



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 29 466 T2 2006.09.21**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 129 198 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 29 466.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/25492**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 962 669.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/026378**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.10.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **11.05.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.09.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **11.01.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.09.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/32 (2006.01)**

C07K 14/325 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

184748 02.11.1998 US

(73) Patentinhaber:

Monsanto Technology LLC., St. Louis, Mo., US

(74) Vertreter:

**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**METTUS, Light, Anne-Marie, Feasterville, PA
19053, US; BAUM, A., James, Webster Groves, MO
63119, US**

(54) Bezeichnung: **POLYPEPTIDZUSAMMENSETZUNGEN VON BACILLUS THURINGIENSIS CRYET70 DIE FÜR DI-
ABROTICA INSEKTEN TOXISCH SIND, UND METHODEN ZUR DESSEN VERWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

1.0 Hintergrund der Erfindung

1.1 Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich allgemein auf die Gebiete der Molekularbiologie. Bereitgestellt werden Verfahren und Zusammensetzungen, die DNA-Segmente umfassen, und Polypeptide, die von Bakterienspezies abgeleitet sind, zur Verwendung in insektiziden Zubereitungen und die Entwicklung von transgenen insektenresistenten Pflanzen. Insbesondere betrifft sie neue Nucleinsäuren, die von *Bacillus thuringiensis* erhalten werden und Polypeptide codieren, die gegenüber Coleoptera und Lepidoptera toxisch sind. Verschiedene Verfahren zur Herstellung und Verwendung dieser Nucleinsäuren, DNA-Segmente, die synthetisch modifizierte CryET70-Polypeptide codieren, sowie native und synthetische Polypeptidzusammensetzungen werden ebenfalls offenbart. Die Verwendung von DNA-Segmenten als diagnostische Sonden und Matrizen für die Proteinproduktion sowie die Verwendung von Polypeptiden, Fusionsproteinen, Antikörpern und Peptidfragmenten in verschiedenen immunologischen und diagnostischen Anwendungen werden ebenfalls offenbart, ebenso wie Verfahren zur Herstellung und Verwendung von Nucleinsäuresegmenten bei der Entwicklung von transgenen Pflanzenzellen, die die hier offenbarten Polynucleotide umfassen.

1.2 Beschreibung des Standes der Technik

[0002] Da Feldfrüchte von kommerziellem Interesse häufig das Ziel von Insektenangriffen sind, sind in vielen Fällen umweltsensible Verfahren zur Bekämpfung oder Ausrottung von Insektenbefall wünschenswert. Dies gilt insbesondere für Bauern, Gärtner, Züchter sowie Gewerbe- und Wohngebieten, wo man versucht, Insektenpopulationen mit Hilfe von umweltfreundlichen Zusammensetzungen zu bekämpfen. Die am verbreitetsten verwendeten umweltsensiblen Insektizidzubereitungen, die in den letzten Jahren entwickelt wurden, bestehen aus mikrobiellen Pestiziden, die von dem Bakterium *Bacillus thuringiensis* abgeleitet sind. *Bacillus thuringiensis* ist ein Gram-positives Bakterium, das Kristallproteine oder Einschlusskörper erzeugt, die spezifisch toxisch gegenüber bestimmten Ordnungen und Spezies von Insekten sind. Es hat sich gezeigt, dass viele verschiedene Stämme von *B. thuringiensis* insektizide Kristallproteine erzeugen. Zusammensetzungen, die *B.-thuringiensis*-Stämme beinhalten, welche insektizide Proteine erzeugen, sind kommerziell erhältlich und werden als umweltverträgliche Insektizide verwendet, da sie gegenüber dem bestimmten Zielinsekt sehr toxisch, aber gegenüber Pflanzen und anderen Nicht-Ziel-Organismen harmlos sind.

1.2.1 δ -Endotoxine

[0003] δ -Endotoxine werden verwendet, um ein breites Spektrum von laubfressenden Raupen und Käfern sowie Stechmücken zu bekämpfen. Diese proteinhaltigen parasporalen Kristalle, die auch als insektizide Kristallproteine, Kristallproteine, Bt-Einschlüsse, kristalline Einschlüsse, Einschlusskörper und Bt-Toxine bezeichnet werden, bilden eine große Sammlung von insektiziden Proteinen, die von *B. thuringiensis* produziert werden und nach Aufnahme durch ein anfälliges Wirtsinsekt toxisch sind. Im letzten Jahrzehnt hat die Erforschung der Struktur und Funktion von *B.-thuringiensis*-Toxinen alle Haupttoxinkategorien abgedeckt, und während sich diese Toxine in der spezifischen Struktur und Funktion unterscheiden, werden allgemeine Ähnlichkeiten in Struktur und Funktion angenommen. Auf der Grundlage des angehäuften Wissens über *B.-thuringiensis*-Toxine wurde ein verallgemeinerter Wirkungsmodus für *B.-thuringiensis*-Toxine erarbeitet, der Folgendes beinhaltet: Aufnahme durch das Insekt, Auflösung im Mitteldarm des Insekts (einer Kombination von Magen und Dünndarm), Resistenz gegen Verdauungsenzyme, zuweilen mit partieller Verdauung, die das Toxin tatsächlich "aktiviert", Bindung an die Zellen des Mitteldarms, Bildung einer Pore in den Insektenzellen und Zerstörung der zellulären Homöostase (English und Slatin, 1992).

[0004] Eines der einzigartigen Merkmale von *B. thuringiensis* ist seine Produktion von Kristallproteinen während der Sporenbildung, die spezifisch toxisch gegenüber bestimmten Ordnungen und Spezies von Insekten sind. Es hat sich gezeigt, dass viele verschiedene Stämme von *B. thuringiensis* insektizide Kristallproteine erzeugen. Zusammensetzungen, die *B.-thuringiensis*-Stämme beinhalten, welche Proteine mit insektizider Wirkung gegen Lepidoptera- und Diptera-Insekten erzeugen, sind kommerziell erhältlich und werden als umweltverträgliche Insektizide verwendet, da sie gegenüber dem bestimmten Zielinsekt sehr toxisch, aber gegenüber Pflanzen und anderen Nicht-Ziel-Organismen harmlos sind.

[0005] Der Mechanismus der insektiziden Wirkung der *B.-thuringiensis*-Kristallproteine wurde im letzten Jahrzehnt eingehend untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die Kristallproteine erst nach der Aufnahme des Proteins

durch das Insekt toxisch gegenüber dem Insekt sind. Der alkalische pH-Wert und die proteolytischen Enzyme im Mitteldarm des Insekts lösen die Proteine auf und ermöglichen dadurch die Freisetzung von Komponenten, die gegenüber dem Insekt toxisch sind. Diese toxischen Komponenten zerstören die Zellen des Mitteldarms, bewirken, dass das Insekt keine Nahrung mehr aufnimmt, und führen schließlich zum Tod des Insekts. Aus diesem Grund hat sich *B. thuringiensis* beim Umgang mit verschiedenen Schadinsekten als wirksames und umweltverträgliches Insektizid erwiesen.

[0006] Wie Höfte et al. (1989) bemerkten, ist die Mehrzahl der insektiziden *B.-thuringiensis*-Stämme aktiv gegen Insekten der Ordnung Lepidoptera, d.h. Raupeninsekten. Andere *B.-thuringiensis*-Stämme sind insektizid aktiv gegen Insekten der Ordnung Diptera, d.h. Fliegen und Mücken, oder sowohl gegen Lepidoptera- als auch gegen Diptera-Insekten. In den letzten Jahren wurde nur von wenigen *B.-thuringiensis*-Stämmen berichtet, die Kristallproteine erzeugen, welche toxisch gegen Insekten der Ordnung Coleoptera, d.h. Käfer, sind (Krieg et al., 1983; Sick et al., 1990; Lambert et al., 1992a; 1992b).

1.2.2 Gene, die Kristallproteine codieren

[0007] Viele der δ -Endotoxine sind in unterschiedlichem Ausmaß durch Ähnlichkeiten in ihren Aminosäuresequenzen miteinander verwandt. Historisch wurden die Proteine und die Gene, die sie codieren, weitgehend auf der Grundlage ihres Spektrums der insektiziden Aktivität klassifiziert. Der Übersichtsartikel von Höfte und Whiteley (1989) diskutiert die Gene und Proteine, die vor 1990 in *B. thuringiensis* identifiziert wurden, und legt das Nomenklatur- und Klassifikationsschema dar, das traditionell auf *B.-thuringiensis*-Gene und -Proteine angewendet wird. Die *cryI*-Gene codieren *CryI*-Proteine, die toxisch gegen Lepidoptera sind. Die *cryII*-Gene codieren *CryII*-Proteine, die toxisch sowohl gegen Lepidoptera als auch gegen Diptera sind. Die *cryIII*-Gene codieren *CryIII*-Proteine, die toxisch gegen Coleoptera sind, während *cryIV*-Gene *CryIV*-Proteine codieren, die toxisch gegen Diptera sind.

[0008] Auf der Grundlage des Grades der Sequenzähnlichkeit wurden die Proteine weiterhin in Unterfamilien eingeteilt; näher miteinander verwandten Proteinen innerhalb jeder Familie wurden einteilende Buchstaben zugeordnet, wie *CryIA*, *CryIB*, *CryIC*. Noch näher miteinander verwandte Proteine innerhalb jeder Abteilung erhielten Namen wie *CryIC1*, *CryIC2*.

[0009] Vor kurzem wurde eine neue Nomenklatur entwickelt, die die *Cry*-Proteine systematisch auf der Grundlage der Aminosäuresequenzhomologie und nicht der Insektenzielspezifitäten klassifiziert. Das Klassifikationsschema für viele bekannte Toxine ohne allelische Variationen bei individuellen Proteinen ist in Tabelle 2 von Abschnitt 4.3 zusammengefasst.

1.2.3 Identifizierung von Kristallproteinen, die toxisch gegenüber dem Westlichen Maiswurzelbohrer sind

[0010] Die Klonierung und Expression des *cry3Bb*-Gens wurde beschrieben (Donovan et al., 1992). Dieses Gen codiert für ein Protein von 74 kD mit Aktivität gegen Coleoptera-Insekten, insbesondere den Kartoffelkäfer (CPB) und den Südlichen Maiswurzelbohrer (SCRW).

[0011] Von einem *B.-thuringiensis*-Stamm, PS201T6, wurde berichtet, dass er Aktivität gegen den Westlichen Maiswurzelbohrer (WCRW; *Diabrotica virgifera virgifera*) besitzt (US-Patent Nr. 5,436,002).

[0012] Dieser Stamm besaß auch Aktivität gegen *Musca domestica*, *Aedes aegypti* und *Liriomyza trifolii*. Das *vip1A*-Gen, das ein vegetatives lösliches insektizides Protein erzeugt, wurde kloniert und sequenziert (WO 96/10083, 1996). Dieses Gen erzeugt ein Protein von ungefähr 80 kD mit Aktivität gegen WCRW und den Nördlichen Maiswurzelbohrer (NCRW). Ein weiteres Toxinprotein mit Aktivität gegen Coleoptera-Insekten einschließlich WCRW ist *CryIIa*, ein 81-kD-Polypeptid, dessen codierendes Gen kloniert und sequenziert wurde (WO 90/13651, 1990).

[0013] Das von Rupar et al. beschriebene *cryET29*-Gen (WO 98/13497, 1998) codiert ein Polypeptid von ungefähr 26 kD, das Aktivität gegen WCRW, SCRW sowie Aktivität gegen die Larven des Kartoffelkäfers und des Katzenfloh *Ctenocephalides felis* besitzt.

2.0 Kurzbeschreibung der Erfindung

[0014] Im krassen Gegensatz zum Stand der Technik stellen das Polypeptid der vorliegenden Erfindung und die neue DNA-Sequenz, die dieses codiert, eine neue Klasse von *B.-thuringiensis*-Kristallproteinen dar, die kei-

ne Sequenzhomologie zu einem der in der oben genannten Literatur beschriebenen WCRW-aktiven Toxine aufweisen. Ebenso umfassen die B.-thuringiensis-Stämme der vorliegenden Erfindung neue Gensequenzen, die ein Polypeptid mit insektizider Wirkung sowohl gegen Coleoptera- als auch Lepidoptera-Insekten einschließlich WCRW aufweisen.

[0015] Offenbart und beansprucht wird hier ein isoliertes *Bacillus-thuringiensis*- δ -Endotoxin-Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu wenigstens 90% mit SEQ ID Nr. 2 identisch ist. Vorzugsweise ist das Polypeptid zu wenigstens 95% mit SEQ ID Nr. 2 identisch. Besonders bevorzugt ist das Polypeptid zu wenigstens 99% mit SEQ ID Nr. 2 identisch, und besonders bevorzugt umfasst es wenigstens 75 aufeinanderfolgende Aminosäuren von SEQ ID Nr. 2. In einer beispielhaften Ausführungsform haben die Erfinder ein insektizid aktives Polypeptid identifiziert, das die 721 Aminosäuren lange Sequenz von SEQ ID Nr. 2 umfasst. Vorzugsweise hat ein solches Polypeptid insektizide Aktivität sowohl gegen Coleoptera- als auch gegen Lepidoptera-Insekten. Zum Beispiel haben die Erfinder gezeigt, dass ein δ -Endotoxin-Polypeptid, das die Sequenz von SEQ ID Nr. 2 umfasst, insektizide Aktivität gegen WCRW und den Kartoffelkäfer (CPB) sowie gegen die Lepidoptera-Insekten *Plutella xylostella* und *Trichoplusia ni* aufweist.

[0016] Solche Polypeptide werden vorzugsweise von einem Nucleinsäuresegment codiert, das zu wenigstens 90% mit den Nucleotiden zwischen Nucleotid 92 und Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 identisch ist, und werden besonders bevorzugt von einem Nucleinsäuresegment codiert, das zu wenigstens 95% mit den genannten Nucleotiden von SEQ ID Nr. 1 identisch ist. Beispielhafte Polynucleotide, die das insektizide Polypeptid codieren, umfassen den codierenden Bereich von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1. Die Erfindung offenbart auch Zusammensetzungen und insektizide Zubereitungen, die ein solches Polypeptid umfassen. Eine solche Zusammensetzung kann ein Zellextrakt, eine Zellsuspension, ein Zellhomogenisat, Zellysat, Zellüberstand, Zellfiltrat oder Zellsediment von Zellen von *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21885 (EG4140) oder NRRL B-21886 (EG11839) sein. Die Zusammensetzung, die im Folgenden ausführlich beschrieben wird, kann als Pulver, Staub, Pellets, Granulat, Sprühlösung, Emulsion, Kolloid oder Lösung zubereitet werden und kann mit herkömmlichen Mitteln wie Trocknung, Lyophilisierung, Homogenisierung, Extraktion, Filtration, Zentrifugation, Sedimentation oder Konzentration einer Kultur von *Bacillus-thuringiensis*-Zellen hergestellt werden. Vorzugsweise sind solche Zusammensetzungen aus Kulturen von Zellen von *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21885 (EG4140) oder NRRL B-21886 (EG11839) erhältlich. In allen solchen Zusammensetzungen, die wenigstens ein solches insektizides Polypeptid enthalten, kann das Polypeptid in einer Konzentration von etwa 1 bis etwa 99 Gew.-% vorhanden sein.

[0017] Eine beispielhafte insektizide Polypeptidzubereitung kann durch ein Verfahren hergestellt werden, das die Schritte des Kultivierens von Zellen von *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21885 (EG4140) oder NRRL B-21886 (EG11839) unter Bedingungen, die eine Produktion des insektiziden Polypeptids bewirken, und des Gewinnens des so produzierten insektiziden Polypeptids umfasst.

[0018] Zum Beispiel offenbart und beansprucht die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines δ -Endotoxin-Polypeptids mit insektizider Aktivität gegen ein Coleoptera- oder Lepidoptera-Insekt. Das Verfahren beinhaltet allgemein das Isolieren des durch die Zellen produzierten δ -Endotoxin-Polypeptids aus einer Kultur von Zellen von *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21885 (EG4140) oder NRRL B-21886 (EG11839), die unter geeigneten Bedingungen gezüchtet wurden. Solche Polypeptide können aus der Zellkultur oder dem Überstand oder aus Sporensuspensionen, die von der Zellkultur abgeleitet sind, isoliert und in nativer Form verwendet werden, oder sie können in sonstiger Weise gereinigt oder konzentriert werden, wie es für die besondere Anwendung zweckmäßig ist.

[0019] Ein Verfahren zur Bekämpfung einer Insektenpopulation der Ordnung Lepidoptera oder Coleoptera wird ebenfalls von der Erfindung bereitgestellt. Das Verfahren beinhaltet allgemein das In-Kontakt-Bringen der Population mit einer insektizid wirksamen Menge eines Polypeptids, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu wenigstens 90% mit SEQ ID Nr. 2 identisch ist. Solche Verfahren können verwendet werden, um die Lepidoptera- oder Coleoptera-Insekten in einem gegebenen Areal zu töten oder ihre Zahl zu reduzieren, oder sie können prophylaktisch auf ein Umweltareal angewendet werden, um einen Befall durch ein betreffendes Insekt zu verhindern. Vorzugsweise nimmt das Insekt eine Insektizid wirksame Menge des Polypeptids auf oder kommt damit in Kontakt.

[0020] Außerdem stellt die Erfindung einen gereinigten Antikörper bereit, der spezifisch an das insektizide Polypeptid der vorliegenden Erfindung bindet. Ein solcher Antikörper ist geeignet, um Polypeptide, an die ein solcher Antikörper spezifisch bindet, zu isolieren, identifizieren, charakterisieren und/oder zu reinigen. Immunologische Kits und Immunnachweisverfahren, die einen solchen Antikörper umfassen, sind für die Identifizierung

solcher Polypeptide und Peptidfragmente und/oder ihren Epitopen geeignet und werden hier eingehend angegeben.

[0021] Solche Antikörper können verwendet werden, um die Anwesenheit solcher Polypeptide in einer Probe nachzuweisen, oder sie können gemäß der folgenden Beschreibung bei einer Vielzahl von immunologischen Verfahren verwendet werden. Ein beispielhaftes Verfahren zum Nachweis eines δ -Endotoxin-Polypeptids in einer biologischen Probe beinhaltet im Allgemeinen die Gewinnung einer biologischen Probe, von der man annimmt, dass sie ein δ -Endotoxin-Polypeptid enthalten könnte, das In-Kontakt-Bringen der Probe mit einem Antikörper, der spezifisch an das Polypeptid der vorliegenden Erfindung bindet, unter Bedingungen, die die Bildung von Komplexen ermöglichen, und das Nachweisen der so gebildeten Komplexe.

[0022] Für solche Verfahren stellt die Erfindung auch einen Immunnachweis-Kit bereit. Ein solcher Kit enthält im Allgemeinen in geeigneten Behältereinrichtungen einen Antikörper, der an das δ -Endotoxin-Polypeptid der vorliegenden Erfindung bindet, und wenigstens ein erstes Immunnachweis-Reagens umfasst. Gegebenenfalls kann der Kit noch zusätzliche Reagentien oder Anweisungen zur Verwendung des Antikörpers beim Nachweis von δ -Endotoxin-Polypeptiden in einer Probe bereitstellen.

[0023] Die Herstellung solcher Antikörper kann erreicht werden, indem man das offenbarte Polypeptid als Antigen in einem Tier verwendet, wie es im Folgenden beschrieben ist. Antigene Epitope, kürzere Peptide, Peptidfusionen, trägergebundene Peptidfragmente und dergleichen können ebenfalls aus der gesamten oder einem Teil der in SEQ ID Nr. 2 offenbarten Polypeptidsequenz erzeugt werden. Besonders bevorzugte Peptide sind solche, die wenigstens 10 aufeinanderfolgende Aminosäuren aus der in SEQ ID Nr. 2 offenbarten Sequenz umfassen.

[0024] In einer anderen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung auch Nucleinsäuresegmente bereit, die charakterisiert sind als:

- a) Nucleinsäuresegment, das einen Sequenzbereich umfasst, der zu wenigstens 90% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist, oder dessen Komplement; oder
- b) Nucleinsäuresegment mit einer Länge von wenigstens 100 Nucleotiden, das dieselbe Sequenz aufeinanderfolgender Basenpaare hat wie ein Segment von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist, oder dessen Komplement.

[0025] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst dieser Nucleotidsequenzbereich einen Sequenzbereich, der zu wenigstens 90% mit SEQ ID Nr. 1 identisch ist.

[0026] Ein weiterer Aspekt der Erfindung bezieht sich auf eine *B. thuringiensis*-Zelle, Stamm EG11839, NRRL-Zugriffs-Nr. B-21886, und eine biologisch reine Kultur eines Wildtyp-*B. thuringiensis*-Bakteriums, Stamm EG4140, hinterlegt am 20. November 1997 bei der Agricultural Research Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory (NRRL) mit der Zugriffs-Nr. B-21885. *B. thuringiensis* EG4140 ist unten in Abschnitt 5.0 beschrieben. *B. thuringiensis* EG4140 ist ein natürlich vorkommender Stamm, der einen Sequenzbereich enthält, der zu einer Polynucleotidsequenz, die die 721 Aminosäuren lange Polypeptidsequenz in SEQ ID Nr. 2 codiert, hochgradig homolog und vorzugsweise damit identisch ist. In einer beispielhaften Ausführungsform umfasst der Stamm eine Nucleotidsequenz, die das in SEQ ID Nr. 1 offenbarte cryET70-Gen umfasst. EG4140 erzeugt ein 87 kD großes insektizides Polypeptid, das mit dem in SEQ ID Nr. 2 offenbarten Polypeptid verwandt oder damit identisch ist.

[0027] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung bezieht sich auf einen Vektor, der einen Sequenzbereich umfasst, welcher das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, auf eine rekombinante Wirtszelle, die mit einem solchen rekombinanten Vektor transformiert ist, und auf biologisch reine Kulturen von rekombinanten Bakterien, die mit einer Polynucleotidsequenz transformiert sind, die das in SEQ ID Nr. 2 offenbarte Polypeptid codiert. In einer beispielhaften Ausführungsform handelt es sich bei dem Bakterium um den hier beschriebenen *B. thuringiensis* EG11839 (hinterlegt am 20. November 1997 beim NRRL mit der Zugriffs-Nr. B-21886). Sowohl B-21885 als auch B-21886 wurden unter den Bestimmungen des Budapester Abkommens beim NRRL in der Patent Culture Collection hinterlegt, und Aussagen zur Lebensfähigkeit gemäß International Receipt Form BP/4 wurden erhalten. Beispielhafte Vektoren, rekombinante Wirtszellen, transgene Zelllinien, pluripotente Pflanzenzellen und transgene Pflanzen, die wenigstens einen ersten Sequenzbereich umfassen, der ein Polypeptid codiert, das die Sequenz von SEQ ID Nr. 2 umfasst, sind im Folgenden ausführlich beschrieben.

[0028] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung einer insektiziden Polypeptidzusammensetzung bereit, die das δ -Endotoxin-Polypeptid der vorliegenden Erfindung enthält. In bei-

spielhaften Ausführungsformen können solche Polypeptide zur Verwendung als Insektizid zubereitet werden, oder sie können verwendet werden, um Insektenpopulationen in einer Umgebung einschließlich landwirtschaftlicher Umgebungen zu bekämpfen. Die Zubereitungen können verwendet werden, um ein Insekt zu töten, entweder durch topische Anwendung oder durch Aufnahme der Polypeptidzusammensetzung durch das Insekt. In bestimmten Fällen kann es wünschenswert sein, die Polypeptide der vorliegenden Erfindung für die Anwendung auf dem Boden, auf oder in der Nähe von Pflanzen, Bäumen, Sträuchern, in der Nähe von lebenden Pflanzen, Vieh, Wohnhäusern, landwirtschaftlichen Geräten oder Gebäuden zuzubereiten.

[0029] Die vorliegende Erfindung stellt auch transformierte Wirtszellen, pluripotente Pflanzenzellpopulationen, embryonales Pflanzengewebe, Pflanzenkalli, Pflänzchen und transgene Pflanzen, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung oder einen ausgewählten Sequenzbereich, der das Polypeptid codiert, umfassen, bereit. Solche Zellen sind vorzugsweise prokaryontische oder eukaryontische Zellen, wie Bakterien-, Pilz- oder Pflanzenzellen; Beispielhafte Bakterienzellen sind Zellen von *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Agrobacterium* oder *Pseudomonas* (wie Zellen von *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21885 (EG4140) und NRRL B-21886 (EG11839)).

[0030] Die Pflanzen und Pflanzenwirtszellen sind vorzugsweise Zellen von Einkeimblättrigen oder Zweikeimblättrigen Pflanzen, wie Zellen von Mais, Weizen, Sojabohne, Hafer, Baumwolle, Reis, Roggen, Sorghum, Zuckerrohr, Tomate, Tabak, Kapok, Flachs, Kartoffel, Gerste, Rasengras, Weidegras, Beeren, Früchten, Leguminosen, Gemüsen, Zierpflanzen, Sträuchern, Kakteen, Sukkulente und Bäumen.

[0031] Beispielhafte transgene Pflanzen der vorliegenden Erfindung haben vorzugsweise in ihrem Genom ein ausgewähltes Polynucleotid (oder "Transgen") eingebaut, das wenigstens einen ersten Sequenzbereich umfasst, der das insektizide Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu wenigstens 90% mit SEQ ID Nr. 2 identisch ist.

[0032] Ebenso stellt auch eine Nachkommenschaft (Abkömmling, Sämlingspopulation) irgendeiner Generation einer solchen transgenen Pflanze einen wichtigen Aspekt der Erfindung dar. Vorzugsweise umfasst diese Nachkommenschaft das ausgewählte Transgen und erbt die phänotypische Eigenschaft der Insektenresistenz, die die Elternpflanze aufwies. Ein Samen irgendeiner Generation von allen solchen transgenen insektenresistenten Pflanzen, der das ausgewählte Transgen umfasst und die phänotypische Eigenschaft der Insektenresistenz auf die Pflanzen, die aus dem Samen wachsen, überträgt, ist ebenfalls ein wichtiger Aspekt der Erfindung.

[0033] Insektenresistente gekreuzte fruchtbare transgene Pflanzen, die ein Transgen umfassen, das das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, können nach einem Verfahren hergestellt werden, das im Allgemeinen Folgendes beinhaltet: das Gewinnen einer fruchtbaren transgenen Pflanze, die ein chromosomal eingebautes Transgen, das das insektizide Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert und das funktionell mit einem in der Pflanze aktiven Promotor verknüpft ist, umfasst; das Kreuzen der fruchtbaren transgenen Pflanze mit einer zweiten Pflanze, der das Transgen fehlt, so dass man eine dritte Pflanze erhält, die das Transgen umfasst; und das Rückkreuzen der dritten Pflanze, so dass man eine rückgekreuzte fruchtbare Pflanze erhält. In solchen Fällen kann das Transgen über eine männliche Elternpflanze oder über eine weibliche Elternpflanze vererbt werden. Die zweite Pflanze kann ingezüchtet sein, und die dritte Pflanze kann ein Hybrid sein.

[0034] Ebenso kann eine insektenresistente transgene Hybridpflanze nach einem Verfahren hergestellt werden, das im Allgemeinen das Kreuzen einer ersten und einer zweiten ingezüchteten Pflanze umfasst, wobei die erste und/oder die zweite ingezüchtete Pflanze ein chromosomal eingebautes Transgen, das das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert und das funktionell mit einem pflanzenexprimierbaren Promotor verknüpft ist, der das Transgen exprimiert. In beispielhaften Ausführungsformen können die erste und die zweite ingezüchtete Pflanze Einkeimblättrige Pflanzen sein, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Mais, Weizen, Reis, Gerste, Hafer, Roggen, Sorghum, Rasengras und Zuckerrohr besteht.

[0035] In einer verwandten Ausführungsform stellt die Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung einer insektenresistenten Pflanze bereit. Das Verfahren beinhaltet im Allgemeinen das In-Kontakt-Bringen einer aufnehmenden Pflanzenzelle mit einer DNA-Zusammensetzung, die wenigstens ein erstes Transgen umfasst, das das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, unter Bedingungen, die die Aufnahme der DNA-Zusammensetzung ermöglichen, das Selektieren einer aufnehmenden Zelle, die ein chromosomal eingebautes Transgen umfasst, das das Polypeptid codiert, das Regenerieren einer Pflanze aus der selektierten Zelle, und das Identifizieren einer fruchtbaren transgenen Pflanze, die eine im Vergleich zu der entsprechenden untransformierten Pflanze verstärkte Insektenresistenz hat.

[0036] Ein Verfahren zur Herstellung von transgenen Samen beinhaltet im Allgemeinen das Gewinnen einer fruchtbaren transgenen Pflanze, die ein chromosomal integriertes Transgen umfasst, das das Polypeptid, welches die Aminosäuresequenz umfasst, die zu wenigstens 90% mit SEQ ID Nr. 2 identisch ist, codiert und funktionell mit einem Promotor verknüpft ist, der das Transgen in einer Pflanze exprimiert, und das Wachsenlassen der Pflanze unter geeigneten Bedingungen unter Bildung des transgenen Samens.

[0037] Ein Verfahren zur Herstellung von Nachkommen irgendeiner Generation einer fruchtbaren transgenen Pflanze mit verstärkter Insektenresistenz wird von der Erfindung ebenfalls bereitgestellt. Das Verfahren beinhaltet im Allgemeinen das Sammeln von transgenem Samen von einer transgenen Pflanze, die ein chromosomal integriertes Transgen, das das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, funktionell verknüpft mit einem Promotor, der das Transgen in der Pflanze exprimiert, umfasst, das Pflanzen des gesammelten transgenen Samens, und das Wachsenlassen von transgenen Nachkommenpflanzen aus dem Samen.

[0038] Diese Verfahren zur Schaffung von transgenen Pflanzen, Nachkommen und Samen können das In-Kontakt-Bringen der Pflanzenzelle mit der DNA-Zusammensetzung beinhalten, wobei man eines der Verfahren verwendet, die für die Transformation von Pflanzenzellen wohlbekannt sind, wie Mikroprojektil-Bombardierung, Elektroporation oder Agrobacterium-vermittelte Transformation.

[0039] Diese und andere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden dem Fachmann anhand der folgenden Beispiele und Ansprüche klar, wobei die Lehre der vorliegenden Beschreibung von Nutzen ist.

2.1 cryET70-Polynucleotidsegmente

[0040] Die vorliegende Erfindung stellt Nucleinsäuresegmente bereit, die von praktisch jeder Quelle isoliert werden können, die frei von genomischer Gesamt-DNA sind und die die neuen insektiziden Polypeptide und Peptidfragmente, die hier offenbart werden, codieren. Die Polynucleotide, die diese Peptide und Polypeptide codieren, können aktive insektizide Proteine oder Peptidfragmente, Polypeptid-Untereinheiten oder funktionelle Domänen von einem oder mehreren mit CryET70- oder mit CryET70 verwandten Kristallproteinen, wie das in SEQ ID Nr. 2 offenbarte Polypeptid, codieren. Außerdem umfasst die Erfindung Nucleinsäuresegmente, die ganz in vitro synthetisiert werden können, wobei man dem Fachmann wohlbekanntes Verfahren verwendet, und die das neue CryET70-Polypeptid, Peptide, Peptidfragmente, Untereinheiten oder funktionelle Domänen, die hier offenbart sind, codiert.

[0041] Der hier verwendete Ausdruck "Nucleinsäuresegment" oder "Polynucleotid" bezieht sich auf ein Nucleinsäuremolekül, das frei von der genomischen Gesamt-DNA einer besonderen Spezies isoliert wurde. Daher bezieht sich "ein Nucleinsäuresegment oder Polynucleotid, das ein Endotoxin-Polypeptid codiert, auf ein Nucleinsäuremolekül, das Sequenzen umfasst, die wenigstens ein erstes Kristallprotein codieren, und das dennoch aus der genomischen Gesamt-DNA der Spezies, aus der das Nucleinsäuresegment erhalten wird, isoliert oder durch Reinigen davon befreit wurde, was im vorliegenden Fall das Genom der Grampositiven Bakteriengattung Bacillus und insbesondere der als *B. thuringiensis* bekannten Bacillus-Spezies ist. Der Ausdruck "Nucleinsäuresegment" umfasst auch Polynucleotidsegmente und kleinere Fragmente solcher Segmente und auch rekombinante Vektoren einschließlich zum Beispiel Plasmiden, Cosmiden, Phagemiden, Phagen, Viren, Baculoviren, künstlichen Chromosomen, Viren.

[0042] Dementsprechend sind Polynucleotidsequenzen, die zwischen 70% und 80% oder besonders bevorzugt zwischen 81% und 90% oder ganz besonders bevorzugt zwischen 91% und 99% Nucleinsäuresequenzidentität oder funktionelle Äquivalenz mit der Polynucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 1 aufweisen, Sequenzen, die "im Wesentlichen wie in SEQ ID Nr. 1 dargelegt" sind. In hohem Maße bevorzugte Sequenzen sind solche, die vorzugsweise zu 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% oder 100% identisch oder funktionell äquivalent mit der Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 1 sind. Weitere bevorzugte Sequenzen, die CryET70- oder mit CryET70 verwandte Sequenzen codieren, sind solche, die zu 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% oder 90% identisch oder funktionell äquivalent mit der in SEQ ID Nr. 1 dargelegten Polynucleotidsequenz sind. Ebenso werden Sequenzen, die zu 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% oder 80% identisch oder funktionell äquivalent mit der in SEQ ID Nr. 1 dargelegten Polynucleotidsequenz sind, ebenfalls als für die praktische Durchführung der vorliegenden Erfindung geeignet angesehen.

[0043] Ähnlich bezieht sich ein "Polynucleotid, das ein isoliertes, gereinigtes oder ausgewähltes Gen oder einen Sequenzbereich umfasst," auf ein Polynucleotid, das außer den peptidcodierenden Sequenzen noch bestimmte andere Elemente enthalten kann, wie regulatorische Sequenzen, die im Wesentlichen aus anderen natürlich vorkommenden Genen oder proteincodierenden Sequenzen isoliert sind. In dieser Hinsicht wird der

Ausdruck "Gen" der Einfachheit halber verwendet, um eine funktionelle protein- oder polypeptidcodierende Einheit zu bezeichnen. Der Fachmann wird sich darüber im Klaren sein, dass dieser funktionelle Ausdruck sowohl genomische Sequenzen, Operatorsequenzen als auch kleinere, gentechnisch erzeugte Gensegmente umfasst, die Proteine, Polypeptide oder Peptide exprimieren oder so angepasst werden können, dass sie welche exprimieren. In bestimmten Ausführungsformen umfasst ein Nucleinsäuresegment wenigstens ein erstes Gen, das ein Polypeptid codiert, welches die Sequenz von SEQ ID Nr. 2 codiert.

[0044] Um eine Expression des Gens und die Translation der mRNA zu einem reifen Polypeptid zu ermöglichen, umfasst das Nucleinsäuresegment vorzugsweise auch wenigstens einen ersten Promotor, der funktionell mit dem Gen verknüpft ist, so dass das Genprodukt in einer mit diesem Nucleinsäuresegment transformierten Wirtszelle exprimiert wird. Der Promotor kann ein endogener Promotor oder alternativ dazu ein heterologer Promotor sein, der aufgrund seiner Fähigkeit ausgewählt wird, die Expression des Gens in einem oder mehreren besonderen Zelltypen zu fördern. Bei der Schaffung von transgenen Pflanzen und pluripotenten Pflanzenzellen, die ein cryET70-Gen umfassen, ist der heterologe Promotor der Wahl zum Beispiel ein in Pflanzen exprimierbarer und kann in vielen Fällen vorzugsweise ein in Pflanzen exprimierbarer, gewebe- oder zellzykluspezifischer Promotor sein. Die Auswahl von pflanzenexprimierbaren Promotoren ist dem Fachmann auf dem Gebiet der Pflanzentransformation wohlbekannt, und beispielhafte geeignete Promotoren sind hier beschrieben. In bestimmten Ausführungsformen kann der pflanzenexprimierbare Promotor aus der Gruppe ausgewählt sein, die aus den Promotoren von Mais-Sucrose-Synthetase 1, Mais-Alkohol-Dehydrogenase 1, Mais-Lichtsammelkomplex, Mais-Hitzeschockprotein, der kleinen Untereinheit der RuBP-Carboxylase (Rubisco) der Erbse, der Mannopin-Synthase des Ti-Plasmids, der Nopalin-Synthase des Ti-Plasmids, der Petunien-Chalcon-Isomerase, des glycinreichen Proteins 1 der Bohne, von Kartoffel-Patatin, Lectin, CaMV 35S und der kleinen Untereinheit der RuBP-Carboxylase (Rubisco) S-E9 besteht.

[0045] "Im Wesentlichen isoliert von anderen codierenden Sequenzen" bedeutet, dass das interessierende Gen, in diesem Fall ein Gen, das ein bakterielles Kristallprotein codiert, den maßgeblichen Teil des codierenden Bereichs des DNA-Segments bildet und dass das DNA-Segment keine großen Teile von natürlich vorkommender codierender DNA, wie große chromosomale Fragmente oder andere funktionelle Gene oder operoncodierende Bereiche, enthält. Selbstverständlich bezieht sich dies auf das DNA-Segment in der Form, wie es ursprünglich isoliert wurde, und schließt keine Gene, rekombinanten Gene, synthetischen Linker oder codierenden Bereiche aus, die später von Menschenhand zu dem Segment hinzugefügt wurden.

[0046] In bestimmten Ausführungsformen betrifft die Erfindung isolierte Polynucleotide (wie DNA, RNA, Antisense-DNA, Antisense-RNA, Ribozyme und PNA) und rekombinante Vektoren, die Polynucleotidsequenzen umfassen, welche ein oder mehrere Polypeptide codieren, die eine Aminosäuresequenz umfassen, die zu wenigstens 90% mit SEQ ID Nr. 2 identisch ist.

[0047] Der Ausdruck "eine Sequenz im Wesentlichen wie in SEQ ID Nr. 2 dargelegt" bedeutet, dass die Sequenz im Wesentlichen einem Teil der Sequenz von SEQ ID Nr. 2 entspricht und relativ wenige Aminosäuren aufweist, die mit den Aminosäuren einer dieser Sequenzen nicht identisch oder ein biologisch funktionelles Äquivalent davon sind. Der Ausdruck "biologisch funktionelles Äquivalent" wird in der Technik wohlverstanden und wird hier ausführlich näher definiert (siehe z.B. den Abschnitt "Beispielhafte Ausführungsformen"). Dementsprechend sind Sequenzen, die zwischen 70% und 80% oder vorzugsweise zwischen 81% und 90% oder besonders bevorzugt zwischen 91% und 99% Aminosäure-Sequenzidentität oder funktionelle Äquivalenz mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 aufweisen, Sequenzen, die "im Wesentlichen wie in SEQ ID Nr. 2 dargelegt" sind. In hohem Maße bevorzugte Sequenzen sind solche, die vorzugsweise zu 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% oder 100% identisch oder funktionell äquivalent mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 sind.

[0048] Man wird sich auch darüber im Klaren sein, dass Aminosäure- und Nucleinsäuresequenzen auch zusätzliche Reste enthalten können, wie zusätzliche N- oder C-terminale Aminosäuren oder 5'- oder 3'-Sequenzen, und dennoch immer noch im Wesentlichen wie in einer der hier offenbarten Sequenzen dargelegt sind, solange die Sequenz die oben dargelegten Kriterien erfüllt, einschließlich der Beibehaltung der biologischen Proteinaktivität, soweit die Proteinexpression betroffen ist. Das Hinzufügen von terminalen Sequenzen gilt insbesondere für Nucleinsäuresequenzen, die zum Beispiel verschiedene nichtcodierende Sequenzen enthalten können, die entweder den 5'- oder den 3'-Teil des codierenden Bereichs flankieren, oder verschiedene interne Sequenzen enthalten können, d.h. Introns, die bekanntermaßen innerhalb von Genen vorkommen.

[0049] Die Nucleinsäuresegmente der vorliegenden Erfindung können unabhängig von der Länge der codierenden Sequenz selbst mit anderen Nucleinsäuresequenzen, wie Promotoren, Polyadenylierungssignalen, zu-

sätzlichen Restriktionsenzymstellen, multiplen Klonierungsstellen oder anderen codierenden Segmenten, kombiniert werden, so dass ihre Gesamtlänge beträchtlich variieren kann. Es wird daher in Betracht gezogen, dass ein Nucleinsäurefragment von fast beliebiger Länge eingesetzt werden kann, wobei die Gesamtlänge vorzugsweise durch die Leichtigkeit der Herstellung und Verwendung in der vorgesehenen Vorschrift für rekombinante Nucleinsäuren eingeschränkt ist. Zum Beispiel können Nucleinsäurefragmente hergestellt werden, die ein kurzes zusammenhängendes Stück enthalten, das die in SEQ ID Nr. 2 offenbarte Peptidsequenz codiert, oder die mit Nucleinsäuresequenzen, die die in SEQ ID Nr. 2 offenbarten Peptide codieren, und insbesondere solchen Nucleinsäuresegmenten, die in SEQ ID Nr. 1 offenbart sind, identisch oder dazu komplementär sind. Zum Beispiel gelten Nucleinsäuresequenzen wie 23 Nucleotide mit einer Länge von bis zu 10 000, 5000, 3000, 2000, 1000, 500, 200, 100, 50 und 23 Basenpaaren (einschließlich aller dazwischenliegenden Längen), die eine zusammenhängende Nucleotidsequenz aus SEQ ID Nr. 1 umfassen, oder solche, die eine zusammenhängende Aminosäuresequenz aus SEQ ID Nr. 2 codieren, als besonders gut geeignet.

[0050] In einer Ausführungsform stellt die Erfindung auch ein isoliertes Nucleinsäuresegment bereit, das charakterisiert ist als:

- a) Nucleinsäuresegment, das einen Sequenzbereich umfasst, der zu wenigstens 90% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist, oder dessen Komplement; oder
- b) Nucleinsäuresegment mit einer Länge von wenigstens 100 Nucleotiden, das dieselbe Sequenz aufeinanderfolgender Basenpaare hat wie ein Segment von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1, oder dessen Komplement.

[0051] Man wird ohne weiteres verstehen, dass "dazwischenliegende Längen" im Zusammenhang mit Polynucleotidsequenzen oder Nucleinsäuresegmenten oder Primern oder Sonden, die für das offenbarte Gen spezifisch sind, eine beliebige Länge zwischen den angegebenen Bereichen bedeutet, wie 24, 25, 26, 27, 28, 29 usw.; 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 usw.; 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 usw.; 100, 101, 102, 103, 104 usw.; 110, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 180, 190 usw.; einschließlich aller ganzen Zahlen in den Bereichen von 200-500; 500-1000; 1000-2000; 2000-3000; 3000-5000 und bis zu einschließlich Sequenzen von 10 000 Nucleotiden.

[0052] Ebenso wird man ohne weiteres verstehen, dass "dazwischenliegende Längen" im Zusammenhang mit Polypeptiden oder Peptiden eine beliebige Länge zwischen den angegebenen Bereichen von aufeinanderfolgenden Aminosäuren bedeutet. Wenn man zum Beispiel von CryET70 abgeleitete Peptide betrachtet, gelten alle Längen zwischen 10 und 100 zusammenhängenden Aminosäuresequenzen als geeignet für bestimmte, hier offenbarte Ausführungsformen. Zum Beispiel gelten Peptide, die zusammenhängende Aminosäuresequenzen mit 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 65 usw., 70, 75 usw., 80, 85 usw., 90, 95 usw. umfassen, und sogar solche Peptide, die wenigstens 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103 und 104 oder mehr aufeinanderfolgende Aminosäuren aus SEQ ID Nr. 2 umfassen, ausdrücklich als in den Umfang der vorliegenden Erfindung fallend.

[0053] Weiterhin wird der Fachmann auch ohne weiteres verstehen, dass "dazwischenliegende Längen" im Zusammenhang mit größeren CryET70- und mit CryET70 verwandten Polypeptiden eine beliebige Länge zwischen den angegebenen Bereichen von aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die ein solches Polypeptid umfassen, bedeutet. Wenn man zum Beispiel die Polypeptide der vorliegenden Erfindung betrachtet, gelten alle Längen zwischen 100 und 730 zusammenhängenden Aminosäuresequenzen als geeignet für bestimmte, hier offenbarte Ausführungsformen. Zum Beispiel gelten Polypeptide, die eine zusammenhängende Aminosäuresequenz mit wenigstens 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 usw., 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 usw., 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400 usw., 410, 430, 450, 470, 490 usw., 500, 525, 550, 575, 600, 650, 674 usw., 700 usw., umfassen, und sogar solche Polypeptide, die wenigstens 721 oder mehr Aminosäuren umfassen, ausdrücklich als in den Umfang der vorliegenden Erfindung fallend. Insbesondere im Falle von Fusionsproteinen, die die ganze oder einen Teil der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 umfassen, können längere Polypeptidsequenzen bevorzugt sein, einschließlich Sequenzen, die eine Länge von 703, 740, 750, 760, 770, 780, 790 oder sogar 800 oder mehr Aminosäuren haben.

[0054] Man wird sich auch darüber im Klaren sein, dass diese Erfindung nicht auf die besonderen Nucleinsäuresequenzen beschränkt ist, die Peptide der vorliegenden Erfindung codieren oder die die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 codieren, einschließlich der DNA-Sequenz, die in SEQ ID Nr. 1 besonders offenbart ist. Rekombinante Vektoren und isolierte DNA-Segmente können daher verschiedentlich die polypeptidcodie-

renden Bereiche selbst, codierende Bereiche, die ausgewählte Veränderungen oder Modifikationen im grundlegenden codierenden Bereich tragen, beinhalten, oder sie können größere Polypeptide codieren, die dennoch diese polypeptidcodierenden Bereiche enthalten, oder sie können biologisch funktionelle äquivalente Proteine oder Peptide codieren, die abweichende Aminosäuresequenzen haben.

[0055] Die DNA-Segmente der vorliegenden Erfindung umfassen biologisch funktionelle äquivalente Peptide. Solche Sequenzen können als Folge einer Codon-Degeneriertheit und einer funktionellen Äquivalenz entstehen, von denen bekannt ist, dass sie natürlicherweise innerhalb von Nucleinsäuresequenzen und den so codierten Proteinen auftreten. Alternativ dazu können funktionell äquivalente Proteine oder Peptide auch durch Anwendung von DNA-Rekombinationstechnik geschaffen werden, wobei Änderungen der Proteinstruktur eingeführt werden können, und zwar auf der Grundlage von Betrachtungen der Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäuren. Vom Menschen gestaltete Änderungen können durch die Anwendung von Techniken der ortsspezifischen Mutagenese eingeführt werden, z.B. zur Einführung von Verbesserungen der Antigenität des Proteins oder zum Testen von Mutanten, um deren Aktivität auf molekularer Ebene zu untersuchen. Alternativ dazu können native, noch unbekannt oder noch unidentifizierte Polynucleotide und/oder Polypeptide, die strukturell und/oder funktionell mit den hier offenbarten Sequenzen verwandt sind, ebenfalls identifiziert werden und in den Umfang der vorliegenden Erfindung fallen. Diese Polynucleotide sind solche Polynucleotide, die ein Polypeptid codieren, das strukturell und/oder funktionell ähnlich zu oder identisch mit dem Polypeptid ist, das hier als "CryET70"-Polypeptid charakterisiert wird. Da die Bezeichnung "CryET70" ein willkürlicher Name ist, der gewählt wurde, um Polypeptide, die die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 2 umfassen, leicht identifizieren zu können, ist es wahrscheinlich, dass noch viele andere Polypeptide identifiziert werden können, die in hohem Maße homolog zu (oder sogar identisch mit) dieser Sequenz sind, die jedoch aus anderen Organismen oder Quellen isoliert wurden, oder alternativ dazu können sie sogar ganz oder teilweise de novo synthetisiert worden sein. Als solche gelten alle Polypeptidsequenzen, ob sie natürlich vorkommen oder künstlich geschaffen wurden, welche zur primären Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 strukturell homolog sind und eine ähnliche insektizide Wirkung gegen die hier offenbarten Zielinsekten aufweisen, als in den Umfang dieser Offenbarung fallend. Ebenso gelten alle Polynucleotidsequenzen, ob sie natürlich vorkommen oder künstlich geschaffen wurden, welche zur Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 1 strukturell homolog sind oder ein Polypeptid codieren, das zu der in SEQ ID Nr. 2 offenbarten Aminosäuresequenz homolog und biologisch funktionell äquivalent ist, als in den Umfang dieser Offenbarung fallend.

[0056] Falls gewünscht, kann man auch Fusionsproteine und -peptide herstellen, z.B. wenn die peptidcodierenden Bereiche innerhalb derselben Expressionseinheit mit anderen Proteinen oder Peptiden, die gewünschte Funktionen aufweisen, ausgerichtet sind, wie etwa für Reinigungs- oder Immunnachweiszwecke (z.B. Proteine, die durch Affinitätschromatographie gereinigt werden können, bzw. Enzymmarker codierende Bereiche).

[0057] Rekombinante Vektoren bilden weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung. Als besonders gut geeignete Vektoren gelten diejenigen Vektoren, bei denen der codierende Teil des DNA-Segments, ob er ein insektizides Protein voller Länge oder ein kleineres Peptid codiert, unter der Kontrolle eines Promotors positioniert ist. Der Promotor kann in Form des Promotors vorliegen, der natürlicherweise mit einem Gen vergesellschaftet ist, das Peptide der vorliegenden Erfindung codiert, wie man ihn erhalten kann, indem man die 5'-nichtcodierenden Sequenzen isoliert, die sich stromaufwärts des codierenden Segments oder Exons befinden, wobei man zum Beispiel rekombinantes Klonen und/oder PCRTM-Technik in Verbindung mit den hier offenbarten Zusammensetzungen verwendet. In vielen Fällen kann der Promotor der native CryET70-Promotor sein, oder alternativ dazu ein heterologer Promotor, wie solche bakteriellen Ursprungs (einschließlich Promotoren von anderen Kristallproteinen), solche, die von Pilzen, Viren, Phagen oder Phagemiden stammen (einschließlich Promotoren wie CaMV35 und seine Derivate, T3-, T7-, λ - und ϕ -Promotor) oder von Pflanzen stammen (einschließlich konstitutiver, induzierbarer und/oder gewebespezifischer Promotoren).

2.2 Nucleinsäuresegmente als Hybridisierungs sonden und Primer

[0058] Außer ihrer Verwendung zur Anleitung der Expression von Kristallproteinen oder Peptiden der vorliegenden Erfindung haben die hier beschriebenen Nucleinsäuresequenzen auch eine Vielzahl von anderen Verwendungen. Zum Beispiel sind sie nützlich als Sonden oder Primer bei Ausführungsformen der Nucleinsäurehybridisierung. Die Erfindung stellt ein Verfahren zum Nachweis einer Nucleinsäuresequenz bereit, die ein δ -Endotoxin-Polypeptid codiert. Das Verfahren beinhaltet im Allgemeinen das Gewinnen von Probennucleinsäuren, von denen man annimmt, dass sie ein δ -Endotoxin-Polypeptid codieren könnten, das In-Kontakt-Bringen der Probennucleinsäuren mit einem isolierten Nucleinsäuresegment, das charakterisiert als:

- a) Nucleinsäuresegment, das einen Sequenzbereich umfasst, der zu wenigstens 90% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist, oder dessen Komplement; oder

b) Nucleinsäuresegment mit einer Länge von wenigstens 100 Nucleotiden, das dieselbe Sequenz aufeinanderfolgender Basenpaare hat wie ein Segment von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1, oder dessen Komplement;

unter Bedingungen, die die Hybridisierung von im Wesentlichen komplementären Nucleinsäuren ermöglichen; und das Nachweisen der so gebildeten hybridisierten komplementären Nucleinsäuren.

[0059] Bei der praktischen Durchführung eines solchen Verfahrens wird in Betracht gezogen, dass Nucleinsäuresegmente, die einen Sequenzbereich umfassen, der aus wenigstens einer 23 Nucleotiden langen zusammenhängenden Sequenz besteht, die dieselbe Sequenz hat wie ein 23 Nucleotide langes zusammenhängendes Nucleinsäuresegment von SEQ ID Nr. 1 oder dazu komplementär ist, ebenfalls von besonderem Nutzen sein können. Längere zusammenhängende identische oder komplementäre Sequenzen, z.B. solche von 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300 bp (einschließlich aller dazwischenliegenden Längen und bis zu einschließlich der vollen Länge der Sequenz von 2344 Basenpaaren, die das CryET70-Polypeptid codiert), werden bei einem solchen Verfahren ebenfalls von Nutzen sein.

[0060] Ebenfalls bereitgestellt wird ein Nucleinsäure-Nachweis-Kit, der in einer geeigneten Behältereinrichtung wenigstens ein erstes Nucleinsäuresegment, das charakterisiert als:

- a) Nucleinsäuresegment, das einen Sequenzbereich umfasst, der zu wenigstens 90% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist, oder dessen Komplement; oder
- b) Nucleinsäuresegment mit einer Länge von wenigstens 100 Nucleotiden, das dieselbe Sequenz aufeinanderfolgender Basenpaare hat wie ein Segment von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1, oder dessen Komplement;

und wenigstens ein erstes Nachweisreagens umfasst. Aufgrund der Fähigkeit solcher Nucleinsäuresonden, spezifisch mit Kristallprotein-codierenden Sequenzen zu hybridisieren, sind sie beim Nachweis der Anwesenheit von komplementären Sequenzen in einer gegebenen Probe von Nutzen. Es werden jedoch auch andere Verwendungen ins Auge gefasst, einschließlich der Verwendung der Sequenzinformation für die Herstellung von Primern einer mutanten Spezies oder Primern zur Verwendung bei der Herstellung anderer genetischer Konstrukte.

[0061] Nucleinsäuremoleküle mit Sequenzbereichen, die aus zusammenhängenden Nucleotidstücken von 23 bis 50 oder sogar bis zu einschließlich Sequenzen von 100-200 Nucleotiden bestehen, welche mit der DNA-Sequenz von SEQ ID Nr. 1 identisch oder dazu komplementär sind, werden insbesondere als Hybridisierungs sonden zur Verwendung z.B. im Southern- und Northern-Blotting in Betracht gezogen. Fragmente mittlerer Größe werden im Allgemeinen ebenfalls Verwendung in Hybridisierungsausführungsformen finden, wobei die Länge des zusammenhängenden komplementären Bereichs variiert werden kann, wie 25-30 oder 30 bis 40 Nucleotide, aber es können auch größere zusammenhängende komplementäre Bereiche verwendet werden, wie solche mit einer Länge von 200 bis 300 oder 300 bis 400 oder 500, je nach der Länge der komplementären Sequenzen, die man nachweisen möchte. Es ist sogar möglich, dass noch längere zusammenhängende Sequenzbereiche verwendet werden, einschließlich solcher Sequenzen, die wenigstens 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 oder mehr aufeinanderfolgende Nucleotide von SEQ ID Nr. 1 umfassen.

[0062] Selbstverständlich können Fragmente auch mit anderen Techniken erhalten werden, wie z.B. durch mechanische Scherkräfte oder durch Abbau mit Restriktionsenzymen. Kleine Nucleinsäuresegmente oder -fragmente können leicht hergestellt werden, zum Beispiel durch direktes Synthetisieren des Fragments mit chemischen Mitteln, wie es bei Verwendung eines automatischen Oligonucleotid-Synthesizers üblicherweise praktiziert wird. Außerdem können auch durch Anwendung von Nucleinsäure-Reproduktionstechnik, wie der PCRTM-Technik der US-Patente 4,683,195 und 4,683,202, indem man ausgewählte Sequenzen in rekombinante Vektoren für die rekombinante Produktion einführt, und durch andere DNA-Rekombinationstechniken, die dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie allgemein bekannt sind, Fragmente erhalten werden.

[0063] Dementsprechend können die Nucleotidsequenzen der Erfindung aufgrund ihrer Fähigkeit verwendet werden, selektiv Duplexmoleküle mit komplementären Stücken von DNA-Fragmenten zu bilden. Je nach der beabsichtigten Anwendung möchte man unterschiedliche Hybridisierungsbedingungen verwenden, um verschiedene Grade der Selektivität der Sonde gegenüber der Zielsequenz zu erreichen. Für Anwendungen, die eine hohe Selektivität erfordern, möchte man für die Bildung der Hybride typischerweise relativ stringente Be-

dingungen einsetzen. Für Hybridisierungsbedingungen "hoher Stringenz" werden zum Beispiel typischerweise Bedingungen mit relativ niedrigem Salzgehalt und/oder hoher Temperatur verwendet, wie etwa 0,02 M bis 0,15 M NaCl bei Temperaturen von 50 °C bis 70 °C. Solche selektiven Bedingungen tolerieren wenn überhaupt nur wenig Fehlpaarungen zwischen der Sonde und dem Matrizen- oder Zielstrang und wären insbesondere für die Isolierung von DNA-Segmenten, die Kristallprotein codieren, geeignet. Der Nachweis von DNA-Segmenten über Hybridisierung ist dem Fachmann wohlbekannt, und die Lehren der US-Patente 4,965,188 und 5,176,995 sind beispielhaft für die Verfahren der Hybridisierungsanalyse. Lehren, wie man sie in den Texten von Maloy et al., 1990, Maloy 1994, Segal 1976, Prokop 1991 und Kuby 1994 findet, sind besonders relevant.

[0064] Bei manchen Anwendungen, zum Beispiel wenn man Mutanten herstellen möchte, indem man einen mutanten Primerstrang einsetzt, der mit einer zugrundeliegenden Matrize hybridisiert ist, oder wenn man Kristallproteincodierende Sequenzen von verwandten Spezies, funktionelle Äquivalente oder dergleichen isolieren möchte, werden typischerweise weniger stringente Hybridisierungsbedingungen benötigt, um die Bildung des Heteroduplex zu ermöglichen. Unter diesen Umständen möchte man vielleicht Hybridisierungsbedingungen "geringer Stringenz" oder "reduzierter Stringenz" einsetzen, wie solche, bei denen 0,15 M bis 0,9 M Salz bei Temperaturen im Bereich von 20 °C bis 55 °C eingesetzt wird. Dadurch können kreuzhybridisierende Spezies leicht als positiv hybridisierende Signale in Bezug auf Kontrollhybridisierungen identifiziert werden. In jedem Fall ist man sich allgemein darüber im Klaren, dass Bedingungen durch die Zugabe steigender Mengen an Formamid, das dazu dient, den Hybridduplex in derselben Weise wie eine erhöhte Temperatur zu destabilisieren, stringenter gemacht werden können. Die Hybridisierungsbedingungen können also leicht manipuliert werden, und die Methode der Wahl wird also im Allgemeinen von den gewünschten Ergebnissen abhängen. Unabhängig davon, welche besondere Kombination von Salzen (wie NaCl oder Natriumcitrat), organischen Puffern (einschließlich z.B. Formamid) und Inkubations- oder Waschttemperaturen eingesetzt wird, ist der Fachmann ohne weiteres in der Lage, Hybridisierungsbedingungen einzusetzen, die einer "hohen", "mittleren" oder "geringen" Stringenz entsprechen, und kann die Ergebnisse der Hybridisierungsanalysen mit Hilfe dieser Bedingungen deuten, um die relative Homologie einer Zielnucleinsäuresequenz zu derjenigen der besonderen neuen Polynucleotidsondensequenz, die aus SEQ ID Nr. 1 eingesetzt wird, zu bestimmen.

