersuchungsglieder, nämlich unteres Blatt, EC60, eine Korrelation gefunden wurde (Tab. 10). Im Jahr 2003 wurden in den meisten Entwicklungsstadien und im Pflanzengewebe Korrelationskoeffizienten zwischen 0,58 und 0,73 gefunden, jedoch konnte

aufgrund der Wahrscheinlichkeitsraten einer Nicht-Korrelation ($>0,05$) eine Korrelation der Toxingehalte statistisch nicht nachgewiesen werden. Tendenziell lag keine Korrelation zwischen der Cry1Ab-Expression im oberen Blatt und den anderen Pflanzenteilen in der gleichen Pflanze vor.

Tab. 10: Vertikale Korrelation der Cry1Ab-Expression (nach Frischgewicht) in den verschiedenen Pflanzengeweben der Linie Mon810 am Standort Halle. Der Bezugspunkt war das obere Blatt der beiden Jahre 2002 und 2003 (nach t-Test; a: Korrelationskoeffizient; b: Wahrscheinlichkeitsrate nicht korreliert; c: Anzahl der Beobachtungen)

Wachstumsstadium	Pearson Korrelation	Halle, 2002			Halle, 2003		
		Wurzel	Stängel	unteres Blatt	Wurzel	Stängel	unteres Blatt
EC20	a	-0,499	-0,367		0,065	0,58	
	b	0,099	0,24		0,903	0,227	
	c	12	12		6	6	
EC30	a	-0,495	0,138	0,19	0,579	0,73	0,346
	b	0,101	0,67	0,553	0,229	0,1	0,501
	c	12	12	12	6	6	6
EC60	a	0,249	-0,249	0,617	0,642	0,473	0,64
	b	0,435	0,433	0,033	0,169	0,343	0,171
	c	12	12	12	6	6	6
EC80	a	0,006	-0,263	0,185	0,601	0,688	0,731
	b	0,985	0,408	0,564	0,207	0,131	0,098
	c	12	12	12	6	6	

3.7.1.2.4 Vergleich der Cry1Ab-Gehalte in Mon810 zwischen den Standorten Bonn und Halle

Um zu überprüfen, ob ein Einfluss verschiedener geographischer Standorte auf die Cry1Ab-Expression in den gleichen transgenen Maissorten bestand, wurden die Cry1Ab-Gehalte von Mon810 in den einzelnen Pflanzenorganen der verschiedenen EC der drei Versuchsjahre am Standort Halle mit denen in Bonn verglichen. Aus Abb. 28 ist ersichtlich, dass zwischen den Cry1Ab-Gehalten der Pflanzenproben aus Halle und aus

Bonn eine überwiegend positive Differenz bestand. Dies deutet darauf hin, dass insgesamt die Cry1Ab-Gehalte in Halle in den drei Versuchsjahren höher als in Bonn waren. Die absolut höchste positive Differenz fand sich mit 2,9 µg/g FG in der oberen Blättern des EC60 im Jahr 2003, was einem Unterschied von 49,2% entsprach. Die über die Versuchsjahre gemittelten Unterschiede der Cry1Ab-Gehalte der Versuchsstandorte Halle und Bonn sind in Tab. 11 dargestellt.

Tab. 11: Prozentuale Differenzen der Cry1Ab-Gehalte zwischen Halle und Bonn (Mittelwerte der Jahre 2001 bis 2003)

Pflanzenteil	Cry1Ab-Gehalt -Differenz zwischen Halle und Bonn [%]			
	EC20	EC30	EC60	EC80
Wurzel	17,6	18,9	14,6	10,9
Stängel	6,2	21,7	6,7	12,2
unteres Blatt		6,4	42,0	32,6
oberes Blatt	27,4	-9,8	49,2	10,7
Antheren			35,1	
Kolben				-6,1

Die prozentualen Differenzen in den Wurzeln, Stängeln und unteren Blättern lagen am Standort Halle für alle Entwicklungsstadien über jenen von Bonn. Lediglich beim oberen Blatt (EC30) konnte am Standort Bonn ein um 9,8% höherer Cry1Ab-Gehalt gemessen werden als am Standort Halle. Allerdings wird diese Differenz überwiegend durch den Wert (EC30, 2001) verursacht, denn in den Jahren 2002 und 2003 waren die Cry1Ab-Gehalte des EC30 am Standort Halle ebenfalls etwas größer als am Standort Bonn (Abb. 28).

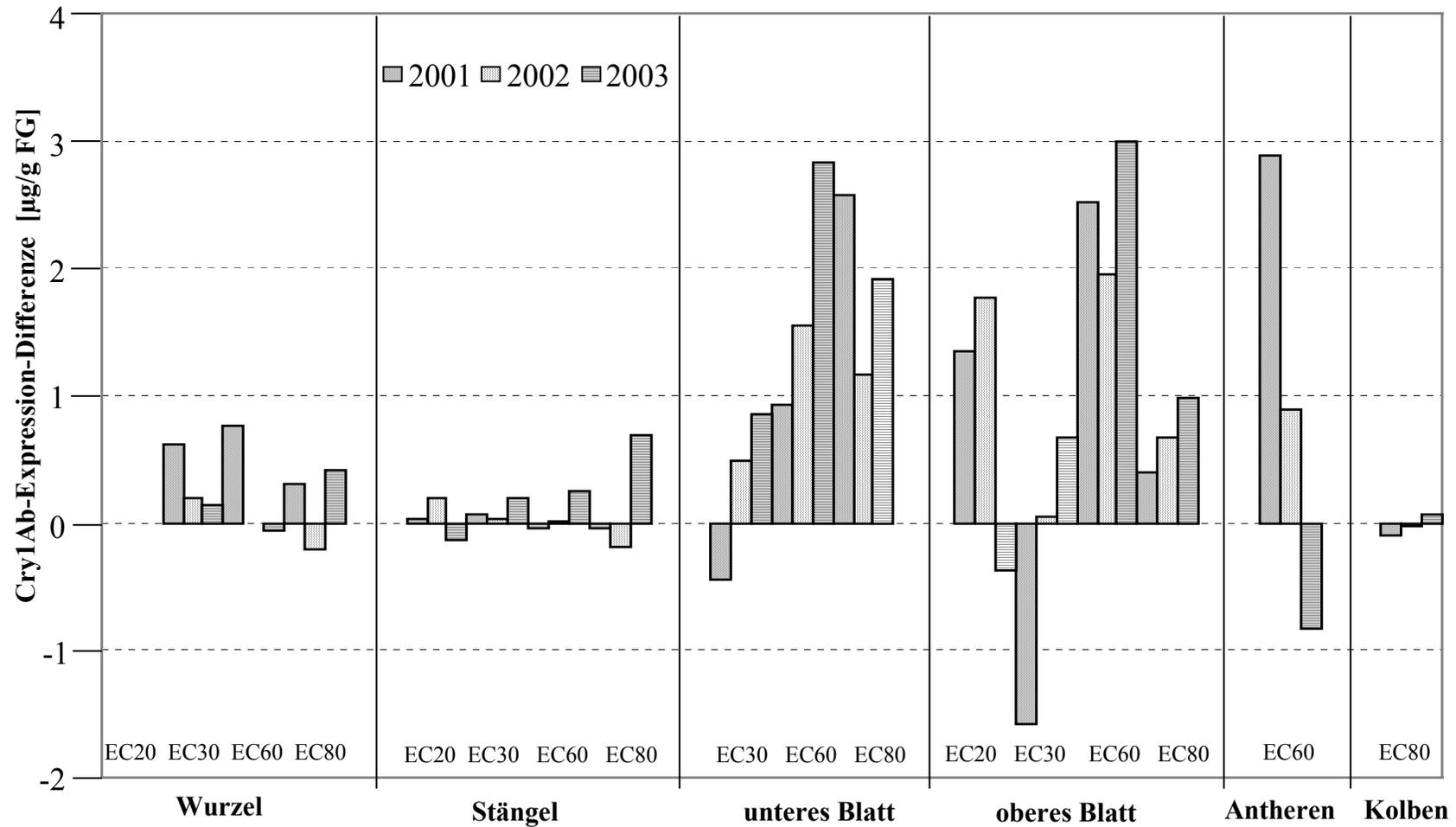


Abb. 28: Differenzen der Expressionshöhe des Cry1Ab-Toxins in den verschiedenen Pflanzegeweben der Sorte (Novelis/Mon810) an den Versuchsstandorten Halle und Bonn in den Versuchsjahren 2001 bis 2003. Positive Differenz: Cry1Ab-Gehalte in Halle höher als in Bonn. Negative Differenz: Cry1Ab-Gehalte in Bonn höher als in Halle.

3.7.2 Cry1Ab-Expression in Bt176

3.7.2.1 Vergleich der Cry1Ab-Gehalte zwischen den Entwicklungsstadien

Die Cry1Ab-Gehalte der Linie Bt176 in den verschiedenen Wachstumsstadien der drei Versuchsjahre 2001 bis 2003 sind in Abb. 29 dargestellt. Bei Bt176 wurde das verkürzte Cry1Ab-Toxin, bedingt durch den kombinierten Einsatz des Promotors Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) und des maispollenspezifischen Promotors, überwiegend in den grünen Pflanzenteilen und in den Pollen exprimiert (Kozziel *et al.*, 1993).

In 32% der Wurzelproben der vier Wachstumsstadien wurde kein Toxin nachgewiesen. In den übrigen Proben wurde ein sehr geringer Toxingehalt von ca. 0,003 µg/g FG ermittelt.

Die Expression von Cry1Ab-Toxin im Stängel war sehr gering (Abb. 29A). Der höchste Cry1Ab-Gehalt trat im EC60 auf (20-93 ng/g FG). Ein signifikanter Unterschied des EC60 im Vergleich zu den anderen Entwicklungsstadien konnte lediglich im Jahr 2003 abgesichert werden (Scheffe's Test; $\alpha = 0,05$).

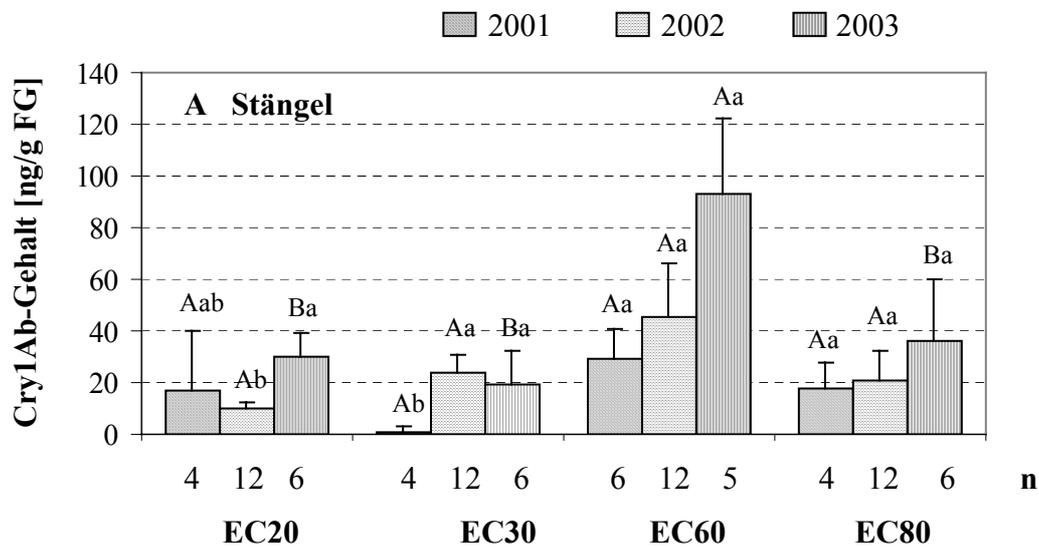


Abb. 29: A: Cry1Ab-Gehalte der Maislinie Bt176 am Standort Halle in den Versuchsjahren 2001 bis 2003 im Stängel. Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant mit Scheffe's Test; $\alpha=0,05$. Die großen Buchstaben indizieren den Unterschied der Cry1Ab-Expression in den verschiedenen EC getrennt nach Jahr und Pflanzengewebe. Die kleinen Buchstaben indizieren den Unterschied der Cry1Ab-Expression zwischen den Jahren 2001 bis 2003 nach EC und Pflanzengewebe (Fehlerbalken: STABW; n: Anzahl der Proben).

Im unteren Blatt variierten die Cry1Ab-Gehalte in allen EC30, EC60 und EC80 zwischen 0,91 bis 2,71 $\mu\text{g/g}$ FG. Die Cry1Ab-Gehalte unterschieden sich nicht statistisch zwischen den Entwicklungsstadien (Scheffe's Test; $\alpha=0,05$), (Abb. 29B).

In oberen Blatt zeigte sich hingegen, dass der Toxingehalt im Laufe der Vegetationsperiode deutlich anstieg. In den EC20 und EC30, bei denen die Blattentwicklung und das Längenwachstum stattfindet, waren die Toxingehalte in den oberen Blättern relativ gering. Bei späteren EC60 und EC80 wurde bei der Bildung von Blüten und Kolben der Pflanzen das Cry1Ab-Toxin deutlich stärker exprimiert. Im EC80 war der Gehalt ca. 4,6fach (2001), 14,5fach (2002) höher als im EC20 desselben Jahres. Dieser Unterschied war signifikant (Scheffe's Test; $\alpha=0,05$), (Abb. 29C). Im Versuchsjahr 2003 war der Toxingehalt im oberen Blatt während der frühen Wachstumsstadien 2,8fach geringer als in der späteren Vegetationsperiode. Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant, da der Cry1Ab-Gehalt innerhalb der verschiedenen Pflanzen stark variierte.

In den Antheren konnte das Cry1Ab-Toxin von 0,12 $\mu\text{g/g}$ FG (2002) bis zu 0,65 $\mu\text{g/g}$ FG (2001) nachgewiesen werden. Der Gehalt des Toxins in Kolbenproben lag unter 0,005 $\mu\text{g/g}$ FG (Ergebnisse nicht dargestellt).

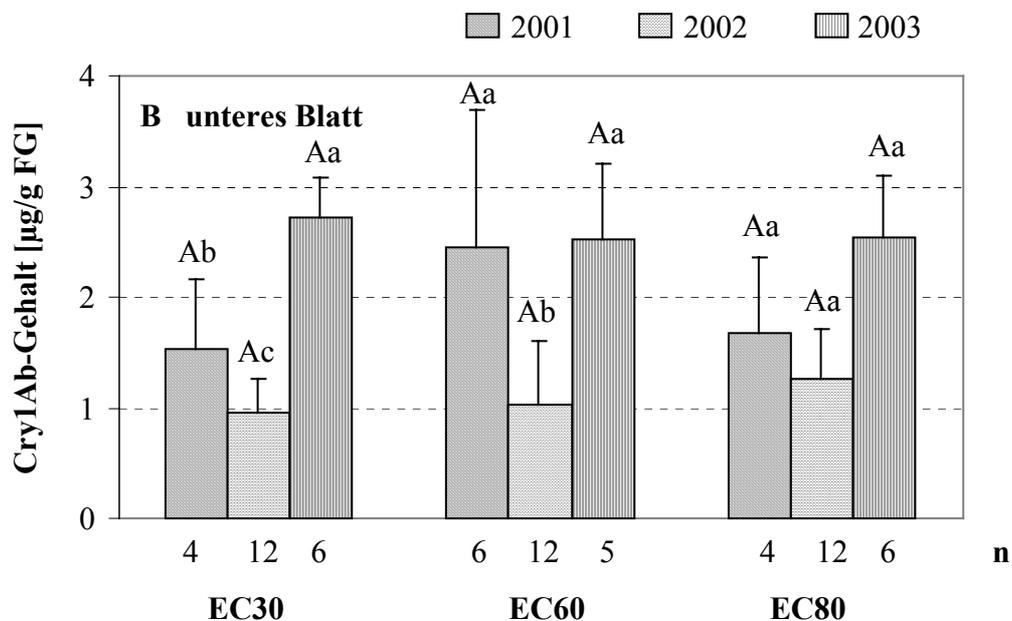


Abb. 29: (Fortsetzung) **B:** Cry1Ab-Gehalte im unteren Blatt der Maislinie Bt176 am Standort Halle (Legende siehe Abb. 29A).

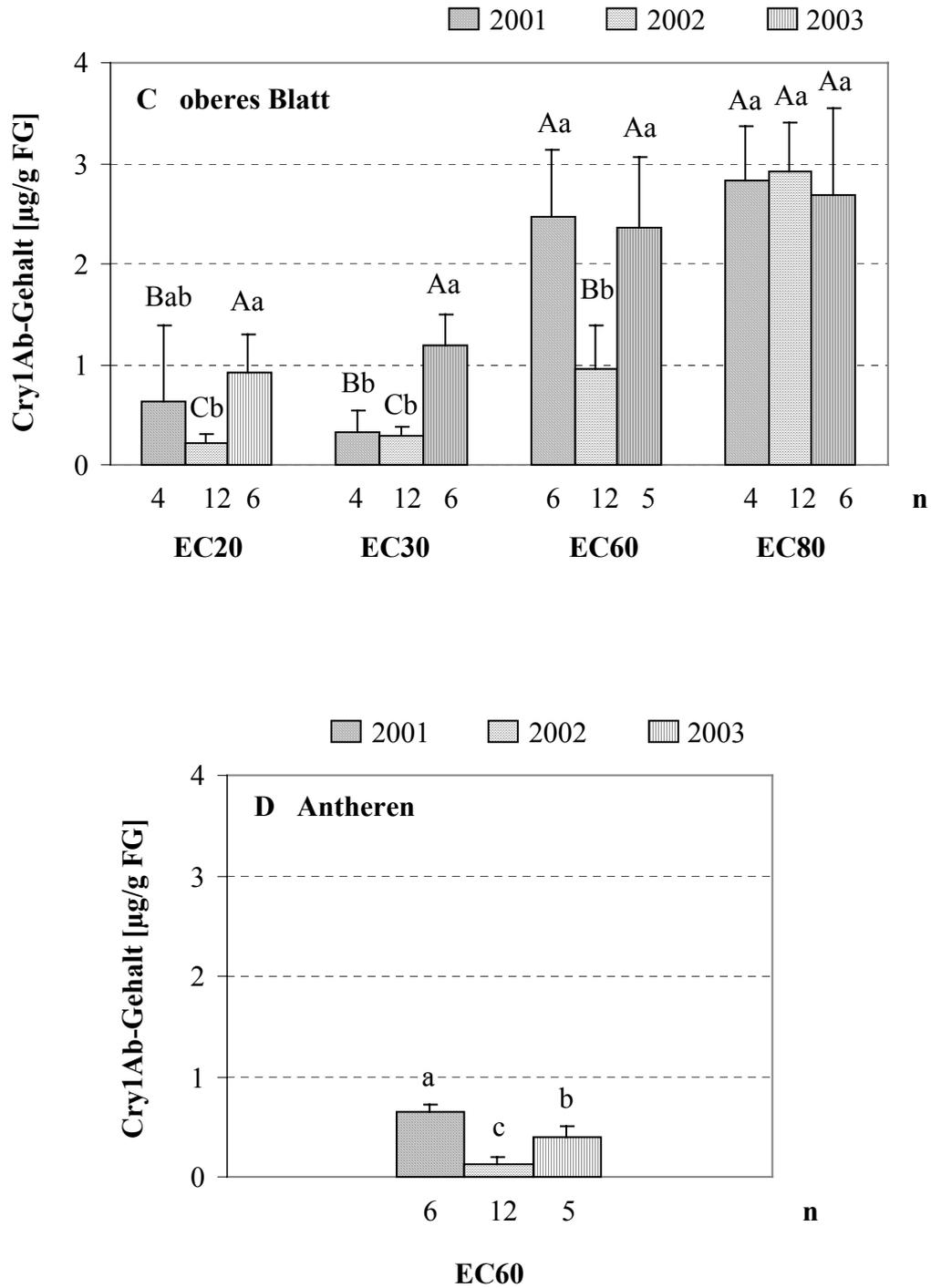


Abb. 29 (Fortsetzung) **C**: Cry1Ab-Gehalte im oberen Blatt der Maislinie Bt176 am Standort Halle; **D**: Cry1Ab-Gehalte in den Antheren (Legende siehe Abb. 29A).

