



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 30 730 T2 2005.09.22**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 942 985 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 30 730.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/21587**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 950 691.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/022595**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.11.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **28.05.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.09.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **15.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.09.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/32**

C12N 15/62, C07K 14/325, A01N 63/00,

C12Q 1/68, A01H 5/00, C07K 16/12,

G01N 33/68

(30) Unionspriorität:

754490 20.11.1996 US

922505 03.09.1997 US

(73) Patentinhaber:

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

(74) Vertreter:

**TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR
Patentanwälte, 81679 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**MALVAR, Thomas, Dublin, US; GILMER, Jelen,
Amy, Langhorne, US**

(54) Bezeichnung: **DELTA-ENDOTOXINE MIT BREITEM SPEKTRUM**

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

[0001] Die vorliegende Anmeldung ist eine Fortsetzungsanmeldung der US-Patentanmeldung mit der Anmeldeungsnummer 08/922,505, eingereicht am 3. September 1997, welche eine Fortsetzungsanmeldung ist der US-Patentanmeldung mit der Anmeldeungsnummer 08/754,490, eingereicht am 20. November 1996, wobei der gesamte Inhalt davon hierin unter Bezugnahme ausdrücklich eingeschlossen ist.

1.1 Hintergrund der Erfindung

[0002] Die vorliegende Erfindung stellt neue Gene bereit, welche *Bacillus thuringiensis*-Kristallproteine codieren, die gegenüber Coleoptera-, Diptera- und Lepidoptera-Insekten toxisch sind. Bereitgestellt werden auch Proteinzusammensetzungen, welche chimäre Kristallproteine mit einer erhöhten Insektizidaktivität und einer verbesserten Insektizidspezifität umfassen.

1.2 Beschreibung des verwandten Fachgebiets

1.2.1 *B. thuringiensis*-Kristallproteine

[0003] Das Gram-positive Bodenbakterium *B. thuringiensis* ist für seine Produktion von proteinähnlichen parasporalen Kristallen oder δ -Endotoxinen bekannt, welche gegenüber einer Vielzahl von Lepidoptera-, Coleoptera- und Diptera-Larven toxisch sind. *B. thuringiensis* produziert während der Sporenbildung Kristallproteine, die gegenüber bestimmten Insektenarten besonders toxisch sind. Es ist gezeigt worden, daß viele verschiedene Stämme von *B. thuringiensis* insektizide Kristallproteine produzieren. Zusammensetzungen, umfassend *B. thuringiensis*-Stämme, die Proteine mit einer Insektizidaktivität produzieren, sind wegen ihrer Toxizität gegenüber dem spezifischen Zielinsekt und der Nichttoxizität gegenüber Pflanzen und anderen Organismen, die nicht zur Zielgruppe gehören, kommerziell als umweltverträgliche Insektizide verwendet worden.

[0004] Kommerzielle Formulierungen von natürlich vorkommenden *B. thuringiensis*-Isolaten sind seit langem zur biologischen Bekämpfung von landwirtschaftlichen Schadinsekten verwendet worden. Bei der kommerziellen Herstellung werden die aus dem Fermentationsprozeß erhaltenen Sporen und Kristalle konzentriert und zum Blattauftrag gemäß herkömmlichen landwirtschaftlichen Anwendungen formuliert.

1.2.2 Nomenklatur von Kristallproteinen

[0005] Eine Übersicht von Höfte et al. (1989) beschreibt den allgemeinen Stand der Technik im Hinblick auf die Mehrzahl der insektiziden *B. thuringiensis*-Stämme, die identifiziert worden sind und gegenüber Insekten der Gattung Lepidoptera, d. h. Raupen, aktiv sind. Diese Abhandlung beschreibt auch *B. thuringiensis*-Stämme mit einer Insektizidaktivität gegenüber Insekten der Gattung Diptera (d. h. Fliegen und Moskitos) und Coleoptera (d. h. Käfer). Eine Reihe von Genen, welche Kristallproteine codieren, sind aus mehreren Stämmen von *B. thuringiensis* cloniert worden. Hörte et al. (1989) besprechen die Gene und Proteine, welche in *B. thuringiensis* vor 1990 identifiziert wurden, und legen das Nomenklatur- und Klassifikationsschema dar, welches traditionell auf Gene und Proteine von *B. thuringiensis* angewendet worden ist. cry1-Gene codieren Cry1-Proteine, die gegenüber Lepidoptera toxisch sind. cry2-Gene codieren Cry2-Proteine, die für sowohl Lepidoptera als auch Diptera toxisch sind. cry3-Gene codieren Cry3-Proteine, welche gegenüber Coleoptera toxisch sind, während cry4-Gene Cry4-Proteine codieren, die gegenüber Diptera toxisch sind, etc.

[0006] Vor kurzem ist eine neue Nomenklatur vorgeschlagen worden, welche die Cry-Proteine auf der Basis der Aminosäuresequenz-Homologie anstatt den Zielinsekt-Spezifitäten systematisch klassifiziert. Dieses Klassifikationsschema ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1
Überarbeitete *B. thuringiensis*- δ -Endotoxin-Nomenklatur^a

Neu	Alt	GenBank-Hinterlegung#
CryIAa	CryIA(a)	M11250
CryIAb	CryIA(b)	M13898
CryIAc	CryIA(c)	M11068
CryIAd	CryIA(d)	M73250
CryIAe	CryIA(e)	M65252
CryIBa	CryIB	X06711
CryIBb	ET5	L32020
CryIBc	PEG5	Z46442
CryIBd	CryE1	U70726
CryICa	CryIC	X07518
CryICb	CryIC(b)	M97880

Neu	Alt	GenBank-Hinterlegung#
Cry1Da	CryID	X54160
Cry1Db	PrtB	Z22511
Cry1Ea	CryIE	X53985
Cry1Eb	CryIE(b)	M73253
Cry1Fa	CryIF	M63897
Cry1Fb	PrtD	Z22512
Cry1Ga	PrtA	Z22510
Cry1Gb	CryH2	U70725
Cry1Ha	PrtC	Z22513
Cry1Hb		U35780
Cry1Ia	CryV	X62821
Cry1Ib	CryV	U07642
Cry1Ja	ET4	L32019
Cry1Jb	ET1	U31527
Cry1K		U28801
Cry2Aa	CryIIA	M31738
Cry2Ab	CryIIB	M23724
Cry2Ac	CryIIC	X57252
Cry3A	CryIIIA	M22472
Cry3Ba	CryIIIB	X17123
Cry3Bb	CryIIIB2	M89794
Cry3C	CryIIID	X59797
Cry4A	CryIVA	Y00423
Cry4B	CryIVB	X07423
Cry5Aa	CryVA(a)	L07025
Cry5Ab	CryVA(b)	L07026
Cry5B		U19725
Cry6A	CryVIA	L07022
Cry6B	CryVIB	L07024
Cry7Aa	CryIIIC	M64478

Neu	Alt	GenBank-Hinterlegung#
Cry7Ab	CryIIICb	U04367
Cry8A	CryIIIE	U04364
Cry8B	CryIIIG	U04365
Cry8C	CryIIIF	U04366
Cry9A	CryIG	X58120
Cry9B	CryIX	X75019
Cry9C	CryIH	Z37527
Cry10A	CryIVC	M12662
Cry11A	CryIVD	M31737
Cry11B	Jeg80	X86902
Cry12A	CryVB	L07027
Cry13A	CryVC	L07023
Cry14A	CryVD	U13955
Cry15A	34kDa	M76442
Cry16A	cbm71	X94146
Cry17A	cbm71	X99478
Cry18A	CryBP1	X99049
Cry19A	Jeg65	Y08920
Cyt1Aa	CytA	X03182
Cyt1Ab	CytM	X98793
Cyt1B		U37196
Cyt2A	CytB	Z14147
Cyt2B	CytB	U52043

^aÜbernommen von: http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html

1.2.3 Art der Kristallprotein-Toxizität

[0007] Alle δ -Endotoxin-Kristalle sind gegenüber Insektenlarven durch Aufnahme toxisch. Die Solubilisierung des Kristalls im Mitteldarm des Insekts setzt die Protoxinform des δ -Endotoxins frei, welche in den meisten Fällen anschließend durch die Mitteldarmprotease in ein aktives Toxin umgewandelt wird. Die aktivierten Toxine erkennen und binden an den Bürstensaum des Insektenmitteldarmepithels über Rezeptorproteine. Mehrere mutmaßliche Kristallprotein-Rezeptoren sind aus bestimmten Insektenlarven isoliert worden (Knight et al., 1995; Gill et al., 1995; Masson et al., 1995). Auf die Bindung der aktiven Toxine folgt die Einlagerung und Aggregation von Toxinmolekülen unter Bildung von Poren in dem Mitteldarmepithel. Dieser Prozeß hat ein osmotisches Ungleichgewicht, eine Anschwellung, eine Lyse der Zellen, die das Mitteldarmepithel auskleiden, und schließlich die Mortalität der Larven zur Folge.

1.2.4 Molekularbiologie von δ -Endotoxinen

[0008] Mit dem Aufkommen der molekulargenetischen Techniken sind verschiedene δ -Endotoxin-Gene isoliert und die DNA-Sequenzen hiervon bestimmt worden. Diese Gene sind verwendet worden, um bestimmte

gentechnisch veränderte *B. thuringiensis*-Produkte zu konstruieren, welche für die kommerzielle Verwendung zugelassen worden sind. Jüngste Entwicklungen haben neue δ -Endotoxin-Übertragungssysteme hervorgebracht, einschließlich Pflanzen, die gentechnisch veränderte δ -Endotoxin-Gene enthalten und exprimieren.

[0009] Die Clonierung und Sequenzierung einer Reihe von δ -Endotoxin-Genen aus einer Vielzahl von *Bacillus thuringiensis*-Stämmen ist durch Höfte und Whiteley, 1989, beschrieben und zusammengefaßt worden. Plasmid-"Shuttle"-Vektoren, welche für die Clonierung und Expression von δ -Endotoxin-Genen in *E. coli* oder *B. thuringiensis* konstruiert wurden, sind bei Gawron-Burke und Baum (1991) beschrieben. US-Patent Nr. 5,441,884 offenbart ein ortsspezifisches Rekombinationssystem für die Konstruktion von rekombinanten *B. thuringiensis*-Stämmen, enthaltend δ -Endotoxin-Gene, welche frei an DNA-Sequenzen sind, welche für *B. thuringiensis* nicht natürlich sind.

[0010] Die Cry1-Familie der Kristallproteine, welche überwiegend gegenüber Lepidoptera-Schädlingen aktiv sind, ist die am besten untersuchte Klassen von δ -Endotoxinen. Die Protoxinform von Cry1- δ -Endotoxinen besteht aus zwei etwa gleich großen Segmenten. Der Carboxylanteil oder das Protoxinsegment ist nicht toxisch, und es wird angenommen, daß es für die Kristallbildung wichtig ist (Arvidson et al., 1989). Der Aminoanteil des Protoxins umfaßt das aktive Toxinsegment des Cry1-Moleküls und kann weiterhin in drei strukturelle Domänen unterteilt werden, wie durch die jüngst beschriebene kristallographische Struktur für das aktive Toxinsegment des Cry1Aa- δ -Endotoxins bestimmt wurde (Grochulski et al., 1995). Die Domäne 1 nimmt das erste Drittel des aktiven Toxins ein und ist für die Kanalbildung wesentlich (Thompson et al., 1995). Domäne 2 und Domäne 3 machen das mittlere bzw. letzte Drittel des aktiven Toxins aus. Die Domänen 2 und 3 sind beide mit der Rezeptorbindung und der Insektenspezifität, abhängig von dem Insekt und dem δ -Endotoxin, welche untersucht wurden, in Verbindung gebracht worden (Thompson et al., 1995).

1.2.5 Chimäre Kristallproteine

[0011] In den letzten Jahren konzentrierten die Forscher ihre Bemühungen auf die Konstruktion von Hybrid- δ -Endotoxinen, in der Hoffnung, Proteine herzustellen, die eine erhöhte Aktivität oder bessere Eigenschaften besitzen. Die Fortschritte auf dem Gebiet der Molekulargenetik in den letzten Jahrzehnten haben einen logischen und geordneten Ansatz für die Konstruktion von Proteinen mit besseren Eigenschaften erleichtert. Ortsspezifische und statistische Mutageneseverfahren, das Aufkommen von Polymerasekettenreaktion (PCRTM)-Methodiken und die Entwicklung von Rekombinationsverfahren zur Erzeugung von Genfusionen und zur Konstruktion von chimären Proteinen haben eine Reihe von Verfahren zur Veränderung der Aminosäuresequenzen von Proteinen, zur Verbindung von Teilen aus zwei oder mehreren Proteinen miteinander in einem einzigen rekombinanten Protein und zur Veränderung von Gensequenzen, welche kommerziell interessante Proteine codieren, ermöglicht.

[0012] Unglücklicherweise sind diese Techniken nur in begrenzter Weise für Kristallproteine nutzbar gemacht worden. Die Wahrscheinlichkeit, zufällig ein chimäres Protein mit besseren Eigenschaften aus Teilen der zahlreichen nativen Proteine, die identifiziert worden sind, zu erzeugen, ist aufgrund der komplexen Natur der Proteinstruktur, Faltung, Oligomerisierung, Aktivierung und richtigen Prozessierung des chimären Protoxins zu einer aktiven Einheit sehr gering. Nur durch die sorgfältige Auswahl von spezifischen Zielregionen innerhalb jedes Proteins und eine anschließende Proteinkonstruktion können Toxine synthetisiert werden, welche eine verbesserte Insektizidaktivität besitzen.

[0013] Über einige Erfolge auf diesem Gebiet ist in der Literatur berichtet worden. Zum Beispiel wird über die Konstruktion von einigen Hybrid- δ -Endotoxinen in dem folgenden verwandten Fachgebiet berichtet: die Internat. Pat. Anmeldg. Veröffentl.-Nr. WO 95/30753 offenbart die Konstruktion von hybriden *B. thuringiensis*- δ -Endotoxinen zur Herstellung in *Pseudomonas fluorescens*, worin das nichttoxische Protoxinfragment von Cry1F durch das nichttoxische Protoxinfragment aus Cry1Ac/Cry1Ab, welches in US-Patent 5,128,130 offenbart ist, ersetzt worden ist.

[0014] US-Patent 5,128,130 offenbart die Konstruktion von hybriden *B. thuringiensis*- δ -Endotoxinen zur Herstellung in *P. fluorescens*, worin ein Teil des nichttoxischen Protoxinsegments von Cry1Ac durch das entsprechende nichttoxische Protoxinfragment von Cry1Ab ersetzt ist. US-Patent 5,055,294 offenbart die Konstruktion eines spezifischen Hybrid- δ -Endotoxins zwischen Cry1Ac (Aminosäurereste 1-466) und Cry1Ab (Aminosäurereste 466-1155) zur Herstellung in *P. fluorescens*. Obwohl das oben erwähnte Patent die Konstruktion eines hybriden Toxins innerhalb des aktiven Toxinsegments offenbart, werden keine Einzelheiten im Hinblick die Insektizidaktivität des hybriden Toxins angegeben. Die Internat. Pat. Anmeldg. Veröffentl.-Nr. WO 95/30752 offenbart die Konstruktion von hybriden *B. thuringiensis*- δ -Endotoxinen zur Herstellung in *P. fluorescens*, worin

das nichttoxische Protoxinsegment von Cry1C durch das nichttoxische Protoxinsegment aus Cry1Ab ersetzt ist. Die oben erwähnte Anmeldung offenbart ferner, daß die Aktivität gegen *Spodoptera exigua* für das Hybrid- δ -Endotoxin gegenüber der Aktivität des aktiven Stamm-Toxins, Cry1C, verbessert ist.

[0015] Die Internat. Pat. Anmeldg. Veröffentl.-Nr. WO 95/06730 offenbart die Konstruktion eines hybriden *B. thuringiensis*- δ -Endotoxins, das aus den Domänen 1 und 2 von Cry1E, gekoppelt an Domäne 3, und dem nicht-toxischen Protoxinsegment von Cry1C besteht. Insekten-Bioassays, durchgeführt gegen *Manduca sexta* (empfindlich gegen Cry1C und Cry1E), *Spodoptera exigua* (empfindlich gegen Cry1C) und *Mamestra brassicae* (empfindlich gegen Cry1C), zeigen, daß das hybride Cry1E/Cry1C-Hybrid-Toxin gegenüber *M. sexta*, *S. exigua* und *M. brassicae* aktiv ist. Die Bioassay-Ergebnisse wurden als EC_{50} -Werte (Toxinkonzentration, welche eine Vermehrungsreduktion von 50% ergibt) anstatt als LC_{50} -Werte (Toxinkonzentration, welche eine Mortalität von 50% ergibt) ausgedrückt. Obwohl die für den Bioassay verwendeten δ -Endotoxine in *B. thuringiensis* hergestellt wurden, wurden nur künstlich erzeugte aktive Segmente der δ -Endotoxine verwendet, nicht die natürlicherweise produzierten Kristalle, welche typischerweise durch *B. thuringiensis* hergestellt werden und in kommerziellen *B. thuringiensis*-Formulierungen vorhanden sind. Die Bioassay-Ergebnisse zeigten, daß die LC_{50} -Werte für den hybriden Cry1E/Cry1C-Kristall gegenüber *S. frugiperda* um das 1,5- bis 1,7fache niedriger (aktiver) als für natives Cry1C sind. Diese Fachliteratur offenbart auch die Konstruktion eines hybriden *B. thuringiensis*- δ -Endotoxins zwischen Cry1Ab (Domänen 1 und 2) und Cry1C (Domäne 3 und das nichttoxische Protoxinsegment), obwohl keine Daten im Hinblick auf die Aktivität oder Nützlichkeit des hybriden Toxins angegeben werden.

[0016] Lee et al. (1995) berichten über die Konstruktion von hybriden *B. thuringiensis*- δ -Endotoxinen zwischen Cry1Ac und Cry1Aa innerhalb des aktiven Toxinsegments. Künstlich erzeugte aktive Segmente der hybriden Toxine wurden verwendet, um die Proteinwechselwirkungen in empfindlichen Bürstensaum-Membranvesikeln (BBMV) von Insekten zu untersuchen. Über die Bioaktivität der hybriden Toxine wurde nicht berichtet.

[0017] Honee et al. (1991) berichten über die Konstruktion von Hybrid- δ -Endotoxinen zwischen Cry1C (Domäne 1) und Cry1 Ab (Domänen 2 und 3) und des reziproken Hybrids zwischen Cry1Ab (Domäne 1) und Cry1C (Domänen 2 und 3). Diese Hybride zeigten keine wesentliche Erhöhung der Aktivität gegenüber empfindlichen Insekten. Außerdem wurde festgestellt, daß das hybride Cry1C (Domäne 1)/Cry1Ab (Domänen 2 und 3)-Toxin gegen einen Proteaseabbau hypersensibel ist. Ein Bericht von Schnepf et al. (1990) offenbart die Konstruktion eines hybriden Cry1Ac-Toxins, worin ein kleiner Teil von Domäne 2 durch die entsprechende Region von Cry1Aa ersetzt wurde, obwohl keine wesentliche Erhöhung der Aktivität gegenüber empfindlichen Insektenlarven beobachtet wurde.

1.3 Mängel gemäß dem Stand der Technik

[0018] Die begrenzten Erfolge bei der Herstellung von chimären Kristallproteinen, welche eine verbesserte Aktivität besitzen, haben das Fachgebiet dahin gehend negativ beeinflusst, daß Bemühungen unterbunden wurden, ein rekombinant verändertes Kristallprotein für die kommerzielle Erschließung herzustellen und die toxischen Eigenschaften und Wirtsspezifitäten der bekannten Endotoxine auszuweiten. Gemäß dem Stand der Technik fehlen daher zuverlässige Verfahren und Zusammensetzungen, umfassend rekombinant veränderte Kristallproteine, welche eine verbesserte Insektizidaktivität und eine Wirtsspezifität mit breitem Spektrum aufweisen und welche für die kommerzielle Herstellung in *B. thuringiensis* geeignet sind.

2.0 Zusammenfassung der Erfindung

[0019] Die vorliegende Erfindung überwindet diese und andere Begrenzungen gemäß dem Stand der Technik durch die Bereitstellung von neuen chimären δ -Endotoxinen, welche verbesserte insektizide Eigenschaften und Spezifitäten mit einem breiten Spektrum besitzen.

[0020] Offenbart werden Verfahren zur Konstruktion von *B. thuringiensis*-Hybrid- δ -Endotoxinen, welche Aminosäuresequenzen aus nativen Cry1Ac- und Cry1F-Kristallproteinen umfassen. Diese Hybridproteine, worin die gesamte oder ein Teil der Cry1Ac-Domäne 2, die gesamte oder ein Teil der Cry1Ac-Domäne 3 und das gesamte oder ein Teil des Cry1Ac-Protoxinsegments durch die entsprechenden Teile von Cry1F ersetzt sind, besitzen nicht nur die insektiziden Eigenschaften der Stamm- δ -Endotoxine, sondern weisen auch die unerwarteten und bemerkenswerten Eigenschaften einer verbesserten Spezifität mit einem breiten Spektrum auf, die keines der nativen δ -Endotoxine, aus welchen die chimären Proteine konstruiert wurden, hinreichend zeigt.

[0021] Genauer offenbart und beansprucht die vorliegende Erfindung gentechnisch hergestellte Hybrid- δ -En-

dotoxine, welche einen Teil eines Cry1Ac-Kristallproteins, verbunden mit einem Teil eines Cry1F-Kristallproteins, umfassen. Diese chimären Endotoxine weisen eine Spezifität mit einem breiten Spektrum gegenüber den hierin beschriebenen Schadinsekten auf.

[0022] In einer weiteren Ausführungsform offenbart und beansprucht die vorliegende Erfindung auch rekombinante *B. thuringiensis*-Hybrid- δ -Endotoxine, umfassend einen Teil von Cry1Ab, Cry1F und Cry1Ac, worin die gesamte oder ein Teil der Cry1Ab-Domäne 2 oder die gesamte oder ein Teil der Cry1Ab-Domäne 3 durch die entsprechenden Teile von Cry1F ersetzt ist, und das gesamte oder ein Teil des Cry1Ab-Protoxinsegments durch die entsprechenden Teile von Cry1Ac ersetzt ist. Beispielhafte Hybrid- δ -Endotoxine zwischen Cry1Ab und Cry1F sind in SEQ ID NO: 13 und SEQ ID NO: 14 identifiziert.

[0023] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung veranschaulicht das unerwartete Ergebnis, daß bestimmte Hybrid- δ -Endotoxine, abgeleitet aus Cry1Ac- und Cry1F-Proteinen, nicht nur die insektiziden Eigenschaften der Stamm- δ -Endotoxine zeigen, sondern auch eine Insektizidaktivität besitzen, die durch keines der Stamm- δ -Endotoxine hinreichend gezeigt wird.

[0024] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung veranschaulicht ferner das unerwartete Ergebnis, daß bestimmte chimäre Cry1Ab/Cry1F-Proteine nicht nur die insektiziden Eigenschaften der Stamm- δ -Endotoxine beibehalten, sondern auch eine Insektizidaktivität besitzen, die durch keines der nativen Cry1Ab- oder Cry1F-Endotoxine hinreichend gezeigt wird.

[0025] Die vorliegende Erfindung umfaßt auch Cry1Ac/Cry1F- und Cry1Ab/Cry1F-Hybrid- δ -Endotoxine, welche die gewünschten Eigenschaften beibehalten, die für die kommerzielle Herstellung in *B. thuringiensis* erforderlich sind. Genauer können die in SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 und SEQ ID NO: 34 identifizierten Hybrid- δ -Endotoxine wirksam proteinähnliche parasporale Einschlüsse in *B. thuringiensis* bilden und weisen die vorteilhaften Eigenschaften einer Löslichkeit, Proteaseempfindlichkeit und Insektizidaktivität der Stamm- δ -Endotoxine auf.

[0026] Der Anstoß für die Konstruktion dieser und anderer Hybrid- δ -Endotoxine ist, neue Toxine mit einer verbesserten Insektizidaktivität, größeren Wirtsbereichsspezifität und verbesserten Produktionseigenschaften zu erzeugen. Die in Tabelle 8 aufgeführten DNA-Sequenzen definieren die Austauschstellen für die Hybrid- δ -Endotoxine, welche für die vorliegende Erfindung relevant sind und als Oligonucleotidprimer verwendet werden können, um solche oder ähnliche Hybrid- δ -Endotoxine durch Southern-Blot- oder Kolonie-Hybridisierungsverfahren unter Bedingungen einer mäßigen bis hohen Stringenz zu identifizieren. Erfahrene Forscher erkennen die Wichtigkeit der gewählten Austauschstelle zwischen zwei oder mehreren δ -Endotoxinen, wobei der Austausch durch eine Reihe von in vivo- oder in vitro-Techniken der Molekulargenetik erreicht werden kann. Kleine Variationen in der Austauschregion zwischen zwei oder mehreren δ -Endotoxinen können ähnliche Ergebnisse ergeben oder, wie für EG11062 und EG11063 gezeigt, gewünschte Merkmale ungünstig beeinflussen. In ähnlicher Weise können große Variationen in der Austauschregion zwischen zwei oder mehreren δ -Endotoxinen keinen Einfluß auf gewünschte Merkmale haben, wie durch EG11063 und EG11074 gezeigt, oder können gewünschte Merkmale ungünstig beeinflussen, wie durch EG11060 und EG11063 gezeigt wird.

[0027] Vorteilhafte Merkmale im Hinblick auf eine verbesserte Insektizidaktivität, einen größeren Wirtsbereich und verbesserte Produktionseigenschaften können durch andere solche Hybrid- δ -Endotoxine, einschließlich, aber nicht begrenzt auf, die cry1-, cry2-, cry3-, cry4-, cry5-, cry6-, cry7-, cry8-, cry9-, cry10-, cry11-, cry12-, cry13-, cry14-, cry15-Klasse von δ -Endotoxin-Genen und die cytolytischen *B. thuringiensis*-cyt1- und -cyt2-Gene, erhalten werden. Vertreter dieser Klassen von *B. thuringiensis*-Insektizidproteinen schließen, aber sind nicht begrenzt auf, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Ca, Cry1Cb, Cry1Da, Cry1Db, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa, Cry1Fb, Cry1Ga, Cry1Ha, Cry2a, Cry2b, Cry1Ja, Cry1Ka, Cry11Aa, Cry11Ab, Cry12Aa, Cry3Ba, Cry3Bb, Cry3C, Cry4a, Cry4Ba, Cry5a, Cry5Ab, Cry6Aa, Cry6Ba, Cry7Aa, Cry7Ab, Cry8Aa, Cry8Ba, Cry8Ca, Cry9Aa, Cry9Ba, Cry9Ca, Cry10Aa, Cry11Aa, Cry12Aa, Cry13Aa, Cry14Aa, Cry15Aa, Cyt1Aa und Cyt2Aa ein. Verwandte Hybrid- δ -Endotoxine würden aus dem Aminoanteil eines der oben erwähnten δ -Endotoxine, einschließlich der gesamten oder einem Teil der Domäne 1 oder Domäne 2, verbunden mit der gesamten oder einem Teil der Domäne 3 aus einem anderen der oben erwähnten δ -Endotoxine, bestehen. Das nichtaktive Protoxinfragment solcher Hybrid- δ -Endotoxine kann aus dem Protoxinfragment irgendeines der oben erwähnten δ -Endotoxine bestehen, welches dazu dienen kann, das Hybrid- δ -Endotoxin zu stabilisieren, wie durch EG11087 und EG11091 (vgl. z. B. Tabelle 5) gezeigt wird. Hybrid- δ -Endotoxine, welche ähnliche Merkmale wie die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen besitzen, können durch konservative oder "ähnliche" Austausche von Aminosäuren innerhalb der Hybrid- δ -Endotoxine konstruiert werden. Solche Substitutionen würden die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften

der nativen Aminosäure an irgendeiner Position in dem Protein nachahmen. Aminosäuren, welche als ähnlich angesehen werden, schließen zum Beispiel, aber sind nicht darauf begrenzt, die folgenden ein:

Ala, Ser und Thr;
 Asp und Glu;
 Asn und Gln;
 Lys und Arg;
 Ile, Leu, Met und Val; und
 Phe, Tyr und Trp.