[0065] Bei bestimmten Ausführungsformen wird es vorteilhaft sein, Nucleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung in Kombination mit einem geeigneten Mittel, wie einem Marker, zur Bestimmung der Hybridisierung einzusetzen. Eine Vielzahl von geeigneten Indikatormitteln sind in der Technik bekannt, einschließlich fluoreszierender, radioaktiver, enzymatischer oder anderer Liganden, wie Avidin/Biotin, die ein nachweisbares Signal erzeugen können. In bevorzugten Ausführungsformen möchte man wahrscheinlich einen Fluoreszenzmarker oder Enzymmarker, wie Urease, Alkalische Phosphatase oder Peroxidase, anstelle von radioaktiven oder anderen umweltunverträglichen Reagentien einsetzen. Im Falle von Enzymmarkern sind kolorimetrische Indikatortsubstanzen bekannt, die eingesetzt werden können, um ein Mittel zu erhalten, das für das menschliche Auge oder spektrophotometrisch sichtbar ist, um die spezifische Hybridisierung mit Proben, die komplementäre Nucleinsäuren enthalten, zu identifizieren.

[0066] Im Allgemeinen wird in Betracht gezogen, dass die hier beschriebenen Hybridisierungssonden sowohl als Reagentien in der Lösungshybridisierung als auch in Ausführungsformen, bei denen eine feste Phase eingesetzt wird, geeignet sein werden. Bei Ausführungsformen, die eine feste Phase beinhalten, wird die Test-DNA (oder RNA) auf einer ausgewählten Matrix oder Oberfläche adsorbiert oder in sonstiger Weise fixiert. Diese fixierte, einzelsträngige Nucleinsäure wird dann einer spezifischen Hybridisierung mit ausgewählten Sonden unter gewünschten Bedingungen unterzogen. Die ausgewählten Bedingungen hängen von den besonderen Umständen auf der Grundlage der besonderen erforderlichen Kriterien ab (die zum Beispiel vom Gehalt an G+C, der Art der Zielnucleinsäure, der Nucleinsäurequelle oder der Größe der Hybridisierungssonde abhängen). Nach dem Waschen der hybridisierten Oberfläche, um unspezifisch gebundene Sondenmoleküle zu entfernen, wird die spezifische Hybridisierung mittels eines Markers nachgewiesen oder sogar quantifiziert.

2.3 Vektoren und Verfahren für die rekombinante Expression von CRY70 und mit CRY70 verwandten Polypeptiden

[0067] In anderen Ausführungsformen wird in Betracht gezogen, dass bestimmte Vorteile gewonnen werden, indem man das codierende DNA-Segment unter die Kontrolle eines rekombinanten oder heterologen Promotors stellt. Der hier verwendete Ausdruck "rekombinanter oder heterologer Promotor" soll sich auf einen Promotor beziehen, der in seiner natürlichen Umgebung normalerweise nicht mit einem DNA-Segment vergesellschaftet ist, das ein Kristallprotein oder -peptid codiert. Solche Promotoren können Promotoren, die normalerweise mit anderen Genen vergesellschaftet sind, und/oder Promotoren, die aus irgendeiner Bakterienzelle, einem Virus, einer Eukaryonten- oder Pflanzenzelle isoliert wurden, umfassen. Natürlich ist es wichtig, einen

Promotor einzusetzen, der die Expression des DNA-Segments in dem für die Expression gewählten Zelltyp, Organismus oder sogar Tier effektiv anleitet. Die Verwendung von Kombinationen aus Promotor und Zelltyp für die Proteinexpression ist dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie allgemein bekannt, siehe zum Beispiel Sambrook et al., 1989. Die eingesetzten Promotoren können konstitutiv oder induzierbar sein, und sie können unter den geeigneten Bedingungen verwendet werden, um eine Expression des eingeführten DNA-Segments auf hohem Niveau anzuleiten, wie es bei der Produktion von rekombinanten Proteinen oder Peptiden in großem Maßstab vorteilhaft ist. Zu den geeigneten Promotorsystemen, die für die Verwendung bei der Expression auf hohem Niveau in Frage kommen, gehört unter anderem das Pichia-Expressionsvektorsystem (Pharmacia LKB Biotechnology).

[0068] In Verbindung mit Expressionsausführungsformen zur Herstellung von rekombinanten Proteinen und Peptiden wird in Betracht gezogen, dass längere DNA-Segmente am häufigsten verwendet werden, wobei DNA-Segmente, die die gesamte Peptidsequenz codieren, am meisten bevorzugt sind. Man wird sich jedoch darüber im Klaren sein, dass die Verwendung von kürzeren DNA-Segmenten zur Anleitung der Expression von Kristallpeptiden oder epitopischen Kernbereichen, wie sie zur Erzeugung von Anti-Kristallprotein-Antikörpern verwendet werden können, ebenfalls in den Umfang der Erfindung fällt. DNA-Segmente, die Peptidantigene mit einer Länge von 8 bis 50 Aminosäuren oder vorzugsweise mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren oder besonders bevorzugt mit einer Länge von 8 bis 20 Aminosäuren codieren, gelten als besonders gut geeignet. Solche Peptidepitope können Aminosäuresequenzen sein, die eine zusammenhängende Aminosäuresequenz aus SEQ ID Nr. 2 umfassen.

2.4 Transgene Pflanzen, die CryET70-Polypeptide exprimieren.

[0069] In noch einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze bereit, die ein ausgewähltes Nucleinsäuresegment exprimiert, das einen Sequenzbereich umfasst, der die neuen Endotoxin-Polypeptide der vorliegenden Erfindung codiert. Das Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen ist in der Technik wohlbekannt. Im Allgemeinen umfasst das Verfahren das Transformieren einer geeigneten Pflanzenwirtszelle mit einem DNA-Segment, das einen Promotor enthält, der funktionell mit einem codierenden Bereich verknüpft ist, der ein oder mehrere CryET70-Polypeptide codiert. Ein solcher codierender Bereich ist im Allgemeinen funktionell mit wenigstens einem ersten Transcriptionsterminationsbereich verknüpft, wodurch der Promotor in der Lage ist, die Transcription des codierenden Bereichs in der Zelle anzutreiben und somit der Zelle die Fähigkeit zu geben, das Polypeptid in vivo zu produzieren. Alternativ dazu sorgt die Erfindung in Fällen, bei denen es wünschenswert ist, die Menge eines besonderen rekombinanten Kristallproteins, das in einer besonderen transgenen Zelle exprimiert wird, zu steuern, zu regulieren oder zu senken, auch für die Expression von Kristallprotein-Antisense-mRNA. Die Verwendung von Antisense-mRNA als Mittel zur Steuerung oder Senkung der Menge eines gegebenen interessierenden Proteins in einer Zelle ist in der Technik wohlbekannt.

[0070] Ein weiterer Aspekt der Erfindung umfasst transgene Pflanzen, die ein Gen, Gensegment oder einen Sequenzbereich exprimieren, das bzw. der wenigstens eine oder mehrere der neuen hier offenbarten Polypeptidzusammensetzungen codiert. Der hier verwendete Ausdruck "transgene Pflanze" soll eine Pflanze bezeichnen, in die DNA-Sequenzen eingebaut sind, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Gene, die vielleicht normalerweise nicht vorhanden sind, DNA-Sequenzen, die normalerweise nicht zu RNA transkribiert oder zu einem Protein translatiert ("exprimiert") werden, oder irgendwelche anderen Gene oder DNA-Sequenzen, die man in die nichttransformierte Pflanze einführen möchte, wie Gene, die normalerweise in der nichttransformierten Pflanze vorhanden sein können, die man aber entweder gentechnisch verändern oder mit einer geänderten Expression versehen möchte.

[0071] Es wird in Betracht gezogen, dass das Genom einer transgenen Pflanze der vorliegenden Erfindung in manchen Fällen durch die stabile Einführung von einem oder mehreren Transgenen, entweder nativ, synthetisch modifiziert oder mutiert, welche ein insektizides Polypeptid codieren, das mit dem in SEQ ID Nr. 2 offenbarten Polypeptid identisch oder dazu in hohem Maße homolog ist, erweitert wird. In manchen Fällen wird mehr als ein Transgen in das Genom der transformierten Wirtspflanzenzelle eingebaut. Dies ist dann der Fall, wenn mehr als ein Kristallprotein-codierendes DNA-Segment in das Genom einer solchen Pflanze eingebaut wird. In bestimmten Situationen kann es wünschenswert sein, dass ein, zwei, drei, vier oder noch mehr B.-thuringiensis-Kristallproteine (entweder nativ oder rekombinant verändert) in die transformierte transgene Pflanze eingebaut und stabil exprimiert werden. Alternativ dazu kann auch ein zweites Transgen in die Pflanzenzelle eingeführt werden, um der Pflanze zusätzliche phänotypische Eigenschaften zu verleihen. Solche Transgene können Resistenz gegen ein oder mehrere Insekten, Bakterien, Pilze, Viren, Nematoden oder andere Pathogene verleihen.

[0072] Ein bevorzugtes Gen, das eingeführt werden kann, umfasst zum Beispiel eine Kristallprotein-codierende DNA-Sequenz bakteriellen Ursprungs und insbesondere eine oder mehrere der hier beschriebenen, die von *Bacillus* spp. erhalten werden. In hohem Maße bevorzugte Nucleinsäuresequenzen sind solche, die von *B. thuringiensis* erhalten werden, oder eine der Sequenzen, die genetisch so verändert wurden, dass die insektizide Aktivität des Kristallproteins in einer solchen transformierten Wirtszelle abnimmt oder zunimmt.

[0073] Mittel zum Transformieren einer Pflanzenzelle und zur Herstellung von pluripotenten Pflanzenzellen und zur Regeneration einer transgenen Zelllinie aus einer transformierten Zelle, Zellkultur, Embryo- oder Kallusgewebe sind in der Technik wohlbekannt und werden hier diskutiert. Vektoren (einschließlich Plasmiden, Cosmiden, Phagen, Phagemiden, Baculovirus, Viren, Virionen, BACs [künstliche bakterielle Chromosomen], YACs [künstliche Hefechromosomen]), die wenigstens ein erstes Nucleinsäuresegment umfassen, das ein insektizides Polypeptid zur Verwendung bei der Transformation solcher Zellen codiert, umfasst selbstverständlich im Allgemeinen entweder die Operonen, Gene oder von Genen abgeleiteten Sequenzen der vorliegenden Erfindung, entweder nativ oder synthetisch abgeleitet, und insbesondere solche, die die offenbarten Kristallproteine codieren. Diese Nucleinsäurekonstrukte können weiterhin Strukturen wie Promotoren, Enhancer, Polylinker, Introns, Terminatoren oder auch Gensequenzen, die nach Wunsch eine positiv oder negativ regulierende Wirkung auf das klonierte δ -Endotoxin-Gen haben, beinhalten. Das DNA-Segment oder Gen kann entweder ein natives oder modifiziertes Kristallprotein codieren, das in den resultierenden rekombinanten Zellen exprimiert wird und/oder das einer transgenen Pflanze, die ein solches Segment umfasst, einen verbesserten Phänotyp verleiht (in diesem Fall eine erhöhte Resistenz gegen Insektenangriff, -befall oder -besiedelung).

[0074] Die Herstellung einer transgenen Pflanze, die wenigstens eine Polynucleotidsequenz umfasst, die ein CryET70- oder von CryET70 abgeleitetes Polypeptid codiert, um die Resistenz einer solchen Pflanze gegen Angriff durch ein Zielinsekt zu erhöhen oder zu verstärken, stellt einen wichtigen Aspekt der Erfindung dar. Insbesondere beschreiben die Erfinder hier die Herstellung von insektenresistenten Einkeimblättrigen oder Zweikeimblättrigen Pflanzen, indem man in eine solche Pflanze ein transgenes DNA-Segment einbaut, das ein oder mehrere CryET70-Polypeptide codiert, die für ein Coleoptera- oder Lepidoptera-Insekt toxisch sind.

[0075] In einem verwandten Aspekt umfasst die vorliegende Erfindung auch einen Samen, der von der transformierten Pflanze erzeugt wurde, die Nachkommenschaft eines solchen Samens sowie einen Samen, der von der Nachkommenschaft der ursprünglichen, nach dem obigen Verfahren hergestellten transformierten Pflanze erzeugt wurde. Diese Nachkommenschaft und die Samen weisen ein Kristallprotein-codierendes Transgen auf, das stabil in ihr Genom eingebaut ist, und diese Nachkommenpflanzen erben die Eigenschaften, die durch die Einführung eines stabilen Transgens erzielt wurden, in Mendelscher Weise. Alle solchen transgenen Pflanzen, in deren Genom transgene DNA-Segmente eingebaut sind, die ein oder mehrere CryET70-Kristallproteine oder -Polypeptide codieren, sind Aspekte dieser Erfindung. Wie dem Fachmann wohlbekannt ist, bedeutet "Nachkommenschaft einer Pflanze" die Sämlingspopulation bzw. jeden Abkömmling einer solchen Pflanze.

2.5 Kristallprotein-Screening- und -Nachweiskits

[0076] Die vorliegende Erfindung zieht Verfahren und Kits zum Durchmustern von Proben, von denen man annimmt, dass sie Kristallproteinpolypeptide oder mit Kristallprotein verwandte Polypeptide enthalten, oder von Zellen, die solche Polypeptide produzieren, in Betracht. Ein Kit kann einen oder mehrere Antikörper, die für die in SEQ ID Nr. 2 gezeigte Aminosäuresequenz spezifisch sind, oder einen oder mehrere Antikörper, die für ein Peptid spezifisch sind, das von der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Sequenz abgeleitet ist, enthalten, und er kann auch Reagentien zum Nachweis einer Wechselwirkung zwischen einer Probe und einem Antikörper der vorliegenden Erfindung enthalten. Das bzw. die bereitgestellten Reagentien können radioaktiv, fluoreszenz- oder enzymmarkiert sein. Der Kit kann ein bekanntes radioaktiv markiertes Reagens enthalten, das zur Bindung oder Wechselwirkung mit einer Nucleinsäure oder einem Antikörper der vorliegenden Erfindung befähigt ist.

[0077] Das bzw. die Reagentien des Kits können als flüssige Lösung, an einen festen Träger gebunden oder als getrocknetes Pulver bereitgestellt werden. Wenn das bzw. die Reagentien in einer flüssigen Lösung bereitgestellt werden, ist die flüssige Lösung vorzugsweise eine wässrige Lösung. Wenn das bzw. die bereitgestellten Reagentien an einen festen Träger gebunden sind, kann es sich bei dem festen Träger um ein chromatographisches Medium, eine Testplatte mit einer Mehrzahl von Näpfen oder einen Objektträger handeln. Wenn das bzw. die Reagentien als getrocknetes Pulver bereitgestellt werden, kann das Pulver durch die Zugabe eines geeigneten Lösungsmittels, das ebenfalls bereitgestellt sein kann, rekonstituiert werden.

[0078] In noch weiteren Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung Immunnachweisverfahren und entsprechende Kits. Es wird vorgeschlagen, dass die Kristallproteine oder -peptide der vorliegenden Erfindung

eingesetzt werden können, um Antikörper nachzuweisen, die eine Reaktivität gegenüber diesen aufweisen, oder alternativ dazu können Antikörper, die gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt wurden, eingesetzt werden, um Kristallproteine oder Peptide, die mit Kristallprotein zusammenhängende Epitope enthalten, nachzuweisen. Im Allgemeinen beinhalten diese Verfahren zuerst das Gewinnen einer Probe, von der man annimmt, dass sie ein solches Protein, Peptid oder einen solchen Antikörper enthalten könnte, das In-Kontakt-Bringen der Probe je nachdem mit einem Antikörper oder Peptid gemäß der vorliegenden Erfindung unter Bedingungen, die die Bildung eines Immunkomplexes ermöglichen, und dann das Nachweisen der Anwesenheit des Immunkomplexes.

[0079] Im Allgemeinen ist der Nachweis einer Immunkomplexbildung in der Technik sehr gut bekannt und kann durch Anwendung zahlreicher Ansätze erreicht werden. Zum Beispiel kommt bei der vorliegenden Erfindung die Anwendung von ELISA, RIA, Immunblotting (z.B. Dot Blot) oder indirekten Immunfluoreszenztechniken in Frage. Im Allgemeinen wird die Immunkomplexbildung durch die Verwendung eines Markers, wie eines radioaktiven Markers oder eines Enzymmarkers (wie Alkalische Phosphatase, Meerrettich-Peroxidase) nachgewiesen.

[0080] Selbstverständlich kann man durch die Verwendung eines sekundären Bindungsliganden, wie eines zweiten Antikörpers oder einer Biotin/Avidin-Ligandbindungsanordnung, zusätzliche Vorteile finden, wie in der Technik bekannt ist.

[0081] Für Assayzwecke wird vorgeschlagen, dass praktisch jede Probe eingesetzt werden kann, von der man annimmt, dass sie je nachdem entweder ein Kristallprotein oder -peptid oder ein mit Kristallprotein verwandtes Peptid oder einen Antikörper, den man nachweisen möchte, umfassen könnte. Eine mögliche Anwendung solcher Ausführungsformen bei der Titration von Antigen- oder Antikörperproben bei der Auswahl von Hybridomen wird in Betracht gezogen.

[0082] In verwandten Ausführungsformen zieht die vorliegende Erfindung die Herstellung von Kits in Betracht, die eingesetzt werden können, um die Anwesenheit von Kristallproteinen oder verwandten Peptiden und/oder Antikörpern in einer Probe nachzuweisen. Proben können Zellen, Zellüberstände, Zellsuspensionen, Zellextrakte, Enzymfraktionen, Proteinextrakte oder andere zellfreie Zusammensetzungen, von denen man annimmt, dass sie Kristallproteine oder -peptide enthalten könnten, enthalten. Allgemein gesagt enthalten Kits gemäß der vorliegenden Erfindung ein geeignetes Kristallprotein, -peptid oder einen Antikörper, der gegen ein solches Protein oder Peptid gerichtet ist, zusammen mit einem Immunnachweisreagens und einer Einrichtung, die den Antikörper oder das Antigen und das Reagens enthält. Das Immunnachweisreagens umfasst typischerweise einen Marker, der mit dem Antikörper oder Antigen oder mit einem sekundären Bindungsliganden assoziiert ist. Beispielhafte Liganden könnten einen sekundären Antikörper, der gegen den ersten Antikörper oder das Antigen gerichtet ist, oder einen Biotin- oder Avidin-(oder Streptavidin-)Liganden mit einem assoziierten Marker umfassen. Wie oben erwähnt, sind in der Technik selbstverständlich mehrere beispielhafte Marker bekannt, und alle solchen Marker können in Verbindung mit der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden.

[0083] Der Behälter beinhaltet im Allgemeinen ein Vial, in das der Antikörper, das Antigen oder Nachweisreagens gegeben und vorzugsweise in geeigneter Weise aliquotiert werden kann. Die Kits der vorliegenden Erfindung enthalten typischerweise auch eine Einrichtung, die den Antikörper-, Antigen- und Reagensbehälter in engem Zusammenhang für den kommerziellen Vertrieb enthält. Solche Behälter können spritzgegossene oder blasgeformte Kunststoffbehälter umfassen, in die die gewünschten Vials eingebracht werden.

2.6 Insektizide Zusammensetzungen und Verfahren zu ihrer Verwendung

[0084] Die Erfinder ziehen in Betracht, dass die hier offenbarten Polypeptidzusammensetzungen besondere Verwendung als Insektizide für die topische und/oder systemische Anwendung auf Feldfrüchte, Gräser, Obst und Gemüse, Rasen, Bäume und/oder Zierpflanzen finden. Alternativ dazu können die hier offenbarten Polypeptide auch als Sprühnebel, Staub, Pulver oder andere wässrige Zubereitung, zerstäubt oder als Aerosol zum Töten eines Insekts oder zur Bekämpfung einer Insektenpopulation zubereitet werden. Die hier offenbarten Polypeptidzusammensetzungen können prophylaktisch verwendet werden, oder alternativ dazu können sie auch an eine Umgebung verabreicht werden, sobald Zielinsekten, wie der Westliche Maiswurzelbohrer (WCRW), in der besonderen zu behandelnden Umgebung identifiziert wurden.

[0085] Unabhängig vom Verfahren der Anwendung wird die Menge der aktiven Polypeptidkomponente(n) in einer insektizid wirksamen Menge angewendet, die in Abhängigkeit von Faktoren variiert wie zum Beispiel den speziellen zu bekämpfenden Zielinsekten, der speziellen Umgebung, dem Ort, der Pflanze, Kulturpflanze oder

landwirtschaftlichen Stelle, die behandelt werden sollen, den Umgebungsbedingungen sowie dem Verfahren, der Auftragungsdichte, der Konzentration, der Stabilität und der Menge der Anwendung der insektizid wirksamen Polypeptidzusammensetzung. Die Zubereitungen können auch in Bezug auf die klimatischen Bedingungen, Umweltbetrachtungen und/oder die Häufigkeit der Anwendung und/oder Schwere des Insektenbefalls variieren.

[0086] Die beschriebenen Insektizidzusammensetzungen können hergestellt werden, indem man entweder die Bakterienzell-, Kristall- und/oder Sporensuspension oder die isolierte Proteinkomponente mit dem gewünschten landwirtschaftlich annehmbaren Träger zubereitet. Die Zusammensetzungen können vor der Verabreichung in einem geeigneten Mittel zubereitet werden, zum Beispiel lyophilisiert, gefriergetrocknet, getrocknet oder in einem wässrigen Träger, Medium oder geeigneten Verdünnungsmittel, wie Kochsalzlösung oder einem anderen Puffer. Die zubereiteten Zusammensetzungen können in Form eines Staubs oder Granulats oder einer Suspension in Öl (Pflanzen- oder Mineralöl) oder von wasser- oder Öl/Wasser-Emulsionen oder als benetzbares Pulver oder in Kombination mit irgendeinem anderen Trägermaterial, das für die landwirtschaftliche Anwendung geeignet ist, vorliegen. Geeignete landwirtschaftliche Träger können fest oder flüssig sein und sind in der Technik wohlbekannt. Der Ausdruck "landwirtschaftlich annehmbarer Träger" umfasst alle Hilfsstoffe, inerten Komponenten, Dispergiermittel, Tenside, Klebrigmacher und Bindemittel, wie gewöhnlich in der Insektizidzubereitungstechnik verwendet werden; diese sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Insektizidzubereitung wohlbekannt. Die Zubereitungen können mit einem oder mehreren festen oder flüssigen Hilfsmitteln gemischt und mit verschiedenen Methoden präpariert werden, z.B. durch homogenes Mischen, physikalisches Mischen und/oder Vermahlen der Insektizidzusammensetzung mit geeigneten Hilfsstoffen unter Verwendung von herkömmlichen Zubereitungstechniken.

2.6.1 Fließfähige Ölsuspensionen

[0087] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Bioinsektizidzusammensetzung eine fließfähige Ölsuspension von Bakterienzellen, die das hier offenbarte neue Kristallprotein exprimieren. Vorzugsweise handelt es sich bei den Zellen um Zellen von *B. thuringiensis* NRRL B-21885 oder NRRL B-21886, doch gilt jede bakterielle Wirtszelle als geeignet, die die hier offenbarten neuen Nucleinsäuresegmente exprimiert und ein Polypeptid produziert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 umfasst. Beispielhafte Bakterienspezies sind solche wie *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Agrobacterium* spp. oder *Pseudomonas* spp.

2.6.2 Wasserdispergierbares Granulat

[0088] In einer anderen wichtigen Ausführungsform umfasst die Bioinsektizidzusammensetzung ein wasserdispergierbares Granulat. Dieses Granulat umfasst Bakterienzellen, die ein hier offenbartes neues Kristallprotein exprimieren. Bevorzugte Bakterienzellen sind *B. thuringiensis* NRRL B-21885 oder NRRL B-21886, doch gelten auch Zellen von Bakterien wie *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Agrobacterium* spp. oder *Pseudomonas* spp., die mit einem hier offenbarten DNA-Segment transformiert sind und das Kristallprotein exprimieren, als geeignet.

2.6.3 Pulver, Stäube und Sporenzubereitungen

[0089] In einer dritten wichtigen Ausführungsform umfasst die Bioinsektizidzusammensetzung ein benetzbares Pulver, einen Staub, eine Sporenkristallzubereitung, ein Zellsediment oder ein kolloidales Konzentrat. Dieses Pulver umfasst Bakterienzellen, die ein hier offenbartes neues Kristallprotein exprimieren. Bevorzugte Bakterienzellen sind *B. thuringiensis* NRRL B-21885 oder NRRL B-21886, doch können auch Zellen von Bakterien wie *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Agrobacterium* spp. oder *Pseudomonas* spp. mit einem oder mehreren hier offenbarten DNA-Segmenten transformiert sein. Solche transformierten oder rekombinanten Bakterienzellen, die vorzugsweise wenigstens ein Polypeptid exprimieren, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu wenigstens 90% mit SEQ ID Nr. 2 identisch ist, und ein Polypeptid produzieren, das insektizide Wirkung gegen ein Zielinsekt aufweist. Solche trockenen Formen der insektiziden Zusammensetzungen können so zubereitet werden, dass sie sich sofort nach der Benetzung auflösen oder sich alternativ dazu mit gesteuerter Freisetzung, nachhaltiger Freisetzung oder in anderer Weise zeitabhängig auflösen. Solche Zusammensetzungen können auf das Zielinsekt aufgetragen oder von diesem aufgenommen werden, und als solche können sie verwendet werden, um die Zahl der Insekten oder die Ausbreitung solcher Insekten in einer gegebenen Umgebung zu reduzieren.

2.6.4 Wässrige Suspensionen und Bakterienzellfiltrate oder -lysate

[0090] In einer vierten wichtigen Ausführungsform umfasst die Bioinsektizidzusammensetzung eine wässrige Suspension von Bakterienzellen oder eine wässrige Suspension von parasporalen Kristallen oder eine wässrige Suspension von Bakterienzellysaten oder -filtraten, wie die oben beschriebenen, die das Kristallprotein exprimieren. Solche wässrigen Suspensionen können als konzentrierte Stammlösung, die vor der Anwendung verdünnt wird, oder alternativ dazu als gebrauchsfertige verdünnte Lösung bereitgestellt werden.

[0091] Für diese Verfahren, die die Anwendung von Bakterienzellen beinhalten, kann der zelluläre Wirt, der das bzw. die Kristallprotein-Gene enthält, in jedem zweckmäßigen Nährmedium gezüchtet werden, wo das DNA-Konstrukt einen selektiven Vorteil verschafft, was ein selektives Medium ergibt, so dass im Wesentlichen alle oder alle Zellen das B.-thuringiensis-Gen enthalten. Diese Zellen können dann mit herkömmlichen Methoden geerntet werden. Alternativ dazu können die Zellen auch vor der Ernte behandelt werden.

[0092] Wenn die insektiziden Zusammensetzungen intakte B.-thuringiensis-Zellen umfassen, die das interessierende Protein exprimieren, können solche Bakterien auf vielerlei Weise zubereitet werden. Sie können als benetzbare Pulver, Granulate oder Stäube oder durch Mischen mit verschiedenen inerten Materialien, wie anorganischen Mineralien (Phyllosilicaten, Carbonaten, Sulfaten, Phosphaten) oder botanischen Materialien (pulverisierten Maiskolben, Reisspelzen, Walnussschalen), eingesetzt werden. Die Zubereitungen können Spreader-Sticker-Hilfsstoffe, Stabilisatoren, andere pestizide Additive oder Tenside umfassen. Flüssige Zubereitungen können auf wässriger oder nichtwässriger Basis sein und als Schäume, Suspensionen oder emulgierbare Konzentrate eingesetzt werden. Die Bestandteile können rheologische Mittel, Tenside, Emulgatoren, Dispergiermittel oder Polymere umfassen.

[0093] Alternativ dazu können die neuen insektiziden Polypeptide auch durch native oder rekombinante bakterielle Expressionssysteme in vitro hergestellt und für die anschließende Feldanwendung isoliert werden. Ein solches Protein kann entweder in Rohzellysaten, Suspensionen oder Kolloiden vorliegen, oder es kann alternativ dazu gereinigt, verfeinert, gepuffert und/oder weiterverarbeitet werden, bevor man es zu einer aktiven bioziden Zubereitung verarbeitet. Ebenso kann es unter gewissen Umständen wünschenswert sein, Kristalle und/oder Sporen aus Bakterienkulturen, die das Kristallprotein exprimieren, zu isolieren und Lösungen, Suspensionen oder kolloidale Präparate solcher Kristalle und/oder Sporen als aktive bioinsektizide Zusammensetzung anzuwenden.

2.6.5 Multifunktionelle Zubereitungen

[0094] Wenn in bestimmten Ausführungsformen die Bekämpfung von mehreren Insektenspezies gewünscht wird, können die hier beschriebenen insektiziden Zubereitungen weiterhin auch ein oder mehrere chemische Pestizide (wie chemische Pestizide, Nematizide, Fungizide, Viruzide, Mikrobizide, Amöbizide, Insektizide) und/oder ein oder mehrere δ -Endotoxin-Polypeptide, die dieselben oder andere insektizide Aktivitäten oder insektizide Spezifitäten wie das in SEQ ID Nr. 2 identifizierte insektizide Polypeptid haben, umfassen. Die insektiziden Polypeptide können auch in Verbindung mit anderen Behandlungen, wie Düngemitteln, Unkrautvernichtern, Frostschutzmitteln, Tensiden, Detergentien, insektiziden Seifen, dormanten Ölen, Polymeren und/oder zeitabhängig freisetzen oder biologisch abbaubaren Trägerzubereitungen, die eine langfristige Dosierung eines Zielbereichs nach einer einzigen Auftragung der Zubereitung ermöglichen. Ebenso können die Zubereitungen auch zu essbaren "Ködern" verarbeitet oder zu "Insektenfallen" gestaltet werden, um eine Zufuhr oder Aufnahme der insektiziden Zubereitung durch ein Zielinsekt zu ermöglichen.

[0095] Die insektiziden Zusammensetzungen der Erfindung können auch in sukzessiver oder gleichzeitiger Anwendung auf eine Umgebungsstelle einzeln oder in Kombination mit einem oder mehreren zusätzlichen Insektiziden, Pestiziden, Chemikalien, Düngemitteln oder anderen Verbindungen verwendet werden.

2.6.6 Auftragsverfahren und wirksame Auftragsdichten

[0096] Die insektiziden Zusammensetzungen der Erfindung werden mit herkömmlichen Verfahren, vorzugsweise durch Sprühen, auf die Umgebung des Zielinsekts, typischerweise auf das Laub der zu schützenden Pflanze oder Feldfrucht, aufgetragen. Die Stärke und Dauer der Insektizidanwendung wird im Hinblick auf die Bedingungen, die spezifisch für die besonderen Schädlinge und zu behandelnden Kulturpflanzen sind, und die besonderen Umgebungsbedingungen eingestellt. Das proportionale Verhältnis von Wirkstoff zu Träger hängt natürlich von der chemischen Natur, Löslichkeit und Stabilität der insektiziden Zusammensetzung sowie der besonderen, in Betracht gezogenen Zubereitung ab.

[0097] Weitere Auftragungstechniken einschließlich Verstäuben, Versprühen, Bodenimprägnierung, Bodeninjektion, Samenbeschichtung, Sämlingsbeschichtung, Laubbesprühung, Belüftung, Verneblung, Zerstäubung, Rauchbildung und Aerosolbildung sind ebenfalls möglich und können unter bestimmten Umständen, wie z.B. Insekten, die einen Wurzel- oder Stängelbefall verursachen, oder bei Auftragung auf empfindliche Pflanzen oder Zierpflanzen, erforderlich sein. Diese Auftragsverfahren sind dem Fachmann ebenfalls wohlbekannt.

[0098] Die insektiziden Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können auch für die präventive oder prophylaktische Auftragung auf eine Fläche zubereitet werden und können unter bestimmten Umständen auch auf Haustiere, Nutztiere, Tierlager oder in und um landwirtschaftliche Geräte, Scheunen, Wohnhäuser oder landwirtschaftliche oder gewerbliche Anlagen aufgetragen werden.

[0099] Die Konzentration der insektiziden Zusammensetzung, die für die Umgebungs-, systemische, topische oder foliare Auftragung verwendet wird, variiert stark in Abhängigkeit von der Natur der besonderen Zubereitung, der Auftragungsmethode, den Umgebungsbedingungen und dem Grad der biologischen Aktivität. Typischerweise ist die bioinsektizide Zusammensetzung in der aufgetragenen Zubereitung in einer Konzentration von wenigstens 1 Gew.-% vorhanden und kann in einer Konzentration von bis zu einschließlich 99 Gew.-% vorhanden sein. Trockene Zubereitungen der Polypeptidzusammensetzungen können 1 bis 99 oder mehr Gew.-% der Proteinzusammensetzung enthalten, während flüssige Zubereitungen im Allgemeinen 1 bis 99 oder mehr Gew.-% des Wirkstoffs enthalten können. Als solche kann eine Vielzahl von Zubereitungen hergestellt werden, einschließlich solcher Zubereitungen, die 5 bis 95 oder mehr Gew.-% des insektiziden Polypeptids umfassen, einschließlich solcher Zubereitungen, die 10 bis 90 oder mehr Gew.-% des insektiziden Polypeptids umfassen. Natürlich gelten auch Zusammensetzungen, die 15 bis 85 oder mehr Gew.-% des insektiziden Polypeptids umfassen, sowie Zubereitungen, die 20 bis 80 oder mehr Gew.-% des insektiziden Polypeptids umfassen, als in den Umfang der vorliegenden Offenbarung fallend.

[0100] Im Falle von Zusammensetzungen, in denen intakte Bakterienzellen, die das insektizide Polypeptid enthalten, vorhanden sind, enthalten die Präparate im Allgemeinen 10^4 bis 10^8 Zellen/mg, obwohl es in manchen Ausführungsformen auch wünschenswert sein kann, Zubereitungen zu verwenden, die 10^2 bis 10^4 Zellen/mg enthalten, oder wenn konzentriertere Zubereitungen gewünscht werden, können auch Zusammensetzungen zubereitet werden, die 10^8 bis 10^{10} oder 10^{11} Zellen/mg umfassen. Alternativ dazu können auch Zellpasten, Sporenkonzentrate oder Kristallprotein-Suspensionskonzentrate hergestellt werden, die das Äquivalent von 10^{12} bis 10^{13} Zellen/mg des aktiven Polypeptids enthalten, und solche Konzentrate können vor der Auftragung verdünnt werden.

[0101] Die oben beschriebene insektizide Zubereitung kann nach Bedarf in einer oder mehreren Anwendungen auf eine besondere Pflanze oder Zielfläche aufgetragen werden, wobei eine typische Feldauftragungsdichte pro Hektar in der Größenordnung von 50 g/Hektar bis 500 g/Hektar des Wirkstoffs liegt, oder alternativ dazu können auch 500 g/Hektar bis 1000 g/Hektar verwendet werden. In bestimmten Fällen kann es sogar wünschenswert sein, die insektizide Zubereitung in einer Auftragungsdichte von 1000 g/Hektar bis 5000 g/Hektar oder mehr des Wirkstoffs auf eine Zielfläche aufzutragen. Tatsächlich gelten alle Auftragungsdichten im Bereich von 50 g aktives Polypeptid pro Hektar bis 10 000 g/Hektar als geeignet für die Behandlung, Bekämpfung und Vernichtung von Zielschadinsekten unter Verwendung solcher insektizider Zubereitungen. Als solche können Auftragungsdichten von 100 g/Hektar, 200 g/Hektar, 300 g/Hektar, 400 g/Hektar, 500 g/Hektar, 600 g/Hektar, 700 g/Hektar, 800 g/Hektar, 900 g/Hektar, 1 kg/Hektar, 1,1 kg/Hektar, 1,2 kg/Hektar, 1,3 kg/Hektar, 1,4 kg/Hektar, 1,5 kg/Hektar, 1,6 kg/Hektar, 1,7 kg/Hektar, 1,8 kg/Hektar, 1,9 kg/Hektar, 2,0 kg/Hektar, 2,5 kg/Hektar, 3,0 kg/Hektar, 3,5 kg/Hektar, 4,0 kg/Hektar, 4,5 kg/Hektar, 6,0 kg/Hektar, 7,0 kg/Hektar, 8,0 kg/Hektar, 8,5 kg/Hektar, 9,0 kg/Hektar und sogar bis zu einschließlich 10,0 kg/Hektar oder mehr des aktiven Polypeptids in bestimmten landwirtschaftlichen, gewerblichen und Haushaltsanwendungen der oben beschriebenen Pestizidzubereitungen verwendet werden.

2.7 Epitopische Kernsequenzen

[0102] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Protein- oder Peptidzusammensetzungen, die frei von Gesamtzellen und anderen Peptiden sind und die ein gereinigtes Peptid umfassen, das ein Epitop beinhaltet, welches immunologisch kreuzreaktiv gegenüber einem oder mehreren Antikörpern ist, die spezifisch für die offenbarten Polypeptidsequenzen sind. Insbesondere betrifft die Erfindung epitopische Kernsequenzen, die von CryET70- und mit CryET70 verwandten Polypeptiden abgeleitet sind.

[0103] Der hier verwendete Ausdruck "ein Epitop beinhalten, welches immunologisch kreuzreaktiv gegenüber

einem oder mehreren Antikörpern ist, die spezifisch für die offenbarte Polypeptidsequenz sind" soll sich auf ein Peptid- oder Proteinantigen beziehen, das eine Primär-, Sekundär- oder Tertiärstruktur umfasst, die einem Epitop ähnelt, das sich innerhalb des offenbarten Polypeptids befindet. Der Grad der Ähnlichkeit wird im Allgemeinen so groß sein, dass monoklonale oder polyklonale Antikörper, die gegen das Kristallprotein oder Polypeptid gerichtet sind, auch an das kreuzreaktive Peptid- oder Proteinantigen binden, mit diesem reagieren oder es in sonstiger Weise erkennen. In Verbindung mit solchen Antikörpern können verschiedene Immunassayverfahren eingesetzt werden, wie zum Beispiel Western Blotting, ELISA und RIA, die dem Fachmann alle bekannt sind.

[0104] Die Identifizierung von immundominanten Epitopen und/oder ihren funktionellen Äquivalenten, die für die Verwendung in Impfstoffen geeignet sind, ist eine relativ geradlinige Sache. Zum Beispiel kann man die Verfahren von Hopp einsetzen, wie es im US-Patent 4,554,101 gelehrt wird, das die Identifizierung und Herstellung von Epitopen aus Aminosäuresequenzen auf der Basis der Hydrophilie lehrt. Die in mehreren anderen Artikeln beschriebenen Verfahren und darauf beruhende Softwareprogramme können auch verwendet werden, um epitopische Kernsequenzen zu identifizieren (siehe zum Beispiel Jameson und Wolf, 1988; Wolf et al., 1988; US-Patent 4,554,101). Die Aminosäuresequenz dieser "epitopischen Kernsequenzen" kann dann leicht in Peptide eingebaut werden, entweder durch die Anwendung von Peptidsynthese oder durch Rekombinationstechnik.

[0105] Bevorzugte Peptide zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung haben im Allgemeinen eine Länge in der Größenordnung von 8 bis 20 Aminosäuren und besonders bevorzugt 8 bis 15 Aminosäuren. Es wird vorgeschlagen, dass kürzere antigene, von Kristallprotein abgeleitete Peptide unter gewissen Umständen Vorteile ergeben, zum Beispiel bei der Herstellung von immunologischen Nachweisassays. Beispielhafte Vorteile sind die Leichtigkeit der Herstellung und Reinigung, die relativ geringen Kosten und die verbesserte Reproduzierbarkeit der Produktion sowie die vorteilhafte Bioverteilung.

[0106] Es wird vorgeschlagen, dass besondere Vorteile der vorliegenden Erfindung durch die Herstellung von synthetischen Peptiden realisiert werden können, die modifizierte und/oder verlängerte epitopische/immunogene Kernsequenzen enthalten, welche zu einem "universalen" epitopischen Peptid führen, das gegen Kristallproteine und insbesondere CryET70 und verwandte Sequenzen gerichtet ist. Diese epitopischen Kernsequenzen werden hier in besonderen Aspekten als hydrophile Bereiche des besonderen Polypeptidantigens identifiziert. Es wird vorgeschlagen, dass diese Bereiche diejenigen repräsentieren, die am wahrscheinlichsten die T-Zell- oder B-Zell-Stimulation fördern und somit die Produktion spezifischer Antikörper hervorrufen.

[0107] Eine epitopische Kernsequenz, wie der Ausdruck hier verwendet wird, ist ein relativ kurzes Stück von Aminosäuren, das "komplementär" zu antigenbindenden Stellen auf den hier offenbarten, gegen Kristallprotein gerichteten Antikörpern ist und daher an diese bindet. Außerdem oder alternativ dazu ist eine epitopische Kernsequenz eine Sequenz, die Antikörper hervorruft, welche kreuzreaktiv gegenüber Antikörpern sind, die gegen die Peptidzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung sind. Man wird sich darüber im Klaren sein, dass sich der Ausdruck "komplementär" im Zusammenhang mit der vorliegenden Offenbarung auf Aminosäuren oder Peptide bezieht, die eine anziehende Kraft aufeinander ausüben. Bestimmte Epitopkernsequenzen der vorliegenden Erfindung können also funktionell anhand ihrer Fähigkeit definiert werden, bei den entsprechenden, gegen das Protein gerichteten Antisera mit dem gewünschten Proteinantigen zu konkurrieren oder dieses womöglich zu verdrängen.

[0108] Im Allgemeinen ist die Größe des Polypeptidantigens vermutlich nicht besonders entscheidend, solange es wenigstens groß genug ist, um die identifizierten Kernsequenzen oder Sequenzen zu tragen. Die kleinste geeignete Kernsequenz, die in der vorliegenden Offenbarung erwartet wird, hätte im Allgemeinen eine Länge in der Größenordnung von 8 Aminosäuren, wobei Sequenzen in der Größenordnung von 10 bis 20 besonders bevorzugt sind. Diese Größe entspricht also im Allgemeinen den kleinsten Peptidantigenen, die gemäß der Erfindung hergestellt werden. Die Größe des Antigens kann jedoch gegebenenfalls auch größer sein, solange es eine grundlegende epitopische Kernsequenz enthält.

[0109] Die Identifizierung von epitopischen Kernsequenzen ist dem Fachmann bekannt, zum Beispiel gemäß der Beschreibung im US-Patent 4,554,101, das die Identifizierung und Herstellung von Epitopen aus Aminosäuresequenzen auf der Basis der Hydrophilie lehrt. Überdies stehen zahlreiche Computerprogramme zur Verfügung, um antigene Teile von Proteinen vorherzusagen (siehe z.B. Jameson und Wolf, 1988; Wolf et al., 1988). Computerisierte Peptidsequenz-Analyseprogramme (z.B. DNASTar[®]-Software, DNASTar, Inc., Madison, WI) können ebenfalls geeignet sein, um synthetische Peptide gemäß der vorliegenden Offenbarung zu entwerfen.

[0110] Synthesen von epitopischen Sequenzen oder Peptiden, die ein antigenes Epitop innerhalb ihrer Sequenz enthalten, werden leicht mit Hilfe von herkömmlichen Synthesetechniken, wie dem Festphasenverfahren, erreicht (z.B. durch die Verwendung eines kommerziell erhältlichen Peptidsynthesizers, wie ein Peptide Synthesizer Modell 430A von Applied Biosystems). Auf diese Weise synthetisierte Peptidantigene können dann in vorbestimmten Mengen aliquotiert und bis zur Verwendung in herkömmlicher Weise, wie in wässrigen Lösungen oder ganz besonders bevorzugt in einem Pulver- oder lyophilisierten Zustand, gelagert werden.

[0111] Aufgrund der relativen Stabilität von Peptiden können sie gewünschtenfalls im Allgemeinen leicht während recht langer Zeiträume, z.B. bis zu sechs Monaten oder mehr, in wässrigen Lösungen, und zwar in praktisch jeder wässrigen Lösung, ohne nennenswerte Zersetzung oder Verlust der antigenen Aktivität aufbewahrt werden. Wenn eine längere Lagerung in wässriger Lösung in Betracht gezogen wird, ist es jedoch im Allgemeinen wünschenswert, Mittel einschließlich Puffern, wie Tris- oder Phosphatpuffer, mitzuverwenden, um einen pH-Wert von 7,0 bis 7,5 aufrechtzuerhalten. Außerdem kann es wünschenswert sein, Mittel mitzuverwenden, die das Mikrobewachstum hemmen, wie Natriumazid oder Merthiolat. Für eine längere Lagerung im wässrigen Zustand ist es wünschenswert, die Lösungen bei 4 °C oder besonders bevorzugt im gefrorenen Zustand zu lagern. Wenn die Peptide im lyophilisierten oder pulverisierten Zustand gelagert werden, können sie selbstverständlich praktisch unendlich lange gelagert werden, z.B. in dosierten Aliquoten, die vor der Verwendung mit einer vorbestimmten Menge Wasser (vorzugsweise destilliert) oder Puffer rehydratisiert werden können.

2.8 Definitionen

[0112] Die folgenden Wörter und Ausdrücke haben die unten dargelegten Bedeutungen.

[0113] Ein, eine: Im Einklang mit der ständigen Patenttradition sollen "ein" oder "eine", wie sie in dieser gesamten Offenbarung verwendet werden, "ein/eine oder mehrere" bedeuten.

[0114] Umfassen, umfasst: Im Einklang mit der ständigen Patenttradition sollen "umfassen" und "umfasst", wie sie in dieser gesamten Offenbarung verwendet werden, "einschließlich, aber nicht eingeschränkt auf" bedeuten.

[0115] Expression: Die Kombination von intrazellulären Vorgängen einschließlich der Transcription und Translation, die ein codierendes DNA-Molekül, wie ein Struktur-Gen, erfährt, so dass ein Polypeptid entsteht.

[0116] Promotor: Eine Erkennungsstelle auf einer DNA-Sequenz oder Gruppe von DNA-Sequenzen, die ein Expressionssteuerungselement für ein Struktur-Gen liefert und an die RNA-Polymerase spezifisch bindet und die RNA-Synthese (Transcription) dieses Gens einleitet.

[0117] Regeneration: Der Vorgang des Wachsenlassens einer Pflanze aus einer Pflanzenzelle (z.B. Pflanzenprotoplast oder Explantat).

[0118] Struktur-Gen: Ein Gen, das exprimiert wird, so dass ein Polypeptid entsteht.

[0119] Transformation: Vorgang der Einführung einer exogenen DNA-Sequenz (z.B. eines Vektors, eines rekombinanten DNA-Moleküls) in eine Zelle oder einen Protoplasten, wo diese exogene DNA in ein Chromosom eingebaut wird oder zur autonomen Replikation befähigt ist.

[0120] Transformierte Zelle: Eine Zelle, deren DNA durch die Einführung eines exogenen DNA-Moleküls in diese Zelle verändert wurde.

[0121] Transgene Zelle: Jede Zelle, die von einer transformierten Zelle abgeleitet ist oder regeneriert wurde oder von einer transgenen Zelle abgeleitet ist. Beispielhafte transgene Zellen sind Pflanzenkalli, die von einer transformierten Pflanzenzelle abgeleitet sind, sowie besondere Zellen, wie Blatt-, Wurzel-, Stängelzellen, z.B. somatische Zellen oder reproduktive Zellen (Keimzellen), die von einer transgenen Pflanze erhalten werden.

[0122] Transgene Pflanze: Eine Pflanze oder Nachkommenschaft irgendeiner Generation der Pflanze, die von einer transformierten Pflanzenzelle oder einem transformierten Protoplasten abgeleitet war, wobei die Nucleinsäuren der Pflanze einen exogenen ausgewählten Nucleinsäuresequenzbereich enthalten, der in einer nativen, nichttransgenen Pflanze desselben Stammes ursprünglich nicht vorhanden ist. Die Ausdrücke "transgene Pflanze" und "transformierte Pflanze" werden in der Technik zuweilen als synonyme Ausdrücke verwen-

det, um eine Pflanze zu definieren, deren DNA ein exogenes DNA-Molekül enthält. Wir halten es jedoch für wissenschaftlich korrekter, eine regenerierte Pflanze oder einen regenerierten Kallus, die bzw. der aus einer transformierten Pflanzenzelle oder einem transformierten Protoplasten oder aus transformierten pluripotenten Pflanzenzellen erhalten wurde, als transgene Pflanze zu bezeichnen. Vorzugsweise gehören zu den transgenen Pflanzen der vorliegenden Erfindung solche Pflanzen, die wenigstens ein erstes ausgewähltes Polynucleotid umfassen, das ein insektizides Polypeptid codiert. Dieses ausgewählte Polynucleotid ist vorzugsweise ein δ -Endotoxin codierender Bereich (oder Gen), der funktionell mit wenigstens einem ersten Promotor verknüpft ist, der den codierenden Bereich exprimiert, so dass das insektizide Polypeptid in der transgenen Pflanze erzeugt wird. Vorzugsweise weisen die transgenen Pflanzen der vorliegenden Erfindung, die das codierte Polypeptid produzieren, einen Phänotyp mit verbesserter Resistenz gegen Zielschadinsekten auf. Solche transgenen Pflanzen, ihre Nachkommenschaft, Abkömmlinge und Samen aus jeder solchen Generation sind vorzugsweise insektenresistente Pflanzen.

[0123] Vektor: Ein Nucleinsäuremolekül, das zur Replikation in einer Wirtszelle befähigt ist und/oder mit dem ein anderes Nucleinsäuresegment funktionell verknüpft werden kann, so dass es zu einer Replikation des daran befestigten Segments kommt. Plasmide, Phagen, Phagemide und Cosmide sind allesamt beispielhafte Vektoren. In vielen Ausführungsformen werden Vektoren als Überträger verwendet, um ein oder mehrere ausgewählte Polynucleotide in eine Wirtszelle einzuführen, wodurch eine "transformierte" oder "rekombinante" Wirtszelle entsteht.

3.0 Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0124] Die Zeichnungen bilden einen Bestandteil der vorliegenden Patentschrift und werden mit aufgenommen, um bestimmte Aspekte der vorliegenden Erfindung näher zu veranschaulichen. Die Erfindung ist durch Bezugnahme auf eine oder mehrere dieser Zeichnungen in Kombination mit der ausführlichen Beschreibung von speziellen Ausführungsformen, die hier präsentiert wird, besser verständlich.

[0125] **Fig. 1.** Strukturelle Karten der cryET70-Plasmide pEG1648 und pEG1657. Ein DNA-Fragment von ungefähr 8,5 kb, das durch einen partiellen Mbol-Abbau von EG4140-DNA erhalten wurde, wurde in die einzige BamHI-Stelle des Shuttle-Vektors pHT315 kloniert, wobei das cryET70-Plasmid pEG1648 entstand. Ein 5,8 kb langes HindIII-EcoRI-Fragment, das das cryET70-Gen enthält, wurde aus dem Plasmid pEG1648 isoliert und in pUC18 eingesetzt, was das Plasmid pEG1657 ergab. Bezeichnungen: ori1030 (ausgefülltes Kästchen) = B.-thuringiensis-Plasmid-Replikationsstartpunkt; ery (leeres Kästchen) = Erythromycin-Resistenz-Gen; pUC18 und pUC19 (schraffierte Kästchen) = E.-coli-Klonierungsvektorfragmente; durchgezogene Linie = cryET70-DNA-Insert. Abkürzungen der Restriktionsstellen: B = BamHI, Bal = Ball, E = EcoRI, H = HindIII, Hp = Hpal, K = KpnI, Mb = Mbol.

4.0 Beschreibung von beispielhaften Ausführungsformen

4.1 Einige Vorteile der Erfindung

[0126] Die vorliegende Erfindung stellt ein neues δ -Endotoxin bereit, das als CryET70 bezeichnet wird und gegenüber dem Westlichen Maiswurzelbohrer (WCRW) hochgradig toxisch ist. Dieses Protein hat eine Aminosäuresequenz, die mit anderen δ -Endotoxinen, die gegenüber Coleoptera-Insekten toxisch sind, nicht verwandt ist. CryET70 stellt eine neue Klasse von insektiziden Kristallproteinen dar, die gegen Coleoptera schädlich sind. Im Unterschied zu anderen WCRW-toxischen insektiziden Kristallproteinen von B. thuringiensis weist CryET70 keine wesentliche Toxizität gegenüber dem Südlichen Maiswurzelbohrer (SCRW) oder dem Kartoffelkäfer (CPB) auf. Das einzige bekannte Protein, das mit CryET70 verwandt ist, ist Cry22, ein insektizides Kristallprotein, von dem berichtet wird, dass es nur gegenüber Hymenoptera-Insekten toxisch ist (GenBank Zugriffs-Nr. I24547).

4.2 Schadinsekten

[0127] Fast alle Feldfrüchte, Pflanzen und kommerziellen Landwirtschaftsflächen unterliegen einem Angriff durch ein oder mehrere Schadinsekten. Besonders problematisch sind die in Tabelle 1 identifizierten Lepidoptera- und Coleoptera-Schädlinge. Zum Beispiel sind Gemüse- und Kohlsorten, wie Artischocken, Kohlrabi, Salaträuke (Rucola), Lauch, Spargel, Linsen, Bohnen, Salat (z.B. Kopf-, Blatt-, Romanasalat), Runkelrüben, Chinesischer Senfkohl, Malanga, Brokkoli, Melonen (z.B. Zuckermelone, Wassermelone, Crenshaw, Honeydew, Cantaloupe), Rosenkohl, Kohl, Kardonen, Karotten, Napa, Blumenkohl, Okra, Zwiebeln, Sellerie, Petersilie, Kichererbsen, Pastinaken, Chicoree, Erbsen, Chinakohl, Pfeffer, Collards, Kartoffeln, Gurken, Kürbisse, Kürbis-

se, Rettiche, Küchenzwiebeln, Steckrübe, Aubergine, Haferwurzel, Endivie, Schalotten, Frisee, Sojabohne, Knoblauch, Spinat, Lauchzwiebeln, Kürbis, Blattgemüse, Zuckerrüben, Süßkartoffeln, Rübe, Mangold, Meerrettich, Tomaten, Grünkohl, Rüben und eine Vielzahl von Gewürzen empfindlich gegenüber Befall durch ein oder mehrere der folgenden Schadinsekten: *Autographa californica*, Heerwurm, Zuckerrübeneule (*Spodoptera exigua*), *Platyptilia carduidactyla*, *Hellula phidilealis*, Amerikanische Gemüseeeule (*Trichoplusia ni*), Südeuropäischer Kreuzferenzzünsler, Baumwollkapselbohrer, *Udea rubigalis*, *Evergestis rimosalis*, Maiszünsler, Kohlmotte, *Hypena scabra*, Kleiner Kohlweißling, *Diaphania hyalinata*, *Platynota stultana*, *Diaphania nitidalis*, den Rindenlarvenkomplex, *Estigmene acraea*, *Pseudoplusia includens*, Tabakeule (*Heliothis virescens*), Baumwolleule (*Helicoverpa armigera*), Tomatenschwärmer (*Manduca quinquemaculata*), *Keiferia lycopersicella*, *Anticarsia gemmatalis* und *Spodoptera praefica*.

[0128] Ebenso werden Weide- und Heupflanzen, wie Luzerne, Weidegräser und Gärfutter, häufig von Schädlingen wie Heerwurm, Zuckerrübeneule, *Colias eurytheme*, Schwarzkolbigem Dickkopffalter (*Thymelicus lineola*), einer Vielzahl von Spannerraupe und Zünslerlarven sowie Raupen der Eule *Spodoptera praefica* angegriffen.

[0129] Obst und Früchte von Kletterpflanzen, wie Äpfel, Aprikosen, Kirschen, Nektarinen, Pfirsiche, Birnen, Zwetschgen, Pflaumen, Quitten, Mandeln, Kastanien, Haselnuss, Pekannuss, Pistazien, Walnuss, Zitrusfrüchte, Brombeeren, Blaubeeren, Boysenbeeren, Preiselbeeren, Johannisbeeren, Loganbeeren, Himbeeren, Erdbeeren, Weintrauben, Avocados, Bananen, Kiwi, Persimonen, Granatapfel, Ananas, tropische Früchte, unterliegen häufig einem Angriff und Entlaubung durch *Eumorpha achemon*, *Amorbia*, Heerwurm, *Egira curialis*, *Eri-nota thrax*, Grauen Obstbaumwickler (*Rhopobota naevana*), *Sparganothis sulfureana*, *Paleacrita vernata* bzw. *Alsophila pometaria*, *Grapholita packardi*, *Egira curialis*, *Chrysoteuchia topiaria*, Amerikanischen Ringelspinner (*Malacosoma americanum*), Weißen Bärenspinner (*Hyphantria cunea*), *Archips rosanus*, *Melissopus latiferreanus*, *Archips argyrospila*, *Endopiza vitana*, *Desmia funeralis*, *Harrisina brillians*, *Orthosia hibisci*, *Gummosos-Batrachedra commosae*, Schwammspinner (*Lymantria dispar*), *Cydia caryana*, Schwärmerraupe, Spannerraupe, *Amyelois transitella*, *Choristoneura rosaceana*, *Platynota stultana*, *Sabulodes caberata*, *Argyrotaenia citrana*, *Papilio cressphontes*, Pfirsichwickler (*Grapholita molesta*), *Pandemis pyrusana*, Pfirsichmotte (*Anarsia lineatella*), *Acrobasis nuxvorella*, *Argyrotaenia velutinana*, *Schizura concinna*, *Athetis mindara*, *Estigmene acraea*, Spannerraupe, *Lasiocampidae*, *Thecla-Thecla basilides*, Tabakeule (*Heliothis virescens*), Wickler, *Platynota idaeusalis*, *Platynota flavedana*, *Datana integerrima*, *Malacosoma californicum* und *Spodoptera praefica*.

[0130] Feldfrüchte, wie Canola/Raps, Nachtkerze, Sumpflume, Mais (Feldmais, Zuckermis, Puffmais), Baumwolle, Hopfen, Jojoba, Erdnüsse, Reis, Färberdistel, feinkörniges Getreide (Gerste, Hafer, Roggen, Weizen), Sorghum, Sojabohnen, Sonnenblumen und Tabak, sind häufig das Ziel eines Befalls durch Insekten einschließlich Heerwurm, *Ostrinia furnacalis* und andere Kornbohrer, *Cochylis hospes*, Zuckerrübeneule (*Spodoptera exigua*), Baumwollkapselraupe, Amerikanische Gemüseeeule (*Trichoplusia ni*), Maiswurzelbohrer (einschließlich der südlichen und westlichen Varietät; *Diabrotica undecimpunctata* und *Diabrotica virgifera*), *Buccatrix thurberiella*, Kohlmotte, Maiszünsler, *Hypena scabra*, Eulen, *Helicoverpa zea*, Kleiner Kohlweißling, Spanner (einschließlich *Anacamptodes* spp.), *Choristoneura rosaceana*, *Cnephasia longana*, Kapselkäfer, Kapselkäfer, *Estigmene acraea*, *Diatraea grandiosella*, *Pseudoplusia includens*, Schwarzes C (*Xestia c-nigrum*), Sonnenblumenmotte (*Homoeosoma electellum*), Tabakeule (*Heliothis virescens*), Tabakschwärmer (*Manduca sexta*), *Anticarsia gemmatalis*.