3.7.2.2 Vergleich der Cry1Ab-Gehalte zwischen den Versuchsjahren

Die Toxingehalte in den Stängelproben waren im Verhältnis zu ihrer Streuung zu gering, so dass in den meisten EC kein Unterschied nachgewiesen werden konnte (Abb. 29A).

Im unteren Blatt waren die Toxingehalte in den EC30 und EC60 des Jahres 2002 deutlich geringer als in denen der Jahre 2001 und 2003. Im EC80 unterschieden sie sich in den einzelnen Jahren nicht (Abb. 29B).

In den Jahren 2001 und 2003 waren die Toxingehalte von EC20 bis EC60 im oberen Blatt 2-3fach höher als in 2002, während sie im EC80 vergleichbar waren (Abb. 29C).

In den Antheren unterschieden sich die Cry1Ab-Gehalte in den Jahren 2001 (0,65 µg/g FG), 2002 (0,12 µg/g FG) und 2003 (0,3 µg/g FG) signifikant von einander (Scheffe's Test; $\alpha=0,05$) (Abb. 29D).

3.7.3 Cry1Ab-Expression - Spezielle Betrachtungen

In den vorangegangenen Abschnitten (Kap 3.7.1 und 3.7.2) wurden die Cry1Ab-Gehalte verschiedener Pflanzenorgane wie Wurzel, Stängel, unteres Blatt, oberes Blatt, Antheren und Kolben quantifiziert. Während des ersten Anbaujahres wurde in den transgenen Linien entweder in der Stängelmittle oder aber im Kolben noch Maiszünsler gefunden. Daher stellte sich die Frage nach der Verteilung des Cry1Ab-Toxins in den verschiedenen Bereichen der jeweiligen Pflanzenorgane, wie beispielsweise im Mark der Kolben oder innerhalb der Antheren und Pollen. Um diese Frage zu beantworten, wurden in den nachfolgenden Versuchsjahren 2002 und 2003 zusätzliche Proben von Pollen, Kolbenmark und Körnern entnommen und deren Cry1Ab-Gehalt mittels ELISA quantifiziert.

3.7.3.1 Cry1Ab-Verteilung im Kolben

Die Cry1Ab-Gehalte im Kolbenmark von Mon810 lagen mit durchschnittlich 0,79 µg/g FG (Bonn) und 0,90 µg/g FG (Halle) über denen der Körner 0,26 µg/g FG (Bonn) und 0,34 µg/g FG (Halle) (Abb. 30A). Bei den Trockengewichten war das Verhältnis umgekehrt. Das Trockengewicht des Kolbenmarks betrug 14,7% (Bonn) und 12,1% (Halle), jenes der Körner 46,3% (Bonn) und 49,4% (Halle) (Abb. 30B). Bei Bt176 lagen die Cry1Ab-Gehalte im Kolbenmark und in den Körnern unterhalb der Nachweisgrenze.

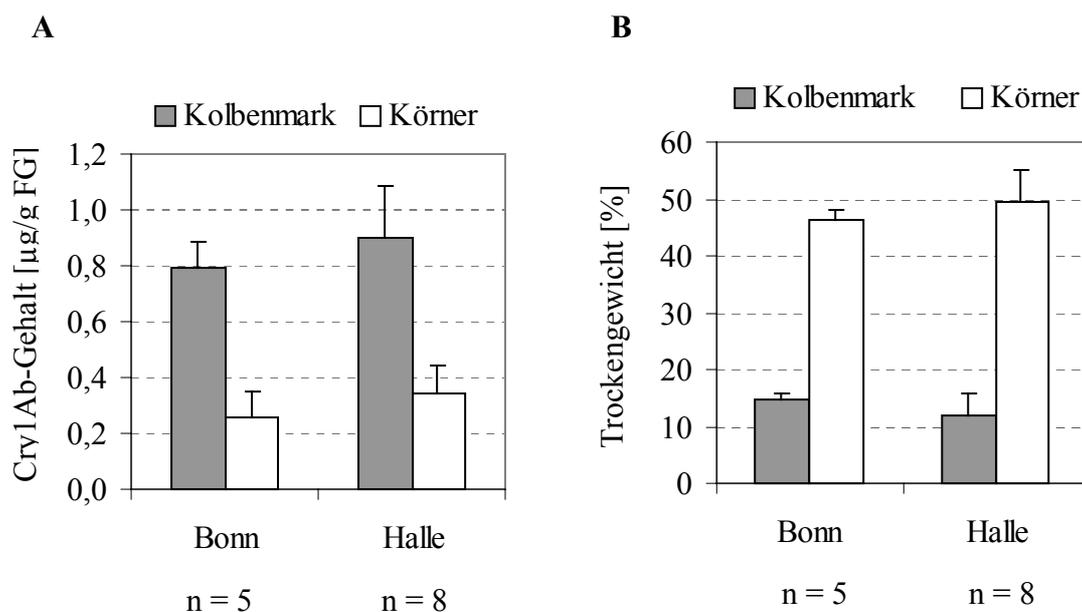


Abb. 30 **A:** Verteilung des Cry1Ab-Toxins im Kolben der Maislinie Mon810 am Standort Bonn und Halle. **B:** Relative Trockengewichte von Kolbenmark und Körnern bei Mon810 (Fehlerbalken: STABW; n: Anzahl der Proben).

3.7.3.2 Cry1Ab-Verteilung in Antheren und Pollen

Die Cry1Ab-Gehalte der Antheren bzw. des ausgeschütteten Pollens von Mon810 und Bt176 der Jahre 2002 und 2003 sind in Abb. 31 dargestellt. Bei Mon810 war der Cry1Ab-Gehalt in den Antheren sehr hoch (0,89-3,4 $\mu\text{g/g FG}$ (Bonn) bzw. 1,78-2,59 $\mu\text{g/g FG}$ (Halle)). In den Pollen war die Konzentration dagegen viel geringer (ca. 30-3000fach). In Halle war der Cry1Ab-Gehalt in den Pollen von 2003 deutlich höher als in Bonn (96,5 ng/g FG). Bei Bt176 war dies umgekehrt. Die Konzentration des Toxins war in den Pollen ca. 3,1-7,6fach höher als in den Antheren (Abb. 31).

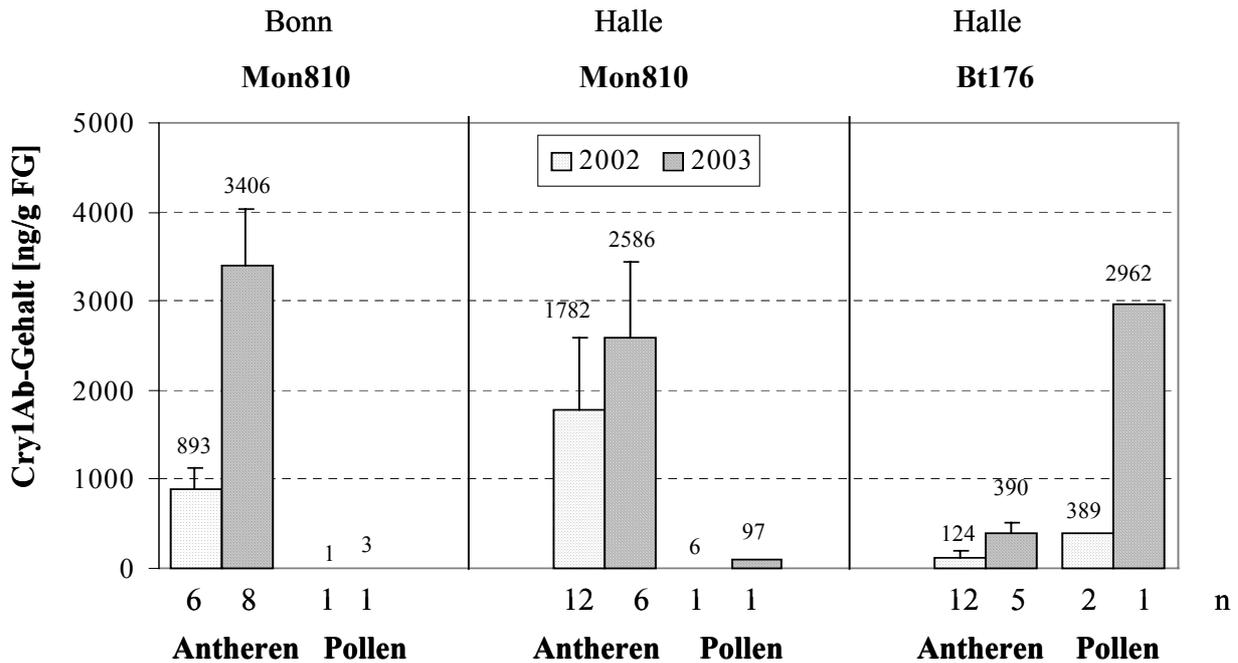


Abb. 31: Cry1Ab-Gehalt in Antheren und Pollen der Maislinie Mon810 und Bt176 an den Standorten Bonn und Halle in den Jahren 2002 und 2003 (Fehlerbalken: STABW; n: Anzahl der Proben).

3.7.4 Cry1Ab-Nachweis in Wurzeln des Vorjahres

Der Versuchsanbau der transgenen Maislinien Mon810 und Bt176 wurde in den drei aufeinander folgenden Jahren auf demselben Versuchsfeld durchgeführt. Im Frühjahr 2002 und 2003 war zu beobachten, dass auf dem Feld viele Wurzelstümpfe der Maispflanzen der vorangegangenen Saison lagen. Im Frühjahr 2002 wurden einige dieser Wurzeln von einer einzigen Parzelle am Standort Bonn gesammelt und deren Toxingehalte bestimmt (Abb. 32). Dabei war das Cry1Ab-Toxin in den Wurzeln, nachdem diese mindestens acht Monate auf dem Feld allen Witterungsbedingungen ausgesetzt waren, noch nachweisbar. Der Toxingehalt lag bei 17 ng/g getrockneter Wurzeln. Diese Untersuchung wurde im Jahr 2003 mit größerer Probenanzahl wiederholt, die durchschnittlichen Cry1Ab-Gehalte betragen 15 ng Toxin/g getrocknete Wurzeln (Abb. 32).

In Wurzelresten der Linie Bt176 (Standort Halle) wurde kein Toxin nachgewiesen, was nicht verwundert, da der Cry1Ab-Gehalt im Frischmaterial unterhalb von 3 ng/g FG lag (vgl. Kap. 3.7.2) (Ergebnisse nicht dargestellt).

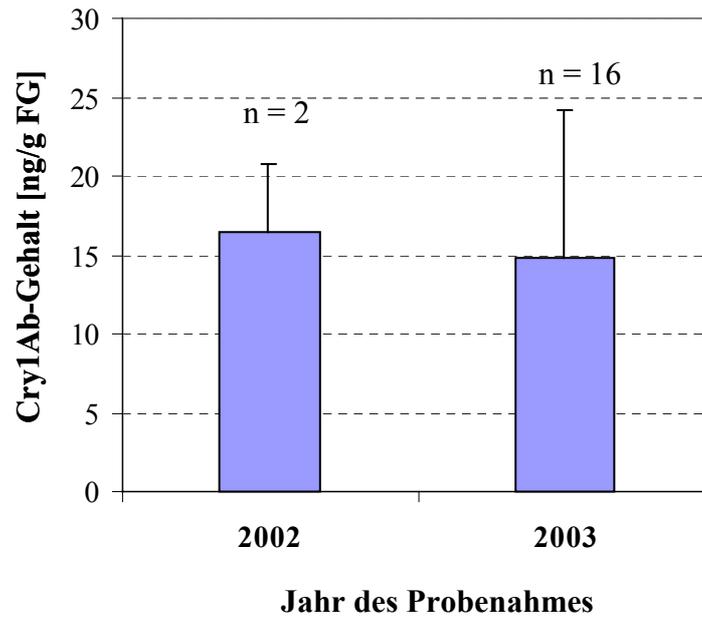


Abb. 32: Mittlerer Cry1Ab-Gehalt in Wurzelresten der Linie Mon810 aus dem Vorjahr am Standort Bonn. Probenahme im Jahr 2002 (angebaut im Jahr 2001) und im Jahr 2003 (angebaut im Jahr 2002), (Fehlerbalken: STABW; n: Anzahl der Proben).

4 DISKUSSION

4.1 Produktion und Reinigung des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins

Die Expression des cry1Ab-Gens von *B. thuringiensis* in *E. coli* bot die Möglichkeit, nur ein einzelnes der verschiedenen insektiziden Kristallproteine zu produzieren. Die meisten *B. thuringiensis* Stämme enthalten mehrere Protoxingene, wie z.B. *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD1 mit drei cry1A-Genen (Kronstad *et al.*, 1983). Mit dem im Rahmen dieser Arbeit rekombinanten *E. coli* HB101-Stamm, der ein Plasmid der pMP-Serie enthält (Masson *et al.*, 1989) und dem rekombinanten *E. coli* XL1-Blue-Stamm mit dem Plasmid pBD140 (de Maagd *et al.*, 1996), ist es möglich, eine hohe Produktion des Cry1Ab-Protoxins in voller Länge (~130 kDa) entsprechend der nativen Form in *B. thuringiensis* zu erzielen. Die Expressionshöhe betrug bis 100-110 mg Protoxin pro 1 Liter Kultur des Stamms HB101/pMP und 170-240 mg Protoxin pro 1 Liter Kultur des Stamms XL1-Blue/pBD140 (Kap. 3.1). Während der Reinigung konnten bis zu 40% Protoxin verloren gehen. Der Reinheitsgrad des Toxinprodukts wurde als wichtiges Kriterium betrachtet und mittels SDS-PAGE und densitometrischer Methode (ImageMaster) überprüft. Das Protoxin wurde in *E. coli* als Inclusion Body (IB) exprimiert. Mittels mechanischer Methode (French press), enzymatischer Behandlung (mit Lysozym) oder der Kombination beider Methoden und zusätzlicher Ultraschallbehandlung wurden die *E. coli*-Zellen lysiert und die IBs freigesetzt. Die Isolierung der IBs hatte den Vorteil, dass das Protoxin leicht von löslichen Proteinen, Lipiden und anderen Zellbestandteilen von *E. coli* durch intensives Waschen mit Waschpuffer, PBS-Puffer und destilliertem Wasser getrennt werden konnte. Diese Vorreinigung der IBs spielte eine wichtige Rolle für den Reinheitsgrad des Protoxins. Je besser die IBs gereinigt wurden, desto leichter erfolgte die Ultrafiltration des gelösten Protoxins. Deshalb sollte bei der Reinigung der IBs des ungelösten Proteins beachtet werden, dass die Zellen vollständig lysiert sind. Solange sich noch intakte Zellen im Pellet befinden, sind die IBs mit Zellwand und Membrankomponenten verunreinigt. Unter Verwendung von TritonX-100 (0,5%-5%) konnten letztere erfolgreich entfernt werden (Palmer und Wingfield, 1995).

In der Literatur sind mehrere alkalische Puffer beschrieben, mit denen die gereinigten IBs gelöst werden können. Ein häufig verwendeter Puffer stellt ein 50-100 mM Natriumhydrogencarbonat Puffer (pH 10), mit 10 mM Dithiothreitol (DTT) als Reduktionsmittel und 100 mM bzw. 200 mM NaCl dar. Die Inkubationszeit zum Lösen der IBs variiert von 2 h bis 8 h bei 37 °C (MacIntosh *et al.*, 1990; Bosch *et al.*, 1994; de Maagd *et*

al., 1996). Eine andere Möglichkeit ist 8 M Harnstoff, 200 mM NaCl, 10 mM DTT, 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid und 50 mM NaHCO₃ (pH 10) (Bosch *et al.*, 1994). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Puffer bestand aus 50 mM CAPS (pH 10,5), 0,25% β -Mercaptoethanol und benötigte eine Inkubationszeit von 2 h, bei 37°C. Ein 0,1 M CAPS-Puffer, (pH 10,5) wurde auch beim Lösen des Kristallproteins aus *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (Bietlot *et al.*, 1989b) bzw. der IBs des Cry1E-Toxins (Masson *et al.*, 1992) und Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac) (Clairmont *et al.*, 1998) verwendet.