[0028] Erfahrene Forscher erkennen, daß die verbesserte Insektizidaktivität, der größere Wirtsbereich und die verbesserten Produktionseigenschaften, welche auf Hybrid- δ -Endotoxine übertragen werden, weiter verbessert werden können, indem der genetische Code für eine oder mehrere Aminosäurepositionen in dem Hybrid- δ -Endotoxin verändert wird, so daß die Position oder die Positionen durch irgendeine andere Aminosäure ersetzt wird bzw. werden. Dies kann dadurch erreicht werden, daß eine Region oder mehrere Regionen des Proteins durch irgendeine Technik einer Reihe von eingeführten Mutagenesetechniken, einschließlich der für die vorliegende Erfindung relevanten Verfahren, zielgerecht angegangen werden, um eine Mutagenese herbeizuführen. Solche Techniken schließen die ortsspezifische Mutagenese (Kunkel, 1985; Kunkel et al., 1987), die DNA-Umordnung ("DNA-Shuffling") (Stemmer, 1994) und eine überlappende PCRTM-Verlängerungsreaktion (Horton et al., 1989) ein. Da Aminosäuren, welche auf oder nahe der Oberfläche eines Proteins vorliegen, wahrscheinlich für die Wechselwirkung hiervon mit anderen proteinähnlichen oder nicht-proteinähnlichen Einheiten verantwortlich sind, können sie als "Ziel"-Regionen für eine Mutagenese dienen. Solche oberflächenexponierten Regionen können, aber sind nicht darauf begrenzt, aus oberflächenexponierten Aminosäureresten innerhalb des aktiven Toxinfragments des Proteins bestehen und schließen die Inter- α -Helix- oder Inter- β -Strang-"Schleifen"-Regionen von δ -Endotoxinen, welche α -Helices innerhalb von Domäne 1 und β -Stränge innerhalb von Domäne 2 und Domäne 3 trennen, ein. Solche Verfahren können die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften des Proteins oder seine Wirkungsweise günstig verändern, wie in Abschnitt 1 dargelegt ist. Diese Eigenschaften schließen, aber sind nicht begrenzt auf, die folgenden ein: 1) eine verbesserte Kristallbildung, 2) eine verbesserte Proteinstabilität oder einen verminderten Proteaseabbau, 3) eine verbesserte Insekten-Membranrezeptor-Erkennung und -Bindung, 4) eine verbesserte Oligomerisierung oder Kanalbildung im Insekten-Mitteldarmepithel, und 5) eine verbesserte Insektizidaktivität oder Insektizidspezifität aufgrund irgendeines oder allen der oben angegebenen Gründe.

[0029] Die vorliegende Erfindung stellt ein isoliertes Nucleinsäuresegment bereit, das ein Polypeptid, umfassend die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34, codiert. Vorzugsweise codiert das Nucleinsäuresegment ein Polypeptid mit einer Insektizidaktivität gegenüber *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* oder *Ostrinia nubilalis*. Solche Nucleinsäuresegmente sind isolierbar aus Zellen von *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21579, NRRL B-21580, NRRL B-21581, NRRL B-21635, NRRL B-21636 bzw. NRRL B-21781.

[0030] In bevorzugten Ausführungsformen hybridisieren diese Nucleinsäuresegmente spezifisch mit einem Nucleinsäuresegment mit der Sequenz von SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 33 oder einem Komplementärstrang hiervon, und in besonders bevorzugten Ausführungsformen umfassend diese Nucleinsäuresegmente die Nucleinsäuresequenzen, welche in SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 bzw. SEQ ID NO: 33 offenbart sind.

[0031] Ein solches Nucleinsäuresegment kann funktionell verbunden sein mit einem Promotor, um das Nucleinsäuresegment in einer Wirtszelle zu exprimieren. In solchen Ausführungsformen kann das Nucleinsäuresegment innerhalb eines rekombinanten Vektors wie einem Plasmid, Cosmid, Phagen, Phagemid, Virus, Baculovirus, bakteriellen künstlichen Chromosom oder künstlichen Hefe-Chromosom umfaßt sein. Beispielhafte Plasmidvektoren schließen die Vektoren pEG1068, pEG1077, pEG1093, pEG365, pEG378 und pEG381 ein.

[0032] Ein weiterer Aspekt der Erfindung beinhaltet die Verwendung der hierin beschriebenen Nucleinsäuresegmente bei der Herstellung von rekombinanten Polypeptidzusammensetzungen, bei der Erzeugung eines Vektors zur Verwendung bei der Herstellung einer transformierten Wirtszelle und bei der Erzeugung einer insektenresistenten transgenen Pflanze.

[0033] Wirtszellen stellen auch einen wichtigen Aspekt der Erfindung dar. Solche Wirtszellen umfassen im allgemeinen eines oder mehrere der Nucleinsäuresegmente, wie oben beschrieben. Bevorzugte Wirtszellen schließen Bakterienzellen wie *E. coli*-, *B. thuringiensis*-, *B. subtilis*-, *B. megaterium*- und *Pseudomonas sp.*-Zellen ein, wobei Zellen von *B. thuringiensis* EG11060, EG11062, EG11063, EG11071, EG11073, EG11074,

EG11090, EG11092, EG11735, EG11751, EG11768, NRRL B-21579, NRRL B-21580, NRRL B-21581, NRRL B-21635, NRRL B-21636 und NRRL B-21781 besonders bevorzugt werden. Bevorzugte Wirtszellen können auch eukaryontische Zellen, wie pflanzliche und tierische Zellen, einschließen. Bevorzugte pflanzliche Zellen schließen Zellen von Getreidepflanzen, Bäumen, Gemüse, Früchten, Beeren, Nüssen, Gräsern, Kakteen, Sukkulente und Zierpflanzen ein. wobei kommerzielle Nutzpflanzen wie Mais, Reis, Tabak, Kartoffel, Tomate, Flachs, Canola, Sonnenblume, Baumwolle, Weizen, Hafer, Gerste und Roggen besonders bevorzugt werden.

[0034] In einer Ausführungsform kann die Wirtszelle innerhalb einer transgenen Pflanze umfaßt sein oder kann bei der Herstellung einer transgenen Pflanze oder bei der Erzeugung von pluripotenten Pflanzenzellen verwendet werden. Alternativ kann die Wirtszelle bei der rekombinanten Expression eines Kristallproteins oder bei der Herstellung einer insektiziden Polypeptidformulierung, umfassend eines oder mehrere der hierin offenbarten Toxine, verwendet werden. Eine solche Zusammensetzung umfaßt vorzugsweise ein oder mehrere isolierte Polypeptide mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34. Eine solche Zusammensetzung findet besondere Anwendung bei der Abtötung einer Insektenzelle, bei der Herstellung einer insektiziden Formulierung und bei der Formulierung eines Pflanzenschutzsprays.

[0035] Die Erfindung sieht auch ein Verfahren zur Herstellung eines *B. thuringiensis*-Kristallproteins vor. Ein solches Verfahren beinhaltet im allgemeinen das Züchten einer Zelle von *B. thuringiensis* NRRL B-21579, NRRL B-21580, NRRL B-21581, NRRL B-21635, NRRL B-21636, NRRL B-21781, EG11768, EG11090, EG11063, EG11074, EG11735 oder EG11751 unter Bedingungen, welche wirksam sind, um ein *B. thuringiensis*-Kristallprotein herzustellen, und anschließend das Gewinnen des *B. thuringiensis*-Kristallproteins aus der Zelle. Solche Verfahren sind bei der rekombinanten Herstellung der hierin offenbarten Kristallproteine sehr nützlich.

[0036] Die Erfindung offenbart und beansprucht auch ein Verfahren zur Abtötung einer Insektenzelle. Das Verfahren beinhaltet im allgemeinen das Bereitstellen einer insektizid wirksamen Menge einer oder mehrerer der hierin offenbarten Insektizidzusammensetzungen in einer Insektenzelle. Solche Zellen können isolierte Zellen sein, oder können alternativ innerhalb eines Insekts selbst umfaßt sein. Typischerweise wird die Zusammensetzung entweder durch direktes Besprühen der Insekten oder alternativ durch Aufnahme der Zusammensetzung durch das Insekt, entweder direkt oder durch Aufnahme einer Pflanze, welche mit der Zusammensetzung bedeckt worden ist, oder alternativ durch Aufnahme eines Teils einer transgenen Pflanze, welche eine oder mehrere der Insektizidzusammensetzungen exprimiert, in dem Insekt bereitgestellt.

[0037] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein gereinigter Antikörper, der spezifisch an ein Polypeptid bindet, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 umfaßt.

[0038] Solche Antikörper können mit einem nachweisbaren Marker, welcher in einem Immunnachweis-Kit bereitgestellt wird. funktionell verbunden werden oder in einem Verfahren zum Nachweis eines insektiziden Polypeptids in einer biologischen Probe durch das Inkontaktbringen einer biologischen Probe, welche im Verdacht steht, das insektizide Polypeptid zu enthalten, mit einem solchen Antikörper unter Bedingungen, welche wirksam sind, um die Bildung von Immunkomplexen zu ermöglichen, und das anschließende Nachweisen der gebildeten Immunkomplexe verwendet werden.

[0039] Ein anderer wichtiger Aspekt der Erfindung betrifft eine transgene Pflanze, welche ein Transgen, codierend ein Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 umfaßt, in ihr Genom eingebaut hat. Vorzugsweise umfassen solche transgenen Pflanzen eine oder mehrere der Nucleinsäuresequenzen, welche in SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 und SEQ ID NO: 33 offenbart sind. Nachkommen und Samen solcher transgenen Pflanzen und deren Nachkommenschaft oder Abkömmlinge sind ebenfalls wichtige Aspekte der Erfindung, welche hierin später ausführlich beschrieben werden.

2.1 Kristallprotein-Transgene und transgene Pflanzen

[0040] Gemäß einem noch anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze bereit, welche ein Nucleinsäuresegment exprimiert, das die neuen chimären Kristallproteine der vorliegenden Erfindung codiert. Das Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen ist auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt. Im allgemeinen umfaßt das Verfahren die Transformation einer geeigneten Wirtszelle mit einem DNA-Segment, enthaltend einen Promotor, der funktionell verbunden ist mit einer codie-

renden Region, die ein chimäres B. thuringiensis-Cry1Ac-1F- oder Cry1Ab-1F-, Cry1Ac-1C- oder ein Cry1Ab-1Ac-1F-Kristallprotein codiert. Eine solche codierende Region ist im allgemeinen funktionell verbunden mit einer Transkriptionsterminationsregion, wodurch der Promotor fähig ist, die Transkription der codierenden Region in der Zelle zu steuern und daher die Zelle in die Lage versetzt, das rekombinante Protein in vivo herzustellen. In Fällen, wo es wünschenswert ist, die Menge eines bestimmten rekombinanten Kristallproteins, das in einer bestimmten transgenen Pflanze exprimiert wird, zu kontrollieren, zu regulieren oder zu verringern, sorgt die Erfindung alternativ für die Expression einer Kristallprotein-Antisense-mRNA. Die Verwendung einer Antisense-mRNA als ein Mittel zur Kontrolle oder Verringerung der Menge eines bestimmten Proteins von Interesse in einer Zelle ist auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt.

[0041] Ein anderer Aspekt der Erfindung umfaßt eine transgene Pflanze, welche ein Gen oder ein Gensegment exprimiert, das eine oder mehrere der hierin offenbarten neuen Polypeptidzusammensetzungen codiert. So wie hierin verwendet, soll der Begriff "transgene Pflanze" auf eine Pflanze verweisen, die DNA-Sequenzen eingebaut hat, einschließlich, aber nicht begrenzt auf, Gene, welche vielleicht normalerweise nicht anwesend sind; DNA-Sequenzen, die normalerweise nicht in RNA transkribiert oder in ein Protein translatiert ("exprimiert") werden; oder irgendwelche anderen Gene oder DNA-Sequenzen, welche in die nichttransformierte Pflanze eingeschleust werden sollen, wie Gene, die normalerweise in der nichttransformierten Pflanze anwesend sein können, aber welche entweder gentechnisch oder derart, daß sie eine veränderte Expression aufweisen, verändert werden sollen. Die Konstruktion und Expression von synthetischen B. thuringiensis-Genen in Pflanzen ist in den US-Patenten 5,00,365 und 5,380,831 ausführlich beschrieben worden.

[0042] Es wird erwartet, daß in einigen Fällen das Genom einer erfindungsgemäßen transgenen Pflanze durch den stabilen Einbau von einem oder mehreren cry1Ac-1F-, cry1Ab-1F-, cry1Ac-1C- oder cry1Ab-1Ac-1F-Transgenen, entweder nativ, synthetisch modifiziert oder weiter durch Mutagenese verändert, vergrößert worden ist. In einigen Fällen wird mehr als ein Transgen in das Genom der transformierten Wirtszelle eingebaut. Dies ist der Fall, wenn mehr als ein DNA-Segment, welches ein Kristallprotein codiert, in das Genom einer solchen Pflanze eingebaut wird. In bestimmten Situationen kann es wünschenswert sein, daß ein, zwei, drei, vier oder auch mehr B. thuringiensis-Kristallproteine (entweder nativ oder rekombinant verändert) in die transformierte transgene Pflanze eingebaut und stabil exprimiert wird.

[0043] Bevorzugte Gene, wie die in SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 und SEQ ID NO: 33 offenbarten, welche eingebaut werden können, schließen zum Beispiel eine bakterielle DNA-Sequenz, welche ein Kristallprotein codiert, und insbesondere eine oder mehrere der hierin beschriebenen DNA-Sequenzen, welche aus Bacillus sp. erhalten werden, ein. Besonders bevorzugte Nucleinsäuresequenzen sind solche, welche aus B. thuringiensis erhalten werden, oder irgendwelche derjenigen Sequenzen, welche gentechnisch verändert worden sind, um die Insektizidaktivität des Kristallproteins in einer solchen transformierten Wirtszelle zu verringern oder zu erhöhen.

[0044] Mittel zur Transformation einer Pflanzenzelle und die Herstellung einer transgenen Zelllinie sind auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt und werden hierin besprochen. Vektoren, Plasmide, Cosmide, künstliche Hefe-Chromosomen (YACs) und Nucleinsäuresegmente zur Verwendung bei der Transformation solcher Zellen umfassen natürlich im allgemeinen entweder die Operons, Gene oder die aus einem Gen abgeleiteten Sequenzen der vorliegenden Erfindung, welche entweder nativ oder synthetisch abgeleitet sind, und insbesondere solche, welche die offenbarten Kristallproteine codieren. Diese DNA-Konstrukte können ferner Strukturen wie Promotoren, Enhancer, Polylinker oder auch Gensequenzen, welche die Aktivität bei den einzelnen Genen von Interesse positiv oder negativ regulieren, falls gewünscht, einschließen. Das DNA-Segment oder das Gen kann entweder ein natives oder ein modifiziertes Kristallprotein codieren, das in den erhaltenen rekombinanten Zellen exprimiert wird und/oder das einen verbesserten Phänotyp auf die regenerierte Pflanze überträgt. Nucleinsäuresequenzen, welche zur Expression in Pflanzen optimiert wurden, sind in der Internat. Pat. Anmeldg. Veröffentl.-Nr. WO 93/07278 offenbart worden.

[0045] Solche transgenen Pflanzen können zur Erhöhung der Insektizidresistenz einer einkeimblättrigen oder zweikeimblättrigen Pflanze durch den Einbau eines transgenen DNA-Segments, codierend ein oder mehrere Cry1Ac-1F- und/oder Cry1Ab-1F- und/oder Cry1Ab-1Ac-1F-Kristallproteine, welche eine Spezifität mit breitem Spektrum gegenüber Insekten besitzen, wünschenswert sein. Besonders bevorzugte Pflanzen sind Getreidepflanzen, einschließlich, aber nicht begrenzt auf, Korn, Weizen, Hafer, Reis, Mais und Gerste; Baumwolle; Sojabohnen und andere Leguminosen; Bäume, einschließlich, aber nicht begrenzt auf, Zierpflanzen, Sträucher, Früchte und Nüsse; Gemüse; Gräser von Rasen und Weiden; Beeren; Zitrusfrüchte; und andere Nutzpflanzen von kommerziellem Interesse, wie Gartennutzpflanzen und/oder Zimmerpflanzen, Sukkulente, Kakteen und Blütenpflanzen.

[0046] Gemäß einem damit verbundenen Aspekt umfaßt die vorliegende Erfindung auch einen Samen, der durch die transformierte Pflanze produziert wird, einen Nachkommen aus einem solchen Samen und einen Samen, der durch den Nachkommen der ursprünglichen transgenen Pflanze, welche gemäß dem obigen Verfahren erzeugt wurde, produziert wird. Solche Nachkommen und Samen weisen ein stabiles Kristallprotein-Transgen auf, das stabil in das Genom hiervon eingebaut ist, und solche Nachkommenpflanzen erben die Merkmale, welche durch den Einbau eines stabilen Transgens übertragen werden, gemäß den Mendelschen Regeln. Alle solche transgenen Pflanzen, die transgene DNA-Segmente, codierend ein oder mehrere chimäre Kristallproteine oder Polypeptide, in ihr Genom eingebaut haben, sind Aspekte dieser Erfindung.

2.2 Kristallprotein-Screening und Immunnachweis-Kits

[0047] Die vorliegende Erfindung umfaßt Verfahren und Kits für das Screening von Proben, welche im Verdacht stehen, Kristallprotein-Polypeptide oder mit dem Kristallprotein verwandte Polypeptide oder solche Polypeptide herstellende Zellen zu enthalten. Beispielhafte Proteine schließen die in SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 und SEQ ID NO: 34 offenbarten ein. Der Kit kann ein Nucleinsäuresegment oder einen Antikörper der vorliegenden Erfindung enthalten. Der Kit kann Reagenzien zum Nachweis einer Wechselwirkung zwischen einer Probe und einer Nucleinsäure oder einem Antikörper der vorliegenden Erfindung enthalten. Das bereitgestellte Reagens kann radioaktiv, fluoreszenz- oder enzymmarkiert sein. Der Kit kann ein bekanntes radioaktiv markiertes Mittel enthalten, welches in der Lage ist, an eine Nucleinsäure oder einen Antikörper der vorliegenden Erfindung zu binden oder damit in Wechselwirkung zu treten.

[0048] Das Reagens des Kits kann als eine flüssige Lösung, gebunden an einen festen Träger oder als ein getrocknetes Pulver bereitgestellt werden. Vorzugsweise, wenn das Reagens in einer flüssigen Lösung bereitgestellt wird, ist die flüssige Lösung eine wäßrige Lösung. Vorzugsweise, wenn das Reagens gebunden an einen festen Träger bereitgestellt wird, kann der feste Träger ein chromatographisches Medium, eine Testplatte mit einer Vielzahl von Vertiefungen oder ein Objektträger sein. Wenn das Reagens als ein trocknes Pulver bereitgestellt wird, kann das Pulver durch die Zugabe eines geeigneten Lösungsmittels, das bereitgestellt werden kann, zubereitet werden.

[0049] In weiteren Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung Immunnachweisverfahren und damit verbundene Kits. Es wird angenommen, daß die erfindungsgemäßen Kristallproteine oder Peptide zum Nachweis von Antikörpern, welche eine Reaktivität damit zeigen, verwendet werden können, oder alternativ können erfindungsgemäß hergestellte Antikörper verwendet werden, um Kristallproteine oder Peptide, enthaltend ein Kristallprotein-Epitop, nachzuweisen. Im allgemeinen schließen diese Verfahren zuerst den Erhalt einer Probe, welche im Verdacht steht, ein(en) solches(n) Protein, Peptid oder Antikörper zu enthalten, das Inkontaktbringen der Probe mit einem erfindungsgemäßen Antikörper oder Peptid, je nach Sachlage, unter Bedingungen, welche wirksam sind, um die Bildung eines Immunkomplexes zu ermöglichen, und anschließend das Nachweisen der Anwesenheit des Immunkomplexes ein.

[0050] Im allgemeinen ist der Nachweis einer Immunkomplexbildung auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt und kann durch die Anwendung von zahlreichen Ansätzen erreicht werden. Zum Beispiel schließt die vorliegende Erfindung die Anwendung von ELISA-, RIA-, Immunoblot (z. B. Dot-Blot)- oder indirekten Immunfluoreszenz-Techniken und dergleichen ein. Im allgemeinen wird die Immunkomplexbildung durch die Verwendung eines Markers, wie eines radioaktiv markierten Stoffes oder eines Enzymmarkers (wie alkalische Phosphatase, Meerrettichperoxidase und dergleichen), nachgewiesen. Natürlich können durch die Verwendung eines zweiten Bindungsliganden wie eines zweiten Antikörpers oder einer Biotin/Avidin-Liganden-Bindungsanordnung, wie auf dem Fachgebiet bekannt ist, weitere Vorteile erhalten werden.

[0051] Für Testzwecke wird vorgeschlagen, daß praktisch jede Probe, welche im Verdacht steht, entweder ein Kristallprotein oder Peptid oder ein mit dem Kristallprotein verwandtes Peptid oder einen Antikörper zu enthalten, welches (welcher) nachgewiesen werden soll, je nach Sachlage, verwendet werden kann. Es wird erwartet, daß solche Ausführungsformen bei der Titration von Antigen- oder Antikörperproben, bei der Selektion von Hybridomen und dergleichen Anwendung finden können. In damit verbundenen Ausführungsformen schließt die vorliegende Erfindung die Herstellung von Kits ein, welche verwendet werden können, um die Anwesenheit von Kristallproteinen oder verwandten Peptiden und/oder Antikörpern in einer Probe nachzuweisen. Die Proben können Zellen, Zellüberstände, Zellsuspensionen, Zellextrakte, Enzymfraktionen, Proteinextrakte oder andere zellfreie Zusammensetzungen, welche im Verdacht stehen, Kristallproteine oder Peptide zu enthalten, einschließen. Im allgemeinen enthalten die erfindungsgemäßen Kits ein geeignetes Kristallprotein, Peptid oder einen Antikörper, welcher gegen ein solches Protein oder Peptid gerichtet ist, zusammen mit einem

Immunnachweisreagens und einen Behälter für den Antikörper oder das Antigen oder das Reagens. Das Immunnachweisreagens umfaßt typischerweise einen Marker in Assoziation mit dem Antikörper oder dem Antigen oder in Assoziation mit einem zweiten Bindungsliganden. Beispielhafte Liganden können einen sekundären Antikörper, welcher gegen den ersten Antikörper oder ein Antigen gerichtet ist, oder einen Biotin- oder Avidin (oder Streptavidin)-Liganden mit einem assoziierten Marker einschließen. Natürlich, wie oben angemerkt, ist eine Reihe von beispielhaften Markern auf dem Fachgebiet bekannt, und alle solche Marker können in Verbindung mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0052] Der Behälter schließt im allgemeinen ein Fläschchen ein, in das der Antikörper, das Antigen oder das Nachweisreagens eingebracht und vorzugsweise geeignet aliquotiert werden kann. Die erfindungsgemäßen Kits schließen auch typischerweise ein Mittel zur Aufnahme der Antikörper-, Antigen- und Reagens-Behälter auf engem Raum für den Verkauf über den Handel ein. Solche Behälter können Injektions- oder blasgeformte Kunststoffbehälter, in denen die gewünschten Fläschchen festgehalten werden, einschließen.

2.3 ELISAs und Immunpräzipitation

[0053] ELISAs können in Verbindung mit der Erfindung verwendet werden. In einem ELISA-Assay werden Proteine oder Peptide, welche Kristallprotein-Antigensequenzen einschließen, auf einer ausgewählten Oberfläche, vorzugsweise einer Oberfläche, welche eine Proteinaffinität zeigt, wie die Vertiefungen einer Polystyrol-Mikrotiterplatte, immobilisiert. Nach dem Waschen, um unvollständig adsorbiertes Material zu entfernen, ist es wünschenswert, die Vertiefungen der Testplatte mit einem unspezifischen Protein, das bekanntermaßen im Hinblick auf das Test-Antiserum, wie Rinderserumalbumin (BSA), Casein oder Lösungen von Milchpulver, antigen-neutral ist, zu beschichten bzw. dieses daran zu binden. Dies ermöglicht die Blockierung unspezifischer Adsorptionsstellen auf der Immobilisierungsoberfläche und verringert auf diese Weise den Hintergrund, der durch eine unspezifische Bindung des Antiserums an die Oberfläche verursacht wird.

[0054] Nach der Bindung eines antigenen Materials an die Vertiefung, der Beschichtung mit einem reaktionsunfähigen Material zur Verringerung des Hintergrunds und dem Waschen, um das ungebundene Material zu entfernen, wird die Immobilisierungsoberfläche mit dem Antiserum oder dem klinischen oder biologischen Extrakt, welches(r) getestet werden soll, in einer Weise, welche die Immunkomplex (Antigen/Antikörper)-Bildung begünstigt, in Kontakt gebracht. Solche Bedingungen schließen vorzugsweise das Verdünnen des Antiserums mit Verdünnungsmitteln wie BSA, Rindergammaglobulin (BGG) und phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)/Tween® ein. Diese zugesetzten Mittel neigen auch dazu, die Verringerung des unspezifischen Hintergrunds zu begünstigen. Das überschichtete Antiserum läßt man dann für etwa 2 bis etwa 4 Stunden bei Temperaturen vorzugsweise in der Größenordnung von etwa 25°C bis etwa 27°C inkubieren. Nach der Inkubation wird die mit dem Antiserum in Kontakt gebrachte Oberfläche gewaschen, um das nicht in einem Immunkomplex gebundene Material zu entfernen. Eine bevorzugte Waschprozedur schließt das Waschen mit einer Lösung wie PBS/Tween® oder Boratpuffer ein.

[0055] Nach Bildung der spezifischen Immunkomplexe zwischen der Testprobe und dem gebundenen Antigen und dem anschließenden Waschen kann das Vorhandensein und auch die Menge einer Immunkomplexbildung bestimmt werden, indem die Immunkomplexe einem zweiten Antikörper mit einer Spezifität für den ersten Antikörper ausgesetzt werden. Um ein Nachweismittel bereitzustellen, weist der zweite Antikörper vorzugsweise ein assoziiertes Enzym auf, das bei der Inkubation mit einem geeigneten chromogenen Substrat eine Farbentwicklung hervorruft. So kann es zum Beispiel wünschenswert sein, die Oberfläche, an welche das Antiserum gebunden ist, mit einem Urease- oder Peroxidase-konjugierten anti-Mensch-IgG für einen Zeitraum und unter Bedingungen, welche die Entwicklung einer Immunkomplexbildung begünstigen (z. B. eine Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer PBS enthaltenden Lösung, wie PBS/Tween®), in Kontakt zu bringen und zu inkubieren.

[0056] Nach der Inkubation mit dem zweiten enzymmarkierten Antikörper und einem darauffolgenden Waschschritt zur Entfernung des ungebundenen Materials wird die Menge des Markers durch Inkubation mit einem chromogenen Substrat wie Harnstoff und Bromcresolpurpur oder 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) und H₂O₂, im Falle von Peroxidase als Enzymmarker, quantitativ bestimmt. Die Quantifizierung wird dann durch Messen des Grads der Farbentwicklung, z. B. unter Verwendung eines Spektrophotometers im sichtbaren Spektrum, erreicht.

[0057] Die anti-Kristallprotein-Antikörper der vorliegenden Erfindung sind für die Isolierung von anderen Kristallprotein-Antigenen mittels Immunpräzipitation besonders nützlich. Die Immunpräzipitation beinhaltet die Abtrennung der Zielantigenkomponente aus einer komplexen Mischung, und wird verwendet, um kleinste Prote-

inmengen zu isolieren oder zu unterscheiden. Für die Isolierung von Membranproteinen müssen die Zellen in Detergenzmizellen solubilisiert werden. Nichtionische Salze werden bevorzugt, da andere Mittel wie Gallensalze bei einem sauren pH oder in Gegenwart von zweiwertigen Kationen ausfallen.

[0058] In einer anderen Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Antikörper nützlich, um zwei Antigene in enge Nachbarschaft zueinander zu bringen. Dies ist besonders nützlich, um die örtliche Konzentration von Antigenen, z. B. Enzym-Substrat-Paaren, zu erhöhen.

2.4 Western-Blots

[0059] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen finden weitreichende Anwendung bei der Immunoblot- oder Western-Blot-Analyse. Die anti-Peptid-Antikörper können als primäre Reagenzien mit einer hohen Affinität zur Identifizierung von Proteinen, immobilisiert an eine feste Trägermatrix, wie Nitrocellulose, Nylon oder Kombinationen hiervon, verwendet werden. In Verbindung mit einer Immunpräzipitation, gefolgt durch eine Gelelektrophorese, können sie als ein Einzelreaktionsschritt-Reagens zur Verwendung beim Nachweis von Antigenen, wobei sekundäre Reagenzien, die beim Nachweis des Antigens verwendet werden, einen unerwünschten Hintergrund verursachen, verwendet werden. Dies ist besonders nützlich, wenn die untersuchten Antigene Immunglobuline sind (ausgenommen bei der Verwendung von bakteriellen Zellwandkomponenten, welche Immunglobuline binden), die untersuchten Antigene mit dem Nachweismittel kreuzreaktiv sind oder diese bei dem gleichen relativen Molekulargewicht wie ein kreuzreaktives Signal wandern.

[0060] Immunologische Nachweisverfahren zur Verwendung in Verbindung mit einem Western-Blot-Verfahren, einschließlich enzym-, radioaktiv oder fluoreszenzmarkierte, sekundäre Antikörper gegen die Toxineinheit, werden in dieser Hinsicht als besonders nützlich angesehen.

2.5 Epitop-Kernsequenzen

[0061] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Protein- oder Peptidzusammensetzungen, welche frei an ganzen Zellen und anderen Peptiden sind und ein gereinigtes Protein oder Peptid umfassend, das ein Epitop einschließt, welches mit einem oder mehreren anti-Kristallprotein-Antikörpern immunologisch kreuzreaktiv ist. Die Erfindung betrifft insbesondere Epitop-Kernsequenzen, welche aus Cry-Proteinen oder -Peptiden abgeleitet sind.

[0062] So wie hierin verwendet, soll der Begriff "ein oder mehrere Epitope einschließend, welche mit einem oder mehreren anti-Kristallprotein-Antikörpern immunologisch kreuzreaktiv sind" auf ein Peptid- oder Protein-Antigen verweisen, das eine Primär-, Sekundär- oder Tertiärstruktur besitzt, die Ähnlichkeit hat mit einem Epitop, das innerhalb eines Kristallproteins oder Polypeptids lokalisiert ist. Der Grad der Ähnlichkeit ist im allgemeinen derart, daß monoclonale oder polyclonale Antikörper, welche gegen das Kristallprotein oder Polypeptid gerichtet sind, auch an das kreuzreaktive Peptid- oder Protein-Antigen binden, damit reagieren oder es in anderer Weise erkennen. Verschiedene Immunoassay-Methoden können in Verbindung mit solchen Antikörpern angewendet werden, wie zum Beispiel Western-Blot-, ELISA- oder RIA-Verfahren und dergleichen, welche den Fachleuten alle bekannt sind.