[0131] Beet- und Balkonpflanzen, Blumen, Ziergewächse, Gemüse und Containerware werden häufig von Scharen von Schadinsekten gefressen, wie Heerwurm, *Datana major*, Zuckerrübeneule (*Spodoptera exigua*), Kohlmotte, *Erinnyis ello*, *Callopietria floridensis*, *Automeris io*, Spannerraupe, Oleanderbärenspinner (*Syntomeida epilais*), *Platynota stultana*, *Sabulodes caberata* und Tabakeule (*Heliothis virescens*).

[0132] Wälder, Obst-, Zier- und Nussbäume sowie Sträucher und andere Baumschulpflanzen unterliegen häufig einem Angriff durch verschiedene Insekten, wie *Thyridopteryx ephemeraeformis*, *Acleris gloverana*, Goldafter (*Euproctis chrysorrhoea*), *Phryganidia californica*, *Orgyia pseudotsugata*, *Ennomos subsignaria*, Weißer Bärenspinner (*Hyphantria cunea*), *Archips argyrospila*, *Dryocampa rubicunda*, Schwammspinner (*Lymantria dispar*), *Choristoneura pinus*, *Homadaula anisocentra*, *Neophasia menapia*, *Schizura concinna*, *Sibine stimulea*, *Heterocampa guttivitta*, *Paleacrita vernata* und *Alsophila pometaria*, *Choristoneura fumiferana*, *Lasiocampidae*, Wickler und *Orgyia vetusta*. Ebenso werden Rasengräser häufig von Schädlingen wie Heerwurm, *Pyralidae* und *Herpetogramma phaeopteralis* angegriffen.

Tabelle 1

Taxonomie von Coleoptera-Schädlingen der Unterordnungen Archostemata und Polyphaga

Unterordnung	Überfamilie	Familie	Unterfamilie	Gattungsgruppe	Gattung	Spezies
Bostrichiformia		Cupedidae			<i>Priacma</i>	<i>P. serrata</i>
		Dermostidae (Speckkäfer)			<i>Attagenus</i>	<i>A. pello</i>
Chrysomeli- formia		Cerambycidae (Bockkäfer)			<i>Agapanthia</i>	<i>Agapanthia</i> sp.
			Lepturinae		<i>Leptura</i>	<i>Leptura</i> sp. (Halsböcke)
					<i>Rhagium</i>	<i>Rhagium</i> sp.
					<i>Megacyllene</i>	<i>M. robiniae</i>
			Prioninae		<i>Derobrachus</i>	<i>D. geminatus</i>
					<i>Tetraopes</i>	<i>T. Tetrophthalmus</i>
		Chrysomelidae (Blattkäfer)	Chlamisinae		<i>Exema</i>	<i>E. neclecta</i>
			Chrysomelinae	Chrysomelini	<i>Chrysomela</i>	<i>C. Tremula, Chryso- mela</i> sp.
					<i>Oreina</i>	<i>O. cacaliae</i>
				Doryphorini	<i>Chrysolina</i>	<i>Chrysolina</i> sp.
					<i>Leptinotarsa</i>	<i>L. decemlineata</i> (Kartoffelkäfer)

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Unterordnung	Überfamilie	Familie	Unterfamilie	Gattungsgruppe	Gattung	Spezies
				Gonioctenini	Gonioctena	<i>G. fornicata</i> , <i>G. holdausi</i> , <i>G. intermedia</i> , <i>G. interposita</i> , <i>G. kamikawai</i> , <i>G. linnaeana</i> , <i>G. nigroplagiata</i> , <i>G. occidentalis</i> , <i>G. olivacea</i> , <i>G. pallida</i> , <i>G. quinquepunctata</i> , <i>G. rubripennis</i> , <i>G. rufipes</i> , <i>G. tredecimmaculata</i> , <i>G. variabilis</i> , <i>G. viminalis</i>
				Timarchini	<i>Timarcha</i>	<i>Timarcha</i> sp.
			Criocerinae		<i>Oulema</i>	<i>Oulema</i> sp.
			Galerucinae	Galerucini	<i>Monoxia</i>	<i>M. inornata</i> , <i>Monoxia</i> sp.
					Ophraella	<i>O. arctica</i> , <i>O. artemisiae</i> , <i>O. bilineata</i> , <i>O. communa</i> , <i>O. conferta</i> , <i>O. cribrata</i> , <i>O. notata</i> , <i>O. notulata</i> , <i>O. nuda</i> , <i>O. pilosa</i> , <i>O. sexvittata</i> , <i>O. slobodkini</i>
				Luperini	<i>Cerotoma</i>	<i>C. trifurcata</i>
					<i>Diabrotica</i>	<i>D. barberi</i> (Nördlicher Maiswurzelbohrer), <i>D. undecimpunctata</i> (Südlicher Maiswurzelbohrer), <i>D. virgifera</i> (Westlicher Maiswurzelbohrer)
			nichtklassifizierte Chrysomelidae		<i>Lachnaia</i>	<i>Lachnaia</i> sp.

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Unterordnung	Überfamilie	Familie	Unterfamilie	Gattungsgruppe	Gattung	Spezies
					<i>Epitrix</i>	<i>E. cucumeris</i> (Harris) (potato flea beetle), <i>E. fuscala</i> (eggplant flea beetle)
		Curculionidae (Rüsselkäfer)	Curculioninae		<i>Anthonomus</i>	<i>A. grandis</i> (Baumwollkapselkäfer)
			Entiminae	Naupactini	<i>Aramigus</i>	<i>A. conirostris</i> , <i>A. Globoculus</i> , <i>A. intermedius</i> , <i>A. planioculus</i> , <i>A. tessellatus</i>
					<i>Otiorhynchus</i>	<i>Otiorhynchus</i> sp.
				Phyllobiini	<i>Diaprepes</i>	<i>D. abbreviata</i>
					<i>Phyllobius</i>	<i>Phyllobius</i> sp.
					<i>Galapaganus</i>	<i>G. galapagoensis</i>
			Hyperinae		<i>Hypera</i>	<i>H. brunneipennis</i> , <i>H. postica</i> , <i>H. punctata</i>
			Molytinae		<i>Pissodes</i>	<i>P. affinis</i> , <i>P. nemorensis</i> , <i>P. schwarzi</i> , <i>P. strobi</i> , <i>P. terminalis</i>
			Rhynchophorinae	Sitophilini	<i>Sitophilus</i>	<i>S. granarius</i> (Kornkäfer), <i>S. zeamais</i> (Maiskäfer)
		Nemonychidae			<i>Lebanorhinus</i>	<i>L. succinus</i>
		Scolytidae			<i>Ips</i>	<i>I. acuminatus</i> , <i>I. amitinus</i> , <i>I. cembrae</i> , <i>I. duplicatus</i> , <i>I. mansfeldi</i> , <i>I. sexdentatus</i> , <i>I. typographus</i>

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Unterordnung	Überfamilie	Familie	Unterfamilie	Gattungs- gruppe	Gattung	Spezies
					<i>Orthotomicus</i>	<i>O. erosus</i>
					<i>Tomicus</i>	<i>T. minor</i>
Cucujiformia		Coccinellidae (Marienkäfer)			<i>Epilachna</i>	<i>E. borealis</i> , <i>E. varivestis</i> (Mexikanischer Bohnenkäfer)
		Cucujidae (Plattkäfer)			<i>Cryptolestes</i>	<i>C. ferrugineus</i>
					<i>Oryzaephilus</i>	<i>O. surinamensis</i> (Getreideplattkäfer)
		Lagriidae (Wollkäfer)			<i>Lagria</i>	<i>Lagria</i> sp.
		Meloidae (Ölkäfer)			<i>Epicauta</i>	<i>E. funebris</i>
					<i>Meloe</i>	<i>M. proscarabaeus</i>
		Rhipiphoridae			<i>Rhipiphorus</i>	<i>R. fasciatus</i>
		Tenebrionidae (Schwarzkäfer)			<i>Alphitobius</i>	<i>A. diaperinus</i> (Getreideschimmelkäfer)
					<i>Hegeter</i>	<i>H. amaroides</i> , <i>H. brevicollis</i> , <i>H. costipennis</i> , <i>H. fernandezi</i> , <i>H. glaber</i> , <i>H. gomerensis</i> , <i>H. gran-canariensis</i> , <i>H. impressus</i> , <i>H. intercedens</i> , <i>H. lateralis</i> , <i>H. plicifrons</i> , <i>H. politus</i> , <i>H. subrotundatus</i> , <i>H. tenuipunctatus</i> , <i>H. transversus</i> , <i>H. webbianus</i>

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Unterordnung	Überfamilie	Familie	Unterfamilie	Gattungsgruppe	Gattung	Spezies
					<i>Misolampus</i>	<i>M. goudoti</i>
					<i>Palorus</i>	<i>P. ficicola</i> , <i>P. ratzeburgi</i> (Klein- äugiger Getreidemehlkäfer), <i>P. subdepressus</i>
					<i>Pimelia</i>	<i>P. baetica</i> , <i>P. canariensis</i> , <i>P. criba</i> , <i>P. elevata</i> , <i>P. estevezi</i> , <i>P. fernandezlopezi</i> , <i>P. grandis</i> , <i>P. granulicollis</i> , <i>P. integra</i> , <i>P. interjecta</i> , <i>P. laevigata</i> , <i>P. lutaria</i> , <i>P. radula</i> , <i>P. sparsa</i> , <i>P. variolosa</i>
					<i>Tenebrio</i>	<i>T. molitor</i> (Mehlkäfer), <i>T. obscurus</i> (Amerikanischer Mehlkäfer)
					<i>Tentyria</i>	<i>T. schaumi</i>
					<i>Tribolium</i>	<i>T. brevicornis</i> , <i>T. castaneum</i> (Rotbrauner Reismehlkäfer), <i>T. confusum</i> (Amerikanischer Reismehlkäfer), <i>T. freemani</i> , <i>T. madens</i>
					<i>Zophobas</i>	<i>Z. atratus</i> , <i>Z. rugipes</i>

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Unterordnung	Überfamilie	Familie	Unterfamilie	Gattungs- gruppe	Gattung	Spezies
Elateriformia	Elateroidea				<i>Octinodes</i>	<i>Octinodes</i> sp.
Scarabaeiformia		Lucanidae (Schröter)			<i>Pyrophorus</i>	<i>P. plagiophthalmus</i>
					<i>Dorcus</i>	<i>D. parallelepipedus</i>
		Scarabaeidae (Blatthornkäfer)			<i>Lucanus</i>	<i>L. cervus</i> (Hirschkäfer)
					<i>Allomyrina</i>	<i>A. dichotoma</i>
			Cetoniinae (Rosenkäfer)		<i>Pachnoda</i>	<i>P. marginata</i>
			Dynastinae		<i>Xyloryctes</i>	<i>X. faunus</i>
			Geotrupinae (Mistkäfer)		<i>Geotrupes</i>	<i>G. stercorosus</i>
			Melolonthinae (Maikäfer)		<i>Costelytra</i>	<i>C. zealandica</i>
					<i>Holotrichia</i>	<i>H. diomphalia</i>
					<i>Melolontha</i>	<i>M. melolontha</i> (Maikäfer)
					<i>Odontria</i>	<i>O. striata</i> , <i>O. variegata</i>
					<i>Prodontria</i>	<i>P. bicolorata</i> , <i>P. capito</i> , <i>P. lewisi</i> , <i>P. tarsis</i> , <i>P. modesta</i> , <i>P. pinguis</i> , <i>P. praelatella</i> , <i>P. truncata</i> , <i>Prodontria</i> sp.
					<i>Scythodes</i>	<i>S. squalidus</i>
			Rutelinae (Gartenkäfer)		<i>Popillia</i>	<i>P. japonica</i> (Japankäfer)

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Unterordnung	Überfamilie	Familie	Unterfamilie	Gattungs- gruppe	Gattung	Spezies
			Scarabaeinae		<i>Copris</i>	<i>C. lunaris</i> (Mondhornkäfer)
					<i>Scarabaeus</i>	<i>Scarabaeus</i> sp. (Skarabäus)
Staphyliniformia		Hydrophilidae			<i>Cercyon</i>	<i>Cercyon</i> sp.
		Silphidae			<i>Nicrophorus</i>	<i>N. americanus</i> , <i>N. marginatus</i> , <i>N. orbicollis</i> , <i>N. tomentosus</i>
		Staphylinidae (Kurzflügler)			<i>Carpelimus</i>	<i>Carpelimus</i> sp.
					<i>Quedius</i>	<i>Q. mesomelinus</i>
					<i>Tachyporus</i>	<i>Tachyporus</i> sp.
					<i>Xantholinus</i>	<i>Xantholinus</i> sp.

4.3 Nomenklatur der B.-thuringiensis- δ -Endotoxine

[0133] Tabelle 2 enthält eine Liste der traditionellen und zur Zeit anerkannten Nomenklatur für die bekannten

δ -Endotoxine. Ebenfalls gezeigt sind die GenBank-Zugriffsnummern für die sequenzierten Polypeptide und Polynucleotide.

Tabelle 2

Nomenklatur der bekannten *B.-thuringiensis*- δ -Endotoxine^a

Neu	Alt	GenBank-Zugriffs-Nr.
Cry1Aa1	CryIA(a)	M11250
Cry1Aa2	CryIA(a)	M10917
Cry1Aa3	CryIA(a)	D00348
Cry1Aa4	CryIA(a)	X13535
Cry1Aa5	CryIA(a)	D175182
Cry1Aa6	CryIA(a)	U43605
Cry1Ab1	CryIA(b)	M13898
Cry1Ab2	CryIA(b)	M12661
Cry1Ab3	CryIA(b)	M15271
Cry1Ab4	CryIA(b)	D00117
Cry1Ab5	CryIA(b)	X04698
Cry1Ab6	CryIA(b)	M37263
Cry1Ab7	CryIA(b)	X13233
Cry1Ab8	CryIA(b)	M16463
Cry1Ab9	CryIA(b)	X54939
Cry1Ab10	CryIA(b)	A29125
Cry1Ac1	CryIA(c)	M11068
Cry1Ac2	CryIA(c)	M35524
Cry1Ac3	CryIA(c)	X54159
Cry1Ac4	CryIA(c)	M73249
Cry1Ac5	CryIA(c)	M73248
Cry1Ac6	CryIA(c)	U43606
Cry1Ac7	CryIA(c)	U87793
Cry1Ac8	CryIA(c)	U87397

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Neu	Alt	GenBank-Zugriffs-Nr.
Cry1Ac9	CryIA(c)	U89872
Cry1Ac10	CryIA(c)	AJ002514
Cry1Ad1	CryIA(d)	M73250
Cry1Ae1	CryIA(e)	M65252
Cry1Ba1	CryIB	X06711
Cry1Ba2		X95704
Cry1Bb1	ET5	L32020
Cry1Bc1	CryIb(c)	Z46442
Cry1Bd1	CryE1	U70726
Cry1Ca1	CryIC	X07518
Cry1Ca2	CryIC	X13620
Cry1Ca3	CryIC	M73251
Cry1Ca4	CryIC	A27642
Cry1Ca5	CryIC	X96682
Cry1Ca6	CryIC	X96683
Cry1Ca7	CryIC	X96684
Cry1Cb1	CryIC(b)	M97880
Cry1Da1	CryID	X54160
Cry1Db1	PrtB	Z22511
Cry1Ea1	CryIE	X53985
Cry1Ea2	CryIE	X56144
Cry1Ea3	CryIE	M73252
Cry1Ea4		U94323
Cry1Eb1	CryIE(b)	M73253
Cry1Fa1	CryIF	M63897
Cry1Fa2	CryIF	M63897
Cry1Fb1	PrtD	Z22512
Cry1Ga1	PrtA	Z22510
Cry1Ga2	CryIM	Y09326

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Neu	Alt	GenBank-Zugriffs-Nr.
Cry1Gb1	CryH2	U70725
Cry1Ha1	PrtC	Z22513
Cry1Hb1		U35780
Cry1Ia1	CryV	X62821
Cry1Ia2	CryV	M98544
Cry1Ia3	CryV	L36338
Cry1Ia4	CryV	L49391
Cry1Ia5	CryV	Y08920
Cry1Ib1	CryV	U07642
Cry1Ja1	ET4	L32019
Cry1Jb1	ET1	U31527
Cry1Ka1		U28801
Cry2Aa1	CryIIA	M31738
Cry2Aa2	CryIIA	M23723
Cry2Aa3		D86084
Cry2Ab1	CryIIB	M23724
Cry2Ab2	CryIIB	X55416
Cry2Ac1	CryIIC	X57252
Cry3Aa1	CryIIIA	M22472
Cry3Aa2	CryIIIA	J02978
Cry3Aa3	CryIIIA	Y00420
Cry3Aa4	CryIIIA	M30503
Cry3Aa5	CryIIIA	M37207
Cry3Aa6	CryIIIA	U10985
Cry3Ba1	CryIIIB	X17123
Cry3Ba2	CryIIIB	A07234
Cry3Bb1	CryIIIB2	M89794
Cry3Bb2	CryIIIC(b)	U31633
Cry3Ca1	CryIIID	X59797
Cry4Aa1	CryIVA	Y00423

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Neu	Alt	GenBank-Zugriffs-Nr.
Cry4Aa2	CryIVA	D00248
Cry4Ba1	CryIVB	X07423
Cry4Ba2	CryIVB	X07082
Cry4Ba3	CryIVB	M20242
Cry4Ba4	CryIVB	D00247
Cry5Aa1	CryVA(a)	L07025
Cry5Ab1	CryVA(b)	L07026
Cry5Ba1	PS86Q3	U19725
Cry6Aa1	CryVIA	L07022
Cry6Ba1	CryVIB	L07024
Cry7Aa1	CryIIIC	M64478
Cry7Ab1	CryIIICb	U04367
Cry8Aa1	CryIIIE	U04364
Cry8Ba1	CryIIIG	U04365
Cry8Ca1	CryIIIF	U04366
Cry9Aa1	CryIG	X58120
Cry9Aa2	CryIG	X58534
Cry9Ba1	CryIX	X75019
Cry9Ca1	CryIH	Z37527
Cry9Da1	N141	D85560
Cry10Aa1	CryIVC	M12662
Cry11Aa1	CryIVD	M31737
Cry11Aa2	CryIVD	M22860
Cry11Ba1	Jeg80	X86902
Cry12Aa1	CryVB	L07027
Cry13Aa1	CryVC	L07023
Cry14Aa1	CryVD	U13955
Cry15Aa1	34kD	M76442
Cry16Aa1	cbm71	X94146
Cry17Aa1	cbm71	X99478

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Neu	Alt	GenBank-Zugriffs-Nr.
Cry18Aa1	CryBP1	X99049
Cry19Aa1	Jeg65	Y08920
Cry20Aa1		U82518
Cry21Aa1		I32932
Cry22Aa1		I34547
Cyt1Aa1	CytA	X03182
Cyt1Aa2	CytA	X04338
Cyt1Aa3	CytA	Y00135
Cyt1Aa4	CytA	M35968
Cyt1Ab1	CytM	X98793
Cyt1Ba1		U37196
Cyt2Aa1	CytB	Z14147
Cyt2Ba1	"CytB"	U52043
Cyt2Ba2	"CytB"	AF020789
Cyt2Ba3	"CytB"	AF022884
Cyt2Ba4	"CytB"	AF022885
Cyt2Ba5	"CytB"	AF022886
Cyt2Bb1		U82519

^a nach: http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html

4.4 Sonden und Primer

[0134] In einem anderen Aspekt ermöglicht DNA-Sequenzinformation, die durch die Erfindung bereitgestellt wird, die Herstellung von relativ kurzen DNA-Sequenzen (oder RNA-Sequenzen) mit der Fähigkeit, spezifisch mit Gensequenzen der hier offenbarten ausgewählten Polynucleotide zu hybridisieren. In diesen Aspekten werden Nucleinsäuresonden geeigneter Länge auf der Basis einer Betrachtung einer ausgewählten Kristallprotein-codierenden Gensequenz hergestellt, zum Beispiel einer Sequenz, wie sie in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist. Aufgrund der Fähigkeit solcher DNAs und Nucleinsäuresonden, spezifisch mit einer Kristallprotein-codierenden Gensequenz zu hybridisieren, sind sie für eine Vielzahl von Ausführungsformen besonders gut geeignet. Was am wichtigsten ist, die Sonden können in einer Vielzahl von Assays verwendet werden, um die Anwesenheit von komplementären Sequenzen in einer gegebenen Probe nachzuweisen.

[0135] In bestimmten Ausführungsformen ist es vorteilhaft, Oligonucleotidprimer zu verwenden. Die Sequenz solcher Primer wird unter Verwendung eines Polynucleotids der vorliegenden Erfindung zur Verwendung beim Nachweisen, Amplifizieren oder Mutieren eines definierten Segments eines Kristallprotein-Gens von *B. thuringiensis* mit Hilfe von PCRTM-Technik entworfen. Segmente von verwandten Kristallprotein-Genen von anderen Spezies können ebenfalls durch PCRTM unter Verwendung solcher Primer amplifiziert werden.

[0136] Um bestimmte Vorteile gemäß der vorliegenden Erfindung zu erhalten, umfasst eine bevorzugte Nucleinsäuresequenz, die für Hybridisierungsstudien oder -assays eingesetzt wird, Sequenzen, die komplementär zu wenigstens einem 23 bis 40 Basen langen Nucleotidstück einer Kristallprotein-codierenden Sequenz sind, wie die in SEQ ID Nr. 1 gezeigte. Eine Größe von wenigstens etwa 14 oder 15 Nucleotiden Länge hilft zu gewährleisten, dass das Fragment eine ausreichende Länge hat, um ein Duplexmolekül zu bilden, das sowohl stabil als auch selektiv ist. Moleküle mit komplementären Sequenzen über Längen von mehr als 23 Basen werden jedoch im Allgemeinen bevorzugt, um die Stabilität und Selektivität des Hybrids zu erhöhen und dadurch die Qualität und den Grad der erhaltenen spezifischen Hybridmoleküle zu verbessern. Im Allgemeinen werden vorzugsweise Nucleinsäuremoleküle mit Gen-Komplementaritätswerten von 14 bis 20 Nucleotiden oder gegebenenfalls noch länger entworfen. Solche Fragmente können leicht hergestellt werden, indem man das Fragment zum Beispiel direkt mit chemischen Mitteln synthetisiert, wobei man Nucleinsäure-Reproduktionstechnik anwendet, wie die PCRTM-Technik der US-Patente 4,683,195 und 4,683,202, oder indem man ausgewählte DNA-Fragmente aus rekombinanten Plasmiden schneidet, die geeignete Inserts und geeignete Restriktionsstellen enthalten.

4.5 Expressionsvektoren

[0137] Die vorliegende Erfindung zieht ein Polynucleotid der vorliegenden Erfindung in Betracht, das in einem oder mehreren Expressionsvektoren enthalten ist. In einer Ausführungsform umfasst ein Expressionsvektor also ein Nucleinsäuresegment, das ein cryET70-Gen enthält, welches funktionell mit einem Promotor verknüpft ist, der das Gen exprimiert. Zusätzlich kann der codierende Bereich auch funktionell mit einem Transcriptionsterminationsbereich verknüpft sein, wodurch der Promotor die Transcription des codierenden Bereichs antreibt und der Transcriptionsterminationsbereich die Transcription an einer Stelle 3' vom codierenden Bereich unterbricht.

[0138] Der hier verwendete Ausdruck "funktionell verknüpft" bedeutet, dass ein Promotor so mit einem codierenden Bereich verknüpft ist, dass die Transcription dieses codierenden Bereichs von diesem Promotor gesteuert und reguliert wird. Mittel, um einen Promotor funktionell mit einem codierenden Bereich zu verknüpfen, sind in der Technik wohlbekannt.

[0139] In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die rekombinante Expression von DNAs, die die Kristallproteine der vorliegenden Erfindung codieren, vorzugsweise in einer Bacillus-Wirtszelle. Zu den bevorzugten Wirtszellen gehören *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* und verwandte *Bacillus*-Spezies, wobei *B. thuringiensis*-Wirtszellen in hohem Maße bevorzugt sind. Promotoren, die in Bakterien funktionieren, sind in der Technik wohlbekannt. Beispielhafte und bevorzugte Promotoren für die von *Bacillus* abgeleiteten Kristallproteine sind alle bekannten Kristallprotein-Gen-Promotoren einschließlich des cryET70-Gen-Promotors selbst. Alternativ dazu können auch mutagenisierte oder rekombinante Promotoren von Menschenhand gestaltet und zur Förderung der Expression der hier offenbarten neuen Gensegmente verwendet werden.

[0140] In einer alternativen Ausführungsform wird die rekombinante Expression von DNAs, die die Kristallproteine der vorliegenden Erfindung codieren, unter Verwendung eines transformierten Gram-negativen Bakteriums, wie einer *E. coli*- oder *Pseudomonas*-spp.-Wirtszelle, durchgeführt. Promotoren, die für die Expression von Ziel-Polypeptiden in *E. coli* und anderen Gram-negativen Wirtszellen auf hohem Niveau geeignet sind, sind in der Technik ebenfalls wohlbekannt.

[0141] Wenn ein Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung verwendet werden soll, um eine Pflanze zu transformieren, wird ein Promotor ausgewählt, der die Fähigkeit hat, die Expression in Pflanzen anzutreiben. Promotoren, die in Pflanzen funktionieren, sind in der Technik ebenfalls wohlbekannt. Für die Expression des Polypeptids in Pflanzen geeignet sind Promotoren, die induzierbar, konstitutiv, zeitlich reguliert, räumlich reguliert und raumzeitlich reguliert sind, einschließlich solcher, die nativ, halbsynthetisch und synthetisch sind (Chau et al., 1989).

[0142] Ein Promotor wird auch aufgrund seiner Fähigkeit ausgewählt, die Transcriptionsaktivität der transformierten Pflanzenzelle oder der transgenen Pflanze auf den codierenden Bereich zu lenken. Struktur-Gene können durch eine Vielzahl von Promotoren in Pflanzengewebe angetrieben werden. Promotoren können fast konstitutiv sein, wie der CaMV-35S-Promotor, oder es können gewebespezifische oder entwicklungspezifische Promotoren sein, die Zweikeimblättrige oder Einkeimblättrige beeinflussen.

[0143] Wenn der Promotor ein fast konstitutiver Promotor ist, wie CaMV 35S, findet man bei einer Vielzahl von transformierten Pflanzengewebe (z.B. Kallus, Blatt, Samen und Wurzel) Erhöhungen der Polypeptidexpression. Alternativ dazu können die Wirkungen der Transformation auf spezifische Pflanzengewebe gerichtet werden, indem man Vektoren verwendet, die sich in das Pflanzengenom integrieren und einen gewebespezifischen Promotor enthalten.

[0144] Ein beispielhafter gewebespezifischer Promotor ist der Lectin-Promotor, der spezifisch für Samengebe ist. Das Lectin-Protein in Sojabohnensamen wird von einem einzigen Gen (Le1) codiert, das nur während der Samenreife exprimiert wird und 2 bis 5% der Gesamt-mRNA des Samens ausmacht. Das Lectin-Gen und der samenspezifische Promotor sind vollständig charakterisiert worden und werden verwendet, um in transgenen Tabakpflanzen eine samenspezifische Expression zu dirigieren (Vodkin et al., 1983; Lindstrom et al., 1990).

[0145] Ein Expressionsvektor, der einen codierenden Bereich enthält, der ein interessierendes Polypeptid codiert, wird so gestaltet, dass er unter der Kontrolle des Lectin-Promotors ist, und dieser Vektor wird in Pflanzen eingeführt, wobei man zum Beispiel ein Protoplasten-Transformationsverfahren verwendet (Dhir et al., 1991a).

Die Expression des Polypeptids ist spezifisch auf die Samen der transgenen Pflanze gerichtet.

[0146] Eine transgene Pflanze der vorliegenden Erfindung, die aus einer Pflanzenzelle erzeugt wird, die mit einem gewebespezifischen Promotor transformiert ist, kann mit einer zweiten transgenen Pflanze gekreuzt werden, die sich aus einer Pflanzenzelle entwickelt hat, die mit einem anderen gewebespezifischen Promotor transformiert ist, wobei eine transgene Hybridpflanze entsteht, die die Wirkungen der Transformation in mehr als einem spezifischen Gewebe zeigt.

[0147] Beispielhafte gewebespezifische Promotoren sind die Promotoren von Mais-Sucrose-Synthase 1 (Yang et al., 1990), Mais-Alkohol-Dehydrogenase 1 (Vogel et al., 1989), Mais-Lichtsammelkomplex (Simpson, 1986), Mais-Hitzeschockprotein (Odell et al., 1985), der kleinen Untereinheit der RuBP-Carboxylase (Rubisco) der Erbse (Poulsen et al., 1986; Cashmore et al., 1983), der Mannopin-Synthase des Ti-Plasmids (Langridge et al., 1989), der Nopalalin-Synthase des Ti-Plasmids (Langridge et al., 1989), der Petunien-Chalcon-Isomerase (van Tunen et al., 1988), des glycinreichen Proteins 1 der Bohne (Keller et al., 1989), des CaMV-35S-Transcripts (Odell et al., 1985) und von Kartoffel-Patatin (Wenzler et al., 1989). Bevorzugte Promotoren sind der Blumenkohlmosaikvirus(CaMV)-35S-Promotor und der Promotor der kleinen S-E9-Untereinheit der RuBP-Carboxylase.

[0148] Die Wahl des Expressionsvektors und letztlich des Promotors, mit dem ein Polypeptid-codierender Bereich funktionell verknüpft wird, hängt direkt von den gewünschten funktionellen Eigenschaften ab, z.B. dem Ort und der Zeit der Proteinexpression und der zu transformierenden Wirtszelle. Dies sind wohlbekannte Einschränkungen, die dem Gebiet der Konstruktion rekombinanter DNA-Moleküle inhärent sind. Ein Vektor, der für die praktische Durchführung der vorliegenden Erfindung geeignet ist, ist jedoch in der Lage, die Expression des Polypeptid-codierenden Bereichs, mit dem er funktionell verknüpft ist, zu dirigieren.

[0149] Typische Vektoren, die für die Expression von Genen in höheren Pflanzen geeignet sind, sind in der Technik wohlbekannt; dazu gehören die beschriebenen Vektoren, die vom tumorinduzierenden (Ti) Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* abgeleitet sind (Rogers et al., 1987). Es ist jedoch von mehreren anderen sich in Pflanzen integrierenden Vektorsystemen bekannt, dass sie in Pflanzen funktionieren, einschließlich des beschriebenen pCaMV CN-Transfer-Kontrollvektors (Fromm et al., 1985). pCaMV CN (erhältlich von Pharmacia, Piscataway, NJ) enthält den Blumenkohlmosaikvirus-CaMV-35S-Promotor.

[0150] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst der zum Expressieren des Polypeptids verwendete Vektor einen Selektionsmarker, der in einer Pflanzenzelle wirksam ist, vorzugsweise ein Wirkstoffresistenz-Selektionsmarker. Ein bevorzugter Wirkstoffresistenzmarker ist das Gen, dessen Expression zu Kanamycin-Resistenz führt, d.h., das beschriebene chimäre Gen, das den Nopalalin-Synthase-Promotor, Tn5-Neomycin-Phosphotransferase II (nptII) und den 3'-nichttranslatierten Bereich der Nopalalin-Synthase enthält (Rogers et al., 1988).

[0151] RNA-Polymerase transkribiert eine codierende DNA-Sequenz über eine Stelle hinweg, wo Polyadenylierung erfolgt. Typischerweise dienen DNA-Sequenzen, die sich wenige hundert Basenpaare stromabwärts der Polyadenylierungsstelle befinden, zum Abbruch der Transcription. Diese DNA-Sequenzen werden hier als Transcriptionsterminationsbereiche bezeichnet. Diese Bereiche sind für eine effiziente Polyadenylierung von transkribierter Messenger-RNA (mRNA) erforderlich.

[0152] Mittel zur Herstellung von Expressionsvektoren sind in der Technik wohlbekannt. Expressionsvektoren (Transformationsvektoren), die zum Transformieren von Pflanzen verwendet werden, und Verfahren zur Herstellung solcher Vektoren sind in den US-Patenten Nr. 4,971,908, 4,940,835, 4,769,061 und 4,757,011 beschrieben. Diese Vektoren können so modifiziert werden, dass sie eine codierende Sequenz gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten.

[0153] Eine Vielzahl von Verfahren wurde entwickelt, um ein DNA-Segment über komplementäre klebrige Enden oder glatte Enden funktionell in einen Vektor einzufügen. Zum Beispiel können komplementäre Homopolymer-Ketten zu dem DNA-Segment, das eingesetzt werden soll, und zur Vektor-DNA hinzugefügt werden. Dann werden der Vektor und das DNA-Segment durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen den komplementären homopolymeren Schwänzen miteinander verknüpft, wobei rekombinante DNA-Moleküle entstehen.

[0154] Ein codierender Bereich, der ein Polypeptid codiert, das die Fähigkeit hat, einer Zelle insektizide Aktivität zu verleihen, ist vorzugsweise ein Gen, das das B.-thuringiensis-Kristallprotein CryET70 codiert. In bevorzugten Ausführungsformen hat ein solches Polypeptid die Aminosäurerestsequenz von SEQ ID Nr. 2 oder ei-

nes funktionellen Äquivalents davon. Gemäß solchen Ausführungsformen wird auch ein codierender Bereich bevorzugt, der die DNA-Sequenz von SEQ ID Nr. 1 umfasst.

4.6 Merkmale des aus EG4140 isolierten CryET70-Polypeptids

[0155] Die vorliegende Erfindung stellt ein neues Polypeptid bereit, das das ganze oder einen Teil eines B.-thuringiensis-CryET70-Kristallproteins definiert.

[0156] In einer bevorzugten Ausführungsform offenbart und beansprucht die Erfindung ein isoliertes und gereinigtes CryET70-Polypeptid. Das aus EG4140 isolierte CryET70-Polypeptid umfasst eine Sequenz von 721 Aminosäuren und hat eine berechnete Molmasse von ungefähr 87 000 Da. Die Aminosäurezusammensetzung des CryET70-Polypeptids ist in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3

Aminosäurezusammensetzung von CryET70

Aminosäure	Zahl der Reste	% insgesamt	Aminosäure	Zahl der Reste	% insgesamt
Ala			Leu		
Arg			Lys		
Asn			Met		
Asp			Phe		
Cys			Pro		
Gln			Ser		
Glu			Thr		
Gly			Tro		
His			Tyr		
Ile			Val		
Sauer	(Asp + Glu)				
Basisch	(Arg + Lys)				
Aromatisch	(Phe + Trp + Tyr)				
Hydrophob	(Aromatisch + Ile + Leu + Met + Val)				

4.7 Nomenklatur der neuen Proteine

[0157] Die Erfinder haben dem neuen Protein der Erfindung willkürlich die Bezeichnung CryET70 zugeordnet. Ebenso wurde der neuen Nucleinsäuresequenz, die dieses Polypeptid codiert, die willkürliche Bezeichnung cryET70 zugeordnet. Die formale Zuordnung von Gen- und Proteinbezeichnungen auf der Basis der überarbeiteten Nomenklatur der Kristallprotein-Endotoxine wird von einem Komitee für die Nomenklatur von B. thuringiensis erfolgen, das gebildet wurde, um B.-thuringiensis-Kristallproteine systematisch zu klassifizieren. Die Erfinder gehen davon aus, dass die willkürlich zugeordneten Bezeichnungen der vorliegenden Erfindung durch die offizielle Nomenklatur, die diesen Sequenzen zugeordnet wird, ersetzt wird.

4.8 Transformierte Wirtszellen und transgene Pflanzen

[0158] Verfahren und Zusammensetzungen zum Transformieren eines Bakteriums, einer Hefezelle, einer Pflanzenzelle oder einer gesamten Pflanze mit einem oder mehreren Expressionsvektoren, die ein Kristallprotein-codierendes Gensegment umfassen, sind weitere Aspekte dieser Offenbarung. Ein transgenes Bakterium,

eine transgene Hefezelle, Pflanzenzelle oder Pflanze, die aus einem solchen Transformationsvorgang hervorgehen, oder die Nachkommenschaft oder Samen von einer solchen transgenen Pflanze sind ebenfalls weitere Ausführungsformen der Erfindung.

[0159] Mittel zum Transformieren von Bakterien und Hefezellen sind in der Technik wohlbekannt. Typischerweise ähneln die Mittel zum Transformieren den wohlbekanntesten Mitteln, die verwendet werden, um andere Bakterien oder Hefen, wie *E. coli* oder *Saccharomyces cerevisiae*, zu transformieren. Zu den Verfahren für die DNA-Transformation von Pflanzenzellen gehören die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation, Protoplastentransformation, Genübertragung in Pollen, Injektion in Reproduktionsorgane, Injektion in unreife Embryos und Teilchenbombardierung. Jedes dieser Verfahren hat seine eigenen Vorteile und Nachteile. Ein bestimmtes Verfahren zum Einführen von Genen in einen bestimmten Pflanzenstamm ist also vielleicht nicht notwendigerweise für einen anderen Pflanzenstamm am effektivsten, aber es ist wohlbekannt, welche Verfahren für einen bestimmten Pflanzenstamm geeignet sind.

[0160] Es gibt viele Verfahren zur Einführung von transformierenden DNA-Segmenten in Zellen, aber nicht alle sind geeignet, um DNA an Pflanzenzellen abzugeben. Zu den geeigneten Verfahren gehört vermutlich praktisch jedes Verfahren, mit dem DNA in eine Zelle eingeführt werden kann, wie durch Agrobacterium-Infektion, direkte Abgabe von DNA, wie zum Beispiel durch PEG-vermittelte Transformation von Protoplasten (Omirulleh et al., 1993), durch Dehydrierung/Hemmung vermittelte DNA-Aufnahme, durch Elektroporation, durch Rühren mit Siliciumcarbidfasern, durch Beschleunigung von DNA-beschichteten Teilchen. In bestimmten Ausführungsformen werden Beschleunigungsverfahren bevorzugt und umfassen zum Beispiel die Mikroprojektil-Bombardierung.

[0161] Die Technologie zur Einführung von DNA in Zellen ist dem Fachmann wohlbekannt. Vier allgemeine Verfahren zur Abgabe eines Gens in Zellen wurden beschrieben:

- (1) chemische Verfahren (Graham und van der Eb, 1973; Zatloukal et al., 1992);
- (2) physikalische Verfahren, wie Mikroinjektion (Capecchi, 1980), Elektroporation (Wong und Neumann, 1982; Fromm et al., 1985; US-Patent Nr. 5,384,253) und die Genkanone (Johnston und Tang, 1994; Fynan et al., 1993);
- (3) virale Vektoren (Clapp, 1993; Lu et al., 1993; Eglitis und Anderson, 1988; Eglitis et al., 1988);
- und (4) Rezeptor-vermittelte Mechanismen (Curiel et al., 1991; 1992; Wagner et al., 1992).

4.8.1 Elektroporation

[0162] Die Anwendung von kurzen elektrischen Hochspannungsimpulsen auf eine Vielzahl von Tier- und Pflanzenzellen führt zur Bildung von nanometergroßen Poren in der Plasmamembran. DNA wird direkt in das Cytoplasma aufgenommen, entweder durch diese Poren oder als Folge der Umverteilung von Membrankomponenten, die mit dem Schließen der Poren einhergeht. Elektroporation kann äußerst effizient sein und kann sowohl für die transiente Expression von klonierten Genen als auch zur Etablierung von Zelllinien, die integrierte Kopien des interessierenden Gens tragen, verwendet werden. Elektroporation führt im Gegensatz zur Calciumphosphat-vermittelten Transfektion und Protoplastenfusion häufig zu Zelllinien, die eine oder höchstens ein paar integrierte Kopien der Fremd-DNA tragen.

[0163] Die Einführung von DNA mittels Elektroporation ist dem Fachmann wohlbekannt. Bei diesem Verfahren werden bestimmte zellwandzersetzennde Enzyme, wie pektinabbauende Enzyme, eingesetzt, um die gewünschten Empfängerzellen anfälliger für eine Transformation durch Elektroporation zu machen als unbehandelte Zellen. Alternativ dazu werden die Empfängerzellen durch eine mechanische Verwundung anfälliger für eine Transformation gemacht. Um eine Transformation durch Elektroporation zu bewirken, kann man entweder zerreibbare Gewebe, wie eine Suspensionskultur von Zellen oder embryogenen Kallus, einsetzen, oder alternativ dazu kann man unreife Embryos oder andere organisierte Gewebe direkt transformieren. Man würde die Zellwände der gewählten Zellen partiell abbauen, indem man sie pektinabbauenden Enzymen (Pektolyasen) aussetzt oder in kontrollierter Weise mechanisch verwundet. Solche Zellen würden dann empfänglich für eine DNA-Übertragung durch Elektroporation, die in diesem Stadium durchgeführt werden kann, und dann könnten transformierte Zellen je nach der Natur der neu eingebauten DNA durch eine geeignete Selektions- oder Screening-Anweisung identifiziert werden.

4.8.2 Mikroprojektil-Bombardierung

[0164] Ein weiteres vorteilhaftes Verfahren zur Abgabe von transformierenden DNA-Segmenten an Pflanzenzellen ist die Mikroprojektil-Bombardierung. Bei diesem Verfahren können Teilchen mit Nucleinsäuren beschichtet und durch eine vorwärtstreibende Kraft an Zellen abgegeben werden. Beispielhafte Teilchen sind sol-

che, die aus Wolfram, Gold und Platin bestehen.

[0165] Ein Vorteil der Mikroprojektil-Bombardierung außer der Tatsache, dass sie ein wirksames Mittel ist, um Einkeimblättrige reproduzierbar und stabil zu transformieren, besteht darin, dass weder die Isolierung von Protoplasten (Cristou et al., 1988) noch die Anfälligkeit für eine Agrobacterium-Infektion erforderlich sind. Eine beispielhafte Ausführungsform eines Verfahrens zur Abgabe von DNA an Maiszellen durch Beschleunigung ist ein Biolistics Particle Delivery System, das verwendet werden kann, um mit DNA beschichtete Teilchen oder Zellen durch ein Sieb, wie ein Edelstahl- oder Nytex-Sieb, auf eine Filteroberfläche zu treiben, die mit in Suspension kultivierten Maiszellen bedeckt ist. Das Sieb dispergiert die Teilchen, so dass sie nicht in großen Aggregaten an die Empfängerzellen abgegeben werden. Vermutlich reduziert ein Sieb zwischen der Projektilapparatur und den zu bombardierenden Zellen die Größe der Projektilaggregate und kann zu einer größeren Transformationshäufigkeit beitragen, indem es Schäden reduziert, die bei den Empfängerzellen durch zu große Projektile entstehen.

[0166] Für die Bombardierung werden Zellen in Suspension vorzugsweise auf Filtern oder festem Kulturmedium konzentriert. Alternativ dazu können auch unreife Embryos oder andere Zielzellen auf festem Kulturmedium angeordnet sein. Die zu bombardierenden Zellen befinden sich in einem geeigneten Abstand unterhalb der Makroprojektil-Abfangplatte. Falls gewünscht, befinden sich auch ein oder mehrere Siebe zwischen der Beschleunigungsvorrichtung und den zu bombardierenden Zellen. Durch die Verwendung der hier dargelegten Techniken kann man bis zu 1000 oder mehr Herde von Zellen erhalten, die ein Marker-Gen transient exprimieren. Die Zahl der Zellen in einem Herd, die das exogene Genprodukt exprimieren, liegt 48 h nach der Bombardierung häufig in einem Bereich von 1 bis 10 und im Durchschnitt 1 bis 3.

[0167] Bei der Transformation durch Bombardierung kann man die Kulturbedingungen vor der Bombardierung und die Bombardierungsparameter so optimieren, dass man die maximale Anzahl an stabilen Transformanten erhält. Sowohl die physikalischen als auch die biologischen Parameter für die Bombardierung sind bei dieser Technik wichtig. Physikalische Faktoren sind solche, die die Manipulation des DNA/Mikroprojektil-Niederschlags beinhalten, oder solche, die den Flug und die Geschwindigkeit entweder der Makro- oder der Mikroprojekte beeinflussen. Zu den biologischen Faktoren gehören alle Schritte, die an der Manipulation von Zellen vor und unmittelbar nach der Bombardierung beteiligt sind, die osmotische Einstellung von Zielzellen, um die Linderung des mit der Bombardierung einhergehenden Traumas zu unterstützen, und auch die Natur der transformierenden DNA, wie linearisierte DNA oder intakte superspiralisierte Plasmide. Vermutlich sind die vor der Bombardierung erfolgenden Manipulationen für eine erfolgreiche Transformation von unreifen Embryos besonders wichtig.

[0168] Dementsprechend wird in Betracht gezogen, dass man vielleicht verschiedene der Bombardierungsparameter in Studien im kleinen Maßstab anpassen möchte, um die Bedingungen vollständig zu optimieren. Man möchte vielleicht insbesondere physikalische Parameter, wie Lückenabstand, Flugabstand, Gewebeabstand und Heliumdruck, einstellen. Man kann auch die Traumareduktionsfaktoren (TRF) durch modifizierende Bedingungen minimieren, die den physiologischen Zustand der Empfängerzellen beeinflussen und die daher auch die Transformations- und Integrationseffizienz beeinflussen können. Zum Beispiel können für eine optimale Transformation der osmotische Zustand, die Gewebehydratisierung und das Subkulturstadium oder der Zellzyklus der Empfängerzellen eingestellt werden. Die Ausführung von anderen Routineeinstellungen wird dem Fachmann im Lichte der vorliegenden Offenbarung bekannt sein.

4.8.3 Agrobacterium-vermittelte Übertragung

[0169] Die Agrobacterium-vermittelte Übertragung ist ein breit anwendbares System für die Einführung von Genen in Pflanzenzellen, da die DNA in ganze Pflanzengewebe eingeführt werden kann, wodurch man die Notwendigkeit der Regeneration einer intakten Pflanze aus einem Protoplasten umgeht. Die Verwendung von Agrobacterium-vermittelten Pflanzenintegrationsvektoren für die Einführung von DNA in Pflanzenzellen ist in der Technik wohlbekannt. Siehe zum Beispiel die beschriebenen Verfahren (Fraley et al., 1985; Rogers et al., 1987). Weiterhin ist die Integration der Ti-DNA ein relativ genaues Verfahren, das nur zu wenigen Umordnungen führt. Der zu übertragende DNA-Bereich wird durch die Bordersequenzen definiert, und dazwischenliegende DNA wird üblicherweise in das Pflanzengenom eingefügt, wie es beschrieben ist (Spielmann et al., 1986).

[0170] Moderne Agrobacterium-Transformationsvektoren sind zur Replikation in *E. coli* sowie Agrobacterium befähigt, was bequeme Manipulationen ermöglicht, wie es beschrieben ist (Klee et al., 1985). Außerdem haben jüngere technologische Fortschritte in Vektoren für die Agrobacterium-vermittelte Gen-Übertragung die Anordnung von Genen und Restriktionsstellen in den Vektoren verbessert, so dass die Konstruktion von Vektoren,

die zum Expressieren verschiedener Polypeptidcodierender Gene befähigt sind, erleichtert wird. Die beschriebenen Vektoren (Rogers et al., 1987) haben zweckmäßige Multilinkerbereiche, die von einem Promotor und einer Polyadenylierungsstelle flankiert werden, für die direkte Expression von eingefügten Polypeptid-codierenden Genen und sind für die vorliegenden Zwecke geeignet. Außerdem kann sowohl Agrobacterium, das funktionelle (armed; zur Bewirkung einer Gallenbildung befähigte) Ti-Gene enthält, als auch eines, das unschädlich gemachte (disarmed; zur Bewirkung einer Gallenbildung nicht befähigte) Ti-Gene enthält, für die Transformationen verwendet werden. In solchen Pflanzenstämmen, bei denen die Agrobacterium-vermittelte Transformation effizient ist, ist sie wegen der leichten und definierten Genübertragung das Verfahren der Wahl.

[0171] Die Agrobacterium-vermittelte Transformation von Blattscheiben und anderen Geweben, wie Keimblättern und Hypokotylen, scheint auf Pflanzen beschränkt zu sein, die natürlicherweise von Agrobacterium infiziert werden. Die Agrobacteriumvermittelte Transformation ist bei Zweikeimblättrigen Pflanzen am effizientesten. Nur wenige Einkeimblättrige scheinen natürliche Wirte für Agrobacterium zu sein, doch wurden bei Asparagus mit Hilfe von Agrobacterium-Vektoren transgene Pflanzen erzeugt. Daher müssen kommerziell wichtige Getreide, wie Reis, Mais und Weizen, gewöhnlich mit alternativen Verfahren transformiert werden. Wie oben erwähnt, kann jedoch auch die Transformation von Asparagus mit Hilfe von Agrobacterium erreicht werden (siehe zum Beispiel Bytebier et al., 1987).

[0172] Eine transgene Pflanze, die mit Hilfe von Agrobacterium-Transformationsverfahren gebildet wurde, enthält typischerweise ein einzelnes Gen auf einem einzigen Chromosom. Solche transgenen Pflanzen können als heterozygot in Bezug auf das hinzugefügte Gen bezeichnet werden. Da die Verwendung des Wortes "heterozygot" jedoch gewöhnlich die Anwesenheit eines komplementären Gens auf demselben Locus des zweiten Chromosoms eines Chromosomenpaars impliziert und es kein solches Gen in einer Pflanze gibt, die wie hier nur ein einziges hinzugefügtes Gen enthält, ist ein vermutlich treffenderer Name für eine solche Pflanze eine "unabhängige segregierende", da das hinzugefügte, exogene Gen während der Mitose und Meiose unabhängig segregiert.

[0173] Besonders bevorzugt ist eine transgene Pflanze, die homozygot in Bezug auf das hinzugefügte Struktur-Gen ist, d.h., eine transgene Pflanze, die zwei hinzugefügte Gene enthält, jeweils ein Gen auf demselben Locus auf jedem Chromosom eines Chromosomenpaars. Eine homozygote transgene Pflanze kann erhalten werden, indem man eine unabhängig segregierende transgene Pflanze, die ein einzelnes hinzugefügtes Gen enthält, geschlechtlich mit sich selbst paart (Selbstbestäubung), einige der erzeugten Samen keimen lässt und die resultierenden Pflanzen auf eine verstärkte Carboxylase-Aktivität relativ zu einer Kontrolle (nativ, nicht-transgen) oder einer unabhängig segregierenden transgenen Pflanze hin analysiert.

[0174] Man sollte sich darüber im Klaren sein, dass auch zwei verschiedene transgene Pflanzen miteinander gepaart werden können, wobei Nachkommen entstehen, die zwei unabhängig segregierende hinzugefügte exogene Gene enthalten. Durch Selbstbestäubung von geeigneten Nachkommen können Pflanzen entstehen, die in Bezug auf beide hinzugefügten exogenen Gene, die ein interessierendes Polypeptid codieren, homozygot sind. Die Rückkreuzung mit einer Elternpflanze und die Kreuzung mit einer nicht verwandten, nichttransgenen Pflanze werden ebenfalls in Betracht gezogen.

4.8.4 Andere Transformationsverfahren

[0175] Die Transformation von Pflanzenprotoplasten kann unter Verwendung von Verfahren erreicht werden, die auf Calciumphosphat-Fällung, Polyethylenglycol-Behandlung, Elektroporation und Kombinationen dieser Behandlungen beruhen (siehe z.B. Potrykus et al., 1985; Lorz et al., 1985; Fromm et al., 1986; Uchimiya et al., 1986; Callis et al., 1987; Marcotte et al., 1988).

[0176] Die Anwendung dieser Systeme auf verschiedene Pflanzenstämmen hängt von der Möglichkeit ab, diesen besonderen Pflanzenstamm aus Protoplasten zu regenerieren. Beispielhafte Verfahren zur Regeneration von Getreiden aus Protoplasten sind beschrieben (Fujimura et al., 1985; Toriyama et al., 1986; Yamada et al., 1986; Abdullah et al., 1986).

[0177] Um Pflanzenstämmen zu transformieren, die aus Protoplasten nicht erfolgreich regeneriert werden können, können andere Methoden zur Einführung von DNA in intakte Zellen oder Gewebe verwendet werden. Zum Beispiel kann die Regeneration von Getreiden aus unreifen Embryos oder Explantaten bewirkt werden, wie es beschrieben ist (Vasil, 1988). Außerdem kann auch "Teilchenkanonen-" oder Hochgeschwindigkeits-Mikroprojektiltechnik verwendet werden (Vasil, 1992).

[0178] Bei Verwendung der letzteren Technik wird DNA auf der Oberfläche von kleinen Metallteilchen durch die Zellwand und in das Cytoplasma getragen, wie es beschrieben ist (Klein et al., 1987; Klein et al., 1988; McCabe et al., 1988). Die Metallteilchen dringen durch mehrere Schichten von Zellen und ermöglichen so die Transformation von Zellen innerhalb von Gewebeexplantaten.

4.8.5 Genexpression in Pflanzen

[0179] Obwohl in den letzten Jahren bezüglich der Herstellung von transgenen Pflanzen, die bakterielle Proteine, wie B.-thuringiensis-Kristallproteine, exprimieren, große Fortschritte erzielt wurden, sind die Ergebnisse der Expression von nativen bakteriellen Genen in Pflanzen oft enttäuschend. Im Unterschied zur Mikrobengenetik war bei den frühen Pflanzengenetikern nur wenig über die Faktoren bekannt, die eine heterologe Expression von Fremd-Genen in Pflanzen beeinflussen. In den letzten Jahren wurden jedoch mehrere potentielle Faktoren identifiziert, die in unterschiedlichem Ausmaß für das Niveau der Proteinexpression ausgehend von einer bestimmten codierenden Sequenz verantwortlich sind. Zum Beispiel wissen die Wissenschaftler jetzt, dass die Aufrechterhaltung einer erheblichen Konzentration eines besonderen mRNA in der Zelle in der Tat ein entscheidender Faktor ist. Unglücklicherweise gibt es viele Ursachen für niedrige Konzentrationen an mRNA, die Fremdproteine codiert, im stationären Zustand. Erstens kann es sein, dass die RNA-Synthese in voller Länge nicht mit großer Häufigkeit stattfindet. Dies könnte zum Beispiel durch den vorzeitigen Abbruch der RNA während der Transcription oder aufgrund einer unerwarteten mRNA-Prozessierung während der Transcription verursacht sein. Zweitens kann es sein, dass die RNA in voller Länge in der Pflanzenzelle produziert wird, dann aber im Zellkern in einer Weise prozessiert wird (Spleißen, PolyA-Addition), bei der eine nichtfunktionelle mRNA entsteht. Wenn die RNA nicht richtig synthetisiert, abgebrochen und polyadenyliert wird, kann sie sich nicht zur Translation ins Cytoplasma bewegen. Ebenso, wenn mRNAs im Cytoplasma reduzierte Halbwertszeiten haben (die durch ihre Primär- oder Sekundärstruktur bestimmt werden), wird ungenügend Proteinprodukt erzeugt. Außerdem gibt es einen Effekt mit ungewissem Ausmaß der Translationseffizienz auf die Halbwertszeit der mRNA. Außerdem faltet sich jedes RNA-Molekül zu einer bestimmten Struktur oder vielleicht zu einer Familie von Strukturen, was von seiner Sequenz bestimmt wird. Die besondere Struktur einer jeden RNA könnte zu einer größeren oder geringeren Stabilität im Cytoplasma führen. Die Struktur an sich ist wahrscheinlich ebenfalls eine Determinante der mRNA-Prozessierung im Zellkern. Leider ist die Struktur irgendeiner RNA (außer tRNA) *in vitro* oder *in vivo* unmöglich vorherzusagen und fast unmöglich zu bestimmen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass eine drastische Änderung der Sequenz einer RNA eine große Wirkung auf ihre Faltungsstruktur hat. Es ist wahrscheinlich, dass die Struktur an sich oder bestimmte strukturelle Merkmale ebenfalls eine Rolle bei der Bestimmung der RNA-Stabilität spielen.

[0180] Um diese Einschränkungen bei der Expression von Fremd-Genen zu überwinden, haben Forscher in RNAs besondere Sequenzen und Signale identifiziert, die das Potential haben, eine spezifische Wirkung auf die RNA-Stabilität auszuüben. In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung gibt es daher ein Bedürfnis, die Expression der offenbaren Nucleinsäuresegmente in planta zu optimieren. Ein besonderes Verfahren dazu besteht in der Änderung des bakteriellen Gens unter Entfernung von Sequenzen oder Motiven, die die Expression in einer transformierten Pflanzenzelle reduzieren. Der Vorgang der Veränderung einer codierenden Sequenz für eine optimale Expression in planta wird häufig als "Plantisierung" einer DNA-Sequenz bezeichnet.

[0181] Besonders problematische Sequenzen sind solche, die reich an A+T sind. Da B. thuringiensis ein A+T-reiches Genom hat, müssen native Kristallprotein-Gensequenzen leider häufig für eine optimale Expression in einer Pflanze modifiziert werden. Das Sequenzmotiv ATTTA (oder AUUUA, wie es in RNA erscheint) wurde als destabilisierende Sequenz in Säugerzellen-mRNA identifiziert (Shaw und Kamen, 1986). Viele kurzlebige mRNAs haben A+T-reiche 3'-untranslatierte Bereiche, und diese Bereiche weisen häufig die ATTTA-Sequenz auf, die zuweilen in mehreren Kopien oder als Multimere (z.B. ATTTATTTA...) vorhanden ist. Shaw und Kamen zeigten, dass die Übertragung des 3'-Endes einer instabilen mRNA auf eine stabile RNA (Globin oder VA1) die Halbwertszeit der stabilen RNA drastisch senkte. Sie zeigten weiterhin, dass ein Pentamer von ATTTA eine tiefgreifende destabilisierende Wirkung auf eine stabile mRNA hatte und dass dieses Signal seine Wirkung unabhängig davon ausüben konnte, ob es sich am 3'-Ende oder innerhalb der codierenden Sequenz befand. Die Zahl der ATTTA-Sequenzen und/oder der Sequenzkontext, in dem sie auftreten, scheint jedoch bei der Frage, ob sie als destabilisierende Sequenzen wirken, ebenfalls wichtig zu sein. Shaw und Kamen zeigten, dass ein Trimer von ATTTA eine viel geringere Wirkung auf die mRNA-Stabilität hatte als ein Pentamer und dass ein Dimer oder ein Monomer keine Wirkung auf die Stabilität hatte (Shaw und Kamen, 1987). Man beachte, dass Multimere von ATTTA, wie ein Pentamer, automatisch einen A+T-reichen Bereich erzeugen. Es zeigte sich, dass dies ein cytoplasmatischer Effekt und kein Zellkerneffekt ist. In anderen instabilen mRNAs kann es sein, dass die ATTTA-Sequenz nur in einer einzigen Kopie vorhanden ist, aber sie ist oft in einem A+T-reichen Bereich vorhanden. Aus den bisher gesammelten Tierzellendaten geht hervor, dass ATTTA wenigstens in einigen

Kontexten wichtig für die Stabilität ist, aber es ist noch nicht möglich, vorherzusagen, welche Vorkommen von ATTTA destabilisierende Elemente sind oder ob es wahrscheinlich ist, dass irgendwelche dieser Effekte in Pflanzen beobachtet werden.