In einigen Untersuchungen wurde das gelöste Cry1Ab-Protoxin bzw. das Cry1Ab-Toxin mittels Ionenaustausch-Chromatographie (MacIntosh *et al.*, 1990), oder einer Kombination mit Protein-Präzipitation und Dialyse gereinigt (Bietlot *et al.*, 1989b). In der vorliegenden Arbeit wurde eine einfache Methode zur Reinigung des Cry1Ab-Prototoxins sowie des Cry1Ab-Toxins in einem präparativen Maßstab durchgeführt. Die Ultrafiltration des Prototoxins mit einer Membran aus Regeneratcellulose (100 kDa Trenngrenze) konnte jedoch nicht alle Proteine, unter 100 kDa, herausfiltrieren. Bei der Ultrafiltration des aktiven Toxins mit einer Membran aus Polyethersulfon (50 kDa Trenngrenze) war die Reinigung ca. 6% effektiver. Der Reinheitsgrad erreichte bis zu 86% (Kap. 3.2.1). Insgesamt wurden 368 mg Cry1Ab-Toxin aus 18 Liter HB101/pMP und fast 2 g Protoxin aus 9 Liter XL1-Blue/pBD140 produziert (Tab. 4).

4.2 Proteolytischer Prozeß des aktiven Cry1Ab-Toxins

Das Cry1Ab-Kristallprotein von Bt-Sporen wird nach der Aufnahme von Lepidopterenlarven in der alkalischen Umgebung des Mitteldarms gelöst. Die Endo-Proteasen des Mitteldarms spalten das gelöste Protoxin zu einem aktiven Toxin mit einem trypsin-resistenten toxischen Kernfragment. In dieser Arbeit wurde das gelöste Protoxin mit Trypsin ca. 16 h bei Raumtemperatur behandelt, um eine vollständige Trypsinisierung einer größeren Menge von Protoxin (≥ 100 mg) zu erzielen. Optimierungsversuche ergaben, dass TPCK behandeltes Trypsin aus Rinderpankreas (Sigma) zu dem gelösten Protoxin im Verhältnis von 1/1 (w:w) gegeben werden musste, um sicher zu sein, dass das gesamte Protoxin zu einem resistenten Kernprotein von 60 kDa gespalten wurde. Die Menge des verwendeten Trypsins sowie die Inkubationszeit sind ausschlaggebend für den Erfolg der Trypsinisierung. Sie variieren in der Literatur. Nach MacIntosh *et al.* (1990) wurden das gelöste Cry1Ab-Protoxin aus IBs der *E.coli* und Trypsin in einem Verhältnisse von 5/1 (w/w) für 6 h bei 18°C inkubiert, um ein aktives trypsinresistentes Fragment zu bekommen. Bei den Untersuchungen von Rajamohan

et al. (1996) mit dem Protoxin aus *E. coli* wurde 2% (w/w) Trypsin verwendet. Die Trypsinisierung dauerte ca. 5 h bei 37°C. Zum Schluß wurde das trypsinisierte Toxin über Nacht dialysiert. Eine Trypsinmenge, bis zu 10% des Protoxingewichts, wurde bei der Behandlung einer gelösten Protoxinlösung verwendet, um die Produktion eines stabilen trypsinresistenten Toxins zu prüfen. Die Inkubation dauerte eine Stunde bei 37°C (de Maagd *et al.*, 1996).

Zum Molekulargewicht des aktiven Cry1Ab-Toxins gibt es in der Literatur zahlreiche unterschiedliche Angaben. Bulla *et al.* (1979) berichteten, dass das 130 kDa Protoxin aus *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* zu einem biologisch aktiven Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 68 kDa abgebaut wird. Nach Höfte und Whiteley (1989) gibt es 20 cry1-Gene, die für Proteine mit einem Molekulargewicht von 130-140 kDa kodieren. Diese Protoxine werden durch die Proteasen im Mitteldarm der Larven in ein toxisches Kernfragment von 60 bis 70 kDa überführt. Bosch *et al.* (1994) und de Maagd *et al.* (1996) gaben hierfür ein Molekulargewicht von ungefähr 65 kDa an. Auch bei der Behandlung des insektiziden Kristallprotoxins aus *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD 73 sowie aus *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 mit den Proteasen Trypsin und Chymotrypsin haben Indrasith *et al.* (1991) gezeigt, dass nach 6 h Inkubation ein resistenter Kern mit einem Molekulargewicht von 65 kDa vorliegt. Dieser Unterschied des Molekulargewichts des aktiven Toxins könnte auf Grund der verschiedenen Arten bzw. Stämme der Wirtsbakterien zustande kommen. Die Behandlung mit unterschiedlichen Proteasen wie z.B. TPCK-Trypsin oder Trypsin aus der Darmflüssigkeit der verschiedenen Insektenarten könnte die Größe des Toxins ebenfalls beeinflussen (Bietlot *et al.*, 1989b; Clairmont *et al.*, 1998; Aronson *et al.*, 1999). Bietlot *et al.* (1989b) fand, dass das gereinigte Toxin resistent gegen weitere Proteolyse von Chymotrypsin, Elastase und Thermolysin bei pH 10,5 war. Jedoch wurde das Toxin bei der Behandlung mit Papain und Pronase in kleinere Fragmente überführt. Es könnte aber auch daran liegen, dass das Toxin (67-65 kDa) nicht vollständig bis auf den trypsinresistenten Kern abgespalten wurde. In eigenen Untersuchungen konnte bei der Trypsinisierung des Protoxins aus HB101/pMP ein Cry1Ab-Toxin von ungefähr 67 kDa nachgewiesen werden (Kap. 3.1.3). Dies war jedoch vermutlich eine unvollständige Trypsinisierung, da bei Lagerung und bei einer weiteren Produktionscharge das Cry1Ab-Toxin im Bereich von ungefähr 65 kDa lag. In weiteren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass das Molekulargewicht des trypsinresistenten Kerns auch nicht 65 kDa war, sondern das Protoxin sowohl vom HB101/pMP-Stamm als auch vom XL1-Blue/pBD140-Stamm weiter bis zu 60 kDa gespalten werden konnte. Bei der Überprüfung der

Stabilität des trypsinresistenten Kerns gegen einen weiteren Abbau von Trypsin wurde festgestellt, dass das aktive Toxin aus HB101/pMP-Zellen trotz einer bis zu 72stündigen Behandlung des trypsinresistenten Kerns bei 60 kDa verblieb. Hingegen wies das aktive Toxin aus XL1-Blue/pBD140-Zellen zusätzlich zu der 60 kDa Bande noch eine kleinere Bande auf, die ein kDa kleiner als das aktive Toxin war (Abb. 11A und B, Kap. 3.1.3).

4.3 Stabilität des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins

Eine weitere Aufgabe der Etablierung einer standardisierten Produktion des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins lag in der Optimierung der Lagerungsbedingungen. Diese wurde über einen Zeitraum von 8 Monaten bei verschiedenen Temperaturen getestet. Die Ergebnisse im SDS-Gel zeigten, dass das Cry1Ab-Protoxin Charge J6A (aus HB101/pMP) sowie das aktive Toxin Charge J4 (aus XL1-Blue/pBD140) stabil waren, solange sie im gefrorenen Zustand vorlagen (Abb. 13a Gel A und Abb. 13b Gel C).

Stabilitätsuntersuchungen des aktiven Toxins im SDS-Gel und in Biotests von Van Frankenhuyzen *et al.* (1991) haben gezeigt, dass die Lagerung bei hohem alkalischem pH der Enzymlyösung des Insektendarms selbst nach drei bis vier Monaten bei 6°C nicht beeinträchtigt war. Die Toxizität des Toxins im Biotest zeigte ebenfalls keine Veränderung. In der vorliegenden Arbeit konnte im SDS-Gel lediglich eine geringe Veränderung der aktiven Toxinbande (Charge J4) nach 8 Monaten Lagerung bei 4°C beobachtet werden, während das Protoxin (Charge J6A) mit einer Konzentration von 200 µg/ml über einen Zeitraum von 8 Monaten vollständig abgebaut wurde. Die Lagerfähigkeit des Cry1Ab-Toxins (Charge J3 und J4) aus HB101/pMP war besser als die des Protoxins, da es einen trypsinisierten Kern besitzt und deshalb bei 4°C relativ resistent gegenüber einem weiteren proteolytischen Abbau ist. Außerdem hängt der Protoxinabbau selbst in der Regel von der Konzentration der Protoxinlösung ab. Höher konzentrierte Proteinlösungen sind stabiler als stark verdünnte Lösungen (Scopes, 1994). Beim Protoxin wurde allerdings beobachtet, dass eine Protoxinlösung über 3 mg/ml zu einer Präzipitation führen kann. Beim Auftauen und wieder Einfrieren wurde festgestellt, dass das Protoxin ebenfalls präzipitiert. Eine Veränderung des pH-Werts könnte ebenfalls zu einer Präzipitation des Toxins führen. Allerdings ist es sehr schwer, diese Präzipitation wieder zu lösen. Lecadet (1967) beobachtete, dass das in 8 M Harnstoff gelöste bipyramidale Kristallprotein durch die Entfernung des Harnstoffs mittels Dialyse in seine ursprüngliche Form zurückkehren konnte. Um die Kristalle nach der Rekristallisierung wieder zu lösen, wird ein alkalischer Puffer mit einem

pH-Wert von mindestens 12 benötigt, anstatt einem pH-Wert von 10, der bei dem unbehandeltem Kristallprotein eingesetzt wird (Du *et al.*, 1994). Der Verlust bei der Solubilisierungsfähigkeit des Protoxins korreliert mit seinem Toxizitätsverlust (Du *et al.*, 1994). Nach Agaisse und Lereclus (1995) hängen die Formation der Kristallstruktur und seine Löslichkeitseigenschaften vermutlich von einer Vielzahl von Faktoren ab, wie z.B. der Sekundärstruktur der Cry-Proteine und Anzahl an Disulfidbindungen.

4.4 Biologische Wirkungskontrolle

4.4.1 Aktivität des Cry1Ab-Protoxins und des -Toxins aus rekombinanten *E. coli*

Parallel zu den Untersuchungen zur Stabilität des produzierten Cry1Ab-Protoxins aus rekombinanten *E. coli* und des aktiven Toxins wurde in der vorliegenden Arbeit deren biologische Aktivität überprüft. Bei einem Biotest mit dem ersten Larvenstadium von *O. nubilalis* zeigte sich, dass die Toxizität des Protoxins aus XL1-Blue/pBD140 der Chargen J5 und J6A identisch war. Die LC₅₀-Werte lagen bei der eingesetzten Oberflächen-Methode zwischen 50 bis 72 ng/cm² (Kap. 3.5.1). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deckten sich mit den Untersuchungen von Meise (2003), der einen LC₅₀-Wert von 67 ng/cm² unter Verwendung des Cry1Ab-Toxins der Firma Novartis in den Biotests mit dem Laborstamm von *O. nubilalis* feststellte. Dagegen wies die Untersuchung von Farinós *et al.* (2004) eine höhere Toxizität des Cry1Ab-Protoxins gegen den Laborstamm von *O. nubilalis* auf. Die LC₅₀-Werte variierten in diesen Biotests zwischen 5-10 ng/cm². Für die Untermisch-Applikation wurde eine bis zu sieben- bzw. 15fach höhere Menge des Cry1Ab-Toxins benötigt, um die gleiche Wirkung wie bei der Oberflächen-Applikation zu erzielen (Meise, 2003). Nach MacIntosh *et al.* (1990) lag der LC₅₀-Wert in dem Biotest mit der Untermisch-Applikation bei Werten bis zu 3,6 µg/ml. In einer weiteren Studie erreichte die Mortalität von *O. nubilalis* 70 bis 75% bei einer Verwendung von 25 µg Cry1Ab-Toxin/g Medium (Hilbeck *et al.*, 1999).

Es ist sehr schwierig Biotest-Daten der Literatur miteinander zu vergleichen. Während das Toxin in der vorliegenden Arbeit und in den beiden Untersuchungen von MacIntosh *et al.* (1990) und Hilbeck *et al.* (1999) in *E. coli* exprimiert wurde, stammte das Cry1Ab-Toxin in den Biotests von Farino *et al.* (2004) aus *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD1-9. Unterschiede der LC₅₀-Werte in den Biotests in den verschiedenen Untersuchungen mit *O. nubilalis* können durch unterschiedliches Larvenalter, die Toxinquellen, die Toxinproduktionen bzw. den

Reinheitsgrad des Toxins zustande kommen. Verschiedene Bedingungen des Biotests wie Oberflächen- oder Untermisch-Applikation, die Methode der Bonitur und Dauer des Biotests können die Ergebnisse ebenfalls beeinflussen. Bei Biotests von Marçon *et al.* (1999) und Siegfried *et al.* (2001) wurden für die Mortalität auch Larven, die ein Gewicht $\leq 0,1$ mg besaßen und im ersten Wachstumsstadium (L1) geblieben waren, mit einberechnet. In den eigenen Biotests sowie Biotests von Meise (2003) und Farinós *et al.* (2004) wurden nur die Larven, die nach Berührung mit einem Pinsel keine Reaktionen mehr zeigten, als tot gezählt. Beim Biotest von Hilbeck *et al.* (1999) wurde die Mortalität der Larven schon nach vier Tagen bestimmt, während bei der Untersuchung von MacIntosh *et al.* (1990) und Hilbeck *et al.* (1999) die Mortalitätsbestimmung sechs Tage nach der Behandlung stattfand. Eine weitere Ursache kann sein, dass der verwendete Laborstamm von *O. nubilalis* in verschiedenen Labors unterschiedlich war und somit auch die Anfälligkeit jedes Stammes unterschiedlich war.

Die Überprüfung der biologischen Aktivität des selbst hergestellten aktiven Cry1Ab-Toxins aus beiden *E. coli*-Stämmen HB101/pMP (Charge J3, J4) und XL1-Blue/pBD140 (Charge J6B) zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Die Toxizität des Cry1Ab-Toxins aus HB101/pMP Charge J3 wies innerhalb von ca. 20 Lagerungswochen bei 4°C keinen statistischen Unterschied auf (Meise, 2003; Nguyen *et al.*, 2004). Nach einjähriger Lagerung bei -20°C (bzw. -18°C) zeigte die Charge J4 keinen Abbau der Bioaktivität. Der LC₅₀-Wert der Charge J4 lag im Jahr 2003 bei 26 ng/cm² und im Jahr 2004 bei 14 ng/cm² (Kaiser-Alexnat, pers. Mitt.). Dies korreliert gut mit den eigenen Untersuchungen der Stabilität des aktiven Toxins aus Charge J4.

Bei dem Cry1Ab-Toxin aus XL1-Blue/pBD140 (Charge J6B) wurde die Ultrafiltration des Toxins nicht durchgeführt. Biotests zeigten, dass bei dieser Toxincharge die Toxizität bis auf weniger als 5% innerhalb von sechs Wochen abnahm. Bei dieser Charge wurde das Trypsin nicht durch Ultrafiltration vom Toxin abgetrennt. Das Toxin J6B besaß in der ersten Woche im aufgetauten Zustand eine doppelte Bande bei ca. 67 und 60 kDa. Danach fand ein Abbau des Cry1Ab-Toxins bis zu ca. 60 und 59 kDa statt (Kap. 3.5.2). Der Verlust an toxischer Aktivität ist möglicherweise auf den proteolytischen Abbau zurückzuführen. Je mehr Anteile der kleineren Proteinbande (ca. 59 kDa) in der gemischten Toxinlösung (60 und 59 kDa) vorlagen, desto geringer war die Wirksamkeit des Toxins. Diese Ergebnisse zeigten auch, dass die Ultrafiltration des Toxins notwendig ist, um das Trypsin zu entfernen und die Stabilität und Aktivität des Toxins in der Lagerungszeit zu erhalten. Höfte *et al.* (1986) zogen aus der Polypeptid-Analyse des Cry1Ab-Toxins den Schluß, dass das minimale toxische

Fragment des Cry1Ab-Proteins ein Polypeptid mit einer Größe von 60 kDa ist, das durch das Spalten an der 29. bzw. 37. Aminosäure am N-terminalen Ende und an der 601. bzw. 607. Aminosäure am C-terminalen Ende definiert wird. Eine Abspaltung weniger weiterer Aminosäuren am N-terminalen Ende oder vom C-terminalen Ende dieses 60 kDa Polypeptids kann einen kompletten Verlust der Toxizität bedeuten. Martens *et al.* (1995) wiesen ebenfalls nach, dass die Deletion von nur drei Aminosäuren des C-terminalen Endes zu einem vollständigen Verlust der Toxizität führte. Zusammenfassend kann man sagen, dass für ein langfristiges Suszeptibilitätsmonitoring eine standardisierte Biotest-Methodik und ein Toxinstandard benötigt werden.

4.4.2 Aktivität des Cry1Ab-Toxins aus transgenem Mais

Der transgene Bt-Mais enthält ein modifiziertes synthetisches cry1Ab-Gen, das für ein verkürztes Cry1Ab codiert. Um zu testen, ob für Screeninguntersuchungen auch transgenes Pflanzenmaterial an Stelle des von *E. coli* exprimierten Toxins eingesetzt werden kann, wurden Biotests mit transgenem Blattmaterial durchgeführt. In früheren Untersuchungen wurden frische Blätter sowie Pollen des transgenen Mais direkt als Insektenfutter in Biotests verwendet (Kozziel *et al.* 1993; Pilcher *et al.*, 1997; Head *et al.*, 2001; Kronback *et al.*, 2001). Bei anderen Tests wurden transgene Pflanzenextrakte in das semi-synthetische Medium gemischt (Dutton *et al.*, 2004) bzw. auf dessen Oberfläche aufgebracht. Zum Abbau des Cry1Ab-Toxins in den Blattresten der Maislinie Bt11, die nach dem Ernten auf dem Boden lagen, hatten Zwahlen *et al.* (2003) ebenfalls einen Untermisch-Biotest mit *O. nubilalis* benutzt. In Wirt/Parasitoid-Biotests mit *Plodia interpunctella* und *Venturia canescens* wurde getrocknetes Blattpulver des transgenen Mais DK440BTY verwendet (Polgar, 2003). Bei einer Dosis von 20 g getrockneter Blätter pro 100 g Futter zeigte sich zwischen transgenen und isogenen Maispulver-Biotests ein signifikanter Unterschied in Gewicht und Mortalität der Larven und Puppen von *P. interpunctella* (Polgar, 2003).