[0063] Die Identifizierung von Cry-immundominanten Epitopen und/oder deren funktionellen Gegenstücken, welche zur Verwendung in Impfstoffen geeignet sind, ist eine relativ einfache Angelegenheit. Zum Beispiel kann man die Verfahren von Hopp anwenden, so wie gelehrt in US-Patent 4,554,101, hierin unter Bezugnahme eingeschlossen, welches die Identifizierung und Herstellung von Epitopen aus Aminosäuresequenzen auf der Basis der Hydrophilie lehrt. Die in mehreren anderen Veröffentlichungen beschriebenen Verfahren und darauf basierende Software-Programme können auch angewendet werden, um Epitop-Kernsequenzen zu identifizieren (vgl. zum Beispiel Jameson und Wolf, 1988; Wolf et al., 1988; US-Patent 4,554,101). Die Aminosäuresequenz dieser "Epitop-Kernsequenzen" kann dann ohne weiteres, entweder durch die Anwendung der Peptid-synthese- oder der Rekombinationstechnik, in Peptide eingeschlossen werden.

[0064] Bevorzugte Peptide zur Verwendung im Einklang mit der vorliegenden Erfindung besitzen im allgemeinen eine Länge in der Größenordnung von etwa 8 bis etwa 20 Aminosäuren, und mehr bevorzugt eine Länge von etwa 8 bis etwa 15 Aminosäuren. Es wird angenommen, daß kürzere antigene Peptide, welche aus Kristallproteinen abgeleitet sind, unter bestimmten Umständen, zum Beispiel bei der Herstellung von immunologischen Nachweistests, Vorteile vorsehen. Beispielhafte Vorteile schließen die Einfachheit der Herstellung und Reinigung, die relativ geringen Kosten und die verbesserte Reproduzierbarkeit der Produktion und eine vorteilhafte Bioverteilung ein.

[0065] Man nimmt an, daß die besonderen Vorteile der vorliegenden Erfindung durch die Herstellung von synthetischen Peptiden, welche modifizierte und/oder verlängerte epitopische/immunogene Kernsequenzen einschließen, wobei ein "universelles" Epitopeptid erhalten wird, das gegen Kristallproteine und insbesondere Cry- und mit Cry verwandte Sequenzen gerichtet ist, verwirklicht werden können. Diese Epitop-Kernsequenzen werden unter bestimmten Aspekten hierin als hydrophile Regionen des bestimmten Polypeptid-Antigens identifiziert. Man nimmt an, daß diese Regionen denjenigen entsprechen, welche höchstwahrscheinlich die T-Zell- oder B-Zellstimulierung fördern und daher eine spezifische Antikörperproduktion hervorrufen.

[0066] Eine Epitop-Kernsequenz, so wie hierin verwendet, ist ein relativ kurzer Bereich von Aminosäuren, der zu Antigen-Bindungsstellen auf den hierin offenbarten Antikörpern, die gegen ein Kristallprotein gerichtet sind, "komplementär" ist und daher daran bindet. Zusätzlich oder alternativ ist eine Epitop-Kernsequenz eine Sequenz, welche Antikörper hervorrufen, die mit Antikörpern kreuzreaktiv sind, welche gegen die erfindungsgemäßen Peptidzusammensetzungen gerichtet sind. Es ist selbstverständlich, daß in Zusammenhang mit der vorliegenden Offenbarung der Begriff "komplementär" auf Aminosäuren oder Peptide verweist, welche eine Anziehungskraft aufeinander ausüben. Folglich können bestimmte erfindungsgemäße Epitop-Kernsequenzen im Hinblick auf ihre Fähigkeit, um die Bindung des gewünschten Protein-Antigens mit dem entsprechenden, gegen das Protein gerichtete Antiserum zu konkurrieren oder es vielleicht zu verdrängen, funktionell definiert werden.

[0067] Man nimmt im allgemeinen an, daß die Größe des Polypeptid-Antigens nicht besonders wichtig ist, so lange es mindestens groß genug ist, um die identifizierte(n) Kernsequenz oder -sequenzen zu tragen. Die kleinste nützliche Kernsequenz, welche durch die vorliegende Offenbarung angenommen wird, würde im allgemeinen eine Länge in der Größenordnung von etwa 8 Aminosäuren besitzen, wobei Sequenzen in der Größenordnung von 10 bis 20 Aminosäuren mehr bevorzugt werden. Folglich entspricht die Größe im allgemeinen den kleinsten Peptid-Antigenen, welche im Einklang mit der Erfindung hergestellt werden. Jedoch kann die Größe des Antigens größer sein, falls gewünscht, so lange es eine wesentliche Epitop-Kernsequenz enthält.

[0068] Die Identifizierung von Epitop-Kernsequenzen ist den Fachleuten bekannt, zum Beispiel wie in US-Patent 4,554,101 beschrieben, hierin unter Bezugnahme eingeschlossen, welches die Identifizierung und Herstellung von Epitopen aus Aminosäuresequenzen auf der Basis einer Hydrophilie lehrt. Außerdem sind zahlreiche Computerprogramme zur Verwendung bei der Vorhersage von antigenen Teilen von Proteinen verfügbar (vgl. z. B. Jameson und Wolf, 1988; Wolf et al., 1988). Computergestützte Peptidsequenzanalyseprogramme (z. B. DNAS[®] Software, DNAS[®], Inc., Madison, WI) können bei der Konstruktion von synthetischen Peptiden im Einklang mit der vorliegenden Offenbarung auch nützlich sein.

[0069] Synthesen von Epitopsequenzen oder Peptiden, welche ein antigenes Epitop in ihrer Sequenz einschließen, werden ohne weiteres mittels herkömmlicher Synthesetechniken wie dem Festphasenverfahren durchgeführt (z. B. unter Verwendung von handelsüblichen Peptid-Synthesegeräten, wie einem Applied Biosystems Modell 430A Peptid-Synthesegerät). Die auf diese Weise synthetisierten Peptid-Antigene können dann in vorbestimmten Mengen aliquotiert und in herkömmlicher Art und Weise, wie in wäßrigen Lösungen oder auch mehr bevorzugt in einem pulverförmigen oder gefriergetrockneten Zustand, bis zur Verwendung gelagert werden.

[0070] Im allgemeinen können Peptide aufgrund ihrer relativen Stabilität in wäßrigen Lösungen ohne weiteres für sehr lange Zeiträume, falls gewünscht, z. B. bis zu sechs Monate oder mehr, in praktisch jeder wäßrigen Lösung ohne einen nennenswerten Abbau oder Verlust der antigenen Aktivität gelagert werden. Falls jedoch eine längere Lagerung in einem wäßrigen Zustand erwogen wird, ist es im allgemeinen wünschenswert, Mittel einzuschließen, einschließlich Puffer wie Tris- oder Phosphatpuffer, um einen pH von etwa 7,0 bis etwa 7,5 aufrechtzuerhalten. Ferner kann es wünschenswert sein, Mittel einzuschließen, welche das Wachstum von Mikroorganismen hemmen, wie Natriumazid oder Merthiolat. Für eine längere Lagerung in einem wäßrigen Zustand es wünschenswert, die Lösungen bei etwa 4°C oder mehr bevorzugt eingefroren zu lagern. Falls die Peptide in einem gefriergetrockneten oder pulverförmigen Zustand aufbewahrt werden, können sie natürlich praktisch unbegrenzt gelagert werden, z. B. in abgemessenen Aliquots, welche mit einer vorbestimmten Menge an Wasser (vorzugsweise destilliert) oder Puffer vor der Verwendung rehydratisiert werden können.

2.6 Nucleinsäuresegmente, codierend Kristallprotein-Chimäre

[0071] Die vorliegende Erfindung betrifft auch DNA-Segmente, sowohl native, synthetische als auch durch Mutagenese veränderte, die aus praktisch irgendeiner Quelle, welche frei an genomischer Gesamt-DNA ist und welche die hierin offenbarten neuen chimären Peptide codiert, synthetisiert oder isoliert werden können.

DNA-Segmente, welche diese Peptidspezies codieren, können nachweislich Proteine, Polypeptide. Untereinheiten, funktionelle Domänen und dergleichen von mit Kristallproteinen verwandten oder anderen nicht verwandten Genprodukten codieren. Zusätzlich können diese DNA-Segmente unter Anwendung von Verfahren, welche den Fachleuten hinreichend bekannt sind, vollständig in vitro synthetisiert werden.

[0072] So wie hierin verwendet, verweist der Begriff "DNA-Segment" auf ein DNA-Molekül, das aus der genomischen Gesamt-DNA einer bestimmten Spezies isoliert worden ist. Daher verweist ein DNA-Segment, codierend ein Kristallprotein oder Peptid, auf ein DNA-Segment, das Sequenzen enthält, welche ein Kristallprotein codieren, welches aber isoliert ist von oder herauspräpariert ist aus der genomischen Gesamt-DNA der Spezies, aus welcher das DNA-Segment erhalten wird, was im vorliegenden Falle das Genom der Gram-positiven Bakteriengattung *Bacillus* und insbesondere die als *B. thuringiensis* bekannte *Bacillus*-Spezies ist. Im Begriff "DNA-Segment" eingeschlossen sind DNA-Segmente und kleinere Fragmente solcher Segmente und auch rekombinante Vektoren, einschließlich zum Beispiel Plasmide, Cosmide, Phagemide, Phagen, Viren und dergleichen.

[0073] In ähnlicher Weise verweist ein DNA-Segment, umfassend ein isoliertes oder gereinigtes Gen, das ein Kristallprotein codiert, auf ein DNA-Segment, welches zusätzlich zu den Sequenzen, welche das Peptid codieren, bestimmte andere Elemente, wie regulatorische Sequenzen, welche im wesentlichen von anderen in der Natur vorkommenden Genen oder Sequenzen, welche ein Protein codieren, isoliert sind, einschließen kann. In dieser Hinsicht wird der Begriff "Gene" der Einfachheit halber verwendet, um auf eine funktionelle Einheit zu verweisen, welche ein Protein, Polypeptid oder Peptid codiert. Wie den Fachleuten bekannt ist, schließt dieser funktionelle Begriff sowohl genomische Sequenzen, Operon-Sequenzen als auch kleinere, konstruierte Gen-segmente, die Proteine, Polypeptide oder Peptide exprimieren oder zur Expression hiervon angepaßt sein können, ein.

[0074] "Im wesentlichen isoliert von anderen codierenden Sequenzen" bedeutet, daß das Gen von Interesse, in diesem Fall ein Gen, das ein bakterielles Kristallprotein codiert, den wesentlichen Teil der codierenden Region des DNA-Segments bildet, und daß das DNA-Segment keine großen Teile einer in der Natur vorkommenden codierenden DNA, wie große Chromosomenfragmente oder andere funktionelle Gene oder ein Operon codierende Regionen, enthält. Natürlich bezieht sich dies auf das DNA-Segment, so wie es ursprünglich isoliert wurde, und schließt keine Gene, rekombinanten Gene, synthetischen Linker oder codierenden Regionen ein, welche später durch die Hand des Menschen an das Segment angehängt werden.

[0075] In bestimmten Ausführungsformen betrifft die Erfindung isolierte DNA-Segmente und rekombinante Vektoren, welche DNA-Sequenzen einschließen, die eine Cry-Peptidspezies codieren, welche innerhalb ihrer Aminosäuresequenz eine Aminosäuresequenz einschließt, wie sie im wesentlichen in SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 dargestellt ist.

[0076] Der Begriff "eine Sequenz, im wesentlichen wie in SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 dargestellt" bedeutet, daß die Sequenz im wesentlichen einem Teil der Sequenz von entweder SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 entspricht, und relativ wenige Aminosäuren aufweist, welche nicht identisch sind zu den Aminosäuren irgendeiner dieser Sequenzen oder ein biologisch funktionelles Gegenstück hiervon sind. Der Begriff "biologisch funktionelles Gegenstück" ist auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt und wird hierin weiterhin ausführlich definiert (vgl. z. B. 'Veranschaulichende Ausführungsformen'). Demgemäß sind Sequenzen, welche zwischen etwa 70 und etwa 80% oder mehr bevorzugt zwischen etwa 81 und etwa 90% oder noch mehr bevorzugt zwischen etwa 91 und etwa 99% Aminosäuresequenzübereinstimmung oder funktionelle Äquivalenz zu den Aminosäuren von SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 aufweisen, Sequenzen, welche "im wesentlichen wie in SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 dargestellt sind".

[0077] Es ist auch selbstverständlich, daß Aminosäure- und Nucleinsäuresequenzen zusätzliche Reste, wie zusätzliche N- oder C-terminale Aminosäuren oder 5'- oder 3'-Sequenzen, einschließen können und immer noch im wesentlichen sind, wie in einer der hierin offenbarten Sequenzen dargestellt, so lange die Sequenz die oben dargelegten Kriterien, einschließlich der Aufrechterhaltung der biologischen Aktivität des Proteins, wenn die Expression des Proteins von Interesse ist, erfüllt. Die Addition von terminalen Sequenzen tritt besonders für Nucleinsäuresequenzen zu, welche zum Beispiel verschiedene nichtcodierende Sequenzen einschließen können, welche entweder die 5'- oder 3'-Teile der codierenden Region umgeben, oder welche verschiedene interne Sequenzen. d. h. Introns, einschließen können, die bekanntermaßen in Genen vorkommen.

[0078] Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuresegmente können unabhängig von der Länge der codierenden Sequenz selbst mit anderen DNA-Sequenzen wie Promotoren, Polyadenylierungssignalen, zusätzlichen Restriktionsenzymstellen, multiplen Clonierungsstellen, anderen codierenden Segmenten und dergleichen kombiniert werden, so daß ihre Gesamtlänge erheblich variieren kann. Es wird daher erwartet, daß ein Nucleinsäurefragment von praktisch jeder Länge verwendet werden kann, wobei die Gesamtlänge vorzugsweise durch die Einfachheit der Herstellung und die Verwendung in dem beabsichtigten DNA-Rekombinationsprotokoll begrenzt wird. Zum Beispiel können Nucleinsäurefragmente hergestellt werden, die einen kurzen zusammenhängenden Bereich einschließen, welcher eine der in SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 offenbarten Peptidsequenzen codiert, oder die identisch sind mit oder komplementär sind zu DNA-Sequenzen, welche irgendeines der in SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 offenbarten Peptide codieren, und besonders solche DNA-Segmente, welche in SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 33 offenbart sind. Zum Beispiel werden DNA-Sequenzen mit einer Länge von zum Beispiel etwa 14 Nucleotiden und solche mit einer Länge von bis zu etwa 10.000, etwa 5.000, etwa 3.000, etwa 2.000, etwa 1.000, etwa 500, etwa 200, etwa 100, etwa 50 und etwa 14 Basenpaaren (einschließlich alle dazwischenliegenden Längen) ebenfalls als nützlich angesehen.

[0079] Es ist ohne weiteres verständlich, daß "dazwischenliegende Längen" in diesem Zusammenhang irgendeine Länge zwischen den angegebenen Bereichen bedeutet, wie 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc.; 21, 22, 23, etc.; 30, 31, 32, etc.; 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; einschließlich aller ganzen Zahlen im Bereich von 200–500; 500–1.000; 1.000–2.000; 2.000–3.000; 3.000–5.000; und bis zu und einschließlich Sequenzen von etwa 10.000 Nucleotiden, und dergleichen.

[0080] Es ist auch selbstverständlich, daß diese Erfindung nicht auf die einzelnen Nucleinsäuresequenzen, welche die erfindungsgemäßen Peptide codieren oder welche die Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 codieren, einschließlich solcher DNA-Sequenzen, welche insbesondere in SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 33 offenbart sind, begrenzt ist. Rekombinante Vektoren und isolierte DNA-Segmente können daher alternativ die das Peptid codierenden Regionen selbst oder codierende Regionen, welche ausgewählte Veränderungen oder Modifikationen in der wesentlichen codierenden Region tragen, einschließen, oder sie können größere Polypeptide codieren, welche dennoch die das Peptid codierenden Regionen einschließen, oder sie können biologisch funktionell äquivalente Proteine oder Peptide codieren, welche variante Aminosäuresequenzen aufweisen.

[0081] Die erfindungsgemäßen DNA-Segmente umfassen biologisch funktionell äquivalente Peptide. Solche Sequenzen können als Folge einer Codon-Redundanz und funktionellen Äquivalenz, welche bekanntermaßen natürlicherweise in Nucleinsäuresequenzen und den so codierten Proteinen auftreten, entstehen. Alternativ können funktionell äquivalente Proteine oder Peptide unter Anwendung der DNA-Rekombinationstechnik erzeugt werden, wobei Veränderungen in der Proteinstruktur unter Berücksichtigung der Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäuren eingeführt werden können. Austausch, welche durch den Menschen beabsichtigt werden, können durch die Anwendung von Techniken der ortsspezifischen Mutagenese eingeführt werden, z. B. um Verbesserungen der Antigenität des Proteins herbeizuführen oder um Mutanten zu testen, um die Aktivität auf molekularer Ebene zu untersuchen.

[0082] Falls gewünscht, kann man auch Fusionsproteine und -peptide herstellen, worin z. B. die das Peptid codierenden Regionen innerhalb derselben Expressionseinheit mit anderen Proteinen oder Peptiden mit gewünschten Funktionen gruppiert sind, wie für Reinigungs- oder Immunnachweiszwecke (z. B. Proteine, welche durch Affinitätschromatographie gereinigt werden können, bzw. enzymmarkierte codierende Regionen).

[0083] Rekombinante Vektoren stellen weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung dar. Besonders nützliche Vektoren schließen solche Vektoren ein, worin der codierende Teil des DNA-Segments, ob er ein Protein vollständiger Länge oder ein kleineres Peptid codiert, sich unter der Kontrolle eines Promotors befindet. Der Promotor kann in Form des Promotors vorliegen, welcher natürlicherweise mit einem Gen assoziiert ist, das die erfindungsgemäßen Peptide codiert, so wie er durch Isolierung der 5'-nichtcodierenden Sequenzen, welche stromaufwärts des codierenden Segments oder Exons angeordnet sind, zum Beispiel unter Anwendung der rekombinanten Clonierungs- und/oder PCRTM-Technik in Verbindung mit den hierin offenbarten Zusammensetzungen erhalten werden kann.

2.7 Rekombinante Vektoren und Proteinexpression

[0084] In anderen Ausführungsformen wird erwartet, daß bestimmte Vorteile dadurch erhalten werden, daß das codierende DNA-Segment unter die Kontrolle eines rekombinanten oder heterologen Promotors gebracht wird. So wie hierin verwendet, soll ein rekombinanter oder heterologer Promotor auf einen Promotor verweisen, welcher normalerweise nicht mit einem DNA-Segment, das ein Kristallprotein oder Peptid codiert, in der natürlichen Umgebung hiervon assoziiert ist. Solche Promotoren können Promotoren, welche normalerweise mit anderen Genen assoziiert sind, und/oder Promotoren, welche aus einer bakteriellen, viralen, eukaryontischen oder pflanzlichen Zelle isoliert sind, einschließen. Natürlich ist es wichtig, einen Promotor zu verwenden, welcher die Expression des DNA-Segments in dem für die Expression ausgewählten Zelltyp, Organismus oder auch Tier wirksam steuert. Die Verwendung von Promotor- und Zelltyp-Kombinationen zur Proteinexpression ist den Fachleuten auf dem Gebiet der Molekularbiologie im allgemeinen bekannt; vgl. Sambrook et al., 1989. Die verwendeten Promotoren können konstitutiv oder induzierbar sein und können unter den geeigneten Bedingungen verwendet werden, um eine hohe Expressionsrate des eingeschleusten DNA-Segments hervorzurufen, was bei der großtechnischen Herstellung von rekombinanten Proteinen oder Peptiden vorteilhaft ist. Geeignete Promotorsysteme, die zur Verwendung bei einer hohen Expressionsrate in Betracht gezogen werden, schließen, aber sind nicht begrenzt auf, das Pichia-Expressionsvektorsystem (Pharmacia LKB Biotechnology) ein.

[0085] In Verbindung mit Expressions-Ausführungsformen zur Herstellung von rekombinanten Proteinen und Peptiden wird erwartet, daß überwiegend längere DNA-Segmente verwendet werden, wobei DNA-Segmente, welche die gesamte Peptidsequenz codieren, am meisten bevorzugt werden. Jedoch ist erkennbar, daß die Verwendung von kürzeren DNA-Segmenten, um die Expression von Kristallpeptiden oder Epitop-Kernregionen zu steuern, so wie sie bei der Erzeugung von anti-Kristallprotein-Antikörpern verwendet werden können, auch zum Schutzzumfang der Erfindung gehört. DNA-Segmente, welche Peptid-Antigene mit einer Länge von etwa 8 bis etwa 50 Aminosäuren oder mehr bevorzugt mit einer Länge von etwa 8 bis etwa 30 Aminosäuren oder noch mehr bevorzugt mit einer Länge von etwa 8 bis etwa 20 Aminosäuren codieren, werden als besonders nützlich angesehen. Solche Peptid-Epitope können Aminosäuresequenzen sein, welche zusammenhängende Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 umfassen; oder irgendein Peptid-Epitop, welches durch die Nucleinsäuresequenzen von SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 33 codiert wird.

[0086] Verfahren zur rekombinanten Expression von Kristallproteinen und Vektoren, welche bei der Expression von DNA-Konstrukten, die Kristallproteine codieren, nützlich sind, sind in der Internat. Pat. Anmeldg. Veröffentl.-Nr. WO 95/02058 offenbart.

2.8 Rekombinante Wirtszellen

[0087] Die rekombinanten Wirtszellen der vorliegenden Erfindung, welche gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrags hinterlegt worden sind, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2
Bei der NRRL gemäß dem Budapester Vertrag hinterlegte Stämme

Stamm	PLASMID	Hinterlegungsnummer	Hinterlegungsdatum
EG 11063	pEG1068	NRRL B-21579	26. Juni 1996
EG11074	pEG1077	NRRL B-21580	26. Juni 1996
EG11091	pEG1092	NRRL B-21780	21. Mai 1997
EG11092	pEG1093	NRRL B-21635	14. November 1996
EG11735	pEG365	NRRL B-21581	26. Juni 1996
EG11751	pEG378	NRRL B-21636	14. November 1996
EG11768	pEG381	NRRL B-21781	21. Mai 1997

2.9 DNA-Segmente als Hybridisierungs sonden und Primer

[0088] Zusätzlich zu ihrer Verwendung bei der Steuerung der Expression von Kristallproteinen oder Peptiden der vorliegenden Erfindung weisen die hierin eingeschlossenen Nucleinsäuresequenzen auch eine Vielzahl von anderen Verwendungen auf. Zum Beispiel sind sie auch als Sonden oder Primer in Nucleinsäurehybridisierungs-Ausführungsformen von Nutzen. Daher wird erwartet, daß Nucleinsäuresegmente, umfassend eine Sequenzregion, die aus einer langen zusammenhängenden Sequenz mit einer Länge von mindestens 14 Nucleotiden besteht, welche die gleiche Sequenz aufweist wie oder komplementär ist zu ein(em) langes(n) zusammenhängendes(n) DNA-Segment von 14 Nucleotiden von SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 33, besonders nützlich sind. Nucleinsäuresegmente, welche eine zusammenhängende Sequenz von mindestens 6 Aminosäuren von SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 codieren, werden ebenfalls bevorzugt. Längere zusammenhängende, identische oder komplementäre Sequenzen, z. B. solche von etwa 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1.000, 2.000, 5.000, 10.000 etc. (einschließlich aller dazwischenliegenden Längen und bis zu und einschließlich Sequenzen von vollständiger Länge), werden in bestimmten Ausführungsformen ebenfalls verwendet.

[0089] Die Fähigkeit solcher Nucleinsäuresonden, mit Sequenzen, welche ein Kristallprotein codieren, spezifisch zu hybridisieren, ermöglicht deren Verwendung beim Nachweis der Anwesenheit von komplementären Sequenzen in einer bestimmten Probe. Andere Verwendungen werden auch für möglich gehalten, einschließlich die Verwendung der Sequenzinformation zur Herstellung von mutanten Primerspezies oder von Primern zur Verwendung bei der Herstellung von anderen genetischen Konstruktionen.

[0090] Nucleinsäuremoleküle mit Sequenzregionen, bestehend aus zusammenhängenden Nucleotidbereichen von 10–14, 15–30, 30, 50 oder auch 100–200 Nucleotiden usw., welche identisch sind mit oder komplementär sind zu DNA-Sequenzen von SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 33, werden insbesondere als Hybridisierungs sonden zur Verwendung in z. B. Southern- oder Northern-Blot-Verfahren in Betracht gezogen. Kleinere Fragmente finden im allgemeinen Verwendung in Hybridisierungs-Ausführungsformen, wobei die Länge der zusammenhängenden komplementären Region variiert werden kann, z. B. zwischen etwa 10–14 und etwa 100 oder 200 Nucleotiden, jedoch können längere zusammenhängende komplementäre Bereiche verwendet werden, je nach Länge der komplementären Sequenzen, welche nachgewiesen werden sollen.

[0091] Natürlich können Fragmente auch durch andere Techniken, wie z. B. durch mechanische Scherung oder durch Restriktionsenzymverdau, erhalten werden. Kleine Nucleinsäuresegmente oder -fragmente können ohne weiteres hergestellt werden, zum Beispiel durch direkte Synthese des Fragments durch chemische Mittel, so wie sie im allgemeinen unter Verwendung eines automatischen Oligonucleotid-Synthesegeräts durchgeführt wird. Fragmente können auch durch Anwendung von Nucleinsäurereproduktionstechniken, wie der PCR™-Technologie von US-Patent 4,683,195 und 4,683,202, durch das Einschleusen von ausgewählten Sequenzen in rekombinante Vektoren zur rekombinanten Produktion und durch andere DNA-Rekombinationstechniken, welche den Fachleuten auf dem Gebiet der Molekularbiologie im allgemeinen bekannt sind, erhalten werden.

[0092] Entsprechend können die erfindungsgemäßen Nucleotidsequenzen wegen ihrer Fähigkeit, selektiv Doppelstrangmoleküle mit komplementären Bereichen von DNA-Fragmenten zu bilden, verwendet werden. In Abhängigkeit von der beabsichtigten Verwendung kann es wünschenswert sein, unterschiedliche Hybridisierungsbedingungen zu verwenden, um verschiedene Selektivitätsgrade einer Sonde gegenüber der Zielsequenz zu erzielen. Für Anwendungen, welche eine hohe Selektivität erfordern, kann es typischerweise wünschenswert sein, relativ stringente Bedingungen zu verwendet werden, um die Hybride zu bilden, z. B. wird man Bedingungen mit einer relativ geringen Salzkonzentration und/oder einer hohen Temperatur wählen, so wie sie durch etwa 0,02 M bis etwa 0,15 M NaCl bei Temperaturen von etwa 50°C bis etwa 70°C vorgesehen werden. Solche selektiven Bedingungen tolerieren wenige, wenn überhaupt, Fehlpaarungen zwischen der Sonde und dem Matrizen- oder Zielstrang, und wären für die Isolierung von DNA-Segmenten, welche ein Kristallprotein codieren, besonders geeignet. Der Nachweis von DNA-Segmenten mittels einer Hybridisierung ist den Fachleuten hinreichend bekannt, und die Lehren von US-Patent 4,965,188 und 5,176,995 sind für die Methoden der Hybridisierungsanalysen beispielhaft. Lehren, wie die in den Texten von Maloy et al., 1994; Segal, 1976; Prokop, 1991; und Kuby, 1994, zu findenden, sind besonders relevant.

[0093] Natürlich sind für einige Anwendungen, zum Beispiel, wobei die Herstellung von Mutanten unter Verwendung eines mutierten Primerstrangs, hybridisiert an eine zugrundeliegende Matrize, erwünscht ist, oder

wobei man versucht, Sequenzen, welche ein Kristallprotein codieren, funktionelle Gegenstücke oder dergleichen aus verwandten Spezies zu isolieren, typischerweise weniger stringente Hybridisierungsbedingungen erforderlich, um die Bildung des Heteroduplexes zu ermöglichen. Unter diesen Verhältnissen kann es wünschenswert sein, Bedingungen wie etwa 0,15 M bis etwa 0,9 M Salz bei Temperaturen im Bereich von etwa 20°C bis etwa 55°C zu verwenden. Kreuzhybridisierende Spezies können dadurch ohne weiteres als positive Hybridisierungssignale im Hinblick auf Kontrollhybridisierungen identifiziert werden. In jedem Fall ist allgemein erkennbar, daß die Bedingungen durch die Zugabe von ansteigenden Mengen an Formamid, welches dazu dient, den Hybriddoppelstrang in der gleichen Art und Weise wie eine erhöhte Temperatur zu destabilisieren, stringenter gemacht werden können. Folglich können die Hybridisierungsbedingungen ohne weiteres manipuliert werden, und diese Vorgehensweise ist im allgemeinen, abhängig von den gewünschten Ergebnissen, das Verfahren der Wahl.