[0182] Einige Studien zum mRNA-Abbau in Tierzellen weisen auch darauf hin, dass der RNA-Abbau in manchen Fällen mit einem nucleolytischen Angriff in A+T-reichen Bereichen beginnen kann. Es ist nicht klar, ob diese Spaltungen an ATTTA-Sequenzen erfolgen. Es gibt auch Beispiele für mRNAs, die je nach dem Zelltyp, in dem sie exprimiert werden, oder je nach dem Stadium innerhalb des Zellzyklus, in dem sie exprimiert werden, eine unterschiedliche Stabilität haben. Zum Beispiel sind Histon-mRNAs während der DNA-Synthese stabil, aber instabil, wenn die DNA-Synthese unterbrochen wird. Das 3'-Ende einiger Histon-mRNAs scheint für diesen Effekt verantwortlich zu sein (Pandey und Marzluff, 1987). Er scheint nicht durch ATTTA vermittelt zu werden, noch ist klar, was die unterschiedliche Stabilität dieser mRNA steuert. Ein weiteres Beispiel ist die differentielle Stabilität von IgG-mRNA in B-Lymphocyten während der B-Zell-Reifung (Genovese und Milcarek, 1988). Ein letztes Beispiel ist die Instabilität einer mutanten β -Thalassämie-Globin-mRNA. In Knochenmarkzellen, wo dieses Gen normalerweise exprimiert wird, ist die mutante mRNA instabil, während die Wildtyp-mRNA stabil ist. Wenn das mutante Gen in vitro in HeLa- oder L-Zellen exprimiert wird, zeigt die mutante mRNA keine Instabilität. Diese Beispiele beweisen alle, dass die mRNA-Stabilität durch Zelltyp- oder Zellzyklus-spezifische Faktoren vermittelt sein kann. Weiterhin wurde diese Art von Instabilität noch nicht mit spezifischen Sequenzen in Verbindung gebracht. Bei diesen Ungewissheiten ist es nicht möglich, vorherzusagen, welche RNAs in einer gegebenen Zelle wahrscheinlich instabil sind. Außerdem kann es sogar sein, dass das ATTTA-Motiv je nach der Natur der Zelle, in der die RNA vorhanden ist, unterschiedlich wirkt. Shaw und Kamen (1987) haben berichtet, dass die Aktivierung von Protein-Kinase C den durch ATTTA vermittelten Abbau blockieren kann.

[0183] Die Addition einer Polyadenylatkette an das 3'-Ende ist den meisten eukaryontischen mRNAs, sowohl pflanzlichen als auch tierischen, gemeinsam. Gemäß der zur Zeit akzeptierten Sichtweise der PolyA-Addition erstreckt sich das entstehende Transcript über den 3'-Terminus der reifen Form hinaus. In diesem Transcript sind Signale für die Polyadenylierung und die richtige Bildung des 3'-Endes enthalten. Diese Prozessierung am 3'-Ende beinhaltet die Spaltung der mRNA und die Addition von PolyA an das 3'-Ende der reifen Form. Durch Suchen nach Consensussequenzen in der Nähe der PolyA-Kette sowohl bei pflanzlichen als auch bei tierischen mRNAs war es möglich, Consensussequenzen zu identifizieren, die anscheinend an der PolyA-Addition und 3'-End-Abspaltung beteiligt sind. Dieselben Consensussequenzen scheinen für beide Vorgänge wichtig zu sein. Diese Signale sind typischerweise eine Variation der Sequenz AATAAA. Bei tierischen Zellen wurden einige Varianten dieser Sequenz, die funktionsfähig sind, identifiziert; bei Pflanzenzellen scheint es einen ausgedehnten Bereich von funktionellen Sequenzen zu geben (Wickens und Stephenson, 1984; Dean et al., 1986). Da alle diese Consensussequenzen Variationen von AATAAA sind, sind alle A+T-reiche Sequenzen. Diese Sequenz befindet sich typischerweise 15 bis 20 bp vor der PolyA-Kette in einer reifen mRNA. Studien bei Tierzellen weisen darauf hin, dass diese Sequenz sowohl an der PolyA-Addition als auch an der 3'-Reifung beteiligt ist. Ortsspezifische Mutationen in dieser Sequenz können diese Funktionen zerstören (Conway und Wickens, 1988; Wickens et al., 1987). Es wurde jedoch auch beobachtet, dass Sequenzen bis zu 50 bis 100 bp 3' vom mutmaßlichen PolyA-Signal ebenfalls erforderlich sind; d.h. ein Gen, das eine normale AATAAA-Sequenz aufweist, aber stromabwärts ersetzt oder zerlegt wurde, wird nicht richtig polyadenyliert (Gil und Proudfoot, 1984; Sadofsky und Alwine, 1984; McDevitt et al., 1984). Das heißt, das PolyA-Signal selbst ist für eine vollständige und richtige Prozessierung nicht ausreichend. Es ist noch nicht bekannt, welche spezifischen stromabwärts liegenden Sequenzen neben dem PolyA-Signal erforderlich sind oder ob es eine spezifische Sequenz gibt, die diese Funktion hat. Daher kann die Sequenzanalyse nur potentielle PolyA-Signale identifizieren.

[0184] Bei natürlich vorkommenden mRNAs, die normal polyadenyliert sind, wurde beobachtet, dass durch eine Unterbrechung dieses Vorgangs, durch Veränderung entweder des PolyA-Signals oder anderer Sequenzen in der mRNA, tiefgreifende Effekte auf der Ebene der funktionellen mRNA erhalten werden können. Dies wurde bei mehreren natürlich vorkommenden mRNAs beobachtet, mit Ergebnissen, die bisher genspezifisch sind.

[0185] Es hat sich gezeigt, dass bei natürlichen mRNAs eine richtige Polyadenylierung wichtig für die Akkumulation von mRNA ist und dass eine Unterbrechung dieses Vorgangs die mRNA-Konzentrationen erheblich beeinflussen kann. Es gibt jedoch nur unzureichendes Wissen, um die Auswirkung von Veränderungen bei einem normalen Gen vorherzusagen. Bei einem heterologen Gen ist es noch schwieriger, die Folgen vorherzusagen. Es ist jedoch möglich, dass die identifizierten mutmaßlichen Sequenzen dysfunktionsfähig sind. Das heißt, diese Stellen wirken vielleicht nicht als eigentliche PolyA-Stellen, sondern fungieren stattdessen als aberrante

Stellen, die zu instabilen mRNAs führen.

[0186] In Tierzellsystemen ist AATAAA bei weitem das häufigste Signal, das in mRNAs stromaufwärts des PolyA identifiziert wurde, aber es wurden auch wenigstens vier Varianten gefunden (Wickens und Stephenson, 1984). In Pflanzen wurden nicht annähernd so viele Analysen durchgeführt, aber es ist klar, dass mehrere Sequenzen, die AATAAA ähnlich sind, verwendet werden können. Die Pflanzenstellen in Tabelle 4, die als Haupt- und Nebenstellen bezeichnet werden, beziehen sich nur auf die Studie von Dean et al. (1986), die nur drei Typen von Pflanzengenen analysierte. Die Bezeichnung von Polyadenylierungsstellen als Haupt- oder Nebenstellen bezieht sich nur auf die Häufigkeit ihres Vorkommens als funktionelle Stellen in natürlich vorkommenden Genen, die analysiert wurden. Im Falle von Pflanzen ist dies eine sehr beschränkte Datengrundlage. Es ist schwierig, mit Bestimmtheit vorherzusagen, dass eine als Haupt- oder Nebenstelle bezeichnete Stelle mehr oder weniger wahrscheinlich partiell oder vollständig funktioniert, wenn man sie in einem heterologen Gen wie solchen, die die Kristallproteine der vorliegenden Erfindung codieren, findet.

Tabelle 4

Polyadenylierungsstellen in Pflanzengenen

PA	AATAAA	Hauptkonsensusstelle
P1A	AATAAT	Hauptstelle bei Pflanzen
P2A	AACCAA	Nebenstelle bei Pflanzen
P3A	ATATAA	"
P4A	AATCAA	"
P5A	ATACTA	"
P6A	ATAAAA	"
P7A	ATGAAA	"
P8A	AAGCAT	"
P9A	ATTAAT	"
P10A	ATACAT	"
P11A	AAAATA	"
P12A	ATTAAA	Nebenstelle bei Tieren
P13A	AATTAA	"
P14A	AATACA	"
P15A	CATAAA	"

[0187] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung von synthetischen Pflanzengenen bereit, wobei diese Gene ihr Proteinprodukt auf wesentlich höherem Niveau exprimieren als die Wildtypgene, die bisher üblicherweise bei der Pflanzentransformation eingesetzt wurden. In einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung auch neue synthetische Pflanzengene bereit, die nichtpflanzliche Proteine codieren.

[0188] Wie oben beschrieben, ist die Expression von nativen *B.-thuringiensis*-Genen in Pflanzen oft problematisch. Die Natur der codierenden Sequenzen von *B.-thuringiensis*-Genen unterscheidet sie von Pflanzengenen sowie von vielen anderen heterologen Genen, die in Pflanzen exprimiert werden. Insbesondere sind *B.-thuringiensis*-Gene sehr reich (~62%) an Adenin (A) und Thymin (T), während Pflanzengene und die meisten anderen Bakteriengene, die in Pflanzen exprimiert wurden, in der Größenordnung von 45-55% A+T liegen.

[0189] Aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes und der begrenzten Zahl von Codonmöglichkeiten für jede Aminosäure befinden sich die meisten der "überschüssigen" A+T der strukturellen codierenden Sequenzen einiger *Bacillus*-Spezies in der dritten Position der Codons. Das heißt, Gene einiger *Bacillus*-Spezies

haben A oder T als drittes Nucleotid in vielen Codons. Der Gehalt an A+T kann also zum Teil die Abweichung in der Codonverwendung bestimmen. Außerdem ist klar, dass sich Gene in dem Organismus, in dem sie sich entwickeln, auf eine maximale Funktion hin entwickeln. Dies bedeutet, dass bestimmte Nucleotidsequenzen, die man in einem Gen von dem einen Organismus findet, wo sie vielleicht keine Rolle spielen, außer für eine besondere Sequenz von Aminosäuren zu codieren, das Potential haben, in einem anderen Organismus als Genkontrollelemente erkannt zu werden (wie Transcriptions promotoren oder -terminatoren, PolA-Additionsstellen, Intron-Spleißstellen oder spezifische mRNA-Abbausignale). Es ist vielleicht überraschend, dass solche falsch gelesenen Signale nicht ein häufigeres Merkmal der heterologen Genexpression sind, sondern dies kann zum Teil durch den relativ homogenen A+T-Gehalt (~50%) vieler Organismen erklärt werden. Dieser A+T-Gehalt plus die Natur des genetischen Codes setzen klare Grenzen für die Wahrscheinlichkeit des Auftretens irgendeiner bestimmten Oligonucleotidsequenz. Ein Gen aus *E. coli* mit 50% A+T-Gehalt enthält also mit viel geringerer Wahrscheinlichkeit irgendein bestimmtes A+T-reiches Segment als ein Gen von *B. thuringiensis*.

[0190] Um eine Expression der δ -Endotoxin-Gene auf hohem Niveau in Pflanzen zu erhalten, muss typischerweise eine vorhandene strukturelle codierende Sequenz ("Struktur-Gen"), die für das δ -Endotoxin codiert, durch Entfernen von ATTTA-Sequenzen und mutmaßlichen Polyadenylierungssignalen durch ortsgerichtete Mutagenese der DNA, die das Struktur-Gen umfasst, modifiziert werden. Am meisten bevorzugt werden im Wesentlichen alle Polyadenylierungssignale und ATTTA-Sequenzen entfernt, obwohl auch dann verstärkte Expressionsniveaus beobachtet werden, wenn nur ein Teil der oben angegebenen Sequenzen entfernt wird. Wenn ein synthetisches Gen hergestellt wird, das für die Expression des betreffenden Proteins codiert, werden alternativ dazu Codons so ausgewählt, dass die ATTTA-Sequenz und mutmaßlichen Polyadenylierungssignale vermieden werden. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung umfassen die mutmaßlichen Polyadenylierungssignale, ohne notwendigerweise darauf beschränkt zu sein, AATAAA, AATAAT, AACCAA, ATATAA, AATCAA, ATACTA, ATAAAA, ATGAAA, AAGCAT, ATTAAT, ATACAT, AAAATA, ATTTAA, AATTAA, AATACA und CATAAA. Beim Ersetzen der ATTTA-Sequenzen und Polyadenylierungssignale werden vorzugsweise Codons verwendet, die die Codons vermeiden, die man in Pflanzengenomen selten findet.

[0191] Die ausgewählte DNA-Sequenz wird abgesucht, um Bereiche mit mehr als vier aufeinanderfolgenden Adenin- (A) oder Thyminnucleotiden (T) zu identifizieren. Die A+T-Bereiche werden auf potentielle Pflanzen-Polyadenylierungssignale abgesucht. Dadurch, dass fünf oder mehr aufeinanderfolgende A- oder T-Nucleotide fehlen, sind zwar die meisten Pflanzen-Polyadenylierungssignale beseitigt, doch wenn mehr als eines der Polyadenylierungsnebensignale innerhalb von zehn Nucleotiden voneinander identifiziert wird, wird die Nucleotidsequenz dieses Bereichs vorzugsweise geändert, um diese Signale zu entfernen, während die ursprünglich codierte Aminosäuresequenz beibehalten wird.

[0192] Der zweite Schritt besteht darin, die etwa 15 bis 30 Nucleotidreste, die den in Schritt 1 identifizierten A+T-reichen Bereich umgeben, in Betracht zu ziehen. Wenn der A+T-Gehalt des umgebenden Bereichs kleiner als 80% ist, sollte der Bereich auf Polyadenylierungssignale untersucht werden. Die Veränderung des Bereichs auf der Basis von Polyadenylierungssignalen hängt ab von (1) der Zahl der vorhandenen Polyadenylierungssignale und (2) der Anwesenheit eines Pflanzen-Polyadenylierungshauptsignals.

[0193] Der erweiterte Bereich wird auf Anwesenheit von Pflanzen-Polyadenylierungssignalen untersucht. Die Polyadenylierungssignale werden durch ortsgerichtete Mutagenese der DNA-Sequenz entfernt. Der erweiterte Bereich wird auch auf mehrfache Kopien der ATTTA-Sequenz untersucht, die ebenfalls durch Mutagenese entfernt werden.

[0194] Es ist auch bevorzugt, dass Bereiche, die viele aufeinanderfolgende A+T-Basen oder C+G-Basen umfassen, unterbrochen werden, da vorhergesagt wird, dass diese Bereiche aufgrund von Selbstkomplementarität eine größere Wahrscheinlichkeit haben, eine Haarnadelstruktur zu bilden. Daher würde die Insertion von heterogenen Basenpaaren die Wahrscheinlichkeit der Bildung einer selbstkomplementären Sekundärstruktur, die bekanntermaßen bei einigen Organismen die Transcription und/oder Translation hemmt, reduzieren. In den meisten Fällen können die nachteiligen Wirkungen minimiert werden, indem man Sequenzen verwendet, die nicht mehr als fünf aufeinanderfolgende A+T oder C+G enthalten.

4.8.6 Synthetische Oligonucleotide für die Mutagenese

[0195] Wenn in der Mutagenese Oligonucleotide verwendet werden, ist es wünschenswert, die richtige Aminosäuresequenz und das richtige Leseraster beizubehalten, ohne häufige Restriktionsstellen, wie BglII, HindII, SacI, KpnI, EcoRI, NcoI, PstI und Sall, in das modifizierte Gen einzuführen. Diese Restriktionsstellen findet

man an Polylinker-Einfügungsstellen vieler Klonierungsvektoren. Selbstverständlich sollte die Einführung neuer Polyadenylierungssignale, ATTTA-Sequenzen oder zusammenhängender Stücke mit mehr als fünf A+T oder G+C ebenfalls vermieden werden. Die bevorzugte Größe für die Oligonucleotide ist 40 bis 50 Basen, aber es werden auch Fragmente im Bereich von 18 bis 100 Basen verwendet. In den meisten Fällen wird ein Minimum von 5 bis 8 Basenpaaren Homologie zur Matrizen-DNA an beiden Enden des synthetisierten Fragments eingehalten, um eine richtige Hybridisierung des Primers mit der Matrize zu gewährleisten. Die Oligonucleotide sollten Sequenzen vermeiden, die mehr als fünf Basenpaare A+T oder G+C enthalten. Codons, die zum Ersetzen der Wildtypcodons verwendet werden, sollten vorzugsweise das TA- oder GC-Dublett vermeiden, wo immer dies möglich ist. Die Codons werden aus einer Tabelle der von Pflanzen bevorzugten Codons (wie der folgenden Tabelle 5) ausgewählt, um Codons zu vermeiden, die man in Pflanzengenomen selten findet, und es sollte sich bemüht werden, Codons so auszuwählen, dass der G+C-Gehalt vorzugsweise auf etwa 50% eingestellt wird.

Tabelle 5

Bevorzugte Codonverwendung bei Pflanzen

Aminosäure	Codon	prozentuale Verwendung in Pflanzen
ARG	CGA	7
	CGC	11
	CGG	5
	CGU	25
	AGA	29
	AGG	23
LEU	CUA	8
	CUC	20
	CUG	10
	CUU	28
	UUA	5
	UUG	30
SER	UCA	14
	UCC	26
	UCG	3
	UCU	21
	AGC	21
	AGU	15
THR	ACA	21
	ACC	41
	ACG	7
	ACU	31
PRO	CCA	45
	CCC	19
	CCG	9
	CCU	26
ALA	GCA	23
	GCC	32
	GCG	3
	GCU	41
GLY	GGA	32
	GGC	20
	GGG	11
	GGU	37
ILE	AUA	12
	AUC	45
	AUU	43
VAL	GUA	9
	GUC	20
	GUG	28

Tabelle 5 (Fortsetzung)

Aminosäure	Codon	prozentuale Verwendung in Pflanzen
LYS	GUU	43
	AAA	36
	AAG	64
ASN	AAC	72
	AAU	28
GLN	CAA	64
	CAG	36
HIS	CAC	65
	CAU	35
GLU	GAA	48
	GAG	52
ASP	GAC	48
	GAU	52
TYR	UAC	68
	UAU	32
CYS	UGC	78
	UGU	22
PHE	UUC	56
	UUU	44
MET	AUG	100
TRP	UGG	100

[0196] Es wird vorhergesagt, dass Bereiche mit vielen aufeinanderfolgenden A+T-Basen oder G+C-Basen aufgrund von Selbstkomplementarität eine größere Wahrscheinlichkeit haben, Haarnadelstrukturen zu bilden. Eine Unterbrechung dieser Bereiche durch das Einfügen von heterogenen Basenpaaren wird bevorzugt und sollte die Wahrscheinlichkeit der Bildung von selbstkomplementären Sekundärstrukturen, wie Haarnadeln, die bekanntermaßen bei einigen Organismen die Transcription (Transcriptionsterminatoren) und Translation (Attenuatoren) hemmen, reduzieren. Alternativ dazu kann auch ein vollständig synthetisches Gen für eine gegebene Aminosäuresequenz hergestellt werden, wobei Bereiche mit fünf oder mehr aufeinanderfolgenden A+T- oder G+C-Nucleotiden vermieden werden. Wann immer dies möglich ist, werden Codons so ausgewählt, dass die TA- und GC-Dubletten in Codons vermieden werden. Die Codonverwendung kann gegen eine Tabelle der von Pflanzen bevorzugten Codonverwendung (wie Tabelle 5) standardisiert und der G+C-Gehalt vorzugsweise auf 50% eingestellt werden. Die resultierende Sequenz sollte untersucht werden, um zu gewährleisten, dass es nur ein Minimum an mutmaßlichen Pflanzen-Polyadenylierungssignalen und ATTTA-Sequenzen gibt. Restriktionsstellen, die man in häufig verwendeten Klonierungsvektoren findet, werden vorzugsweise ebenfalls vermieden. Die Platzierung von mehreren einzigartigen Restriktionsstellen über das gesamte Gen ist jedoch nützlich für eine Analyse der Genexpression oder Konstruktion von Genvarianten.

4.9 Verfahren zur Herstellung von insektenresistenten transgenen Pflanzen

[0197] Durch Transformieren einer geeigneten Wirtszelle, wie einer Pflanzenzelle, mit einem rekombinanten, ein cryET70-Gen enthaltenden Segment kann die Expression des codierten Kristallproteins (d.h. eines bakteriellen Kristallproteins oder -polypeptids mit insektizider Aktivität gegen Coleoptera) zur Bildung von insektenresistenten Pflanzen führen.

[0198] Zum Beispiel kann man einen Expressionsvektor, der einen codierenden Bereich für ein B.-thuringiensis-Kristallprotein und einen geeigneten Selektionsmarker enthält, verwenden, um eine Suspension von embryonalen Pflanzenzellen, wie Weizen- oder Maiszellen, zu transformieren, wobei man ein Verfahren wie Teil-

chenbombardierung (Maddock et al., 1991; Vasil et al., 1992) verwendet, um die DNA, mit der Mikroprojekteile beschichtet sind, an die Empfängerzellen abzugeben. Dann werden transgene Pflanzen aus transformierten embryonalen Kalli, die die insektiziden Proteine exprimieren, regeneriert.

[0199] Die Bildung von transgenen Pflanzen kann auch mit Hilfe von anderen Verfahren der Zelltransformation erreicht werden, die in der Technik bekannt sind, wie Agrobacterium-vermittelte DNA-Übertragung (Fraley et al., 1983). Alternativ dazu kann die DNA auch durch direkte DNA-Übertragung in Pollen (Zhou et al., 1983; Hess, 1987; Luo et al., 1988), durch Injektion der DNA in Reproduktionsorgane einer Pflanze oder durch direkte Injektion von DNA in die Zellen von unreifen Embryos mit anschließender Rehydratisierung der dehydrierten Embryos (Neuhaus et al., 1987; Benbrook et al., 1986) in Pflanzen eingeführt werden.

[0200] Die Regeneration, Entwicklung und Kultivierung von Pflanzen aus einzelnen Pflanzenprotoplasten-Transformanten oder aus verschiedenen transformierten Explantaten ist in der Technik wohlbekannt (Weissbach und Weissbach, 1988). Dieser Regenerations- und Wachstumsvorgang beinhaltet typischerweise die Schritte der Selektion von transformierten Zellen, das Kultivieren dieser individualisierten Zellen durch die üblichen Stadien der Embryonalentwicklung hindurch und durch das Stadium des bewurzelten Pflänzchens hindurch. Transgene Embryos und Samen werden ähnlich regeneriert. Die resultierenden transgenen bewurzelten Schösslinge werden danach in ein geeignetes Pflanzenwachstumsmedium, wie Erde, gepflanzt.

[0201] Die Entwicklung oder Regeneration von Pflanzen, die das exogene Gen (Fremd-Gen) enthalten, welches ein interessierendes Polypeptid codiert und das durch Agrobacterium aus Blattexplantaten eingeführt wurde, kann durch Verfahren erreicht werden, die in der Technik wohlbekannt sind, wie es beschrieben ist (Horsch et al., 1985). Bei diesem Verfahren werden Transformanten in Gegenwart eines Selektionsmittels und in einem Medium, das die Regeneration von Schösslingen in dem transformierten Pflanzenstamm induziert, kultiviert, wie es beschrieben ist (Fraley et al., 1983).

[0202] Dieses Verfahren ergibt typischerweise innerhalb von zwei bis vier Monaten Schösslinge, und diese Schösslinge werden dann auf ein geeignetes wurzelinduzierendes Medium übertragen, das das Selektionsmittel und ein Antibiotikum, um Bakterienwachstum zu verhindern, enthält. Dann werden Schösslinge, die in Gegenwart des Selektionsmittels unter Bildung von Pflänzchen Wurzeln ausbildeten, in Erde oder ein anderes Medium umgepflanzt, um die Erzeugung von Wurzeln zu ermöglichen. Diese Verfahren variieren in Abhängigkeit von dem besonderen eingesetzten Pflanzenstamm, wobei solche Variationen in der Technik wohlbekannt sind.

[0203] Vorzugsweise werden die regenerierten Pflanzen einer Selbstbestäubung unterzogen, um homozygote transgene Pflanzen zu erhalten, wie es bereits diskutiert wurde. Ansonsten wird Pollen, der von den regenerierten Pflanzen erhalten wird, mit aus Samen aufgezogenen Pflanzen von agronomisch wichtigen, vorzugsweise ingezüchteten Linien gekreuzt. Umgekehrt wird Pollen von Pflanzen dieser wichtigen Linien verwendet, um regenerierte Pflanzen zu bestäuben. Eine transgene Pflanze der vorliegenden Erfindung, die ein gewünschtes Polypeptid enthält, wird mit Hilfe von Verfahren kultiviert, die dem Fachmann wohlbekannt sind.

[0204] Eine transgene Pflanze dieser Erfindung weist also eine erhöhte Menge eines codierenden Bereichs (z.B. ein Gen) auf, der ein Polypeptid gemäß SEQ ID Nr. 2 codiert. Eine bevorzugte transgene Pflanze ist eine unabhängig segregierende und kann das Gen und seine Aktivität an seine Nachkommenschaft weitergeben. Eine besonders bevorzugte transgene Pflanze ist homozygot in Bezug auf dieses Gen und gibt das Gen bei geschlechtlicher Paarung an alle ihre Nachkommen weiter. Samen von einer transgenen Pflanze kann auf dem Feld oder im Gewächshaus ausgesät werden, und die resultierenden geschlechtsreifen Pflanzen werden einer Selbstbestäubung unterzogen, um echte Zuchtpflanzen zu erzeugen. Die Nachkommenschaft dieser Pflanzen wird zu echten Zuchtlinien, die zum Beispiel in Bezug auf erhöhte insektizide Kapazität gegen Coleoptera-Insekten, vorzugsweise auf dem Feld, unter einer Reihe von Umgebungsbedingungen bewertet werden. Die Erfinder gehen davon aus, dass die vorliegende Erfindung besonderen Nutzen bei der Schaffung von transgenen Pflanzen von kommerziellem Interesse finden wird, einschließlich verschiedener Rasen- und Weidegräser, Roggen, Weizen, Mais, Kapok, Flachs, Reis, Gerste, Hafer, Zuckerrohr, Baumwolle, Tomate, Kartoffel, Sojabohne und andere Leguminosen, Tabak, Sorghum sowie einer Vielzahl von Zierpflanzen einschließlich Kaktusen und Sukkulenten, Früchte, Beeren, Gemüse und auch eine Reihe von nuss- und obsttragenden Bäumen und Pflanzen.

[0205] Transgene Pflanzen, die ein oder mehrere Transgene umfassen, die ein Polypeptid gemäß SEQ ID Nr. 2 codieren, weisen vorzugsweise einen Phänotyp mit verbesserter oder verstärkter Insektenresistenz gegen die hier beschriebenen Ziel-Coleoptera- und Lepidoptera-Insekten auf. Diese Pflanzen liefern vorzugsweise

transgene Samen, die verwendet werden, um Linien von transgenen Pflanzen zu schaffen (d.h. Nachkommen oder fortgeschrittene Generationen der ursprünglichen transgenen Pflanze), die zur Erzeugung von Samen verwendet oder als Tierfutter oder Nahrungsmittel für den Menschen oder zur Herstellung von Fasern, Öl, Früchten, Körnern oder anderen kommerziell wichtigen Pflanzenprodukten oder von Pflanzen stammenden Komponenten verwendet werden können. In solchen Fällen enthalten die Nachkommen und die Samen, die von irgendeiner Generation der transformierten Pflanzen erhalten wurden, das ausgewählte, in ein Chromosom integrierte Transgen, das das δ -Endotoxin der vorliegenden Erfindung codiert. Die transgenen Pflanzen der vorliegenden Erfindung können mit einer oder mehreren Pflanzen, die wünschenswerte Eigenschaften haben, gekreuzt werden, so dass Hybrid- oder ingezüchtete Linien entstehen. Unter bestimmten Umständen kann es auch wünschenswert sein, transgene Pflanzen, Samen und Nachkommen zu schaffen, die neben dem Transgen, das das Polypeptid der Erfindung codiert, noch ein oder mehrere zusätzliche Transgene enthalten, die in ihr Genom eingebaut sind. Zum Beispiel können die transgenen Pflanzen ein zweites Gen enthalten, das dasselbe oder ein anderes Insektenresistenz-Polypeptid codiert, oder alternativ dazu können die Pflanzen auch ein oder mehrere zusätzliche Transgene enthalten, wie solche, die Herbizidresistenz, Pilzresistenz, Bakterienresistenz, Stress-, Salz- oder Dürretoleranz, verbesserte Stängel- oder Wurzelbildung oder erhöhte Stärke-, Korn-, Öl-, Kohlenhydrat-, Aminosäure- und Proteinproduktion verleihen.

4.10 Isolierung von homologen Genen und Genfragmenten

[0206] Die Gene und δ -Endotoxine gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen nicht nur die hier offenbarten Sequenzen mit der vollen Länge, sondern auch Fragmente dieser Sequenzen oder Fusionsproteine, die die charakteristische insektizide Aktivität der hier spezifisch als Beispiele genannten Sequenzen beibehalten.

[0207] Der Fachmann auf diesem Gebiet sollte sich darüber im Klaren sein, dass insektizide δ -Endotoxine mit mehreren Methoden identifiziert und erhalten werden können. Die spezifischen Gene oder Teile davon können von einer hinterlegten Kultur erhalten oder synthetisch aufgebaut werden, zum Beispiel unter Verwendung einer Genmaschine. Variationen dieser Gene können leicht mit Hilfe von Standardtechniken zur Herstellung von Punktmutationen aufgebaut werden. Außerdem können Fragmente dieser Gene unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Exonucleasen oder Endonucleasen gemäß Standardverfahren hergestellt werden. Zum Beispiel können Enzyme, wie Bal31, oder ortsgerichtete Mutagenese verwendet werden, um Nucleotide systematisch von den Enden dieser Gene abzuschneiden. Außerdem können Gene, die für aktive Fragmente codieren, unter Verwendung einer Vielzahl von anderen Restriktionsenzymen erhalten werden. Proteasen können verwendet werden, um direkt aktive Fragmente dieser δ -Endotoxine zu erhalten.

[0208] Äquivalente δ -Endotoxine und/oder Gene, die diese äquivalenten δ -Endotoxine codieren, können ebenfalls mit Hilfe der hier angegebenen Lehren aus Bacillus-Stämmen und/oder DNA-Bibliotheken isoliert werden. Zum Beispiel können Antikörper gegen die hier offenbarten und beanspruchten δ -Endotoxine verwendet werden, um andere δ -Endotoxine aus einem Gemisch von Proteinen zu identifizieren und zu isolieren. Insbesondere können Antikörper gegen die Teile der δ -Endotoxine erzeugt werden, die am konstantesten sind und sich am meisten von anderen B.-thuringiensis- δ -Endotoxinen unterscheiden. Diese Antikörper können dann verwendet werden, um spezifisch äquivalente δ -Endotoxine mit der charakteristischen insektiziden Aktivität durch Immunfällung, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) oder Western Blotting zu identifizieren.

[0209] Ein weiteres Verfahren zum Identifizieren der δ -Endotoxine und Gene der vorliegenden Erfindung besteht in der Verwendung von Oligonucleotidsonden. Diese Sonden sind Nucleotidsequenzen mit einem nachweisbaren Marker. Wie in der Technik wohlbekannt ist, kann dann vernünftigerweise angenommen werden, dass die Sonde und die Probe im Wesentlichen identisch sind, wenn das Sondenmolekül und die Nucleinsäureprobe miteinander hybridisieren, indem sie eine starke Bindung zwischen den beiden Molekülen bilden. Der nachweisbare Marker der Sonde liefert ein Mittel, um in bekannter Weise zu bestimmen, ob eine Hybridisierung stattgefunden hat. Eine solche Sondenanalyse liefert ein schnelles Verfahren zum Identifizieren von formidablen δ -Endotoxin-Genen der vorliegenden Erfindung.

[0210] Die Nucleotidsegmente, die als Sonden gemäß der Erfindung verwendet werden, können unter Verwendung von DNA-Synthesizern mit Hilfe von Standardverfahren synthetisiert werden. Bei der Verwendung der Nucleotidsegmente als Sonden wird eine bestimmte Sonde mit irgendeinem geeigneten Marker markiert, der dem Fachmann bekannt ist, einschließlich radioaktiver und nichtradioaktiver Marker. Zu den typischen radioaktiven Markern gehören ^{32}P , ^{125}I und ^{35}S . Eine mit einem radioaktiven Isotop markierte Sonde kann aus einer zu der DNA-Sonde komplementären Nucleotidsequenz durch eine herkömmliche Nick-Translations-Reaktion unter Verwendung einer DNase und einer DNA-Polymerase aufgebaut werden. Dann können die Sonde

und die Probe in einer Hybridisierungspufferlösung miteinander kombiniert und auf einer geeigneten Temperatur gehalten werden, bis eine Assoziation erfolgt. Danach wird Fremdmaterial von der Membran abgewaschen, wobei die Probe und gebundene Sondenmoleküle zurückbleiben, die typischerweise durch Autoradiographie und/oder mit einem Flüssigszintillationszähler nachgewiesen und quantifiziert werden.

[0211] Zu den nichtradioaktiven Markern gehören zum Beispiel Liganden, wie Biotin oder Thyroxin, sowie Enzyme, wie Hydrolasen oder Peroxidasen, oder die verschiedenen chemilumineszierenden Verbindungen, wie Luciferin, oder fluoreszierende Verbindungen, wie Fluorescein und seine Derivate. Die Sonde kann zur leichteren Trennung auch an beiden Enden mit verschiedenen Typen von Markern markiert sein, indem man zum Beispiel einen Isotopenmarker an dem oben genannten Ende und einen Biotinmarker an dem anderen Ende verwendet.

[0212] Die Duplexbildung und Stabilität hängen von der weitgehenden Komplementarität zwischen den beiden Strängen eines Hybrids ab, und wie oben angemerkt wurde, kann ein bestimmter Grad der Fehlpaarung toleriert werden. Daher beinhalten die Sonden der vorliegenden Erfindung Mutationen (sowohl einfache als auch mehrfache), Deletionen, Insertionen der beschriebenen Sequenzen und Kombinationen davon, wobei die Mutationen, Insertionen und Deletionen die Bildung von stabilen Hybriden mit dem interessierenden Zielpolynucleotid ermöglichen. Mutationen, Insertionen und Deletionen können in einer gegebenen Polynucleotidsequenz auf vielerlei Weise durch Verfahren, die dem Fachmann zur Zeit bekannt sind, und vielleicht mit anderen Verfahren, die vielleicht in der Zukunft bekannt werden, erzeugt werden.

[0213] Die potentiellen Variationen in den aufgeführten Sonden sind zum Teil auf die Redundanz des genetischen Codes zurückzuführen. Redundanz des genetischen Codes bedeutet, dass für die meisten Aminosäuren, die zur Herstellung von Proteinen verwendet werden, mehr als ein codierendes Nucleotidtriplett (Codon) verwendet werden kann. Daher können verschiedene Nucleotidsequenzen für eine bestimmte Aminosäure codieren. Die Aminosäuresequenzen der B.-thuringiensis- δ -Endotoxine und Peptide können also durch äquivalente Nucleotidsequenzen hergestellt werden, die dieselbe Aminosäuresequenz des Proteins oder Peptids codieren. Dementsprechend umfasst die vorliegende Erfindung solche äquivalenten Nucleotidsequenzen. Außerdem bilden auch inverse oder komplementäre Sequenzen einen Aspekt der vorliegenden Erfindung und können vom Fachmann leicht verwendet werden. Außerdem hat sich gezeigt, dass Proteine mit identifizierter Struktur und Funktion aufgebaut werden können, indem man die Aminosäuresequenz verändert, wenn diese Änderungen die Sekundärstruktur des Proteins nicht verändern (Kaiser und Kezdy, 1984). Die vorliegende Erfindung umfasst also Mutanten der hier gezeigten Aminosäuresequenz, die die Sekundärstruktur des Proteins nicht verändern, oder wenn die Struktur verändert wird, dann bleibt die biologische Aktivität im Wesentlichen erhalten. Weiterhin umfasst die Erfindung auch Mutanten von Organismen, die das ganze oder einen Teil des δ -Endotoxincodierenden Gens der Erfindung beherbergen. Solche Mutanten können mit Techniken hergestellt werden, die dem Fachmann wohlbekannt sind. Zum Beispiel kann UV-Bestrahlung verwendet werden, um Mutanten von Wirtsorganismen herzustellen. Ähnlich können solche Mutanten auch asporogene Wirtszellen umfassen, die ebenfalls nach in der Technik wohlbekanntem Verfahren hergestellt werden können.

4.11 Ribozyme

[0214] Ribozyme sind enzymatische RNA-Moleküle, die bestimmte mRNA-Spezies spalten. In bestimmten Ausführungsformen ziehen die Erfinder die Auswahl und Verwendung von Ribozymen, die die RNA-Segmente der vorliegenden Erfindung spalten können, sowie ihre Verwendung zum Reduzieren der Aktivität von Ziel-mRNAs in bestimmten Zelltypen oder Geweben in Betracht.

[0215] Zur Zeit sind sechs Grundvarianten von natürlich vorkommenden enzymatischen RNAs bekannt. Jede kann unter physiologischen Bedingungen die Hydrolyse von RNA-Phosphodiesterbindungen in trans katalysieren (und somit andere RNA-Moleküle spalten). Im Allgemeinen wirken enzymatische Nucleinsäuren, indem sie zuerst an eine Ziel-RNA binden. Diese Bindung erfolgt über den Zielbindungsbereich einer enzymatischen Nucleinsäure, die in großer Nähe zu einem enzymatischen Teil des Moleküls gehalten wird, das die Spaltung der Ziel-RNA bewirkt. Die enzymatische Nucleinsäure erkennt also zuerst und bindet dann eine Ziel-RNA durch Paarung komplementärer Basen, und sobald sie an die richtige Stelle gebunden ist, wirkt sie enzymatisch, so dass die Ziel-RNA geschnitten wird. Durch die strategische Spaltung einer solchen Ziel-RNA wird ihre Fähigkeit, die Synthese eines codierten Proteins anzuleiten, zerstört. Nachdem eine enzymatische Nucleinsäure an ihre Ziel-RNA gebunden und sie gespalten hat, wird sie von dieser RNA freigesetzt und kann dadurch nach einem weiteren Ziel suchen und wiederholt neue Ziele binden und spalten.

[0216] Die enzymatische Natur eines Ribozyms ist gegenüber vielen Techniken, wie Antisense-Technik (wo

ein Nucleinsäuremolekül einfach an eine Zielnucleinsäure bindet und dadurch deren Translation blockiert), vorteilhaft, da die Konzentration an Ribozym, die notwendig ist, um eine therapeutische Behandlung zu beeinflussen, geringer ist als die eines Antisense-Oligonucleotids. Dieser Vorteil spiegelt die Fähigkeit des Ribozyms, enzymatisch zu wirken, wider. Ein einzelnes Ribozymmolekül ist also in der Lage, viele Moleküle Ziel-RNA zu spalten. Außerdem ist das Ribozym ein hochspezifischer Inhibitor, wobei die Spezifität der Hemmung nicht nur vom Basenpaarungsmechanismus der Bindung an die Ziel-RNA, sondern auch vom Mechanismus der Ziel-RNA-Spaltung abhängt. Einzelne Fehlpaarungen oder Basensubstitutionen in der Nähe der Spaltungsstelle können die katalytische Aktivität eines Ribozyms vollständig beseitigen. Ähnliche Fehlpaarungen in Antisense-Molekülen verhindern deren Wirkung nicht (Woolf et al., 1992). Somit ist die Wirkungsspezifität eines Ribozyms größer als die eines Antisense-Oligonucleotids, das an dieselbe RNA-Stelle bindet.

[0217] Das enzymatische Nucleinsäuremolekül kann als Hammerhead-, Hairpin-, Hepatitis- δ -Virus-, Gruppe-I-Intron- oder RNaseP-RNA- (in Verbindung mit einer RNA-Führungssequenz) oder Neurospora-VS-RNA-Motiv gebildet werden. Beispiele für Hammerhead-Motive werden von Rossi et al. (1992) beschrieben; Beispiele für Hairpin-Motive werden von Hampel et al. (Eur. Pat. EP 0 360 257), Hampel und Tritz (1989), Hampel et al. (1990) sowie Cech et al. (US-Pat. Nr. 5,631,359) beschrieben; ein Beispiel für das Hepatitis- δ -Virus-Motiv wird von Perrotta und Been (1992) beschrieben; ein Beispiel für das RNaseP-Motiv wird von Guerrier-Takada et al. (1983) beschrieben; das Neurospora-VS-RNA-Ribozymmotiv wird von Collins (Saville und Collins, 1990; Saville und Collins, 1991; Collins und Olive, 1993) beschrieben; und ein Beispiel für das Gruppe-I-Intron wird von Cech et al. (US-Pat. Nr. 4,987,071) beschrieben. Bei einem enzymatischen Nucleinsäuremolekül dieser Erfindung ist nur wichtig, dass es eine spezifische Substratbindungsstelle hat, die zu einem oder mehreren der Ziel-Gen-RNA-Bereiche komplementär ist, und dass es Nucleotidsequenzen innerhalb oder in der Umgebung dieser Substratbindungsstelle hat, die dem Molekül eine RNA-Spaltungsaktivität verleihen. Die Ribozymkonstrukte brauchen also nicht auf spezielle, hier erwähnte Motive beschränkt zu sein.

[0218] Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung einer Klasse von enzymatischen Spaltungsmitteln bereit, die ein hohes Maß an Spezifität für die RNA eines gewünschten Ziels aufweisen. Das enzymatische Nucleinsäuremolekül ist vorzugsweise auf einen hochgradig konservierten Sequenzbereich einer Ziel-mRNA gerichtet, so dass eine spezifische Behandlung einer Krankheit oder eines Zustands mit einer oder mehreren enzymatischen Nucleinsäuren bereitgestellt werden kann. Solche enzymatischen Nucleinsäuremoleküle können gegebenenfalls exogen an die spezifischen Zellen abgegeben werden. Alternativ dazu können die Ribozyme auch ausgehend von DNA- oder RNA-Vektoren, die an spezifische Zellen abgegeben werden, exprimiert werden.

[0219] Kleine enzymatische Nucleinsäuremotive (z.B. mit Hammerhead- oder Hairpin-Struktur) können für die exogene Abgabe verwendet werden. Die einfache Struktur dieser Moleküle erhöht die Fähigkeit der enzymatischen Nucleinsäure, in Zielbereiche der mRNA-Struktur vorzudringen. Alternativ dazu können katalytische RNA-Moleküle auch innerhalb von Zellen ausgehend von eukaryontischen Promotoren exprimiert werden (z.B. Scanlon et al., 1991; Kashani-Sabet et al., 1992; Dropulic et al., 1992; Weerasinghe et al., 1991; Ojwang et al., 1992; Chen et al., 1992; Sarver et al., 1990). Der Fachmann erkennt, dass jedes Ribozym in eukaryontischen Zellen ausgehend von dem geeigneten DNA-Vektor exprimiert werden kann. Die Aktivität solcher Ribozyme kann durch ihre Freisetzung aus dem primären Transcript durch ein zweites Ribozym erhöht werden (WO 93/23569; WO 94/02595; Ohkawa et al., 1992; Taira et al., 1991; Ventura et al., 1993).

[0220] Ribozyme können direkt hinzugefügt werden, oder sie können mit kationischen Lipiden, Lipidkomplexen komplexiert, innerhalb von Liposomen verpackt oder in anderer Weise an Zielzellen abgegeben werden. Die RNA oder die RNA-Komplexe können lokal ex vivo oder in vivo durch Injektion, Aerosolinhalation, mit Infusionspumpen oder Stents mit oder ohne Einarbeitung in Biopolymere an relevante Gewebe verabreicht werden.

[0221] Ribozyme können so gestaltet werden, wie es in WO 93/23569 oder WO 94/02595 beschrieben ist, und gemäß der Beschreibung synthetisiert werden, um sie in vitro und in vivo zu testen. Solche Ribozyme können auch für die Abgabe optimiert werden. Während spezielle Beispiele angegeben werden, wird sich der Fachmann darüber im Klaren sein, dass notfalls auch äquivalente RNA-Ziele in anderen Spezies verwendet werden können.

[0222] Hammerhead- oder Hairpin-Ribozyme können individuell durch Computer-Faltung analysiert werden (Jaeger et al., 1989), um zu bewerten, ob sich die Ribozymsequenzen zu der geeigneten Sekundärstruktur falten. Diejenigen Ribozyme mit ungünstigen intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den Bindungsarmen und dem katalytischen Kern werden von der Betrachtung ausgeschlossen. Variable Bindungsarm-längen kön-

nen gewählt werden, um die Aktivität zu optimieren. Im Allgemeinen sind wenigstens 5 Basen an jedem Arm in der Lage, an die Ziel-RNA zu binden oder in sonstiger Weise mit ihr in Wechselwirkung zu treten.

[0223] Ribozyme mit dem Hammerhead- oder Hairpin-Motiv können so gestaltet werden, dass sie an verschiedene Stellen der mRNA-Sequenz assoziieren, und sie können chemisch synthetisiert werden. Das verwendete Syntheseverfahren folgt dem Verfahren für die normale RNA-Synthese, wie es bei Usman et al. (1992) und bei Scaringe et al. (1990) beschrieben ist, und macht sich übliche Nucleinsäure-Schutz- und Koppelungsgruppen zu Nutze, wie Dimethoxytrityl am 5'-Ende und Phosphoramidite am 3'-Ende. Die Ausbeuten einer durchschnittlichen stufenweise erfolgenden Kopplung betragen typischerweise >98%. Hairpin-Ribozyme können in zwei Teilen synthetisiert und assoziiert werden, um ein aktives Ribozym zu rekonstruieren (Chowrira and Burke, 1992). Ribozyme können weitgehend modifiziert werden, um ihre Stabilität zu erhöhen, indem man die mit nucleaseresistenten Gruppen modifiziert, zum Beispiel 2'-Amino, 2'-C-Allyl, 2'-Fluor, 2'-O-Methyl, 2'-H (wegen einer Übersicht, siehe Usman und Cedergren, 1992). Ribozyme können durch Gelelektrophorese unter Verwendung von allgemeinen Verfahren oder durch HPLC (high pressure liquid chromatography) gereinigt und in Wasser resuspendiert werden.

[0224] Die Ribozymaktivität kann optimiert werden, indem man die Länge der Ribozymbindungsarme verändert oder indem man Ribozyme mit Modifikationen, die ihren Abbau durch Serum-Ribonucleasen verhindert (siehe z.B. WO 92/07065; Perreault et al, 1990; Pieken et al., 1991; Usman and Cedergren, 1992; WO 93/15187; WO 91/03162; EP-A-519 463 (EP 92110298.4); US-Pat. Nr. 5,334,711 und WO 94/13688, die verschiedene chemische Modifikationen beschreiben, die an den Zucker-Struktureinheiten von enzymatischen RNA-Molekülen vorgenommen werden können), Modifikationen, die ihre Wirksamkeit in Zellen verstärkt, und Entfernung von Stem-II-Basen, um die RNA-Synthesezeiten zu verkürzen und die chemischen Anforderungen zu reduzieren, chemisch synthetisiert.

[0225] WO 94/02595 beschreibt die allgemeinen Verfahren zur Abgabe von enzymatischen RNA-Molekülen. Ribozyme können durch eine Vielzahl von Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, an Zellen verabreicht werden; dazu gehören unter anderem die Verkapselung in Liposomen, die Iontophorese oder der Einbau in andere Vesikel, wie Hydrogele, Cyclodextrine, biologisch abbaubare Nanokapseln und bioadhäsive Mikrokugeln. Für einige Indikationen können Ribozyme auch mit oder ohne die oben genannten Träger direkt ex vivo in Zellen oder Gewebe abgegeben werden. Alternativ dazu kann die RNA-Träger-Kombination auch lokal durch direkte Inhalation, durch direkte Injektion oder unter Verwendung eines Katheters, einer Infusionspumpe oder eines Stents abgegeben werden. Weitere Verabreichungswege sind unter anderem die intravaskuläre, intramuskuläre, subkutane oder intraartikuläre Verabreichung, Aerosolinhalation, orale (Tabletten- oder Pillenform), topische, systemische, Okulare, intraperitoneale und/oder intrathekale Verabreichung. Ausführlichere Beschreibungen der Ribozymabgabe und -verabreichung werden in WO 94/02595 und WO 93/23569 angegeben.

[0226] Eine weitere Methode, um hohe Konzentrationen eines oder mehrerer Ribozyme innerhalb von Zellen zu akkumulieren, besteht darin, die Ribozym-codierenden Sequenzen in einen DNA-Expressionsvektor einzubauen. Die Transcription der Ribozymsequenzen wird von einem Promotor für eukaryontische RNA-Polymerase I (pol I), RNA-Polymerase II (pol II) oder RNA-Polymerase III (pol III) angetrieben. Transcripte ausgehend von pol-II- oder pol-III-Promotoren werden in allen Zellen auf hohem Niveau exprimiert; die Niveaus eines gegebenen pol-II-Promotors in einem gegebenen Zelltyp hängt von der Natur der genregulatorischen Sequenzen (Enhancer, Silencer) ab, die sich in der Nähe befinden. Es können auch prokaryontische RNA-Polymerase-Promotoren verwendet werden, vorausgesetzt, dass das prokaryontische RNA-Polymerase-Enzym in den geeigneten Zellen exprimiert wird (Elroy-Stein und Moss, 1990; Gao und Huang, 1993; Lieber et al., 1993; Zhou et al., 1990). Ausgehend von solchen Promotoren exprimierte Ribozyme können in Säugerzellen funktionieren (z.B. Kashani-Saber et al., 1992; Ojwang et al., 1992; Chen et al., 1992; Yu et al., 1993; L'Huillier et al., 1992; Lisziewicz et al., 1993). Solche Transcriptionseinheiten können für die Einführung in Säugerzellen in eine Vielzahl von Vektoren eingearbeitet werden; dazu gehören unter anderem Plasmid-DNA-Vektoren, virale DNA-Vektoren (wie Adenovirus oder Adenovirus-assoziierte Vektoren) oder virale RNA-Vektoren (wie retrovirale, Semliki-Forest-Virus, Sindbis-Virus-Vektoren).

[0227] Ribozyme dieser Erfindung können als diagnostische Werkzeuge verwendet werden, um Gendrift und Mutationen innerhalb von Zelllinien oder Zelltypen zu untersuchen. Sie können auch verwendet werden, um Konzentrationen des Ziel-RNA-Moleküls zu bewerten. Der enge Zusammenhang zwischen der Ribozymaktivität und der Struktur der Ziel-RNA ermöglicht den Nachweis von Mutationen in jedem Bereich des Moleküls, die die Basenpaarung und die dreidimensionale Struktur der Ziel-RNA verändern. Unter Verwendung mehrfacher Ribozyme, die in dieser Erfindung beschrieben werden, kann man Nucleotidveränderungen kartieren, die wich-

tig für die RNA-Struktur und Funktion in vitro sowie in Zellen und Geweben sind. Die Spaltung von Ziel-RNAs mit Ribozymen kann verwendet werden, um die Genexpression zu hemmen und die Rolle (im Wesentlichen) von spezifizierten Genprodukten in besonderen Zellen oder Zelltypen zu definieren.

4.12 Rekombinante Wirtszellen

[0228] Die Nucleotidsequenzen der vorliegenden Erfindung können in eine Vielzahl von mikrobiellen und eukaryontischen Wirten eingeführt werden. Von besonderem Interesse als Wirte für die rekombinante Expression von CryET70-Polypeptiden sind die Prokaryonten und niederen Eukaryonten, wie Pilze. Beispielhafte Prokaryonten, sowohl Gram-negative als auch Gram-positive, sind Enterobacteriaceae, wie Escherichia, Erwinia, Shigella, Salmonella und Proteus; Bacillaceae; Rhizobiceae, wie Rhizobium; Spirillaceae, wie Photobacterium, Zymomonas, Serratia, Aeromonas, Vibrio, Desulfovibrio, Spirillum; Lactobacillaceae; Pseudomonadaceae, wie Pseudomonas und Acetobacter; Azotobacteraceae, Actinomycetales und Nitrobacteraceae. Zu den Eukaryonten gehören Pilze, wie Phycomycetes und Ascomycetes, zum Beispiel Hefe, wie Saccharomyces und Schizosaccharomyces; sowie Basidiomycetes-Hefe, wie Rhodotorula, Aureobasidium und Sporobolomyces.

[0229] Zu den Merkmalen von besonderem Interesse bei der Auswahl einer Wirtszelle für Zwecke der Produktion gehören die leichte Einführbarkeit der genetischen Konstrukte der vorliegenden Erfindung in die Wirtszelle, die Verfügbarkeit von Expressionssystemen, die Effizienz der Expression, die Stabilität des interessierenden Gens in dem Wirt und die Anwesenheit von genetischen Hilfsfähigkeiten.

[0230] Eine große Zahl von Mikroorganismen, von denen bekannt ist, dass sie die Phylloplane (die Oberfläche der Blätter einer Pflanze) und/oder die Rhizosphäre (die Erde, die die Wurzeln einer Pflanze umgibt) einer Vielzahl von wichtigen Kulturpflanzen bewohnen, können ebenfalls wünschenswerte Wirtszellen für die Manipulation, Vermehrung, Lagerung, Abgabe und/oder Mutagenese der offenbarten genetischen Konstrukte sein. Zu diesen Mikroorganismen gehören Bakterien, Algen und Pilze. Von besonderem Interesse sind Mikroorganismen, wie Bakterien, z.B. die Gattungen Bacillus (einschließlich der Spezies und Subspezies B. thuringiensis kurstaki HD-1, B. thuringiensis kurstaki HD-73, B. thuringiensis sotto, B. thuringiensis berliner, B. thuringiensis thuringiensis, B. thuringiensis tolworthi, B. thuringiensis dendrolimus, B. thuringiensis alesti, B. thuringiensis galleriae, B. thuringiensis aizawai, B. thuringiensis subtoxicus, B. thuringiensis entomocidus, B. thuringiensis tenebrionis und B. thuringiensis san diego); Pseudomonas, Erwinia, Serratia, Klebsiella, Xanthomonas, Streptomyces, Rhizobium, Rhodopseudomonas, Methylophilus, Agrobacterium, Acetobacter, Lactobacillus, Arthrobacter, Azotobacter, Leuconostoc und Alcaligenes; Pilze, insbesondere Hefe, z.B. die Gattungen Saccharomyces, Cryptococcus, Kluyveromyces, Sporobolomyces, Rhodotorula und Aureobasidium. Von besonderem Interesse sind Bakterienspezies der Phytosphäre, wie Pseudomonas syringae, Pseudomonas fluorescens, Serratia marcescens, Acetobacter xylinum, Agrobacterium tumefaciens, Rhodobacter sphaeroides, Xanthomonas campestris, Rhizobium melioli, Alcaligenes eutrophus und Azotobacter vinlandii; sowie Hefespezies der Phytosphäre, wie Rhodotorula rubra, R. glutinis, R. marina, R. aurantiaca, Cryptococcus albidus, C. diffluens, C. laurentii, Saccharomyces rosei, S. pretoriensis, S. cerevisiae, Sporobolomyces roseus, S. odoratus, Kluyveromyces veronae und Aureobasidium pollulans.

[0231] Zu den Merkmalen von besonderem Interesse bei der Auswahl einer Wirtszelle für Zwecke der Produktion gehören die leichte Einführbarkeit der genetischen Konstrukte der vorliegenden Erfindung in die Wirtszelle, die Verfügbarkeit von Expressionssystemen, die Effizienz der Expression, die Stabilität des interessierenden Gens in dem Wirt und die Anwesenheit von genetischen Hilfsfähigkeiten. Zu den weiteren Überlegungen gehören die Leichtigkeit der Zubereitung und Handhabung, die Wirtschaftlichkeit und Lagerstabilität.

4.13 Polynucleotidsequenzen

[0232] DNA-Zusammensetzungen, die die insektizid aktiven Polypeptide der vorliegenden Erfindung codieren, sind für die Abgabe an Empfängerpflanzenzellen, bei der Erzeugung von pluripotenten Pflanzenzellen und letztlich bei der Produktion von insektenresistenten transgenen Pflanzen besonders bevorzugt. Zum Beispiel können DNA-Segmente in Form von Vektoren und Plasmiden oder lineare DNA-Fragmente, die in manchen Fällen nur das DNA-Element enthalten, das in der Pflanzenzelle exprimiert werden soll, eingesetzt werden.

[0233] Vektoren, Plasmide, Phagemide, Cosmide, virale Vektoren, Shuttle-Vektoren, Baculovirus-Vektoren, BACs (künstliche bakterielle Chromosomen), YACs (künstliche Hefechromosomen) und DNA-Segmente zur Verwendung bei der Transformation von Zellen mit einem δ -Endotoxin-codierenden Polynucleotid umfassen selbstverständlich im Allgemeinen wenigstens ein erstes Gen, das ein Polypeptid codiert, oder ein Gen, das ein Polypeptid codiert, welches wenigstens etwa 80% oder 85% oder 90% oder 95% Sequenzidentität mit der

in SEQ ID Nr. 2 offenbarten Aminosäuresequenz aufweist. Diese Nucleinsäurekonstrukte können ein oder mehrere Gene umfassen, die man in Empfängerzellen einführen möchte. Diese DNA-Konstrukte können gegebenenfalls Strukturen wie Promotoren, Enhancer, Polylinker oder regulatorische Gene umfassen. Das DNA-Segment oder Gen, das für die Einführung in eine Zelle ausgewählt wird, codiert häufig ein Polypeptid, das in den resultierenden rekombinanten Zellen exprimiert wird, was zu einer nachweisbaren oder selektierbaren Eigenschaft führt und/oder der transformierten Wirtszelle einen verbesserten Phänotyp verleiht. Alternativ dazu können die Nucleinsäurekonstrukte auch Antisense-Konstrukte oder Ribozymcodierende Bereiche enthalten, wenn die Abgabe oder Einführung solcher Nucleinsäurekonstrukte wünschenswert ist.