Die eigenen Biotests mit getrocknetem Maispulver der Linie Mon810 zeigten trotz niedriger Mortalität der L1-Larven des Maiszünsler-Laborstammes schon bei einer Konzentration von 0,45 µg Cry1Ab (Bt-Mais)/ml Medium (9 g Maispulver/100 ml Medium) eine vollständige Hemmung des Wachstums der Larven (Kap. 3.5.3). Ein Versuch mit einer höheren Menge von transgenem Pulveranteil (12 g Maispulver/100 ml Medium) ergab ebenfalls eine 100%-ige Wachstumshemmung. Die Mortalität bei den L1-Larven war jedoch nicht erhöht. Einen ähnlichen Effekt konnte Dutton *et al.* (2004) in Untermisch-Biotests unter Verwendung

von frischem Blattextrakt des transgenen Mais beobachten. Mit den Larven *O. furnacalis* (Guenée) (Asian Corn Borer) zeigte sich ebenfalls eine niedrigere Mortalität und eine starke Wachstumshemmung, nachdem diese mit Pollen des Bt-Mais gefüttert wurden (He *et al.*, 2003).

Eine mögliche Erklärung für die niedrige Mortalität in diesen Biotests könnte sein, dass die Larven relativ wenig Medium mit dem Maispulver gefressen haben, so dass sie nicht gestorben sind. Aber die Toxinwirkung des transgenen Maispulvers führte dazu, dass sie nicht weiter gefressen haben und somit ihr weiteres Wachstum stoppen. Eine andere Ursache dafür könnte sein, dass das getrocknete Maispulver seine Toxizität tatsächlich schon zum Teil durch die Trocknung und Verarbeitung des Pflanzenmaterials verloren hatte, sich jedoch noch mittels ELISA quantifizieren ließ. Dieses Phänomen konnte bisher noch nicht eindeutig aufgeklärt werden. Aufgrund der einfachen Lagerung des getrockneten Maispulvers nach der Ernte, stellt diese Methode allerdings eine Alternative für die Suszeptibilitätstestung des Maiszünslers dar. Jedoch wird bei diesem Biotest mehr Zeit für die Bonitur benötigt, um das Gewicht der einzelnen Larve zu bestimmen.

4.5 Immunologischer Nachweis des Cry1Ab-Toxins: ELISA und Western-Blot

Der pAK-NTH1 wurde durch Immunisierung eines Huhnes mit aktivem Cry1Ab gewonnen. Zur Immunisierung wurde die Cry1Ab-Toxincharge J1 mit einem Molekulargewicht von 65 kDa verwendet. Bisher wurde meistens mAK und pAK gegen das gesamte Bt-Kristallprotein bzw. das verkürzte Toxin in Kaninchen (Perlak *et al.*, 1991, Cheng *et al.*, 1999, Hori *et al.*, 2000) oder Mäusen (Höfte *et al.*, 1988, Walschus *et al.*, 2002) hergestellt. Die Gewinnung des pAK aus Hühnern hatte den Vorteil, dass eine große Menge aus den gelegten Eiern isoliert werden konnte. In einem eigenen entwickelten indirekten ELISA konnte der pAK das aktive Cry1Ab-Toxin (60 kDa) der späteren Produktionschargen bis zu 7 ng/ml quantifizieren. Eine Nachweisgrenze von 0,4 ng/ml erreichte ein aus Mäusen hergestellter mAK im Sandwich-ELISA (Walschus *et al.*, 2002). Eine ähnliche Empfindlichkeit erreichte der aus Kaninchen erzeugte pAK (0,5 ng/ 50 µg gesamte Pflanzenprotein) ebenfalls im DAS-ELISA (Perlak *et al.*, 1991). Die Unterschiede in der Nachweisgrenze lagen in erster Linie in den unterschiedlichen Testverfahren, indirekte ELISA vs. DAS-ELISA. Bei dem Vergleich von drei verschiedenen ELISA-Varianten, DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich), ABC-ELISA (Avidin-Biotin-Complex-System) und AC-ELISA (Antigen Captured), konnten Hori *et al.* (2000) zeigen, dass alle drei ELISA-Varianten das Protoxin bis zu einer Konzentration

von 2 ng/ml detektierten. Beim ABC-ELISA wurde der maximale Reaktionsbereich allerdings schon bei 50 ng/ml erreicht. Obwohl die Sensitivität des DAS-ELISA bei der Konzentration von 2 ng/ml höher war als jene des AC-ELISA, war die Durchführung des AC-ELISA einfacher, so dass dieser für die weiteren Experimente verwendet wurde (Hori *et al.*, 2000).

Die Ergebnisse des eigenen indirekten ELISA zum Screening der Spezifität des AK zeigten, dass der pAK-NTH1 mit dem Cry1Ab-Toxin etwa siebenmal sensitiver als mit dem Protoxin reagierte (Kap. 3.3.3). Da das Molekulargewicht des Protoxin (130 kDa) doppelt so groß ist wie das aktive Cry1Ab-Toxin (60-65 kDa), der pAK-NTH1 aber nur gegen den trypsinisierten Kern des Toxins gerichtet ist, war zu erwarten, dass das Protoxin nur mit der halben Empfindlichkeit (bezogen auf molare Proteinkonzentration) detektiert wird. Dieser große Unterschied allein erklärt aber nicht den großen Sensitivitätsunterschied. Die Überprüfung der Reaktionen des AK an Hand des QuantiplateTM-Kits mit den beiden Protoxinen und aktiven Toxin zeigte ein ähnliches Ergebnis, wobei der AK des Kits mit dem Protoxin noch wesentlich schwächer (bis ca. 50fach) reagierte als mit dem aktiven Toxin. Das verwendete Protoxin im ELISA befand sich in nativer Form. Denkbar wäre, dass es während der Inkubation zu einer Faltung des Protoxins gekommen ist, wodurch die Reaktion zwischen dem Antikörper und dem Protoxin limitiert wurde.

Die unterschiedliche Sensitivität des pAK-NTH1 gegenüber dem Cry1Ab-Protoxin (130 kDa) und dem Cry1Ab-Toxin (60 kDa) wurde mittels Western-Blots bestätigt. Dabei zeigte sich im Immunoblot, dass das Signal des aktiven Toxins ebenfalls ca. acht- bis zehnfach stärker war als das des Protoxins (Kap. 3.4.2). Bis zu 10 ng/Spur zeigte das Protoxin noch sichtbare Signale im Western-Blot. Bei der Untersuchung von Monsanto wurde bestätigt, dass das vollständige Protoxin der BollGard Baumwolle (ein Hybridtoxin von Cry1Ab und Cry1Ac) eine schwächere Antikörper-Affinität hatte als das trypsinisierte Kernfragment des gleichen Proteins (Monsanto Cotton, 1994a, b in Freese, 2001).

Erstaunlicherweise war es in dieser Arbeit nicht möglich, die verkürzten Formen der Cry1Ab-Toxine in den transgenen Maisproben mit Molekulargewichten von ca. 92 kDa (Mon810) und 65 kDa (Bt176) mittels ELISA und Western-Blot zu detektieren. Im ELISA trat eine Kreuzreaktion mit isogenen Pflanzen auf. Walschus *et al.* (2002) zeigten in ihrem DAS-ELISA, in dem die Proteinextrakte aus dem Pulver der Maiskörner eingesetzt wurden, einen „Matrix Effekt“. Die Komponenten aus der Probe könnten den Antikörper auf der Platte abbauen oder aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen an diese binden bzw. die spezifische Bindung des eigentlichen Antigens an dem Antikörper auf der Platte verringern

und damit die Empfindlichkeit des ELISA mindern. Andere Möglichkeiten sind Störungen, die sich aus dem pH-Wert oder aus der Ionenstärke der Probe ergeben (Walschus *et al.*, 2002; Stave, 1999). Theoretisch könnte durch die Verwendung anderer ELISA-Systeme (wie z.B. DAS-ELISA), sowie die Verbesserung des Blockierungsschrittes diese Kreuzreaktion beseitigt werden. Der Hintergrund im ELISA könnte auch durch die Zugabe von Ascorbinsäure (10 mM Endkonzentration) in Extraktionspuffer eliminiert werden (Palm *et al.*, 1994).

Im Westen-Blot wurde der Hintergrund sowie die unspezifischen Reaktionen durch die Herstellung und Verwendung zweier monospezifischer pAKs (msAK-NTH1 und msAK-NTH2) stark verringert. Die Nachweisempfindlichkeit der beiden monospezifischen AK war geringfügig reduziert. Das Cry1Ab-Toxin und das Protoxin aus rekombinanten *E. coli* konnte noch bis zu 10 ng nachgewiesen werden. Allerdings war das Signal des Protoxins immer noch schwächer als das des aktiven Toxins. Trotz eines sehr guten Effekts nach der Reinigung des pAK-NTH1 sowie der Verwendung verschiedener Proteinextraktionsmethoden aus Pflanzenproben, konnten die msAK-NTH1 und -NTH2 das Cry1Ab-Toxin aus transgenem Mais weder der Linie Mon810 noch der Linie Bt176 nachweisen. Die Immunoblots mit den aus Mäusen erzeugten mAKs 3A11C3, 2C4G11 und 3E7E9 zeigten ähnliche Ergebnisse. Obwohl im ELISA diese mAKs das Cry1Ab-Protein mit einer sehr geringen Menge bis zu 0,4 ng/ml detektieren konnten (Walschus *et al.*, 2002), wurde in eigenen Western-Blots allerdings keine der erwarteten Banden des Cry1Ab-Toxins aus transgenem Mais gefunden. Daraus läßt sich schließen, dass es nicht an der Qualität des aus Hühnern erzeugten polyklonalen Antikörpers lag, weshalb kein Nachweis des Cry1Ab-Toxins aus Pflanzenmaterial gelang.

Die erste Erklärung wäre, dass das Nachweisproblem bei der Extraktion der Proteine, bzw. bei den unerwünschten Interaktionen zwischen der Western-Blot-Membran und den Extrakten bzw. Substanzen in den Extrakten liegen könnte. Eine Abtrennung der Proteinfraction von den anderen niedermolekularen Substanzen sowie anderen Nicht-Protein-Bestandteilen wie Chlorophyll, Fette, Nukleinsäuren aus dem Extrakt durch Proteinfällung (Amoniumsulfat-Fällung; Aceton-Fällung) wurde durchgeführt; trotzdem war das Cry1Ab-Toxin aus den Proteinextrakten im Blot nicht nachweisbar. Ergänzend wurde untersucht, welcher Einfluß das Einmischen verschiedener Volumina der Pflanzenextrakte mit einer konstante Menge von Toxin aus *E. coli* auf das Signal des Cry1Ab-Toxins aus rekombinanten *E. coli* im Western-Blot hatte. Die Ergebnisse ergaben eindeutig, dass die Pflanzenextrakte die Reaktion zwischen AK und Cry1Ab-Toxin deutlich beeinflussten. Die Intensität der Cry1Ab-

Toxinbande reduzierte sich stetig mit der Zunahme der Menge von Pflanzenextrakten. Möglicherweise wird es bei der Extraktion proteolytisch abgebaut. Weitere Erklärungen wären, dass das Cry1Ab-Protein aus transgenem Mais zu der Proteingruppe gehörte, die nicht einfach zu extrahieren ist und das extrahierte Cry1Ab-Protein in einer unzureichenden Menge vorlag, um einen Nachweis mittels immunologischer Methode zu erlauben.

In Western-Blot-Untersuchungen der Firma Monsanto war der Nachweis erfolgreich, nachdem die Pflanzenextrakte mit Trypsin behandelt wurden, dann lag bei Mon810 die Toxinbande im Western-Blot allerdings nicht im Bereich von 92 kDa, sondern bei ca. 63 kDa. Sieben andere transgene Maislinien MON zeigten ebenfalls einen Cry1Ab-trypsinresistenten Proteinkern mit einem Molekulargewicht von ca. 63 kDa (Agbios, 2001). Bei der Hybridsorte der Linie Bt176 (CG00554×CG00526-176 und CG00564×CG00526-176) lag die Haupttoxinbande im Blot ebenfalls bei ca. 65 kDa (Fearing *et al.*, 1997). Bei drei anderen Banden mit ungefähr 60, 40 und 36 kDa wurde festgestellt, dass sie nicht für die insektizide Aktivität verantwortlich sind.

4.6 Expressionsmonitoring des Cry1Ab-Toxins in transgenem Mais

Um die wichtigen Parameter von den möglichen Wirkungen des Bt-Mais auf Nicht-Ziel-Organismen zu erkennen und zu beurteilen, wurden die Kenntnisse über die Cry1Ab-Gehalte in den verschiedenen Pflanzenorganen während der ganzen Saison benötigt. Die jährliche Variabilität und der Einfluss der verschiedenen Standorte auf die Expression des Cry1Ab-Toxins sollten ebenfalls ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Cry1Ab-Gehalte der transgenen Linien Mon810 und Bt176 auf den beiden Versuchsflächen des BMBF-Verbundprojektes „Sicherheitsforschung und Monitoringsmethoden zum Anbau von Bt-Mais“ bestimmt. Beim Sammeln der transgenen Proben wurde darauf geachtet, dass die zu untersuchenden Pflanzen in der Mitte einer Parzelle standen, damit keine isogene Pflanze statt einer transgenen Pflanze geerntet wurde, denn am Rand jeder Parzelle waren jeweils 18 Reihen Mantelsaat ausgesät. Die Messung der Expressionshöhe von Cry1Ab in Mon810 und Bt176 bestätigte im Wesentlichen veröffentlichte Untersuchungen der Firmen Monsanto und Syngenta (EPA BRAD, 2001; Canada Food inspection Agency; ANZFA, 2001; Mendelsohn *et al.*, 2003; Essential Biosafety, 2001; Agbios, 2001). Der Vergleich der Mittelwerte der bestimmten Toxingehalte in den eigenen Untersuchungen mit den Literaturdaten zeigte einige Unterschiede (Tab 12a und 12b). Insgesamt war bei Mon810 und Bt176 der Gehalt des Cry1Ab-Toxins in den unteren und oberen Blättern am höchsten. Die Toxinmenge in den

Wurzeln der Mon810 variierte zwischen 0,7-2,1 µg/g FG (Bonn) bzw. 0,34-2,31 µg/g (Halle) während der ganzen Vegetationsperiode (Tab. 12a). Im Gegensatz dazu wurde bei Bt176 nur bei 68% der Wurzelproben ein sehr geringer Toxingehalt (<0,003 µg/gFG) detektiert. Dies ist mit der Daten der Fa. Novartis vergleichbar (Tab. 12b). Nach Koziel *et al.* (1993) ist bei Bt176 durch die Anwendung des Promotors Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) das Toxin überwiegend nur in den grünen Pflanzenteilen zu finden.

Tab. 12a: Vergleich des Toxingehaltes in Pflanzengewebe der Maislinie Mon810 zwischen Literaturdaten und eigenen Messungen

Cry1Ab-Gehalt (µg/g FG)						
Mon810	Literaturdaten				Eigene Untersuchungen ^f	
	US 1994	US 1995	EU 1995	EU 1996	Bonn 2001-2003	Halle 2001-2003
Wurzeln	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1,41 0,75-2,14	1,58 0,34-2,31
Stängel	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1,09 0,35-1,90	1,24 0,46-2,06
Blätter	9,35 ^{a, b, c} 7,93-10,34 ^{d, e}	8,95 ^d 5,21-10,61	8,60 ^d 7,59-9,39	12,15 ^d 7,77-15,06	5,68 0,44-8,60	6,36 1,88-11,07
Pollen	< 0,090 µg/g TG ^{a, b, c, e}	k.A.	k.A.	k.A.	0,003 ^g	0,096 ^h
Antheren	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1,82 0,48-4,65	2,80 0,30-6,65
Kolben/ Körner	0,31 ^{a, b, c} 0,19-0,39 ^{b, e}	0,57 ^d 0,39-0,91	0,53 ^d 0,42-0,69	0,41 ^d 0,35-0,46	0,26 0,06-0,51	0,24 0,007-0,46
Kolben- mark	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0,79 0,68-0,88	0,90 0,63-1,09
ganze Pflanze	4,15 ^{b, c, d} 3,65-4,65 ^{b, e}	3,34 ^d 2,31-4,48 ^d	4,80 ^d 4,11-5,56	4,88 ^d 4,32-5,34	k.A.	k.A.

^{a)} EPA BRAD (2001)

^{b)} ANZFA (2001)

^{c)} Canadian food inspection Agency

^{d)} Safety assessment of YieldGard[®] insect-protected corn event Mon810 (2002)

^{e)} Mendelsohn *et al.* (2003)

^{f)} Mittelwert, Min-Max von drei Jahren, EC80

^{g)} Mittelwert, Min-Max von zwei Jahren 2002 und 2003, EC60

^{h)} Einzelwert im Jahr 2003, EC60

k.A.: keine Angabe

Zu den Ergebnissen aus den Stängeln der beiden Linien Mon810 und Bt176 konnten keine Daten in der Literatur gefunden werden. Da sich der Maiszünsler nach dem Blattfraß in die Stängel bohrt und sich in das Stängelmark frißt (Hoffmann *et al.*, 1985), wurden die Cry1Ab-Gehalte in den Stängeln quantifiziert. Bei Mon810 betrug der Cry1Ab-Gehalt ca. 0,5-2 µg/g FG, bei Bt176 hingegen bei ca. 24 ng/g FG (Tab. 12a und b).

Bei Mon810 lag der durchschnittliche Toxingehalt der Blätter in den drei Jahren bei 5,68-6,36 µg/g FG, ca. 32-40% geringer als in der Literatur angegeben (Tab. 12a). Die Betrachtung einzelner Werte zeigte, dass die Toxingehalte sehr stark von Pflanze zu Pflanze variierten. Bei einigen Blattproben des Standortes Halle erreichte die Konzentration des Cry1Ab-Toxins über 10-11 µg/g FG. Diese starke Schwankung in den eigenen Untersuchungen könnte auf dem größeren Stichprobenumfang und unterschiedlichen Versuchsjahren basieren. Bei Bt176 waren die Toxingehalte im unteren und oberen Blatt der eigenen Untersuchung ca. doppelt so hoch wie in den Literaturdaten (Tab. 12b). Diese Unterschiede könnten auch darauf beruhen, dass die verschiedenen Messungen zwar mit derselben Bt-Mais-Linie, jedoch bei unterschiedlichen Sorten durchgeführt worden sein könnten.

Tab. 12b: Vergleich der Toxingehalte in Pflanzengewebe der Maislinie Bt176 zwischen Literaturdaten und eigenen Messungen.