[0094] In bestimmten Ausführungsformen ist es vorteilhaft, erfindungsgemäße Nucleinsäuresequenzen in Kombination mit einem geeigneten Mittel, wie einem Marker, zum Nachweis der Hybridisierung zu verwenden. Eine große Vielzahl von geeigneten Indikatoren ist auf dem Fachgebiet bekannt, einschließlich fluoreszierende, radioaktive, enzymatische oder andere Liganden, wie Avidin/Biotin, welche fähig sind, ein nachweisbares Signal hervorzurufen. In bevorzugten Ausführungsformen ist es wahrscheinlich wünschenswert, einen Fluoreszenzmarker oder einen Enzymmarker, wie Urease, alkalische Phosphatase oder Peroxidase, anstelle von radioaktiven oder anderen umweltunverträglichen Reagenzien zu verwenden. Im Falle von Enzymmarkern sind kolorimetrische Indikatorsubstrate bekannt, die verwendet werden können, um ein Mittel vorzusehen, welches für das menschliche Auge oder spektrophotometrisch sichtbar ist, um die spezifische Hybridisierung mit komplementäre Nucleinsäuren enthaltenden Proben zu identifizieren.

[0095] Im allgemeinen wird es für möglich gehalten, daß die hierin beschriebenen Hybridisierungssonden sowohl als Reagenzien bei einer Hybridisierung in Lösung als auch in Ausführungsformen unter Verwendung einer festen Phase nützlich sind. In Ausführungsformen unter Beteiligung einer festen Phase wird die zu testende DNA (oder RNA) an eine ausgewählte Matrix oder Oberfläche adsorbiert oder anderweitig gebunden. Diese gebundene einzelsträngige Nucleinsäure wird dann einer spezifischen Hybridisierung mit ausgewählten Sonden unter gewünschten Bedingungen unterzogen. Die gewählten Bedingungen hängen von den besonderen Verhältnissen ab, welche auf den einzelnen erforderlichen Kriterien basieren (abhängig zum Beispiel von dem G + C-Gehalt, der Art der Ziel-Nucleinsäure, der Nucleinsäurequelle, der Größe der Hybridisierungssonde, etc.). Nach dem Waschen der hybridisierten Oberfläche, um unspezifisch gebundene Sondenmoleküle zu entfernen, wird die spezifische Hybridisierung mit Hilfe des Markers nachgewiesen oder auch quantitativ bestimmt.

2.10 Biologisch funktionelle Gegenstücke

[0096] In die Struktur der erfindungsgemäßen Peptide und der sie codierenden DNA-Segmente können Modifikationen und Veränderungen eingeführt werden, wobei immer noch ein funktionelles Molekül erhalten wird, das ein Protein oder Peptid mit wünschenswerten Eigenschaften codiert. Das Folgende ist eine Besprechung unter der Zugrundelegung eines Austausches der Aminosäuren eines Proteins, um ein äquivalentes oder auch ein verbessertes Molekül der zweiten Generation zu erzeugen. In besonderen Ausführungsformen der Erfindung wird erwartet, daß mutierte Kristallproteine zur Erhöhung der Insektizidaktivität des Proteins und folglich zur Erhöhung der Insektizidaktivität und/oder der Expression des rekombinanten Transgens in einer Pflanzenzelle nützlich sind. Die Aminosäureaustausche können durch Veränderung der Codons der DNA-Sequenz gemäß den in Tabelle 3 angegebenen Codons erreicht werden.

Tabelle 3

Aminosäure			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					

[0097] Zum Beispiel können bestimmte Aminosäuren durch andere Aminosäuren in einer Proteinstruktur ohne einen erkennbaren Verlust der interaktiven Bindungskapazität mit Strukturen wie zum Beispiel Antigen-Bindungsregionen oder Antikörpern oder Bindungsstellen auf Substratmolekülen ersetzt werden. Da es die interaktive Kapazität und die Natur eines Proteins ist, welche die biologisch funktionelle Aktivität des Proteins definiert, können bestimmte Aminosäuresequenz-Substitutionen in eine Proteinsequenz und natürlich in die zugrundeliegende codierende DNA-Sequenz hiervon eingeführt werden, wobei trotzdem ein Protein mit ähnlichen Eigenschaften erhalten wird. Es wird folglich durch die Erfinder in Betracht gezogen, daß verschiedene Austausch in die Peptidsequenzen der offenbarten Zusammensetzungen oder entsprechenden DNA-Sequenzen, welche die Peptide codieren, ohne einen erkennbaren Verlust ihrer biologischen Nützlichkeit oder Aktivität eingeführt werden können.

[0098] Bei der Einführung solcher Austausch kann der Hydrophathie-Index von Aminosäuren berücksichtigt

werden. Die Wichtigkeit des hydropathischen Aminosäure-Indexes bei der Übertragung einer interaktiven biologischen Funktion auf ein Protein ist auf dem Fachgebiet allgemein bekannt (Kyte und Doolittle, 1982, hierin unter Bezugnahme eingeschlossen). Es ist bekannt, daß der relative hydropathische Charakter der Aminosäure zu der Sekundärstruktur des erhaltenen Proteins beiträgt, welche wiederum die Wechselwirkung des Proteins mit anderen Molekülen, zum Beispiel Enzymen, Substraten, Rezeptoren, DNA, Antikörpern, Antigenen und dergleichen, definiert.

[0099] Jeder Aminosäure ist basierend auf ihren Hydrophilie- und Ladungseigenschaften ein Hydropathie-Index zugewiesen worden (Kyte und Doolittle, 1982), diese 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).

[0100] Auf dem Fachgebiet ist bekannt, daß bestimmte Aminosäuren durch andere Aminosäuren mit einem ähnlichen Hydropathie-Index oder -Ergebnis ersetzt werden können, wobei immer noch ein Protein mit einer ähnlichen biologischen Aktivität, d. h. ein biologisch funktionell äquivalentes Protein, erhalten wird. Bei der Einführung solcher Austauschungen wird die Substitution von Aminosäuren, deren Hydropathie-Indices innerhalb ± 2 liegen, bevorzugt, wobei solche innerhalb von ± 1 besonders bevorzugt werden, und solche innerhalb von $\pm 0,5$ noch mehr bevorzugt werden.

[0101] Auf dem Fachgebiet ist auch selbstverständlich, daß die Substitution von ähnlichen Aminosäuren wirksam basierend auf der Hydrophilie durchgeführt werden kann. US-Patent 4,554,101 gibt an, daß die größte lokale, durchschnittliche Hydrophilie eines Proteins, wie durch die Hydrophilie der benachbarten Aminosäuren hiervon bestimmt wurde, mit einer biologischen Eigenschaft des Proteins korreliert.

[0102] Wie in US-Patent 4,554,101 ausführlich beschrieben, sind den Aminosäureresten die folgenden Hydrophilie-Werte zugewiesen worden: 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).

[0103] Es ist selbstverständlich, daß eine Aminosäure durch eine andere mit einem Hydrophilie-Wert ersetzt werden kann, wobei noch immer ein biologisch äquivalentes und insbesondere ein immunologisch äquivalentes Protein erhalten wird. Bei solchen Austauschungen wird die Substitution von Aminosäuren, deren Hydrophilie-Werte innerhalb ± 2 liegen, bevorzugt, wobei solche innerhalb von ± 1 besonders bevorzugt werden, und solche innerhalb von $\pm 0,5$ noch mehr bevorzugt werden.

[0104] Wie oben dargelegt, basieren Aminosäure-Substitutionen daher im allgemeinen auf der relativen Ähnlichkeit der Aminosäureseitenketten-Substituenten, zum Beispiel ihrer Hydrophobizität, Hydrophilie, Ladung, Größe und dergleichen. Beispielhafte Substitutionen, welche verschiedene der vorstehenden Eigenschaften berücksichtigen, sind den Fachleuten hinreichend bekannt und schließen ein: Arginin und Lysin; Glutamat und Aspartat; Serin und Threonin; Glutamin und Asparagin; und Valin, Leucin und Isoleucin.

2.11 Ortsspezifische Mutagenese

[0105] Die ortsspezifische Mutagenese ist eine Technik, welche bei der Herstellung von einzelnen Peptiden oder biologisch funktionell äquivalenten Proteinen oder Peptiden durch spezifische Mutagenese der zugrundeliegenden DNA nützlich ist. Die Technik sieht ferner eine geeignete Möglichkeit vor, um Sequenzvarianten durch das Einführen eines oder mehrerer Nucleotidsequenzaustausche in die DNA, zum Beispiel unter Berücksichtigung einer oder mehrerer der obigen Überlegungen, herzustellen und zu testen. Die ortsspezifische Mutagenese ermöglicht die Herstellung von Mutanten durch die Verwendung von spezifischen Oligonucleotidsequenzen, welche die DNA-Sequenz mit der gewünschten Mutation sowie eine ausreichende Anzahl an benachbarten Nucleotiden codieren, um eine Primersequenz von ausreichender Größe und Sequenzkomplexität bereitzustellen, damit ein stabiler Doppelstrang auf beiden Seiten der überbrückten Deletionsverbindungsstelle gebildet wird. Typischerweise wird ein Primer mit einer Länge von etwa 17 bis 25 Nucleotiden bevorzugt, wobei etwa 5 bis 10 Reste auf beiden Seiten der Verbindungsstelle der Sequenz verändert werden.

[0106] Im allgemeinen ist die Technik der ortsspezifischen Mutagenese auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt, wie durch zahlreiche Veröffentlichungen veranschaulicht wird. Bekanntermaßen gebraucht die Technik typischerweise einen Phagenvektor, welcher in sowohl einer einzelsträngigen als auch in einer doppelsträngigen

gen Form vorliegt. Typische Vektoren, welche bei der ortsspezifischen Mutagenese nützlich sind, schließen Vektoren wie den M13-Phagen ein. Diese Phagen sind ohne weiteres im Handel erhältlich, und deren Verwendung ist den Fachleuten im allgemeinen hinreichend bekannt. Doppelsträngige Plasmide werden auch üblicherweise bei der ortsspezifischen Mutagenese verwendet, wodurch der Schritt des Transfers des Gens von Interesse aus einem Plasmid in einen Phagen entfällt.

[0107] Im allgemeinen wird die ortsspezifische Mutagenese demgemäß durchgeführt, indem zuerst ein einzelsträngiger Vektor erhalten wird oder zwei Stränge eines doppelsträngigen Vektors, welcher innerhalb seiner Sequenz eine DNA-Sequenz einschließt, die das gewünschte Peptid codiert, aufgeschmolzen werden. Ein Oligonucleotidprimer, der die gewünschte mutierte Sequenz trägt, wird hergestellt, im allgemeinen synthetisch. Dieser Primer wird dann an den einzelsträngigen Vektor angelagert und DNA-Polymeraseenzymen wie dem Klenow-Fragment der *E. coli*-Polymerase I ausgesetzt, um die Synthese des die Mutation tragenden Strangs abzuschließen. Auf diese Weise wird ein Heteroduplex gebildet, worin ein Strang die ursprüngliche nicht mutierte Sequenz codiert, und der zweite Strang die gewünschte Mutation trägt. Dieser Heteroduplex-Vektor wird dann verwendet, um geeignete Zellen, wie *E. coli*-Zellen zu transformieren, und Clone, welche rekombinante Vektoren einschließen, welche die mutierte Sequenzanordnung tragen, werden ausgewählt.

[0108] Die Herstellung von Sequenzvarianten der ausgewählten ein Peptid codierenden DNA-Segmente mittels der ortsspezifischen Mutagenese wird als ein Mittel für die Herstellung von potentiell nützlichen Spezies bereitgestellt und soll keine Begrenzung darstellen, da es andere Wege gibt, durch welche Sequenzvarianten von Peptiden und der sie codierenden DNA-Sequenzen erhalten werden können. Zum Beispiel können rekombinante Vektoren, welche die gewünschte Peptidsequenz codieren, mit mutagenen Mitteln wie Hydroxylamin behandelt werden, um Sequenzvarianten zu erhalten.

2.12 Kristallprotein-Zusammensetzungen als Insektizide und Anwendungsverfahren

[0109] Die Erfinder erwarten, daß die hierin offenbarten chimären Kristallprotein-Zusammensetzungen besondere Verwendung als Insektizide für die topische und/oder systemische Anwendung bei Feldfrüchten, Gräsern, Früchten und Gemüse sowie Zierpflanzen finden. In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Bioinsektizidzusammensetzung eine ölige, fließfähige Suspension von Bakterienzellen, die ein hierin offenbartes neues Kristallprotein exprimieren. Vorzugsweise sind die Zellen *B. thuringiensis*-Zellen, jedoch wird erwartet, daß jede solche bakterielle Wirtszelle, welche die hierin offenbarten neuen Nucleinsäuresegmente exprimiert und ein Kristallprotein herstellt, nützlich ist, z. B. *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli* oder *Pseudomonas sp.*

[0110] In einer anderen wichtigen Ausführungsform umfaßt die Bioinsektizidzusammensetzung ein in Wasser dispergierbares Granulat. Dieses Granulat umfaßt Bakterienzellen, welche ein hierin offenbartes neues Kristallprotein exprimieren. Bevorzugte Bakterienzellen sind *B. thuringiensis*-Zellen, jedoch werden Bakterien wie *B. megaterium*-, *B. subtilis*-, *E. coli*- oder *Pseudomonas sp.*-Zellen, welche mit einem hierin offenbarten DNA-Segment transformiert sind und das Kristallprotein exprimieren, auch als nützlich angesehen.

[0111] In einer dritten wichtigen Ausführungsform umfaßt die Bioinsektizidzusammensetzung ein benetzbares Pulver, Stäubemittel, Pellet oder kolloidales Konzentrat. Das Pulver umfaßt Bakterienzellen, welche ein hierin offenbartes neues Kristallprotein exprimieren. Bevorzugte Bakterienzellen sind *B. thuringiensis*-Zellen, jedoch werden Bakterien wie *B. megaterium*-, *B. subtilis*-, *E. coli*- oder *Pseudomonas sp.*-Zellen, welche mit einem hierin offenbarten DNA-Segment transformiert sind und das Kristallprotein exprimieren, auch als nützlich angesehen. Solche trockene Formen der Insektizidzusammensetzungen können derart formuliert sein, daß sie sich unmittelbar bei der Benetzung auflösen oder alternativ in einer Weise mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung, verzögerter Wirkstofffreisetzung oder einer anderen zeitabhängigen Wirkstofffreisetzung auflösen.

[0112] In einer vierten wichtigen Ausführungsform umfaßt die Bioinsektizidzusammensetzung eine wäßrige Suspension von Bakterienzellen, wie die oben beschriebenen, welche das Kristallprotein exprimieren. Solche wäßrigen Suspensionen können als eine konzentrierte Stammlösung, welche vor der Anwendung verdünnt wird, oder alternativ als eine gebrauchsfertige verdünnte Lösung bereitgestellt werden.

[0113] Für diese Verfahren in Verbindung mit der Verwendung von Bakterienzellen kann der zelluläre Wirt, welcher das/die Kristallprotein-Gen(e) enthält, in irgendeinem geeigneten Nährmedium gezüchtet werden; wenn das DNA-Konstrukt einen Selektionsvorteil bereitstellt, wird für eine Selektionsmedium gesorgt, so daß im wesentlichen alle oder alle Zellen das *B. thuringiensis*-Gen beibehalten. Diese Zellen können dann im Einklang mit herkömmlichen Verfahren geerntet werden. Alternativ können die Zellen vor dem Ernten behandelt werden.

[0114] Wenn die Insektizidzusammensetzungen intakte *B. thuringiensis*-Zellen umfassen, welche das Protein von Interesse exprimieren, können solche Bakterien durch eine Vielzahl von Verfahren formuliert werden. Sie können als benetzbare Pulver, Granulate oder Stäubemittel verwendet werden, indem sie mit verschiedenen inerten Materialien, wie anorganischen Mineralien (Phyllosilicate, Carbonate, Sulfate, Phosphate und dergleichen), oder botanischen Materialien (pulverisierte Maiskolben, Reisschalen, Walnußschalen und dergleichen) vermischt werden. Die Formulierungen können Verteilungsmittel-Haftmittel-Adjuvanzien, Stabilisierungsmittel, andere Pestizidzusätze oder Tenside einschließen. Flüssige Formulierungen können wäßrig oder nichtwäßrig sein und als Schäume, Suspensionen, emulgierbare Konzentrate oder dergleichen verwendet werden. Die Bestandteile können Fließmittel, Tenside, Emulgiermittel, Dispergiemittel oder Polymere einschließen.

[0115] Alternativ können die neuen chimären Cry-Proteine durch rekombinante bakterielle Expressionssysteme *in vitro* hergestellt und für die anschließende Ausbringung im Feld isoliert werden. Ein solches Protein kann entweder in Zellrohlysaten, Suspensionen, Kolloiden, etc. vorliegen, oder kann alternativ vor der Formulierung in eine aktive Biozidformulierung gereinigt, verarbeitet, gepuffert und/oder weiterverarbeitet werden. Desgleichen kann es unter bestimmten Verhältnissen wünschenswert sein, Kristalle und/oder Sporen aus Bakterienkulturen, welche das Kristallprotein exprimieren, zu isolieren und Lösungen, Suspensionen oder kolloidale Zubereitungen solcher Kristalle und/oder Sporen als aktive Bioinsektizidzusammensetzung auszubringen.

[0116] Ungeachtet des Anwendungsverfahrens ist die ausgebrachte Menge der aktiven Komponente(n) eine insektizid wirksame Menge, welche abhängig von solchen Faktoren wie zum Beispiel der zu bekämpfenden besonderen Coleoptera-Insekten, der zu behandelnden besonderen Pflanze oder Feldfrucht, den Umweltbedingungen und dem Verfahren, der Rate und der Quantität der Ausbringung der insektizid aktiven Zusammensetzung variiert.

[0117] Die beschriebenen Insektizidzusammensetzungen können durch Formulierung von entweder der Bakterienzelle, der Kristall- und/oder Sporensuspension oder der isolierten Proteinkomponente mit dem gewünschten landwirtschaftlich verträglichen Trägern hergestellt werden. Die Zusammensetzungen können vor der Applikation durch ein geeignetes Verfahren, wie Lyophilisieren, Gefrierrocknen oder Trocknen, oder in einem wäßrigen Träger, Medium oder geeigneten Verdünnungsmittel wie eine Salzlösung oder einem anderen Puffer formuliert werden. Die formulierten Zusammensetzungen können in Form eines Stäubemittels oder eines granulären Materials oder einer Suspension in Öl (pflanzlich oder mineralisch) oder Wasser oder von Öl/Wasser-Emulsionen oder als ein benetzbares Pulver oder in Kombination mit irgendeinem anderen Trägermaterial, welches für die landwirtschaftliche Ausbringung geeignet ist, vorliegen. Geeignete landwirtschaftliche Träger können fest oder flüssig sein und sind auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt. Der Begriff "landwirtschaftlich verträglicher Träger" schließt alle Adjuvanzien ein, z. B. inerte Komponenten, Dispergiemittel, Tenside, Klebrigmacher, Bindemittel, etc., die üblicherweise bei der Insektizidformulierungstechnik verwendet werden; diese sind den Fachleuten der Insektizidformulierung hinreichend bekannt. Die Formulierungen können mit einem oder mehreren festen oder flüssigen Adjuvanzien gemischt und durch verschiedene Verfahren, z. B. durch homogenes Mischen, Vermischen und/oder Vermahlen der Insektizidzusammensetzung mit geeigneten Adjuvanzien mittels herkömmlicher Formulierungstechniken, zubereitet werden.

[0118] Die erfindungsgemäßen Insektizidzusammensetzungen werden in die Umgebung des Coleoptera-Zielinsekts, typischerweise auf die Blätter der zu schützenden Pflanze oder Feldfrucht, durch herkömmliche Verfahren, vorzugsweise durch Sprühen, ausgebracht. Die Intensität und Dauer der Insektizidanwendung wird im Hinblick auf die Bedingungen festgelegt, welche für das (die) besondere(n) Pestizid(e), die zu behandelnde(n) Nutzpflanze(n) und die besonderen Umweltbedingungen spezifisch sind. Das proportionale Verhältnis von Wirkstoffbestandteil zu dem Träger hängt natürlich von der chemischen Natur, Löslichkeit und Stabilität der Insektizidzusammensetzung sowie der besonderen beabsichtigten Formulierung ab.

[0119] Andere Ausbringungstechniken, z. B. Zerstäuben, Bespritzen, Einweichen, Bodeninjektion, Samenbeschichtung, Sämlingbeschichtung, Sprühen, Belüften, Vernebeln, Atomisieren und dergleichen, sind auch möglich und können unter bestimmten Umständen erforderlich sein, wie z. B. bei Insekten, welche einen Wurzel- oder Halmbefall verursachen, oder zur Ausbringung auf empfindliche Vegetationen oder Zierpflanzen. Diese Ausbringungsverfahren sind den Fachleuten ebenfalls hinreichen bekannt.

[0120] Die erfindungsgemäßen Insektizidzusammensetzungen können in dem Verfahren der Erfindung allein oder in Kombination mit anderen Verbindungen, einschließlich, aber nicht begrenzt auf, anderen Pestiziden, verwendet werden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch in Verbindung mit anderen Behandlungen wie mit Tensiden, Detergenzien, Polymeren oder Formulierungen mit einer zeitabhängigen Wirkstofffreisetzung verwendet werden. Die erfindungsgemäßen Insektizidzusammensetzungen können entweder für die sys-

temische oder die topische Anwendung formuliert werden.

[0121] Die Konzentration der Insektizidzusammensetzung, welche für die Ausbringung in die Umwelt, die systemische Anwendung oder den Blattauftrag verwendet wird, variiert in Abhängigkeit von der Art der einzelnen Formulierung, dem Mittel der Ausbringung, den Umweltbedingungen und dem Grad der Biozidaktivität. Typischerweise liegt die Bioinsektizidzusammensetzung in der ausgebrachten Formulierung in einer Konzentration von mindestens etwa 0,5 Gew.-% vor und kann bis zu und einschließlich etwa 99 Gew.-% betragen. Trockene Formulierungen der Zusammensetzungen können etwa 0,5 bis etwa 99 Gew.-% oder mehr der Zusammensetzung umfassen, während flüssige Formulierungen im allgemeinen etwa 0,5 bis etwa 99 Gew.-% oder mehr des Wirkstoffbestandteils umfassen. Formulierungen, welche intakte Bakterienzellen umfassen, enthalten im allgemeinen etwa 10^4 bis etwa 10^{12} Zellen/mg.

[0122] Die Insektizidformulierung kann in einer oder mehreren Anwendungen, falls erforderlich, an eine bestimmte Pflanze verabreicht oder auf einen Zielbereich aufgebracht werden, wobei eine typische Feldausbringungsrate pro Hektar in der Größenordnung von etwa 50 g bis etwa 500 g des Wirkstoffbestandteils oder von etwa 500 g bis etwa 1.000 g oder von etwa 1.000 g bis etwa 5.000 g oder mehr des Wirkstoffbestandteils liegt.

2.13 Antikörperzusammensetzungen und Herstellungsverfahren

[0123] In bestimmten Ausführungsformen erwägen die Erfinder die Verwendung von Antikörpern, entweder monoclonal oder polyclonal, welche an die hierin offenbarten Kristallproteine binden. Mittel zur Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern sind auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt (vgl. z. B. Harlow und Lane, 1989; hierin unter Bezugnahme eingeschlossen). Die Verfahren zur Erzeugung von monoclonalen Antikörpern (mAbs) folgen im allgemeinen den gleichen Grundsätzen wie für die Herstellung von polyclonalen Antikörpern. Kurz zusammengefaßt wird ein polyclonaler Antikörper dadurch hergestellt, daß ein Tier mit einer erfindungsgemäßen immunogenen Zusammensetzung immunisiert wird und das Antiserum aus dem immunisierten Tier gewonnen wird. Ein große Auswahl von Tierarten kann für die Herstellung von Antiseren verwendet werden. Typischerweise ist das zur Herstellung von anti-Antiseren verwendete Tier ein Kaninchen, eine Maus, eine Ratte, ein Hamster, ein Meerschweinchen oder eine Ziege.

[0124] Aufgrund des relativ großen Blutvolumens von Kaninchen ist ein Kaninchen eine bevorzugte Wahl für die Herstellung von polyclonalen Antikörpern.

[0125] Wie auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt ist, kann eine bestimmte Zusammensetzung hinsichtlich ihrer Immunogenität variieren. Es ist daher oft notwendig, das Immunsystem des Wirts zu stimulieren, wie durch Kopplung eines Peptid- oder Polypeptid-Immunogens an einen Träger erreicht werden kann. Beispielhafte und bevorzugte Träger sind Schlüsselloch-Napfschnecken-Hämocyanin (KLH) und Rinderserumalbumin (BSA). Andere Albumine wie Ovalbumin, Mausserumalbumin oder Kaninchenserumalbumin können auch als Träger verwendet werden. Mittel zur Konjugation eines Polypeptids an ein Trägerprotein sind auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt und schließen Glutaraldehyd, m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester, Carbodiimid und Bisbiazo-behandeltes Benzidin ein.

[0126] Wie auf dem Fachgebiet auch hinreichend bekannt ist, kann die Immunogenität einer bestimmten immunogenen Zusammensetzung durch die Verwendung von unspezifischen Stimulatoren der Immunantwort, welche als Adjuvantien bekannt sind, verstärkt werden. Beispielhafte und bevorzugte Adjuvantien schließen komplettes Freundsches Adjuvans (ein unspezifischer Stimulator der Immunantwort, enthaltend abgetötete Zellen von *Mycobacterium tuberculosis*), unvollständiges Freundsches Adjuvans und Aluminiumhydroxid-Adjuvans ein.

[0127] Die bei der Herstellung von polyclonalen Antikörpern verwendete Menge der immunogenen Zusammensetzung variiert in Abhängigkeit von der Art des Immunogens sowie des zur Immunisierung verwendeten Tiers. Eine Vielzahl von Wegen kann verwendet werden, um das Immunogen zu verabreichen (subkutan, intramuskulär, intradermal, intravenös und intraperitoneal). Die Herstellung von polyclonalen Antikörpern kann durch Entnehmen von Blut des immunisierten Tiers zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung überwacht werden. Eine zweite Injektion, eine Nachimpfung, kann auch verabreicht werden. Das Verfahren der Nachimpfung und Titration wird wiederholt, bis ein geeigneter Titer erreicht ist. Wenn ein gewünschter Immunogenitätsgrad erreicht ist, kann dem immunisierten Tier Blut abgenommen und das Serum isoliert und gelagert werden, und/oder das Tier kann verwendet werden, um mAbs herzustellen.

[0128] mAbs können durch die Anwendung von hinreichend bekannten Techniken, wie den in US-Patent

4,196,265 veranschaulichten (hierin unter Bezugnahme ausdrücklich eingeschlossen), ohne weiteres hergestellt werden. Typischerweise beinhaltet diese Technik die Immunisierung eines geeigneten Tiers mit einer ausgewählten immunogenen Zusammensetzung, z. B. einem gereinigten oder teilweise gereinigten Kristallprotein, Polypeptid oder Peptid. Die immunisierende Zusammensetzung wird in einer Art und Weise verabreicht, welche wirksam ist, um Antikörper produzierende Zellen zu stimulieren. Nagetiere wie Mäuse und Ratten sind bevorzugte Tiere, jedoch ist die Verwendung von Kaninchen-, Schafs- oder Froschzellen auch möglich. Die Verwendung von Ratten kann gewisse Vorteile vorsehen (Goding, 1986, S. 60–61), aber Mäuse werden bevorzugt, wobei die BALB/c-Maus am meisten bevorzugt wird, da diese meistens routinemäßig verwendet wird und im allgemeinen einen höheren Prozentsatz an stabilen Fusionen ergibt.

[0129] Nach der Immunisierung werden somatische Zellen mit dem Potential für die Produktion von Antikörpern, besonders B-Lymphocyten (B-Zellen), zur Verwendung in dem mAb-Erzeugungsprotokoll ausgewählt. Diese Zellen können aus biopsierten Milzen, Mandeln oder Lymphknoten oder aus einer peripheren Blutprobe erhalten werden. Milzzellen und periphere Blutzellen werden bevorzugt, die Ersteren weil sie eine ergiebige Quelle für Antikörper produzierende Zellen sind, welche in dem sich teilenden Plasmablastenstadium vorliegen, und die Letzteren, welche peripheres Blut leicht zugänglich ist. Oft ist eine Reihe von Tieren immunisiert worden, und die Milz eines Tiers mit dem höchsten Antikörpertiter wird entnommen, und die Milz-Lymphocyten werden durch Homogenisieren der Milz mit einer Spritze erhalten. Typischerweise enthält eine Milz aus einer immunisierten Milz etwa 5×10^7 bis 2×10^8 Lymphocyten.

[0130] Die Antikörper produzierenden B-Lymphocyten aus dem immunisierten Tier werden dann mit Zellen einer unsterblichen Myelomzelle fusioniert, im allgemeinen mit einer Myelomzelle derselben Spezies wie das Tier, welches immunisiert wurde. Myelomzelllinien, welche zur Verwendung in Hybridome erzeugenden Fusionsverfahren geeignet sind, produzieren vorzugsweise keine Antikörper, besitzen eine hohe Fusionseffizienz und weisen Enzymdefizienzen auf, welche dann ein Wachstum in bestimmten Selektionsmedien, welche nur das Wachstum der gewünschten Fusionszellen (Hybridome) fördern, unmöglich machen.