4.14 Verfahren zur Herstellung von mutagenisierten Polynucleotiden

[0234] Unter bestimmten Umständen kann es wünschenswert sein, ein oder mehrere Nucleotide in einer oder mehreren der hier offenbarten Polynucleotidsequenzen zu modifizieren oder zu verändern, um die insektizide Aktivität oder insektizide Spezifität des codierten Polypeptids zu modifizieren oder zu verändern. Im Allgemeinen sind die Mittel und Verfahren zum Mutagenisieren eines DNA-Segments dem Fachmann wohlbekannt. Modifikationen an solchen Segmenten können durch statistische oder ortsspezifische Mutageneseverfahren vorgenommen werden. Die Polynucleotide können durch die Addition, Deletion oder Substitution von einem oder mehreren Nucleotiden aus der Sequenz, die das insektizid aktive Polypeptid codiert, modifiziert werden.

[0235] Mutagenese kann gemäß einer der in der Technik bekannten Methoden durchgeführt werden, wie unter anderem das Synthetisieren eines Oligonucleotids, das eine oder mehrere Mutationen innerhalb der Sequenz eines bestimmten Bereichs aufweist. Insbesondere die ortsspezifische Mutagenese ist eine Technik, die für die Herstellung von Mutanten durch spezifische Mutagenese der zugrundeliegenden DNA geeignet ist. Die Technik liefert weiterhin eine gute Möglichkeit, um Sequenzvarianten, die zum Beispiel eine oder mehrere der obigen Überlegungen beinhalten, herzustellen und zu testen, indem man eine oder mehrere Änderungen der Nucleotidsequenz in die DNA einführt. Die ortsspezifische Mutagenese ermöglicht die Produktion von Mutanten durch die Verwendung von spezifischen Oligonucleotidsequenzen, die die DNA-Sequenz der gewünschten Mutation sowie eine ausreichende Anzahl von benachbarten Nucleotiden codieren, so dass man eine Primersequenz ausreichender Größe und Sequenzkomplexität erhält, um einen stabilen Duplex auf beiden Seiten der überquerten Deletionsverknüpfung zu bilden. Typischerweise wird ein Primer mit einer Länge von 17 bis 75 Nucleotiden oder mehr bevorzugt, wobei 10 bis 25 oder mehr Reste auf beiden Seiten der Verknüpfung der Sequenz verändert sind.

[0236] Im Allgemeinen ist die Technik der ortsspezifischen Mutagenese in der Technik wohlbekannt, wie durch verschiedene Publikationen beispielhaft belegt wird. Man wird sich darüber im Klaren sein, dass bei dieser Technik typischerweise ein Phagenvektor eingesetzt wird, der sowohl in einzelsträngiger als auch in doppelsträngiger Form existiert. Zu den typischen Vektoren, die für die ortsspezifische Mutagenese geeignet sind, gehören Vektoren wie der M13-Phage. Diese Phagen sind kommerziell leicht erhältlich, und ihre Verwendung ist dem Fachmann im Allgemeinen wohlbekannt. Doppelsträngige Plasmide werden ebenfalls routinemäßig bei der ortsspezifischen Mutagenese eingesetzt, wodurch der Schritt der Übertragung des interessierenden Gens von einem Plasmiden auf einen Phagen weggelassen werden kann.

[0237] Im Allgemeinen wird die im Einklang damit erfolgende ortsspezifische Mutagenese durchgeführt, indem man zuerst einen einzelsträngigen Vektor erhält oder zwei Stränge eines doppelsträngigen Vektors, der innerhalb seiner Sequenz eine DNA-Sequenz enthält, die den gewünschten Promotorbereich oder das gewünschte Peptid codiert, auseinanderschmilzt. Ein Oligonucleotidprimer, der die gewünschte mutierte Sequenz trägt, wird hergestellt, im Allgemeinen synthetisch. Dann wird dieser Primer mit dem einzelsträngigen Vektor assoziiert und DNA-polymerisierenden Enzymen, wie dem Klenow-Fragment der E.-coli-Polymerase I, ausgesetzt, um die Synthese des mutationstragenden Strangs zu beenden. So entsteht ein Heteroduplex, wobei ein Strang die ursprüngliche unmutierte Sequenz codiert und der zweite Strang die gewünschte Mutation trägt. Dann wird dieser Heteroduplexvektor verwendet, um geeignete Zellen, wie E.-coli-Zellen, zu transformieren oder zu transfizieren, und Klone, die rekombinante Vektoren enthalten, welche die mutierte Sequenzanordnung tragen, werden ausgewählt. Ein genetisches Selektionsschema wurde von Kunkel et al. (1987) entworfen, um Klone anzureichern, die das mutagene Oligonucleotid enthalten. Alternativ dazu kann auch die Verwendung von PCRTM mit kommerziell erhältlichen thermostabilen Enzymen, wie Taq-Polymerase, verwendet werden, um einen mutagenen Oligonucleotidprimer in ein amplifiziertes DNA-Fragment einzubauen, das dann in einen geeigneten Klonierungs- oder Expressionsvektor kloniert werden kann. Die PCRTM-vermittelten Mutageneseverfahren von Tomic et al. (1990) und Upender et al. (1995) liefern zwei Beispiele für solche Vorschriften. Eine PCRTM, bei der neben einer thermostabilen Polymerase auch eine thermostabile Ligase eingesetzt wird, kann ebenfalls verwendet werden, um ein phosphoryliertes mutagenes Oligonucleotid in das amplifizierte

DNA-Fragment einzubauen, das dann in einen geeigneten Klonierungs- oder Expressionsvektor kloniert werden kann. Das von Michael (1994) beschriebene Mutageneseverfahren liefert ein Beispiel für eine solche Vorschrift.

[0238] Die Herstellung von Sequenzvarianten der ausgewählten δ -Endotoxin-codierenden DNA-Segmente unter Verwendung von ortsspezifischer Mutagenese wird als Mittel zur Herstellung von potentiell nützlichen Spezies angegeben und ist nicht als Einschränkung gemeint, da es auch andere Methoden gibt, mit denen Sequenzvarianten von DNA-Sequenzen erhalten werden können. Zum Beispiel können rekombinante Vektoren, die die gewünschte Sequenz codieren, mit mutagenen Mitteln, wie Hydroxylamin, behandelt werden, um Sequenzvarianten zu erhalten.

[0239] Der hier verwendete Ausdruck "Oligonucleotid-spezifisches Mutageneseverfahren" bezieht sich auf matrizenabhängige Verfahren und vektorvermittelte Vermehrung, die zu einer Erhöhung der Konzentration eines speziellen Nucleinsäuremoleküls relativ zu seiner Anfangskonzentration oder zu einer Erhöhung der Konzentration eines nachweisbaren Signals, wie Amplifikation, führen. Der hier verwendete Ausdruck "Oligonucleotid-spezifisches Mutageneseverfahren" soll sich auch auf ein Verfahren beziehen, das die matrizenabhängige Verlängerung eines Primermoleküls beinhaltet. Der Ausdruck "matrizenabhängiger Vorgang" bezieht sich auf die Nucleinsäuresynthese eines RNA- oder DNA-Moleküls, wobei die Sequenz des neu synthetisierten Nucleinsäurestrangs durch die wohlbekanntesten Regeln der komplementären Basenpaarung (Watson, 1987) festgelegt wird. Typischerweise beinhalten vektorvermittelte Methoden die Einführung des Nucleinsäurefragments in einen DNA- oder RNA-Vektor, die klonale Amplifikation des Vektors und die Gewinnung des amplifizierten Nucleinsäurefragments. Beispiele für solche Methoden sind im US-Patent Nr. 4,237,224 angegeben.

[0240] Mehrere matrizenabhängige Verfahren sind verfügbar, um die interessierenden Zielsequenzen, die in einer Probe vorhanden sind, zu amplifizieren. Eines der am besten bekannten Amplifikationsverfahren ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCRTM), die im Einzelnen in den US-Patenten Nr. 4,683,195, 4,683,202 und 4,800,159 beschrieben ist. Kurz gesagt, bei der PCRTM werden zwei Primersequenzen hergestellt, die komplementär zu Bereichen auf entgegengesetzten komplementären Strängen der Zielsequenz sind. Ein Überschuss an Desoxynucleosidtriphosphaten wird zusammen mit einer DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) zu einem Reaktionsgemisch gegeben. Wenn die Zielsequenz in einer Probe vorhanden ist, binden die Primer an das Ziel, und die Polymerase bewirkt, dass die Primer durch Hinzufügen von Nucleotiden entlang der Zielsequenz verlängert werden. Durch Anheben und Absenken der Temperatur des Reaktionsgemischs dissoziieren die verlängerten Primer vom Ziel unter Bildung von Reaktionsprodukten, überschüssige Primer binden an das Ziel und an die Reaktionsprodukte, und der Vorgang wird wiederholt. Vorzugsweise kann ein Reverse-Transcriptase-PCRTM-Amplifikationsverfahren durchgeführt werden, um die Menge der amplifizierten mRNA zu quantifizieren. Methoden der Polymerase-Kettenreaktion sind in der Technik wohlbekannt.

[0241] Ein anderes Verfahren zur Amplifikation ist die Ligase-Kettenreaktion (als LCR bezeichnet), die in EP-A-320 308 offenbart ist. Bei der LCR werden zwei komplementäre Sondenpaare hergestellt, und in Gegenwart der Zielsequenz bindet jedes Paar an entgegengesetzte komplementäre Stränge des Ziels, so dass sie aneinanderstoßen. In Gegenwart einer Ligase verbinden sich die beiden Sondenpaare unter Bildung einer einzigen Einheit. Durch Temperaturwechsel wie bei der PCRTM dissoziieren gebundene ligierte Einheiten vom Ziel ab und dienen dann als "Zielsequenzen" für die Ligierung von überschüssigen Sondenpaaren. Das US-Patent Nr. 4,883,750 beschreibt ein alternatives Verfahren der Amplifikation, das der LCR ähnlich ist, zur Bindung von Sondenpaaren an eine Zielsequenz.

[0242] Qbeta-Replicase, die in WO 87/06270 (PCT/US 87/00880) beschrieben wird, kann in der vorliegenden Erfindung ebenfalls als weiteres Amplifikationsverfahren verwendet werden. Bei diesem Verfahren wird eine replikative RNA-Sequenz, die einen Bereich aufweist, der zu demjenigen eines Ziels komplementär ist, in Gegenwart einer RNA-Polymerase zu einer Probe gegeben. Die Polymerase kopiert die replikative Sequenz, die dann nachgewiesen werden kann.

[0243] Ein isothermes Amplifikationsverfahren, bei dem Restriktionsendonucleasen und Ligasen verwendet werden, um die Amplifikation von Zielmolekülen zu erreichen, welche Nucleotid-5'-[α -thio]triphosphate in einem Strang einer Restriktionsstelle enthalten (Walker et al., 1992), können ebenfalls für die Amplifikation von Nucleinsäuren in der vorliegenden Erfindung geeignet sein.

[0244] Strangverdrängungsamplifikation (SDA) ist ein weiteres Verfahren zur Durchführung einer isothermen Amplifikation von Nucleinsäuren, das mehrere Durchläufe von Strangverdrängung und Synthese, d.h. Nick-Translation, beinhaltet. Ein ähnliches Verfahren, das Reparatur-Kettenreaktion (RCR) genannt wird, ist

ein weiteres Amplifikationsverfahren, das für die vorliegende Erfindung geeignet sein kann und das die Assoziation mehrerer Sonden über einen ganzen Bereich, der für die Amplifikation vorgesehen ist, mit anschließender Reparaturreaktion beinhaltet, wobei nur zwei der vier Basen vorhanden sind. Die anderen zwei Basen können zum leichten Nachweis als biotinylierte Derivate hinzugefügt werden. Ein ähnlicher Ansatz wird bei der SDA verwendet.

[0245] Gemäß der vorliegenden Erfindung können noch andere Amplifikationsverfahren verwendet werden, die in GB-A-2 202 328 und in WO 89/09284 (PCT/US 89/01025) beschrieben sind. Bei der ersten Anmeldung werden "modifizierte" Primer in einer PCRTM-artigen, matrizen- und enzymabhängigen Synthese verwendet. Die Primer können durch Markierung mit einer Abfangeinheit (z.B. Biotin) und/oder einer Detektoreinheit (z.B. Enzym) modifiziert sein. Bei der letzteren Anmeldung wird ein Überschuss an markierten Sonden zu einer Probe gegeben. In Gegenwart der Zielsequenz bindet die Sonde und wird katalytisch gespalten. Nach der Spaltung wird die Zielsequenz intakt freigesetzt und durch überschüssige Sonde gebunden. Die Spaltung der markierten Sonden signale signalisiert die Anwesenheit der Zielsequenz.

[0246] Weitere Nucleinsäure-Amplifikationsverfahren sind auf Transcription basierende Amplifikationssysteme (TAS) (Kwoh et al., 1989; WO 88/10315); dazu gehören die auf einer Nucleinsäuresequenz basierende Amplifikation (NASBA) und 3SR. Bei der NASBA können die Nucleinsäuren für die Amplifikation durch Standard-Phenol/Chloroform-Extraktion, Hitzedenaturierung einer Probe, Behandlung mit Lysepuffer und Minispin-Säulen für die Isolierung von DNA und RNA oder Guanidiniumchlorid-Extraktion von RNA vorbereitet werden. Diese Amplifikationstechniken beinhalten die Assoziation eines Primers, der Kristallprotein-spezifische Sequenzen aufweist. Nach der Polymerisation werden DNA/RNA-Hybride mit RNase H abgebaut, während doppelsträngige DNA-Moleküle erneut hitzedenaturiert werden. In beiden Fällen wird die einzelsträngige DNA durch Zugabe eines zweiten Kristallprotein-spezifischen Primers vollständig doppelsträngig gemacht, und anschließend erfolgt eine Polymerisation. Dann werden die doppelsträngigen DNA-Moleküle durch eine Polymerase wie T7 oder SP6 mehrfach transkribiert. In einer isothermen cyclischen Reaktion werden die RNAs einer Reversen Transcription zu doppelsträngiger DNA unterzogen und noch einmal mit einer Polymerase, wie T7 oder SP6, transkribiert. Die resultierenden Produkte, ob sie nun verkürzt oder vollständig sind, zeigen Kristallprotein-spezifische Sequenzen an.

[0247] EP-A-329 822 offenbart ein Nucleinsäure-Amplifikationsverfahren, das das cyclische Synthetisieren von einzelsträngiger RNA ("ssRNA"), ssRNA und doppelsträngiger DNA (dsDNA) beinhaltet und gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann. Die ssRNA ist eine erste Matrize für ein erstes Primer-Oligonucleotid, das durch Reverse Transcriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) verlängert wird. Dann wird die RNA durch die Einwirkung von Ribonuclease H (RNase H, eine RNase, die für RNA in einem Duplex mit entweder DNA oder RNA spezifisch ist) aus dem resultierenden DNA:RNA-Duplex entfernt. Die resultierende ssDNA ist eine zweite Matrize für einen zweiten Primer, der ebenfalls die Sequenzen eines RNA-Polymerase-Promotors (zum Beispiel T7-RNA-Polymerase) 5' von seiner Homologie zu seiner Matrize beinhaltet. Dann wird dieser Primer durch DNA-Polymerase (zum Beispiel das große "Klenow"-Fragment von E.-coli-DNA-Polymerase I) verlängert, was zu einem doppelsträngigen DNA-Molekül (dsDNA) führt, das eine Sequenz, die mit derjenigen der ursprünglichen RNA identisch ist, zwischen den Primern und zusätzlich an einem Ende eine Promotorsequenz aufweist. Diese Promotorsequenz kann von der geeigneten RNA-Polymerase verwendet werden, um viele RNA-Kopien von der DNA herzustellen. Diese Kopien können dann wieder in den Kreislauf eintreten, was zu einer sehr raschen Amplifikation führt. Bei einer geeigneten Wahl der Enzyme kann diese Amplifikation isotherm erfolgen, ohne in jedem Zyklus Enzyme hinzuzufügen. Wegen der cyclischen Natur dieses Vorgangs kann die Startsequenz so gewählt werden, dass sie in Form von entweder DNA oder RNA vorliegt.

[0248] WO 89/06700 offenbart ein Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsschema auf der Basis der Hybridisierung einer Promotor/Primer-Sequenz mit einer einzelsträngigen Ziel-DNA ("ssDNA") und anschließender Transcription vieler RNA-Kopien der Sequenz. Dieses Schema ist nicht cyclisch, d.h. aus den resultierenden RNA-Transcripten werden keine neuen Matrizen produziert. Weitere Amplifikationsverfahren sind "RACE" (Frohmann, 1990) und "einseitige PCRTM" (Ohara et al., 1989), die dem Fachmann wohlbekannt sind.

[0249] Verfahren auf der Basis einer Ligierung von zwei (oder mehr) Oligonucleotiden in Gegenwart einer Nucleinsäure mit der Sequenz des resultierenden "Dioligonucleotids", wodurch das Dioligonucleotid amplifiziert wird (Wu und Dean, 1996), können bei der Amplifikation von Polynucleotidsequenzen der vorliegenden Erfindung ebenfalls verwendet werden.

4.15 Posttranscriptionale Ereignisse, die die Expression von Transgenen in Pflanzen beeinflussen

[0250] In vielen Fällen zeigt das Transcriptionsniveau eines bestimmten Transgens in einer gegebenen Wirtszelle nicht immer die Menge des Proteins an, das in der transformierten Wirtszelle produziert wird. Dies ist häufig auf posttranscriptionale Vorgänge, wie Spleißen, Polyadenylierung, geeignete Translationseinleitung und RNA-Stabilität zurückzuführen, die die Fähigkeit eines Transcripts zur Produktion von Protein beeinflussen. Solche Faktoren können auch die Stabilität und Menge der ausgehend von einem gegebenen Transgen erzeugten mRNA beeinflussen. Daher ist es häufig wünschenswert, die posttranscriptionalen Ereignisse durch besondere molekularbiologische Techniken zu verändern. Die Erfinder gehen davon aus, dass es in bestimmten Fällen wünschenswert sein kann, die Transcription und/oder Expression der Polypeptid-codierenden Nucleinsäurekonstrukte der vorliegenden Erfindung zu verändern, um diese Konstrukte in bestimmten Wirtszellen und/oder transgenen Pflanzen zu erhöhen, zu senken oder in sonstiger Weise zu regulieren oder zu steuern.

4.15.1 Effiziente Einleitung der Proteintranslation

[0251] Die 5'-untranslatierte (5'-UTL) Leitsequenz von eukaryontischer mRNA spielt eine größere Rolle bei der Translationseffizienz. Bei vielen frühen chimären Transgenen, bei denen ein viraler Promotor verwendet wird, wird nach der Transcriptionsstartstelle eine willkürliche Länge einer viralen Sequenz verwendet und mit dem AUG des codierenden Bereichs fusioniert. Vor kurzem haben Studien gezeigt, dass die 5'-UTL-Sequenz und die Sequenzen, die das AUG direkt umgeben, eine große Wirkung auf die Translationseffizienz von Wirtszellen und insbesondere bestimmten Pflanzenspezies haben können und dass diese Wirkung je nach den besonderen Zellen oder Geweben, in denen die Sequenz exprimiert wird, unterschiedlich sein können.

[0252] Bei den meisten eukaryontischen mRNAs befindet sich der Punkt der Translationseinleitung am AUG-Codon, das der 5'-Endgruppe des Transcripts am nächsten ist. Ein Vergleich von Pflanzen-mRNA-Sequenzen und Experimenten zur ortsspezifischen Mutagenese haben die Existenz einer Consensussequenz nachgewiesen, die das Startcodon bei Pflanzen umgibt, und zwar 5'-UAAACAAUGGCU-3' (SEQ ID Nr. 4) (Joshi, 1987; Lutcke et al., 1987). Consensussequenzen treten jedoch auch unter individuellen Pflanzenspezies auf. Zum Beispiel ergibt eine Zusammenstellung von Sequenzen, die das Startcodon aus 85 Maisgenen umgeben, einen Consensus von 5'-(C/G)AUGGCG-3' (Luehrsen et al., 1994). Bei Tabakprotoplasten zeigten Transgene, die β -Glucuronidase (GUS) und bakterielle Chitinase codierten, eine Erhöhung der Expression auf das Vierfache bzw. Achtfache, wenn die nativen Sequenzen dieser Gene so geändert wurden, dass sie 5'-ACAUGG-3' codieren (Gallie et al., 1987b; Jones et al., 1988).

[0253] Wenn chimäre Transgene (d.h. Transgene, die DNA-Segmente aus unterschiedlichen Quellen umfassen, die funktionell miteinander verknüpft sind) produziert werden, wird häufig das 5'-UTL von Pflanzenviren verwendet. Es hat sich gezeigt, dass die 5'-UTL des Hüllproteins des Luzernemosaikvirus (AMV) und des Hüllproteins des Weidelgrasmosaikvirus (BMV) die mRNA-Translation bei einer Elektroporation unterzogenen Tabakprotoplasten auf das Achtfache verstärken (Gallie et al., 1987a; 1987b). Es hat sich gezeigt, dass ein 67-Nucleotid-Derivat (Ω) des 5'-UTL von Tabakmosaikvirus-RNA (TMV), das mit dem Chloramphenicol-Acetyltransferase(CAT)-Gen und dem GUS-Gen fusioniert ist, die Translation von Reporter-Genen in vitro verstärkt (Gallie et al., 1987a; 1987b; Sleat et al., 1987; Sleat et al., 1988). Die Elektroporation von Tabakmesophyllprotoplasten mit Transkripten, die den TMV-Leader enthalten, der mit den Reportergen CAT, GUS und LUC fusioniert ist, ergaben ein 33faches, 21faches bzw. 36faches Niveau der Verstärkung (Gallie et al., 1987a; 1987b; Gallie et al., 1991). Auch bei Tabak wurde gezeigt, dass ein 83-nt-5'-UTL von Kartoffelvirus-X-RNA die Expression von Neomycin-Phosphotransferase II (NptII) auf das Vierfache verstärkt (Poogin und Skryabin, 1992).

[0254] Die Wirkung eines 5'-UTL kann je nach Pflanze, insbesondere zwischen Zweikeimblättrigen und Einkeimblättrigen, unterschiedlich sein. Es hat sich gezeigt, dass das TMV-5'-UTL in Tabakprotoplasten (Gallie et al., 1989) effektiver ist als in Maisprotoplasten (Gallie und Young 1994). Außerdem funktionierten die 5'-UTL von TMV- Ω (Gallie et al., 1988), AMV-Hüllprotein (Gehrke et al., 1983; Jobling und Gehrke, 1987), TMV-Hüllprotein (Goelet et al., 1982) und BMV-Hüllprotein (French et al., 1986) in Mais nur schlecht und hemmten die Expression eines Luciferase-Gens in Mais relativ zum nativen Leader (Koziel et al., 1996). Die 5'-UTL aus dem 35S-Transcript von Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) und den Maisgenen Glutelin (Boronat et al., 1986), PEP-Carboxylase (Hudspeth und Grula, 1989) und Ribulosebiphosphat-Carboxylase zeigten eine beträchtliche Erhöhung der Expression des Luciferase-Gens in Mais relativ zum nativen Leader (Koziel et al., 1996).

[0255] Diese 5'-UTL hatten in Tabak unterschiedliche Wirkungen. Im Gegensatz zu Mais verstärkten das TMV- Ω -5'-UTL und das 5'-UTL des AMV-Hüllproteins die Expression in Tabak, während die 5'-UTL von Glute-

lin, Mais-PEP-Carboxylase und Mais-Rribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase keine Verstärkung relativ zum nativen Luciferase-5'-UTL zeigten (Koziel et al., 1996). Nur das 5'-UTL des CaMV 35S verstärkte die Luciferase-Expression sowohl bei Mais als auch bei Tabak (Koziel et al., 1996). Weiterhin waren die 5'-UTL von TMV- und BMV-Hüllprotein sowohl bei Mais- als auch bei Tabakprotoplasten hemmend (Koziel et al., 1996).

4.15.2 Verwendung von Introns zur Erhöhung der Expression

[0256] Es hat sich gezeigt, dass der Einschluss von einem oder mehreren Introns in den transkribierten Teil eines Gens die Expression heterologer Gene bei einer Vielzahl von Pflanzensystemen erhöht (Callis et al., 1987; Maas et al., 1991; Mascerenhas et al., 1990; McElroy et al., 1990; Vasil et al., 1989), obwohl nicht alle Introns eine stimulatorische Wirkung haben und der Grad der Stimulation variiert. Die verstärkende Wirkung von Introns scheint bei Einkeimblättrigen häufiger aufzutreten als bei Zweikeimblättrigen. Tanaka et al. (1990) haben gezeigt, dass die Verwendung des Catalase-Introns 1, das aus *Ricinus* isoliert wird, die Genexpression in Reis erhöht. Ähnlich hat sich auch gezeigt, dass das erste Intron der Alkohol-Dehydrogenase 1 (*Adh1*) die Expression eines genomischen Klon von *Adh1*, der den endogenen Promotor umfasst, in transformierten Maiszellen erhöht (Callis et al., 1987; Dennis et al., 1984). Weitere Introns, die ebenfalls in der Lage sind, die Expression von Transgenen, die sie enthalten, zu erhöhen, sind die Introns 2 und 6 von *Adh1* (Luehrsen und Walbot, 1991), das Catalase-Intron (Tanaka et al., 1990), das Intron 1 des Mais-Bronze-1-Gens (Callis et al., 1987), das Intron 1 der Mais-Sucrose-Synthase (Vasil et al., 1989), das Intron 3 des Reis-Actin-Gens (Luehrsen und Walbot, 1991), das Intron 1 des Reis-Actins (McElroy et al., 1990) und das Exon 1 des Mais-Ubiquitins (Christensen et al., 1992).

[0257] Um eine optimale Expression zu erreichen, sollten die ausgewählten Introns im Allgemeinen in der 5'-Transcriptionseinheit in der korrekten Orientierung in Bezug auf die Spleißverknüpfungssequenzen vorhanden sein (Callis et al., 1987; Maas et al., 1991; Mascerenhas et al., 1990; Oard et al., 1989; Tanaka et al., 1990; Vasil et al., 1989). Es hat sich gezeigt, dass Intron 9 von *Adh1* die Expression eines heterologen Gens erhöht, wenn es 3' (oder stromabwärts) des interessierenden Gens platziert wird (Callis et al., 1987).

4.15.3 Verwendung von synthetischen Genen zur Erhöhung der Expression von heterologen Genen in Pflanzen

[0258] Wenn man ein prokaryontisches Gen in einen eukaryontischen Wirt einführt oder wenn man ein eukaryontisches Gen in einen nichtnativen Wirt einführt, muss die Sequenz des Gens häufig verändert oder modifiziert werden, um eine effiziente Translation des bzw. der von dem Gen abgeleiteten Transcripte zu ermöglichen. Beträchtliche Erfahrung bei der Verwendung von synthetischen Genen zur Erhöhung der Expression eines gewünschten Proteins wurde bei der Expression von *Bacillus thuringiensis* in Pflanzen erreicht. Native *B.-thuringiensis*-Gene werden in Zweikeimblättrigen häufig nur auf geringem Niveau und in vielen Spezies von Einkeimblättrigen zuweilen überhaupt nicht exprimiert (Koziel et al., 1996). Die Codonverwendung in den nativen Genen unterscheidet sich beträchtlich von derjenigen, die man in typischen Pflanzengenen findet, die einen höheren G+C-Gehalt haben. Strategien zur Erhöhung der Expression dieser Gene in Pflanzen verändern im Allgemeinen den Gesamt-G+C-Gehalt der Gene. Zum Beispiel führten synthetische Gene, die *B.-thuringiensis*-Kristallprotein codieren, zu erheblichen Verbesserungen der Expression dieser Endotoxine bei verschiedenen Kulturpflanzen einschließlich Baumwolle (Perlak et al., 1990; Wilson et al., 1992), Tomate (Perlak et al., 1991), Kartoffel (Perlak et al., 1993), Reis (Cheng et al., 1998) und Mais (Koziel et al., 1993).

[0259] In ähnlicher Weise gehen die Erfinder davon aus, dass die genetischen Konstrukte der vorliegenden Erfindung, da sie ein oder mehrere Gene bakteriellen Ursprungs enthalten, unter bestimmten Umständen verändert werden können, um die Expression dieser von Prokaryonten abgeleiteten Gene in bestimmten eukaryontischen Wirtszellen und/oder transgenen Pflanzen, die solche Konstrukte umfassen, zu erhöhen. Mit Hilfe von molekularbiologischen Techniken, die dem Fachmann wohlbekannt sind, kann man die codierenden oder nichtcodierenden Sequenzen der besonderen CryET70-codierenden Gensequenzen so verändern, dass ihre Expression in transformierten Pflanzenzellen auf ausreichendem Niveau, um Insektenbefall oder -angriff bei solchen transgenen Pflanzen zu verhindern oder zu reduzieren, optimiert oder erleichtert wird.

4.15.4 Chloroplasten-Sequestrierung und -Zielsteuerung

[0260] Ein anderer Ansatz, um die Expression von A+T-reichen Genen in Pflanzen zu erhöhen, wurde bei der Transformation von Tabakchloroplasten nachgewiesen. Hohe Niveaus der Expression von unmodifizierten *Bacillus-thuringiensis*-Kristallproteincodierenden Genen in Tabak wurde von McBride et al. (1995) berichtet.

[0261] Außerdem wurden Verfahren zur Zielsteuerung von Proteinen zum Chloroplasten entwickelt. Diese Technik, die sich das Transitpeptid des Erbsenchloroplasten zu Nutze macht, wird verwendet, um die Enzyme des Polyhydroxybutyrat-Synthesewegs zum Chloroplasten zu lenken (Nawrath et al., 1994). Außerdem wurde bei dieser Technik die Notwendigkeit einer Modifikation des codierenden Bereichs, außer der Hinzufügung einer geeigneten Zielsteuerungssequenz, vermieden.

[0262] Das US-Patent 5,576,198 offenbart Zusammensetzungen und Verfahren, die für die gentechnische Veränderung von Pflanzenzellen geeignet sind, so dass man ein Verfahren zur Steuerung des Zeitverhaltens oder Gewebemusters der Expression von Fremd-DNA-Sequenzen, die in das Pflanzenplastidgenom eingesetzt sind, erhält. Zu den Konstrukten gehören solche zur Zellkerntransformation, die für die Expression einer einzelnen Untereinheit einer viralen RNA-Polymerase in Pflanzengewebe sorgen, und die Zielsteuerung des exprimierten Polymeraseproteins zu Pflanzenzellplastiden. Dazu gehören auch Plastidexpressionskonstrukte, die einen viralen Genpromotorbereich, der spezifisch für die RNA-Polymerase ist, die ausgehend von den oben beschriebenen Zellkernexpressionskonstrukten exprimiert wird, und ein interessierendes heterologes Gen, das in den transformierten Plastidzellen exprimiert werden soll, umfassen.

4.15.5 Wirkungen von 3'-Bereichen auf die Transgen-Expression

[0263] Es hat sich gezeigt, dass die 3'-Endbereiche von Transgenen eine große Wirkung auf die Transgenexpression in Pflanzen hat (Ingelbrecht et al., 1989). In dieser Studie wurden verschiedene 3'-Enden funktionell mit dem Neomycin-Phosphotransferase-II(NptII)-Reporter-Gen verknüpft und in transgenem Tabak exprimiert. Die verschiedenen verwendeten 3'-Enden wurden vom Octopin-Synthase-Gen, dem 2S-Samenprotein von Arabidopsis, der kleinen Untereinheit von rbcS aus Arabidopsis, der Verlängerung aus der Karotte und der Chalcon-Synthase aus Antirrhinum erhalten. In stabilen Tabaktransformanten gab es etwa einen sechzigfachen Unterschied zwischen dem am besten exprimierenden Konstrukt (3'-Ende der kleinen Untereinheit von rbcS) und dem am geringsten exprimierenden Konstrukt (3'-Ende der Chalcon-Synthase).

Tabelle 6

Pflanzenpromotoren

Promotor	Literaturstelle
Viral	
Braunwurz-Mosaikvirus (FMV)	US-Pat. Nr. 5,378,619
Blumenkohlmosaikvirus (CaMV)	US-Pat. Nr. 5,530,196
	US-Pat. Nr. 5,097,025
	US-Pat. Nr. 5,110,732
Pflanzlich	
Verlängerungsfaktor	US-Pat. Nr. 5,177,011
Tomaten-Polygalacturonase	US-Pat. Nr. 5,442,052
<i>Arabidopsis</i> -Histon H4	US-Pat. Nr. 5,491,288
Phaseolin	US-Pat. Nr. 5,504,200
Gruppe 2	US-Pat. Nr. 5,608,144
Ubiquitin	US-Pat. Nr. 5,614,399
P119	US-Pat. Nr. 5,633,440
α -Amylase	US-Pat. Nr. 5,712,112
Viraler Enhancer/pflanzlicher Promotor	
CaMV-35S-Enhancer/Mannopin-Synthase-Promotor	US-Pat. Nr. 5,106,739

Tabelle 7

Gewebespezifische Pflanzenpromotoren

Gewebespezifischer Promotor	Gewebe	Literaturstelle
Blec	Epidermis	US-Pat. Nr. 5,646,333
Malat-Synthase	Samen; Sämlinge	US-Pat. Nr. 5,689,040
Isocitrat-Lyase	Samen; Sämlinge	US-Pat. Nr. 5,689,040
Patatin	Knolle	US-Pat. Nr. 5,436,393
ZRP2	Wurzel	US-Pat. Nr. 5,633,363
ZRP2(2.0)	Wurzel	US-Pat. Nr. 5,633,363
ZRP2(1.0)	Wurzel	US-Pat. Nr. 5,633,363
RB7	Wurzel	US-Pat. Nr. 5,459,252
	Wurzel	US-Pat. Nr. 5,401,836
	Frucht	US-Pat. Nr. 4,943,674
	Meristem	US-Pat. Nr. 5,589,583
	Wächterzelle	US-Pat. Nr. 5,538,879
	Staubblatt	US-Pat. Nr. 5,589,610
SodA1	Pollen; Mittelschicht; Stomium der Staubbeutel	Van Camp et al., 1996
SodA2	Gefäßbündel; Stomata; Achselknospen; Perizykel; Stomium; Pollen	Van Camp et al., 1996
CHS15	Blüten; Wurzelspitzen	Faktor et al., 1996
Psam-1	Phloemgewebe; Rinde; Wurzelspitzen	Vander et al., 1996
ACT11	Streckungsgewebe und -organe; Pollen; Ovarien	Huang et al., 1997
zmGBS	Pollen; Endosperm	Russell and Fromm, 1997
zmZ27	Endosperm	Russell and Fromm, 1997
osAGP	Endosperm	Russell and Fromm, 1997

osGT1	Endosperm	Russell and Fromm, 1997
RoIC	Phloemgewebe; Bündelscheide; Gefäßparenchym	Graham et al., 1997
Sh	Phloemgewebe	Graham et al., 1997
CMd	Endosperm	Grosset et al., 1997
Bnm1	Pollen	Treacy et al., 1997
Reis-Tungro- Bacilliform-Virus	Phloem	Yin et al., 1997a; 1997b
S2-RNase	Pollen	Ficker et al., 1998
LeB4	Samen	Baumlein et al., 1991
gf-2.8	Samen; Sämlinge	Berna and Bernier, 1997

[0264] Die Fähigkeit, Gene in Pflanzen in gewebespezifischer Weise zu exprimieren, führte zur Produktion von männlichen und weiblichen sterilen Pflanzen. Im Allgemeinen beinhaltet die Produktion von männlichen sterilen Pflanzen die Verwendung von Staubbeutel-spezifischen Promotoren, die funktionell mit heterologen Genen verknüpft sind, welche die Pollenbildung unterdrücken (US-Patente Nr. 5,689,051; 5,689,049; 5,659,124). Das US-Patent Nr. 5,633,441 offenbart ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit weiblicher genetischer Sterilität. Das Verfahren umfasst die Verwendung von Griffelzellen-, Narbenzellen- oder Griffel- und Narbenzellen-spezifischen Promotoren, die Polypeptide exprimieren, welche, wenn sie in den Zellen der Pflanze produziert werden, die Zellen abtöten oder ihren Stoffwechsel, ihre Funktionsweise oder Entwicklung erheblich stören.

Tabelle 8

Induzierbare Pflanzenpromotoren

Promotor	Literaturstelle
Hitzeschockpromotor	US-Pat. Nr. 5,447,858
Em	US-Pat. Nr. 5,139,954
Adh1	Kyozoka et al., 1991
HMG2	US-Pat. Nr. 5,689,056
Cinnamylalkohol-Dehydrogenase	US-Pat. Nr. 5,633,439
Asparagin-Synthase	US-Pat. Nr. 5,595,896
GST-II-27	US-Pat. Nr. 5,589,614

4.16 Peptidnucleinsäurezusammensetzungen

[0265] In bestimmten Ausführungsformen ziehen die Erfinder die Verwendung von Peptidnucleinsäuren (PNAs) bei der praktischen Durchführung der Verfahren der Erfindung in Betracht. PNA ist ein DNA-Analogon, bei dem die Nucleobasen an ein Pseudopeptid-Rückgrat gebunden sind (Good und Nielsen, 1997). PNA kann bei mehreren Verfahren verwendet werden, bei denen traditionell RNA oder DNA verwendet wurde. Häufig sind PNA-Sequenzen in Techniken leistungsfähiger als die entsprechenden RNA- oder DNA-Sequenzen und haben nützliche Eigenschaften, die weder RNA noch DNA zu eigen sind. Ein ausgezeichneter Überblick über PNA einschließlich Herstellungsverfahren, Charakteristiken und Verwendungsverfahren wird von Corey (1997) gegeben.

4.16.1 Verfahren zur Herstellung von PNAs

[0266] Nach Corey haben PNAs 2-Aminoethylglycin-Bindungen, die das normale Phosphodiester-Gerüst der DNA ersetzen (Nielsen et al., 1991; Harvey et al., 1992; Hyrup and Nielsen, 1996; Nielsen, 1996). Diese Chemie hat drei wichtige Konsequenzen: erstens sind PNAs im Gegensatz zu DNA oder Phosphorothioat-Oligonucleotiden neutrale Moleküle; zweitens sind PNAs achiral, so dass die Notwendigkeit, eine stereoselektive Synthese zu entwickeln, vermieden wird; und drittens werden bei der PNA-Synthese Standard-Boc- (Dueholm et al., 1994) oder Fmoc-Vorschriften (Thomson et al., 1995) für die Festphasenpeptidsynthese verwendet, obwohl auch andere Verfahren einschließlich eines modifizierten Merrifield-Verfahrens verwendet werden (Christensen et al., 1995).

[0267] PNA-Monomere oder fertige Oligomere sind von PerSeptive Biosystems (Framingham, Mass., USA) kommerziell erhältlich. PNA-Synthesen entweder anhand von Boc- oder von Fmoc-Vorschriften sind geradlinig und verwenden Vorschriften für manuelle oder automatische Synthese (Norton et al., 1995). Die manuelle Vorschrift widmet sich der Herstellung von chemisch modifizierten PNAs oder der gleichzeitigen Synthese von Familien von nahe verwandter PNAs.

[0268] Wie bei der Peptidsynthese hängt der Erfolg einer besonderen PNA-Synthese von den Eigenschaften der gewählten Sequenz ab. Während PNAs in der Theorie zum Beispiel jede Kombination von Nucleotidbasen enthalten können, kann die Anwesenheit von benachbarten Purinresten zu Deletionen von einem oder mehreren Resten im Produkt führen. In Erwartung dieser Schwierigkeit wird vorgeschlagen, dass man bei der Herstellung von PNAs mit benachbarten Purinresten die Kopplung von Resten, die wahrscheinlich ineffizient adiert wurden, wiederholen sollte. Danach sollte eine Reinigung von PNAs durch Umkehrphasen-HPLC (Norton et al., 1995) erfolgen, die Ausbeuten und eine Reinheit des Produkts ähnlich denjenigen ergibt, die man während der Synthese von Peptiden beobachtet.

[0269] Corey diskutiert weiterhin gewünschte Modifikationen von PNAs für gegebene Anwendungen. Modifikationen können durch Kopplung von Aminosäuren während der Festphasensynthese oder durch Binden von Verbindungen, die eine Carbonsäuregruppe enthalten, an das exponierte N-terminale Amin bewerkstelligt werden. Alternativ dazu können PNAs nach der Synthese durch Kopplung an einen eingeführten Lysin- oder Cysteinrest modifiziert werden. Die Leichtigkeit, mit der PNAs modifiziert werden können, erleichtert die Optimierung im Hinblick auf eine bessere Löslichkeit oder spezifische funktionelle Anforderungen. Sobald sie synthetisiert sind, kann die Identität von PNAs und ihrer Derivate durch Massenspektrometrie bestätigt werden. In mehreren Studien wurden Modifikationen von PNAs hergestellt und verwendet (Norton et al., 1995; Haaima et al., 1996; Stetsenko et al., 1996; Petersen et al., 1995; Ulmann et al., 1996; Koch et al., 1995; Orum et al., 1995; Footer et al., 1996; Griffith et al., 1995; Kremisky et al., 1996; Pardridge et al., 1995; Boffa et al., 1995; Landsdorp et al., 1996; Gambacorti-Passerini et al., 1996; Armitage et al., 1997; Seeger et al., 1997; Rusckowski et al., 1997). Das US-Pat. Nr. 5,700,922 diskutiert chimäre PNA-DNA-PNA-Moleküle und ihre Verwendungen in der Diagnostik, zur Modulation von Protein in Organismen und zur Behandlung von Zuständen, die für Therapeutika zugänglich sind.

4.16.2 Physikalische Eigenschaften von PNAs

[0270] Im Gegensatz zu DNA und RNA, die negativ geladene Verknüpfungen enthalten, ist das PNA-Gerüst neutral. Trotz dieser dramatischen Veränderung erkennen PNAs komplementäre DNA und RNA durch Watson-Crick-Paarung (Egholm et al., 1993), was den ursprünglichen Modellansatz von Nielsen et al. (1991) bestätigt. PNAs fehlt die 3'-nach-5'-Polarität, und sie können entweder parallel oder antiparallel binden, wobei der antiparallele Modus bevorzugt wird (Egholm et al., 1993).

[0271] Die Hybridisierung von DNA-Oligonucleotiden mit DNA und RNA wird durch elektrostatische Abstoßung zwischen den negativ geladenen Phosphatgerüsten der komplementären Stränge destabilisiert. Dagegen erhöht die Abwesenheit von Ladungsabstoßung in PNA-DNA- oder PNA-RNA-Duplexen die Schmelztemperatur (T_m) und reduziert die Abhängigkeit der T_m von der Konzentration an ein- oder zweiwertigen Kationen (Nielsen et al., 1991). Die erhöhte Rate und Affinität der Hybridisierung sind signifikant, da sie für die überraschende Fähigkeit von PNAs zur Durchführung einer Stranginvasion von komplementären Sequenzen innerhalb von relaxierter doppelsträngiger DNA verantwortlich sind. Außerdem lässt die effiziente Hybridisierung an invertierten Wiederholungssequenzen vermuten, dass PNAs eine Sekundärstruktur innerhalb von doppelsträngiger DNA effektiv erkennen können. Eine verstärkte Erkennung erfolgt auch bei PNAs, die auf Oberflächen immobilisiert sind, und Wang et al. haben gezeigt, dass trägergebundene PNAs verwendet werden können, um Hybridisierungsereignisse nachzuweisen (Wang et al., 1996).

[0272] Man könnte erwarten, dass die feste Bindung von PNAs an komplementären Sequenzen auch die Bindung an ähnliche (aber nicht identische) Sequenzen erhöhen würde, was die Sequenzspezifität der PNA-Erkennung reduzieren würde. Wie bei der DNA-Hybridisierung kann jedoch eine selektive Erkennung erreicht werden, indem man Oligomerlänge und Inkubationstemperatur in ein ausgewogenes Verhältnis bringt. Außerdem wird die selektive Hybridisierung von PNAs dadurch gefördert, dass die PNA-DNA-Hybridisierung weniger tolerant gegenüber Basenfehlpaarungen ist als die DNA-DNA-Hybridisierung. Zum Beispiel kann eine einzige Fehlpaarung innerhalb eines 16 bp langen PNA-DNA-Duplex die T_m um bis zu 15 °C reduzieren (Egholm et al., 1993). Dieses hohe Diskriminierungsniveau ermöglichte die Entwicklung von mehreren auf PNA beruhenden Strategien für die Analyse von Punktmutationen (Wang et al., 1996; Carlsson et al., 1996; Thiede et al., 1996; Webb und Hurskainen, 1996; Perry-O'Keefe et al., 1996).

[0273] Die hochaffine Bindung bringt klare Vorteile für die molekulare Erkennung und die Entwicklung von neuen Anwendungen für PNAs. Zum Beispiel hemmen PNAs mit 11-13 Nucleotiden die Aktivität von Telomerase, eines Ribonucleoproteins, das Telomer-Enden unter Verwendung einer essentiellen RNA-Matrize verlängert, während die analogen DNA-Oligomere sie nicht hemmen (Norton et al., 1996).

[0274] Neutrale PNAs sind hydrophober als analoge DNA-Oligomere, und dies kann zu Schwierigkeiten führen, wenn man sie bei neutralem pH auflösen will, insbesondere wenn die PNAs einen hohen Puringehalt haben oder wenn sie das Potential zur Bildung von Sekundärstrukturen haben. Ihre Löslichkeit kann verstärkt werden, indem man eine oder mehr positive Ladungen an die PNA-Termini bindet (Nielsen et al., 1991).

4.16.3 Anwendungen von PNAs

[0275] Ergebnisse von Allfrey und Kollegen lassen vermuten, dass eine Stranginvasion an Sequenzen innerhalb von chromosomaler DNA spontan erfolgt (Boffa et al., 1995; Boffa et al., 1996). Bei diesen Studien wurden PNAs auf Triplet-Wiederholungen der Nucleotide CAG gerichtet, und diese Erkennung wurde verwendet, um transcriptionsaktive DNA zu reinigen (Boffa et al., 1995) und die Transcription zu hemmen (Boffa et al., 1996). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass PNAs, wenn sie an Zellen abgegeben werden können, das Potential haben, allgemeine sequenzspezifische Regulatoren der Genexpression zu sein. Zu den Studien und Übersichten, die die Verwendung von PNAs als Antisense- und Anti-Gen-Mittel betreffen, gehören die von Nielsen et al. (1993b), Hanvey et al. (1992) und Good and Nielsen (1997). Koppelhus et al. (1997) verwendeten PNAs, um die Reverse Transcription von HIV-1 zu hemmen, was zeigte, dass PNAs für antivirale Therapien verwendet werden können.

[0276] Verfahren zum Charakterisieren der Antisense-Bindungseigenschaften von PNAs werden bei Rose (1993) und Jensen et al. (1997) diskutiert. Rose verwendet Kapillargelelektrophorese, um die Bindung von PNAs an ihr komplementäres Oligonucleotid zu bestimmen, wobei die relative Bindungskinetik und die Stöchiometrie gemessen werden. Ähnliche Typen von Messungen wurden von Jensen et al. unter Verwendung von BIAcoreTM-Technik durchgeführt.

[0277] Weitere Anwendungen von PNAs sind die Verwendung in der DNA-Stranginvasion (Nielsen et al., 1991), Antisense-Hemmung (Hanvey et al., 1992), Mutationsanalyse (Orum et al., 1993), für Enhancer der Transcription (Mollegaard et al., 1994), Nucleinsäurereinigung (Orum et al., 1995), Isolierung von transcriptionsaktiven Genen (Boffa et al., 1995), Blockierung der Bindung von Transcriptionsfaktor (Vickers et al., 1995), Genomspaltung (Veselkov et al., 1996), Biosensoren (Wang et al., 1996), in-situ-Hybridisierung (Thisted et al., 1996) und in einer Alternative zum Southern Blotting (Perry-O'Keefe, 1996).

4.17 Antikörperzusammensetzungen und Herstellungsverfahren

[0278] In besonderen Ausführungsformen ziehen die Erfinder die Verwendung von Antikörpern, entweder monoklonal oder Polyklonal, die an eines oder mehrere der hier offenbarten Polypeptide binden, in Betracht. Mittel zur Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern sind in der Technik wohlbekannt (siehe z.B. Harlow und Lane, 1988). Die Verfahren zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern (mAbs) beginnen im Allgemeinen im Wesentlichen genauso wie die zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern. Kurz gesagt, ein polyklonaler Antikörper wird hergestellt, indem man ein Tier mit einer immunogenen Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung immunisiert und Antiseren von dem immunisierten Tier sammelt. Ein weiterer Bereich von Tierspezies kann für die Herstellung von Antiseren verwendet werden. Typischerweise ist das für die Produktion von Anti-Antiseren verwendete Tier ein Kaninchen, eine Maus, eine Ratte, ein Hamster, ein Meerschweinchen oder eine Ziege. Wegen des relativ großen Blutvolumens von Kaninchen ist ein Kaninchen die bevorzugte Wahl für die Produktion von polyklonalen Antikörpern.

[0279] Wie in der Technik wohlbekannt ist, kann eine gegebene Zusammensetzung in ihrer Immunogenität variieren. Es ist daher häufig notwendig, das Wirtsimmunsystem anzukurbeln, was durch Kopplung eines Peptid- oder Polypeptid-Immunogens an einen Träger erreicht werden kann. Beispielhafte und bevorzugte Träger sind Schlitzschnecken-Hämocyanin (KLH) und Rinderserumalbumin (BSA). Andere Albumine, wie Ovalbumin, Mausserumalbumin oder Kaninchenserumalbumin, können ebenfalls als Träger verwendet werden. Mittel zum Konjugieren eines Polypeptids mit einem Trägerprotein sind in der Technik wohlbekannt und umfassen Glutaraldehyd, m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester, Carbodiimid und bisbiazotiertes Benzidin.

[0280] Wie in der Technik ebenfalls wohlbekannt ist, kann die Immunogenität einer bestimmten Immunogenzusammensetzung durch die Verwendung von unspezifischen Stimulatoren der Immunantwort, die als Adjuvantien bekannt sind, verstärkt werden. Beispielhafte und bevorzugte Adjuvantien sind Freund's vollständiges Adjuvans (ein unspezifischer Stimulator der Immunantwort, der abgetötetes *Mycobacterium tuberculosis* enthält), Freund's unvollständiges Adjuvantien und Aluminiumhydroxid-Adjuvans.

[0281] Die bei der Produktion von polyklonalen Antikörpern verwendete Menge der Immunogenzusammensetzung variiert je nach der Natur des Immunogens sowie des für die Immunisierung verwendeten Tiers. Eine Vielzahl von Wegen kann verwendet werden, um das Immunogen zu verabreichen (subkutan, intramuskulär, intradermal, intravenös und intraperitoneal). Die Produktion von polyklonalen Antikörpern kann überwacht werden, indem man zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung Blutproben von dem immunisierten Tier entnimmt. Eine zweite Injektion zum Auffrischen kann ebenfalls gegeben werden. Der Vorgang des Auffrischens und Titrierens wird wiederholt, bis ein geeigneter Titer erreicht ist. Wenn ein gewünschtes Maß der Immunogenität erhalten wurde, kann das immunisierte Tier ausbluten gelassen und das Serum isoliert und gelagert werden, und/oder das Tier kann verwendet werden, um mAbs zu erzeugen.

[0282] mAbs können leicht unter Verwendung von wohlbekannten Techniken hergestellt werden, wie solche, die beispielhaft im US-Patent 4,196,265 genannt sind. Typischerweise beinhaltet diese Technik das Immunisieren eines geeigneten Tiers mit einer ausgewählten Immunogenzusammensetzung, z.B. einem gereinigten oder partiell gereinigten Kristallprotein, Polypeptid oder Peptid. Die immunisierende Zusammensetzung wird so verabreicht, dass eine Stimulation von antikörperproduzierenden Zellen bewirkt wird. Nagetiere, wie Mäuse und Ratten, sind bevorzugte Tiere, doch ist die Verwendung von Kaninchen-, Schaf- oder Froschzellen ebenfalls möglich. Die Verwendung von Ratten kann gewisse Vorteile bringen (Goding, 1986, S. 60-61), aber Mäuse sind bevorzugt, wobei die BALB/c-Maus am meisten bevorzugt ist, da diese am meisten routinemäßig verwendet wird und im Allgemeinen einen höheren Prozentsatz an stabilen Fusionen ergibt.

[0283] Nach der Immunisierung werden somatische Zellen mit dem Potential zur Produktion von Antikörpern, insbesondere B-Lymphocyten (B-Zellen), zur Verwendung in der Vorschrift zur mAb-Erzeugung ausgewählt. Diese Zellen können aus biopsierten Milzen, Mandeln oder Lymphknoten oder aus einer Probe peripheren Bluts erhalten werden. Milzzellen und periphere Blutzellen sind bevorzugt, erstere, weil sie eine reiche Quelle für antikörperproduzierende Zellen sind, die sich im teilenden Plasmablastenstadium befinden, und letztere, weil peripheres Blut leicht zugänglich ist. Häufig wird eine Gruppe von Tieren immunisiert, und die Milz des Tiers mit dem höchsten Antikörpertiter wird entnommen, und die Milzlymphocyten werden durch Homogenisieren der Milz mit einer Spritze erhalten. Typischerweise enthält eine Milz aus einer immunisierten Maus ungefähr 5×10^7 bis 2×10^8 Lymphocyten.

[0284] Dann werden die antikörperproduzierenden B-Lymphocyten aus dem immunisierten Tier mit Zellen eines sich unbegrenzt vermehrenden Myeloms fusioniert, das im Allgemeinen von derselben Spezies stammt wie das Tier, das immunisiert wurde. Myelomzelllinien, die zur Verwendung in hybridomerzeugenden Fusionsverfahren geeignet sind, sind vorzugsweise nichtantikörperproduzierend, haben eine hohe Fusionseffizienz und weisen Enzymmängel auf, aufgrund derer sie nicht in bestimmten selektiven Medien wachsen können, die nur das Wachstum der gewünschten fusionierten Zellen (Hybridome) unterstützen.

[0285] Es können beliebige von mehreren Myelomzellen verwendet werden, wie sie dem Fachmann bekannt sind (Goding, S. 65-66, 1986; Campbell, S. 75-83, 1984). Wenn das immunisierte Tier eine Maus ist, kann man zum Beispiel P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 und S194/5XX0 Bul verwenden; für Ratten kann man R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F und 4B210 verwenden; und U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 sowie UC729-6 sind alle in Verbindung mit Humanzellfusionen geeignet.

[0286] Eine bevorzugte murine Myelomzelle ist die NS-1-Myelomzelllinie (auch P3-NS-1-Ag4-1 genannt), die vom NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository leicht erhältlich ist, indem man die Zelllinien-Hinterle-

gungsnummer GM3573 anfordert. Eine andere Maus-Myelomzelllinie, die verwendet werden kann, ist die 8-Azaguanin-resistente nichtantikörperproduzierende Maus-Myelom-SP2/0-Zelllinie.

[0287] Verfahren zur Erzeugung von Hybriden von antikörperproduzierenden Milz- oder Lymphknotenzellen und Myelomzellen umfassen gewöhnlich das Mischen von somatischen Zellen mit Myelomzellen in einem Verhältnis von 2:1, obwohl das Verhältnis von etwa 20:1 bis etwa 1:1 variieren kann, in Gegenwart eines oder mehrerer Mittel (chemisch oder elektrisch), die die Fusion von Zellmembranen fördern. Fusionsverfahren unter Verwendung von Sendai-Virus wurden beschrieben (Kohler und Milstein, 1975; 1976), wie auch solche unter Verwendung von Polyethylenglycol (PEG), wie 37 Vol.-% PEG (Geffer et al., 1977). Die Verwendung von elektrisch induzierten Fusionsverfahren ist ebenfalls geeignet (Goding, 1986, S. 71-74).

[0288] Fusionsverfahren erzeugen gewöhnlich lebensfähige Hybride in geringen Häufigkeiten, 1×10^{-6} bis 1×10^{-8} . Dies stellt jedoch kein Problem dar, da die lebensfähigen fusionierten Hybride durch Kultivieren in einem selektiven Medium von den nicht fusionierten Stammzellen (insbesondere den unfusionierten Myelomzellen, die sich normalerweise unbegrenzt weiterteilen würden) unterschieden werden können. Das selektive Medium ist im Allgemeinen eines, das ein Mittel enthält, welches die de-novo-Synthese von Nucleotiden in den Gewebekulturmedien blockiert. Beispielhafte und bevorzugte Mittel sind Aminopterin, Methotrexat und Azaserin. Aminopterin und Methotrexat blockieren die de-novo-Synthese sowohl von Purinen als auch von Pyrimidinen, während Azaserin nur die Purinsynthese blockiert. Wenn Aminopterin oder Methotrexat verwendet wird, wird das Medium mit Hypoxanthin und Thymidin als Quelle für Nucleotide ergänzt (HAT-Medium). Wenn Azaserin verwendet wird, wird das Medium mit Hypoxanthin ergänzt.

[0289] Das bevorzugte Selektionsmedium ist HAT. Nur Zellen, die Nucleotid-Wiederverwendungswege beschreiten können, können in HAT-Medium überleben. Den Myelomzellen fehlen entscheidende Enzyme des Wiederverwendungswegs, z.B. Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), und daher können sie nicht überleben. Die B-Zellen können diesen Stoffwechselweg beschreiten, aber sie haben in Kultur nur eine begrenzte Lebensdauer und sterben im Allgemeinen innerhalb von etwa zwei Wochen. Daher sind die einzigen Zellen, die in den selektiven Medien überleben können, die Hybride, die aus Myelom- und B-Zellen gebildet wurden.

[0290] Diese Kultur ergibt eine Population von Hybridomen, aus denen spezifische Hybridome ausgewählt werden. Typischerweise erfolgt die Auswahl von Hybridomen durch Kultivieren der Zellen durch Einzelklonverdünnung in Mikrotiterplatten, wobei man die einzelnen Klonüberstände anschließend (nach etwa zwei bis drei Wochen) auf die gewünschte Reaktivität testet. Der Assay sollte empfindlich, einfach und schnell sein, wie Radioimmunassays, Enzymimmunassays, Cytotoxizitätsassays, Plaqueassays und Dot-Immunbindungsassays.

[0291] Dann würde man mit den ausgewählten Hybridomen eine Verdünnungsreihe herstellen und sie in einzelnen antikörperproduzierenden Zelllinien klonieren, wobei die Klone dann unbegrenzt vermehrt werden können, um mAbs zu erhalten. Die Zelllinien können mit zwei grundlegenden Methoden in Bezug auf die mAb-Produktion ausgebeutet werden. Eine Probe des Hybridoms kann in ein histokompatibles Tier des Typs, der verwendet wurde, um die somatischen und Myelomzellen für die ursprüngliche Fusion zu erhalten, injiziert werden (häufig in die Bauchfellhöhle). Das Tier, das die Injektion erhielt, entwickelt Tumoren, die den spezifischen monoklonalen Antikörper sezernieren, der vom fusionierten Zellhybrid produziert wird. Die Körperflüssigkeiten des Tiers, wie Serum oder Ascitesflüssigkeit, können dann angezapft werden, um mAbs in hoher Konzentration zu erhalten. Die einzelnen Zelllinien könnten auch *in vitro* kultiviert werden, wobei die mAbs natürlicherweise in das Kulturmedium sezerniert werden, aus dem sie leicht in hohen Konzentrationen erhalten werden können.