Cry1Ab-Gehalt (µg/g FG)		
Bt176	Literaturdaten	Eigene Untersuchungen^c
Pflanzen- gewebe	USA 1995	Halle 2001-2003
Wurzel	<0,008 ^{a, b}	<0,003
Stängeln	k.A.	0,024 0,007-0,112
Blätter	1,440 ^a	2,814 1,69-3,75
Pollen	1,137-2,348 ^{a, b}	1,749 ^d 0,113-2,692
Antheren	0,530-3,029 ^a	0,389 0,018-0,75
Kolben/Körner	<0,005 ^b	<0,005
Kolbenmark	<0,008 ^{a, b}	<0,0003

^a) Essential Biosafety (2001)

^b) Agbios (2001)

^c) Mittelwert, Min-Max von 3 Jahren; EC80

^d) Mittelwert, Min-Max von 2 Jahren 2002 und 2003, EC60

k.A.: keine Angabe

Nach Koziel *et al.* (1993) wird bei Bt176 das Cry1Ab-Toxin im Pollen stark exprimiert. Die Toxingehalte variierten zwischen 2fach (US-Daten, 1995, Tab. 12b) und 4fach (eigene Messung) (Tab. 12b). Nach den Daten von EPA (1999) betrug der Toxingehalt in Pollen von Bt176 bis zu 7,1 µg/g FG. Nach Hansen und Obrycki (2000) betrug der Toxingehalt in Pollen von Bt176 1,6 µg/g Pollen, also ca. viermal weniger als von EPA (1999) angegeben. Der unterschiedliche Toxingehalt in Pollen einer Maislinie in verschiedenen Untersuchungen könnte zum Teil auf die Methode und den Zeitraum zur Lagerung der Pollen sowie die Extraktionsmethode des Toxins aus Pollen zurückzuführen sein. Nach dem Trennen von den Antheren wurden die Pollen direkt bei -20°C gelagert (eigenen Untersuchung) oder für 24 h bei 23°C getrocknet und bei -20°C für 8-9 Monaten bis zur Messung gelagert (Pilcher *et al.*, 1997) bzw. lyophilisiert (Fearing *et al.*, 1997). Die Toxinextraktion aus Pollen wurde mit der Ultraschallbehandlungs- oder French-Press-Methode durchgeführt (Hansen und Obrycki, 2000; Fearing, *et al.*, 1997). In eigenen Versuchen wurden die Pollen zerquetscht und in dem Extraktionspuffer des QuantiplateTM-Kits, 15 h bei 4°C inkubiert (Kap. 2.13.6).

Die starke Expression des Toxins in Pollen der Linie Bt176 führt dazu, dass Larven der zweiten Generation des Maiszünslers, die häufig Pollen fressen, sterben (Carrozzi und Koziel, 1997), aber andererseits eine mögliche Gefährdung pollenfressender Nicht-Zielorganismen gegeben sein könnte (Hansen und Obrycki, 2000; Sears *et al.*, 2001; Stanley-Horn *et al.*, 2001; Hellmich *et al.*, 2001). Bei Laborversuchen mit Larven des Tagpfauenauges (*Inachis io*) wiesen Felke und Langenbruch (2003) nach, dass die Larven, die mit Pollen von transgenem Mais der Linie Bt176 gefüttert worden waren, eine signifikant erhöhte Mortalität von 62,3% gegenüber den unbehandelten Kontrolllarven hatten. Gegenüber der Linie Bt176 wird bei Mon810 nur wenig Toxin in Pollen gebildet. Die amerikanischen Daten von 1994 und die eigenen Untersuchungen am Standort Halle waren vergleichbar (Tab. 12a). Die Toxinmenge in Pollen bei Bt176 war 12-25fach höher als bei Mon810 (Tab. 12a und 12b). Wraight *et al.* (2000) zeigte, dass das Cry1Ab-Toxin in Pollen der Linie Bt176 sogar bis 40fach höher sein kann als in der Linie Mon810. Dies stimmte gut mit den Ergebnissen der Untersuchungen überein, in denen lediglich 7-30 Pollenkörner der Linie Bt176 pro cm² Blatt bei Milk weeds (*Asclepias* spp.) schon einen negativen Effekt auf die Larven des Monarchfalters (*Danaus plexippus* L.) entwickelten, im Gegensatz zu mehr als 1000 Pollenkörnern der Bt11, Mon810 bzw. EC1507 pro cm² Blatt des Milk weeds (Hellmich *et al.*, 2001). Nach Felke und Langenbruch (2003) stellte der Anbau von Bt-Mais-Sorten, die große Mengen Toxin in Pollen produzieren, eine zusätzliche, potentielle Gefahrenquelle dar,

deren Wirkungen auf zahlreiche Arten zum jetzigen Zeitpunkt aber noch nicht abgeschätzt werden können.

Über die Toxinexpression in Antheren der Linie Mon810 lagen keine Vergleichswerte in der Literatur vor. Eigene Messungen zeigten, dass die Toxinmenge in den Antheren (1,8 µg/g FG) ca. 30-600fach höher war als in Pollen. Im Gegensatz dazu wurde bei Bt176 das Toxin stärker in Pollen (1,7 µg/g FG) exprimiert als in Antheren (0,39 µg/g FG). Die Toxingehalte in Antheren der eigenen Untersuchung waren bis zu 10mal geringer als in der Literatur (Tab. 12b).

In den Körnern von Mon810 lag der Toxingehalt bei 0,3 µg/g FG, bei Bt176 dagegen nur bei <0,5 ng/g FG. Bei Mon810 waren die Toxingehalte der US-Studien des Jahres 1994 und der eigenen Untersuchung vergleichbar. Die durchschnittlichen Toxingehalte in der Literatur (Tab.12a und 12b) in den Jahren 1995 und 1996 waren ca. 1,5- bis 2mal höher als in der eigenen Messung. Bei Bt176 waren die Toxingehalte in den Körnern der eigenen Messungen und in den Literatur sehr gering (<5 ng/g FG).

Die Unterschiede der Expression des Cry1Ab-Toxins in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Maispflanzen sind in den Kapitel 3.7.1 und 3.7.2 erläutert worden. Die Ergebnisse zeigten, dass in den Wurzeln der Mon810 Pflanzen die Toxingehalte von EC20 bis EC80 keinen signifikanten Unterschied aufwiesen. Hingegen wurde eine signifikante Zunahme der Toxingehalte zwischen dem EC20 und EC80 in Stängeln (ca. 1,5-4fach) und oberen Blättern (ca. 1,5-2fach bzw. 1,6-4,1fach) beobachtet. Bei Bt176 war der Toxingehalt im oberen Blatt zwischen EC20 und EC80 des Jahres 2002 bis zu 13mal höher. Auch eine Zunahme des Toxingehaltes in den Blättern der Maislinie Bt176 konnte von 1 µg/mg des gesamten löslichen Proteins von sieben Wochen alten Pflanzen bis zu 4 µg/mg Gesamtproteine in einem späteren Entwicklungsstadium nachgewiesen werden (Koziel *et al.*, 1993). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Untersuchungen von Dutton *et al.* (2004) sowie von Olsen und Daly (2000), nach denen jüngere Pflanzen eine höhere Menge an Bt-Toxin enthielten als ältere Pflanzen. Nach der Erklärung von Olsen und Daly (2000) könnte dies durch eine geringere Menge an Gesamtproteinen in den älteren Pflanzen beeinflusst worden sein. Die unteren Blätter waren in den späteren Entwicklungsstadien (EC60 und EC80) oft welk und vertrocknet, so dass es schwierig ist, den Toxingehalt zwischen unteren und oberen Blatt zu vergleichen.

Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass die Toxingehalte in einzelnen Pflanzengeweben verschiedener Pflanzen schwankten. Bei Mon810 waren die durchschnittlichen Toxingehalte in den Wurzeln zwar über verschiedenen Wachstumsstadien relativ konstant, jedoch war die Schwankungsbreite zwischen dem maximalen und minimalen Toxingehalt der einzelnen Probe bei EC20, EC30 des Jahres 2002 am Standort Bonn bis zu 3,2 bzw. 5fach. Ein Faktor von ca. 4,5 wurde in EC20 und EC30 des Jahres 2003 in den Wurzeln des Standortes Halle gemessen. Im oberen Blatt war die Schwankungsbreite von ca. 4,5fach ermittelt werden (EC30 im Jahr 2002 am Standort Bonn und EC80 im Jahr 2003 am Standort Halle).

Bei Bt176 variierten die Toxingehalte am stärksten in oberen Blatt im EC20 und EC30 des Jahres 2001 mit einem Faktor von 12. In den Stängeln und Kolben konnte die Schwankungsbreite nicht deutlich erkannt werden, da deren Toxingehalte sehr gering waren. In den restlichen Geweben der beiden Maislinien Mon810 und Bt176 lagen die Schwankungsbreiten bei einem Faktor von 1,5-3.

Um zu untersuchen, ob die Schwankung in einzelnen Geweben jeweils miteinander korrelierten, also eine Abhängigkeit zwischen den gewebespezifischen Expressionen in einer einzelnen Pflanze existiert, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Als Basis wurde der Cry1Ab-Gehalt des oberen Blattes genommen. Die Korrelationsanalyse konnte allerdings nur von den Proben der beiden Jahre 2002 und 2003 der Mon810 durchgeführt werden, da die Probennahme im Jahr 2001 einer unverbundenen Stichprobe entsprach. Am Standort Bonn wurde überwiegend keine Korrelation zwischen den Toxingehalten verschiedener Pflanzengewebe in den beiden Jahren bestimmt. Am Standort Halle wurde ebenfalls nur in einem der 22 Untersuchungsglieder eine Korrelation mit dem Toxingehalt gefunden.

Die Sorte Novelis (Mon810) wurde sowohl im Versuchsfeld Bonn als auch in Halle angebaut. Daher war es möglich, deren Cry1Ab-Gehalt zwischen der beiden Standorten zu vergleichen. In der Verteilung der Cry1Ab-Gehalte in der verschiedenen Pflanzenorganen und in den saisonalen Unterschieden zeigten die Maispflanzen auf beide Standorten die selbe Tendenz. Allerdings waren die Cry1Ab-Gehalte am Standort Halle in 38 von 51 Untersuchungsgliedern (Pflanzengewebe und Wachstumsstadien der drei Jahre 2001 bis 2003) deutlich höher als am Standort Bonn (Kap. 3.7.1.3). Am Standort Halle waren die Toxingehalte im Durchschnitt in den Wurzeln und Stängeln 1,3fach, im oberen und unteren Blatt 1,5fach und in den Antheren 2fach höher als am Standort Bonn. Am Standort Bonn waren die Toxingehalte in 13 von 51 Untersuchungsgliedern höher als am Standort Halle, jedoch waren die Unterschiede nur bei 5

Untersuchungsgliedern deutlich zu erkennen (1,3-1,7fach), nämlich in der Wurzel (EC20, 2003), Stängeln (EC20, 2003), oberem Blatt (EC30, 2001), Antheren (EC60, 2003) und Kolben (EC80, 2001). Diese Unterschiede im Toxingehalt zwischen zwei Standorten konnten nur zum Teil mit dem Trockengewicht und den Wetterbedingungen der drei Versuchsjahre erklärt werden. Im Vergleich zum Trockengewicht der Proben zwischen den Standorten Halle und Bonn wurde festgestellt, dass der Toxingehalt von ca. 50% der Untersuchungsglieder und deren Trockengewicht miteinander korreliert. Dies bedeutet, dass die Proben am Standort Halle, die ein höheres prozentuales Trockengewicht als am Standort Bonn besaßen, einen höheren Toxingehalt hatten als jene mit einem niedrigen prozentualen Trockengewicht. Außerdem war die Zunahme des Toxingehaltes in den Stängeln und im oberen Blatt mit der Steigerung deren Trockengewichts im Laufe der Vegetationsperiode (EC20 bis EC80) deutlich zu sehen (Abb. I, II und III). Bei Wurzeln, unterem Blatt, Antheren und Kolben stimmte diese Beobachtung allerdings nicht.

Der Jahresvergleich der Cry1Ab-Gehalte (Mon810, Standort Bonn) zeigte, dass in der Tendenz der Gehalt des Toxins im Jahr 2002 geringer war als in den Jahren 2001 und 2003. Diese Tendenz war in den drei Gewebeproben wie Stängel, oberes Blatt und unteres Blatt besonders deutlich. Dies kann zum Teil mit den Wetterdaten des jeweiligen Jahres erklärt werden. In drei von vier Entwicklungsstadien war die Luftfeuchtigkeit im Jahr 2002 höher als in 2001 und 2003 (siehe Wetterdaten in Tab. Ia und Ib). Die Wochensummen des Niederschlages waren vor dem Termin EC20 und EC30 im Jahr 2002 etwas niedriger als im Jahr 2001, aber im Vergleich mit dem Jahr 2003 ca. 1,2- bzw. fast 7fach höher. Außerdem waren die gesamten Sonnenstunden und die Mitteltemperatur in den drei EC20 bis EC60 im Jahr 2002 niedriger als in den beiden Jahren 2001 und 2003. Dies könnte den Wassergehalt in den frischen Blattgeweben beeinflusst haben, wodurch der Proteingehalt im Allgemeinen und der Cry1Ab-Gehalt im Besonderen bezogen auf das Frischgewicht der Proben im Jahr 2002 geringer gewesen sein könnte als in den Jahren 2001 und 2003. Diese Wetterbedingungen konnten jedoch nicht die Unterschiede der Toxingehalte in anderen Pflanzengeweben wie Wurzel, Kolben, Antheren erklären.

Am Standort Halle wurden im unteren, oberen Blatt und Pollen von Mon810 und im oberen bzw. unteren Blatt von Bt176 in den meisten Entwicklungsstadien des Jahres 2002 (außer EC80) geringere Cry1Ab-Gehalte gemessen als in den Jahren 2001 und 2003. Die Wetterdaten am Standort Halle eine Woche vor dem Termin der Probenahme zeigten, dass in EC20, EC30 und EC60 die Niederschlagssummen im Jahr 2002 zwischen 1,4-3,3fach höher

waren als im Jahr 2001 (siehe Wetterdaten in Tab IIa und IIb). Im Jahr 2003 lag die Niederschlagssumme eine Woche vor den vier Probenahme-Terminen zwischen 0-0,9 mm. Diese Menge war in der ganzen Vegetationsperiode gering (Tab. IIa und IIb). Die Gesamtsumme der Sonnenstunden und die Mitteltemperatur in den meisten EC des Jahres 2003 waren deutlich höher als in den zwei Jahren zuvor. Die Betrachtung nach Trockengewicht zeigte, dass das Trockengewicht des Stängels (1,1-1,6fach), des oberen Blattes (1,1-1,5fach) und der Antheren (1,2 fach) beim EC30 bis EC80 des Jahres 2003 höher war als in den Jahren 2001 und 2002. Die Toxingehalte dieser Proben im Jahr 2003 waren signifikant höher als im Vorjahr und korrelierten somit gut mit deren Trockengewicht. Im unteren Blatt von EC80 bei Mon810 der Jahre 2001 und 2003 waren die Trockengewichte ca. doppelt so hoch wie im Jahr 2002 (Abb. II), jedoch wiesen deren Toxingehalte keinen signifikanten Unterschied auf. Nach Traore *et al.* (2000) kann Trockenstress die Expression des Bt-Toxins in transgenen Maisgewebe beeinflussen.

In den letzten zwei Versuchsjahren 2002 und 2003 wurde der Cry1Ab-Gehalt in den Wurzelstümpfen der Linie Mon810 am Standort Bonn und der Linie Bt176 am Standort Halle, die nach der Bodenbearbeitung auf dem Feld (über 8 Monaten) liegen geblieben waren, eingesammelt. In den Wurzelstümpfen von Mon810 konnte das Cry1Ab-Toxin noch bis zu 15-17 ng/g getrocknete Wurzel nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Toxingehalt in den frischen Wurzeln der vorigen Saison war die Toxinkonzentration in den verrotteten Wurzelresten somit mindestens um das ca. hundertfache niedriger, aber dennoch nachweisbar. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der Untersuchung von Zwahlen *et al.* (2003a), in welcher der Toxingehalt im Blattmaterial der Maislinie Bt11 am Anfang bei $15,5 \pm 12,9 \mu\text{g/g}$ Trockengewicht lag und sich nach 200 Tagen auf $0,05 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$ Trockengewicht reduzierte. Laut diesen Autoren wurden 90 % des Toxins in den Blättern nach 145 bzw. 105 Tagen unter den Freilandbedingungen abgebaut. In den Biotests mit dem Regenwurm *Lumbricus terrestris* wurde kein Lethaleffekt von der transgenen Maislinie Bt11 innerhalb 200 Tagen beobachtet (Zwahlen *et al.*, 2003b). Es stellte sich die Frage, ob das nachweisbare Toxin in den Wurzelstümpfen bzw. Blattrückständen noch im aktiven insektiziden Zustand geblieben ist, oder ob es nur Abbauprodukte waren, die trotzdem mit dem AK im ELISA reagierten. In Biotests wies die Mortalität der *O. nubilalis* Larven, die beim entsprechenden Laborversuch bzw. Feldversuch mit 40 bzw. 80 Tage alten Blattrückständen des Mais Bt11 gefüttert worden waren, gegenüber den Kontrolllarven, die isogenen Bt-Mais bekommen hatten, eine höhere Signifikanz auf (Zwahlen *et al.*, 2003b). Die *O. nubilalis* Larven, die mit 160 bzw. 200 Tage alten Blattrückständen gefüttert worden waren, hatten tendenziell ein

niedrigeres Gewicht als die Kontrollen, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede abgesichert werden. Diese Daten zeigten, dass es unterhalb einer bestimmten Bt-Toxinkonzentration nicht mehr möglich war, mit dem Biotest festzustellen, ob das ermittelte Bt-Toxin noch in seinem aktiven Zustand war oder nicht (Zwahlen, *et al.* 2003b). Daher ist davon auszugehen, dass auch für die in den Wurzelstümpfen der Linie Mon810 ermittelten Cry1Ab-Toxin-Gehalte keine Aussage über die Aktivität getroffen werden kann. Jedoch ist darauf hinzuweisen, dass die Bt-Toxin-Gehalte in den Pflanzenresten auch nach der Erntezeit ausreichend sein könnten, um einen Einfluß auf die umgebende Mikroorganismen-Flora und andere Bodenlebewesen zu haben. Dabei ist zu berücksichtigen, dass eine Anreicherung des Cry1Ab-Toxins im Boden durch Bindung an Ton, Huminsäuren und Ton-Huminsäure-Komplexe möglich ist (Crecchio und Stotzky, 1998). Nach Stotzky (1998) blieb die insektizide Aktivität der gebundenen Toxine erhalten und konnte noch bis zu 234 Tage nach Ausbringung im Boden nachgewiesen werden.