[0131] Jede einer Reihe von Myelomzellen, welche den Fachleuten bekannt sind (Goding, S. 65–66, 1986; Campbell, S. 75–83, 1984), kann verwendet werden. Zum Beispiel, wenn das immunisierte Tier eine Maus ist, kann man P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag41, 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 und UC729-6 sind alle in Verbindung mit menschlichen Zellfusionen nützlich.

[0132] Eine bevorzugte murine Myelomzelle ist die NS-1-Myelomzelllinie (auch als P3-NS-1-Ag4-1 bezeichnet), welche ohne weiteres von der NIGMS Human Genetic Mutant Cell-Hinterlegungsstelle durch Ersuchen um die Zelllinien-Hinterlegungsnummer GM3573 erhältlich ist. Eine andere Maus-Myelomzelllinie, welche verwendet werden kann, ist die 8-Azaguanin-resistente murine Maus-Myelom-SP2/0-"Nicht-Erzeuger"-Zelllinie.

[0133] Verfahren zur Erzeugung von Hybriden aus Antikörper produzierenden Milz- oder Lymphknotenzellen und Myelomzellen umfassen üblicherweise das Mischen von somatischen Zellen mit Myelomzellen in einem Verhältnis von 2 : 1, obgleich das Verhältnis jeweils von etwa 20 : 1 bis etwa 1 : 1 variieren kann, in Gegenwart eines Mittels oder von Mitteln (chemische oder elektrische), welche die Fusion von Zellmembranen begünstigen. Fusionsverfahren unter Verwendung des Sendai-Virus (Kohler und Milstein, 1975; 1976), sowie solche unter Verwendung von Polyethylenglykol (PEG), wie 37% (Vol./Vol.) PEG (Geffer et al., 1977), sind beschrieben worden. Die Anwendung von elektrisch induzierten Fusionsverfahren ist auch geeignet (Goding, 1986, S. 71–74).

[0134] Fusionsverfahren bringen üblicherweise lebensfähige Hybride in geringen Häufigkeiten, etwa 1×10^{-6} bis 1×10^{-8} , hervor. Jedoch stellt dies kein Problem dar, da sich die lebensfähigen, fusionierten Hybride von den nicht fusionierten Stammzellen (besonders den nicht fusionierten Myelomzellen, welche sich normalerweise fortgesetzt unbegrenzt teilen würden) durch das Züchten in einem Selektionsmedium unterschieden werden. Das Selektionsmedium ist im allgemeinen ein Medium, das ein Mittel enthält, welches die de novo-Synthese von Nucleotiden in dem Gewebekulturmedium blockiert. Beispielhafte und bevorzugte Mittel sind Aminopterin, Methotrexat und Azaserin. Aminopterin und Methotrexat blockieren die de novo-Synthese von sowohl Purinen als auch Pyrimidinen, während Azaserin nur die Purinsynthese blockiert. Wenn Aminopterin oder Methotrexat verwendet wird, wird das Medium mit Hypoxanthin und Thymidin als eine Quelle für Nucleotide ergänzt (HAT-Medium). Wenn Azaserin verwendet wird, wird das Medium mit Hypoxanthin ergänzt.

[0135] Das bevorzugte Selektionsmedium ist HAT. In HAT-Medium können nur Zellen überleben, welche fähig

sind, einen Nucleotidrückgewinnungsweg zu unterhalten. Die Myelomzellen sind bezüglich der Schlüsselenzyme des Rückgewinnungswegs, z. B. der Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), defizient und können nicht überleben. Die B-Zellen können diesen Abbauweg unterhalten, aber sie haben eine begrenzte Lebensdauer in Kultur und sterben im allgemeinen innerhalb von etwa zwei Wochen. Daher sind die einzigen Zellen, welche in dem Selektionsmedium überleben können, solche Hybride, welche sich aus Myelom- und B-Zellen gebildet haben.

[0136] Diese Züchtung stellt eine Population von Hybridomen bereit, aus welchen spezifische Hybridome ausgewählt werden. Typischerweise wird die Selektion von Hybridomen durch das Züchten der Zellen mittels Einzelclon-Verdünnung in Mikrotiterplatten, gefolgt durch das Testen der einzelnen Clon-Überstände (nach etwa zwei bis drei Wochen) auf die gewünschte Reaktivität, ausgeführt. Der Test sollte empfindlich, einfach und schnell sein, wie Radioimmunoassays, Enzymimmunoassays, cytotoxische Assays, Plaqueassays, Dot-Immunoassays und dergleichen.

[0137] Die ausgewählten Hybridome würde man anschließend seriell verdünnen und in einzelne Antikörper produzierende Zelllinien klonieren, wobei die Clone dann unbegrenzt vermehrt werden können, um mAbs bereitzustellen. Die Zelllinien können für die mAb-Herstellung in zwei wesentlichen Verfahren verwendet werden. Eine Probe der Hybridome kann einem histokompatiblen Tier des Typs, welcher verwendet wurde, um die somatischen Zellen und die Myelomzellen für die ursprüngliche Fusion bereitzustellen, gespritzt werden (oft in die Bauchfellhöhle). Das mit der Injektion behandelte Tier entwickelt Tumore, welche den spezifischen monoclonalen Antikörper sezernieren, der durch das fusionierte Zellhybrid hergestellt wird. Die Körperflüssigkeiten des Tiers, wie Serum oder Aszitesflüssigkeit, können dann punktiert werden, um mAbs in hoher Konzentration bereitzustellen. Die einzelnen Zelllinien können auch *in vitro* gezüchtet werden, wobei die mAbs natürlicherweise in das Kulturmedium sezerniert werden, aus dem sie ohne weiteres in hohen Konzentrationen erhalten werden. Die durch jedes Verfahren hergestellten mAbs können mittels Filtrations-, Zentrifugations- und verschiedenen Chromatographieverfahren, wie HPLC oder Affinitätschromatographie, gegebenenfalls weiter gereinigt werden.

3.0 Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0138] Die folgenden Zeichnungen machen einen Teil der vorliegenden Beschreibung aus und sind eingeschlossen, um bestimmte Aspekte der vorliegenden Erfindung weiter zu veranschaulichen. Die Erfindung wird unter Bezugnahme auf eine oder mehrere dieser Zeichnungen in Verbindung mit der ausführlichen Beschreibung der hierin vorgestellten spezifischen Ausführungsformen verständlicher.

[0139] **Fig. 1:** Die Wildtyp- δ -endotoxine und die relevanten Restriktionsstellen, welche zur Konstruktion der erfindungsgemäß wichtigen Hybrid- δ -Endotoxine verwendet wurden, sind in **Fig. 1A** schematisch dargestellt. Es ist nur die DNA dargestellt, welche das δ -Endotoxin codiert, das in dem angegebenen Plasmid enthalten ist (gekennzeichnet durch die Vorsilbe "pEG"). Die *B. thuringiensis*-Stämme, welche die angegebenen Plasmide enthalten, sind durch die Vorsilbe "EG" gekennzeichnet. Die in der Erfindung beschriebenen Hybrid- δ -Endotoxine sind in **Fig. 1B** schematisch dargestellt und sind an den Wildtyp- δ -Endotoxinen in **Fig. 1A** ausgerichtet.

[0140] **Fig. 2:** Eine gleiche Menge jeder gewaschenen sporenbildenden *B. thuringiensis*-Kultur wurde durch eine SDS-PAGE analysiert. Bahn a: Kontrolle – der Cry1Ac produzierende *B. thuringiensis*-Stamm EG11070; b: EG11060; c: EG11062; d: EG11063; e: EG11065; f: EG11067; g: EG11071; h: EG11073; i: EG11074; j: EG11088; k: EG11090; und l: EG11091.

[0141] **Fig. 3:** Solubilisierte Hybrid- δ -Endotoxine wurden Trypsin für 0, 15, 30, 60 und 120 Minuten ausgesetzt. Das erhaltene Material wurde durch eine SDS-PAGE analysiert. Die Menge des restlichen aktiven δ -Endotoxin-Fragments wurde mittels Abtastdensitometrie unter Verwendung eines Molecular Dynamics Modell 300A-Densitometers quantitativ bestimmt. Der Prozentsatz des restlichen aktiven Toxins wurde gegen die Zeit aufgetragen. Wildtyp-Cry1Ac- δ -Endotoxin (nicht ausgefülltes Kästchen) diente als Kontrolle.

[0142] **Fig. 4:** Schematische Darstellungen der Wildtyp-Toxine und der relevanten Restriktionsstellen, welche zur Konstruktion des durch pEG381 codierten und in EG11768 exprimierten Hybrid- δ -Endotoxins verwendet wurden. Es ist nur die DNA dargestellt, welche das δ -Endotoxin codiert, das in dem angegebenen Plasmid enthalten ist (gekennzeichnet durch die Vorsilbe "pEG").

4.0 Kurze Beschreibung der Sequenzidentifizierungen

- [0143] SEQ ID NO: 1 ist der Oligonucleotidprimer A.
- [0144] SEQ ID NO: 2 ist der Oligonucleotidprimer B.
- [0145] SEQ ID NO: 3 ist der Oligonucleotidprimer C.
- [0146] SEQ ID NO: 4 ist der Oligonucleotidprimer D.
- [0147] SEQ ID NO: 5 ist der Oligonucleotidprimer E.
- [0148] SEQ ID NO: 6 ist der Oligonucleotidprimer F.
- [0149] SEQ ID NO: 7 ist der Oligonucleotidprimer G.
- [0150] SEQ ID NO: 8 ist der Oligonucleotidprimer H.
- [0151] SEQ ID NO: 9 ist die Nucleotid- und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des EG11063-Hybrid- δ -Endotoxins.
- [0152] SEQ ID NO: 10 gibt in der Drei-Buchstaben-Abkürzungsform die Aminosäuresequenz für das in SEQ ID NO: 9 spezifizierte Hybrid- δ -Endotoxin an.
- [0153] SEQ ID NO: 11 ist die Nucleotid- und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des EG11074-Hybrid- δ -Endotoxins.
- [0154] SEQ ID NO: 12 gibt in der Drei-Buchstaben-Abkürzungsform die Aminosäuresequenz für das in SEQ ID NO: 11 spezifizierte Hybrid- δ -Endotoxin an.
- [0155] SEQ ID NO: 13 ist die Nucleotid- und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des EG11735-Hybrid- δ -Endotoxins.
- [0156] SEQ ID NO: 14 gibt in der Drei-Buchstaben-Abkürzungsform die Aminosäuresequenz für das in SEQ ID NO: 13 spezifizierte Hybrid- δ -Endotoxin an.
- [0157] SEQ ID NO: 15 ist die 5'-Austauschstelle für pEG1065, pEG1070 und pEG1074.
- [0158] SEQ ID NO: 16 ist die 5'-Austauschstelle für pEG1067, pEG1072 und pEG1076.
- [0159] SEQ ID NO: 17 ist die 5'-Austauschstelle für pEG1068, pEG1077 und pEG365.
- [0160] SEQ ID NO: 18 ist die 5'-Austauschstelle für pEG1088 und pEG1092.
- [0161] SEQ ID NO: 19 ist die 5'-Austauschstelle für pEG1089 und die 3'-Austauschstelle für pEG1070 und pEG1072.
- [0162] SEQ ID NO: 20 ist die 5'-Austauschstelle für pEG1091.
- [0163] SEQ ID NO: 21 ist die 3'-Austauschstelle für pEG1065, pEG1067, pEG1068, pEG1093, pEG378 und pEG365.
- [0164] SEQ ID NO: 22 ist die 3'-Austauschstelle für pEG1088.
- [0165] SEQ ID NO: 23 ist der Oligonucleotidprimer I.
- [0166] SEQ ID NO: 24 ist der Oligonucleotidprimer J.
- [0167] SEQ ID NO: 25 ist die Nucleinsäuresequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz für das ein Hybrid-Kristallprotein codierende Gen von EG11092.

[0168] SEQ ID NO: 26 ist die Drei-Buchstaben-Abkürzungsform der Aminosäuresequenz des durch den Stamm EG11092 produzierten Hybrid-Kristallproteins, welches durch SEQ ID NO: 25 codiert wird.

[0169] SEQ ID NO: 27 ist die Nucleinsäuresequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz für das ein Hybrid-Kristallprotein codierende Gen von EG11751.

[0170] SEQ ID NO: 28 ist die Drei-Buchstaben-Abkürzungsform der Aminosäuresequenz des durch den Stamm EG11751 produzierten Hybrid-Kristallproteins, welches durch SEQ ID NO: 27 codiert wird.

[0171] SEQ ID NO: 29 ist die Nucleinsäuresequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz für das ein Hybrid-Kristallprotein codierende Gen von EG11091.

[0172] SEQ ID NO: 30 ist die Drei-Buchstaben-Abkürzungsform der Aminosäuresequenz des durch den Stamm EG11091 produzierten Hybrid-Kristallproteins, welches durch SEQ ID NO: 29 codiert wird.

[0173] SEQ ID NO: 31 ist der Oligonucleotidprimer K.

[0174] SEQ ID NO: 32 ist die 5'-Austauschstelle für pEG378 und pEG381.

[0175] SEQ ID NO: 33 ist die Nucleinsäuresequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz für das ein Hybrid-Kristallprotein codierende Gen von EG11768.

[0176] SEQ ID NO: 34 kennzeichnet in der Drei-Buchstaben-Abkürzungsform die Aminosäuresequenz des durch den Stamm EG11768 produzierten Hybrid-Kristallproteins, welches durch SEQ ID NO: 33 codiert wird.

[0177] SEQ ID NO: 35 ist die 3'-Austauschstelle für pEG1074, pEG1076, pEG1077 und pEG381.

5.0 Beschreibung von veranschaulichenden Ausführungsformen

5.1 Verfahren für die Züchtung von *B. thuringiensis* zur Herstellung von Cry-Proteinen

[0178] Die hierin beschriebenen *B. thuringiensis*-Stämme können mittels bekannten üblichen Medien und Fermentationstechniken gezüchtet werden. Nach Beendigung des Fermentationszyklus können die Bakterien geerntet werden, indem zuerst die Sporen und Kristalle von *B. thuringiensis* aus der Fermentationsbrühe durch Mittel, welche auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt sind, abgetrennt werden. Die gewonnenen Sporen und Kristalle von *B. thuringiensis* können durch die Zugabe von Tensiden, Dispergiemitteln, inerten Trägern und anderen Komponenten, um die Handhabung und Anwendung für bestimmte Zielschädlinge zu erleichtern, zu einem benetzbaren Pulver, einem flüssigen Konzentrat, Granulaten oder anderen Formulierungen zubereitet werden. Die Formulierungs- und Anwendungsverfahren sind auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt und werden zusammen mit handelsüblichen Stämmen von *B. thuringiensis* (HD-1), welche gegenüber Lepidoptera-Insekten, z. B. Raupen, aktiv sind, angewendet.

5.2 Rekombinante Wirtszellen zur Expression von Cry-Genen

[0179] Die Nucleotidsequenzen der vorliegenden Erfindung können in eine große Vielzahl von mikrobiellen Wirten eingeschleust werden. Die Expression des Toxingens resultiert, direkt oder indirekt, in der intrazellulären Herstellung und Beibehaltung des Pestizids. Mit geeigneten Wirten, z. B. *Pseudomonas*, können die Mikroben zu den Stellen, wo sie sich in Lepidoptera-Insekten vermehren oder durch die Insekten aufgenommen werden, gebracht werden. Das Ergebnis ist eine Bekämpfung der unerwünschten Insekten. Alternativ kann die Mikrobe, welche das Toxingen trägt, unter Bedingungen behandelt werden, welche die Aktivität des in der Zelle produzierten Toxins verlängern. Die behandelte Zelle kann dann in der Umgebung eines oder mehrerer Zielschädlinge ausgebracht werden. Das erhaltene Produkt behält die Toxizität des *B. thuringiensis*-Toxins bei.

[0180] Geeignete Wirtszellen, wobei die das Pestizid enthaltenden Zellen behandelt werden, um die Aktivität des Toxins in der Zelle zu verlängern, wenn die behandelte Zelle anschließend in die Umgebung eines oder mehrerer Zielschädlinge ausgebracht wird, können entweder Prokaryonten oder Eukaryonten einschließen, die normalerweise auf solche Zellen begrenzt sind, welche keine Substanzen produzieren, die für höhere Organismen wie Säuger toxisch sind. Jedoch können Organismen, welche Substanzen produzieren, die für höhere Organismen toxisch sind, verwendet werden, wenn das Toxin instabil ist oder die Einsatzmenge ausreichend gering ist, um jede Möglichkeit einer Toxizität für einen Säugerwirt zu vermeiden. Als Wirte sind die Pro-

karyonten und die niederen Eukaryonten, wie Pilze, von besonderem Interesse. Veranschaulichende Prokaryonten, sowohl Gram-negative als auch Gram-positive, schließen Enterobacteriaceae wie *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella* und *Proteus*; Bacillaceae; Rhizobiceae wie *Rhizobium*; Spirillaceae wie Photobakterien, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; Lactobacillaceae; Pseudomonadaceae wie *Pseudomonas* und *Acetobacter*; Azotobacteraceae, Actinomycetales und Nitrobacteracea ein. Unter den Eukaryonten befinden sich Pilze wie *Phycomycetes* und *Ascomycetes*, welche Hefen wie *Saccharomyces* und *Schizosaccharomyces* einschließen; und Basidiomycetes-Hefen wie *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces* und dergleichen.

[0181] Eigenschaften von besonderem Interesse bei der Auswahl einer Wirtszelle für Herstellungszwecke schließen die Einfachheit der Einschleusung des *B. thuringiensis*-Gens in den Wirt, die Verfügbarkeit von Expressionssystemen, die Expressionseffizienz, die Stabilität des Pestizids in dem Wirt und das Vorhandensein von zusätzlichen genetischen Eigenschaften ein. Eigenschaften von Interesse zur Verwendung als eine Pestizidmikrokapsel schließen schützende Eigenschaften für das Pestizid, wie dicke Zellwände, eine Pigmentation und die intrazelluläre Verpackung oder Bildung von Einschlußkörpern; eine Blattaffinität; eine fehlende Toxizität gegenüber Säugern; ein Anreiz für die Aufnahme durch Schädlinge; eine einfache Abtötung und Fixierung ohne eine Schädigung des Toxins; und dergleichen ein. Andere Gesichtspunkte schließen die Einfachheit der Formulierung und Handhabung, die Wirtschaftlichkeit, die Lagerfähigkeit und dergleichen ein.

[0182] Wirtsorganismen von besonderem Interesse schließen Hefen wie *Rhodotorula* sp., *Aureobasidium* sp., *Saccharomyces* sp. und *Sporobolomyces* sp.; phylloplane Organismen wie *Pseudomonas* sp., *Erwinia* sp. und *Flavobacterium* sp.; oder andere solche Organismen wie *Escherichia*, *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. und dergleichen ein. Spezifische Organismen schließen *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Streptomyces lividans* und dergleichen ein.

[0183] Die Behandlung der Mikrobenzelle, z. B. einer Mikrobe, enthaltend das *B. thuringiensis*-Toxingen, kann durch chemische oder physikalische Mittel oder durch eine Kombination von chemischen und/oder physikalischen Mitteln erfolgen, so lange die Technik weder die Eigenschaften des Toxins nachteilig beeinflusst, noch die Fähigkeit der Zellen im Hinblick auf den Schutz des Toxins vermindert. Beispiele für chemische Reagenzien sind Halogenierungsmittel, besonders Halogene der Ordnungszahl 17–80. Insbesondere kann Iod unter milden Bedingungen und für einen ausreichenden Zeitraum, um die gewünschten Ergebnisse zu erzielen, verwendet werden. Andere geeignete Techniken schließen die Behandlung mit Aldehyden wie Formaldehyd und Glutaraldehyd; anti-infektiösen Mitteln wie Zephiranchlorid und Cetylpyridiniumchlorid; Alkoholen wie Isopropyl und Ethanol; verschiedenen histologischen Fixierungsmitteln wie Lugolsche Iodlösung, Bouinsche Fixierungslösung und Hellysche Fixierungslösung (vg. z. B. Humason, 1967); oder eine Kombination von physikalischen (Hitze) und chemischen Mitteln, welche die Aktivität des in der Zelle produzierten Toxins erhalten und verlängern, wenn die Zelle an einen geeigneten Wirt verabreicht wird, ein. Beispiele für physikalische Mittel sind eine Bestrahlung mit kurzen Wellenlängen, wie γ -Strahlung und Röntgenstrahlung, Einfrieren, UV-Bestrahlung, Gefriertrocknung und dergleichen. Die verwendeten Zellen sind üblicherweise intakt und liegen bei der Behandlung im wesentlichen in der proliferativen Form vor, anstatt in einer Sporenform, obwohl in einigen Fällen Sporen verwendet werden können.

[0184] Wenn das *B. thuringiensis*-Toxingen mit Hilfe eines geeigneten Vektors in einen mikrobiellen Wirt eingeschleust wird und der Wirt in einem lebenden Stadium in die Umwelt ausgebracht wird, ist es wesentlich, daß bestimmte Wirtsmikroben verwendet werden. Es werden Mikroorganismen ausgewählt, die bekanntermaßen die "Phytosphäre" (phylloplan, phyllosphär, rhizosphär und/oder rhizoplan) einer oder mehrerer Nutzpflanzen von Interesse besiedeln. Diese Mikroorganismen werden so gewählt, daß sie in der Lage sind, in der besonderen Umgebung (Nutzpflanze oder andere Insektenhabitate) mit den Wildtyp-Mikroorganismen zu konkurrieren, für eine stabile Beibehaltung und Expression des Gens, welches das Polypeptid-Pestizid codiert, zu sorgen und wünschenswerterweise für einen besseren Schutz des Pestizids vor einem umweltbedingten Abbau und einer umweltbedingten Inaktivierung zu sorgen.

[0185] Eine große Zahl von Mikroorganismen ist bekannt, welche die Blattebene (die Oberfläche der Pflanzenblätter) und/oder die Rhizosphäre (den Boden, welcher die Pflanzenwurzeln umgibt) einer großen Vielzahl von wichtigen Nutzpflanzen bewohnt. Diese Mikroorganismen schließen Bakterien, Algen und Pilze ein. Von besonderem Interesse sind Mikroorganismen wie Bakterien, z. B. der Gattung *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Zanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* und *Alcaligenes*; Pilze, besonders Hefen, z. B. der Gattung *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*

und *Aureobasidium*. Von besonderem Interesse sind solche phytosphären Bakterienarten wie *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes eutrophus* und *Azotobacter vinlandii*; sowie phytosphäre Hefearten wie *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoros*, *Kluyveromyces veronae* und *Aureobasidium pullulans*.

5.3 Definitionen

- [0186]** Die folgenden Worte und Ausdrücke haben die nachstehend angegebenen Bedeutungen.
- [0187]** Breites Spektrum: verweist auf einen großen Bereich von Insektenarten. Insektizidaktivität mit breitem Spektrum: Toxizität gegenüber einem großen Bereich von Insektenarten.
- [0188]** Expression: Die Kombination von intrazellulären Prozessen einschließlich Transkription und Translation, welche ein codierendes DNA-Molekül wie ein Strukturgen durchläuft, um ein Polypeptid herzustellen.
- [0189]** Insektizidaktivität: Toxizität gegenüber Insekten.
- [0190]** Insektizidspezifität: Die durch ein Kristallprotein gezeigte Toxizität gegenüber mehreren Insektenarten.
- [0191]** Spezifität innerhalb einer Ordnung: Die Toxizität eines bestimmten Kristallproteins gegenüber Insektenarten innerhalb einer Insektenordnung (z. B. der Ordnung Lepidoptera).
- [0192]** Spezifität zwischen Ordnungen: Die Toxizität eines bestimmten Kristallproteins gegenüber Insektenarten aus verschiedenen Ordnungen (z. B. der Ordnungen Lepidoptera und Diptera).
- [0193]** LC_{50} : Die letale Konzentration eines Kristallproteins, welche eine 50%-ige Mortalität der behandelten Insekten hervorruft.
- [0194]** LC_{95} : Die letale Konzentration eines Kristallproteins, welche eine 95%-ige Mortalität der behandelten Insekten hervorruft.
- [0195]** Promotor: Eine Erkennungsstelle in einer DNA-Sequenz oder einer Gruppe von DNA-Sequenzen, welche ein Expressionskontrollelement für ein Strukturgen vorsieht und an welche eine RNA-Polymerase spezifisch bindet und die RNA-Synthese (Transkription) des Gens einleitet.
- [0196]** Regeneration: Verfahren zur Züchtung einer Pflanze aus einer Pflanzenzelle (z. B. einem Pflanzenprotoplasten oder -explantat).
- [0197]** Strukturgen: Ein Gen, welche exprimiert wird, um ein Polypeptid herzustellen.
- [0198]** Transformation: Ein Verfahren zur Einschleusung einer exogenen DNA-Sequenz (z. B. eines Vektors oder eines rekombinanten DNA-Moleküls) in eine Zelle oder einen Protoplasten, worin die exogene DNA in ein Chromosom eingebaut wird oder zu einer autonomen Replikation fähig ist.
- [0199]** Transformierte Zelle: Eine Zelle, deren DNA durch die Einschleusung eines exogenen DNA-Moleküls in die Zelle verändert worden ist.
- [0200]** Transgen: Ein exogenes Gen, welches, wenn in das Genom einer Wirtszelle eingebaut durch ein Verfahren wie Transformation, Elektroporation, Teilchenbeschuss und dergleichen, durch die Wirtszelle exprimiert und in das Genom der Zellen integriert wird, so daß das Merkmal oder die Merkmale, welche durch die Expression des Transgens hervorgerufen werden, an die Nachkommen der transformierten Zelle vererbt werden.
- [0201]** Transgene Zelle: Irgendeine Zelle, abgeleitet oder regeneriert aus einer transformierten Zelle oder abgeleitet aus einer transgenen Zelle. Beispielhafte transgene Zellen schließen Pflanzenkalluse, abgeleitet aus einer transformierten Pflanzenzelle, und besonders Zellen wie Blatt-, Wurzel- oder Stammzellen, z. B. somatische Zellen, oder reproduktive Zellen (Keimzellen), erhalten aus einer transgenen Pflanze, ein.
- [0202]** Transgene Pflanze: Eine Pflanze oder ein Nachkomme hiervon, abgeleitet aus einer transformierten

Pflanzenzelle oder einem Protoplasten, wobei die Pflanzen-DNA ein eingeschleustes exogenes DNA-Molekül enthält, welches ursprünglich nicht in einer nativen, nicht-transgenen Pflanze derselben Art vorhanden ist. Die Begriffe "transgene Pflanze" und "transformierte Pflanze" sind auf dem Fachgebiet zuweilen als synonyme Begriffe verwendet worden, um eine Pflanze zu definieren, deren DNA ein exogenes DNA-Molekül enthält. Jedoch nimmt man an, daß es wissenschaftlich korrekter ist, auf eine regenerierte Pflanze oder einen Kallus, welche(r) aus einer transformierten Pflanzenzelle oder einem Protoplasten erhalten wurde, als eine transgene Pflanze zu verweisen, und dieser Wortgebrauch wird hierin befolgt.

[0203] Vektor: Ein DNA-Molekül, welches zur Replikation in einer Wirtszelle fähig ist und/oder welches mit einem anderen DNA-Segment funktionell verbunden werden kann, um die Replikation des verknüpften Segments zu bewirken. Ein Plasmid ist ein beispielhafter Vektor.

5.4 Sonden und Primer

[0204] Gemäß einem anderen Aspekt ermöglicht die durch die Erfindung bereitgestellte DNA-Sequenzinformation die Herstellung von relativ kurzen DNA (oder RNA)-Sequenzen, welche die Fähigkeit besitzen, mit Gensequenzen der ausgewählten hierin offenbarten Polynucleotide spezifisch zu hybridisieren. Gemäß diesen Aspekten werden Nucleinsäuresonden mit einer geeigneten Länge unter Berücksichtigung einer ausgewählten Kristallprotein-Gensequenz, z. B. einer Sequenz wie die in SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 33 gezeigten, hergestellt. Die Fähigkeit solcher Nucleinsäuresonden, mit einer Gensequenz, welche ein Kristallprotein codiert, spezifisch zu hybridisieren, macht sie für eine Vielzahl von Ausführungsformen besonders nützlich. Besonders bedeutsam ist, daß die Sonden in einer Vielzahl von Assays zum Nachweis der Anwesenheit von komplementären Sequenzen in einer bestimmten Probe verwendet werden können.

[0205] In bestimmten Ausführungsformen ist die Verwendung von Oligonucleotid primern vorteilhaft. Die Sequenz von solchen Primern wird unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Polynucleotids zur Verwendung beim Nachweis, bei der Amplifikation oder Mutation eines definierten Segments eines Kristallprotein-Gens aus *B. thuringiensis* mittels der PCRTM-Technologie entworfen. Segmente von verwandten Kristallprotein-Genen aus anderen Spezies können auch mittels PCRTM unter Verwendung solcher Primer amplifiziert werden.