[0292] Nach beiden Methoden produzierte mAbs können, falls gewünscht, weiter gereinigt werden, wobei man Filtration, Zentrifugation und verschiedene chromatographische Verfahren, wie HPLC oder Affinitätschromatographie, verwendet.

4.18 ELISAs und Immunfällung

[0293] ELISAs können in Verbindung mit der Erfindung verwendet werden. In einem ELISA-Assay werden Proteine oder Peptide, in die Kristallprotein-Antigensequenzen eingebaut sind, auf einer ausgewählten Oberfläche immobilisiert, vorzugsweise einer Oberfläche, die Proteinaffinität aufweist, wie die Näpfe einer Polystyrol-Mikrotiterplatte. Nach dem Waschen zum Entfernen von unvollständig adsorbiertem Material ist es wünschenswert, die Näpfe der Assayplatte mit einem unspezifischen Protein zu binden oder zu beschichten, das bekanntermaßen antigenneutral in Bezug auf die Testantiseren, wie Rinderserumalbumin (BSA), Casein oder Lösungen von Milchpulver, ist. Dies ermöglicht eine Blockierung von unspezifischen Adsorptionsstellen auf der

immobilisierenden Oberfläche und reduziert so den Hintergrund, der durch unspezifische Bindung von Antisera auf der Oberfläche verursacht wird.

[0294] Nach der Bindung von antigenem Material an den Napf, dem Beschichten mit einem unreaktiven Material zum Reduzieren des Hintergrunds und dem Waschen zur Entfernung von ungebundenem Material wird die immobilisierende Oberfläche mit den Antisera oder dem zu testenden klinischen oder biologischen Extrakt in einer Weise in Kontakt gebracht, die zur Bildung eines Immunkomplexes (Antigen/Antikörper) führt. Solche Bedingungen beinhalten vorzugsweise das Verdünnen der Antisera mit Verdünnungsmitteln, wie BSA, Rinder-Gammaglobulin (BGG) und phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS)/Tween®. Diese hinzugefügten Agentien unterstützen auch häufig die Reduktion des unspezifischen Hintergrunds. Dann werden die geschichteten Antisera 2 bis 4 h lang bei Temperaturen vorzugsweise in der Größenordnung von 25 °C bis 27 °C inkubiert. Nach der Inkubation wird die mit Antisera in Kontakt gebrachte Oberfläche gewaschen, um nichtimmunkomplexiertes Material zu entfernen. Ein bevorzugtes Waschverfahren umfasst das Waschen mit einer Lösung wie PBS/Tween® oder Boratpuffer.

[0295] Nach der Bildung von spezifischen Immunkomplexen zwischen der Testprobe und dem gebundenen Antigen und dem anschließenden Waschen kann das Auftreten und sogar die Menge der Immunkomplexbildung bestimmt werden, indem man einen zweiten Antikörper hinzufügt, der Spezifität für den ersten aufweist. Um ein Nachweismittel zu erhalten, weist der zweite Antikörper vorzugsweise ein assoziiertes Enzym auf, das beim Inkubieren mit einem geeigneten chromogenen Substrat eine Farbentwicklung erzeugt. So möchte man zum Beispiel die antiseraengebundene Oberfläche während einer Zeit und unter Bedingungen, die die Entwicklung einer Immunkomplexbildung begünstigen (z.B. 2 h Inkubation bei Raumtemperatur in einer PBS-haltigen Lösung, wie PBS/Tween®), mit einem Urease- oder Peroxidase-konjugierten Anti-Human-IgG in Kontakt bringen und inkubieren.

[0296] Nach der Inkubation mit dem zweiten enzymmarkierten Antikörper und nach dem Waschen zur Entfernung des ungebundenen Materials wird die Menge des Markers durch Inkubation mit einem chromogenen Substrat, wie Harnstoff und Bromkresolpurpur oder 2,2'-Azinodi(3-ethyl-benzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) und H₂O₂ im Falle von Peroxidase als Enzymmarker, quantifiziert. Die Quantifizierung wird dann durch Messen des Grades der Farbbildung erreicht, z.B. mit Hilfe eines Spektrophotometers für Spektren im Sichtbaren.

[0297] Die Anti-Kristallprotein-Antikörper der vorliegenden Erfindung sind besonders gut für die Isolierung anderer Kristallprotein-Antigene durch Immunfällung geeignet. Immunfällung beinhaltet die Abtrennung der Zielantigenkomponente aus einem komplexen Gemisch und wird verwendet, um kleinste Proteinmengen zu diskriminieren oder zu isolieren. Für die Isolierung von Membranproteinen müssen Zellen zu Detergensmicellen solubilisiert werden. Nichtionische Salze werden bevorzugt, da andere Mittel, wie Gallensalze, bei saurem pH-Wert oder in Gegenwart von zweiwertigen Kationen ausfallen.

[0298] In einer alternativen Ausführungsform sind die Antikörper der vorliegenden Erfindung für die enge Nebeneinanderstellung von zwei Antigenen geeignet. Dies ist besonders nützlich zur Erhöhung der lokalisierten Konzentration von Antigenen, z.B. Enzym-Substrat-Paaren.

4.19 Western Blots

[0299] Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung finden in hohem Maße Verwendung in der Immunblot- oder Western-Blot-Analyse. Die Anti-Peptid-Antikörper können als hochaffine primäre Reagentien für die Identifizierung von Proteinen verwendet werden, die auf einer festen Trägermatrix, wie Nitrocellulose, Nylon oder Kombinationen davon, immobilisiert sind. In Verbindung mit der Immunfällung und anschließenden Gel-Elektrophorese können diese als einstufiges Reagens zur Verwendung beim Nachweis von Antigenen verwendet werden, gegen welche sekundäre Reagentien, die beim Nachweis des Antigens verwendet werden, einen nachteiligen Hintergrund verursachen. Dies ist besonders nützlich, wenn die untersuchten Antigene Immunglobuline sind (was die Verwendung von Immunglobulinen, die Komponenten von Bakterienzellwänden binden, ausschließt), die untersuchten Antigene mit dem Nachweismittel kreuzreagieren oder mit demselben relativen Molekulargewicht wandern wie ein Kreuzreaktionssignal.

[0300] Nachweisverfahren auf immunologischer Basis zur Verwendung in Verbindung mit Western Blotting beinhalten enzymatisch, radioaktiv oder fluoreszierend markierte sekundäre Antikörper gegen die Toxin-Strukturinheit und gelten in dieser Hinsicht als besonders gut geeignet.

4.20 Biologisch funktionelle Äquivalente

[0301] In der Struktur der Peptide der vorliegenden Erfindung und der DNA-Segmente, die sie codieren, können Modifikationen und Änderungen vorgenommen werden, wobei man dennoch ein funktionelles Molekül erhält, das ein Protein oder Peptid mit wünschenswerten Eigenschaften codiert. Folgendes ist eine Diskussion auf der Basis einer Veränderung der Aminosäuren eines Proteins unter Schaffung eines äquivalenten oder sogar verbesserten Moleküls der zweiten Generation. In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung gelten mutierte Kristallproteine als geeignet, um die insektizide Aktivität des Proteins zu erhöhen und folglich die insektizide Aktivität und/oder Expression des rekombinanten Transgens in einer Pflanzenzelle zu erhöhen. Die Aminosäureänderungen können erreicht werden, indem man die Codons der DNA-Sequenz gemäß den in Tabelle 9 angegebenen Codons ändert.

Tabelle 9

Aminosäuren	Codons							
Alanin	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cystein	Cys	C	UGC	UGU				
Asparaginsäure	Asp	D	GAC	GAU				
Glutaminsäure	Glu	E	GAA	GAG				
Phenylalanin	Phe	F	UUC	UUU				
Glycin	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidin	His	H	CAC	CAU				
Isoleucin	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Lysin	Lys	K	AAA	AAG				
Leucin	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Methionin	Met	M	AUG					
Asparagin	Asn	N	AAC	AAU				
Prolin	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamin	Gln	Q	CAA	CAG				
Arginin	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serin	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Threonin	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valin	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Tryptophan	Trp	W	UGG					
Tyrosin	Tyr	Y	UAC	UAU				

[0302] Zum Beispiel können bestimmte Aminosäuren anstelle von anderen Aminosäuren in einer Proteinstruktur verwendet werden, ohne dass ein nennenswerter Verlust der wechselwirkenden Bindungskapazität mit Strukturen wie zum Beispiel antigenbindenden Bereichen von Antikörpern oder Bindungsstellen auf Substratmolekülen erfolgt. Da es die Wechselwirkungsfähigkeit und natur eines Proteins ist, die die biologisch funktionelle Aktivität dieses Proteins definiert, können bestimmte Aminosäuresequenzsubstitutionen in einer Proteinsequenz und selbstverständlich auch in der zugrundeliegenden codierenden DNA-Sequenz vorgenom-

men und dennoch ein Protein mit ähnlichen Eigenschaften erhalten werden. Die Erfinder gehen also davon aus, dass verschiedene Veränderungen in den Peptidsequenzen der offenbarten Zusammensetzungen oder entsprechenden DNA-Sequenzen, die die Peptide codieren, ohne nennenswerten Verlust ihrer biologischen Nützlichkeit oder Aktivität vorgenommen werden können.

[0303] Wenn solche Änderungen vorgenommen werden, kann der hydropathische Index der Aminosäuren berücksichtigt werden. Die Bedeutung des hydropathischen Aminosäureindex bei der Übertragung einer wechselwirkenden biologischen Funktion auf ein Protein ist in der Technik allgemein bekannt (Kyte und Doolittle, 1982).

[0304] Es wird anerkannt, dass der relative hydropathische Charakter der Aminosäure zur Sekundärstruktur des resultierenden Proteins beiträgt, die wiederum die Wechselwirkung des Proteins mit anderen Molekülen, zum Beispiel Enzymen, Substraten, Rezeptoren, DNA, Antikörpern, Antigenen, definiert.

[0305] Jeder Aminosäure ist ein hydropathischer Index auf der Basis ihrer Hydrophobie und Ladungsmerkmale zugeordnet (Kyte und Doolittle, 1982); dies sind: Isoleucin (+4,5); Valin (+4,2); Leucin (+3,8); Phenylalanin (+2,8); Cystein/Cystin (+2,5), Methionin (+1,9); Alanin (+1,8); Glycin (-0,4); Threonin (-0,7); Serin (-0,8); Tryptophan (-0,9); Tyrosin (-1,3); Prolin (-1,6); Histidin (-3,2); Glutamat (-3,5); Glutamin (-3,5); Aspartat (-3,5); Asparagin (-3,5); Lysin (-3,9) und Arginin (-4,5).

[0306] Es ist in der Technik bekannt, dass bestimmte Aminosäuren durch andere Aminosäuren mit einem ähnlichen hydropathischen Index oder Score ersetzt werden können, was immer noch ein Protein mit ähnlicher biologischer Aktivität ergibt, d.h., wobei man immer noch ein biologisch funktionell äquivalentes Protein erhält. Wenn solche Änderungen vorgenommen werden, ist die Substitution von Aminosäuren, deren hydropathische Indices innerhalb von ± 2 gleich sind, bevorzugt, solche, die innerhalb von ± 1 gleich sind, sind besonders bevorzugt, und solche, die innerhalb von $\pm 0,5$ gleich sind, sind ganz besonders bevorzugt.

[0307] In der Technik wird auch davon ausgegangen, dass die Substitution von ähnlichen Aminosäuren effektiv auf der Basis der Hydrophilie vorgenommen werden kann. In US-Patent 4,554,101 heißt es, dass die größte lokale mittlere Hydrophilie eines Proteins, die von der Hydrophilie seiner benachbarten Aminosäuren beherrscht wird, mit der biologischen Eigenschaft des Proteins korreliert.

[0308] Wie im US-Patent 4,554,101 ausgeführt ist, wurden den Aminosäurereste die folgenden Hydrophiliewerte zugeordnet: Arginin (+3,0); Lysin (+3,0); Aspartat (+3,0 \pm 1); Glutamat (+3,0 \pm 1); Serin (+0,3); Asparagin (+0,2); Glutamin (+0,2); Glycin (0); Threonin (-0,4); Prolin (-0,5 \pm 1); Alanin (-0,5); Histidin (-0,5); Cystein (-1,0); Methionin (-1,3); Valin (-1,5); Leucin (-1,8); Isoleucin (-1,8); Tyrosin (-2,3); Phenylalanin (-2,5); Tryptophan (-3,4).

[0309] Es wird davon ausgegangen, dass eine Aminosäure anstelle einer anderen mit einem ähnlichen Hydrophiliewert verwendet werden kann, wobei man dennoch ein biologisch äquivalentes und insbesondere ein immunologisch äquivalentes Protein erhalten wird. Bei solchen Änderungen ist die Substitution von Aminosäuren, deren Hydrophiliewerte innerhalb von ± 2 gleich sind, bevorzugt, solche, die innerhalb von ± 1 gleich sind, sind besonders bevorzugt, und solche, die innerhalb von $\pm 0,5$ gleich sind, sind ganz besonders bevorzugt.

[0310] Wie oben skizziert wurde, beruhen Aminosäuresubstitutionen daher im Allgemeinen auf der relativen Ähnlichkeit der Aminosäure-Seitenkettensubstituenten, zum Beispiel ihrer Hydrophobie, Hydrophilie, Ladung und Größe. Beispielhafte Substitutionen, bei denen verschiedene der obigen Merkmale berücksichtigt werden, sind dem Fachmann wohlbekannt; dazu gehören: Arginin und Lysin; Glutamat und Aspartat; Serin und Threonin; Glutamin und Asparagin; sowie Valin, Leucin und Isoleucin.

5.0 Beispiele

[0311] Die folgenden Beispiele sind mit aufgenommen, um bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung aufzuzeigen. Der Fachmann sollte sich darüber im Klaren sein, dass die in den folgenden Beispielen offenbarten Techniken Ansätze darstellen, von denen die Erfinder herausgefunden haben, dass sie bei der praktischen Ausführung der Erfindung gut funktionieren, und diese können daher als bevorzugte praktische Ausführungsweisen derselben gelten.

5.1 Beispiel 1 – Isolierung von *B. thuringiensis* EG4140

[0312] Getreidestaubproben wurden aus verschiedenen Quellen in den gesamten USA und im Ausland, typischerweise Kornspeichereinrichtungen, erhalten. Die Getreidestaubproben wurden behandelt und auf Agarplatten ausgebreitet, um individuelle Kolonien des *Bacillus*-Typs zu isolieren, wie es beschrieben ist (Donovan et al., 1992). EG4140 ist ein Wildtyp-*B. thuringiensis*-Stamm, der aus einer Getreidestaubprobe aus Pennsylvania isoliert wurde. Phasenkontrastmikroskopie wurde verwendet, um die Morphologie von parasporalen Kristallen, die von Bakterienkolonien aus diesem Getreidestaub erzeugt werden, visuell zu untersuchen. Die als EG4140 bezeichnete Kolonie enthielt Endosporen und kristalline Einschlüsse mit einer einzigartigen Morphologie, die Spindeln ähnelte. Das Komplement von nativen Plasmiden, die in isoliertem *B. thuringiensis* EG4140 enthalten sind, wurde durch modifizierte Eckhardt-Agarose-Gel-Elektrophorese bestimmt, wie sie in Gonzalez et al. (1982) beschrieben ist. Das Muster der nativen Plasmide entsprach nicht den Mustern von typischen bekannten Serovarianten (Gonzalez und Carlton, 1984). Die Plasmidgrößen betragen ungefähr 110 MDa, 80 MDa und 33 MDa.

5.2 Beispiel 2 – Bioassaybewertung von *B. thuringiensis*-Stämmen in Bezug auf Toxizität gegenüber Coleoptera-Insekten

[0313] Ein dreischichtiges Bioassayschema wurde übernommen, um *B. thuringiensis*-Stämme mit Toxizität gegenüber Larven des Coleoptera-Insekts *Diabrotica virgifera virgifera* (Westlicher Maiswurzelbohrer; WCRW) zu identifizieren. Da WCRW-Larven empfindlich sind, sind Bioassays mit diesem Insekt zeitraubend und führen häufig zu hohen Kontrollsterblichkeiten. Um die Zahl der WCRW-Bioassays, die durchgeführt werden mussten, zu beschränken, wurden zuerst gegenüber Coleoptera toxische *B. thuringiensis*-Stämme identifiziert, indem man zuerst ein Bioassay-Screening gegen Larven des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata*, CPB) durchführte, ein Insekt, das eine größere Empfindlichkeit als WCRW gegenüber Coleoptera-toxischen *B. thuringiensis*-Cry-Proteinen zeigt. Bei Stämmen mit CPB-Toxizität wurden weiterhin Schwerpunkte gesetzt, indem man ein Bioassay-Screening gegen Larven des Coleoptera-Insekts *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Südlicher Maiswurzelbohrer, SCRW) durchführte, eine nahe verwandte Wurzelbohrerspezies, die robuster und leichter einem Bioassay zu unterziehen ist als WCRW. *B. thuringiensis*-Stämme, die Toxizität gegenüber SCRW- und/oder CPB-Larven aufwiesen, wurden in Bioassays gegen WCRW bewertet. Auf diese Weise wurden mehrere hundert *B. thuringiensis*-Stämme einem Screening im Bioassay unterzogen, und Stämme, die WCRW-Toxizität aufweisen, wurden identifiziert. Der Stamm EG4096, ein Wildtyp-*B. thuringiensis*-Stamm, der ein gegenüber Coleoptera toxisches Protein, CryET29, produziert, wurde als positive Kontrolle in diesen Bioassays verwendet.

[0314] *B. thuringiensis*-Stämme wurden vier Tage lang bei 25 °C in C2-Medium (Donovan et al., 1988) gezüchtet; zu diesem Zeitpunkt hatten Sporulation und Lyse bereits stattgefunden. Die Kulturen, die Sporen gebildet hatten, wurden direkt in einem Screening gegen CPB verwendet. Für SCRW- und WCRW-Bioassays wurden die Kulturen durch Zentrifugation geerntet, in ungefähr dem 2,5fachen des ursprünglichen Volumens mit Wasser gewaschen und in 0,005% Triton X-100® in einem Zehntel des ursprünglichen Kulturvolumens resuspendiert. Die Sporen-Kristall-Suspensionen wurden direkt im Bioassay verwendet.

[0315] Die insektizide Aktivität gegen CPB- und SCRW-Larven wurde durch einen Oberflächenkontaminationsassay auf einer künstlichen Nahrung in einer Kunststoff-Futterschale (175 mm² Oberfläche), wie sie von Rupar et al. (1991) beschrieben wird, bestimmt. Alle Bioassays wurden unter Verwendung von 128-Napf-Platten, die ungefähr 1 ml Nahrung pro Napf enthielten, mit perforierten Mylar-Folienabdeckungen durchgeführt (C-D International Inc., Pitman, NJ). In jede Schale wurde eine Larve im ersten Häutungsstadium gesetzt und nach 3-5 Tagen (CPB) oder 7 Tagen (SCRW) in Bezug auf die Mortalität bewertet. Zweiunddreißig Larven wurden pro Bioassay-Screening mit 50 µl einer Sporen-Kristall-Suspension pro Nahrungsnapf getestet.

[0316] Bioassay-Screening gegen WCRW-Larven wurde durch einen Oberflächenkontaminationsassay unter Verwendung einer künstlichen Nahrung (20 g Agar, 50 g Weizenkeim, 39 g Saccharose, 32 g Casein, 14 g Faser, 9 g Wesson-Salzgemisch, 1 g Methylparaben, 0,5 g Sorbinsäure, 0,06 g Cholesterin, 9 g Vaderzant-Vitaminmischung, 0,5 ml Leinsaatöl, 2,5 ml Phosphorsäure/Propionsäure pro Liter) bestimmt. In jeden Nahrungsnapf wurde eine Larve im ersten Häutungsstadium gesetzt, und die Mortalität wurde nach 7 Tagen bewertet.

[0317] Eine Kultur des Stamms EG4140, die Sporen gebildet hatte und lysiert war, wies in einem Bioassay-Screening Toxizität gegenüber CPB-Larven auf. Anschließend wurde der Stamm einem Screening in einem Bioassay gegen SCRW-Larven unterzogen und zeigte, wenn überhaupt, nur wenig Toxizität. Dennoch wurde der Stamm einem Screening in einem Bioassay gegen WCRW-Larven unterzogen, und es zeigte sich,

dass er eine erhebliche insektizide Aktivität aufwies (Tabelle 10). EG4140 zeigte auch Toxizität gegenüber Larven des Lepidoptera-Schädling Plutella xylostella.

Tabelle 10

Insektizide Aktivität des Stamms EG4140 gegen WCRW-Larven

Probe	% Mortalität
EG4140	100%
EG4096	100%
Kontrolle	31%

Dosis: EG4096 – 31 µg/Napf

EG4140 – 38 µg/Napf

5.3 Beispiel 3 – Charakterisierung des CryET70-Polypeptids

[0318] EG4140 wurde vier Tage lang bei 25 °C in C2-Medium (Donovan et al., 1988) gezüchtet, und während dieser Zeit wuchs die Kultur bis zur stationären Phase, bildete Sporen und lysierte, so dass die Proteineinschlüsse in das Medium freigesetzt wurden. Zweihundert Mikroliter der Kultur wurden zu einem Milliliter 1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8, gegeben, und es wurde zentrifugiert, um die Sporen und Kristalle zu sedimentieren. Das Sediment wurde in Wasser mit der Hälfte des ursprünglichen Volumens resuspendiert.

[0319] Kristallprotein wurde solubilisiert, indem man die Sporen-Kristall-Suspension 5 min lang bei 100 °C in einem SDS-Solubilisierungspuffer inkubierte und durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) nach Größe aufgetrennt. Nach der Auftrennung nach Größe wurden die Proteine durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue R-250 sichtbar gemacht. Diese Analyse zeigte, dass das größere Kristallprotein, das in der Kultur von EG4140, die Sporen gebildet hatte, vorhanden war, eine Größe von ungefähr 86 kD hatte. Dieses neue Protein wurde als CryET70 bezeichnet. Zusätzliche Proteine von 39 kD, 34 kD und 32 kD werden ebenfalls von diesem Stamm produziert.

[0320] Um CryET70 näher zu charakterisieren, wurde die NH₂-terminale Aminosäuresequenz des Proteins bestimmt. Eine Kultur von EG4140, die Sporen gebildet hatte, wurde in Wasser gewaschen und in dem ursprünglichen Volumen Wasser resuspendiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt, wobei die von Brussock und Currier (1990) beschriebene Vorschrift befolgt wurde. Das Verfahren wurde so modifiziert, dass der Neutralisationsschritt mit 3 M HEPES weggelassen wurde. Nach der Elektrophorese wurde die Proteine auf eine Immobilon-P-Membran (Millipore, Bedford, MA) übertragen, wobei Standard-Western-Blotting-Verfahren befolgt wurden (Towbin et al., 1979). Nach der Übertragung wurde die Membran viermal in dH₂O gespült und in 0,025% Coomassie Blue R-250, 40% Methanol gewaschen. Der Filter wurde in 50% Methanol von Farbstoff befreit und 4 × in dH₂O gespült. Der Teil des Filters, der die Proteinbande von ungefähr 86 kD enthielt, wurde mit einer Rasierklinge herausgeschnitten.

[0321] Die Bestimmung der NH₂-terminalen Aminosäuresequenz des auf der Membran immobilisierten gereinigten CryET70-Polypeptids wurde im Department of Physiology an der Tufts Medical School, Boston, MA, durchgeführt, wobei Standardverfahren des automatischen Edman-Abbaus verwendet wurden. Die NH₂-terminale Sequenz wurde bestimmt zu:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Ala Ser Asp Tyr Ile Asp Ile Arg Ser Ile Phe Gln Thr (SEQ ID

NO: 3)

[0322] Der FASTA-Algorithmus (Lipman und Pearson, 1985) im PCGene-Programm (Intelligenetics, Mountain View, Kalif.) wurde verwendet, um die N-terminale Sequenz des CryET70-Polypeptids mit Aminosäuresequenzen aller B.-thuringiensis-Kristallproteine, von denen die Erfinder zu dieser Zeit wussten, einschließlich der Sequenzen aller B.-thuringiensis-Kristallproteine, die in der wissenschaftlichen Literatur, in internationalen Patentanmeldungen oder erteilten Patenten veröffentlicht worden waren, zu vergleichen. Es zeigt sich, dass

die N-terminale Sequenz des CryET70-Polypeptids den Sequenzen der bekannten B.-thuringiensis-Kristallproteine nicht ähnlich ist.

5.4 Beispiel 4 – Klonierung des CryET70-Gens

[0323] Gesamt-DNA wurde nach dem folgenden Verfahren aus EG4140 extrahiert. Vegetative Zellen wurden in einem Lysepuffer, der 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA und 4 mg/ml Lysozym enthielt, resuspendiert. Die Suspension wurde eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde SDS bis 1% hinzugefügt. Dann wurde die Suspension mit dem gleichen Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (50:48:2) extrahiert. DNA wurde durch Zugabe von einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat und zwei Volumina 100% Ethanol aus der wässrigen Phase ausgefällt. Die ausgefällte DNA wurde mit einem Glasstab gesammelt, mit 70% Ethanol gewaschen und in dH₂O resuspendiert.

[0324] Die DNA wurde mit der Restriktions-Endonuclease MboI partiell abgebaut und auf einem 0,6% Agarose-Gel in 1X TAE über Nacht mit 2 V/cm nach Größe aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid angefärbt, so dass die abgebaute DNA sichtbar gemacht werden konnte, wenn sie langwelligem UV-Licht ausgesetzt wurde. Gelscheiben, die DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen etwa 9 und etwa 12 kb enthielten, wurden mit einer Rasierklinge aus dem Gel herausgeschnitten. Die DNA wurde unter Verwendung des GENE-CLEAN II® Kit (BIO 101 Inc., La Jolla, CA) aus dem Gel extrahiert und in H₂O eluiert.

[0325] Um eine Bibliothek in E. coli zu schaffen, wurden die 9- bis 12-kb-MboI-Restriktionsfragmente von DNA aus EG4140 in den E.-coli/B.-thuringiensis-Shuttle-Vektor pHT315 (Arantes und Lereclus, 1991) ligiert. Der Vektor pHT315 kann sich in E. coli replizieren und trägt das Gen für die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin, das als Selektionsmarker verwendet werden kann. Der Vektor pHT315 kann sich auch in hoher Kopienzahl in B. thuringiensis replizieren und trägt das Gen für die Resistenz gegen das Antibiotikum Erythromycin, das als Selektionsmarker für diesen Organismus verwendet werden kann. Die Fragmente aus EG4140 wurden mit pHT315, das mit BamHI abgebaut und mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) behandelt worden war, um die terminalen 5'-Phosphatgruppen von den abgebauten Plasmid zu entfernen, ligiert, wodurch die Religierung des Vektors mit sich selbst verhindert wurde. T4-Ligase und ein Ligierungspuffer (Promega Corporation, Madison, WI) wurden zu der Reaktion gegeben, die das abgebaute pHT315 und die MboI-Fragmente enthielt. Diese wurden mehrere Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert, um die Insertion und Ligierung der MboI-Fragmente in die pHT315-Vektor-DNA zu ermöglichen.

[0326] Das oben beschriebene Ligierungsgemisch wurde verwendet, um elektroporationskompetente SURE™-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA) zu Ampicillin-Resistenz zu transformieren, wobei die vom Hersteller beschriebenen Vorgehensweisen befolgt wurden. Aliquote der transformierten Zellen wurden bei -70 °C in LB (Maniatis et al., 1982), das 15% Glycerin enthielt, eingefroren. Die transformierten E.-coli-Zellen wurden später aufgetaut und auf LB-Agarplatten, die 50 µg/ml Ampicillin enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum von ampicillinresistenten Kolonien zeigte die Anwesenheit eines rekombinanten Plasmids in den Zellen jeder Kolonie an.

[0327] Um die Kolonien, die die klonierten Fragmente beherbergen, welche die cryET70-Gensequenzen enthalten, zu isolieren, wurden die transformierten E.-coli-Kolonien zuerst auf Nitrocellulose-Filter übertragen. Dies wurde bewerkstelligt, indem man einen Rundfilter (Millipore HATF 085 25, Millipore Corp., Bedford, MA) direkt auf die LB-Ampicillin-Agarplatten legte, die die transformierten Kolonien enthielten. Wenn der Filter langsam von der Platte abgelöst wird, bleiben die Kolonien an dem Filter kleben und ergeben eine exakte Kopie des Musters von Kolonien von der ursprünglichen Platte. Von jeder Kolonie bleiben genügend Zellen auf der Platte zurück, so dass die Kolonien durch 5 bis 6 Stunden Wachstum bei 37 °C wiederhergestellt werden. Dann wurden die Platten bei 4 °C aufbewahrt, bis sie benötigt werden. Dann wurden die Nitrocellulosefilter mit den übertragenen Kolonien mit der Kolonieseite nach oben auf frische LB-Ampicillin-Agarplatten gelegt und bei 37 °C wachsen gelassen, bis sie eine Größe von ungefähr 1 mm im Durchmesser erreichten.

[0328] Um die DNA aus den rekombinanten E.-coli-Zellen auf den Nitrocellulosefilter freizusetzen, wurden die Filter 15 min lang mit der Kolonieseite nach oben auf Whatman 3 MM Chromatography Paper (Whatman International Ltd., Maidstone, England), das mit 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl getränkt war, gelegt. Dann wurden die Filter neutralisiert, indem man sie 10 min lang mit der Kolonieseite nach oben auf Whatman Paper legte, das mit 1M NH₄-Acetat, 0,02 M NaOH getränkt war. Dann wurden die Filter in 3X SSC, 0,1% SDS abgespült, an der Luft getrocknet und eine Stunde lang bei 80 °C in einem Vakuumofen gebrannt, um sie für die Hybridisierung vorzubereiten.

[0329] Um das Gen zu identifizieren, das das CryET70-Polypeptid codierte, wurde eine Oligonucleotidsonde entworfen, die für die NH₂-terminale Aminosäuresequenz des Proteins spezifisch war, wobei Codons verwendet wurden, die man typischerweise in B.-thuringiensis-Toxin-Genen findet. Das folgende Oligonucleotid, das als AM24 bezeichnet wird, wurde von Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA) synthetisiert: 5'-GCITCIGATTATATTGATATTAGATCAATTTTTCAAAC-3' (SEQ ID Nr. 4) wobei I = Inosin.

[0330] Das für das cryET70-Gen spezifische NH₂-terminale Oligonucleotid, AM24, wurde am 5'-Ende mit γ -³²P markiert und als Hybridisierungssonde verwendet. Um die Sonde radioaktiv zu markieren, wurden 40 pmol AM24 zu einer Reaktion (20 μ l Gesamtvolumen) gegeben, die [γ -³²P]ATP (3 μ l mit 3000 Ci/mmol bei 10 mCi/ml), 2 μ l eines 10X-Reaktionspuffers (700 mM Tris-HCl, pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT) und 10 Einheiten T4-Polynucleotid-Kinase (Promega Corporation, Madison, WI) enthielt. Die Reaktion wurde 20 min lang bei 37 °C inkubiert, um die Übertragung des radioaktiven Phosphats auf das 5'-Ende des Oligonucleotids zu ermöglichen, so dass es als Hybridisierungssonde geeignet ist.

[0331] Die markierte Sonde wurde zu den Filtern in 3X SSC, 0,1% SDS, 10X Denhardt-Reagens (0,2% Rinderserumalbumin (BSA), 0,2% Polyvinylpyrrolidon, 0,2% Ficoll®), 0,2 mg/ml Heparin gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese Bedingungen wurden gewählt, um eine Hybridisierung des markierten Oligonucleotids mit verwandten Sequenzen zu ermöglichen, die sich auf den Nitrocellulose-Blots der transformierten E.-coli-Kolonien befanden. Nach der Inkubation wurden die Filter bei 40 °C in dreimal gewechseltem 3X SSC, 0,1% SDS gewaschen. Die Filter wurden trockengelöscht und über Nacht bei -70 °C mit einer Verstärkerfolie (Fisher Biotech, Pittsburgh, PA) auf Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm (Eastman Kodak Company, Rochester, NY) einwirken gelassen.

[0332] Mehrere Kolonien hybridisierten mit AM24. Diese Kolonien wurden identifiziert, indem man die Signale auf dem Autoradiogramm mit den Kolonien auf den ursprünglichen Transformationsplatten abglich. Dann wurden die isolierten Kolonien in LB-Ampicillin-Flüssigmedium gezüchtet, aus dem die Zellen geerntet werden konnten, und rekombinantes Plasmid wurde nach dem Standard-Miniprep-Verfahren mit alkalischer Lyse präpariert (beschrieben in Maniatis et al., 1982). Die isolierten Plasmide wurden mit der Restriktionsendonuclease EcoRI abgebaut. Die DNA aus diesen Plasmid-Abbaufragmenten wurde durch Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und nach dem Verfahren von Southern (1975) auf ein Immobilon-NC-Nitrocellulosefilter (Millipore Corp., Bedford, MA) übertragen. DNA wurde durch Backen bei 80 °C in einem Vakuumofen auf dem Filter fixiert.

[0333] Anschließend wurde der Blot mit dem Oligonucleotid AM24, das unter Verwendung von T4-Polynucleotid-Kinase am 5'-Ende mit γ -³²P radioaktiv markiert worden war, hybridisiert. EcoRI-Fragmente von fünf der 16 Plasmide hybridisierten mit der Sonde, was die Anwesenheit eines cryET70-Gens in diesen Klonen bestätigte. Eines der Plasmide, die ein cryET70-Gen enthielten, wurde als pEG1648 bezeichnet ([Fig. 1](#)). Der E.-coli-Stamm, der pEG1648 enthielt, wurde als EG11841 bezeichnet.

5.5 Beispiel 5 – Sequenzierung des cryET70-Gens und Bestimmung der darin codierten Aminosäuresequenz

[0334] Eine partielle DNA-Sequenz des auf pEG1648 klonierten Gens wurde bestimmt, wobei bewährte Didesoxy-Kettenabbruch-DNA-Sequenzierungsverfahren (Sanger et al., 1977) befolgt wurden. Die Herstellung der doppelsträngigen Plasmid-Matrizen-DNA erfolgte unter Verwendung eines Wizard® SV Miniprep Kit (Promega, Madison, WI) gemäß den Anweisungen des Herstellers oder eines Qiagen Plasmid Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) gemäß den Anweisungen des Herstellers, und danach erfolgte eine Extraktion mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (50:48:2) und dann eine Extraktion mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1). Die Sequenzierungsreaktionen wurden unter Verwendung des Sequenase™ Version 2.0 DNA Sequencing Kit (United States Biochemical/Amersham Life Science Inc., Cleveland, OH) gemäß den Anweisungen des Herstellers und unter Verwendung von ³⁵S-dATP als Markerisotop (erhalten von DuPont NEN® Research Products, Boston, MA) durchgeführt. Eine denaturierende Gelelektrophorese der Reaktionen wurde auf einem Sequenzierungsgel mit 6% (w/v) Acrylamid, 42% (w/v) Harnstoff oder auf einem CastAway™-Precast-Sequenzierungsgel mit 6% Acrylamid (Stratagene, La Jolla, CA) durchgeführt. Das getrocknete Gel wurde über Nacht bei Raumtemperatur auf Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm (Eastman Kodak Company, Rochester, NY) einwirken gelassen.

[0335] Das NH₂-terminale spezifische Oligonucleotid AM24 wurde als anfänglicher Sequenzierungsprimer verwendet. Eine partielle DNA-Sequenz für das cryET70-Gen auf pEG1648 wurde unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahren erhalten. Die sukzessiven Oligonucleotide, die als Primer für Sequenzierungsreakti-

onen verwendet werden sollten, wurden anhand der Sequenzierungsdaten der vorigen Gruppe von Reaktionen entworfen. Ein ungefähr 5,8 kb großes EcoRI-HindIII-Fragment, das das gesamte cryET70-Gen enthielt, wurde aus pEG1648 in pUC18 subkloniert. Dieses Plasmid, das als pEG1657 bezeichnet wurde ([Fig. 1](#)), wurde verwendet, um die cryET70-Sequenz durch automatisches Sequenzieren zu vervollständigen. 500 ng gereinigtes Plasmid wurden zu 100 ng Primer in einem Gesamtvolumen von 20 µl gegeben. Alle Primer wurden unter Verwendung der OLIGO-Primer-Analyse-Software (National Biosciences, Inc., MN) entworfen. DNA-Proben wurden unter Verwendung des ABI PRISM DyeDeoxy Sequencing Chemistry Kit (Applied Biosystems, CA) gemäß den vorgeschlagenen Anweisungen des Herstellers sequenziert. Die vollständigen Reaktionen wurden auf einem automatischen ABI377-DNA-Sequenzierer laufen gelassen. Überlappende DNA-Sequenzfragmente wurden analysiert und mit Hilfe der DNA-Analyse-Software Sequencher v2.1 (Gene Codes Corporation, MI) zusammengesetzt. Die DNA-Sequenz von cryET70 ist in Abschnitt 5.5.1 gezeigt (SEQ ID Nr. 1). Der proteincodierende Bereich beginnt bei Nucleotid 92. Die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des CryET70-Polypeptids ist in Abschnitt 5.5.1 gezeigt (SEQ ID Nr. 2).

5.5.1 DNA-Sequenz des cryET70-Gens (SEQ ID Nr. 1)

```
GTAATAGTAGTTATTTAGCAGGAATAAAAGGGAGGGTATCGAATACTTTCAAATGAAGACTGAA
AATTTACAAATAGAAGGAGAGAAAAGTATGAAAGATTCAATTTCAAAGGGATATGATGAAATAA
CAGTGCAGGCAAGTGATTATATTGATATTCGCTCAATTTTTCAAACGAATGGATCTGCAACATT
TAATTC AACCTAATATTACAACCTTTAACGCAAGCTACAAATAGTCAAGCGGGAGCAATTGCA
GGGAAGACAGCTTTAGATATGAGACATGATTTTACTTTTAGAGCTGATATTTTTCTTGGA ACTA
```

AAAGTAATGGAGCAGATGGTATTGCGATAGCATTTCATAGAGGATCAATTGGTTTTGTTGGGGA
GAAGGGTGGAGGACTTGGGATTTTAGGCGCCCTAAAAGGTATAGGATTTGAATTAGACACATAT
GCCAATGCTCCTCAAGATGAACAAGGAGATTCTTTTGGACATGGAGCAATGAGAGGCCTATTCC
CTGGTTTTCCCAAATGGATATCCACATGCTGGTTTTGTAAAGTACGGATAAAAATAGAGGTTGGTT
ATCTGCCTTAGCTCAGATGCAGCGAATAGCTGCTCCAAATGGGCGTTGGAGACGTCTGGCGATT
CATTGGGATGCTCGCAATAAAAAATTAAGTAACTGCAAACCTTGAGGATTTAACTTTTAATGATTCAA
CGGTATTAGTGAAACCACGTAATCCAAGATATGCAAGATGGGAGTTATCAAATCCTGCATTTGA
ACTTGATCAAAGTATACTTTTTGTTATTGGTTCAGCGACGGGTGCATCTAATAACCTACATCAG
ATTGGTATTATAGAATTTGATGCATACTTTACTAAACCGACAATAGAGGCGAATAATGTAAGTG
TTCCGGTGGGAGCAACATTTAATCCGAAAACATATCCAGGAATAAATTTAAGAGCAACTGATGA
AATAGATGGTGATTTGACATCTGAAATTATTGTGACAGATAATAATGTTAATACGTGAAATCT
GGTGTGTATAATGTGACGTATTATGTAAAGAATAGCTATGGGGAAAGTGATGAAAAACAATCG
AAGTAACTGTGTTTTCAAACCCTACAATTATTGCAAGTGATGTTGAAATTGAAAAAGGTGAATC
GTTTAATCCATTAACAGACTCAAGAGTGAGGCTGTCTGCACAAGATTCATTGGGTAATGATATT
ACTTCAAAGTAAAGGTGAAATCAAGTAATGTGGATACTTCGAAACCAGGTGAATATGATGTTG
TGTTTGAAGTGACCGATAATTTTGGTGGGAAAGCAGAAAAAGAAATCAAGGTTACAGTTTTAGG
GCAGCCAAGTATTGAAGCGAATGATGTTGAATTAGAAATAGGTGATTTATTTAATCCGTTAACA
GATTCACAAGTAGGCCTTCGTGCAAAGACTCATTAGGCAAAGATATTACGAATGATGTGAAAG
TAAAGTCAAGTAATGTGGATACTTCAAACCAGGAGAATATGAAGTTGTATTTGAAGTGACCGA
TCGTTTTGGAAAAAAGCAGAAAAAGTATCAAAGTCCTTGTTCTAGGAGAACCAAGCATTGAA
GCAAATAATGTTGAGATTGAAAAAGACGAAAGGTTGATCCATTAACAGATTCAAGAGTAGGTC
TCCGTGCAAAGACTCATTAGGCAAAGATATTACGAATGATGTGAAAGTAAAATCAAGTAATGT
GGATACTTCAAACCAGGAGAATATGAAGTTGTATTTGAAGTGACTGATCGTTTTGGTAAATAT
GTAAAGAAATTGATTGTAGTTATAGTACCAGTAATTGATGATGAATGGGAAGATGGAAATGTGA
ATGGATGGAAATTCATGCGGGGCAAGACATCACACTGTTGAAAGATCCTGAAAAAGCATATAA
AGGAGAATATGTATTCTATGATTCTAGGCATGCTGCTATTTCTAAAACAATCCAGTAACAGAT
TTACAAGTGGGAGGGAATTATGAAATTACAGTATATGTTAAAGCAGAAAGCGGTGATCATCACC
TAAAAGTGACGTACAAGAAAGACCCGAAAGGTCCGGAGGAACCACCAGTTTTCAATAGACTTAT
TAGTACAGGGAAATTGGTGGAAAAAGACTATAGAGAATTAAGGAACATTCCGTGTAACGGAA
TTAAACCAAGCACCATTGATAATCGTAGAGAATTTTGGTCTGGATATATAGGTGGAATTAGAA
TTGTGAAAATATCGTAATAAAAACAGATAAAATAGAGAGAGGAACGCTGGATAGCGTTCCTCTT
TTCAGTTTAGTGTACCATCTCCAGGTCCAGTTCATTTTTT

5.5.2 Aminosäuresequenz des CryET70-Polypeptids

MKDSISKGYDEITVQASDYIDIRSIFQTNGSATFNSTTNITTLTQATNSQ
 AGAIAGKTALDMRHDFTRADI FLGTKSNGADGIAIAFHRSIGFVGEKG
 GGLGILGALKGIGFELDTYANAPQDEQGDSFGHGAMRGLFPGFPNGYPHA
 GFVSTDKNRGWLSALAQMQRIAAPNGRWRRLAIHWDARNKCLTANLEDLT
 FNDSTVLVKPRTPRYARWELSNPAFELDQKYTFVIGSATGASNNLHQIGI
 IEFDAYFTKPTIEANNVSVFVGATFNPKTYPGINLRA'TDEIDGDLTSEII
 VTDNNVNTSKSGVYNVTYYVKNSYGESDEKTIEVTVFSNPTIIASDVEIE
 KGESFNPLTDSRVRLSAQDSLGN DITSKVVKVSSNVDTSKPGEYDVVFEV
 TDNFGGKAEKEIKVTVL̄GQPSIEANDVELEIGDL̄FNPLTDSQVGLRAKDS
 LGKDITNDVKVKSNNVDTSKPGEYEYVFEVTD RFGKKAEKSIKVLVLGEP
 SIEANNVEIEKDERFDPLTDSRVGLRAKDSL̄GKDITNDVKVKSNNVDTSK
 PGEYEYVFEVTD RFGKYVKKLIVVIVPVIDDEWEDGNVNGWKFYAGQDIT
 LLKDPEKAYKGEYVFYDSRHA AISKTI PVTDLQVGGNYEITVYVKAESGD
 HHLKVTYKKDKPKGPEEPPVFNRLISTGKLV̄EKDYRELKGTFRVTELNQAP
 LIIVENFGAGYIGGIRIVKIS

5.6 Beispiel 6 – Analyse von Sequenzhomologien zu cryET70/CryET70-Sequenzen

[0336] Datenbank-Recherchen wurden durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Aminosäuresequenz des CryET70-Polypeptids teilweise mit den Sequenzen anderer charakterisierter Proteine, insbesondere anderer insektizider Proteine, identisch ist. Datenbank-Recherchen unter Verwendung von Online-Servern wurden durchgeführt, wobei man die Aminosäuresequenz von CryET70 mit dem BLASTP-Programm (Altschul et al., 1990) verwendete, das vom National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD) zur Verfügung gestellt wurde. Die BLASTP-Recherchen wurden mit der BLOSUM62-Matrix durchgeführt. Die durchsuchte Datenbank bestand aus nichtredundanten GenBank-CDS-Translationen plus den Datenbanken PDB, SwissProt, SPupdate und PIR.

[0337] Nur ein Protein in diesen Datenbanken wurde identifiziert, das eine signifikante Ähnlichkeit mit CryET70 aufwies: Cry22, ein gegenüber Hymenoptera toxisches Protein aus *B. thuringiensis* PS211B2, das als SEQ ID Nr. 51 von US-Patent Nr. 5,596,071 identifiziert wurde, zeigte 88,9% Sequenzidentität mit CryET70.

[0338] Eine Datenbank mit *B.-thuringiensis*-Toxinen (die alle bisher veröffentlichten Toxingene und -proteine umfasst) wurde nach Proteinen mit Homologie zu CryET70 abgesucht, wobei der FASTA-Algorithmus (Lipman und Pearson, 1985) im PCGene-Programm (Intelligenetics, Mountain View, CA) verwendet wurde. Wiederum zeigte nur Cry22 eine signifikante Sequenzidentität mit CryET70.

5.7 Beispiel 7- Expression von rekombinantem CryET70-Polypeptid

[0339] Um die Eigenschaften des CryET70-Polypeptids zu charakterisieren, war es notwendig, das klonierte cryET70-Gen in einem *B.-thuringiensis*-Stamm zu exprimieren, der keine anderen Kristallproteine produziert (d.h. in einem Cry-negativen Stamm). Das Plasmid, das das klonierte cryET70-Gen enthielt, pEG1648, enthält einen *B.-thuringiensis*-Replikationsstartpunkt sowie einen Startpunkt, der die Replikation in *E. coli* anleitet, wie es oben beschrieben ist. Das Plasmid pEG1648 wurde verwendet, um den Cry-negativen *B.-thuringiensis*-Stamm EG10650 durch Elektroporation (Macaluso und Mettus, 1991) zu Erythromycin-Resistenz (Em^R) zu transformieren. Zu Em^R transformierte Zellen wurden durch über Nacht erfolgende Inkubation auf LB-Agarplatten, die 25 µg/ml Erythromycin enthielten, selektiert. Eine Em^R -Kolonie aus jeder Transformation wurde für die weitere Analyse ausgewählt. Ein Isolat wurde als EG11839 bezeichnet.

[0340] EG11839 wurde vier Tage lang bei 25 °C in C2-Medium gezüchtet, das 25 µg/ml Erythromycin enthielt;

zu diesem Zeitpunkt hatten Sporulation und Lyse bereits stattgefunden. Die mikroskopische Untersuchung der Kulturen, die Sporen gebildet hatten, zeigte, dass der rekombinante Stamm große dunkle spindelförmige kristalline Einschlüsse produzierte. Diese Kristalle ähneln den Kristallen, die der Wildtypstamm EG4140 produziert, was darauf hinweist, dass das cryET70-Gen im rekombinanten Stamm EG11839 ein funktionelles Gen ist, das die Expression des CryET70-Polypeptids anleiten kann.

[0341] Die Kultur von EG11839, die Sporen gebildet hatte, wurde durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und in einem Zehntel des ursprünglichen Volumens H₂O resuspendiert. Das Kristallprotein in der Suspension wurde durch SDS-PAGE-Analyse charakterisiert, die die Produktion eines Proteins von ungefähr 86 kD ergab.

5.8 Beispiel 8 – Toxizität von CryET70 gegenüber Insekten

[0342] Die Toxizität des CryET70-Polypeptids gegenüber WCRW-Larven (*Diabrotica virgifera virgifera*) wurde bestimmt.

[0343] EG11839 wurde vier Tage lang bei 25 °C in C2-Medium gezüchtet, bis Sporulation und Zellyse stattgefunden hatten. Die Kultur wurde durch Zentrifugation geerntet, in ungefähr dem 2,5fachen des ursprünglichen Volumens mit H₂O gewaschen und in 0,005% Triton X-100® in einem Zehntel des ursprünglichen Volumens resuspendiert. Zum Vergleich mit EG11839 wurde ein rekombinanter *B. thuringiensis*-Stamm, EG11204, der das gegenüber Coleoptera toxische Protein Cry3Bb produzierte (Donovan et al., 1992), in derselben Weise gezüchtet und geerntet. Toxinproteine aus den Proben wurden durch SDS-PAGE quantifiziert, wie es von Brussock und Currier (1990) beschrieben wurde. Das Verfahren wurde so modifiziert, dass der Neutralisationsschritt mit 3 M HEPES weggelassen wurde.

[0344] WCRW-Larven wurden einem Bioassay durch Oberflächenkontamination einer künstlichen Nahrung (20 g Agar, 50 g Weizenkeim, 39 g Saccharose, 32 g Casein, 14 g Faser, 9 g Wesson-Salzgemisch, 1 g Methylparaben, 0,5 g Sorbinsäure, 0,06 g Cholesterin, 9 g Vadderzant-Vitaminmischung, 0,5 ml Leinsaatöl, 2,5 ml Phosphorsäure/Propionsäure pro Liter) unterzogen. Jeder Bioassay von EG11839 (CryET70) und EG11204 (Cry3Bb) bestand aus einer Verdünnungsreihe aus acht wässrigen Verdünnungen, wobei Aliquote auf die Oberfläche der Nahrung aufgetragen wurden. Nachdem das Verdünnungsmittel (eine wässrige 0,005%ige Triton-X-100®-Lösung) getrocknet war, wurden Larven des ersten Häutungsstadiums auf die Nahrung gesetzt und bei 28 °C inkubiert. Pro Dosis wurden zweiunddreißig Larven getestet. Die Mortalität wurde nach sieben Tagen bewertet. Daten aus parallel durchgeführten Bioassays wurden für eine Probitanalyse (Daum, 1970) vereinigt, wobei die Mortalität um die Kontrollmortalität korrigiert wurde, wobei die Kontrolle nur aus Verdünnungsmittel bestand (Abbott, 1925). Die Ergebnisse werden als Menge des Kristallproteins pro Napf (175 mm² Nahrungsoberfläche) angegeben, was zu einem LC₅₀-Wert führte, der Konzentration, die 50% der Testinsekten tötete. 95%-Konfidenzintervalle für die LC₅₀-Werte werden ebenfalls angegeben (Tabelle 11).

Tabelle 11

Insektizide Aktivität des CryET70-Proteins gegenüber WCRW-Larven

Probe	Kristallprotein	LC ₅₀ (µg Protein/Napf)	95%-Konfidenz- intervall	LC ₉₅ (µg Protein/Napf)
EG11839	CryET70	8,4	6-11	69
EG11204	Cry3Bb	11,4	3-23	437

Kontrollmortalität 12,5%

[0345] Die in Tabelle 11 gezeigten Ergebnisse beweisen, dass das CryET70-Polypeptid eine signifikante Aktivität auf Larven des Westlichen Maiswurzelbohrers hat. CryET70 ist wenigstens so aktiv wie Cry3Bb.

[0346] Eine Sporen-Kristall-Suspension von EG11839, wie sie in Beispiel 2 beschrieben ist, wurde einem Screening auf Aktivität gegen Lepidoptera-Insekten unterzogen. EG2001, der Cry1-enthaltende Stamm HD1, wurde als Kontrolle getestet. EG2001 wurde in C2-Medium gezüchtet, wie es in Beispiel 2 beschrieben ist, gewaschen und in einem ursprünglichen Volumen von 0,005% Triton X-100® resuspendiert. EG11839 zeigte keine signifikante Aktivität gegen *Agrotis ipsilon*, *Heliiothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Ostrinia nubilalis*, *Spodo-*

ptera exigua, Spodoptera frugiperda, Diabrotica undecimpunctata howardi und Leptinotarsa decemlineata. EG11839 zeigte eine gewisse Aktivität gegen Plutella xylostella und Trichoplusia ni (Tabelle 12).

Tabelle 12

Insektizide Aktivität von EG11839 gegen *P. xylostella* und *T. ni*

Probe	<i>P. xylostella</i> (% Mortalität)	<i>T. ni</i> (% Mortalität)
EG11839*	31	40
EG2001**	25	81

* Dosis 10 000 nl/Napf

** Dosis 10 nl/Napf

[0347] CryET70 weist also Toxizität gegenüber Larven sowohl von Coleoptera- als auch von Lepidoptera-Spezies auf.

[0348] CryET70 ist mit Cry22 zu 88,9% homolog. Der Escherichia-coli-Stamm NRRL B-21150, der das Plasmid pMYC2371 enthält, das das cry22-Gen trägt, wurde von der USDA-ARS, Patent Culture Collection (Peoria, IL), erhalten. Das Plasmid wurde unter Verwendung des Wizard® SV Miniprep Kit (Promega, Madison, WI) isoliert, und die Plasmid-DNA wurde verwendet, um Bt EG10650 zu Em^R zu transformieren. Der resultierende Stamm ist EG11860. EG11860 und EG11839 wurden so gezüchtet, wie es in Beispiel 2 beschrieben ist, und einem Screening gegen WCRW unterzogen, wie es oben beschrieben ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 gezeigt.

Tabelle 13

Insektizide Aktivität von CryET70 und Cry22 gegen WCRW

Probe	% Mortalität	
	20 µg/Napf	200 µg/Napf
EG11839 (CryET70)	81,5	100
EG11860 (Cry22)	0	18,5

[0349] CryET70 zeigt eine signifikante Toxizität gegenüber WCRW, während Cry22 keine zeigt. Die Sequenzunterschiede zwischen CryET70 und Cry22 verleihen CryET70 WCRW-Aktivität.

[0350] Ein Abgleich zwischen den CryET70- und den Cry22Aa-Aminosäuresequenzen zeigte, dass die Aminosäuresequenzunterschiede nicht auf einen bestimmten Bereich lokalisiert sind, sondern über die gesamte Länge der beiden Proteine verstreut sind. Dennoch sind mehrere Bereiche der Verschiedenheit zu bemerken. Zum Beispiel sind die aminoterminalen Sequenzen der beiden Proteine von Position 3 bis 8 völlig verschieden. Außerdem enthält Cry22Aa einen zusätzlichen Alaninrest auf Position 17. Die CryET70-Sequenz von Rest 506 bis 516 zeigt nur 45% Sequenzidentität mit der homologen Sequenz 507-517 in Cry22Aa. Unter Verwendung des ANTIGEN-Programms [auf der Basis des Verfahrens von Hopp und Woods (1981)] im PC/GENE-Sequenzanalysepaket wurde bestimmt, dass die CryET70-Sequenz von Rest 508 bis 514 erheblich hydrophiler ist als die homologe Cry22A-Sequenz. Da hydrophile Bereiche häufig an der Oberfläche von globulären Proteinen lokalisiert sind und folglich an Wechselwirkungen mit anderen Molekülen beteiligt sein können, kann dieser hydrophile Bereich wichtig sein, um die Unterschiede in der insektiziden Aktivität, die zwischen CryET70 und Cry22Aa festgestellt wurden, zu bestimmen. Unter Verwendung des SOAP-Programms [auf der Basis des Verfahrens von Kyle und Doolittle (1982)] im PC/GENE-Sequenzanalysepaket konnten die Hydropathieindices für CryET70 und Cry22Aa miteinander verglichen werden. Die beiden Proteine zeigten offensichtliche Unterschiede in der Hydrophobie am Aminoterminus in der Nähe von Rest Q124 in CryET70, in der Nähe der Reste 506-516 in ET70, in der Nähe der Reste 569-573 in CryET70 und in der Nähe von Rest K662 in CryET70. Diese Bereiche stellen Angriffspunkte für zukünftige Untersuchungen dar. Zum Beispiel könnte jeder einzigartige

CryET70-Bereich systematisch durch in-vitro-Mutagenese in das cry22Aa-Gen eingeführt werden, um diejenigen Bereiche zu identifizieren, die Cry22Aa WCRW-Toxizität verleihen.

5.9 Beispiel 9 – Zusätzliche Stämme mit Sequenzen, die mit cryET70 verwandt sind

[0351] Bisher wurden 26 Wildtypstämme mit Sequenzen, die mit cryET70 verwandt sind, identifiziert. Diese Stämme wurden durch Kolonie-Blot-Hybridisierungsexperimente unter Verwendung einer cryET70-spezifischen Hybridisierungssonde identifiziert. Wildtypstämme wurden fleckenförmig auf LB-Platten aufgetragen und vier Stunden lang bei 30 °C inkubiert. Dann wurde ein Rundmembranfilter (82 mm Durchmesser) des Typs Nytran® Maximum-Strength Plus (Schleicher und Schuell, Keene, NH) auf die Platten gelegt, und die Platten und Filter wurden über Nacht bei 25 °C inkubiert. Dann wurden die Filter, die eine genaue Kopie der Flecken enthielten, auf frische LB-Platten gelegt, und die Filter und die ursprünglichen Platten wurden 4 h lang bei 30 °C inkubiert, um ein Wachstum der Kolonien zu ermöglichen. Nach vier Stunden wurden die Filter denaturiert, neutralisiert, gewaschen und gebacken, wie es in Beispiel 4 beschrieben ist.

[0352] Primer wurden auf der Basis der cryET70-Sequenz entworfen.

AM34:

5'-GACATGATTTTACTTTTAGAGC-3' (SEQ ID NO:5)

AM43:

5'-CATCACTTTCCCATAGC-3' (SEQ ID NO:6)

[0353] Ein PCRTM mit den Primern AM34 und AM43 wurde verwendet, um ein cryET70-Fragment aus pEG1648-DNA zu amplifizieren. Dieses PCRTM-Produkt wurde unter Verwendung des Prime-a-Gene® Kit (Promega Corporation, Madison, WI) mit [α -³²P]dATP markiert, um eine cryET70-spezifische Sonde zu erzeugen. Hybridisierungen wurden so durchgeführt, wie es in Beispiel 4 beschrieben ist, mit der Ausnahme, dass die Hybridisierungstemperatur 63 °C betrug. Filter wurden bei 63 °C in 1X SSC, 0,1% SDS gewaschen. Hybridisierende Kolonien wurden durch Autoradiographie unter Verwendung von Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm nachgewiesen. Die Stämme, die durch Kolonie-Blot-Hybridisierung identifiziert wurden, sind in Tabelle 14 aufgeführt.