Die Quantifizierung der Cry1Ab-Toxingehalte in verschiedenen Pflanzenorganen zweier transgener Maislinien in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der drei Jahre 2001 bis 2003 zeigte insgesamt eine große Variabilität der Expression des Toxins. Dieses könnte durch epigenetische Effekte verursacht worden sein. Nach Moch (2004) können eventuell die Anzahl der Kopien der eingebauten Konstrukte, die Position der Insertion, die Stärke-Expression durch den 35S-Promotor und Umwelteinflüsse, insbesondere der Faktor Temperatur, Gründe für diesen Effekt sein. Des weiteren stimmten die eigenen Messungen mit denen von Archer *et al.* (2000) überein. Dieser konnte nachweisen, dass bei den Mon810, Bt176, Bt11 und CBH354 eine Resistenz gegen die erste Generation von *O. nubilalis* bestand. Bei Bt176 wurde das Cry1Ab-Toxin viel in Pollen und Blätter exprimiert, jedoch sehr wenig bzw. kein Toxin in den Wurzeln, Stängeln und Körnern, so dass die Toxingehalte der Linie Bt176 nicht ausreichend für den Schutz vor der zweite Generation von *O. nubilalis* im Gegensatz zu Mon810 und anderen Linien waren. Die überlebenden Larven auf dem Feld der Bt176 hatten subletale Dosen an Bt-Toxin. Dies zeigte, dass die Bt176 Linie die Voraussetzungen für das Resistenz-Management der „Hoch-Dosis“-Strategie nicht erfüllt (Zoerb *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit einer einfachen und effizienten Methode zur Herstellung größerer Mengen (im mg- bis g- Bereich) des Cry1Ab-Protoxins und Toxins aus rekombinanten *E. coli* aufgezeigt. Standardisierte Toxine können für ökologische Studien, wie z.B. die Bestimmung der Basis-Empfindlichkeit von Insektenpopulationen oder Analyse

möglicher Effekte des Bt-Mais auf Nicht-Zielorganismen verwendet werden. Die Ermittlung der Expressionshöhe des Cry1Ab-Toxins der zwei Bt-Maislinien in den Versuchsfeldern in Deutschland stellt eine wichtige Information und die Datenbasis in Bezug auf die Resistenzentwicklung und Risikoabschätzung beim Anbau der Bt-Maispflanzen dar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war (1) die Produktion, biochemische Charakterisierung und biologische Aktivitätstestung von rekombinant exprimiertem *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ab und (2) die vergleichende Bestimmung der Cry1Ab-Gehalte in verschiedenen Organen der transgenen Bt-Maislinien Mon810 und Bt176 im Verlauf von drei Vegetationsperioden.

Die Produktion von Cry1Ab wurde mit zwei rekombinanten *E. coli*-Stämmen, HB101/pMP und XL1-Blue/pBD140, welche das komplette Cry1Ab-Protein exprimierten, durchgeführt. Durch Trypsinisierung des Protoxins aus beiden *E. coli*-Stämmen wurde das aktive Cry1Ab-Toxin als trypsinresistentes Protein von 60 kDa hergestellt. Bei der unvollständigen Trypsinbehandlung besaß das Cry1Ab-Toxin ein Molekulargewicht von ca. 67 kDa. Die Reinigung der Proteineinschlusskörper und anschließende Ultrafiltration resultierte in einem Reinheitsgrad des Cry1Ab-Protoxins und des Cry1Ab-Toxins von 80-86%. Insgesamt wurden ca. 2 g Cry1Ab-Protoxin und 368 mg Cry1Ab-Toxin produziert. Rekombinant hergestelltes Cry1Ab-Protoxin und -Toxin waren bei -20°C Lagerung über einen Zeitraum von mindestens acht Monaten stabil. Bei 4°C Lagerung hatte sich das Protoxin nach acht Monaten vollständig abgebaut. Im gleichen Zeitraum zeigte das Cry1Ab-Toxin im SDS-Gel dagegen keine große Veränderung der Intensität der Toxinbande.

In Biotests wurde festgestellt, dass sich die Aktivität des Protoxins über einen Zeitraum von vier bis sechs Lagerungswochen bei 4°C nicht signifikant unterschied. Der LC_{50} -Wert lag bei 50 bzw. 72 ng/cm^2 bei der Oberflächen-Applikation. Die Aktivität des Cry1Ab-Toxins aus HB101/pMP blieb für ca. 20 Lagerungswochen bei 4°C stabil. Das Cry1Ab-Toxin aus XL1-Blue/pBD140, das nicht ultrafiltriert wurde, zeigte einen 22fachen Verlust der toxischen Aktivität innerhalb von sechs Wochen. Die Überprüfung im SDS-Gel zeigte einen weiteren proteolytischen Abbau dieses Toxins von 60 kDa bis ca. 59 kDa. Biotests unter Verwendung von getrocknetem transgenem Maispulver zeigten trotz niedriger Mortalität der *O. nubilalis*-Larven, eine vollständige Wachstumshemmung des Maiszünslers bei $0,45 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Medium.

Zum immunologischen Nachweis des rekombinanten Cry1Ab-Protoxins und -Toxins wurde ein polyklonaler Antikörper aus Hühnereiern gewonnen und ein indirekter ELISA-Test etabliert. Bei der Verdünnung 1/1600 des ersten Antikörpers und 1/5000 des zweiten Antikörpers wurde die untere Nachweisgrenze des aktiven Toxins im indirekten ELISA bei einer Konzentration von 7 ng/ml erreicht. Der Nachweis des Toxins war um das ca. siebenfache empfindlicher als der des Protoxins. Im Western-Blot zeigte das Toxin ebenfalls

eine ca. acht bis zehnfach stärkere Antikörper-Affinität als das Protoxin des gleichen Cry1Ab-Toxins. Allerdings ist es weder mit einem monospezifischen polyklonalen Antikörper noch mit einem monoklonalen Antikörper gelungen, das Cry1Ab-Toxin in den transgenen Maislinien Mon810 und Bt176 zu detektieren.

Der Schwerpunkt des zweiten Teils lag in der Bestimmung der Expressionshöhe des Cry1Ab-Toxins bei den zwei transgenen Maislinien Mon810 und Bt176 an zwei Versuchsstandorten bei Bonn und Halle. In dreijährigen Feldversuchen wurden insgesamt 2023 Gewebeproben verschiedener Entwicklungsstadien EC20, EC30, EC60, EC80 gesammelt und der Cry1Ab-Toxingehalt von 1632 Proben mittels DAS-ELISA bestimmt.

Die durchschnittlichen Cry1Ab-Gehalte in den Blättern der Linie Mon810 waren im Vergleich zu allen anderen Pflanzenteilen am höchsten. Der Cry1Ab-Gehalt betrug 2,4-6,4 µg/g FG (oberes Blatt) und 3,8-5,7 µg/g FG (unteres Blatt). In den Wurzeln betrug die Konzentration des Cry1Ab-Toxins 1-2 µg/g FG. Dagegen fand sich in den Stängeln (0,4-1,2 µg/g FG) und Kolben (0,05-0,5 µg/g FG) die niedrigste Konzentration an Cry1Ab-Toxin. In den auf dem Feld überwinterten Wurzelresten der Maislinie Mon810 waren noch bis zu 0,015 µg Cry1Ab-Toxin/g TG nachweisbar. Bei der Betrachtung der Expression des Cry1Ab-Toxins in den vier Entwicklungsstadien während der gesamten Vegetationsperiode zeigte sich folgendes Bild: Die Expression in den Wurzeln war annähernd konstant. In Stängeln und Blättern zeigte sich hingegen, dass das Toxin im Laufe der Vegetationsperiode anstieg. Im Vergleich zwischen den Versuchsjahren zeigte sich, dass in der Tendenz der Gehalt des Toxins im Jahr 2002 geringer war als in den Jahren 2001 und 2003. Die Werte des Cry1Ab-Toxins an den beiden Standorten Bonn und Halle wiesen ähnliche Muster innerhalb der verschiedenen Pflanzenteile auf. Allerdings lagen die Toxinmengen am Standort Halle in fast allen Entwicklungsstadien während der drei Versuchsjahre ungefähr 6% bis 49% über denen vom Standort Bonn.

Bei der Maislinie Bt176 konnte Cry1Ab-Toxin in den meisten Wurzel- und Kolbenproben nicht nachgewiesen werden. Im Stängel wurde ein geringer Cry1Ab-Gehalt (14-55 ng/g FG) gefunden. In den Blättern war der Cry1Ab-Gehalt von Bt176 zwischen 0,5-2,8 µg/g FG (oberes Blatt) und 1,7-2,0 µg/g FG (unteres Blatt). In den Blättern wurde das Toxin in den späteren Entwicklungsstadien gegenüber den früheren Stadien stärker exprimiert. Ähnlich wie bei Mon810 zeigte sich auch hier ein deutlicher Unterschied zwischen den Cry1Ab-Gehalten in den Jahren 2001 und 2003 und dem Jahr 2002. Die vorliegenden Monitoringergebnisse

belegen, dass die Schwankungen der Toxinexpression zwischen den Pflanzen der beiden Maislinien relativ hoch waren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adang, M.J. , Brody, M.S., Cardineau, G., Eagan, N., Roush R.T., Shewmaker, C.K., Jones, A., Oakes, J.V. und McBride, K.E.** (1993). The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIIIa gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol. Biol.* **21**: 1131–1145
- Agaisse, H. und Lereclus, D.** (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* **177** (21): 6027–6032
- Agbios** (2001). <http://www.agbios.com>
- ANZFA** (2001). Food derived from insect-protected corn line Mon810. A safety assessment technical report series No.5. Australia New-Zealand Food Authority. p. 9
- Archer, T. L., Schuster, G., Patrick, C., Cronholm, G., Bynum, E.D.Jr. und Morrison, W.P.** (2000). Whorl and stalk damage by European and Southwestern corn borers to four events of *Bacillus thuringiensis* transgenic maize. *Crop Prot.* **19**: 181–190
- Aronson, J.N. und Arvidson, H.C.** (1987). Toxin trypsin digeste fragment from the *Bacillus thuringiensis* parasporal body. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 416–421
- Aronson, A.I., Geng, C. und Wu. L.** (1999). Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxins upon Binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (6): 2503–2507
- Balkan, B., Melcion, D., Richard-Molard, D. und Cahagnier, B.** (2002). Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize growth in France and Spain. *J. Agr. Food Chem.* **50**: 728–731
- Ballester, V., Granero, F., de Maagd, R.A., Bosch, D., Mensua, J.L. und Ferré, J.** (1999). Role of *Bacillus thuringiensis* toxin domains in toxicity and receptor binding in the diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (5): 1900–1903
- Barton, K., Whitley, H. und Yang, N.S.** (1987). *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.* **85**: 1103–1109
- Bietlot, H.P., Carey, P.R., Pozsgay, M. und Kaplan, H.** (1989a). Isolation of carboxyl terminal peptides from proteins by diagonal electrophoresis: application to the entomocidal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Anal. Biochem.* **181**: 212–215

- Bietlot, H., Carey, P.R., Choma, C., Kaplan, H., Lessard, T. und Pozsgay, M.** (1989b). Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biochem. J.* **260**: 87–91
- Bohn, M., Kreps, R.C., Klein, D. und Melchinger, A.E.** (1999). Damage and grain yield losses caused by European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) in early maturing European maize hybrids. *J. Econ. Entomol.* **92**: 723–731
- Bolin, P.C., Hutchinson, W.D., Andow, D.A. und Ostlie, K.R.** (1998). Monitoring for European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) resistance to *Bacillus thuringiensis*: logistical considerations when sampling larvae. *J. Agr. Entomol.* **15** (3): 231–238
- Bosch, D., Visser, B. und Stiekema, W.J.** (1994). Analysis of non-active engineered *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**: 129–134
- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254
- Brookes, G.** (2002). The farm level impact of using Bt Mais in Spain. 16. Sep. 2002. p.3. Brookes West, Canterbury, Kent, UK, CT4 6UE. (<http://www.europabio.org/upload/dokument/gbpressrelease/EuropaBiobtmaizeinspainreportFINAL.pdf>)
- Bulla, J.L.A., Davidson, L.I., Kramer, K.J. und Jones, B.L.** (1979). Purification of the insecticidal toxin from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstakie*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**: 1123–1130
- Canadian Food Inspection Agency.** Case Study-Insect Resistant Corn Mon810 .p. 18–19. (http://www.tier.org.tw/biotech/Training%20Material/Mon810%20corn%20case%20study_2.pdf)
- Capenter, J.E.** (2001). Case studies in Benefits and riskis of agricultural biotechnology: Roundup ready soybeans and Bt filed corn. p. 26 (<http://www.ncfap.org>)
- Carozzi, N.B. und Koziel, M.G.** (1997). Transgenic maize expressing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein for control of the European corn borer. *Advanced in insect control: the role of transgenic plants.* p. 63–74. Taylor & Francis.
- Cheng, P., Wu, L., Ziniu, Y. und Aronson, A.** (1999). Subspecies-dependent regulation of *Bacillus thuringiensis* protoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (5): 1849–1853

- Chihrane, J. und Laugé, G.** (1996). Loss of parasitization efficiency of *Trichogramma brassicae* (Hym: Trichogrammatidae) under high temperature conditions. *Biol. Control* **7**: 95–99
- Chiueh, L.C., Chen, Y.L. und Shih, D.Y.C.** (2002). Study on the detection method of six varieties of genetically modified maize and processed foods. *J. Food Drug Anal.* **10** (1): 25–33
- Clairmont, R.E., Milne, R.E., Pham, V.T., Carrière, M.B. und Kaplan, H.** (1998). Role of DNA in the activation of the Cry1A insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **273** (15): 9292–9296
- Clark, M.F. und Adam, A.N.** (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**: 475–483
- Crecchio, C. und Stotzky, G.** (1998). Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biology and Biochemistry* **30** (4): 463–470
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. und Daean, D. H.** (1998). Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** (3): 807–813
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A. und Dean, D.H.** (2000). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. (http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html Feb. 2002)
- Crickmore, N.** (2004). http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/
- Crowther, J. R.** (2001). *Methods in Molecular biology* **149**: The ELISA Guidebook. p.9. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- De Maagd, R. A., Kwa, M. S. G., Van der Klei, H., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J. M., Stiekema, W. J. und Bosch, D.** (1996). Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Cry1A(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (5): 1537–1543
- De Maagd, R., Bosch, D. und Stiekema, W.** (1999). *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **4** (1): 9–13
- Degenhardt, H., Horstmann, F. und Mülleder, N.** (2003). Bt-Mais in Deutschland-Erfahrungen mit dem Praxisanbau von 1998 bis 2002. *Mais* **2/2003**: 75–78

- Du, C., Martin, P.A.W. und Nickerson, K.W.** (1994). Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3847–3853
- Dutton, A., D'Alessandro, M., Romeis, J. und Bigler, F.** (2004). Assessing expression of Bt-toxin (Cry1Ab) in transgenic maize under different environmental conditions. *GMOs in Intergrated Production, IOBC wprs Bullentin* **27** (3): 49–55
- EPA** (1999). Biopesticide fact sheet: *Bacillus thuringiensis* Cry1A(b)-endotoxin and the genetic material necessary for its production (plasmid vector pcib4431) in corn. Office of Pesticide Programs, US Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/pesticides/facsheets/fs006458t.htm>
- EPA BRAD** (2001). Biopsticides registration action document: Revised risks and benefits sections- *Bacillus thuringiensis* plant-pesticides. July 16. 2001, EPA. p. IIA5; IIC17
- Essential Biosafety** (2001). (<http://www.essentialbiosafety.info/dbase.php>)
- Farinós, G.P., de la Poza, M., Hernández-Crespo, P., Ortego, F. und Castañera, P.** (2004). Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomol. Exp. Appl.* **110**: 23–30
- Fearing, P. L., Brown, D., Vlachos, D., Meghji, M. und Privalle, L.** (1997). Quantitative analysis of CryIA(b) expression in Bt maize plants, tissues, and silage and stability of expression over successive generations. *Mol. Breeding* **3**: 169–176
- Felke, V.M. und Langenbruch, G.A.** (2003). Wirkung von Bt-Mais-Pollen auf Raupen des Tagpfauenauges im Laborversuch. *Gesunde Pflanzen* **55** (1): 1–7
- Ferré, J., Réal, M.D., Van Rie, J. Jansens, S. und Peferoen, M.** (1991). Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 5119–5123
- Freese, B.** (2001). A critique of the EPA's decision to re-register Bt Crops and an examination of the potential allergenicity of Bt proteins. Adapted from „Final comments for submission to the environmental protection agency docket No. OOP-00678B concerning the revised risks and benefits sections for *Bacillus thuringiensis* plant-pesticides“. p. 24

- Fujimoto, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Kyojuka, J. und Shimamoto, K.** (1993). Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol.* **11**: 1151–1155
- Garduno, F. , Thorne, L., Walfield, A.M. und Pollock, T.J.** (1988). Structural relatedness between mosquitocidal endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 277–279
- Gianessi, L., Sankula, S. und Reigner, N.** (2003). Plant Biotechnology: Potential impact for improving pest management in European agriculture - Maize case study June 2003. NCFAP (<http://www.ncfap.org>)
- Glare, T.R. und O'Callaghan, M.** (2000). *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. p. 14. John Wiley & Sons, LTD
- Gómez, I., Oltean, D.I., Gill, S.S., Bravo, A. und Soberón, M.** (2001). Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J. Biol. Control* **276** (31). 28906–28912
- Gómez, I., Miranda-Rios, J., Rudiño-Piñera, E., Oltean, D.I., Gill, S.S., Bravo, A. und Soberón, M.** (2002). Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope ⁸⁶⁹HITDTNNK⁸⁷⁶ in *Manduca sexta* Bt-R₁ receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A Toxins. *J. Biol. Chem.* **277** (33): 30137–30143
- Hafez, M., Salama, H.S., Aboul-Ela, R., Zaki, F.N. und Ragaei, M.** (1997). *Bacillus thuringiensis* affecting the larval parasite *Meteorus laeviventris* (Wesm.) (Hym., Braconidae) associated with *Agrotis ypsolom* (Rott.) (Lep., Noctuidae) larvae. *J. Appl. Entomol.* **121**: 535–538
- Hansen, L.C. und Obrycki, J.J.** (2000). Field deposition of Bt transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia* **125**: 241–248
- He, K., Wang, Z., Zhou, D., Wen, L., Song, Y. und Yao, Z.** (2003). Evaluation of transgenic Bt corn for resistance to the Asian corn borer (*Lepidoptera: Pyralidae*). *J. Econ. Entomol.* **96** (3): 935–940
- Head, G., Brown, C.R., Groth, M.E. und Duan, J.J.** (2001). Cry1Ab protein levels in phytophagous insects feeding on transgenic corn: implications for secondary exposure risk assessment. *Entomol. Exp. Appl.* **99**: 37–45