[0206] Um bestimmte der erfindungsgemäßen Vorteile bereitzustellen, schließt eine bevorzugte Nucleinsäuresequenz, welche für Hybridisierungsstudien oder -tests verwendet wird, Sequenzen ein, welche zu mindestens einem Bereich von etwa 14 bis 30 Nucleotiden einer Sequenz, welche ein Kristallprotein codiert, wie die in SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 33 gezeigten, komplementär sind. Eine Länge von mindestens 14 Nucleotiden trägt dazu bei, sicherzustellen, daß das Fragment eine ausreichende Länge besitzt, um ein Doppelstrangmolekül zu bilden, welches sowohl stabil als auch selektiv ist. Moleküle mit komplementären Sequenzen über Bereiche mit einer Länge von mehr als 14 Basen werden im allgemeinen trotzdem bevorzugt, um die Stabilität und Selektivität des Hybrids zu erhöhen und auf diese Weise die Qualität und die Ordnung der erhaltenen spezifischen Hybridmoleküle zu verbessern. Im allgemeinen wird bevorzugt, Nucleinsäuremoleküle zu konstruieren, die Gen-komplementäre Bereiche von 14 bis 20 Nucleotiden oder auch mehr, falls gewünscht, aufweisen. Solche Fragmente können zum Beispiel durch direkte Synthese des Fragments durch chemische Mittel, durch Anwendung einer Nucleinsäurereproduktionstechnik, wie der PCRTM-Technik von US-Patent 4,683,195 und 4,683,202, oder durch das Ausschneiden ausgewählter DNA-Fragmente aus rekombinanten Plasmiden, enthaltend geeignete Insertionen und geeignete Restriktionsstellen, ohne weiteres hergestellt werden.

5.5 Expressionsvektoren

[0207] Die vorliegende Erfindung schließt einen Expressionsvektor ein, der ein erfindungsgemäßes Polynucleotid umfaßt. So ist in einer Ausführungsform ein Expressionsvektor ein isoliertes und gereinigtes DNA-Molekül, umfassend einen Promotor, welcher funktionell verbunden ist mit einer codierenden Region, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid codiert, wobei die codierende Region mit einer Transkriptionsterminationsregion funktionell verbunden ist, wodurch der Promotor die Transkription der codierenden Region steuert.

[0208] So wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff "funktionell verbunden", daß ein Promotor mit einer codierenden Region in einer solchen Weise verknüpft ist, daß die Transkription der codierenden Region durch den Promotor kontrolliert und reguliert wird. Mittel zur funktionellen Verbindung eines Promotors mit einer codierenden Region sind auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt.

[0209] Promotoren, welche in Bakterien wirksam sind, sind auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt. Beispielhafte und bevorzugte Promotoren für die Bacillus-Kristallproteine schließen die sigA-, sigE- und sigK-Genpromotoren ein. Alternativ können die nativen, durch Mutagenese veränderten oder rekombinanten Promotoren eines Gens, welches ein Kristallprotein codiert, selbst verwendet werden.

[0210] Wenn ein erfindungsgemäßer Expressionsvektor zur Transformation einer Pflanze verwendet werden soll, wird ein Promotor gewählt, welcher die Fähigkeit besitzt, die Expression in Pflanzen zu steuern. Promotoren, welche in Pflanzen wirksam sind, sind auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt. Bei der Expression des Polypeptids in Pflanzen sind Promotoren nützlich, welche induzierbar, viral, synthetisch, konstitutiv, wie beschrieben (Poszkowski et al., 1989; Odell et al., 1985), und zeitlich reguliert, räumlich reguliert und räumlich-zeitlich reguliert (Chau et al., 1989) sind.

[0211] Ein Promotor wird auch im Hinblick auf seine Fähigkeit ausgewählt, die Transkriptionsaktivität für die codierende Region der transformierten Pflanzenzelle oder der transgenen Pflanze zu regulieren. Strukturgene können durch eine Vielzahl von Promotoren in Pflanzengewebe gesteuert werden. Promotoren können nahezu konstitutiv sein, wie der CaMV35S-Promotor, oder gewebespezifische oder entwicklungspezifische Promotoren, welche zweikeimblättrige Pflanzen oder einkeimblättrige Pflanzen beeinflussen.

[0212] Wenn der Promotor ein nahezu konstitutiver Promotor wie CaMV35S ist, wird eine Erhöhung der Polypeptidexpression in einer Vielzahl von transformierten Pflanzengewebe nachgewiesen (z. B. Kallus, Blatt, Samen und Wurzel). Alternativ können die Effekte einer Transformation unter Verwendung von integrierenden Pflanzenvektoren, welche einen gewebespezifischen Promotor enthalten, zu spezifischen Pflanzengewebe geleitet werden.

[0213] Ein beispielhafter gewebespezifischer Promotor ist der Lectin-Promotor, welcher für Samengewebe spezifisch ist. Das Lectinprotein in Sojabohnensamen wird durch ein einziges Gen (Lel) codiert, welches nur während der Samenreifung exprimiert wird und etwa 2 bis etwa 5% der Gesamt-mRNA des Samens ausmacht. Das Lectin-Gen und der samenspezifische Promotor sind vollständig charakterisiert und zur Steuerung der samenspezifischen Expression in transgenen Tabakpflanzen verwendet worden (Vodkin et al., 1983; Lindstrom et al., 1990).

[0214] Ein Expressionsvektor, enthaltend eine codierende Region, welche ein Polypeptid von Interesse codiert, wird derart konstruiert, daß er sich unter der Kontrolle des Lectin-Promotors befindet, und dieser Vektor wird zum Beispiel durch ein Protoplasten-Transformationsverfahren (Dhir et al., 1991) in Pflanzen eingeschleust. Die Expression des Polypeptids wird spezifisch auf die Samen der transgenen Pflanze ausgerichtet.

[0215] Eine transgene Pflanze der vorliegenden Pflanze, welche aus einer Pflanzenzelle erzeugt wurde, die mit einem gewebespezifischen Promotor transformiert ist, kann mit einer zweiten transgenen Pflanze, welche sich aus einer Pflanzenzelle entwickelt hat, die mit einem anderen gewebespezifischen Promotor transformiert wurde, gekreuzt werden, um eine hybride transgene Pflanze zu erzeugen, welche die Effekte einer Transformation in mehr als einem spezifischen Gewebe zeigt.

[0216] Beispielhafte gewebespezifische Promotoren sind Mais-Sucrosesynthetase I (Yang et al., 1990), Mais-Alkoholdehydrogenase I (Vogel et al., 1989), Mais-Leichternte-Komplex (Simpson, 1986), Mais-Hitzeschockprotein (Odell et al., 1985), die kleine Untereinheit der RuBP-Carboxylase aus der Erbse (Poulsen et al., 1986; Cashmore et al., 1983), Ti-Plasmid-Mannopinsynthase (Langridge et al., 1989), Ti-Plasmid-Nopalinsynthase (Langridge et al., 1989), Petunien-Chalconisomerase (Van Tunen et al., 1988), das glycinreiche Bohnen-Protein I (Keller et al., 1989), das CaMV35S-Transkript (Odell et al., 1985) und Kartoffel-Patatin (Wenzler et al., 1989). Bevorzugte Promotoren sind der Blumenkohlmosaikvirus (CaMV35S)-Promotor und die kleine Untereinheit S-E9 des RuBP-Carboxylase-Promotors.

[0217] Die Wahl eines Expressionsvektors und schließlich die funktionelle Verbindung einer Region, welche ein Polypeptid codiert, mit einem bestimmten Promotor hängt direkt von den gewünschten funktionellen Eigenschaften ab, z. B. von dem Bereich und der zeitlichen Abstimmung der Proteinexpression und der zu transformierenden Wirtszelle. Dies sind hinreichend bekannte Einschränkungen, welche mit dem Fachgebiet der Konstruktion von rekombinanten DNA-Molekülen verbunden sind. Jedoch ist ein bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung nützlicher Vektor in der Lage, die Expression der Region, welche ein Polypeptid codiert, mit welcher er funktionell verbunden ist, zu steuern.

[0218] Typische Vektoren, welche zur Expression von Genen in höheren Pflanzen nützlich sind, sind auf dem

Fachgebiet hinreichend bekannt und schließen Vektoren ein, welche aus dem beschriebenen tumorinduzierenden (Ti) Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* (Rogers et al., 1987) abgeleitet sind. Jedoch ist bekannt, daß mehrere andere integrierende Pflanzenvektorsysteme in Pflanzen wirksam sind, einschließlich der beschriebene pCaMVCN-Transferkontrollvektor (Fromm et al., 1985). pCaMVCN (erhältlich von Pharmacia, Piscataway, NJ) schließt den Blumenkohlmosaikvirus-CaMV35S-Promotor ein.

[0219] In bevorzugten Ausführungsformen schließt der zur Expression des Polypeptids verwendete Vektor einen Selektionsmarker ein, welcher in einer Pflanzenzelle wirksam ist, vorzugsweise einen Arzneistoffresistenz-Selektionsmarker. Ein bevorzugter Arzneistoffresistenz-Marker ist das Gen, dessen Expression eine Kanamycin-Resistenz zur Folge hat; d. h. das beschriebene (Rogers et al., 1988) chimäre Gen, welches den Nopalinsynthase-Promotor, die Tn5-Neomycin-Phosphotransferase II (nptII) und die 3'-nichttranslatierte Region der Nopalinsynthase enthält.

[0220] Die RNA-Polymerase transkribiert eine codierende DNA-Sequenz über eine Stelle, wo eine Polyadenylierung auftritt. Typischerweise dienen DNA-Sequenzen, welche einige Hundert Basenpaare stromabwärts der Polyadenylierungsstelle angeordnet sind, dazu, die Transkription zu terminieren. Solche DNA-Sequenzen werden hierin als Transkriptionsterminationsregionen bezeichnet. Solche Regionen sind für eine wirksame Polyadenylierung einer transkribierten Boten-RNA (mRNA) erforderlich.

[0221] Mittel zur Herstellung von Expressionsvektoren sind auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt. Expressionsvektoren (Transformationsvektoren), welche zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, und Verfahren zur Herstellung solcher Vektoren sind in den US-Patenten 4,971,908, 4,940,835, 4,769,061 und 4,757,011 beschrieben. Solche Vektoren können so modifiziert werden, daß sie eine erfindungsgemäße codierende Sequenz einschließen.

[0222] Eine Vielzahl von Verfahren ist entwickelt worden, um eine DNA mit Vektoren über komplementäre kohäsive Enden oder glatte Enden funktionell zu verbinden. Zum Beispiel können komplementäre Homopolymerbereiche an das zu inserierende DNA-Segment und an die Vektor-DNA angehängt werden. Der Vektor und das DNA-Segment werden dann durch Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären homopolymeren Schwänzen verbunden, um rekombinante DNA-Moleküle zu bilden.

[0223] Eine codierende Region, welche ein Polypeptid codiert, das die Fähigkeit besitzt, eine Insektizidaktivität auf eine Zelle zu übertragen, ist vorzugsweise ein chimäres Gen, welches ein *B. thuringiensis*-Kristallprotein codiert. In bevorzugten Ausführungsformen weist ein solches Polypeptid die Aminosäurerestsequenz von SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34, oder eines funktionellen Gegenstücks einer oder mehrerer dieser Sequenzen auf. Im Einklang mit solchen Ausführungsformen wird eine codierende Region, umfassend die DNA-Sequenz von SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 33, ebenfalls bevorzugt.

5.6 Transformierte oder transgene Pflanzenzellen

[0224] Ein Bakterium, eine Hefezelle oder eine Pflanzenzelle oder eine Pflanze, transformiert mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor, ist ebenfalls eingeschlossen. Ein(e) transgene(s) Bakterium, Hefezelle, Pflanzenzelle oder Pflanze, abgeleitet aus einer solchen transformierten oder transgenen Zelle ist auch eingeschlossen. Typischerweise ähneln die Mittel zur Transformation solchen hinreichend bekannten Mitteln, welche verwendet werden, um andere Bakterien oder Hefen wie *E. coli* oder *S. cerevisiae* zu transformieren.

[0225] Verfahren zur DNA-Transformation von Pflanzenzellen schließen die *Agrobacterium*-vermittelte Pflanzentransformation, die Protoplastentransformation, den Gentransfer in Pollen, die Injektion in Fortpflanzungsorgane, die Injektion in unreife Embryonen und den Teilchenbeschuß ein. Jedes dieser Verfahren hat deutliche Vorteile und Nachteile. Folglich muß ein bestimmtes Verfahren zur Einschleusung von Genen in eine bestimmte Pflanzenart nicht notwendigerweise für eine andere Pflanzenart das wirksamste Verfahren sein, aber es ist hinreichend bekannt, welche Verfahren für eine bestimmte Pflanzenart nützlich sind.

[0226] Es gibt viele Verfahren zur Einschleusung von transformierenden DNA-Segmenten in Zellen, aber nicht alle sind zur Übertragung von DNA in Pflanzenzellen geeignet. Man nimmt an, daß geeignete Verfahren praktisch jedes Verfahren einschließen, durch das eine DNA in eine Zelle eingeschleust werden kann, wie durch Infektion mit *A. tumefaciens* und verwandten *Agrobacterium*-Spezies, durch direkte Übertragung von DNA, wie zum Beispiel durch eine PEG-vermittelte Transformation von Protoplasten (Omirulleh et al., 1993), durch Trocknung/Inhibition-vermittelte DNA-Aufnahme, durch Elektroporation, durch Rühren mit Siliciumcar-

bidfasern, durch Beschleunigung von DNA-beschichteten Teilchen, etc. In bestimmten Ausführungsformen werden Beschleunigungsverfahren bevorzugt und schließen zum Beispiel den Mikroprojektilbeschuß und dergleichen ein.

[0227] Die Technik zur Einschleusung von DNA in Zellen ist den Fachleuten hinreichend bekannt. Vier allgemeine Verfahren zur Übertragung eines Gens in Zellen sind beschrieben worden: (1) chemische Verfahren (Graham und van der Eb, 1973); (2) physikalische Verfahren wie die Mikroinjektion (Capecchi, 1980), Elektroporation (Wong und Neumann, 1982; Fromm et al., 1985) und die Genkanone (Johnston und Tang, 1994; Fynan et al., 1993); (3) virale Vektoren (Clapp, 1993; Lu et al., 1993; Eglitis und Anderson, 1988a; 1988b); und (4) Rezeptor-vermittelte Mechanismen (Curiel et al., 1991, 1992; Wagner et al., 1992).

5.6.1 Elektroporation

[0228] Die Anwendung von kurzen Hochspannungsimpulsen auf eine Vielzahl von tierischen und pflanzlichen Zellen resultiert in der Bildung von Poren mit einer Größe im Nanometerbereich in der Plasmamembran. Die DNA wird entweder über diese Poren oder als eine Folge der Umverteilung von Membrankomponenten, welche den Verschuß der Poren begleitet, direkt in das Zellcytoplasma aufgenommen. Die Elektroporation ist außerordentlich wirksam und kann sowohl zur vorübergehenden Expression von klonierten Genen als auch zur Etablierung von Zelllinien, welche integrierte Kopien des Gens von Interesse tragen, verwendet werden. Die Elektroporation bringt im Gegensatz zur Calciumphosphat-vermittelten Transfektion und Protoplastenfusion häufig Zelllinien hervor, die eine integrierte Kopie oder meistens einige integrierte Kopien der fremden DNA tragen.

[0229] Die Einschleusung von DNA mit Hilfe der Elektroporation ist den Fachleuten hinreichend bekannt. Bei diesem Verfahren werden bestimmte die Zellwand abbauende Enzyme, wie Pektin abbauende Enzyme, verwendet, um die Ziel-Empfängerzellen für eine Transformation durch Elektroporation empfindlicher zu machen als unbehandelte Zellen.

[0230] Alternativ werden Empfängerzellen durch eine mechanische Verletzung für eine Transformation empfindlicher gemacht. Um eine Transformation mittels Elektroporation zu bewirken, kann man entweder zerreibbare Gewebe wie eine Suspensionskultur von Zellen oder einen embryonalen Kallus verwenden, oder man kann alternativ unreife Embryonen oder andere organisierte Gewebe direkt transformieren. Die Zellwände der ausgewählten Zellen würden teilweise abgebaut, indem man sie Pektin abbauenden Enzymen (Pektolyasen) oder einer mechanischen Verletzung in einer kontrollierten Art und Weise ausgesetzt. Solche Zellen wären dann für einen DNA-Transfer durch Elektroporation empfänglich, welcher in diesem Stadium ausgeführt werden kann, und die transformierten Zellen werden dann durch ein geeignetes Selektions- oder Screeningprotokoll, abhängig von der Art der neu eingebauten DNA, identifiziert.

5.6.2 Mikroprojektilbeschuß

[0231] Ein weiteres vorteilhaftes Verfahren zur Übertragung von transformierenden DNA-Segmenten in Pflanzenzellen ist der Mikroprojektilbeschuß. Bei diesem Verfahren können Teilchen mit Nucleinsäuren beschichtet und durch eine vorwärtstreibende Kraft in Zellen übertragen werden. Beispielhafte Teilchen schließen solche ein, welche aus Wolfram, Gold, Platin und dergleichen bestehen.

[0232] Ein Vorteil des Mikroprojektilbeschusses, zusätzlich dazu, daß er ein wirksames Mittel für eine reproduzierbare, stabile Transformation von einkeimblättrigen Pflanzen ist, ist, daß weder die Isolierung von Protoplasten (Cristou et al., 1988), noch eine Empfindlichkeit gegen eine Agrobacterium-Infektion erforderlich sind. Ein veranschaulichende Ausführungsform eines Verfahrens zur Übertragung von DNA in Maiszellen mittels Beschleunigung ist eine Biolistics Particle Delivery System-Vorrichtung, welche verwendet werden kann, um DNA-beschichtete Teilchen oder Zellen durch einen Schirm, wie einen Edelstahlschirm oder Nytex-Schirm, auf eine Filteroberfläche, bedeckt mit in Suspension gezüchteten Maiszellen, hin zu bewegen. Der Schirm zerstreut die Teilchen, so daß sie nicht in großen Aggregaten in die Empfängerzellen übertragen werden. Man nimmt an, daß ein Schirm, welcher zwischen der Projektilapparatur und den zu beschießenden Zellen angeordnet ist, die Größe von Projektilaggregaten verringert und zu einer höheren Transformationshäufigkeit durch die Verringerung einer durch die Empfängerzellen erlittenen Schädigung durch Projektile, welche zu groß sind, beiträgt.

[0233] Für den Beschuß werden Zellen in Suspension vorzugsweise auf Filtern oder einem festen Kulturmedium konzentriert. Alternativ können unreife Embryonen oder andere Zielzellen auf einem festen Kulturmedium

angeordnet werden. Die zu beschießenden Zellen werden in einem geeigneten Abstand unterhalb der Makroprojektil-Abbremsplatte positioniert. Falls gewünscht, werden auch ein oder mehrere Schirme zwischen der Beschleunigungsvorrichtung und den zu beschießenden Zellen positioniert. Durch die Anwendung der hierin dargelegten Techniken kann man bis zu 1.000 oder mehr Loci von Zellen, welche vorübergehend ein Marker-gen exprimieren, erhalten. Die Anzahl der Zellen in einem Locus, welche das exogene Genprodukt 48 Stunden nach dem Beschuß exprimieren, reicht oft von 1 bis 10 und durchschnittlich 1 bis 3.

[0234] Bei der Beschußtransformation kann man die Kulturbedingungen vor dem Beschuß und die Beschußparameter optimieren, um die maximale Anzahl an stabilen Transformanten zu erhalten. Sowohl die physikalischen als auch die biologischen Parameter für den Beschuß sind bei dieser Technik wichtig. Physikalische Faktoren sind solche, welche die Manipulation des DNA/Mikroprojektil-Präzipitats beinhalten, oder solche, welche den Flug und die Geschwindigkeit von entweder den Makro- oder Mikroprojektilen beeinflussen. Biologische Faktoren schließen alle Schritte ein, welche mit der Manipulation von Zellen vor und unmittelbar nach dem Beschuß verbunden sind, die osmotische Einstellung von Zielzellen, um dazu beizutragen, das mit dem Beschuß verbundene Trauma zu lindern, und auch die Art der transformierenden DNA, wie eine linearisierte DNA oder intakte, stark verdrillte Plasmide. Man nimmt an, daß Manipulationen vor dem Beschuß für eine erfolgreiche Transformation von unreifen Embryonen besonders wichtig sind.

[0235] Demgemäß wird erwartet, daß es wünschenswert sein kann, verschiedene der Beschußparameter in Kleinversuchen anzupassen, um die Bedingungen zu optimieren. Es kann besonders wünschenswert sein, physikalische Parameter wie Spaltabstand, Fluglänge, Gewebeabstand und Heliumdruck einzustellen. Man kann auch die Traumareduktionsfaktoren (TRFs) durch die Modifizierung von Bedingungen, welche den physiologischen Zustand der Empfängerzellen beeinflussen und welche daher die Transformations- und Integrationseffizienzen beeinflussen können, minimieren. Zum Beispiel kann der osmotische Zustand, die Gewebehdratation und das Subkulturstadium oder der Zellzyklus der Empfängerzellen für eine optimale Transformation angepaßt werden. Die Ausführung von anderen routinemäßigen Anpassungen ist für Fachleute im Hinblick auf die vorliegenden Offenbarung ersichtlich.

[0236] Die Verfahren einer Teilchen-vermittelten Transformation sind den Fachleuten hinreichend bekannt. US-Patent 5,015,580 beschreibt die Transformation von Sojabohnen mittels einer solchen Technik.

5.6.3 Agrobacterium-vermittelter Transfer

[0237] Der Agrobacterium-vermittelter Transfer ist ein häufig verwendbares System für die Einschleusung von Genen in Pflanzenzellen, da die DNA in ganze Pflanzengewebe eingeschleust werden kann, wodurch die Notwendigkeit für die Regeneration einer intakten Pflanze aus einem Protoplasten umgangen wird. Die Verwendung von Agrobacterium-vermittelten Pflanzenintegrationsvektoren, um eine DNA in Pflanzenzellen einzuschleusen, ist auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt. Vgl. zum Beispiel die beschriebenen Verfahren (Fralley et al., 1985; Rogers et al., 1987). Die gentechnische Veränderung von Baumwollpflanzen mittels des Agrobacterium-vermittelten Transfers ist in US-Patent 5,004,862 beschrieben, während die Transformation von Salatpflanzen in US-Patent 5,349,124 beschrieben ist. Ferner ist die Integration der Ti-DNA ein relativ genauer Prozeß, welcher wenige Umlagerungen zur Folge hat. Die zu übertragende DNA-Region ist durch die Grenzsequenzen definiert, und üblicherweise wird eine dazwischenliegende DNA in das Pflanzengenom inseriert, wie beschrieben wurde (Spielmann et al., 1986; Jorgensen et al., 1987).

[0238] Moderne Agrobacterium-Transformationsvektoren sind zur Replikation in *E. coli* sowie Agrobacterium fähig, was geeignete Manipulationen ermöglicht, wie beschrieben wurde (Klee et al., 1985). Außerdem haben jüngste technische Fortschritte bezüglich von Vektoren für den Agrobacterium-vermittelten Gentransfer die Anordnung von Genen und Restriktionsstellen in den Vektoren verbessert, um die Konstruktion von Vektoren zu erleichtern, welche in der Lage sind, verschiedene Gene, welche ein Polypeptid codieren, zu exprimieren. Die beschriebenen Vektoren (Rogers et al., 1987) besitzen geeignete Multilinkerregionen, welche von einem Promotor und einer Polyadenylierungsstelle für die direkte Expression von inserierten Genen, welche ein Polypeptid codieren, umgeben sind, und sind für die vorliegenden Zwecke geeignet. Zusätzlich können Agrobacterium-Zellen, enthaltend sowohl "bewaffnete" als auch "unbewaffnete" Ti-Gene, für die Transformation verwendet werden. Dieses Verfahren ist bei solchen Pflanzenarten, bei denen eine Agrobacterium-vermittelte Transformation wirksam ist, wegen der günstigen und definierten Art des Gentransfers das Verfahren der Wahl.

[0239] Die Agrobacterium-vermittelte Transformation von Blattscheiben und anderen Geweben wie Kotyledonen und Hypokotyledonen scheint auf Pflanzen begrenzt zu sein, welche Agrobacterium natürlicherweise infiziert. Die Agrobacterium-vermittelte Transformation ist bei zweikeimblättrigen Pflanzen am wirksamsten. We-

nige einkeimblättrige Pflanzen scheinen natürliche Wirte für Agrobacterium zu sein, obwohl transgene Pflanzen in Spargel unter Verwendung von Agrobacterium-Vektoren hergestellt worden sind, wie beschrieben wurde (Bytebier et al., 1987). Daher müssen kommerziell wichtige Getreidepflanzen wie Reis, Mais und Weizen üblicherweise durch andere Verfahren transformiert werden. Jedoch, wie oben erwähnt, kann die Transformation von Spargel auch unter Verwendung von Agrobacterium erreicht werden (vgl. z. B. Bytebier et al., 1987).

[0240] Eine transgene Pflanze, welche durch Agrobacterium-Transformationsverfahren erzeugt wurde, enthält typischerweise ein einziges Gen auf einem Chromosom. Solche transgenen Pflanzen können im Hinblick auf das hinzugefügte Gen als heterozygot bezeichnet werden. In Anbetracht der Tatsache, daß die Verwendung des Wortes "heterozygot" üblicherweise das Vorhandensein eines komplementären Gens an dem gleichen Locus des zweiten Chromosoms eines Chromosomenpaares voraussetzt und kein solches Gen in einer Pflanze, welche ein hinzugefügtes Gen enthält, vorhanden ist, wie in diesem Fall, nimmt man an, daß ein exaktere Bezeichnung für eine solche Pflanze eine "unabhängige Segregante" ist, da das hinzugefügte exogene Gen während der Mitose und Meiose unabhängig segregiert.

[0241] Mehr bevorzugt wird eine transgene Pflanze, welche im Hinblick auf das hinzugefügte Strukturgen homozygot ist; d. h. eine transgene Pflanze, welche zwei hinzugefügte Gene enthält, und zwar ein Gen an dem gleichen Locus auf jedem Chromosom eines Chromosomenpaares. Eine homozygote transgene Pflanze kann durch sexuelle Paarung (Selbstbefruchtung) einer unabhängigen segreganten transgenen Pflanze, welche ein einziges hinzugefügtes Gen enthält, Keimung von einigen der produzierten Samen und Untersuchen der erhaltenen erzeugten Pflanzen auf eine erhöhte Carboxylaseaktivität im Verhältnis zu einer Kontrolle (nativ, nicht transgen) oder einer unabhängigen segreganten transgenen Pflanze erhalten werden.

[0242] Es ist selbstverständlich, daß auch zwei verschiedene transgene Pflanzen gepaart werden können, um Nachkommen hervorzubringen, welche zwei unabhängig segregierende hinzugefügte exogene Gene enthalten. Die Selbstbefruchtung von geeigneten Nachkommen kann Pflanzen hervorzubringen, welche im Hinblick auf beide hinzugefügten exogenen Gene, welche ein Polypeptid von Interesse codieren, homozygot sind. Die Rückkreuzung mit einer Elternpflanze und die Auskreuzung mit einer nicht transgenen Pflanze sind auch eingeschlossen.

[0243] Die Transformation von Pflanzenprotoplasten kann unter Anwendung von Verfahren auf der Basis einer Calciumphosphat-Präzipitation, Polyethylenglykol-Behandlung, Elektroporation und Kombinationen dieser Behandlungen erreicht werden (vgl. z. B. Potrykus et al., 1985; Lorz et al., 1985; Fromm et al., 198; Uchimiya et al., 1986; Callis et al., 1987; Marcotte et al., 1988).

[0244] Die Anwendung dieser Systeme auf verschiedene Pflanzenarten hängt von der Fähigkeit ab, diese besondere Pflanzenart aus Protoplasten regenerieren zu können. Veranschaulichende Verfahren zur Regeneration von Getreidepflanzen aus Protoplasten sind beschrieben (vgl. z. B. Fujimura et al., 1985; Toriyama et al., 1986; Yamada et al., 1986; Abdullah et al., 1986).

[0245] Um Pflanzenarten zu transformieren, welche nicht erfolgreich aus Protoplasten regeneriert werden können, können andere Verfahren angewendet werden, um eine DNA in intakte Zellen oder Gewebe einzuschleusen. Zum Beispiel kann die Regeneration von Getreidepflanzen aus unreifen Embryonen oder Explantaten erreicht werden, wie beschrieben wurde (Vasil, 1988). Zusätzlich kann die "Teilchenkanonen"- oder Hochgeschwindigkeitmikroprojektiltechnik angewendet werden (Vasil, 1992).

[0246] Unter Anwendung der letzteren Technik wird die DNA auf der Oberfläche von kleinen Metallteilchen durch die Zellwand hindurch in das Cytoplasma getragen, wie beschrieben wurde (Klein et al., 1987; Klein et al., 1988; McCabe et al., 1988). Die Metallteilchen durchdringen mehrere Schichten von Zellen und ermöglichen somit die Transformation von Zellen innerhalb von Gewebeexplantaten.

5.6.4 Genexpression in Pflanzen

[0247] Aufgrund der Tatsache, daß der Codon-Gebrauch in Pflanzen mehr demjenigen von Menschen und anderen höheren Organismen ähnelt als dem von einzelligen Organismen wie Bakterien, werden unmodifizierte Bakteriengene in transgenen Pflanzenzellen häufig unzureichend exprimiert. Die offensichtliche allgemeine GC-Gehalt-Vorliebe in Codon-Position 3 ist durch Murray et al. (1990) ausführlich beschrieben worden. Die in dieser Arbeit beschriebenen 207 Pflanzengene erlauben die Zusammenstellung von Codon-Präferenzen für Aminosäuren in Pflanzen. Diese Autoren beschreiben den Unterschied zwischen dem Codon-Gebrauch in einkeimblättrigen Pflanzen und zweikeimblättrigen Pflanzen, sowie die Unterschiede zwischen Genen, welche

durch Chloroplasten codiert werden, und solchen, welche durch den Kern codiert werden. Mittels der bereitgestellten Codon-Häufigkeitstabellen können Fachleute eine solche bakterielle Sequenz zur Expression in Pflanzen durch Modifikation der DNA-Sequenzen, um eine Codon-Vorliebe für G oder C in der dritten Position vorzusehen, entwerfen.