5.10 Beispiel 10 – Produktion von Antikörper gegen CryET70

[0354] CryET70-Polypeptid wurde für die Antikörperproduktion hergestellt, so dass CryET70-Antikörper verwendet werden konnten, um mit CryET70 verwandte Proteine zu identifizieren. EG11839 wurde vier Tage lang bei 25 °C in C2-Medium gezüchtet. Die Kultur wurde im 2,5fachen Volumen H₂O gewaschen und in 1/20 des ursprünglichen Volumens an 0,005% Triton X-100® resuspendiert. Dann wurde die Sporen-Kristall-Suspension auf einen Saccharose-Stufengradienten aufgetragen, der aus 79%, 72% und 55% Saccharose bestand. Der Gradient wurde über Nacht mit 18 000 U/min in einer Beckman SW28 rotieren gelassen. CryET70-Kristalle bildeten eine Bande zwischen den Schichten mit 79% und 72% Saccharose. Die CryET70-Kristalle wurden mehrmals in H₂O gewaschen und in 0,005% Triton X-100® resuspendiert. Dann wurden die gereinigten Kristalle in 50 mM Natriumcarbonat (pH 10), 5 mM DTT, gelöst, und alle kontaminierenden vegetativen Zellen oder Sporen wurden durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde mit Borsäure auf pH 8,4 neutralisiert, und die gelösten Kristalle wurden für die Antikörperproduktion in Kaninchen nach Standardverfahren zu den Rockland Laboratories (Gilbertsville, PA) geschickt. Die Kaninchen erhielten zwei intradermale Injektionen an den Tagen 0 und 7 mit 50% CryET70-Polypeptid in steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung, 50% Freund's vollständiges Adjuvans. Zwei zusätzliche Auffrischimpfungen wurden an den Tagen 14 und 28 subkutan gegeben, bevor am Tag 38 eine Testblutentnahme erfolgte. Für die anfängliche Injektion wurden 250 µg CryET70 pro Kaninchen verwendet, und für die anschließenden Auffrischimpfungen wurden 125 µg CryET70 pro Kaninchen verwendet. Am Tag 56 erhielten die Kaninchen erneut eine Auffrischimpfung wie zuvor, bevor am Tag 71 eine Produktionsblutentnahme erfolgte. Die letzte Auffrischimpfung erfolgte mit 160 µg CryET70 am Tag 80, gefolgt von einer Abschlussblutentnahme am Tag 90.

5.11 Beispiel 11 – Analyse von Stämmen, die mit cryET70 verwandte Sequenzen enthalten

[0355] Die Stämme, die in Beispiel 9 als Stämme identifiziert wurden, die Sequenzen enthalten, die mit cryET70 verwandt sind, wurden einem Screening in einem Bioassay gegen WCRW unterzogen, wie es in Beispiel 2 beschrieben ist. Außerdem wurden die Stämme weiterhin durch Southern- und Western-Blot-Analysen untersucht.

[0356] Gesamt-DNA wurde aus den Stämmen präpariert, wie es in Beispiel 4 beschrieben ist. Die Ge-

samt-DNA wurde mit EcoRI abgebaut und auf einem 0,8% Agarose-Gel in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 2 mM Na₂EDTA, pH 8) aufgetrennt. Die DNA wurde nach dem Verfahren von Southern (1975) auf ein Immobilon-NC-Nitrocellulosefilter (Millipore Corp., Bedford, MA) übertragen. DNA wurde durch Backen bei 80 °C in einem Vakuumofen auf dem Filter fixiert.

[0357] Dann wurde der Blot mit der in Beispiel 9 beschriebenen cryET70-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Hybridisierungen wurden wie in Beispiel 4 durchgeführt, mit der Ausnahme, dass die Hybridisierungs- und Waschttemperatur 60 °C betrug. Stämme, die hybridisierende DNA-Fragmente enthalten, sind in Tabelle 14 aufgeführt.

[0358] Für die Western-Blot-Analyse wurden Proteine aus 10fach konzentrierten Kulturen der Stämme auf einem 10% SDS-Polyacrylamid-Gel (Owl Separation Systems, Woburn, MA) laufen gelassen. 20 µl Kultur wurden zu 10 µl 3 × Laemmli-Puffer gegeben, und es wurde fünf Minuten lang auf 100 °C erhitzt. Pro Bahn wurden 15 µl aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel nach Standard-Western-Blotting-Verfahren (Towbin et al., 1979) auf Nitrocellulose übertragen. Der Filter wurde mit TBSN (10 mM Tris, pH 7,8, 0,9% NaCl, 0,1% globulinfreies BSA, 0,03% NaN₃) + 2% BSA blockiert. Dann wurde das Filter zweimal mit TBSN gewaschen und dann mit einer 1/1000-Verdünnung von Anti-CryET70 in TBSN inkubiert. Der Filter wurde nach der Inkubation mit Antikörper in TBSN gewaschen und dann mit dem mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Schaf-Anti-Kaninchen-IgG (1/1000 Verdünnung in TBSN) inkubiert. Nach dem Waschen in TBSN wurden die antigen mit CryET70 verwandten Proteine mit dem ImmunoPure[®] NBT/BCIP Substrate Kit (Pierce, Rockford, IL) nachgewiesen. Die Ergebnisse der Southern-Blot-, Western-Blot- und Bioassyanalyse sind in Tabelle 14 gezeigt.

Tabelle 14

Stämme, die mit cryET70 verwandte Gene enthalten

Stämme	Southern Blot	Western Blot	% Kontrolle WCRW
EG2929	+	+	26
EG3218	+	-	30
EG3221	+	--	63
EG3303	+	-	15
EG3304	+		0
EG3707	+	-	45
EG3803		-	0
EG3953	+		100
EG3966	+	-	7
EG4113	-	-	40
EG4135	+	+	45
EG4150	-	-	64
EG4268	-	+	46
EG4375		-	100
EG4447	+		0
EG4448	+	-	100
EG4503	+	-	56
EG4541	+	-	72
EG4580	+	+	33
EG4640	-	-	95
EG4737	-	-	72
EG4741	+	-	73
EG5233	-	-	52
EG5366	+	-	69
EG5370	-	-	16
EG5422		-	8

[0359] Die obigen Daten weisen darauf hin, dass es eine Familie von mit cryET70 verwandten Genen gibt, von denen einige mit CryET70 verwandte Proteine codieren, welche Aktivität gegen WCRW aufweisen. Es können verwandte Proteine mit erhöhter Aktivität gegen WCRW oder mit einem erweiterten Spektrum der insektiziden Aktivität gefunden werden.

5.12.1 Konstruktion eines Pflanzengens

[0360] Die Expression eines Pflanzengens, das in Form einer doppelsträngigen DNA vorliegt, beinhaltet die Transcription von Messenger-RNA (mRNA) ausgehend von einem Strang der DNA durch RNA-Polymerase-Enzym und die anschließende Prozessierung des primären mRNA-Transcripts innerhalb des Zellkerns. Diese Prozessierung beinhaltet einen 3'-untranslatierten Bereich, der Polyadenylat-Nucleotide an das 3'-Ende der RNA hinzufügt. Die Transcription von DNA zu mRNA wird durch einen DNA-Bereich reguliert, der gewöhnlich als "Promotor" bezeichnet wird. Der Promotorbereich enthält eine Sequenz von Basen, die der RNA-Polymerase signalisiert, sich an die DNA anzulagern und die Transcription von mRNA einzuleiten, wobei einer der DNA-Stränge als Matrize verwendet wird, so dass ein entsprechender RNA-Strang entsteht.

[0361] Mehrere Promotoren, die in Pflanzenzellen aktiv sind, wurden in der Literatur beschrieben. Solche Promotoren können aus Pflanzen oder Pflanzenviren erhalten werden und umfassen unter anderem die Promotoren der Nopalinn-Synthase (NOS) und der Octopinn-Synthase (OCS) (die auf tumorinduzierenden Plasmiden von *Agrobacterium tumefaciens* vorhanden sind), der 19S- und der 35S-Promotor des Blumenkohl-Mosaikvirus (CaMV), der lichtinduzierbare Promotor von der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (ssRUBISCO, ein sehr häufiges Pflanzen-Polypeptid) und der Braunwurz-Mosaikvirus (FMV)-35S-Promotor. Alle diese Promotoren werden verwendet, um verschiedene Typen von DNA-Konstrukten zu schaffen, die in Pflanzen exprimiert wurden (siehe z.B. US-Patent Nr. 5,463,175).

[0362] Der besondere ausgewählte Promotor sollte eine ausreichende Expression der enzymcodierenden Sequenz bewirken können, die zur Produktion einer wirksamen Menge Protein führt. Eine Gruppe von bevorzugten Promotoren sind konstitutive Promotoren, wie der CaMV-35S- oder FMV-35S-Promotor, die in den meisten Pflanzenorganen hohe Expressionsniveaus ergeben (US-Patent Nr. 5,378,619).

[0363] Eine andere Gruppe von bevorzugten Promotoren sind wurzelverstärkte oder -spezifische Promotoren, wie der von CaMV abgeleitete 4as-1-Promotor oder der Weizen-POX1-Promotor (US-Patent Nr. 5,023,179, Hertig et al., 1991). Die wurzelverstärkten oder -spezifischen Promotoren wären besonders für die Bekämpfung des Maiswurzelbohrers (*Diabrotica* spp.) in transgenen Maispflanzen bevorzugt.

[0364] Die in den DNA-Konstrukten der vorliegenden Erfindung verwendeten Promotoren können gegebenenfalls so modifiziert werden, dass ihre Kontrolleigenschaften beeinflusst werden. Zum Beispiel kann der CaMV35S-Promotor mit dem Teil des ssRUBISCO-Gens ligiert werden, der die Expression von ssRUBISCO in Abwesenheit von Licht reprimiert, wobei ein Promotor entsteht, der in Blättern, aber nicht in Wurzeln aktiv ist. Der resultierende chimäre Promotor kann so verwendet werden, wie es hier beschrieben ist. Für die Zwecke dieser Beschreibung beinhaltet der Ausdruck "CaMV35S"-Promotor also Variationen des CaMV35S-Promotors, z.B. Promotoren, die mittels Ligierung mit Operatorbereichen, statistischer oder kontrollierter Mutagenese abgeleitet sind. Weiterhin können die Promotoren so verändert werden, dass sie multiple "Enhancersequenzen" enthalten, was die Steigerung der Genexpression unterstützt.

[0365] Die durch ein DNA-Konstrukt der vorliegenden Erfindung produzierte RNA enthält auch eine 5'-untranslatierte Leadersequenz. Diese Sequenz kann von dem Promotor abgeleitet sein, der ausgewählt wurde, um das Gen zu exprimieren, und er kann spezifisch modifiziert werden, um die Translation der mRNA zu erhöhen. Die 5'-untranslatierten Bereiche können auch aus viralen RNAs, aus geeigneten eukaryontischen Genen oder aus einer synthetischen Gensequenz erhalten werden. Die vorliegende Erfindung ist nicht auf Konstrukte beschränkt, bei denen der untranslatierte Bereich von der 5'-untranslatierten Sequenz, die die Promotorsequenz begleitet, abgeleitet ist.

[0366] Für eine optimierte Expression in Einkeimblättrigen Pflanzen, wie Mais, sollte auch ein Intron in das DNA-Expressionskonstrukt aufgenommen werden. Dieses Intron würde man typischerweise in der Nähe des 5'-Endes der mRNA in der untranslatierten Sequenz platzieren. Dieses Intron könnte unter anderem aus einer Gruppe von Introns erhalten werden, die aus dem Mais-hsp70-Intron (US-Patent Nr. 5,424,412) oder dem Reis-Act1-Intron (McElroy et al., 1990) besteht. Wie im Folgenden gezeigt wird, ist das Mais-hsp70-Intron für die vorliegende Erfindung geeignet.

[0367] Wie oben angemerkt, enthält der 3'-untranslatierte Bereich der chimären Pflanzengene der vorliegenden Erfindung ein Polyadenylierungssignal, das in Pflanzen die Funktion hat, dass es die Addition von Adenylnucleotiden an das 3'-Ende der RNA bewirkt. Beispiele für bevorzugte 3'-Bereiche sind (1) die 3'-transcri-

bierten, untranslatierten Bereiche, die das Polyadenylierungssignal von tumorinduzierenden (Ti) Plasmidgenen von *Agrobacterium*, wie das Nopalin-Synthase(NOS)-Gen, enthalten, und (2) Pflanzengene wie das Erbsen-ssRUBISCO-E9-Gen (Fischhoff et al., 1987).

5.12.2 Pflanzentransformation und Expression

[0368] Ein Transgen, das eine strukturelle codierende Sequenz der vorliegenden Erfindung enthält, kann nach irgendeinem geeigneten Verfahren, wie den hier ausführlich beschriebenen, in das Genom einer Pflanze eingefügt werden. Zu den geeigneten Pflanzentransformationsvektoren gehören solche, die von einem Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* abgeleitet sind, sowie solche, die zum Beispiel von Herrera-Estrella (1983), Bevan (1983), Klee (1985) und EP 0 120 516 offenbart werden. Außer Pflanzentransformationsvektoren, die von den Ti- oder wurzelinduzierenden (Ri) Plasmiden von *Agrobacterium* abgeleitet sind, können alternative Verfahren verwendet werden, um die DNA-Konstrukte dieser Erfindung in Pflanzenzellen einzufügen. Solche Verfahren können zum Beispiel die Verwendung von Liposomen, Elektroporation, Chemikalien, die die Aufnahme freier DNA erhöhen, Abgabe freier DNA über Mikroprojektil-Bombardierung und Transformation unter Verwendung von Viren oder Pollen (Fromm et al., 1986; Armstrong et al., 1990; Fromm et al., 1990) beinhalten.

5.12.3 Konstruktion von Pflanzenexpressionsvektoren für cryET70-Transgene

[0369] Für eine effiziente Expression der hier offenbarten Polynucleotide in transgenen Pflanzen muss der ausgewählte Sequenzbereich, der das insektizide Polypeptid codiert, eine geeignete Sequenzzusammensetzung haben (Diehn et al., 1996).

[0370] Um ein cry-Gen in einen Vektor einzusetzen, der für die Expression in Einkeimblättrigen Pflanzen geeignet ist (d.h. unter der Kontrolle des verstärkten Blumenkohlmosaikvirus-355-Promotors und verknüpft mit dem hsp70-Intron, gefolgt von einer Nopalin-Synthase-Polyadenylierungsstelle, wie im US-Patent Nr. 5,424,412), wird der Vektor mit geeigneten Enzymen, wie NcoI und EcoRI, abgebaut. Dann wird die größere Vektorbande von ungefähr 4,6 kb einer Elektrophorese unterzogen, gereinigt und mit T4-DNA-Ligase mit dem geeigneten Restriktionsfragment ligiert, das das plantisierte cry-Gen enthält. Dann wird die Ligierungsmischung in *E. coli* transformiert, Carbenicillin-resistente Kolonien werden gewonnen, und Plasmid-DNA wird durch DNA-Miniprep-Verfahren gewonnen. Dann kann die DNA einer Restriktions-Endonuclease-Analyse mit Enzymen wie NcoI und EcoRI (zusammen), NotI und PstI unterzogen werden, um Klone zu identifizieren, die die cry-Gen-codierende Sequenz, die mit dem hsp70-Intron fusioniert ist, unter der Kontrolle des verstärkten CaMV35S-Promotors enthalten.

[0371] Um das Gen in einen Vektor einzusetzen, der für die Gewinnung stabil transformierter und insekten-resistenter Pflanzen geeignet ist, kann das Restriktionsfragment aus pMON33708, das die codierende Sequenz von Lysin-Oxidase, die mit dem hsp70-Intron fusioniert ist, unter der Kontrolle des verstärkten CaMV35S-Promotors enthält, durch Gel-Elektrophorese und Reinigung isoliert werden. Dann kann dieses Fragment mit einem Vektor wie pMON30460 ligiert werden, der mit NotI und Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm behandelt wurde (pMON30460 enthält die Neomycin-Phosphotransferase-codierende Sequenz unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors). Dann können kanamycinresistente Kolonien durch Transformation dieser Ligierungsmischung in *E. coli* erhalten werden, und Kolonien, die das resultierende Plasmid enthalten, können durch Restriktions-Endonuclease-Abbau von Plasmid-Miniprep-DNAs identifiziert werden. Restriktionsenzyme wie NotI, EcoRV, HindIII, NcoI, EcoRI und BglII können verwendet werden, um die richtigen Klone zu identifizieren, die das Restriktionsfragment, das richtig in die entsprechende Stelle von pMON30460 eingesetzt ist, in einer solchen Orientierung enthalten, dass sich beide Gene in Tandemstellung befinden (d.h., das 3'-Ende der cry-Gen-Expressions-cassette ist mit dem 5'-Ende der nptII-Expressions-cassette verknüpft). Dann wird die Expression des CryET70-Polypeptids durch den resultierenden Vektor in Pflanzenprotoplasten durch Einführen des Vektors in Protoplasten durch Elektroporation und anschließende Protein-Blot- und ELISA-Analyse bestätigt. Dieser Vektor kann durch Bombardierung mit der Teilchenkanone in die genomische DNA von Pflanzenembryos, wie Mais, eingeführt werden, woraufhin eine Paromomycin-Selektion erfolgt, wobei man Maispflanzen erhält, die das cry-Gen exprimieren, im Wesentlichen so, wie es im US-Patent Nr. 5,424,412 beschrieben ist. In diesem Beispiel wurde der Vektor durch Cobombardierung mit einem Hygromycin-Resistenz verleihenden Plasmid in unreifes embryonales Scutellum (IES) von Mais eingeführt, und dann erfolgte eine Hygromycin-Selektion und Regeneration. Dann werden transgene Maislinien, die das CryET70-Polypeptid exprimieren, durch ELISA-Analyse identifiziert. Dann werden Nachkommensamen aus diesen Ereignissen anschließend auf Schutz vor Insektenfraßanfälligkeit getestet.

5.13 Beispiel 13 – Modifizierung von cryET70-Genen für die Expression in Pflanzen

[0372] Es ist bekannt, dass viele Wildtypgene, die bakterielle Kristallproteine codieren, in Pflanzen nur schlecht als Gen voller Länge oder als verkürztes Gen exprimiert werden. Typischerweise ist der G+C-Gehalt eines cry-Gens gering (37%), und oft enthält es viele A+T-reiche Bereiche, potentielle Polyadenylierungsstellen und zahlreiche ATTTA-Sequenzen. Tabelle 15 zeigt eine Liste von potentiellen Polyadenylierungssequenzen, die vermieden werden sollten, wenn man das "plantisierte" Genkonstrukt herstellt.

Tabelle 15

Liste von Sequenzen potentieller Polyadenylierungssignale

AATAAA*	AAGCAT
AATAAT*	ATTAAT
AACCAA	ATACAT
ATATAA	AAAATA
AATCAA	ATTAAA**
ATACTA	AATTAA**
ATAAAA	AATACA**
ATGAAA	CATAAA**

* zeigt eine potentielle Hauptpolyadenylierungsstelle bei Pflanzen an.

** zeigt eine potentielle Nebepolyadenylierungsstelle bei Tieren an.

[0373] Alle anderen sind potentielle Nebepolyadenylierungsstellen bei Pflanzen.

[0374] Die Bereiche für die Mutagenese können in folgender Weise ausgewählt werden. Alle Bereiche der DNA-Sequenz des cry-Gens, die fünf oder mehr aufeinanderfolgende Basenpaare enthalten, die A oder T sind, werden identifiziert. Diesen wurde in Abhängigkeit von der Länge und dem höchsten Prozentsatz an A+T in der umgebenden Sequenz über einen Bereich von 20-30 Basenpaaren ein Rang zugewiesen. Die DNA wird auf Bereiche analysiert, die Polyadenylierungsstellen oder ATTTA-Sequenzen enthalten könnten. Dann werden Oligonucleotide entworfen, die die Beseitigung von Bereichen von aufeinanderfolgenden A+T, die eine oder mehrere Polyadenylierungsstellen oder ATTTA-Sequenzen enthalten, maximieren. Auf der Basis von veröffentlichten Berichten hat sich gezeigt, dass zwei potentielle Pflanzen-Polyadenylierungsstellen entscheidender sind. Es werden Codons ausgewählt, die den G+C-Gehalt erhöhen, aber keine Restriktionsstellen für Enzyme erzeugen, welche für die Klonierung und den Zusammenbau des modifizierten Gens geeignet sind (z.B. BamHI, BglII, SacI, NcoI, EcoRV). Ähnlich werden Codons vermieden, die die Dubletten TA oder GC enthalten und von denen berichtet wurde, dass es Codons sind, die man in Pflanzen nicht häufig findet.

[0375] Obwohl der CaMV35S-Promotor in den meisten Pflanzengeweben im Allgemeinen ein konstitutiver Promotor mit hohem Niveau ist, ist das Expressionsniveau von Genen, die vom CaMV35S-Promotor angetrieben werden, in Blütengewebe niedrig im Vergleich zu den Niveaus, die man in Blattgewebe beobachtet. Da die ökonomisch wichtigen Angriffspunkte, die von einigen Insekten beschädigt werden, die Blütenteile oder von Blütenteilen abgeleitet (z.B. Baumwollknospen und -kapseln, Tabakknospen, Tomatenknospen und -früchte) sind, ist es häufig vorteilhaft, die Expression von Kristallproteinen in diesen Geweben gegenüber der mit dem CaMV35S-Promotor erhaltenen Expression zu erhöhen.

[0376] Der 35S-Promotor des Braunwurz-Mosaikvirus (FMV) ist zum CaMV35S-Promotor analog. Dieser Promotor wurde isoliert und in einen Pflanzentransformationsvektor eingefügt. Im Vergleich zum CaMV-Promotor wird der FMV-35S-Promotor im Blütengewebe auf hohem Niveau exprimiert, während er immer noch ähnlich hohe Niveaus der Genexpression in anderen Geweben, wie Blättern, ergibt. Es kann ein Pflanzentransformationsvektor konstruiert werden, bei dem das synthetische cry-Gen in voller Länge vom FMV-35S-Promotor angetrieben wird. Tabakpflanzen können mit dem Vektor transformiert und in Bezug auf die Expression des Kristallproteins durch Western Blot oder ELISA-Immunoassay in Blatt- und Blütengewebe

verglichen werden. Der FMV-Promotor wird verwendet, um relativ hohe Konzentrationen an Kristallprotein in Blütengewebe im Vergleich zum CaMV-Promotor zu produzieren.

5.14 Beispiel 14 – Expression von synthetischen cry-Genen mit ssRUBISCO-Promotoren und Chloroplasten-Transitpeptiden

[0377] Die Gene in Pflanzen, die die kleine Untereinheit von RUBISCO (SSU) codieren, werden häufig auf hohem Niveau exprimiert, durch Licht reguliert und zeigen zuweilen Gewebespezifität. Diese Expressionseigenschaften sind weitgehend auf die Promotorsequenzen dieser Gene zurückzuführen. Es ist möglich, SSU-Promotoren zu verwenden, um heterologe Gene in transformierten Pflanzen zu exprimieren. Typischerweise enthält eine Pflanze multiple SSU-Gene, und die Expressionsniveaus und die Gewebespezifität von verschiedenen SSU-Genen ist unterschiedlich. Die SSU-Proteine werden im Zellkern codiert und im Cytoplasma als Vorstufen synthetisiert, die eine N-terminale Verlängerung enthalten, welche als Chloroplasten-Transitpeptid (CTP) bekannt ist. Das CTP lenkt die Vorstufe zum Chloroplasten und fördert die Aufnahme des SSU-Proteins in den Chloroplasten. Bei diesem Vorgang wird das CTP vom SSU-Protein abgespalten. Diese CTP-Sequenzen werden verwendet, um heterologe Proteine in die Chloroplasten transformierter Pflanzen zu lenken.

[0378] Die SSU-Promotoren könnten bei der Expression von heterologen Genen in Pflanzen mehrere Vorteile haben. Einige SSU-Promotoren werden auf sehr hohem Niveau exprimiert und könnten zu Expressionsniveaus führen, die genauso groß oder größer sind als diejenigen, die man mit dem CaMV35S-Promotor beobachtet. Die Gewebeverteilung der Expression ausgehend von SSU-Promotoren unterscheidet sich von derjenigen des CaMV35S-Promotors, und daher kann es zur Bekämpfung einiger Schadinsekten vorteilhaft sein, die Expression von Kristallproteinen zu denjenigen Zellen zu lenken, in denen SSU auf dem höchsten Niveau exprimiert wird. Obwohl er zum Beispiel relativ konstitutiv ist, wird der CaMV35S-Promotor im Blatt in Gefäßgewebe auf höherem Niveau exprimiert als in anderen Teilen des Blatts, während die meisten SSU-Promotoren in den Mesophyllzellen des Blatts am höchsten exprimiert werden. Einige SSU-Promotoren sind auch stärker gewebespezifisch, so dass es möglich sein könnte, einen spezifischen SSU-Promotor zu verwenden, um das Protein der vorliegenden Erfindung nur in einer Teilmenge von Pflanzengeweben zu exprimieren, wenn sich zum Beispiel erwiesen hat, dass die Expression eines solchen Proteins in bestimmten Zellen nachteilig für diese Zellen ist. Zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers bei der Kartoffel kann es zum Beispiel vorteilhaft sein, SSU-Promotoren zu verwenden, um die Expression des Kristallproteins zu den Blättern, aber nicht zu den essbaren Knollen zu lenken.

[0379] Die Verwendung von SSU-CTP-Sequenzen, um Kristallproteine im Chloroplasten zu lokalisieren, könnte ebenfalls vorteilhaft sein. Die Lokalisierung der B.-thuringiensis-Kristallproteine im Chloroplasten könnte sie vor Proteasen schützen, die man im Cytoplasma findet. Dies könnte die Proteine stabilisieren und zu höheren Niveaus der Akkumulation des aktiven Toxins führen. cry-Gene, die das CTP enthalten, können in Kombination mit dem SSU-Promotor oder mit anderen Promotoren, wie CaMV35S, verwendet werden.

5.15 Beispiel 15 – Zielsteuerung von CryET70-Polypeptiden zum extrazellulären Raum oder in Vakuolen mit Hilfe von Signalpeptiden

[0380] Die hier beschriebenen B.-thuringiensis-Polypeptide sind primär im Cytoplasma der Pflanzenzelle lokalisiert, und diese Lokalisierung im Cytoplasma führt zu Pflanzen, die insektizid wirksam sind. In bestimmten Ausführungsformen kann es jedoch vorteilhaft sein, das B.-thuringiensis-Polypeptid in andere Kompartimente der Pflanzenzelle zu lenken. Die Lokalisierung von B.-thuringiensis-Proteinen in anderen Kompartimenten als dem Cytoplasma kann zu einer geringeren Einwirkung von cytoplasmatischen Proteasen auf die B.-thuringiensis-Proteine führen, was eine größere Akkumulation des Proteins und damit eine verstärkte insektizide Aktivität zur Folge hat. Eine extrazelluläre Lokalisierung könnte zu einer effizienteren Einwirkung der B.-thuringiensis-Proteine auf bestimmte Insekten und damit zu einer größeren Wirksamkeit führen. Wenn sich herausstellen würde, dass ein B.-thuringiensis-Protein nachteilig für die Pflanzenzellfunktion ist, könnte eine Lokalisierung in einem nichtcytoplasmatischen Kompartiment diese Zellen vor dem Protein schützen.

[0381] In Pflanzen sowie in anderen Eukaryonten werden Proteine, die entweder für eine extrazelluläre Lokalisierung oder für eine Lokalisierung in mehreren speziellen Kompartimenten vorgesehen sind, typischerweise mit einer N-terminalen Aminosäureverlängerung synthetisiert, die als Signalpeptid bekannt ist. Dieses Signalpeptid lenkt das Protein auf den Kompartimentalisierungsweg, und es wird typischerweise in einem frühen Schritt der Kompartimentalisierung von dem reifen Protein abgespalten. Bei einem extrazellulären Protein beinhaltet der Sekretionsweg typischerweise die cotranslationale Insertion ins Endoplasmatische Retikulum, wobei die Abspaltung des Signalpeptids in diesem Stadium erfolgt. Dann tritt das reife Protein durch den Gol-

gi-Apparat in Vesikeln, die mit der Plasmamembran verschmelzen und so das Protein in den extrazellulären Raum freisetzen. Proteine, die für andere Kompartimente vorgesehen sind, folgen einem ähnlichen Weg. Zum Beispiel folgen Proteine, die für das Endoplasmatische Retikulum oder den Golgi-Apparat vorgesehen sind, diesem Schema, aber sie werden in dem geeigneten Kompartiment spezifisch zurückgehalten. In Pflanzen werden einige Proteine auch zur Vakuole gesteuert, ein anderes membrangebundenes Kompartiment im Cytoplasma vieler Pflanzenzellen. Zur Vakuole gesteuerte Proteine zweigen am Golgi-Apparat von dem obigen Weg ab, wo sie in Vesikel eintreten, die mit der Vakuole verschmelzen.

[0382] Ein gemeinsames Merkmal dieser Protein-Zielsteuerung ist das Signalpeptid, das den Kompartimentalisierungsvorgang einleitet. Das Fusionieren eines Signalpeptids mit einem Protein führt in vielen Fällen zur Zielsteuerung dieses Proteins zum Endoplasmatischen Retikulum. Die Effizienz dieses Schritts kann auch von der Sequenz des reifen Proteins selbst abhängen. Die Signale, die ein Protein in ein spezifisches Kompartiment und nicht in den extrazellulären Raum lenken, sind nicht so klar definiert. Anscheinend sind viele der Signale, die das Protein in spezifische Kompartimente lenken, in der Aminosäuresequenz des reifen Proteins enthalten. Dies wurde für einige zur Vakuole gelenkte Proteine gezeigt, aber es ist noch nicht möglich, diese Sequenzen genau zu definieren. Anscheinend ist die Sekretion in den extrazellulären Raum der "Standardweg" für ein Protein, das eine Signalsequenz, aber keine anderen Kompartimentalisierungssignale enthält. Eine Strategie, um B.-thuringiensis-Proteine aus dem Cytoplasma herauszulenken, ist also die Fusion der Gene für synthetische B.-thuringiensis-Gene mit DNA-Sequenzen, die bekannte Pflanzensignalpeptide codieren. Diese Fusionsgene ergeben B.-thuringiensis-Proteine, die den Sekretionsweg betreten, und führen zu einer extrazellulären Sekretion oder Zielsteuerung zur Vakuole oder anderen Kompartimenten.

[0383] Signalsequenzen für mehrere Pflanzengene wurden beschrieben. Eine solche Sequenz für das mit Tabak-Pathogenese zusammenhängende Protein PR1b wurde bereits beschrieben (Cornelissen et al., 1986). Das PR1b-Protein ist normalerweise im extrazellulären Raum lokalisiert. Ein anderer Typ von Signalpeptid befindet sich an Samenspeicherproteinen von Leguminosen. Diese Proteine sind im Eiweißkörper von Samen lokalisiert, ein vakuolenartiges Kompartiment, das man in Samen findet. Eine Signalpeptid-DNA-Sequenz für die β -Untereinheit des 7S-Speicherproteins der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*), PvuB, wurde beschrieben (Doyle et al., 1986). Auf der Grundlage dieser veröffentlichten Sequenzen können Gene chemisch synthetisiert werden, wobei man Oligonucleotide verwendet, die die Signalpeptide für PR1b und PvuB codieren. Um eine Sekretion oder Kompartimentalisierung von heterologen Proteinen zu erreichen, kann es in einigen Fällen notwendig sein, eine Aminosäuresequenz über die normale Abspaltungsstelle des Signalpeptids hinaus mit aufzunehmen. Dies kann notwendig sein, um eine richtige Abspaltung des Signalpeptids zu gewährleisten.

6.0 Literaturstellen

US-Patent Nr. 4,196,265, erteilt am Apr. 1, 1980.
 US-Patent Nr. 4,237,224, erteilt am Dez. 2, 1980.
 US-Patent Nr. 4,554,101, erteilt am Nov. 19, 1985.
 US-Patent Nr. 4,683,195, erteilt am Jul. 28, 1987.
 US-Patent Nr. 4,683,202, erteilt am Jul. 28, 1987.
 US-Patent Nr. 4,757,011, erteilt am Jul. 12, 1988.
 US-Patent Nr. 4,769,061, erteilt am Sep. 6, 1988.
 US-Patent Nr. 4,800,159, erteilt am Jan. 24, 1989.
 US-Patent Nr. 4,883,750, erteilt am Nov. 28, 1989.
 US-Patent Nr. 4,940,835, erteilt am Feb. 23, 1990.
 US-Patent Nr. 4,943,674, erteilt am Jul. 24, 1990.
 US-Patent Nr. 4,965,188, erteilt am Okt. 23, 1990.
 US-Patent Nr. 4,971,908, erteilt am Nov. 20, 1990.
 US-Patent Nr. 4,987,071, erteilt am Jan. 22, 1991.
 US-Patent Nr. 5,097,025, erteilt am März 17, 1992.
 US-Patent Nr. 5,106,739, erteilt am Apr. 21, 1992.
 US-Patent Nr. 5,110,732, erteilt am Mai 5, 1992.
 US-Patent Nr. 5,139,954, erteilt am Aug. 19, 1992.
 US-Patent Nr. 5,176,995, erteilt am Okt. 15, 1991.
 US-Patent Nr. 5,177,011, erteilt am Jan. 5, 1993.
 US-Patent Nr. 5,334,711, erteilt am Aug. 2, 1994.
 US-Patent Nr. 5,378,619, erteilt am Jan. 3, 1995.
 US-Patent Nr. 5,384,253, erteilt am Jan. 24, 1995.
 US-Patent Nr. 5,401,836, erteilt am März 28, 1995.

US-Patent Nr. 5,436,393, erteilt am Jul. 25, 1995.
US-Patent Nr. 5,442,052, erteilt am Aug. 15, 1995.
US-Patent Nr. 5,447,858, erteilt am Sep. 5, 1995.
US-Patent Nr. 5,459,252, erteilt am Okt. 17, 1995.
US-Patent Nr. 5,491,288, erteilt am Feb. 13, 1996.
US-Patent Nr. 5,504,200, erteilt am Apr. 2, 1996.
US-Patent Nr. 5,530,196, erteilt am Jun. 25, 1996.
US-Patent Nr. 5,538,879, erteilt am Jul. 23, 1996.
US-Patent Nr. 5,576,198, erteilt am Nov. 19, 1996.
US-Patent Nr. 5,589,583, erteilt am Dez. 31, 1996.
US-Patent Nr. 5,589,610, erteilt am Dez. 31, 1996.
US-Patent Nr. 5,595,896, erteilt am Jan. 21, 1997.
US-Patent Nr. 5,596,071, erteilt am Jan. 21, 1997.
US-Patent Nr. 5,608,144, erteilt am März 4, 1997.
US-Patent Nr. 5,614,399, erteilt am März 25, 1997.
US-Patent Nr. 5,631,359, erteilt am Mai 20, 1997.
US-Patent Nr. 5,633,363, erteilt am Mai 27, 1997.
US-Patent Nr. 5,633,439, erteilt am Mai 27, 1997.
US-Patent Nr. 5,633,440, erteilt am Mai 27, 1997.
US-Patent Nr. 5,633,441, erteilt am Mai 27, 1997.
US-Patent Nr. 5,646,333, erteilt am Jul. 8, 1997.
US-Patent Nr. 5,659,124, erteilt am Aug. 19, 1997.
US-Patent Nr. 5,689,040, erteilt am Nov. 18, 1997.
US-Patent Nr. 5,689,049, erteilt am Nov. 18, 1997.
US-Patent Nr. 5,689,051, erteilt am Nov. 18, 1997.
US-Patent Nr. 5,689,056, erteilt am Nov. 18, 1997.
US-Patent Nr. 5,700,922, erteilt am Dez. 23, 1997.
US-Patent Nr. 5,712,112, erteilt am Jan. 27, 1998.
WO 87/6270 (PCT/US87/0088).
WO 89/09284 (PCT/US89/01025).
WO 84/02913.
WO 88/10315.
WO 89/06700.
WO 91/03162.
WO 92/07065.
WO 93/15187.
WO 93/23569.
WO 94/02595.
WO 94/13688.
WO 98/13497.
EP-A-0 360 257.
EP-A-320 308.
EP-A-329 822.
EP-A-519 463 (EP 92 110 298.4)
GB-A-2,202,328.
Abdullah et al., *Biotechnology*, 4:1087, 1986.
Abbott, "A method for computing the effectiveness of an insecticide," *J. Econ. Entomol.*, 18:265-267, 1925.
Adelman, Hayflick, Vasser, Seeburg, "In vitro deletion mutagenesis for bacterial production of the 20,000-dalton form of human pituitary growth hormone," *DNA*, 2(3):183-193, 1983.
Allen and Choun, "Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system," *FEBS Lett.*, 223:42-46, 1987.
Altschul, Gish, Miller, Myers, Lipman, "Basic local alignment search tool," *J. Mol. Biol.*, 215(3):403-410, 1990.
Armitage, Ly, Koch, Frydenlund, Orum, Batz, Schuster, "Peptide nucleic acid-DNA duplexes: long range hole migration from an internally linked anthraquinone," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(23):12320-12325, 1997.
Arvidson, Dunn, Strnad, Aronson, "Specificity of *Bacillus thuringiensis* for lepidopteran larvae: factors involved in vivo and in the structure of a purified protoxin," *Mol. Microbiol.*, 3(11):1533-1534, 1989.
Baum, Coyle, Gilbert, Jany, Gawron-Burke, "Novel cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*," *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(11):3420-3428, 1990.
Baumlein, Boerjan, Nagy, Panitz, Inze, Wobus, "Upstream sequences regulating legumin gene expression in heterologous transgenic plants," *Mol. Gen. Genet.*, 225(1):121-128, 1991.

- Benbrook et al., In: Proceedings Bio Expo 1986, Butterworth, Stoneham, MA, pp. 27-54, 1986.
- Berhnhard, FEMS Microbiol. Lett., 33:261-265, 1986.
- Berna and Bernier, "Regulated expression of a wheat germin gene in tobacco: oxalate oxidase activity and apoplastic localization of the heterologous protein," Plant Mol. Biol., 33(3):417-429, 1997.
- Boffa, Carpaneto, Allfrey, "Isolation of active genes containing CAG repeats by DNA strand invasion by a peptide nucleic acid," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(6):1901-1905, 1995.
- Boffa, Morris, Carpaneto, Louissaint, Allfrey, "Invasion of the CAG triplet repeats by a complementary peptide nucleic acid inhibits transcription of the androgen receptor and TATA-binding protein genes and correlates with refolding of an active nucleosome containing a unique AR gene sequence," J. Biol. Chem., 271(22):13228-13233, 1996.
- Bolivar, Rodriguez, Greene, Betlach, Heyneker, Boyer, "Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system," Gene, 2(2):95-113, 1977.
- Boronat, Martinez, Reina, Puigdomenech, Palau, "Isolation and sequencing of a 28 kd gluteline-2 gene from maize: Common elements in the 5' flanking regions among zein and glutelin genes," Plant Sci., 47:95-102, 1986.
- Brown and Whiteley, "Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* susp. thompsoni," J. Bacteriol., 174(2):549-557, 1992.
- Brussock and Cunier, "Use of sodium dodecyl sulfate-polacryamide gel electrophoresis to quantify *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins," In: Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*, L.A. Hickie and W.L. Fitch, (Eds), American Chemical Society, Washington DC, pp. 78-87, 1990.
- Callis, Fromm, Walbot, "Introns increase gene expression in cultured maize cells," Genes Devel., 1:1183-1200, 1987.
- Campbell, In: Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, (Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp 75-83, 1984.
- Capecchi, "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells," Cell, 22(2):479-488, 1980.
- Carlsson, Jonsson, Norden, Bulay, Zare, Noolandi, Nielsen, Tsui, Zielenski, "Screening for genetic mutations," Nature, 380(6571):207, 1996.
- Cashmore et al., In: Gen. Eng. of Plants, Plenum Press, New York, pp 29-38, 1983.
- Cech, Zaug, Grabowski, "In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence," Cell, 27(3 Pt 2):487-496, 1981.
- Chambers, Jelen, Gilbert, Jany, Johnson, Gawron-Burke, J. Bacteriol., 173(13):3966-3976, 1991.
- Chau, Tobias, Bachmair, Marriott, Ecker, Gonda, Varshavsky, "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein," Science, 243(4898):1576-1583, 1989.
- Chen, Banerjee, Harmison, Haglund, Schubert, "Multitarget-ribozyme directed to cleave at up to nine highly conserved HIV-1 env RNA regions inhibits HIV-1 replication – potential effectiveness against most presently sequenced HIV-1 isolates," Nucl. Acids Res., 20(17):4581-4589, 1992.
- Cheng, Sardana, Kaplan, Altosaar, "Agrobacterium-transformed rice plants expressing synthetic cryIA(b) and cryIA(c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(6):2767-2772, 1998.
- Chowrira and Burke, "Extensive phosphorothioate substitution yields highly active and nucleaseresistant hairpin ribozymes," Nucl. Acids Res., 20(11):2835-2840, 1992.
- Christensen, Fitzpatrick, Gildea, Petersen, Hansen, Koch, Egholm, Buchardt, Nielsen, Coull et al., J. Pept. Sci., 1(3):175-183, 1995.
- Christensen, Shanock, Quail, "Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation," Plant Mol. Biol., 18:675-689, 1992.
- Clapp, "Somatic gene therapy into hematopoietic cells. Current status and future implications," Clin. Perinatol., 20(1):155-168, 1993.
- Collins and Olive, "Reaction conditions and kinetics of self-cleavage of a ribozyme derived from *Neurospora* VS RNA," Biochemistry, 32(11):2795-2799, 1993.
- Conway and Wickens, In: RNA Processing, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p40, 1988.
- Corey, "Peptide nucleic acids: expanding the scope of nucleic acid recognition," Trends Biotechnol., 15(6):224-229, 1997.
- Couvreux et al., "Nanocapsules, a new lysosomotropic carrier," FEBS Lett., 84:323-326, 1977. Couvreux, "Polyalkyleanoacrylates as colloidal drug carriers," Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 5:1-20, 1988.
- Crickmore et al., Abstr. 28th Annu. Meet. Soc. Invert. Pathol., Cornell University, Ithaca, NY, 1995.
- Cristou et al., Plant Physiol., 87:671-674, 1988.
- Curiel, Agarwal, Wagner, Cotten, "Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88(19):8850-8854, 1991.

- Curiel, Wagner, Cotten, Birnstiel, Agarwal, Li, Loechel, and Hu, "High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes," *Hum. Gen. Ther.*, 3(2):147-154, 1992.
- Daum, "Revision of two computer programs for probit analysis," *Bull. Entomol. Soc. Amer.*, 16:10-15, 1970.
- de Barjac, In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*, H. D. Burges (Ed.), Academic Press, London, pp 36-43, 1981.
- Dean, Tamaki, Dunsmuir, Favreau, Katayama, Dooner, Bedbrook, "mRNA transcripts of several plant genes are polyadenylated multiple sites in vivo," *Nucl. Acids Res.*, 14(5):2229-2240, 1986.
- Dennis, Gerlach, Pryor, Bennetzen, Inglis, Llewellyn, Sachs, Ferl, Peackocock, "Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase (Adh1) gene of maize," *Nucl. Acids Res.*, 12:3983-4000, 1984.
- Dhir, Dhir, Hepburn, Widholm, "Factors affecting transient gene expression in electroporated *Glycine-max* protoplasts," *Plant Cell Rep.*, 10(2):106-110, 1991a.
- Dhir, Dhir, Sturtevant, Widholm, "Regeneration of transformed shoots for electroporated soybean *Glycine max* L. Merr. Protoplasts," *Plant Cell Rep.*, 10(2):97-101, 1991b.
- Donovan, Rugar, Slaney, Malvar, Gawron-Burke, Johnson, "Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species," *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(12):3921-3927, 1992.
- Donovan, Gonzalez Jr., Gilbert, Dankocsik, "Isolation and characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene," *Mol. Gen. Genet.*, 214(3):365-372, 1988.
- Dropulic, Lin, Martin, Jeang, "Functional characterization of a US ribozyme: intracellular suppression of human immunodeficiency virus type 1 expression," *J. Virol.*, 66(3):1432-1441, 1992.
- Dueholm et al., *J. Org. Chem.*, 59:5767-5773, 1994.
- Egholm, Buchardt, Christensen, Behrens, Freier, Driver, Berg, Kim, Norden, Nielsen, "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogenbonding rules," *Nature*, 365(6446):566-568, 1993.
- Eglitis and Anderson, "Retroviral vectors for introduction of genes into mammalian cells," *Biotechniques*, 6(7):608-614, 1988.
- Eglitis, Kantoff, Kohn, Karson, Moen, Lothrop, Blaese, Anderson, "Retroviral-mediated gene transfer into hemopoietic cells," *Avd. Exp. Med. Biol.*, 241:19-27, 1988.
- Eichenlaub, "Mutants of the mini-F plasmid pML3I thermosensitive in replication," *J. Bacteriol.*, 138(2):559-566, 1979.
- Elroy-Stein and Moss, "Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(17):6743-6747, 1990.
- English and Slatin, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 22:1-7, 1992.
- Faktor, Kooter, Dixon, Lamb, "Functional dissection of a bean chalcone synthase gene promoter in transgenic tobacco plants reveals sequence motifs essential for floral expression," *Plant Mol. Biol.*, 32(5):849-859, 1996.
- Ficker, Kirch, Eijlander, Jacobsen, Thompson, "Multiple elements of the S2-RNase promoter from potato (*Solanum tuberosum* L.) are required for cell type-specific expression in transgenic potato and tobacco," *Mol. Gen. Genet.*, 257(2):132-142, 1998.
- Fiers, Contreras, haegemann, Rogiers, Van de Voorde, Van Heuverswyn, Van Herreweghe, Volckaert, Ysebaert, "Complete nucleotide sequence of SV40 DNA," *Nature*, 273(5658):113-120, 1978.
- Footer, Egholm, Kron, Coull, Matsudaira, "Biochemical evidence that a D-loop is part of a fourstranded PNA-DNA bundle. Nickel-mediated cleavage of duplex DNA by a Gly-Gly-His bis-PNA," *Biochemistry*, 35(33):10673-10679, 1996.
- Fraley et al., *Biotechnology*, 3:629, 1985.
- Fraley, Rogers, Horsch, Sanders, Flick, Adams, Bittner, Brand, Fink, Fry, Galluppi, Goldberg, Hoffmann, Woo, "Expression of bacterial genes in plant cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80(15):4803-4807, 1983.
- French, Janda, Ahlquist, "Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus: efficient expression in monocotyledonous plant cells," *Science*, 231:1294-1297, 1986.
- Frohman, In: *PCR™ Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, 1990.
- Fromm, Taylor, Walhot, "Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(17):5824-5828, 1985.
- Fromm, Taylor, Walbot, "Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation," *Nature*, 319(6056):791-793, 1986.
- Fujimura et al., *Plant Tiss. Cult. Lett.*, 2:74, 1985.
- Fynan, Webster, Fuller, Haynes, Santoro, Robinson, "DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene gun inoculations," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(24):11478-11482, 1993.
- Gallie and Young, "The regulation of expression in transformed maize aleurone and endosperm protoplasts," *Plant Physiol.*, 106:929-939, 1994.
- Gallie, Feder, Schimke, Walhot, "Post-transcriptional regulation in higher eukaryotes: the role of the reporter

- gene in controlling expression," *Mol. Gen. Genet.*, 228:258-264, 1991.
- Gallie, Lucas, Walbot, "Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: factors influencing efficient mRNA uptake and translation," *Plant Cell*, 1:301-311, 1989.
- Gallie, Sleat, Turner, Wilson, "Mutational analysis of the tobacco mosaic virus 5'-leader for altered ability to enhance translation," *Nucl. Acids Res.*, 16:883-893, 1988.
- Gallie, Sleat, Watts, Turner, Wilson, "A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression in vivo," *Nucl. Acids Res.*, 15:8693-8711, 1987b.
- Gallie, Sleat, Watts, Turner, Wilson, "The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo," *Nucl. Acids Res.*, 15:3257-3273, 1987a.
- Gambacorti-Passerini, Mologni, Bertazzoli, le Coutre, Marchesi, Grignani, Nielsen, "In vitro transcription and translation inhibition by anti-promyelocytic leukemia (PML)/retinoic acid receptor alpha and anti-PML peptide nucleic acid," *Blood*, 88(4):1411-1417, 1996.
- Gao and Huang, "Cytoplasmic expression of a reporter gene by co-delivery of 77 RNA polymerase and T7 promoter sequence with cationic liposomes," *Nucl. Acids Res.*, 21(12):2867-2872, 1993.
- Gawron-Burke and Baum, "Genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein genes in bacteria," *Genet. Eng. (NY)*, 13:237-263, 1991.
- Gefter, Margulies, Scharff, "A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells," *Somat. Cell Genet.*, 3(2):231-236, 1977.
- Gehrke, Auron, Quigley, Rich, Sonenberg, "5'-Conformation of capped alfalfa mosaic virus ribonucleic acid 4 may reflect its independence of the cap structure or of cap-binding protein for efficient translation," *Biochemistry*, 22:5157-5164, 1983.
- Genovese and Milcarek, In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p 62, 1988.
- Gil and Proudfoot, "A sequence downstream of AAUAAA is required for rabbit beta-globin mRNA 3'-end formation," *Nature*, 312(5993):473-474, 1984.
- Gill, Cowles, Francis, "Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*," *J. Biol. Chem.*, 270(45):27277-27282, 1995.
- Goding, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2nd Edition, Academic Press, Orlando, FL, pp 60-74, 1986.
- Goeddel, Heyneker, Hozumi, Arentzen, Itakura, Yansura, Ross, Miozzari, Crea, Seeburg, "Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence for human growth hormone," *Nature*, 281(5732):544-548, 1979.
- Goeddel, Shepard, Yelverton, Leung, Crea, Sloma, Pestka, "Synthesis of human fibroblast interferon by *E. coli*," *Nucl. Acids Res.*, 8(18):4057-4074, 1980.
- Goelet, Lomonosoff, Butler, Akam, Gait, Karn, "Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:5818-5822, 1982.
- Gonzalez Jr. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:6951-6955, 1982. Good and Nielsen, *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.*, 7(4):431-437, 1997.
- Graham, Craig, Waterhouse, "Expression patterns of vascular-specific promoters ROIC and Sh in transgenic potatoes and their use in engineering PLRV-resistant plants," *Plant Mol. Biol.*, 33(4):729-735, 1997.
- Graham and van der Eb, "Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5," *Virology*, 54(2):536-539, 1973.
- Green, Issemann, Sheer, "A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering," *Nucl. Acids Res.*, 16(1):369, 1988.
- Griffith et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 117:831-832, 1995.
- Grochulski, Masson, Borisova, Puzstai-Carey, Schwanz, Brousseau, Cygler, "*Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation," *J. Mol. Biol.*, 254(3):447-464, 1995.
- Grosset, Alary, Gautier, Menossi, Martinez-Izquierdo, Joudrier, "Characterization of a barley gene coding for an alpha-amylase inhibitor subunit (Cmd protein) and analysis of its promoter in transgenic tobacco plants and in maize kernels by microprojectile bombardment," *Plant Mol. Biol.*, 34(2):331-338, 1997.
- Guerrier-Takada, Gardiner, Marsh, Pace, Altman, "The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme," *Cell*, 35(3 Pt 2):849-857, 1983.
- Haaime, Lohse, Buchardt, Nielsen, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 35:1939-1942, 1996.
- Hampel and Tritz, "RNA catalytic properties of the minimum (-)sTRSV sequence," *Biochemistry*, 28(12):4929-4933, 1989.
- Hampel, Tritz, Hicks, Cruz, "Hairpin' catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA," *Nucl. Acids Res.*, 18(2):299-304, 1990.
- Hanvey, Pepper, Bisi, Thomson, Cadilla, Josey, Ricca, Hassman, Bonham, Au KG et al., *Science*, 258(5087):1481-1485, 1992.
- Harlow and Lane, In: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,

NY, 1988.

Henry-Michelland et al., "Attachment of antibiotics to nanoparticles; Preparation, drug-release and antimicrobial activity in vitro," *Int. J. Pharm.*, 35:121-127, 1987.

Hermstadt et al., *Bio/Technology*, 4:305-308, 1986.

Hermstadt, Gilroy, Sobieski, Bennett, Gaertner, "Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*," *Gene*, 57(1):37-46, 1987.

Hess, Boiteux, Kruger, "Cooperation of glycolytic enzymes," *Adv. Enzyme Regul.*, 7:149-167, 1969.

Hess, *Intern Rev. Cytol.*, 107:367, 1987.

Hilber, Bodmer, Smith, Koller, "Biolistic transformation of conidia of *Botryotinia fuckeliana*," *Curr. Genet.*, 25(2):124-127, 1994.

Hitzeman, Clarke, Carbon, "Isolation and characterization of the yeast 3-phosphoglycerokinase gene (PGK) by an immunological screening technique," *J. Biol. Chem.*, 255(24):12073-12080, 1980.

Höfte and Whiteley, "Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*," *Microbiol. Rev.*, 53(2):242-255, 1989.

Höfte, Seurinck, Van houstven, Vaeck, "Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* toxic against Coleoptera," *Nucl. Acids Res.*, 15(17):7183, 1987.

Holland and Holland, "Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase," *Biochemistry*, 17(23):4900-4907, 1978.

Honee, Convents, Van Rie, Jansens, Peferoen, Visser, "The C-terminal domain of the toxic fragment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein determines receptor binding," *Mol. Microbiol.*, 5(11):2799-2806, 1991.

Hoover et al., (Eds.), In: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15th Edition, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1975.

Hopp and Woods, "Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(6):3824-3828, 1981.

Horsch, Fry, Hoffmann, Eichholtz, Rogers, Fraley, "A simple and general method for transferring genes into plants," *Science*, 227(4691):1229-1231, 1985.

Horton, Hunt, Ho, Pullen, Pease, "Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: genes splicing by overlap extension," *Gene*, 77(1):61-68, 1989.

Huang, An, McDowell, McKinney, Meagher, "The Arabidopsis ACT11 action gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen and developing ovules," *Plant Mol. Biol.*, 33(1):125-139, 1997.

Hudspeth and Grula, "Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C4 photosynthesis," *Plant Mol. Biol.*, 12:579-589, 1989.

Hyrup and Nielsen, "Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications," *Bioorg. Med. Chem.*, 4(1):5-23, 1996.

Ingelbrecht, Herman, Dekeyser, Van Montagu, Depicker, "Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells," *Plant Cell*, 1:671-680, 1989.

Itakura, Hirose, Crea, Riggs, Heyneker, Bolivar, Boyer, "Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin," *Science*, 198(4321):1056-1063, 1977.

Jaeger, Turner, Zuker, "Improved predictions of secondary structures for RNA," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(20):7706-7710, 1989.

Jameson and Wolf, "The Antigenic Index: A Novel Algorithm for Predicting Antigenic Determinants," *Compu. Appl. Biosci.*, 4(1):181-6, 1988.

Jensen, Orum, Nielsen, Norden, "Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique," *Biochemistry* 36(16):5072-5077, 1997.

Jobling and Gehrke, "Enhanced translation of chimaeric messenger RNAs containing a plant viral untranslated leader sequence," *Nature*, 325:622-625, 1987.

Johnston and Tang, "Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization," *Methods Cell. Biol.*, 43(A):353-365, 1994.

Jones, Dean, Gidoni, Gilbert, Bond-Nutter, Lee, Bedbrook, Dunsmuir, "Expression of bacterial chitinase protein in tobacco leaves using two photosynthetic gene promoters," *Mol. Gen. Genet.*, 212:536-542, 1988.

Jones, "Proteinase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, 85(1):23-33, 1977.

Joshi, "An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes," *Nucl. Acids Res.*, 15:6643-6653, 1987.

Kaiser and Kezdy, "Amphiphilic secondary structure: design of peptide hormones," *Science*, 223(4633):249-255, 1984.

Kashani-Saber et al., *Antisense Res. Dev.*, 2:3-15, 1992.

Keller et al., *EMBO J.*, 8:1309-14, 1989.