- Hellmich, R.L., Siegfried, B.D., Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E., Daniels, M.J., Mattila, H.R., Spencer, T., Bidne, K.G. und Lewis, L.C.** (2001). Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis* purified proteins and pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (21): 11925–11930
- Hilbeck, A., Baumgartner, M., Fried, P.M. und Bigler, F.** (1998a). Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.* **27** (2): 480–481
- Hilbeck, A., Moar, W.J., Pusztai-Carey, M., Filippini, A. und Bigler, F.** (1998b). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.* **27** (5): 1255–1263
- Hilbeck, A., Moar, W.J., Pusztai-Carey, M., Filippini, A. und Bigler, F.** (1999). Prey-mediated effects of Cry1Ab toxin and protoxin and Cry2A protoxin on the predator *Chrysoperla carnea*. *Entomol. Exp. Appl.* **91**: 305–316
- Hilbeck, A., Meier, M.S. und Raps, A.** (2000). Review on non-target organisms and Bt-plants. Report to Greenpeace International, Amsterdam. p.10. Published by EcoStrat GmbH., Zurich, Switzerland. April, 2000.
- Hoffmann, G.M., Nienhaus, F., Schönbeck, F., Weltzien, H.C. und Wilbert, H.** (1985). *Lehrbuch der Phytomedizin*. p. 333. 2. Auflage. Paul Parey
- Höfte, H. de Greve H., Seurinck, J., Jansens, S., Mahillon, J., Ampe, C., Vandekerchove, J., Vanderbruggen H., Van Montagu, M. und Zabeau, M.** (1986). Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis berliner* 1715. *Eur. J. Biochem.* **161**: 273–280
- Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Houtven, A., Vanderbruggen, H. und Vaeck, M.** (1988). Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of Lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** (8): 2010–2017
- Höfte, H. und Whiteley, H.R.** (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**:242–255
- Hori, H., Takahashi, Y., Takahashi, M. und Wada, Y.** (2000). Detection of the *Bacillus thuringiensis* serova *japonensis* strain Buibui protoxin with enzyme-linked immunosorbent assay and its application to detection of the toxin in soil. *Appl. Entomol. Zool.* **3** (3): 401–411

- Hübner, P., Studer, E., Häfliger, D., Stadler, M., Wolf, C. und Looser, M.** (1999). Detection of genetically modified organisms in food: critical points for quality assurance. *Accredit. Qual. Assur.* **4**: 292–298
- Hutchinson W.D. und Andow, D.A.** (1998). Resistance management for Bt Corn: Progress and Challenges to consensus in U.S. policy. Proceedings of 5th Intl. Symp. on Biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms, Braugschweig, Germany, Sept. 6-10, 1998.
- Ibiza-Palacios, M., Sayyed, A., Raymond, B., Wright, D. und Escrache, B.** (2004). Biochemical characterization of field evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in diamondback moth, *Plutella xylostella*. Book of Abstracts. Sip 2004. 37th Annual Meeting of the Society for Invertebrate pathology. 7th international conference on *Bacillus thuringiensis*. p. 58
- Indrasith, L.S., Ogiwara, K., Mimami, M., Iwasa, T., Maruyama, T., Suzuki, N., Asano, S., Sakanaka, K. und Hori, H.** (1991). Processing of delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by immobilized trypsin and chymotrypsin. *Appl. Ent. Zool.* **26**: 485–492
- Itoua-Apoyolo, C., Drif, L., Vassal, J.M., DeBarjac, H., Bossy, J.P., Leclant, F. und Frutos, R.** (1995). Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a Population of the European sunflower moth, *Homoeosoma nebulella*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (12): 4343–4347
- Janinhoff, A.** (2003). Entwicklung des Maisanbaues in Deutschland. *Mais* **3/2003**: 110–113
- Jarchow, E.G. und Ahl Goy, P.** (1996). Insect tolerant maize: possibilities and limitations of safety evaluations in biological system. In: BATS (Ed.) Safety of transgenic crops. Environmental and Agriculture considerations. Proceedings base form on biotechnology. 17.10.199
- Jenkins, J.L. und Dean, D.** (2001). Binding specificity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa for purified, native *Bombyx mori* aminopeptidase N and cadherin-like receptors. *BMC Biochem.* **2** (1): 12.
- Kaiser-Alexnat** (2004). Personliche Mitteilung. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für biologischen Pflanzenschutz, Henrichstraße 24, 64287 Darmstadt

- Klier, A., Bourgouin, C. und Rapoport, G.** (1983). Mating between *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* and transfer of cloned crystal genes. *Mol. Gen. Genet.* **191**: 257–262
- Koziel, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carozzi N.B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desal, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M.R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G.W., Wringt, M. und Evola, S.V.** (1993). Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol.* **11**: 194–200
- Kronback, K.T., Anderson, P.L., Hellmich, R.L., Dyer, J.M. und Lewis, L.C.** (2001). Improved method for assaying transgenic pollen effect on *Ostrinia nubilalis* (Hübner) larva. The ESA 2001 Annual Meeting-2001: An Entomological Odyssey of ESA. (http://www.esa.confex.com/esa/2001/techprogram/paper_2012.htm.)
- Kronstad, J.W., Schnepf, H.E. und Whiteley, H.R.** (1983). Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *Bacteriol.* **154**: 419–428
- Laemmler, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680–685
- Lecadet, M.M.** (1967). Action comparée de l'urée et du thioglycolate sur la toxine figurée de *Bacillus thuringiensis*. *C.R. Acad. Sci. Ser. D.* **264**: 2847–2850.
- Lee, C.S. und Aronson, A.I.** (1991). Cloning and analysis of δ -Endotoxin genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *alesti*. *J. Bacteriol.* **173** (20): 6635–6638
- Li, J., Carroll, J. und Ellar, D.J.** (1991). Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. *Nature (London)* **353**: 815–821
- Li, J., Derbyshire, D.J., Promdonkoy, B. und Ellar, D.J.** (2001). Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans.* **29** (part 4): 571–577
- Lightwood, D.J., Ellar, D.J. und Jarrett, P.** (2000). Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -Endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (12): 5174–5181
- MacIntosh, S.C., Stone, T.B., Sims, S.R., Hunst, P.L., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Prlak, F.J., Fischhoff, D.A. und Fuchs, R.L.** (1990). Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J. Invertebr. Pathol.* **56**: 258–266

- Magg, T., Melchinger, A.E., Klein, D. und Bohn, M.** (2002). Relationship between European corn borer resistance and concentration of mycotoxins produced by *Fusarium* spp. In grains of transgenic Bt maize hybrids, their isogenic counterparts, and commercial varieties. *Plant Breeding* **121**: 146–154
- Marçon, P.C.R.G., Young, L.G., Steffey, K.L. und Siegfried, B.D.** (1999). Baseline susceptibility of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* **92** (2): 279–285
- Martens, J.W.M., Visser, B., Vlak, J.M. und Bosch, D.** (1995). Mapping and characterization of the entomocidal domain of the *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) protoxin. *Mol. Gen. Genet.* **247** (4): 482–487
- Masson, L., Prefontaine, G., Peloquin, L., Lau, P.C.K. und Brousseau, R.** (1989). Comparative analysis of the individual protoxin compound in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1, *Biochem. J.* **269**: 507–512
- Masson, L., Moar, W.J., van Frankenhuyzen, K., Bosse, M. und Brousseau, R.** (1992). Insecticidal properties of a crystal protein gene product isolated from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (2): 642–646
- Meise, T.** (2003). Monitoring der Resistenzentwicklung des Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*, Hübner) gegenüber Bt-Mais. Dissertation, Universität Göttingen
- Melchinger, A. E., Kreps, R., Späth, R., Klein, D. und Schulz, B.** (1998). Evaluation of early-maturing European maize inbreeds for resistance to the Europa corn borer. *Euphytica* **99**: 115–125
- Mendelsohn, M., Kough, J., Vaituzis, Z. und Matthews, K.** (2003). Are Bt crops save? *Nat. Biotechnol.* **21** (9): 1003–1009
- Moch, K.** (2004). Epigenetic effects in transgenic plants-examples and relevance for risk assessment. Ecological process dynamics on population and landscape level with and without genetically modified organisms-comparing views and methods. p. 282. <http://www.uft.uni-bremen.de/oekologie/arbeitskreise2.htm>
- Müller, W.** (2000). Handbuch “Monitoring und Resistenzmanagement für Bt-Mais”. Umweltbundesamt/Federal Environment Agency - Austria. pp. 20–21

- Nagamatsu, Y., Itai, Y., Hatanaka, C., Funatsu, G. und Hayashi, K.** (1984). A toxic fragment from the entomocidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. Agr. Biol. Chem. (Tokyo). **48**: 611–619
- Nguyen, T.H., Meise, T., Langenbruch, G.A. und Jehle, J.** (2004). Production of Cry1Ab toxin in *E. coli* for standardisation of insect bioassays. GMOs in Intergrated Production, IOBC wprs Bulletin Vol. 27 (3): 125–130
- Obukowicz, M.G., Perlak, F.J., Kusano–Kretzmer, K., Mayer, E.J., Bolten, S.L. und Watrud, L.S.** (1986). Tn5-mediated intergration of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing pseudomonads. J. Bacteriol. **168**: 982–989
- Oddou, P., Hartmann, H., Radecke, F. und Geise, M.** (1993). Immunologically unrelated *Heliothis* sp. and *Spodoptera* sp. midgut membrane-proteins bind *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin. Eur. J. Biochem. **212**: 145–150
- Ogiwara, K., Indrasith, L.S., Asano, S. und Hori, H.** (1992). Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juice of various insect larvae. J. Invertebr. Pathol. **60**:121–126
- Olsen, K.M. und Daly, J.C.** (2000). Plant-toxin interactions in transgenic Bt cotton and their effect on mortality of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. **93**: 1293–1299
- Palm, C.J. , Donegan, K., Harris, D. und Seidler, R.J.** (1994). Quantification of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin from transgenic plants. Mol. Ecol. **3**: 145–151
- Palmer, I. und Wingfield, P.T.** (1995). Preparation and extraction of insoluble (Inclusion-Body) proteins from *Escherichia coli*. Unit 6.3.1. in Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc.
- Perlak, F.J., Deaton, R.W. Deaton, Armstrong, T.A., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T. und Fischhoff, D.A.** (1990). Insect resistant cotton plants. Biotechnol. **8**: 939–943
- Perlak, F.J., Fuchs, R.L., Dean, D.A., McPherson, S.L. und Fischhoff, D.A.** (1991): Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88**: 3324–3328

- Perlak, F.J., Stone, T.B., Muskopf, Y.M., Petersen, L.J., Parker, G.B., McPherson, S.A., Wyman, J., Love, S., Reed, G., Biever, D. und Fischhoff, D.A.** (1993). Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.* **22**: 313–321
- Pilcher, C.D., Obrycki, J.J., Rice, M.E. und Lewis, L.C.** (1997). Preimaginal development, survival and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Biol. Control* **26** (2): 446–454
- Polgar, A.L.** (2003). Laboratory method to test the effects of GM-plants on host/parasitoid system *Plodia interpunctella* and *Venturia canescens*. Ecological Impact of Genetically Modified Organisms. Praha, November 26–29, 2003. P 40
- Rajamohan, F., Alzate, O., Cotrill, J.A., Curtiss, A. und Dean, D.H.** (1996). Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: Mutations at domain II of Cry1Ab enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14338–14343
- Rang, C., Vachon, V., De Maagd, R., Villalon, M., Schwartz, J.L., Bosch, D., Fruutos, R. und Laprade, R.** (1999). Interaction between functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (7): 2918–2925
- Ribeiro, B.M. und Crook, N.E.** (1993). Expression of full-length and truncated forms of crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a Baculovirus and pathogenicity of the recombinant viruses. *J. Inverteb. Pathol.* **62**: 121–130
- Roberts, P. und Guillebeau, P.** (2004). European Corn Borer-*Ostrinia nubilalis* (Hubner). (<http://www.gaipm.org/top50/europeancorn.html>.)
- Robertson, J.L. und Preisler, H.K.** (1992). Pesticide Bioassays with Arthropods. Comparison of lethal doses. p. 46. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Romeis, J., Dutton, A. und Bigler, F.** (2004). *Bacillus thuringiensis* toxin (cry1Ab) has no direct effect on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). *J. Insect Physiol.* **50**: 175–183
- Safety Assessment of YieldGard[®] Insect-Protected Corn Event Mon810.** March 2002.
- Schnepf, H.E. und Whiteley, H.R.** (1981). Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 2893–2897

- Schnepf, H.E. und Whiteley, H.R.** (1985). Delineation of a toxin-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* **260**: 6273–6280
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. und Dean, D.H.** (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** (3): 775–806
- Schnepf, H.E., Tomczak, K., Ortega, J.P. und Whiteley, H.R.** (1990). Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **265**: 20923–20930
- Schrijver, A.D. und Moens, W.** (2003). Report on the molecular characterisation of the genetic map of event Bt176. Service of Biosafety and Biotechnology
- Scientific committee on plants at the EU-Commission** (30.03.1998). Protocol for the monitoring of European corn borer resistance to Bt-maize. Doc.: XI/157/98
- Scopes, R.K.** (1994). Protein purification principles and practice. 3rd ed., Springer Verlag New York.
- Sears, M.K., Hellmich, R.L., Stanley-Horn, D.E., Oberhauser, K.S., Pleasants, J.M., Mattila, H.R., Siegfried, B.D. und Dively, G.P.** (2001). Impact of *Bt* corn pollen on monarch butterfly populations: A risk assessment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (21): 11937-11942
- Sharma, H.C., Sharma, K.K., Seetharama, N. und Ortiz, R.** (2000). Prospects for using transgenic resistance to insects in crop improvement. *Electron. J. Biotechnol.* ISSN. **3** (2): 76–95
- Shivakumar, A.G., Gundling, G.J., Benson, T.A., Casuto, D., Miller, M.F. und Spear, B.B.** (1986). Vegetative expression of the δ -Endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **166**: 194–204
- Siegfried, B.D., Zoerb, A.C. und Spencer, T.** (2001). Development of European corn borer larvae on Event 176 Bt corn: influence on survival and fitness. *Entomol. Exp. Appl.* **100**: 15–20
- Stanley-Horn, D.E., Dively, G.P., Hellmich, R.L., Mattila, H.R., Sears, M.K., Rose, R., Jesse, L.C.H., Losey, J.E., Obrycki, J.J. und Lewis, L.** (2001). Assessing the impact of Cry1Ab expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (21): 11931–11936

- Stave, J.W.** (1999). Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO-future needs. *Food Control* **10**: 367–374
- Stotzky, G.** (1998). Persistence of the Insectizidal Toxins from *Bacillus thuringiensis* in Soil. In: International Committee on Microbial Ecology (Hrsg.): Eight International Symposium on Microbial Ecology, Halifax.
- Syngenta**: Bt Mais (<http://www.syngenta-seeds.de/btmais.html>)
- Tabashnik, B.E.** 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* **39**:47-79
- Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N. und Johneson, M.W.** (1990). Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: plutellidae). *J. Econ. Entomol.* **83**:1671–1676
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Fimon, N., Masson, L. und Heckel, D.G.** (1997) One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 1640–1644
- Tabashnik, B.E., Carrière, Y., Dennehy, T.J., Motin, S., Sisterson, M., Roush, R.T., Shelton, A.M. und Zhao, J.** (2003). Insect resistance to transgenic Bt crops: Lessons from the laboratory and field. *J. Econ. Entomol.* **96** (4): 1031–1038
- Transgen** (2001). (<http://www.transgen.de/Lexikon/zuensler.html>)
- Transgen** (2003). (http://www.transgen.de./Anwendung/Pflanzen/global_anbau.html)
- Transgen** (2003). (http://www.transgen.de/Pflanzen/Zulassung/mais_zul.html)
- Transgen** (2004). (<http://www.transgen.de/Anwendung/Pflanzen/Mais/weltgetreide.html>)
- Traore, S.B., Carlson, R.E., Pilcher, C.D. und Rice, M.E.** (2000). Bt and No-Bt Maize growth and development as affected by temperature and drought stress. *Agron. J.* **92**: 1027–1035
- Van der Salm, T., Bosch, D., Honée, G., Feng, L., Munsterman, E., Bakker, P., Stiekema, W.J. und Visser, B.** (1994). Insect resistant of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis cryIA(b)* and *cryIC* genes: a resistance management strategy. *Plant Mol. Biol.* **26**: 51–59
- Van Frankenhuyzen, K., Gringorten, J.L., Milne, R.E., Gauthier, D., Pusztai, M., Brousseau, R. und Masson, L.** (1991). Specificity of activated CryIA proteins from *Bacillus*

thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1 for defoliating forest lepidoptera. Appl. Environ. Microbiol. **57**(6): 1650–1655

Van Rie, J. (2000). *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. Int. J. Med. Microbiol. **290**: 463–469

Vogelgesang, J. und Hädrich, J. (1998). Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners. Accred Qual Assur **3**: 242-255

Wabiko, H., Raymon, K.C. und Bulla, L.A. (1986). *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. DNA **5**: 305–314

Walschus, U., Witt, S. und Wittmann, C. (2002). Development of monoclonal antibodies against Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* and their application in an ELISA for detection of transgenic Bt-Maize. Food Agr. Immunol. **41**: 231–240

Whiteley, H. R. und Schnepf, H.E. (1986) The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Microbiol. **40**: 549–576

Wraight, C.L., Zangerl, A.R., Carroll, M.J. und Berebbaum, M.R. (2000). Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97** (14): 7700–7703

Yamaguchi, H., Sasaki, K., Umetsu, H., Kamada, H. (2003). Two detection methods of genetically modified maize and the state of its import into Japan. Food Control **14**: 201-206

Zangerl, A.R., McKenna, D., Wraight, C.L., Carroll, M., Ficarello, P., Warner, R. und Berenbaum, M.R. (2001). Effect of exposure to event 176 *Bacillus thuringiensis* corn pollen on monarch and black swallowtail caterpillars under field conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98** (21): 11908–11912

Zoerb, A.C., Spencer, T., Hellmich, R.L., Wright, R.J. und Siegfrieg, B.D. (2003). Larval distribution and survival of second generation European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) on Event 176 Bt corn. Crop Protection **22**: 179–184

Zwahlen, C., Hilbeck, A., Gugerli, P. und Nentwig, W. (2003a). Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. Mol. Ecol. **12**: 765–775

Zwahlen, C., Hilbeck, A., Howald, R. und Nentwig, W. (2003b). Effect of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. Mol. Ecol. **12**: 1077–1086

7 ANHANG

7.1 Trockengewichte verschiedener Pflanzengewebe der Linie Mon810 und Bt176

Parallel zu den Messungen der Cry1Ab-Gehalte wurden die Trockengewichte der Pflanzenproben der drei Versuchsjahre bestimmt. Das relative prozentuale Trockengewicht verschiedener Pflanzengewebe der Maislinie Mon810 und Bt176 in den unterschiedlichen Wachstumsstadien am Standort Bonn und Halle in den Versuchsjahren 2001 bis 2003 wurden in den Abb. I, II und III dargestellt.