[0248] Die Arbeit von Diehn et al. (1996) beschreibt ausführlich die Modifikation einer Prokaryonten-gesteuerten Gensequenz, um eine Expression in Pflanzen zu ermöglichen. Iannacone et al. (1997) beschreiben die Transformation von Auberginenpflanzen mit einem gentechnisch veränderten *B. thuringiensis*-Gen, welches ein Endotoxin der cry3-Klasse codiert. Unter Verwendung von Sequenzen, welche Polyadenylierungssequenzen, ATTA-Sequenzen und Spleißstellen vermeiden, wurde ein synthetisches Gen konstruiert, welches die Expression des codierten Toxins in Pflanzen ermöglicht. Die Expression des grün fluoreszierenden Proteins der Qualle in transgenen Tabakpflanzen ist durch Rouwendal et al. (1997) beschrieben worden. Unter Verwendung eines synthetischen Gens, wurde eine Codon-Vorliebe für C + G in der dritten Position hervorgerufen, um die Expression des heterologen Gens in Pflanzen zu ermöglichen.

[0249] Fütterer und Hohn (1996) beschreiben die Effekte von mRNA-Sequenzen, Leadersequenzen, polycistronischen Informationen und internen Ribosomenbindungsstellenmotiven auf die Expression in Pflanzen. Die Modifikation solcher Sequenzen durch die Konstruktion von synthetischen Genen ermöglicht die Expression von viralen mRNAs in transgenen Pflanzenzellen.

[0250] Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte im Hinblick auf die Herstellung von transgenen Pflanzen, welche bakterielle Proteine wie *B. thuringiensis*-Kristallproteine exprimieren, gemacht worden sind, sind die Ergebnisse der Expression von nativen Bakteriengen in Pflanzen oft enttäuschend. Im Gegensatz zu der Genetik von Mikroorganismen war den ersten Pflanzengenetikern wenig über die Faktoren bekannt, welche die heterologe Expression von fremden Genen in Pflanzen beeinflussen. In den letzten Jahren sind jedoch mehrere mögliche Faktoren einbezogen worden, welche in unterschiedlichen Graden für die Expressionsrate eines Proteins durch eine bestimmte codierende verantwortlich sein könnten. Zum Beispiel ist den Wissenschaftler nun bekannt, daß die Aufrechterhaltung einer wesentlichen Konzentration einer bestimmten mRNA in der Zelle tatsächlich ein wichtiger Faktor ist. Unglücklicherweise sind die Gründe für ein geringes Fließgleichgewichtsniveau einer mRNA, welche fremde Proteine codiert, sehr vielfältig. Als erstes könnte die Synthese einer RNA vollständiger Länge nicht in einer hohen Häufigkeit erfolgen. Dies könnte zum Beispiel durch die frühzeitige Termination einer RNA während der Transkription oder infolge einer unerwarteten mRNA-Prozessierung während der Transkription verursacht werden. Als zweites könnte eine RNA vollständiger Länge in der Pflanzenzelle hergestellt werden, aber dann im Kern in einer Art und Weise prozessiert (Spleißen, PolyA-Addition) werden, welche keine funktionelle mRNA hervorbringt. Falls die RNA nicht richtig synthetisiert, terminiert und polyadenyliert wird, kann sie nicht in das Cytoplasma zur Translation transportiert werden. Entsprechend wird im Cytoplasma, falls mRNAs verminderte Halbwertszeiten aufweisen (welche durch ihre Primär- oder Sekundärsequenz bestimmt werden), eine unzureichende Menge des Proteinprodukts hergestellt. Außerdem gibt es einen Einfluß, dessen Bedeutung ungewiß ist, der Translationseffizienz auf die mRNA-Halbwertszeit. Zusätzlich faltet sich jedes RNA-Molekül zu einer bestimmten Struktur oder möglicherweise einer Familie von Strukturen, welche durch seine Sequenz bestimmt wird. Die besondere Struktur einer RNA kann zu einer größeren oder geringeren Stabilität im Cytoplasma führen. Die Struktur per se ist wahrscheinlich auch eine Determinante der mRNA-Prozessierung im Kern. Unglücklicherweise ist es unmöglich vorherzusagen und nahezu unmöglich festzustellen, welche Struktur eine RNA (ausgenommen tRNA) in vitro oder in vivo hat. Jedoch ist es wahrscheinlich, daß eine drastische Veränderung der Sequenz einer RNA einen großen Einfluß auf die gefaltete Struktur hiervon hat. Es ist wahrscheinlich, daß die Struktur per se oder besondere Strukturmerkmale bei der Festlegung der RNA-Stabilität auch eine Rolle spielen.

[0251] Um diese Begrenzungen im Hinblick auf die Expression eines fremden Gens zu überwinden, haben Forscher bestimmte Sequenzen und Signale in RNAs identifiziert, welche unter Umständen eine spezifische Auswirkung auf die RNA-Stabilität haben. In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung ist es daher wünschenswert, die Expression der offenbaren Nucleinsäuresegmente in Pflanzen zu optimieren. Ein besonderes Verfahren hierfür ist die Veränderung des Bakteriengens, um Sequenzen oder Motive zu entfernen, welche die Expression in einer transformierten Pflanzenzelle vermindern. Das Verfahren zur Konstruktion einer codierenden Sequenz für eine optimale Expression in Pflanzen wird häufig als "Botanisieren" einer DNA-Sequenz bezeichnet.

[0252] Besonders problematische Sequenzen sind die A + T-reichen Sequenzen. Unglücklicherweise, da *B. thuringiensis* ein A + T-reiches Genom besitzt, müssen native Kristallprotein-Gensequenzen häufig modifiziert werden, um eine optimale Expression in einer Pflanze zu erreichen. Das Sequenzmotiv ATTTA (oder AUUUA,

so wie es in RNA vorkommt) ist als eine destabilisierende Sequenz in der mRNA einer Säugerzelle identifiziert worden (Shaw und Kamen, 1986). Viele kurzlebige mRNAs besitzen A + T-reiche, 3'-nichttranslatierte Regionen, und diese Regionen weisen häufig die ATTTA-Sequenz auf, welche zuweilen in mehreren Kopien oder als Multimere (z. B. ATTTAATTTA...) 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 stabile RNA drastisch verringerte. Sie zeigten weiterhin, daß ein Pentamer von ATTTA eine starke destabilisierende Wirkung auf eine stabile Information hatte, und daß dieses Signal seine Wirkung ausüben konnte, unabhängig davon, ob es am 3'-Ende oder innerhalb der codierenden Sequenz befand. Jedoch scheint die Anzahl der ATTTA-Sequenzen und/oder der Sequenzzusammenhang, in dem sie vorkommen, auch für die Festlegung wichtig zu sein, ob sie als destabilisierende Sequenzen wirksam sind. Shaw und Kamen zeigten, daß ein Trimer von ATTTA eine viel geringere Auswirkung als ein Pentamer auf die mRNA-Stabilität hatte, und daß ein Dimer oder ein Monomer keinen Einfluß auf die Stabilität hatte (Shaw und Kamen, 1986). Es ist anzumerken, daß Multimere von ATTTA, wie ein Pentamer, automatisch eine A + T-reiche Region erzeugen. Es wurde gezeigt, daß dies ein cytoplasmatischer Effekt und kein nuklearer Effekt ist. In anderen instabilen mRNAs kann die ATTTA-Sequenz in nur einer einzigen Kopie vorhanden sein, aber sie ist häufig in einer A + T-reichen Region enthalten. Aus den bis heute gesammelten Daten über tierische Zellen ist ersichtlich, daß ATTTA zumindest in einigen Zusammenhängen für die Stabilität wichtig ist, aber es ist noch nicht möglich vorherzusagen, welche Vorkommen von ATTTA destabilisierende Elemente sind oder ob irgendeiner dieser Effekte wahrscheinlich in Pflanzen zu beobachten ist.

[0253] Einige Studien über den mRNA-Abbau in tierischen Zellen zeigen auch, daß der RNA-Abbau in einigen Fällen mit einem nucleolytischen Angriff in A + T-reichen Regionen beginnen kann. Es ist nicht klar, ob diese Spaltungen an ATTTA-Sequenzen erfolgen. Es gibt auch Beispiele für mRNAs, die eine unterschiedliche Stabilität in Abhängigkeit von dem Zelltyp, in dem sie exprimiert werden, oder von dem Stadium innerhalb des Zellzyklus, in dem sie exprimiert werden, zeigen. Zum Beispiel sind Histon-mRNAs während der DNA-Synthese stabil, aber instabil, falls die DNA-Synthese unterbrochen wird. Für diesen Effekt scheint das 3'-Ende einiger Histon-mRNAs verantwortlich zu sein (Pandey und Marzluff, 1987). Er scheint nicht durch ATTTA vermittelt zu werden, noch ist deutlich, wodurch die unterschiedliche Stabilität dieser mRNA kontrolliert wird. Ein anderes Beispiel ist die unterschiedliche Stabilität von IgG-mRNA in B-Lymphocyten während der B-Zellreifung (Genovese und Milcarek, 1988). Ein letztes Beispiel ist die Instabilität einer mutierten β -Thalassämie-Globin-mRNA. In Knochenmarkzellen, wo dieses Gen normalerweise exprimiert wird, ist die mutierte mRNA instabil, während die Wildtyp-mRNA stabil ist. Wenn das mutierte Gen in HeLa- oder L-Zellen in vitro exprimiert wird, zeigt die mutierte mRNA keine Instabilität (Lim et al., 1988). Diese Beispiele weisen alle darauf hin, daß die mRNA-Stabilität durch Zelltyp- oder Zellzyklus-spezifische Faktoren vermittelt werden kann. Ferner ist diese Art der Instabilität auch nicht mit spezifischen Sequenzen assoziiert. Aufgrund dieser Unklarheiten ist es nicht möglich, vorherzusagen, welche RNAs wahrscheinlich in einer bestimmten Zelle instabil sind. Außerdem kann selbst das ATTTA-Motiv, abhängig von der Art der Zelle, in welcher die RNA vorliegt, unterschiedlich wirksam sein. Shaw und Kamen (1987) haben berichtet, daß die Aktivierung der Proteinkinase C den durch ATTTA vermittelten Abbau blockieren kann.

[0254] Die Addition einer Polyadenylatkette an das 3'-Ende ist ein allgemeines Merkmal der meisten eukaryontischen mRNAs, sowohl in Pflanzen als auch in Tieren. Der gegenwärtig angenommene Mechanismus der PolyA-Addition ist, daß das wachsende Transkript über das reife 3'-Ende hinaus verlängert wird. In diesem Transkript sind Signale für eine Polyadenylierung und eine korrekte Bildung des 3'-Endes enthalten. Diese Prozessierung am 3'-Ende beinhaltet die Spaltung der mRNA und die Addition von PolyA an das reife 3'-Ende. Durch die Suche nach Konsensussequenzen in der Nähe des PolyA-Bereiches in sowohl pflanzlichen als tierischen mRNAs ist es möglich gewesen, Konsensussequenzen zu identifizieren, welche anscheinend an der PolyA-Addition und der Spaltung am 3'-Ende beteiligt sind. Für beide Prozesse scheinen dieselben Konsensussequenzen wichtig zu sein. Diese Signale sind typischerweise eine Variation der Sequenz AATAAA. In tierischen Zellen sind einige Varianten dieser Sequenz, welche funktionell sind, identifiziert worden; in Pflanzenzellen scheint es eine größere Auswahl von funktionellen Sequenzen zu geben (Wickens und Stephenson, 1984; Dean et al., 1986). Da diese Konsensussequenzen alle Variationen von AATAAA darstellen, sind sie alle A + T-reiche Sequenzen. Diese Sequenz ist typischerweise 15 bis 20 bp vor dem PolyA-Bereich in einer reifen mRNA zu finden. Studien an tierischen Zellen zeigen, 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). Jedoch ist auch beobachtet worden, daß Sequenzen, welche bis zu 50 bis 100 bp 3' zu dem mutmaßlichen PolyA-Signal vorliegen, ebenfalls erforderlich sind; d. h. ein Gen, das eine normale AATAAA-Sequenz aufweist, aber stromabwärts ersetzt oder unterbrochen worden ist, wird nicht richtig polyadenyliert (Gil und Proudfoot, 1984; Sadofsky und Alwine, 1984; McDewitt et al., 1984). Das heißt, daß das PolyA-Signal selbst nicht für eine vollständige und richtige Prozessierung

ausreichend ist. Es ist noch nicht bekannt, welche spezifischen Stromabwärtssequenzen zusätzlich zu dem PolyA-Signal erforderlich sind, oder ob es eine spezifische Sequenz gibt, welche diese Funktion hat. Daher kann eine Sequenzanalyse nur potentielle PolyA-Signale identifizieren.

[0255] Bei natürlich vorkommenden mRNAs, welche normalerweise polyadenyliert sind, ist beobachtet worden, daß durch Unterbrechung dieses Prozesses, entweder durch Veränderung des PolyA-Signals oder anderer Sequenzen in der mRNA, sehr große Effekte auf der Ebene der funktionellen mRNA erhalten werden können. Dies ist bei mehreren natürlich vorkommenden mRNAs beobachtet worden, wobei die Ergebnisse bisher genspezifisch sind.

[0256] Es ist gezeigt worden, daß in natürlichen mRNAs eine korrekte Polyadenylierung bei der mRNA-Anreicherung wichtig ist, und daß die Unterbrechung dieses Prozesses die mRNA-Konzentrationen wesentlich beeinflussen kann. Jedoch ist zu wenig bekannt, um vorherzusagen, welchen Effekt Veränderungen in einem normalen Gen haben. Bei einem heterologen Gen ist es sogar noch schwerer, die Folgen vorherzusagen. Jedoch ist es möglich, daß die identifizierten mutmaßlichen Stellen nicht richtig wirksam sind. Das heißt, diese Stellen können nicht als richtige PolyA-Stellen wirksam sein, aber fungieren statt dessen als atypische Stellen, welche instabile mRNAs ergeben.

[0257] In Tierzellsystemen ist die AATAAA-Sequenz das weitaus häufigste Signal, welches in mRNAs stromaufwärts des PolyA-Signals identifiziert wurde, jedoch sind auch mindestens vier Varianten gefunden worden (Wickens und Stephenson, 1984). Bei Pflanzen sind längst nicht so viele Untersuchungen durchgeführt worden, aber es ist klar, daß mehrere Sequenzen, welche AATAAA ähnlich sind, verwendet werden können. Die in Tabelle 4 als bedeutend oder unbedeutend bezeichneten Pflanzenstellen beziehen sich nur auf die Studie von Dean et al. (1986), welche nur drei Typen von Pflanzengen analysierten. Die Bezeichnung von Polyadenylierungsstellen als bedeutend oder unbedeutend bezieht sich nur auf die Häufigkeit ihres Vorkommens als funktionelle Stellen in natürlich vorkommenden Genen, welche analysiert worden sind. Im Falle von Pflanzen ist dies eine sehr begrenzte Datenbank. Es ist schwer, mit Sicherheit vorherzusagen, daß eine als bedeutend oder unbedeutend bezeichnete Stelle mehr oder weniger wahrscheinlich teilweise oder vollständig wirksam ist, wenn sie in heterologen Genen, wie solchen, welche die erfindungsgemäßen Kristallproteine codieren, vorkommen.

Tabelle 4
Polyadenylierungsstellen in Pflanzengen

PA	AATAAA	Bedeutende Konsensusstelle
P1A	AATAAT	Bedeutende Pflanzenstelle
P2A	AACCAA	Unbedeutende Pflanzenstelle
P3A	ATATAA	"
P4A	AATCAA	"
P5A	ATACTA	"
P6A	ATAAAA	"
P7A	ATGAAA	"
P8A	AAGCAT	"
P9A	ATTAAT	"
P10A	ATACAT	"
P11A	AAAATA	"
P12A	ATTA AA	Unbedeutende Tierstelle
P13A	AATTAA	"
P14A	AATACA	"
P15A	CATAAA	"

[0258] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung von synthetischen Pflanzengen bereit, wobei die Gene ihr Proteinprodukt in wesentlich höheren Raten exprimieren als die Wildtyp-Gene, welche bisher im allgemeinen bei der Pflanzentransformation verwendet wurden. Gemäß einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung auch neue synthetische Pflanzene bereit, welche nicht pflanzliche Proteine codieren.

[0259] 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 Pflanzengen sowie von vielen anderen in Pflanzen exprimierten heterologen Genen. Insbesondere sind *B. thuringiensis*-Gene sehr reich (~62%) an Adenin (A) und Thymin (T), während Pflanzene und die meisten anderen Bakteriengene, welche in Pflanzen exprimiert worden sind, einen A + T-Gehalt in der Größenordnung von 45-55% aufweisen.

[0260] Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes und der begrenzten Codon-Auswahl für eine Aminosäure findet man den "Überschuß" an A + T in den strukturellen codierenden Sequenzen von einigen *Bacillus*-Spezies in der dritten Position der Codons.

[0261] Das heißt, die Gene einiger *Bacillus*-Spezies weisen A oder T als das dritte Nucleotid in vielen Codons auf. Folglich kann der A + T-Gehalt zum Teil die Vorliebe des Codon-Gebrauchs bestimmen. Außerdem ist erkennbar, daß Gene eine maximale Funktion in dem Organismus, in dem sie sich entwickeln, entfalten. Dies bedeutet, daß bestimmte Nucleotidsequenzen, welche in einem Gen aus einem Organismus vorkommen, in dem sie keine Rolle spielen können, außer daß sie einen bestimmten Bereich von Aminosäuren codieren, das Potential haben, als Genkontrollelemente (wie transkriptionelle Promotoren oder Terminatoren, PolyA-Additionsstellen, Intron-Spleißstellen oder spezifische mRNA-Abbausignale) in einem anderen Organismus erkannt zu werden. Es ist vielleicht überraschend, daß solche falsch abgelesenen Signale nicht ein häufigeres Merkmal der heterologen Genexpression sind, aber dies kann zum Teil durch den relativ homogenen A + T-Gehalt (~50%) von vielen Organismen erklärt werden. Der A + T-Gehalt zusammen mit der Natur des genetischen Co-

des sieht im Hinblick auf die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens einer bestimmten Oligonucleotidsequenz deutliche Einschränkungen vor. So ist es viel weniger wahrscheinlich, daß ein Gen aus *E. coli* mit einem A + T-Gehalt von 50% irgendein A + T-reiches Segment enthält, als ein Gen aus *B. thuringiensis*.

[0262] Um eine hohe Expressionsrate der δ -Endotoxin-Gene in Pflanzen zu erhalten, wird typischerweise eine vorhandene strukturelle codierende Sequenz ("Strukturgen"), welche das δ -Endotoxin codiert, durch die Entfernung von ATTTA-Sequenzen und mutmaßlichen Polyadenylierungssignalen durch ortsspezifische Mutagenese der DNA, welche das Strukturgen umfaßt, modifiziert. Am meisten bevorzugt wird, daß im wesentlichen alle Polyadenylierungssignale und ATTTA-Sequenzen entfernt werden, obwohl erhöhte Expressionsraten beobachtet werden, wenn nur ein Teil der beiden oben identifizierten Sequenzen entfernt wird. Alternativ, falls ein synthetisches Gen hergestellt wird, welches die Expression des gewünschten Proteins codiert, werden die Codons so gewählt, daß die ATTTA-Sequenz und mutmaßliche Polyadenylierungssignale vermieden werden. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung schließen mutmaßliche Polyadenylierungssignale AATAAA, AATAAT, AACCAA, ATATAA, AATCAA, ATACTA, ATAAAA, ATGAAA, AAGCAT, ATTAAT, ATACAT, AAAATA, ATTAAA, AATTAA, AATACA und CATAAA ein, aber sind nicht notwendigerweise darauf begrenzt. Beim Ersetzen der ATTTA-Sequenzen und der Polyadenylierungssignale werden vorzugsweise Codons verwendet, welche die Codons vermeiden, die selten in Pflanzengenomen vorkommen.

[0263] Die ausgewählte DNA-Sequenz wird abgesucht, um Regionen mit mehr als vier aufeinanderfolgenden Adenin (A)- oder Thymin (T)-Nucleotiden zu identifizieren. Die A + T-Regionen werden auf mutmaßliche Pflanzen-Polyadenylierungssignale abgesucht. Obwohl durch das Fehlen von fünf oder mehr aufeinanderfolgenden A- oder T-Nucleotiden die meisten Pflanzen-Polyadenylierungssignale eliminiert werden, wird, wenn mehr als eine der unbedeutenden Polyadenylierungssignale innerhalb von zehn Nucleotiden voneinander identifiziert wird, die Nucleotidsequenz dieser Region vorzugsweise anschließend verändert, um diese Signale zu entfernen, während die ursprünglich codierte Aminosäuresequenz beibehalten wird.

[0264] Der zweite Schritt ist das Betrachten der etwa 15 bis etwa 30 Nucleotidreste, welche die im ersten Schritt identifizierte A + T-reiche Region umgeben. Falls der A + T-Gehalt der umgebenden Region weniger als 80% beträgt, sollte die Region auf Polyadenylierungssignale untersucht werden. Die Veränderung der Region auf der Basis von Polyadenylierungssignalen ist abhängig von (1) der Anzahl der vorhandenen Polyadenylierungssignale, und (2) des Vorhandenseins eines bedeutenden Pflanzen-Polyadenylierungssignals.

[0265] Der erweiterte Region wird auf das Vorhandensein von Pflanzen-Polyadenylierungssignalen untersucht. Die Polyadenylierungssignale werden durch ortsspezifische Mutagenese der DNA-Sequenz entfernt. Der erweiterte Region wird auch auf mehrere Kopien der ATTTA-Sequenz untersucht, welche ebenfalls durch Mutagenese entfernt werden.

[0266] Es wird auch bevorzugt, daß Regionen, welche viele aufeinanderfolgende A + T-Basen oder G + C-Basen umfassen, unterbrochen werden, da vorhergesagt werden kann, daß für diese Regionen eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Bildung von Haarnadelstrukturen infolge einer Selbstkomplementarität besteht. Daher würde die Insertion von heterogenen Basenpaaren die Wahrscheinlichkeit einer auf Selbstkomplementarität beruhenden Sekundärstrukturverringern, welche bekanntermaßen die Transkription und/oder Translation in einigen Organismen hemmt. In den meisten Fällen können die ungünstigen Effekte unter Verwendung von Sequenzen, welche nicht mehr als fünf aufeinanderfolgende A + T-Basen oder G + C-Basen enthalten, minimiert werden.

5.7 Herstellung von insektenresistenten transgenen Pflanzen

[0267] Somit kann die Menge eines Gens, welches ein Polypeptid von Interesse codiert (d. h. ein bakterielles Kristallprotein oder Polypeptid mit einer Insektizidaktivität gegenüber einer oder mehreren Insektenarten), in einer Pflanze wie Mais durch die Transformation solcher Pflanzen mittels Teilchenbeschußverfahren erhöht werden (Maddock et al., 1991). Beispielsweise wird ein Expressionsvektor, enthaltend eine codierende Region für ein *B. thuringiensis*-Kristallprotein und einen geeigneten selektierbaren Marker, in eine Suspension von embryonalen Maiszellen (Getreidezellen) unter Verwendung einer Teilchenkanone zur Übertragung der auf Mikroprojektilen aufgetragenen DNA eingeschleust. Transgene Pflanzen werden aus transformierten embryonalen Kallussen regeneriert, welche die offenbaren insektiziden Kristallproteine exprimieren. Der Teilchenbeschuß ist erfolgreich angewendet worden, um Weizen zu transformieren (Vasil et al., 1992).

[0268] Die DNA kann auch durch den direkten DNA-Transfer in Pollen, wie beschrieben wurde (Zhou et al., 1983; Hess, 1987; Luo et al., 1988), in Pflanzen eingeschleust werden. Die Expression von Genen, welche ein

Polypeptid codieren, kann durch Injektion der DNA in die Fortpflanzungsorgane einer Pflanze, wie beschrieben wurde (Pena et al., 1987), erreicht werden. Die DNA kann auch direkt in die Zellen von unreifen Embryonen injiziert werden, wobei die getrockneten Embryonen rehydriert werden, wie beschrieben wurde (Neuhaus et al., 1987; Benbrook et al., 1986).

[0269] Die Entwicklung oder Regeneration von Pflanzen aus entweder einzelnen Pflanzenprotoplasten oder verschiedenen Explantaten ist auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt (Weissbach und Weissbach, 1988). Dieser Regenerations- und Züchtungsprozeß schließt typischerweise die Schritte der Selektion von transformierten Zellen und der Züchtung dieser vereinzelt Zellen über die üblichen Stadien der Embryonalentwicklung bis zu einem bewurzelten Pflänzchenstadium ein. Transgene Embryonen und Samen werden in ähnlicher Weise regeneriert. Die erhaltenen transgenen, bewurzelten Schößlinge werden dann in ein geeignetes Pflanzenwachstumsmedium wie Erde gepflanzt.

[0270] Die Entwicklung oder Regeneration von Pflanzen, enthaltend das fremde exogene Gen, das ein Polypeptid von Interesse codiert, welches durch Agrobacterium aus Blattexplantaten eingeschleust wurde, kann durch Verfahren erreicht werden, welche auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt sind, wie beschrieben wurde (Horsch et al., 1985. Bei diesem Verfahren werden Transformanten in Gegenwart eines Selektionsmittels und in einem Medium, welches die Regeneration von Schößlingen bei der zu transformierenden Pflanzenart induziert, gezüchtet, wie beschrieben wurde (Fraley et al., 1983). Insbesondere beschreibt US-Patent 5,349,124 ausführlich die Erzeugung von genetisch transformierten Salatzellen und daraus erhaltenen Pflanzen, welche hybride Kristallproteine exprimieren, die eine Insektizidaktivität gegenüber Lepidoptera-Larven auf solche Pflanzen übertragen.

[0271] Dieses Verfahren bringt typischerweise innerhalb von zwei bis vier Monaten Schößlinge hervor, und diese Schößlinge werden dann in ein geeignetes Medium, enthaltend das Selektionsmittel und ein Antibiotikum, um ein bakterielles Wachstum zu verhindern, welches die Wurzelbildung induziert, übertragen. Schößlinge, welche sich in Gegenwart des Selektionsmittels unter Bildung von Pflänzchen bewurzeln, werden dann in Erde oder ein anderes Medium übertragen, um die Bildung von Wurzeln zu ermöglichen. Diese Verfahren variieren in Abhängigkeit von der verwendeten einzelnen Pflanzenart, wobei solche Variationen auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt sind.

[0272] Vorzugsweise sind die regenerierten Pflanzen selbstbefruchtend, um homozygote transgene Pflanzen, wie oben besprochen, bereitzustellen. Andernfalls werden die aus den regenerierten Pflanzen erhaltenen Pollen gekreuzt, um aus Samen gezüchtete Pflanzen von landwirtschaftlich wichtigen, vorzugsweise durch Inzucht erzeugten, Zuchtlinien bereitzustellen. Umgekehrt werden Pollen aus Pflanzen solcher wichtigen Zuchtlinien verwendet, um regenerierte Pflanze zu bestäuben. Eine erfindungsgemäße transgene Pflanze, enthaltend ein gewünschtes Polypeptid, wird unter Anwendung von Verfahren, welche dem Fachmann hinreichend bekannt sind, gezüchtet.

[0273] Eine erfindungsgemäße transgene Pflanze weist somit eine erhöhte Menge einer codierenden Region auf (z. B. ein cry-Gen), welche eines oder mehrere der hierin offenbarten chimären Cry-Polypeptide codiert. Eine bevorzugte transgene Pflanze ist eine unabhängige Segregante und kann das Gen und dessen Aktivität an ihre Nachkommen weitergeben. Eine mehr bevorzugte transgene Pflanze ist im Hinblick auf das Gen homozygot und überträgt dieses Gen auf alle ihre Nachkommen durch sexuelle Paarung. Samen aus einer transgenen Pflanze können auf dem Acker oder in einem Gewächshaus herangezogen werden, und die erhaltenen geschlechtsreifen transgenen Pflanzen sind selbstbestäubend, um reine Zuchtpflanzen zu erzeugen. Die Nachkommen dieser Pflanzen werden reine Zuchtlinien, welche zum Beispiel auf eine erhöhte Insektizidkapazität gegenüber Coleoptera-Insekten, vorzugsweise auf dem Acker, unter einer Reihe von Umweltbedingungen beurteilt werden. Die Erfinder erwarten, daß die vorliegende Erfindung bei der Erzeugung von transgenen Pflanzen von Mais, Sojabohne, Baumwolle, Tabak, Tomate, Kartoffel, Flachs, Roggen, Gerste, Canola, Weizen, Hafer, Reis, anderen Getreidesorten, Gemüse, Früchten, Obstbäumen, Beeren, Rasengräsern, Zierpflanzen, Sträuchern und Bäumen von besonderem Nutzen ist.