Kingsman, Clarke, Mortimer, Carbon, "Replication in *Saccharomyces cerevisiae* of plasmid pBR313 carrying

- DNA from the yeast trp1 region," *Gene*, 7(2):141-152, 1979.
- Klee, Yanofsky, Nester, "Vectors for transformation of higher plants," *Biotechnology*, 3(7):637-642, 1985.
- Klein et al., *Nature*, 327:70, 1987.
- Klein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8502-8505, 1988.
- Knight et al., *J. Biol. Chem.*, 270:17765-17770, 1995.
- Koch et al., *Tetrahedron Lett.*, 36:6933-6936, 1995.
- Kohler and Milstein, "Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion," *Eur. J. Immunol.*, 6(7):511-519, 1976.
- Kohler and Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, 256(5517):495-497, 1975.
- Koppelhus, Zachar, Nielsen, Liu, Eugen-Olsen, Ebbesen, "Efficient in vitro inhibition of HIV-1 gag reverse transcription by peptide nucleic acid (PNA) at minimal ratios of PNA/RNA," *Nucl. Acids Res.*, 25(11):2167-2173, 1997.
- Korn and Queen, "Analysis of biological sequences on small computers," *DNA*, 3(6):421-436, 1984.
- Kozak, "Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo," *Nature*, 308(5956):241-246, 1984.
- Kozziel, Beland, Bowman, Carozzi, Crenshaw, Crossland, Dawson, Desai, Hill, Kadwell, Launis, Lewis, Maddox, McPherson, Meghji, Merlin, Rhodes, Warren, Wright, Evola, "Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*," *Biotechnology*, 11:194-200, 1993.
- Kozziel, Carozzi, Desai, "Optimizing expression of transgenes with an emphasis on posttranscriptional events," *Plant Mol. Biol.*, 32(102):393-405, 1996.
- Kremsky et al., *Tetrahedron Lett.*, 37:4313-4316, 1996.
- Krieg et al., *AnzSchaed. lingskde, Pflanzenschutz, Umweltschulz*, 57:145-150, 1984. Krieg et al., In: *Zangew. Ent.*, 96:500-508, 1983.
- Krieg et al., *J. Appl. Ent.*, 104:417-424, 1987.
- Kuby, In: *Immunology*, 2nd Edition, W. H. Freeman & Company, New York, 1994.
- Kunkel, Roberts, Zakour, "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection," *Methods Enzymol.*, 154:367-382, 1987.
- Kwoh, Davis, Whitfield, Chappelle, DiMichele, Gingeras, "Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a beadbased sandwich hybridization format," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(4):1173-1177, 1989.
- Kyozuka, Fujimoto, Izawa, Shimamoto, "Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize *Adh1* promoter in transgenic rice plants and their progeny," *Mol. Gen. Genet.*, 228(1-2):40-48, 1991.
- Kyte and Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein," *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- L'Huillier, Davis, Bellamy, "Cytoplasmic delivery of ribozymes leads to efficient reduction in alpha-lactalbumin mRNA levels in C1271 mouse cells," *EMBO J.*, 11:4411-8, 1992.
- Ladd Jr., *J. Econ. Entomol.*, 79:00668-671, 1986.
- Lambert et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:2536-2642, 1992b.
- Lambert et al., *Gene*, 110:131-132, 1992a.
- Landsdorp et al., *Hum. Mol. Genet.*, 5:685-691, 1996.
- Langridge et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3219-3223, 1989.
- Lee, Young, Dean, "Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 216(1):306-312, 1995.
- Lieber, Sandig, Sommer, Bahring, Strauss, "Stable high-level gene expression in mammalian cells by T7 phage RNA polymerase," *Methods Enzymol.*, 217:47-66, 1993.
- Lindstrom, Vodkin, Harding, Goeken, "Expression of soybean lectin gene deletions in tobacco," *Dev. Genet.*, 11(2):160-167, 1990.
- Liszewicz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:8000-4, 1993.
- Lorz et al., *Mol. Gen. Genet.*, 199:178, 1985.
- Lu, Xiao, Clapp, Li, Broxmeyer, "High efficiency retroviral mediated gene transduction into single isolated immature and replatable CD34(3+) hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood," *J. Exp. Med.*, 178(6):2089-2096, 1993.
- Luehrsen and Walbot, "Intron enhancement of gene expression and the splicing efficiency of introns in maize cells," *Mol. Gen. Genet.*, 225:81-93, 1991.
- Luo et al., *Plant Mol. Biol. Reporter*, 6:165, 1988.
- Lutcke, Chow, Mickel, Moss, Kern, Scheele, "Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals," *EMBO J.*, 6:43-48, 1987.
- Maas, Laufs, Grant, Korfhage, Werr, "The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize *shrunken-1* gene with the following intron enhances reporter gene expression 1000-fold," *Plant Mol. Bi-*

- ol., 16:199-207, 1991.
- Macaluso and Mettus, "Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* requires nonmethylated plasmid DNA," *J. Bacteriol.*, 173(3):1353-1356, 1991.
- Maddock et al., Third International Congress of Plant Molecular Biology, Abstract 372, 1991.
- Maloy, In: *Experimental Techniques in Bacterial Genetics*, Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA, 1990.
- Maloy et al., In: *Microbial Genetics*, 2nd Edition, Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA, 1994.
- Maniatis et al., In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
- Marcotte et al., *Nature*, 335:454, 1988.
- Mascarenhas, Mettler, Pierce, Lowe, "Intron mediated enhancement of heterologous gene expression in maize," *Plant Mol. Biol.*, 15:913-920, 1990.
- Masson, Lu, Mazza, Brousseau, Adang, "The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities," *J. Biol. Chem.*, 270(35):20309-20315, 1995.
- McBride, Svab, Schaaf, Hogan, Stalker, Maliga, "Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco," *Biotechnology*, 13:362-365, 1995.
- McCabe et al., *Biotechnology*, 6:923, 1988.
- McDevitt et al., *Cell*, 37:993-999, 1984.
- McElroy, Zhang, Wu, "Isolation of an efficient promoter for use in rice transformation," *Plant Cell*, 2:163-171, 1990.
- McPherson et al., *Bio/Technology*, 6:61-66, 1988.
- Mettus and Macaluso, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:1128-1134, 1990.
- Michael, "Mutagenesis by Incorporation of a Phosphorylated Oligo During PCR™ Amplification," *BioTechniques*, 16(3):410-412, 1994.
- Mollegaard, Buchardt, Egholm, Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3892-3895, 1994.
- Nawrath, Poirier, Somerville, "Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:12760-12764, 1994.
- Neilsen, In: *Perspectives in Drug Discovery and Design 4*, Escom Science Publishers, pp 76-84, 1996.
- Neuhaus et al., *Theor. Appl. Genet.*, 75:30, 1987.
- Nielsen, Egholm, Berg, Buchardt, "Peptide nucleic acids (PNAs): potential antisense and antigene agents," *Anticancer Drug Des.*, 8(1):53-63, 1993b.
- Nielsen, Egholm, Berg, Buchardt, *Science*, 254(5037):1497-1500, 1991.
- Norton, Orzech, Burke Jr., "Construction and characterization of plasmid vectors for cloning in the entomocidal organism *Bacillus sphaericus* 1593," *Plasmid*, 13(3):211-214, 1985.
- Norton, Piatyszek, Wright, Shay, Corey, "Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids," *Nat. Biotechnol.*, 14(5):615-619, 1996.
- Norton, Waggenspack, Varnum, Corey, *Bioorg. Med. Chem.*, 3:437-445, 1995.
- Oard, Paige, Dvorak, "Chimeric gene expression using maize intron in cultured cells of breadwheat," *Plant Cell Rep.*, 8:156-160, 1989.
- Odell, Nagy, Chua, "Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter," *Nature*, 313(6005):810-812, 1985.
- Ohkawa, Yuyama, Taira, "Activities of HIV-RNA targeted ribozymes transcribed from a 'shotgun' type ribozyme-trimming plasmid," *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 27:15-6, 1992.
- Ojwang, Hampel, Looney, Wong-Staal, Rappaport, "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 expression by a hairpin ribozyme," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(22):10802-10806, 1992.
- Omirulleh, Abraham, Golovkin, Stefanov, Karabaev, Mustardy, Morocz, Dudits, "Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize," *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-428, 1993.
- Orum, Nielsen, Egholm, Berg, Buchardt, Stanley, "Single base pair mutation analysis by PNA directed PCRTM clamping," *Nucl. Acids Res.*, 21(23):5332-5336, 1993.
- Orum, Nielsen, Jorgensen, Larsson, Stanley, Koch, "Sequence-specific purification of nucleic acids by PNA-controlled hybrid selection," *Biotechniques*, 19(3):472-480, 1995.
- Pandey and Marzluff, In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p 133, 1987.
- Pardridge, Boado, Kang, "Vector-mediated delivery of a polyamide ("peptide") nucleic acid analogue through the blood-brain barrier in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(12):5592-5596, 1995.
- Perlak, Deaton, Armstrong, Fuchs, Sims, Greenplate, Fischhoff, "Insect resistant cotton plants," *Biotechnology*, 8:939-943, 1990.
- Perlak, Fuchs, Dean, McPherson, Fischhoff, "Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:3324-3328, 1991.

- Perlak, Stone, Muskopf, Peterson, Parker, McPherson, Wyman, Love, Reed, Biever, Fischhoff, "Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles," *Plant Mol. Biol.*, 22:313-321, 1993.
- Perreault, Wu, Cousineau, Ogilvie, Cedergren, "Mixed deoxyribo- and ribo-oligonucleotides with catalytic activity," *Nature*, 344(6266):565-567, 1990.
- Perrotta and Been, "Cleavage of oligoribonucleotides by a ribozyme derived from the hepatitis delta virus RNA sequence," *Biochemistry*, 31(1):16-21, 1992.
- Perry-O'Keefe, Yao, Coull, Fuchs, Egholm, "Peptide nucleic acid pre-gel hybridization: an alternative to southern hybridization," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(25):14670-14675, 1996.
- Petersen, Jensen, Egholm, Nielsen, Buchardt, *Bioorg. Med Chem. Lett.*, 5:1119-1124, 1995.
- Pieken, Olsen, Benseler, Aurup, Eckstein, "kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes," *Science*, 253(5017):314-317, 1991.
- Poogin and Skryabin, "The 5' untranslated leader sequence of potato virus X RNA enhances the expression of the heterologous gene in vivo," *Mol. Gen. Genet.*, 234:329-331, 1992.
- Potrykus, Paszkowski, Saul, Petruska, Shillito, "Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer," *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.
- Poulsen et al., "Characterization of an RBC-S gene from *Nicotiana plumbaginifolia* and expression of an RBC-S-CAT chimeric gene in homologous and heterologous nuclear background," *Mol. Gen. Genet.*, 205(2):193-200, 1986.
- Prokop and Bajpai, "Recombinant DNA Technology I," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 646:1-383, 1991.
- Rogers et al., In: *Methods For Plant Molecular Biology*, Weissbach and Weissbach (Eds.), Academic Press Inc., San Diego, CA, 1988.
- Rogers et al., *Methods Enzymol.*, 153:253-277, 1987.
- Rose, "Characterization of antisense binding properties of peptide nucleic acids by capillary gel electrophoresis," *Anal. Chem*, 65(24):3545-3549, 1993.
- Rossi, Elkins, Zaia, Sullivan, "Ribozymes as anti-HIV-1 therapeutic agents: principles, applications, and problems," *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, 8(2):183-189, 1992.
- Rupar et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:3337-3344, 1991.
- Rusckowski, Qu, Chang, Hnatowich, "Pretargeting using peptide nucleic acid," *Cancer*, 80(12 Suppl):2699-2705, 1997.
- Russell and Fromm, "Tissue-specific expression in transgenic maize for four endosperm promoters from maize and rice," *Transgenic Res.*, 6(2):157-168, 1997.
- Sadofsky and Alwine, "Sequences on the 3' side of hexanucleotide AAUAAA affect efficiency of cleavage at the polyadenylation site," *Mol. Cell. Biol.*, 4(8):1460-1468, 1984.
- Sambrook et al., In: *Antibodies: A Laborator Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, NY, 1989a.
- Sambrook et al., In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989b.
- Sanger, Nicklen, Coulson, "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(12):5463-5467, 1977.
- Saville and Collins, "A site-specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in *Neurospora mitochondria*," *Cell*, 61(4):685-696, 1990.
- Saville and Collins, "RNA-mediated ligation of self-cleavage products of a *Neurospora* mitochondrial plasmid transcript," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(19):8826-8830, 1991.
- Scanlon, Jiao, Funato, Wang, Tone, Rossi, Kashani-Sabet," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(23):10591-10595, 1991.
- Scaringe, Francklyn, Usman, "Chemical synthesis of biologically active oligoribonucleotides using beta-cyanoethyl protected ribonucleoside phosphoramidites," *Nucl. Acids Res.*, 18(18):5433-5441, 1990.
- Seeger, Batz, Orum, "PNA-mediated purification of PCRTM amplifiable human genomic DNA from whole blood," *Biotechniques*, 23(3):512-517, 1997.
- Segal, In: *Biochemical Calculations*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, NY, 1976.
- Shaw and Kamen, "A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation," *Cell*, 46(5):659-667, 1986.
- Shaw and Kamen, In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p 220, 1987.
- Sick, Gaertner, Wong, "Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*," *Nucl. Acids Res.*, 18(5):1305, 1990.
- Simpson, *Science*, 233:34, 1986.
- Sleat, Gallie, Jefferson Bevan, Turner, Wilson, "Characterization of the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA as a general enhancer of translation in vitro," *Gene*, 217:217-225, 1987.
- Sleat, Hull, Turner, Wilson, "Studies on the mechanism of translational enhancement by the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA," *Eur. J. Biochem.*, 175:75-86, 1988.

- Southern, "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis," *J. Mol. Biol.*, 98(3):503-517, 1975.
- Spielmann et al., *Mol. Gen. Genet.*, 205:34, 1986.
- Stetsenko, Lubyako, Potapov, Azhikina, Sverdlov, *Tetrahedron Lett.*, 37:3571-3574, 1996.
- Taira, Nakagawa, Nishikawa, Furukawa, "Construction of a novel RNA-transcript-trimming plasmid which can be used both in vitro in place of run-off and (G)-free transcriptions and in vivo as multi-sequences transcription vectors," *Nucl. Acids Res.*, 19(19):5125-5130, 1991.
- Tanaka, Mita, Ohta, Kyojuka, Shimamoto, Nakamura, "Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron," *Nucl. Acids Res.*, 18:6767-6770, 1990.
- Thiede, Bayerdorffer, Blasczyk, Wittig, Neubauer, "Simple and sensitive detection of mutations in the ras protooncogenes using PNA-mediated PCR™ clamping," *Nucl. Acids Res.*, 24(5):983-984, 1996.
- Thisted, Just, Petersen, Hyldig-Nielsen, Godfredsen, *Cell Vision*, 3:358-363, 1996.
- Thomson et al., *Tetrahedron*, 51:6179-6194, 1995.
- Tomic, Sunjevaric, Savtchenko, Blumenberg, "A rapid and simple method for introducing specific mutations into any position of DNA leaving all other positions unaltered," *Nucl. Acids Res.*, 18(6):1656, 1990.
- Toriyama et al., *Theor Appl. Genet.*, 73:16, 1986.
- Treacy, Hattori, Prud'homme, Barbour, Boutilier, Baszczynski, Huang, Johnson, Miki, "Bnm1, a Brassica pollen-specific gene," *Plant Mol. Biol.*, 34(4):603-611, 1997.
- Uchimiya et al., *Mol. Gen. Genet.*, 204:204, 1986.
- Ulmann, Will, Breipohl, Langner, Rytte, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 35:2632-2635, 1996.
- Upender, Raj, Weir, "Megaprimer method for in vitro mutagenesis using parallel templates," *Biotechniques*, 18:29-31, 1995.
- Usman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845-7854, 1987.
- Usman and Cedergren, "Exploiting the chemical synthesis of RNA," *Trends Biochem. Sci.*, 17(9):334-339, 1992.
- Van Camp, Herouart, Willekens, Takahashi, Saito, Van Montagu, Inze, "Tissue-specific activity of two manganese superoxide dismutase promoters in transgenic tobacco," *Plant Physiol.*, 112(2):525-535, 1996.
- van Tunen, Koes, Spelt, van der Krol, Stuitje, Mol, "Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavanoid genes," *EMBO J.*, 7(5):1257-1263, 1988.
- Vander, Van Montagu, Inze, Boerjan, "Tissue-specific expression conferred by the S-adenosyl-L-methionine synthetase promoter of *Arabidopsis thaliana* in transgenic poplar," *Plant Cell Physiol.*, 37(8):1108-1115, 1996.
- Vasil et al., "Herbicide-resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus," *Biotechnology*, 10:667-674, 1992. Vasil, *Biotechnology*, 6:397, 1988.
- Vasil, Clancy, Ferl, Vasil, Hannah, "Increased gene expression by the first intron of maize shrunken-1 locus in grass species," *Plant Physiol.*, 91:1575-1579, 1989.
- Velten et al., *EMBO J.*, 3:2723-2730, 1984.
- Velten and Schell, "Selection-expression plasmid vectors for use in genetic transformation of higher plants," *Nucl. Acids Res.*, 13(19):6981-6998, 1985.
- Ventura, Wang, Ragot, Perricaudet, Saragosti, "Activation of HIV-specific ribozyme activity by self-cleavage," *Nucl. Acids Res.*, 21(14):3249-3255, 1993.
- Veselkov, Demidov, Nielson, Frank-Kamenetskii, "A new class of genome rare cutters," *Nucl. Acids Res.*, 24(13):2483-2487, 1996.
- Vickers, Griffith, Ramasamy, Risen, Freier, "Inhibition of NF-kappa B specific transcriptional activation by PNA strand invasion," *Nucl. Acids Res.*, 23(15):3003-3008, 1995.
- Vodkin, "cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element," *Cell*, 34(3):1023-1031, 1983.
- Vogel, Dawe, Freeling, "Regulation of the cell type-specific expression of maize Adh1 and Sh1 electroporation-directed gene transfer into protoplasts of several maize tissues," *J. Cell. Biochem.*, (Suppl. 0) 13:Part D, 1989.
- Wagner, Zatloukal, Cotten, Kirlappos, Mechtler, Curiel, Birnstiel, "Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(13):6099-6103, 1992.
- Walker, Little, Nadeau, Shank, "Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(1):392-396, 1992.
- Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 118:7667-7670, 1996.
- Watson, "Fluid and electrolyte disorders in cardiovascular patients," *Nurs. Clin. North Am.*, 22(4):797-803, 1987.
- Webb and Hurskainen, *J. Biomol. Screen.*, 1:119-121, 1996.

- Weerasinghe, Liem, Asad, Read, Joshi, "Resistance to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in human CD4+ lymphocyte-derived cell lines conferred by using retroviral vectors expressing an HIV-1 RNA-specific ribozyme," *J. Virol.*, 65(10):5531-5534, 1991.
- Weissbach and Weissbach (Eds.), In: *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1988.
- Wenzler, Mignery, Fisher, Park, "Sucrose-regulated expression of a chimeric potato tuber gene in leaves of transgenic tobacco plants," *Plant Mol. Biol.*, 13(4):347-354, 1989.
- Wickens and Stephenson, "Role of the conserved AAUAAA sequence: four AAUAAA point mutants prevent messenger RNA 3' end formation," *Science*, 226(4678):1045-1051, 1984.
- Wickens et al., In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p 9, 1987.
- Wilson, Flint, Deaton, Fischhoff, Perlak, Armstrong, Fuchs, Berberich, Parks, Stapp, "Resistance of cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to pink bollworm (Lepidopteran: Gelechiidae) and other insects," *J. Econ. Entomol.*, 4:1516-1521, 1992.
- Wolf, Modrow, Motz, Jameson, Hermann, Fortsch, "An integrated family of amino acid sequence analysis programs," *Comput. Appl. Biosci.*, 4(1):187-191 1988.
- Wong and Neumann, "Electric field mediated gene transfer," *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 107(2):584-587, 1982.
- Woolf, Melton, Jennings, "Specificity of antisense oligonucleotides in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(16):7305-7309, 1992.
- Wu and Dean, "Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIa delta-endotoxin," *J. Mol. Biol.*, 255(4):628-640, 1996.
- Yamada et al., *Plant Cell Rep.*, 4:85, 1986.
- Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-48, 1990.
- Yin, Chen, Beachy, "Promoter elements required for phloem-specific gene expression from the RTBV promoter in rice," *Plant J.*, 12(5):1179-1188, 1997b.
- Yin, Zhu, Dai, Lamb, Beachy, "RF2a, a bZIP transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, functions in vascular development," *EMBO J.*, 16(17):5247-5259, 1997a.
- Yu, Ojwang, Yamada, Hampel, Rapaport, Looney, Wong-Staal, "A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(13):6340-6344, 1993.
- Zatloukal, Wagner, Cotten, Phillips, Plank, Steinlein, Curiel, Birnstiel, "Transferrin infection: a highly efficient way to express gene constructs in eukaryotic cells," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 660:136-153, 1992.
- Zhou, Weng, Zeng, Huang, Qian, Liu, "Introduction of exogenous DNA into cotton embryos," *Methods Enzymol.*, 101:433-481, 1983.
- Zhou, Giordano, Durbin, McAllister, "Synthesis of functional mRNA in mammalian cells by bacteriophage T3 RNA polymerase," *Mol. Cell Biol.*, 10(9):4529-4537, 1990.

Sequenzprotokoll

<110> Mettus, Anne-Marie Light
 Baum, James A.

<120> Polypeptidzusammensetzungen, die toxisch gegenüber
 Diabrotica-Insekten sind, und Verfahren zu ihrer Verwendung

<130> MECO:200

<140> unbekannt

<141> 1998-11-02

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2344

<212> DNA

<213> Bacillus thuringiensis

<220>

<221> CDS

<222> (92)..(2254)

<400> 1

gtaatagtag ttatttagca ggaataaaaag ggagggtatc gaatactttc aatgaagac 60

tgaaaattta caaatagaag gagagaaaag t atg aaa gat tca att tca aag 112
 Met Lys Asp Ser Ile Ser Lys
 1 5

gga tat gat gaa ata aca gtg cag gca agt gat tat att gat att cgc 160
 Gly Tyr Asp Glu Ile Thr Val Gln Ala Ser Asp Tyr Ile Asp Ile Arg
 10 15 20

tca att ttt caa acg aat gga tct gca aca ttt aat tca acc act aat 208
 Ser Ile Phe Gln Thr Asn Gly Ser Ala Thr Phe Asn Ser Thr Thr Asn
 25 30 35

att aca act tta acg caa gct aca aat agt caa gcg gga gca att gca 256
 Ile Thr Thr Leu Thr Gln Ala Thr Asn Ser Gln Ala Gly Ala Ile Ala
 40 45 50 55

ggg aag aca gct tta gat atg aga cat gat ttt act ttt aga gct gat 304
 Gly Lys Thr Ala Leu Asp Met Arg His Asp Phe Thr Phe Arg Ala Asp
 60 65 70

att ttt ctt gga act aaa agt aat gga gca gat ggt att gcg ata gca 352
 Ile Phe Leu Gly Thr Lys Ser Asn Gly Ala Asp Gly Ile Ala Ile Ala
 75 80 85

ttt cat aga gga tca att ggt ttt gtt ggg gag aag ggt gga gga ctt 400
 Phe His Arg Gly Ser Ile Gly Phe Val Gly Glu Lys Gly Gly Gly Leu

DE 699 29 466 T2 2006.09.21

90	95	100		
ggg att tta ggc gcc cta aaa ggt ata gga ttt gaa tta gac aca tat			448	
Gly Ile Leu Gly Ala Leu Lys Gly Ile Gly Phe Glu Leu Asp Thr Tyr				
105	110	115		
gcg aat gct cct caa gat gaa caa gga gat tct ttt gga cat gga gca			496	
Ala Asn Ala Pro Gln Asp Glu Gln Gly Asp Ser Phe Gly His Gly Ala				
120	125	130	135	
atg aga ggc cta ttc cct ggt ttc cca aat gga tat cca cat gct ggt			544	
Met Arg Gly Leu Phe Pro Gly Phe Pro Asn Gly Tyr Pro His Ala Gly				
140	145	150		
ttt gta agt acg gat aaa aat aga ggt tgg tta tct gcc tta gct cag			592	
Phe Val Ser Thr Asp Lys Asn Arg Gly Trp Leu Ser Ala Leu Ala Gln				
155	160	165		
atg cag cga ata gct gct cca aat ggg cgt tgg aga cgt ctg gcg att			640	
Met Gln Arg Ile Ala Ala Pro Asn Gly Arg Trp Arg Arg Leu Ala Ile				
170	175	180		
cat tgg gat gct cgc aat aaa aaa tta act gca aac ctt gag gat tta			688	
His Trp Asp Ala Arg Asn Lys Lys Leu Thr Ala Asn Leu Glu Asp Leu				
185	190	195		
act ttt aat gat tca acg gta tta gtg aaa cca cgt act cca aga tat			736	
Thr Phe Asn Asp Ser Thr Val Leu Val Lys Pro Arg Thr Pro Arg Tyr				
200	205	210	215	
gca aga tgg gag tta tca aat cct gca ttt gaa ctt gat caa aag tat			784	
Ala Arg Trp Glu Leu Ser Asn Pro Ala Phe Glu Leu Asp Gln Lys Tyr				
220	225	230		
act ttt gtt att ggt tca gcg acg ggt gca tct aat aac cta cat cag			832	
Thr Phe Val Ile Gly Ser Ala Thr Gly Ala Ser Asn Asn Leu His Gln				
235	240	245		
att ggt att ata gaa ttt gat gca tac ttt act aaa ccg aca ata gag			880	
Ile Gly Ile Ile Glu Phe Asp Ala Tyr Phe Thr Lys Pro Thr Ile Glu				
250	255	260		
gcg aat aat gta agt gtt ccg gtg gga gca aca ttt aat ccg aaa aca			928	
Ala Asn Asn Val Ser Val Pro Val Gly Ala Thr Phe Asn Pro Lys Thr				
265	270	275		
tat cca gga ata aat tta aga gca act gat gaa ata gat ggt gat ttg			976	
Tyr Pro Gly Ile Asn Leu Arg Ala Thr Asp Glu Ile Asp Gly Asp Leu				
280	285	290	295	
aca tct gaa att att gtg aca gat aat aat gtt aat acg tcg aaa tct			1024	
Thr Ser Glu Ile Ile Val Thr Asp Asn Asn Val Asn Thr Ser Lys Ser				
300	305	310		
ggt gtg tat aat gtg acg tat tat gta aag aat agc tat ggg gaa agt			1072	
Gly Val Tyr Asn Val Thr Tyr Tyr Val Lys Asn Ser Tyr Gly Glu Ser				
315	320	325		

DE 699 29 466 T2 2006.09.21

gat gaa aaa aca atc gaa gta act gtg ttt tca aac cct aca att att 1120
Asp Glu Lys Thr Ile Glu Val Thr Val Phe Ser Asn Pro Thr Ile Ile
330 335 340

gca agt gat gtt gaa att gaa aaa ggt gaa tcg ttt aat cca tta aca 1168
Ala Ser Asp Val Glu Ile Glu Lys Gly Glu Ser Phe Asn Pro Leu Thr
345 350 355

gac tca aga gtg agg ctg tct gca caa gat tca ttg ggt aat gat att 1216
Asp Ser Arg Val Arg Leu Ser Ala Gln Asp Ser Leu Gly Asn Asp Ile
360 365 370 375

act tca aaa gta aag gtg aaa tca agt aat gtg gat act tcg aaa cca 1264
Thr Ser Lys Val Lys Val Lys Ser Ser Asn Val Asp Thr Ser Lys Pro
380 385 390

ggt gaa tat gat gtt gtg ttt gaa gtg acc gat aat ttt ggt ggg aaa 1312
Gly Glu Tyr Asp Val Val Phe Glu Val Thr Asp Asn Phe Gly Gly Lys
395 400 405

gca gaa aaa gaa atc aag gtt aca gtt tta ggg cag cca agt att gaa 1360
Ala Glu Lys Glu Ile Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Ser Ile Glu
410 415 420

gcg aat gat gtt gaa tta gaa ata ggt gat tta ttt aat ccg tta aca 1408
Ala Asn Asp Val Glu Leu Glu Ile Gly Asp Leu Phe Asn Pro Leu Thr
425 430 435

gat tca caa gta ggc ctt cgt gca aaa gac tca tta ggc aaa gat att 1456
Asp Ser Gln Val Gly Leu Arg Ala Lys Asp Ser Leu Gly Lys Asp Ile
440 445 450 455

acg aat gat gtg aaa gta aag tca agt aat gtg gat act tca aaa cca 1504
Thr Asn Asp Val Lys Val Lys Ser Ser Asn Val Asp Thr Ser Lys Pro
460 465 470

gga gaa tat gaa gtt gta ttt gaa gtg acc gat cgt ttt gga aaa aaa 1552
Gly Glu Tyr Glu Val Val Phe Glu Val Thr Asp Arg Phe Gly Lys Lys
475 480 485

gca gaa aaa agt atc aaa gtc ctt gtt cta gga gaa cca agc att gaa 1600
Ala Glu Lys Ser Ile Lys Val Leu Val Leu Gly Glu Pro Ser Ile Glu
490 495 500

gca aat aat gtt gag att gaa aaa gac gaa agg ttc gat cca tta aca 1648
Ala Asn Asn Val Glu Ile Glu Lys Asp Glu Arg Phe Asp Pro Leu Thr
505 510 515

gat tca aga gta ggt ctc cgt gca aaa gac tca tta ggc aaa gat att 1696
Asp Ser Arg Val Gly Leu Arg Ala Lys Asp Ser Leu Gly Lys Asp Ile
520 525 530 535

acg aat gat gtg aaa gta aaa tca agt aat gtg gat act tca aaa cca 1744
Thr Asn Asp Val Lys Val Lys Ser Ser Asn Val Asp Thr Ser Lys Pro
540 545 550

DE 699 29 466 T2 2006.09.21

gga gaa tat gaa gtt gta ttt gaa gtg act gat cgt ttt ggt aaa tat 1792
 Gly Glu Tyr Glu Val Val Phe Glu Val Thr Asp Arg Phe Gly Lys Tyr
 555 560 565

gta aag aaa ttg att gta gtt ata gta cca gta att gat gat gaa tgg 1840
 Val Lys Lys Leu Ile Val Val Ile Val Pro Val Ile Asp Asp Glu Trp
 570 575 580

gaa gat gga aat gtg aat gga tgg aaa ttc tat gcg ggg caa gac atc 1888
 Glu Asp Gly Asn Val Asn Gly Trp Lys Phe Tyr Ala Gly Gln Asp Ile
 585 590 595

aca ctg ttg aaa gat cct gaa aaa gca tat aaa gga gaa tat gta ttc 1936
 Thr Leu Leu Lys Asp Pro Glu Lys Ala Tyr Lys Gly Glu Tyr Val Phe
 600 605 610 615

tat gat tct agg cat gct gct att tct aaa aca atc cca gta aca gat 1984
 Tyr Asp Ser Arg His Ala Ala Ile Ser Lys Thr Ile Pro Val Thr Asp
 620 625 630

tta caa gtg gga ggg aat tat gaa att aca gta tat gtt aaa gca gaa 2032
 Leu Gln Val Gly Gly Asn Tyr Glu Ile Thr Val Tyr Val Lys Ala Glu
 635 640 645

agc ggt gat cat cac cta aaa gtg acg tac aag aaa gac ccg aaa ggt 2080
 Ser Gly Asp His His Leu Lys Val Thr Tyr Lys Lys Asp Pro Lys Gly
 650 655 660

ccg gag gaa cca cca gtt ttc aat aga ctt att agt aca ggg aaa ttg 2128
 Pro Glu Glu Pro Pro Val Phe Asn Arg Leu Ile Ser Thr Gly Lys Leu
 665 670 675

gtg gaa aaa gac tat aga gaa tta aaa gga aca ttc cgt gta acg gaa 2176
 Val Glu Lys Asp Tyr Arg Glu Leu Lys Gly Thr Phe Arg Val Thr Glu
 680 685 690 695

tta aac caa gca cca ttg ata atc gta gag aat ttt ggt gct gga tat 2224
 Leu Asn Gln Ala Pro Leu Ile Ile Val Glu Asn Phe Gly Ala Gly Tyr
 700 705 710

ata ggt gga att aga att gtg aaa ata tcg taataaaaac agataaaata 2274
 Ile Gly Gly Ile Arg Ile Val Lys Ile Ser
 715 720

gagagaggaa cgctggatag cgttcctctt ttcagtttag tgtaccatct ccagggtccag 2334

ttcattttttt 2344

- <210> 2
- <211> 721
- <212> PRT
- <213> Bacillus thuringiensis

<400> 2
 Met Lys Asp Ser Ile Ser Lys Gly Tyr Asp Glu Ile Thr Val Gln Ala
 1 5 10 15

DE 699 29 466 T2 2006.09.21

Ser Asp Tyr Ile Asp Ile Arg Ser Ile Phe Gln Thr Asn Gly Ser Ala
 20 25 30
 Thr Phe Asn Ser Thr Thr Asn Ile Thr Thr Leu Thr Gln Ala Thr Asn
 35 40 45
 Ser Gln Ala Gly Ala Ile Ala Gly Lys Thr Ala Leu Asp Met Arg His
 50 55 60
 Asp Phe Thr Phe Arg Ala Asp Ile Phe Leu Gly Thr Lys Ser Asn Gly
 65 70 75 80
 Ala Asp Gly Ile Ala Ile Ala Phe His Arg Gly Ser Ile Gly Phe Val
 85 90 95
 Gly Glu Lys Gly Gly Gly Leu Gly Ile Leu Gly Ala Leu Lys Gly Ile
 100 105 110
 Gly Phe Glu Leu Asp Thr Tyr Ala Asn Ala Pro Gln Asp Glu Gln Gly
 115 120 125
 Asp Ser Phe Gly His Gly Ala Met Arg Gly Leu Phe Pro Gly Phe Pro
 130 135 140
 Asn Gly Tyr Pro His Ala Gly Phe Val Ser Thr Asp Lys Asn Arg Gly
 145 150 155 160
 Trp Leu Ser Ala Leu Ala Gln Met Gln Arg Ile Ala Ala Pro Asn Gly
 165 170 175
 Arg Trp Arg Arg Leu Ala Ile His Trp Asp Ala Arg Asn Lys Lys Leu
 180 185 190
 Thr Ala Asn Leu Glu Asp Leu Thr Phe Asn Asp Ser Thr Val Leu Val
 195 200 205
 Lys Pro Arg Thr Pro Arg Tyr Ala Arg Trp Glu Leu Ser Asn Pro Ala
 210 215 220
 Phe Glu Leu Asp Gln Lys Tyr Thr Phe Val Ile Gly Ser Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Ser Asn Asn Leu His Gln Ile Gly Ile Ile Glu Phe Asp Ala Tyr
 245 250 255
 Phe Thr Lys Pro Thr Ile Glu Ala Asn Asn Val Ser Val Pro Val Gly
 260 265 270
 Ala Thr Phe Asn Pro Lys Thr Tyr Pro Gly Ile Asn Leu Arg Ala Thr
 275 280 285
 Asp Glu Ile Asp Gly Asp Leu Thr Ser Glu Ile Ile Val Thr Asp Asn
 290 295 300
 Asn Val Asn Thr Ser Lys Ser Gly Val Tyr Asn Val Thr Tyr Tyr Val
 305 310 315 320

DE 699 29 466 T2 2006.09.21

Lys Asn Ser Tyr Gly Glu Ser Asp Glu Lys Thr Ile Glu Val Thr Val
 325 330 335
 Phe Ser Asn Pro Thr Ile Ile Ala Ser Asp Val Glu Ile Glu Lys Gly
 340 345 350
 Glu Ser Phe Asn Pro Leu Thr Asp Ser Arg Val Arg Leu Ser Ala Gln
 355 360 365
 Asp Ser Leu Gly Asn Asp Ile Thr Ser Lys Val Lys Val Lys Ser Ser
 370 375 380
 Asn Val Asp Thr Ser Lys Pro Gly Glu Tyr Asp Val Val Phe Glu Val
 385 390 395 400
 Thr Asp Asn Phe Gly Gly Lys Ala Glu Lys Glu Ile Lys Val Thr Val
 405 410 415
 Leu Gly Gln Pro Ser Ile Glu Ala Asn Asp Val Glu Leu Glu Ile Gly
 420 425 430
 Asp Leu Phe Asn Pro Leu Thr Asp Ser Gln Val Gly Leu Arg Ala Lys
 435 440 445
 Asp Ser Leu Gly Lys Asp Ile Thr Asn Asp Val Lys Val Lys Ser Ser
 450 455 460
 Asn Val Asp Thr Ser Lys Pro Gly Glu Tyr Glu Val Val Phe Glu Val
 465 470 475 480
 Thr Asp Arg Phe Gly Lys Lys Ala Glu Lys Ser Ile Lys Val Leu Val
 485 490 495
 Leu Gly Glu Pro Ser Ile Glu Ala Asn Asn Val Glu Ile Glu Lys Asp
 500 505 510
 Glu Arg Phe Asp Pro Leu Thr Asp Ser Arg Val Gly Leu Arg Ala Lys
 515 520 525
 Asp Ser Leu Gly Lys Asp Ile Thr Asn Asp Val Lys Val Lys Ser Ser
 530 535 540
 Asn Val Asp Thr Ser Lys Pro Gly Glu Tyr Glu Val Val Phe Glu Val
 545 550 555 560
 Thr Asp Arg Phe Gly Lys Tyr Val Lys Lys Leu Ile Val Val Ile Val
 565 570 575
 Pro Val Ile Asp Asp Glu Trp Glu Asp Gly Asn Val Asn Gly Trp Lys
 580 585 590
 Phe Tyr Ala Gly Gln Asp Ile Thr Leu Leu Lys Asp Pro Glu Lys Ala
 595 600 605
 Tyr Lys Gly Glu Tyr Val Phe Tyr Asp Ser Arg His Ala Ala Ile Ser
 610 615 620

DE 699 29 466 T2 2006.09.21

Lys Thr Ile Pro Val Thr Asp Leu Gln Val Gly Gly Asn Tyr Glu Ile
625 630 635 640

Thr Val Tyr Val Lys Ala Glu Ser Gly Asp His His Leu Lys Val Thr
645 650 655

Tyr Lys Lys Asp Pro Lys Gly Pro Glu Glu Pro Pro Val Phe Asn Arg
660 665 670

Leu Ile Ser Thr Gly Lys Leu Val Glu Lys Asp Tyr Arg Glu Leu Lys
675 680 685

Gly Thr Phe Arg Val Thr Glu Leu Asn Gln Ala Pro Leu Ile Ile Val
690 695 700

Glu Asn Phe Gly Ala Gly Tyr Ile Gly Gly Ile Arg Ile Val Lys Ile
705 710 715 720

Ser

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 3
Ala Ser Asp Tyr Ile Asp Ile Arg Ser Ile Phe Gln Thr
1 5 10

<210> 4
<211> 38
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> modifizierte Base
<222> (3)..(6)
<223> i

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 4
gcntcngatt atattgatat tagatcaatt tttcaaac 38

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 5

gacatgattt tacttttaga gc 22

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetisch

<400> 6

catcacttttc cccatagc 18

Patentansprüche

1. Isoliertes Bacillus-thuringiensis- δ -Endotoxin-Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu wenigstens 90% mit SEQ ID Nr. 2 identisch ist.
2. Polypeptid gemäß Anspruch 1, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu wenigstens 95% mit SEQ ID Nr. 2 identisch ist.
3. Polypeptid gemäß Anspruch 2, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu wenigstens 99% mit SEQ ID Nr. 2 identisch ist.
4. Polypeptid gemäß Anspruch 3, das wenigstens 75 aufeinanderfolgende Aminosäuren von SEQ ID Nr. 2 umfasst.
5. Polypeptid gemäß Anspruch 4, das wenigstens 100 aufeinanderfolgende Aminosäuren von SEQ ID Nr. 2 umfasst.
6. Polypeptid gemäß Anspruch 5, das wenigstens 300 aufeinanderfolgende Aminosäuren von SEQ ID Nr. 2 umfasst.
7. Polypeptid gemäß Anspruch 1, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 umfasst.
8. Polypeptid gemäß Anspruch 1, das von einem Nucleinsäuresegment codiert wird, das zu wenigstens 90% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist.
9. Polypeptid gemäß Anspruch 8, das von einem Nucleinsäuresegment codiert wird, das zu wenigstens 95% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist.
10. Polypeptid gemäß Anspruch 9, das von einem Nucleinsäuresegment codiert wird, das zu wenigstens 99% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist.
11. Polypeptid gemäß Anspruch 10, das von einem Nucleinsäuresegment codiert wird, das die Sequenz von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 umfasst.
12. Isoliertes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 umfasst.
13. Zusammensetzung, die das Polypeptid gemäß Anspruch 1 umfasst.
14. Zusammensetzung gemäß Anspruch 13, die einen Zellextrakt, eine Zellsuspension, ein Zellhomogenisat, ein Zelllysat, einen Zellüberstand, ein Zellfiltrat oder ein Zellsediment von Zellen von Bacillus thuringiensis NRRL B-21885 (EG4140) oder NRRL B-21886 (EG11839) umfasst.
15. Zusammensetzung gemäß Anspruch 13, wobei es sich bei der Zusammensetzung um ein Pulver, ei-

nen Staub, Pellets, ein Granulat, eine Sprühlösung, Emulsion, ein Kolloid oder eine Lösung handelt.

16. Zusammensetzung gemäß Anspruch 13, wobei die Zusammensetzung durch Trocknung, Lyophilisierung, Homogenisierung, Extraktion, Filtration, Zentrifugation, Sedimentation oder Konzentration einer Kultur von *Bacillus-thuringiensis*-Zellen hergestellt wird.

17. Zusammensetzung gemäß Anspruch 13, die etwa 1 Gew.-% bis etwa 99 Gew.-% des Polypeptids umfasst.

18. Polypeptid gemäß Anspruch 1, das durch ein Verfahren erhältlich ist, das die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Kultivieren von Zellen von *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21885 (EG4140) oder NRRL B-21886 (EG11839) unter Bedingungen, die eine Produktion des insektiziden Polypeptids bewirken; und
- (b) Gewinnen des so produzierten insektiziden Polypeptids.

19. Zusammensetzung gemäß Anspruch 18, wobei das Polypeptid SEQ ID Nr. 2 umfasst.

20. Verfahren zur Herstellung des δ -Endotoxin-Polypeptids gemäß Anspruch 1, das eine insektizide Wirkung gegen ein Insekt der Ordnung Coleoptera oder Lepidoptera besitzt, umfassend:

- (a) Kultivieren von Zellen von *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21885 (EG4140) oder NRRL B-21886 (EG11839) unter Bedingungen, die eine Produktion des δ -Endotoxin-Polypeptids bewirken; und
- (b) Gewinnen des so produzierten Polypeptids aus den Zellen.

21. *Bacillus-thuringiensis*-Zelle mit der NRRL-Zugriffs-Nr. NRRL B-21886.

22. *Bacillus-thuringiensis*-Zelle mit der NRRL-Zugriffs-Nr. NRRL B-21885.

23. Gereinigter Antikörper, der spezifisch an das Polypeptid gemäß Anspruch 1 bindet.

24. Verfahren zum Nachweis eines δ -Endotoxin-Polypeptids in einer biologischen Probe, das die folgenden Schritte umfasst:

- a) Gewinnen einer biologischen Probe, von der man annimmt, dass sie ein δ -Endotoxin-Polypeptid enthalten könnte;
- b) In-Kontakt-Bringen der Probe mit einem Antikörper, der an das Polypeptid gemäß Anspruch 1 bindet, unter Bedingungen, die die Bildung von Komplexen ermöglichen; und
- c) Nachweisen der so gebildeten Komplexe.

25. Immunnachweis-Kit, der in einer geeigneten Behältereinrichtung einen Antikörper, der an das Polypeptid gemäß Anspruch 1 bindet, und ein Immunnachweis-Reagens umfasst.

26. Polynucleotid, das einen isolierten Sequenzbereich umfasst, der das Polypeptid gemäß Anspruch 1 codiert.

27. Polynucleotid gemäß Anspruch 26, wobei das Polynucleotid ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 umfasst.

28. Polynucleotid gemäß Anspruch 26, das zu wenigstens 90% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist.

29. Polynucleotid gemäß Anspruch 28, das zu wenigstens 95% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist.

30. Polynucleotid gemäß Anspruch 29, das zu wenigstens 99% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist.

31. Polynucleotid gemäß Anspruch 30, das die Nucleinsäuresequenz von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 umfasst.

32. Polynucleotid gemäß Anspruch 26, das weiterhin als RNA, PNA oder DNA charakterisiert ist.

33. Polynucleotid gemäß Anspruch 32, das weiterhin als DNA charakterisiert ist.

34. Polynucleotid gemäß Anspruch 26, wobei der Sequenzbereich funktionell mit wenigstens einem ersten Promotor verknüpft ist, der den Sequenzbereich unter Bildung des Polypeptids exprimiert.

35. Polynucleotid gemäß Anspruch 34, wobei der Promotor ein heterologer Promotor ist.

36. Polynucleotid gemäß Anspruch 35, wobei der heterologe Promotor ein für die Expression in Pflanzen geeigneter Promotor ist.

37. Polynucleotid gemäß Anspruch 36, wobei der für die Expression in Pflanzen geeignete Promotor aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus den Promotoren von Mais-Sucrose-Synthetase 1, Mais-Alkohol-Dehydrogenase 1, Mais-Lichtsammelkomplex, Mais-Hitzeschockprotein, der kleinen Untereinheit der RuBP-Carboxylase (Rubisco) der Erbse, der Mannopin-Synthase des Ti-Plasmids, der Nopalinsynthase des Ti-Plasmids, der Petunien-Chalcon-Isomerase, des glycinreichen Proteins 1 der Bohne, von Kartoffel-Patatin, Lectin, CaMV 35S und der kleinen Untereinheit der RuBP-Carboxylase (Rubisco) S-E9 besteht.

38. Isoliertes Nucleinsäuresegment, charakterisiert als:

- a) Nucleinsäuresegment, das einen Sequenzbereich umfasst, der zu wenigstens 90% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist, oder dessen Komplement; oder
- b) Nucleinsäuresegment mit einer Länge von wenigstens 100 Nucleotiden, das dieselbe Sequenz aufeinanderfolgender Basenpaare hat wie ein Segment von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1, oder dessen Komplement.

39. Isoliertes Nucleinsäuresegment gemäß Anspruch 38, charakterisiert als Nucleinsäuresegment, das einen Sequenzbereich umfasst, der zu wenigstens 90% identisch mit SEQ ID Nr. 1 ist, oder dessen Komplement.

40. Isoliertes Nucleinsäuresegment gemäß Anspruch 39, charakterisiert als Nucleinsäuresegment, das einen Sequenzbereich umfasst, der zu wenigstens 95% identisch mit SEQ ID Nr. 1 ist, oder dessen Komplement.

41. Isoliertes Nucleinsäuresegment gemäß Anspruch 40, charakterisiert als Nucleinsäuresegment, das einen Sequenzbereich umfasst, der zu wenigstens 99% identisch mit SEQ ID Nr. 1 ist, oder dessen Komplement.

42. Verfahren zum Nachweis einer Nucleinsäuresequenz, die ein δ -Endotoxin-Polypeptid codiert, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Gewinnen von Probennucleinsäuren, von denen man annimmt, dass sie ein δ -Endotoxin-Polypeptid codieren könnten;
- b) In-Kontakt-Bringen der Probennucleinsäuren mit einem isolierten Nucleinsäuresegment gemäß Anspruch 38 unter Bedingungen, die die Hybridisierung von im Wesentlichen komplementären Nucleinsäuren ermöglichen; und
- c) Nachweisen der so gebildeten hybridisierten komplementären Nucleinsäuren.

43. Nucleinsäure-Nachweis-Kit, der in einer geeigneten Behältereinrichtung wenigstens ein erstes Nucleinsäuresegment gemäß Anspruch 38 und wenigstens ein erstes Nachweisreagens umfasst.

44. Vektor, der wenigstens einen ersten Sequenzbereich umfasst:

- (a) der das Nucleinsäuresegment gemäß Anspruch 38 umfasst; oder
- (b) der das Polypeptid gemäß Anspruch 1 codiert.

45. Vektor gemäß Anspruch 44, der weiterhin als Plasmid, Baculovirus, künstliches Chromosom, Virion, Cosmid, Phagemid, Phage oder viraler Vektor definiert ist.

46. Vektor gemäß Anspruch 44, wobei der Sequenzbereich das Nucleinsäuresegment gemäß Anspruch 38 umfasst.

47. Vektor gemäß Anspruch 44, wobei der Sequenzbereich das Polypeptid gemäß Anspruch 1 codiert.

48. Vektor gemäß Anspruch 44, wobei der Sequenzbereich ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 umfasst.

49. Vektor gemäß Anspruch 48, wobei der Sequenzbereich die Nucleinsäuresequenz von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 umfasst.
50. Transformierte Wirtszelle, die den Vektor gemäß Anspruch 44 umfasst.
51. Transformierte Wirtszelle gemäß Anspruch 50, die das Nucleinsäuresegment gemäß Anspruch 38 umfasst.
52. Transformierte Wirtszelle gemäß Anspruch 50, die einen Sequenzbereich umfasst, der das Polypeptid gemäß Anspruch 1 codiert.
53. Transformierte Wirtszelle gemäß Anspruch 50, die weiterhin als prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle definiert ist.
54. Transformierte Wirtszelle gemäß Anspruch 53, die weiterhin als Bakterienzelle oder Pflanzenzelle definiert ist.
55. Transformierte Wirtszelle gemäß Anspruch 54, wobei die Bakterienzelle eine Zelle von *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Agrobacterium* oder *Pseudomonas* ist.
56. Transformierte Wirtszelle gemäß Anspruch 55, wobei die Bakterienzelle eine Zelle von *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21885 (EG4140) oder NRRL B-21886 (EG11839) ist.
57. Transformierte Wirtszelle gemäß Anspruch 54, wobei die Bakterienzelle eine Zelle von *Agrobacterium tumefaciens* ist.
58. Transformierte Wirtszelle gemäß Anspruch 54, die weiterhin als Zelle einer Einkeimblättrigen oder Zweikeimblättrigen Pflanze definiert ist.
59. Transformierte Wirtszelle gemäß Anspruch 58, wobei die Pflanzenzelle aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Zellen von Mais, Weizen, Sojabohne, Hafer, Baumwolle, Reis, Roggen, Sorghum, Zuckerrohr, Tomate, Tabak, Kapok, Flachs, Kartoffel, Gerste, Rasengras, Weidegras, Beeren, Früchten, Leguminosen, Gemüsen, Zierpflanzen, Sträuchern, Kakteen, Sukkulente und Bäumen besteht.
60. Transformierte Wirtszelle gemäß Anspruch 59, wobei die Pflanzenzelle eine Mais-, Weizen-, Reis- oder Zuckerrohrzelle ist.
61. Transformierte Wirtszelle gemäß Anspruch 59, wobei die Pflanzenzelle eine Sojabohnen-, Baumwoll-, Kartoffel-, Tomaten- oder Tabakzelle ist.
62. Transformierte Wirtszelle gemäß Anspruch 50, wobei der Sequenzbereich ein Polypeptid codiert, das wenigstens 75 aufeinanderfolgende Aminosäuren von SEQ ID Nr. 2 umfasst.
63. Pluripotente Pflanzenzellpopulation, die das Polypeptid gemäß Anspruch 1 umfasst.
64. Pluripotente Pflanzenzellpopulation gemäß Anspruch 63, die ein Polypeptid mit der Sequenz von SEQ ID Nr. 2 umfasst.
65. Pflanzenkallus oder Pflanzenembryo, der das Polypeptid gemäß Anspruch 1 umfasst.
66. Pflanzenkallus oder Pflanzenembryo gemäß Anspruch 65, wobei das Polypeptid die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 umfasst.
67. Transgene Pflanze, in deren Genom ein ausgewähltes Polynucleotid eingebaut ist, wobei das Polynucleotid wenigstens einen ersten Sequenzbereich umfasst, der das Polypeptid gemäß Anspruch 1 codiert.
68. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 67, wobei der Sequenzbereich ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 umfasst.

69. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 68, wobei der Sequenzbereich zu wenigstens 90% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist.
70. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 69, wobei der Sequenzbereich zu wenigstens 95% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist.
71. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 67, die weiterhin als Einkeimblättrige Pflanze definiert ist.
72. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 71, die weiterhin als Mais-, Weizen-, Hafer-, Reis-, Gerste-, Rausengras- oder Weidegraspflanze definiert ist.
73. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 67, die weiterhin als Zweikeimblättrige Pflanze definiert ist.
74. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 73, die weiterhin als Leguminose, Sojabohne, Tabak, Tomate, Kartoffel, Baumwolle, Frucht, Beere, Gemüse oder Baum definiert ist.
75. Nachkommenschaft irgendeiner Generation der transgenen Pflanze gemäß Anspruch 67, wobei die Nachkommenschaft den Sequenzbereich umfasst.
76. Samen irgendeiner Generation der Pflanze gemäß Anspruch 67, wobei der Samen den Sequenzbereich umfasst.
77. Verfahren zur Bekämpfung einer Insektenpopulation der Ordnung Lepidoptera oder Coleoptera, das das In-Kontakt-Bringen der Population mit einer insektizid wirksamen Menge des Polypeptids gemäß Anspruch 1 umfasst.
78. Verfahren gemäß Anspruch 77, wobei es sich bei dem Insekt der Ordnung Lepidoptera um *Plutella xylostella* oder *Trichoplusia ni* handelt.
79. Verfahren gemäß Anspruch 77, wobei es sich bei dem Insekt der Ordnung Coleoptera um den Westlichen Maiswurzelbohrer oder den Kartoffelkäfer (Coloradokäfer) handelt.
80. Verfahren gemäß Anspruch 77, wobei das Polypeptid die Sequenz von SEQ ID Nr. 2 umfasst.
81. Verfahren gemäß Anspruch 80, wobei das Polypeptid von einem Sequenzbereich codiert wird, der zu wenigstens 90% identisch mit den Nucleotiden von Nucleotid 92 bis Nucleotid 2254 von SEQ ID Nr. 1 ist.
82. Verfahren zur Tötung eines Insekts der Ordnung Lepidoptera oder Coleoptera, das das In-Kontakt-Bringen des Insekts oder das Füttern des Insekts mit einer insektizid wirksamen Menge des Polypeptids gemäß Anspruch 1 umfasst.
83. Verfahren gemäß Anspruch 82, wobei es sich bei dem Insekt der Ordnung Lepidoptera um *Plutella xylostella* oder *Trichoplusia ni* handelt.
84. Verfahren gemäß Anspruch 82, wobei es sich bei dem Insekt der Ordnung Coleoptera um den Westlichen Maiswurzelbohrer oder den Kartoffelkäfer (Coloradokäfer) handelt.
85. Peptid, das einen Sequenzbereich von wenigstens 75 aufeinanderfolgenden Aminosäuren von SEQ ID Nr. 2 umfasst und eine Länge von bis zu 100 Aminosäuren aufweist.
86. Peptid, das einen Sequenzbereich von wenigstens 100 aufeinanderfolgenden Aminosäuren von SEQ ID Nr. 2 umfasst.
87. Peptid, das einen Sequenzbereich von wenigstens 150 aufeinanderfolgenden Aminosäuren von SEQ ID Nr. 2 umfasst.
88. Verfahren zur Herstellung einer insektenresistenten Pflanze, umfassend:
(a) In-Kontakt-Bringen einer aufnehmenden Pflanzenzelle mit einer Polynucleotidzusammensetzung, die wenigstens ein erstes Transgen umfasst, das das Polypeptid von Anspruch 1 codiert, unter Bedingungen, die die Aufnahme der Polynucleotidzusammensetzung durch die Zelle ermöglichen;

- (b) Selektieren einer aufnehmenden Zelle, die ein chromosomal eingebautes Transgen umfasst, das das Polypeptid codiert;
 - (c) Regenerieren einer Pflanze aus der selektierten Zelle; und
 - (d) Identifizieren einer fruchtbaren transgenen Pflanze;
- wobei die Pflanze eine im Vergleich zu der entsprechenden untransformierten Pflanze verstärkte Insektenresistenz hat.

89. Verfahren gemäß Anspruch 88, wobei das In-Kontakt-Bringen eine Mikroprojektil-Bombardierung, Elektroporation oder Agrobacterium-vermittelte Transformation umfasst.

90. Insektenresistente gekreuzte fruchtbare transgene Pflanze, die nach einem Verfahren hergestellt ist, das Folgendes umfasst:

- (a) Gewinnen einer fruchtbaren transgenen Pflanze, die (i) ein chromosomal eingebautes Transgen, das das Polypeptid gemäß Anspruch 1 codiert, und (ii) einen Promotor, der in der Pflanze aktiv ist und funktionell mit dem Transgen verknüpft ist, umfasst;
- (b) Kreuzen der fruchtbaren transgenen Pflanze mit einer zweiten Pflanze, der das Transgen fehlt, so dass man eine dritte Pflanze erhält, die das Transgen umfasst; und
- (c) Rückkreuzen der dritten Pflanze, so dass man eine rückgekreuzte fruchtbare Pflanze erhält.

91. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 90, wobei das Transgen über ein männliches Elternteil vererbt wird.

92. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 90, wobei das Transgen über ein weibliches Elternteil vererbt wird.

93. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 90, wobei die zweite Pflanze eine ingezüchtete Pflanze ist.

94. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 90, wobei die dritte Pflanze ein Hybrid ist.

95. Insektenresistente transgene Hybridpflanze, die nach einem Verfahren hergestellt ist, das das Kreuzen einer ersten und einer zweiten ingezüchteten Pflanze umfasst, wobei die erste und/oder die zweite ingezüchtete Pflanze (a) ein chromosomal eingebautes Transgen, das das Polypeptid gemäß Anspruch 1 codiert, und (b) einen Promotor, der in der Pflanze aktiv ist und funktionell mit dem Transgen verknüpft ist, umfasst.

96. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 95, wobei die erste und die zweite ingezüchtete Pflanze Einkeimblättrige Pflanzen sind, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Mais, Weizen, Reis, Gerste, Hafer, Roggen, Sorghum, Rasengras und Zuckerrohr besteht.

97. Verfahren zur Herstellung von transgenem Samen, das die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Gewinnen einer fruchtbaren transgenen Pflanze, die ein chromosomal integriertes Transgen umfasst, das das Polypeptid gemäß Anspruch 1 codiert und funktionell mit einem Promotor verknüpft ist, der das Transgen in einer Pflanze exprimiert; und
- (b) Wachsenlassen der Pflanze unter geeigneten Bedingungen unter Bildung des transgenen Samens.

98. Verfahren zur Herstellung von Nachkommen irgendeiner Generation einer fruchtbaren transgenen Pflanze mit verstärkter Insektenresistenz, umfassend:

- (a) Sammeln von transgenem Samen von einer transgenen Pflanze, die ein chromosomal eingebautes Transgen, das das Polypeptid gemäß Anspruch 1 codiert, funktionell verknüpft mit einem Promotor, der das Transgen in der Pflanze exprimiert, umfasst;
- (b) Pflanzen des gesammelten transgenen Samens; und
- (c) Wachsenlassen von transgenen Nachkommenpflanzen aus dem Samen.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

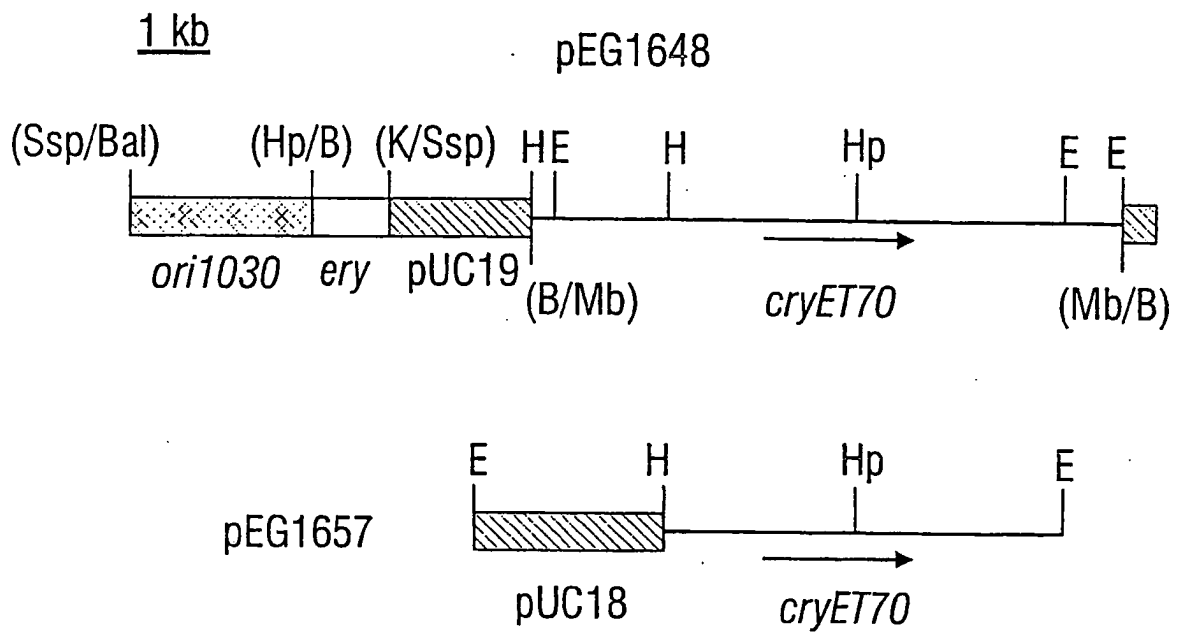


FIG. 1