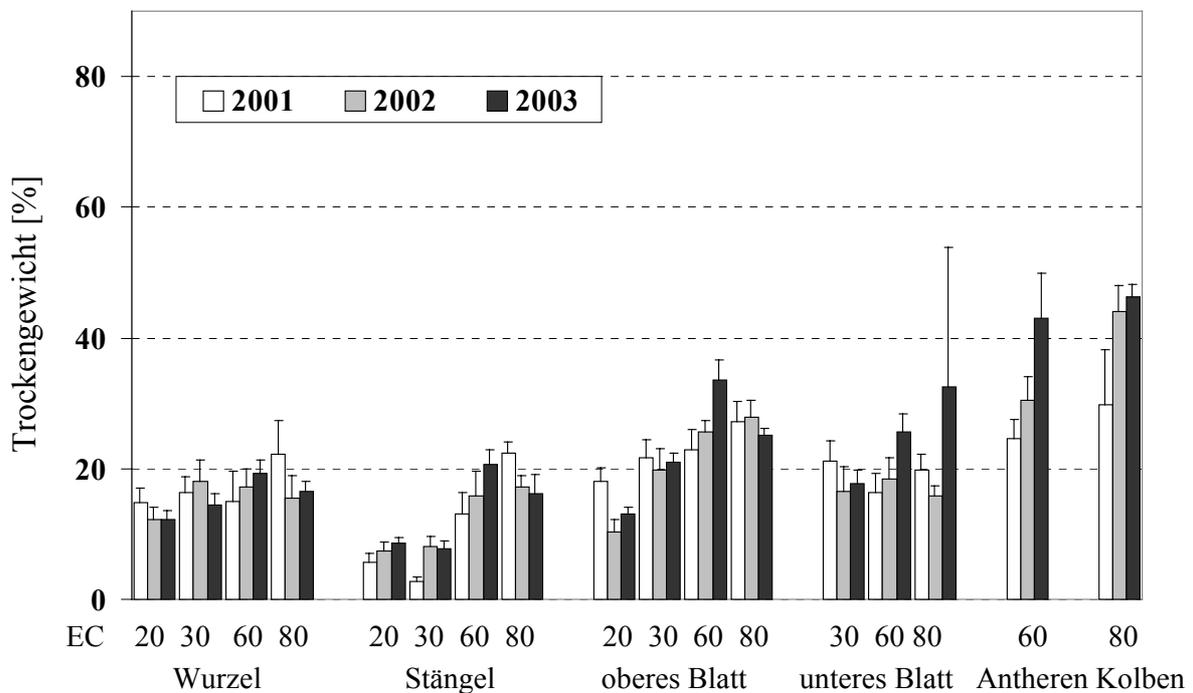


Abb. I: Relatives prozentuales Trockengewicht verschiedener Pflanzengewebe der Maislinie Mon810 in den unterschiedlichen Wachstumsstadien am Standort Bonn der Jahren 2001 bis 2003. Balken stellen Mittelwerte aus 16 Proben (2001 und 2002) bzw. 8 Proben (2003) dar.

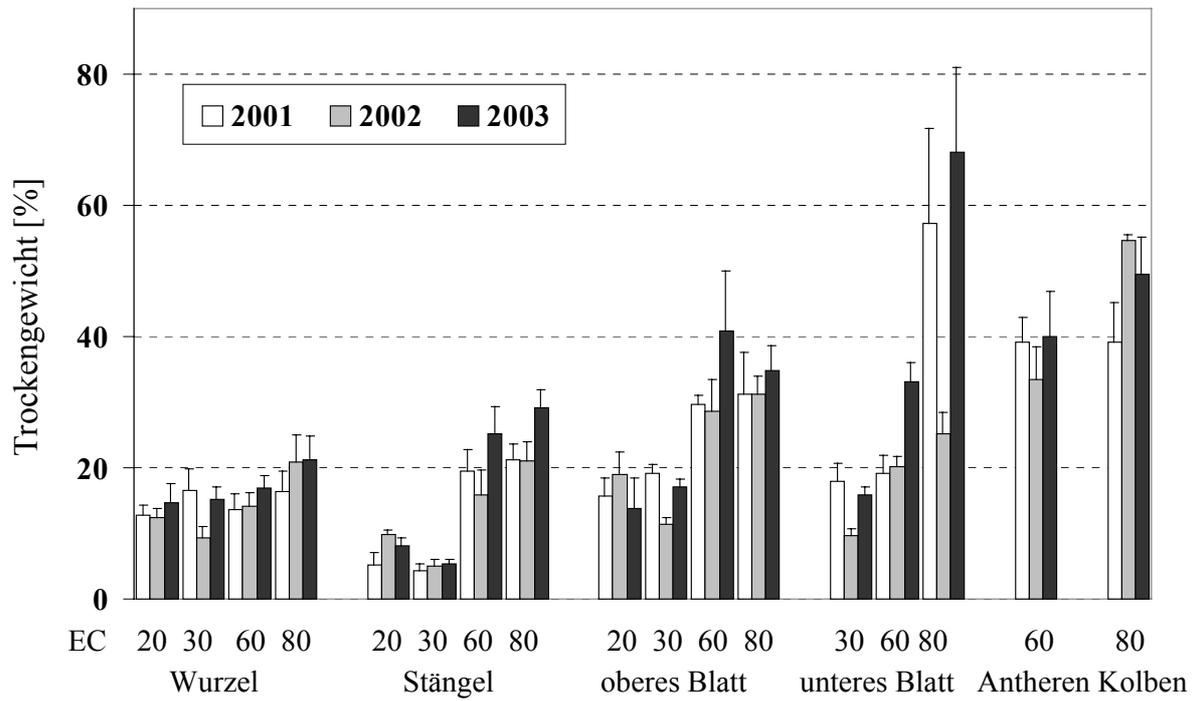


Abb. II: Relatives prozentuales Trockengewicht verschiedener Pflanzengewebe der Maislinie Mon810 in den unterschiedlichen Wachstumsstadien am Standort Halle der Jahren 2001 bis 2003. Balken sind Mittelwerte aus 16 Proben (2001 und 2002) bzw. 8 Proben (2003).

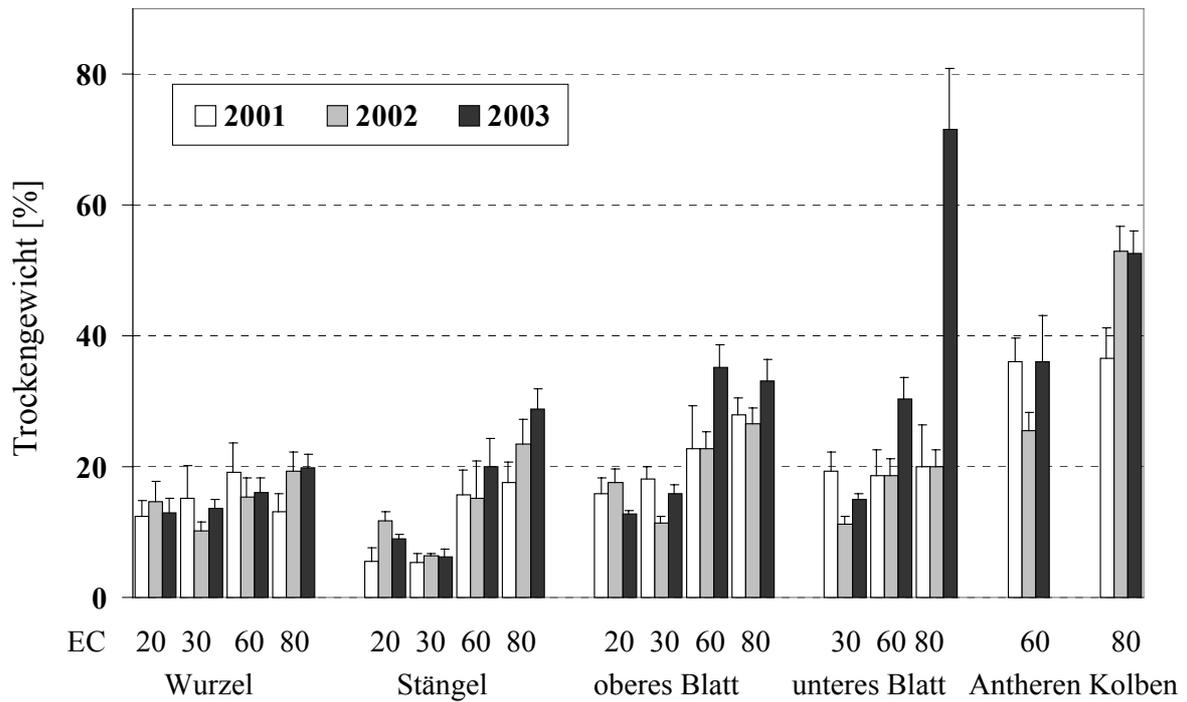


Abb. III: Relatives prozentuales Trockengewicht verschiedener Pflanzengewebe der Maislinie Bt176 in den unterschiedlichen Wachstumsstadien am Standort Halle der Jahren 2001 bis 2003. Balken sind Mittelwerte aus 16 Proben (2001 und 2002) bzw. 8 Proben (2003).

7.2 Wetterdaten

Tab. Ia: Wetterdaten (Wochensummen) in der Woche vor den Probenahmeterminen der drei Jahre 2001 bis 2003 (Wetterstation Bonn)

1 Woche vor Probenahme	Jahr	Mitteltemperatur [°C]	Gesamtsumme der Sonnenstunden [h]	Niederschlags-summe [mm]	Luftfeuchtigkeit [%]
EC20	2001	18,7	57,1	39,8	74,0
	2002	18,3	29,2	16,9	82,1
	2003	19,3	73,9	14,0	67,1
EC30	2001	18,7	57,1	39,8	74,0
	2002	17,8	33,2	24,9	78,0
	2003	18,4	77,9	3,6	63,4
EC60	2001	19,0	48,6	4,4	75,1
	2002	20,1	45,6	7,6	75,4
	2003	22,7	67,6	2,1	58,6
EC80	2001	12,4	13,9	32,3	88,7
	2002	17,5	38,9	3,8	77,9
	2003	19,6	47,3	0,2	67,9

Tab. Ib: Wetterdaten am Tag der Probenahme der drei Jahre 2001 bis 2003 (Wetterstation Bonn)

Am Tag der Probenahme	Jahr	Mitteltemperatur [°C]	Sonnenstunden [h]	Niederschlag [mm]	Luftfeuchtigkeit [%]
EC20	2001	18,6	14,9	5,5	6,7
	2002	24,4	11,6	-	72,0
	2003	20,0	11,5	8,9	68,0
EC30	2001	18,6	14,9	5,5	6,7
	2002	22,5	6,7	7,2	76
	2003	19,2	11,9	n.v.	56,0
EC60	2001	21,8	12,7	-	68,0
	2002	22,7	5,1	4,8	76,0
	2003	20,7	5,8	1,6	82,0
EC80	2001	11,7	1,7	0,8	88,0
	2002	14,1	0	1,5	90,0
	2003	19,1	4,0	0,2	80,0

n.v.: nicht vorhanden.

Tab. IIa: Wetterdaten (Wochensumme) in der Woche vor den Probenahmeterminen der Jahre 2001 bis 2003 (Wetterstation Halle)

1 Woche vor Probenahme	Jahr	Mitteltemperatur [°C]	Gesamtsumme der Sonnenstunden [h]	Niederschlags-summe [mm]	Luftfeuchtigkeit [%]
EC20	2001	17,0	56,8	5,8	70,3
	2002	14,5	65,6	8,5	68,4
	2003	19,1	68,5	0,3	60,0
EC30	2001	17,0	56,8	5,8	70,3
	2002	17,7	33,5	9,3	77,4
	2003	18,5	60,7	0,9	64,3
EC60	2001	21,8	75,8	4,8	63,3
	2002	20,2	41,5	15,9	64,9
	2003	18,7	69,0	0	56,4
EC80	2001	12,6	13,7	24,4	80,0
	2002	19,1	56,7	0,1	70,9
	2003	21,8	64,6	9,3	49,3

Tab. IIb: Wetterdaten am Tage der Probenahme der drei Jahre 2001 bis 2003 (Wetterstation Halle)

Am Tag der Probenahme	Jahr	Mitteltemperatur [°C]	Sonnenstunden [h]	Niederschlag [mm]	Luftfeuchtigkeit [%]
EC20	2001	19,2	1,4	0,8	87,0
	2002	16,9	14,6	n.v.	59,0
	2003	22,4	13,5	n.v.	46,0
EC30	2001	19,2	1,4	0,8	87
	2002	22,5	11,5	n.v.	63,0
	2003	17,60	3,1	0,1	82,0
EC60	2001	18,7	9,6	n.v.	65,0
	2002	18,6	1,9	0	73,0
	2003	22,3	13,5	0	45,0
EC80	2001	11,7	0,1	3,7	76,0
	2002	17,3	8,1	n.v.	63,0
	2003	24,3	7,4	2,7	48,0

n.v.: nicht vorhanden

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an dem Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR)–Rheinpfalz in Neustadt an der Weinstraße durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Jehle für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, die fachliche Unterstützung, die wertvollen Anregungen und ständige Diskussionsbereitschaft bei der Anfertigung des Manuskriptes.

Herrn Prof. Dr. A. G. Wolf (Universität Göttingen) danke ich für die Übernahme des Referates und die hilfreiche Unterstützung sowie das fortwährende Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. S. Vidal (Universität Göttingen) danke ich für die bereitwillige Übernahme des Korreferates.

Bei Frau Claudia Vogel, Herrn Theodoros Purtouridis und Frau Manuela Berlinghof bedanke ich mich für die technische Assistenz bei den Versuchen und die hilfreiche Unterstützung bei der Probenahme im Freiland.

Herrn Hugo Arends gilt mein Dank für die Einweisung in die Anwendung des „Image Master“ Programmes. Herrn M. Jutzi danke ich für die statistische Datenauswertung.

Des weiteren danke ich herzlich Frau Dr. Andrea Matt und Frau Britta Wahl-Ermel für die wertvollen Anregungen und das Korrekturlesen des Manuskripts.

Für das freundliche Arbeitsklima und Hilfsbereitschaft möchte mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Biotechnologischer Pflanzenschutz“ sowie allen Institutsangehörigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Herrn Dr. Moar (Auburn, USA) und Herrn Dr. de Maagd (Wageningen, Niederlande) danke ich für die zur Verfügung gestellten rekombinanten *E. coli* HB101/pMP-Zellen und XL1-Blue/pBD140-Zellen. Bei Herr Walschus (Fachhochschule Neubrandenburg) bedanke ich mich für die erhaltenen monoklonalen Antiseren und seine vielfältigen Anregungen.

Für die gute Zusammenarbeit bei den Probenahmen im Freiland möchte ich besonders Frau S. Baumgarte und den Mitarbeitern der FAL-Braunschweig sowie Herrn Dr. Achim Garthmann und den Mitarbeitern der RWTH Aachen danken, des weiteren Frau Dr. G. Leinhos vom DLR-Rheinpfalz und Frau B. Klante vom Deutschen Wetterdienst Geisenheim für die

Bereitstellung von Wetterdaten, sowie Herrn Dr. Langenbruch, Frau Dr. Kaiser-Alexnat, Herrn Dr. Meise und den Mitarbeitern der BBA-Darmstadt für die Einweisung zur Durchführung des Biotests und die Bereitstellung von Eiern des Maiszünslers.

Hang DT, Chi, Minh, Karen, Udo, Oliver, Jan Bernd und Kazu, Euch danke ich für die Hilfe und die Motivation in den letzten Phasen der Anfertigung der Arbeit.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern, meinen Freunden, der „Elxlebener Familie“ sowie der Familie Hermann Wagner, die mich von nah und fern sehr liebevoll unterstützt haben und ohne deren Ermutigung, insbesondere in schwierigen Phasen, diese Arbeit nicht erfolgreich zu Ende geführt worden wäre.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Verbundprojekts „Sicherheitsforschung und Monitoring zum Anbau von Bt-Mais“ vom BMBF gefördert.

Lebenslauf

Name	Nguyen Thu
Vorname	Hang
Geburtsdatum	09.03.1974
Geburtsort	Hanoi, Vietnam
1979–1990	Schulbildung in Hanoi Abschluss: Abitur
1990–1994	Biologie-Studium an der Universität Hanoi (Vietnam) Abschluss: Diplom – Biologin
1994–1995	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Center for Experimental Biology, Institute for Technological Application, Hanoi, Vietnam
1995–1997	Graduiertenstudium im Zentrum für Angewandte Mikrobiologie, University of Sciences, Vietnam National University Hanoi Abschluss: M.Sc. in Mikrobiologie
1997–1998	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Department of Petroleum Mikrobiology Institute of Biotechnology, National Center for Natural Science and Technology, Hanoi, Vietnam
1998–2000	DAAD-Stipendiatin für Aufbaustudium der Agrarwissenschaften in Tropen und Subtropen, Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Universität Göttingen Abschluss: M.Sc. Agr.
2001–2002	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Pflanzen Gesundheit, Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau, Großbeeren/Erfurt e.V.
Ab März 2002	Anfertigung der Dissertation, wissenschaftliche Mitarbeiterin am DLR- Rheinpfalz, Neustadt/Weinstrasse, Sachgebiet Biotechnologischer Pflanzenschutz , Abteilung Phytomedizin