5.8 Ribozyme

[0274] Ribozyme sind enzymatische RNA-Moleküle, welche bestimmte mRNA-Spezies spalten. In bestimmten Ausführungsformen ziehen die Erfindung die Auswahl und die Verwendung von Ribozymen in Betracht, welche fähig sind, die erfindungsgemäßen RNA-Segmente zu spalten, sowie deren Verwendung, um die Aktivität von Ziel-mRNAs in bestimmten Zelltypen oder Geweben zu verringern.

[0275] Sechs Basenvarianten von natürlich vorkommenden enzymatischen RNAs sind gegenwärtig bekannt. Jede kann die Hydrolyse von RNA-Phosphodiesterbindungen in trans-Stellung unter physiologischen Bedingungen katalysieren (und kann folglich andere RNA-Moleküle spalten). Im allgemeinen sind enzymatische Nucleinsäuren wirksam, indem sie zuerst an eine Ziel-RNA binden. Eine solche Bindung kommt über den Ziel-Bindungsanteil einer enzymatischen Nucleinsäure zustande, der in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem enzymatischen Teil des Moleküls, welcher die Spaltung der Ziel-RNA bewirkt, gehalten wird. Folglich erkennt die enzymatische Nucleinsäure zuerst eine Ziel-RNA und bindet dann daran über eine komplementäre Basenpaarung, und ist nach der Bindung an die richtige Stelle enzymatisch wirksam, um die Ziel-RNA zu schneiden. Die strategische Spaltung einer solchen Ziel-RNA hebt deren Fähigkeit auf, die Synthese eines codierten Proteins zu steuern. Nach der Bindung einer enzymatischen Nucleinsäure an ihre Ziel-RNA und die Spaltung des RNA-Zielmoleküls, wird sie aus der RNA freigesetzt, um nach anderen Zielmolekülen zu suchen, und kann wiederholt an neue Zielmoleküle binden und diese spalten.

[0276] Die enzymatische Natur eines Ribozyms ist gegenüber vielen Techniken wie der Antisense-Technik (wobei ein Nucleinsäuremolekül einfach an ein Nucleinsäure-Zielmolekül bindet, um die Translation hiervon zu blockieren) vorteilhaft, da die Konzentration eines Ribozyms, welche notwendig ist, um eine therapeutische Behandlung zu beeinflussen, geringer ist als die eines Antisense-Oligonucleotids. Dieser Vorteil weist auf die Fähigkeit des Ribozyms hin, enzymatisch wirksam zu sein. So ist ein einziges Ribozymmolekül in der Lage, viele Moleküle einer Ziel-RNA zu spalten. Außerdem ist das Ribozym ein sehr spezifischer Inhibitor, wobei die Spezifität der Inhibition nicht nur von dem Basenpaarungsmechanismus der Bindung an die Ziel-RNA abhängt, sondern auch von dem Mechanismus der Ziel-RNA-Spaltung. Einzelne Fehlpaarungen oder Basensubstitutionen nahe der Spaltstelle können die katalytische Aktivität eines Ribozyms vollständig aufheben. Ähnliche Fehlpaarungen in Antisense-Molekülen verhindern deren Wirkung nicht (Woolf et al., 1992). Folglich ist die Spezifität der Wirkung eines Ribozyms größer als die eines Antisense-Oligonucleotids, welches an dieselbe RNA-Stelle bindet.

[0277] Das enzymatische Nucleinsäuremolekül kann in Form eines Hammerkopf-, Haarnadel-, Hepatitis- δ -Virus-, Gruppe I-Intron- oder RNaseP-RNA- (in Verbindung mit einer RNA-Leadersequenz) oder Neurospora VS-RNA-Motivs vorliegen. Beispiele für Hammerkopfmotive sind bei Rossi et al. (1992) beschrieben; Beispiele für Haarnadelmotive sind bei Hampel et al. (Eur. Pat. EP 0360257), Hampel und Tritz (1989), Hampel et al. (1990) und Cech et al. (US-Patent 5,631,359) beschrieben; ein Beispiel für das Hepatitis- δ -Virus-Motiv ist bei Perrotta und Been (1992) beschrieben; ein Beispiel des RNaseP-Motivs ist bei Guerrier-Takada et al. (1983) beschrieben; ein Neurospora VS-RNA-Ribozymmotiv ist bei Collins (Saville und Collins, 1990; Saville und Collins, 1991; Collins und Olive, 1993) beschrieben; und ein Beispiel des Gruppe I-Introns ist bei Cech et al. (US-Patent 4,987,071) beschrieben. Das wichtigste Merkmal eines erfindungsgemäßen enzymatischen Nucleinsäuremoleküls ist, daß es eine spezifische Substratbindungsstelle besitzt, welche zu einer oder mehreren der Zielgen-RNA-Regionen komplementär ist, und daß es Nucleotidsequenzen innerhalb oder in der Umgebung der Substratbindungsstelle besitzt, welche eine RNA-Spaltaktivität auf das Molekül übertragen. Folglich müssen die Ribozymkonstrukte nicht auf die hierin erwähnten spezifischen Motive begrenzt sein.

[0278] Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung einer Klasse von enzymatischen Spaltungsmitteln bereit, welche einen hohen Spezifitätsgrad im Hinblick auf die RNA eines gewünschten Zielmoleküls zeigen. Das enzymatische Nucleinsäuremolekül ist vorzugsweise auf eine stark konservierte Sequenzregion einer Ziel-mRNA ausgerichtet, so daß die spezifische Behandlung einer Erkrankung oder eines Zustands durch entweder eine oder mehrere enzymatische Nucleinsäuren vorgesehen werden kann. Solche enzymatischen Nucleinsäuremoleküle können gegebenenfalls exogen auf spezifische Zellen übertragen werden. Alternativ können die Ribozyme durch DNA- oder RNA-Vektoren, welche auf spezifische Zellen übertragen werden, exprimiert werden.

[0279] Kleine enzymatische Nucleinsäuremotive (z. B. die Hammerkopf- oder Haarnadelstruktur) können für eine exogene Übertragung verwendet werden. Die einfache Struktur dieser Moleküle verbessert die Fähigkeit der enzymatischen Nucleinsäure, in die Zielregionen der mRNA-Struktur einzudringen. Alternativ können katalytische RNA-Moleküle innerhalb von Zellen durch eukaryontische 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). Für Fachleute ist erkennbar, daß jedes Ribozym in eukaryontischen Zellen durch den geeigneten DNA-Vektor exprimiert werden kann. Die Aktivität solcher Ribozyme kann durch ihre Freisetzung aus dem primären Transkript durch ein zweites Ribozym verstärkt werden (Draper et al., Internat. Pat. Anmelddg. Veröffentl.-Nr. WO 93/23569, und Sullivan et al., Internat. Pat. Anmelddg. Veröffentl.-Nr. WO 94/02595; Ventura et al., 1993; Ohkawa et al., 1992; Taira et al., 1991; Ventura et al., 1993).

[0280] Ribozyme können direkt zugegeben werden oder können in einem Komplex mit kationischen Lipiden, als Lipidkomplexe, verpackt in Liposomen oder in anderer Weise an Zielzellen abgegeben werden. Die RNA-Moleküle oder RNA-Komplexe können an relevante Gewebe ex vivo oder in vivo durch Injektion, Aerosolinhalation, Infusionspumpe oder -kanüle, mit oder ohne Einschließung hiervon in Biopolymere, lokal verabreicht werden.

[0281] Ribozyme können konstruiert werden, wie bei Draper et al. (Internat. Pat. Anm. Veröf. -Nr. WO 93/23569) oder Sullivan et al. (Internat. Pat. Anm. Veröf. -Nr. WO 94/02595) beschrieben ist, und zum Testen in vitro und in vivo synthetisiert werden, wie beschrieben wurde. Solche Ribozyme können auch hinsichtlich der Übertragung optimiert werden. Obwohl spezifische Beispiele bereitgestellt werden, ist den Fachleuten bewußt, daß gegebenenfalls äquivalente RNA-Zielmoleküle in anderen Spezies verwendet werden können.

[0282] Hammerkopf- oder Haarnadel-Ribozyme können durch Faltung am Computer einzeln analysiert werden (Jaeger et al., 1989), um zu beurteilen, ob sich die Ribozymsequenzen zu der geeigneten Sekundärstruktur falten. Ribozyme mit ungünstigen intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den Bindungsarmen und dem katalytischen Kern werden nicht berücksichtigt. Wahlweise können die Bindungsarmenlängen variiert werden, um die Aktivität zu optimieren. Im allgemeinen sind mindestens 5 Basen auf jedem Arm in der Lage, an die Ziel-RNA zu binden oder in anderer Weise damit in Wechselwirkung zu treten.

[0283] Ribozyme des Hammerkopf- oder Haarnadelmotivs können so konstruiert werden, daß sie sich an verschiedene Stellen in der mRNA-Information anlagern, und können chemisch synthetisiert werden. Das angewendete Syntheseverfahren folgt dem Verfahren für eine normale RNA-Synthese, wie bei Usman et al. (1987) und bei Scaringe et al. (1990) beschrieben ist, und macht Gebrauch von üblichen Nucleinsäure-Schutz- und Kopplungsgruppen, wie Dimethoxytrityl am 5'-Ende und Phosphoramidite am 3'-Ende. Durchschnittliche Ausbeuten einer stufenweisen Kopplung sind typischerweise > 98%. Haarnadel-Ribozyme können in zwei Teilen synthetisiert und unter Rekonstruktion eines aktiven Ribozyms aneinandergelagert werden (Chowrira und Burke, 1992). Ribozyme können umfassend modifiziert werden, um die Stabilität durch die Modifikation mit Nuclelease-resistenten Gruppen, zum Beispiel 2'-Amino, 2'-C-Allyl, 2'-Fluoro, 2'-o-Methyl oder 2'-H (für eine Übersicht vgl. Usman und Cedergren, 1992), zu erhöhen. Ribozyme können durch Gelelektrophorese unter Anwendung von allgemeinen Verfahren oder durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie gereinigt und in Wasser resuspendiert werden.

[0284] Die Ribozymaktivität kann durch Veränderung der Länge der Ribozym-Bindungsarme oder durch die chemische Synthese von Ribozymen mit Modifikationen, die ihren Abbau durch Serum-Ribonucleasen verhindern (vgl. z. B. Internat. Pat. Anm. Veröf. -Nr. WO 92/07065; Perrault et al., 1990; Pieken et al., 1991; Usman und Cedergren, 1992; Internat. Pat. Anm. Veröf. -Nr. WO 93/15187; Internat. Pat. Anm. Veröf. -Nr. WO 91/03162; US-Patent 5,334,711; und Internat. Pat. Anm. Veröf. -Nr. WO 94/13688, welche verschiedene chemische Modifikationen beschreiben, die an den Zuckereinheiten von enzymatischen RNA-Molekülen vorgenommen werden können), und Modifikationen, welche deren Wirksamkeit in Zellen erhöhen, sowie durch Entfernung von Stamm II-Basen, um die RNA-Synthesezeiten zu verkürzen und die chemischen Anforderungen zu verringern, optimiert werden.

[0285] Sullivan et al. (Internat. Pat. Anm. Veröf. -Nr. WO 94/02595) beschreibt die allgemeinen Verfahren zur Übertragung von enzymatischen RNA-Molekülen. Ribozyme können durch eine Vielzahl von Verfahren, mit welchen die Fachleute vertraut sind, einschließlich, aber nicht begrenzt auf, Einkapselung in Liposomen, durch Iontophorese oder durch Einschließen in andere Vehikel, wie Hydrogele, Cyclodextrine, bioabbaubare Nanokapseln und bioadhäsive Mikrokügelchen, an Zellen verabreicht werden. Für einige Indikationen können Ribozyme ex vivo direkt an Zellen oder Gewebe, mit oder ohne den oben erwähnten Vehikeln, abgegeben werden. Alternativ kann die RNA/Vehikel-Kombination durch direkte Inhalation, durch direkte Injektion oder durch Verwendung eines Katheters, einer Infusionspumpe oder Kanüle, lokal abgegeben werden. Andere Übertragungswege schließen, aber sind nicht begrenzt auf, die intravaskuläre, intramuskuläre, subkutane oder Gelenk-Injektion, Aerosolinhalation, orale (Tabletten- oder Pillenform), topische, systemische, okkulare, intraperitoneale und/oder intrathekale Abgabe ein. Ausführlichere Beschreibungen der Ribozym-Übertragung und -Verabreichung werden bei Sullivan et al. (Internat. Pat. Anm. Veröf. -Nr. WO 94/02595) und Draper et al. (Internat. Pat. Anm. Veröf. -Nr. WO 93/23569) vorgesehen.

[0286] Ein anderes Mittel zur Anreicherung von hohen Konzentrationen eines oder mehrerer Ribozyme innerhalb von Zellen ist der Einbau der das Ribozym codierenden Sequenzen in einen DNA-Expressionsvektor. Die Transkription der Ribozymsequenzen wird durch einen Promotor für die eukaryontische RNA-Polymerase I

(poll), RNA-Polymerase II (polII) oder RNA-Polymerase III (polIII) gesteuert. Transkripte von poll- oder polII-Promotoren werden in allen Zellen in hohen Raten exprimiert; die Raten eines bestimmten polIII-Promotors in einem bestimmten Zelltyp hängen von der Art der in der Nähe befindlichen genregulatorischen Sequenzen (Enhancer, stumme Sequenzen, etc.) ab. Prokaryontische RNA-Polymerase-Promotoren können auch verwendet werden, mit der Maßgabe, daß das prokaryontische RNA-Polymeraseenzym in den geeigneten Zellen exprimiert wird (Elroy-Stein und Moss, 1990; Gao und Huang, 1993; Lieber et al., 1993; Zhou et al., 1990). Die durch solche Promotoren exprimierten Ribozyme können in Säugerzellen wirksam sein (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 Transkriptionseinheiten können in eine Vielzahl von Vektoren zur Einschleusung in Säugerzellen eingebaut werden, einschließlich, aber nicht begrenzt auf, Plasmid-DNA-Vektoren, Virus-DNA-Vektoren (wie Adenovirus- oder Adeno-assoziierte Vektoren) oder Virus-RNA-Vektoren (wie Retrovirus-, Semliki-Forrest-Virus- oder Sindbisvirus-Vektoren).

[0287] Die erfindungsgemäßen Ribozyme können als diagnostische Hilfsmittel verwendet werden, um eine Gendrift sowie Mutationen innerhalb von Zelllinien oder Zelltypen zu untersuchen. Sie können auch verwendet werden, um die Konzentrationen des RNA-Zielmoleküls abzuschätzen. Die enge Beziehung zwischen der Ribozymaktivität und der Struktur der Ziel-RNA ermöglicht den Nachweis von Mutationen in einer Region des Moleküls, welche die Basenpaarung und die dreidimensionale Struktur der Ziel-RNA verändert. Unter Verwendung von mehreren der in dieser Erfindung beschriebenen Ribozymen kann man Nucleotidaustausche kartieren, welche für die RNA-Struktur und -Funktion *in vitro* sowie in Zellen und Geweben wichtig sind. Die Spaltung von Ziel-RNAs mit Ribozymen kann verwendet werden, um die Genexpression zu inhibieren und die Rolle (im wesentlichen) von spezifischen Genprodukten in bestimmten Zellen oder Zelltypen zu definieren.

5.9 Isolierung von homologen Genen und Genfragmenten

[0288] Die erfindungsgemäßen Gene und δ -Endotoxine schließen nicht nur die hierin offenbarten Sequenzen vollständiger Länge ein, sondern auch Fragmente dieser Sequenzen oder Fusionsproteine, welche die charakteristische Insektizidaktivität der hierin spezifisch veranschaulichten Sequenzen beibehalten.

[0289] Für den Fachmann sollte es ersichtlich sein, daß insektizide δ -Endotoxine durch mehrere Mittel identifiziert und erhalten werden können. Die spezifischen Gene oder Teile hiervon können von einer Kultur-Hinterlegungsstelle erhalten werden oder zum Beispiel unter Verwendung eines Gensynthesegeräts synthetisch konstruiert werden. Variationen dieser Gene können durch Standardtechniken zur Einführung von Punktmutationen ohne weiteres konstruiert werden. Fragmente dieser Gene können unter Verwendung von im Handel erhältlichen Exonucleasen oder Endonucleasen gemäß Standardverfahren ebenfalls hergestellt werden. Zum Beispiel können Enzyme wie Bal31 oder die ortsspezifische Mutagenese verwendet werden, um systematisch Nucleotide an den Enden dieser Gene abzuspalten. Unter Verwendung einer Vielzahl von anderen Restriktionsenzymen können auch Gene erhalten werden, welche aktive Fragmente codieren. Proteasen können verwendet werden, um direkt aktive Fragmente dieser δ -Endotoxine zu erhalten.

[0290] Äquivalente δ -Endotoxine und/oder Gene, welche diese äquivalenten δ -Endotoxine codieren, können mittels den hierin bereitgestellten Lehren auch aus Bacillus-Stämmen und/oder DNA-Genbanken isoliert werden. Zum Beispiel können Antikörper gegen die hierin offenbarten und beanspruchten δ -Endotoxine verwendet werden, um andere δ -Endotoxine aus einer Mischung von Proteinen zu identifizieren und zu isolieren. Genauer können Antikörper gegen die Teile der δ -Endotoxine, welche am konstantesten sind und sich am stärksten von anderen *B. thuringiensis*- δ -Endotoxinen unterscheiden, erzeugt werden. Diese Antikörper können dann verwendet werden, um spezifisch äquivalente δ -Endotoxine mit der charakteristischen Insektizidaktivität durch eine Immunpräzipitation, einen Enzym-gebundenen Immunoassay (ELISA) oder ein Western-Blot-Verfahren zu identifizieren.

[0291] Ein weiteres Verfahren zur Identifizierung der erfindungsgemäßen δ -Endotoxine und Gene ist durch die Verwendung von Oligonucleotidsonden. Diese Sonden sind Nucleotidsequenzen, welche einen nachweisbaren Marker aufweisen. Wie auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt ist, falls das Sondenmolekül und die Nucleinsäureprobe unter Bildung einer starken Bindung zwischen den zwei Molekülen hybridisieren, kann mit ziemlicher Sicherheit angenommen werden, daß die Sonde und die Probe im wesentlichen identisch sind. Der nachweisbare Marker der Sonde stellt ein Mittel für den Nachweis in einer bekannten Art und Weise bereit, ob eine Hybridisierung stattgefunden hat. Eine solche Sondenanalyse stellt ein schnelles Verfahren zur Identifizierung von erfindungsgemäßen formiziden δ -Endotoxin-Genen bereit.

[0292] Die Nucleotidsegmente, die als erfindungsgemäße Sonden verwendet werden, können unter Verwen-

derung von DNA-Synthesegeräten mittels Standardverfahren synthetisiert werden. Bei der Verwendung der Nucleotidsegmente als Sonden wird die einzelne Sonde mit irgendeinem geeigneten Marker markiert, welcher den Fachleuten bekannt ist, einschließlich radioaktive und nicht-radioaktive Marker. Typische radioaktive Marker schließen ^{32}P , ^{125}I , ^{35}S oder dergleichen ein. Eine mit einem radioaktiven Isotop markierte Sonde kann aus einer Nucleotidsequenz, welche zu der DNA-Probe komplementär ist, durch eine herkömmliche Nicktranslationsreaktion unter Verwendung einer DNase und einer DNA-Polymerase konstruiert werden. Die Sonde und die Probe können dann in einer Hybridisierungspufferlösung kombiniert und bei einer geeigneten Temperatur gehalten werden, bis eine Aneinanderlagerung stattfindet. Danach wird die Membran gewaschen, um fremde Materialien abzuspülen, wobei die Probe und die gebundenen Sondenmoleküle zurückbleiben, welche typischerweise mittels Autoradiographie und/oder Flüssigkeitsszintillationszählung nachgewiesen und quantifiziert werden.

[0293] Nicht-radioaktive Marker schließen 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 dessen Derivate ein. Die Sonde kann auch an beiden Enden mit verschiedenen Arten von Markern markiert sein, um die Trennung zu erleichtern, wie zum Beispiel durch die Verwendung eines Isotopenmarkers an dem oben erwähnten Ende und einem Biotinmarker an dem anderen Ende.

[0294] Die Doppelstrangbildung und -stabilität hängt von der wesentlichen Komplementarität zwischen den zwei Strängen eines Hybrids ab, und, wie oben angemerkt, kann ein gewisser Grad von Fehlpaarungen toleriert werden. Daher schließen die erfindungsgemäßen Sonden Mutationen (sowohl einzelne als auch mehrere), Deletionen, Insertionen der beschriebenen Sequenzen und Kombinationen hiervon ein, wobei die Mutationen, Insertionen und Deletionen die Bildung von stabilen Hybriden mit dem Ziel-Polynucleotid von Interesse ermöglichen. Mutationen, Insertionen und Deletionen können in eine bestimmte Polynucleotidsequenz auf vielfältige Weise durch Verfahren, welche dem Fachmann gegenwärtig bekannt sind, und möglicherweise durch andere Verfahren, welche in der Zukunft bekannt werden, eingeführt werden.

[0295] Die möglichen Variationen in den aufgeführten Sonden ist zum Teil auf die Redundanz des genetischen Codes zurückzuführen. Das heißt, daß aufgrund der Redundanz des genetischen Codes mehr als ein codierendes Nucleotidtriplett (Codon) für die meisten Aminosäuren, welche zur Herstellung von Proteinen verwendet werden, verwendet werden kann. Daher können verschiedene Nucleotidsequenzen eine bestimmte Aminosäure codieren. So können die Aminosäuresequenzen der *B. thuringiensis*- δ -Endotoxine und Peptide durch äquivalente Nucleotidsequenzen, welche dieselbe Aminosäuresequenz des Proteins oder Peptids codieren, hergestellt werden. Demgemäß schließt die vorliegende Erfindung solche äquivalenten Nucleotidsequenzen ein. Umgekehrte und komplementäre Sequenzen sind auch ein Aspekt der vorliegenden Erfindung und können ohne weiteres durch einen Fachmann verwendet werden. Außerdem ist gezeigt worden, daß Proteine mit einer identifizierten Struktur und Funktion durch Veränderung der Aminosäuresequenz konstruiert werden können, falls solche Veränderungen die Sekundärstruktur des Proteins nicht verändern (Kaiser und Kezdy, 1984). Folglich schließt die vorliegende Erfindung Mutanten der hierin gezeigten Aminosäuresequenz ein, welche die Sekundärstruktur des Proteins nicht verändern, oder welche, falls die Struktur verändert wird, die biologische Aktivität im wesentlichen beibehalten. Ferner schließt die Erfindung auch Mutanten von Organismen ein, welche das gesamte oder einen Teil eines erfindungsgemäßen Gens, welches ein δ -Endotoxin codiert, aufgenommen haben. Solche Mutanten können durch Techniken hergestellt werden, welche den Fachleuten hinreichend bekannt sind. Zum Beispiel kann eine UV-Bestrahlung verwendet werden, um Mutanten von Wirtsorganismen herzustellen. Desgleichen können solche Mutanten asporogene Wirtszellen einschließen, welche ebenfalls durch Verfahren hergestellt werden können, die auf dem Fachgebiet hinreichend bekannt sind.

6.0 Beispiele

[0296] Die folgenden Beispiele sind eingeschlossen, um bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung zu veranschaulichen. Den Fachleuten sollte bewußt sein, daß die in den Beispielen offenbarten Techniken, die repräsentative Techniken befolgen, welche die Erfinder entdeckt haben, bei der Ausführung der Erfindung hinreichend wirksam sind und folglich als bevorzugte Verfahren zu deren Ausführung angesehen werden können. Jedoch sollte den Fachleuten im Hinblick auf die vorliegende Offenbarung bewußt sein, daß viele Veränderungen bei den spezifischen Ausführungsformen, welche offenbart werden, durchgeführt werden können und dennoch das gleiche oder ein ähnliches Ergebnis erhalten wird, ohne vom Geist und Schutzzumfang der Erfindung abzuweichen.

6.1 Beispiel 1 – Konstruktion von *B. thuringiensis*-Hybrid- δ -Endotoxinen

[0297] Die *B. thuringiensis*-„Shuttle“-Vektoren pEG853, pEG854 und pEG857, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, sind beschrieben worden (Baum et al., 1990). pEG857 enthält das Cry1Ac-Gen, cloniert in pEG853 als ein SphI-BamHI-DNA-Fragment. pEG1064 wurde in einer solchen Weise konstruiert, daß die KpnI-Stelle innerhalb des cry1Ac-Gens erhalten wurde und die KpnI-Stelle in der multiplen Clonierungsstelle (MCS) von pEG857 eliminiert wurde. Dies wurde erreicht, indem die pEG857-DNA aufeinanderfolgend einem begrenzten KpnI-Verdau unterzogen wurde, so daß nur eine KpnI-Stelle geschnitten wird, das überhängende KpnI-5'-Ende durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt wurde, um glatte DNA-Enden zu erzeugen, und die glatten Enden der DNA durch die T4-DNA-Ligase verknüpft wurden. pEG318 enthält das cry1F-Gen (Chambers et al., 1991), cloniert in die XhoI-Stelle von pEG854 als ein XhoI-Sall-DNA-Fragment. pEG315 enthält das cry1C-Gen aus Stamm EG6346 (Chambers et al., 1991), cloniert in die XhoI-BamHI-Stellen von pEG854 als ein Sall-BamHI-DNA-Fragment.

[0298] Fig. 1A zeigt eine schematische Darstellung der DNA, welche die vollständigen cry1Ac-, cry1Ab-, cry1C- und cry1F-Gene codiert, die in pEG854/pEG1064, pEG20, pEG315 bzw. pEG318 enthalten sind. Einmalige Restriktionsstellen, welche bei der Konstruktion von bestimmten Hybridgenen verwendet wurden, sind auch gezeigt. Fig. 1B zeigt eine schematische Darstellung von Hybridgenen, welche für die vorliegende Erfindung relevant sind. In einigen Fällen wurde eine übliche PCRTM-Amplifikation mit mutagenen Oligonucleotidprimern angewendet, um geeignete Restriktionsstellen in DNA-Fragmente einzubauen, welche zur Konstruktion des Hybridgens verwendet wurden. Bestimmte Hybridgen-Konstruktionen konnten nicht durch eine Restriktionsfragment-Subclonierung erhalten werden. In solchen Fällen wurde eine überlappende PCRTM-Verlängerung (PCRTM overlap extension, POE) verwendet, um das gewünschte Hybridgen zu konstruieren (Horton et al., 1989). Die folgenden Oligonucleotidprimer (bezogen von Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) wurden verwendet:

Primer A: 5'-GGATAGCACTCATCAAAGGTACC-3' (SEQ ID NO: 1).
 Primer B: 5'-GAAGATATCCAATTCGAACAGTTTCCC-3' (SEQ ID NO: 2)
 Primer C: 5'-CATATTCTGCCTCGAGTGTTCAGTAAC-3' (SEQ ID NO: 3)
 Primer D: 5'-CCCAGATCGGCCGCATGC-3' (SEQ ID NO: 4)
 Primer E: 5'-CATTGGAGCTCTCCATG-3' (SEQ ID NO: 5)
 Primer F: 5'-GCACTACGATGTATCC-3' (SEQ ID NO: 6)
 Primer G: 5'-CATCGTAGTGCAACTCTTAC-3' (SEQ ID NO: 7)
 Primer H: 5'-CCAAGAAAATACTAGAGCTCTTGTTAAAAAAGGTGTTCC-3' (SEQ ID NO: 8)
 Primer I: 5'-ATTTGAGTAATACTATCC-3' (SEQ ID NO: 23)
 Primer J: 5'-ATTACTCAAATACCATTGG-3' (SEQ ID NO: 24)
 Primer K: 5'-TCGTTGCTCTGTTCCCG-3' (SEQ ID NO: 31)

[0299] Die in Fig. 1B beschriebenen Plasmide, welche die erfindungsgemäß relevanten Hybrid- δ -Endotoxin-Gene enthalten, werden nachstehend beschrieben. Die Isolierung oder Reinigung von DNA-Fragmenten, welche mittels Restriktion von Plasmid-DNA, PCRTM-Amplifikation oder POE erzeugt wurden, verweist auf die aufeinanderfolgende Anwendung einer Agarose-TAE-Gelelektrophorese und die Verwendung des GeneClean Kits (Bio 101) gemäß den Empfehlungen des Herstellers. pEG1065 wurde durch eine PCRTM-Amplifikation des cry1F-DNA-Fragments unter Verwendung des Primerpaars A und B und pEG318 als DNA-Matrize konstruiert. Das erhaltene PCRTM-Produkt wurde isoliert, mit AsuII und KpnI geschnitten und dazu verwendet, das entsprechende AsuII-KpnI-DNA-Fragment in pEG857 zu ersetzen. Das Plasmid pEG1067 wurde mittels POE und unter Verwendung der DNA-Fragmente Saul-KpnI von cry1F und AsuII-Clal von cry1Ac, welche aus pEG318 bzw. pEG857 isoliert wurden, konstruiert. Das erhaltene POE-Produkt wurde mit dem Primerpaar A und B einer PCRTM-Amplifikation unterzogen, mit AsuII und KpnI geschnitten und dazu verwendet, das entsprechende AsuII-KpnI-Fragment in pEG857 zu ersetzen.

[0300] pEG1068 wurde konstruiert, indem das aus pEG857 isolierte SacI-KpnI-DNA-Fragment von cry1Ac durch das entsprechende SacI-KpnI-DNA-Fragment, welches aus cry1F (pEG318) isoliert worden war, ersetzt wurde. pEG1070 wurde konstruiert, indem das aus pEG1065 isolierte SacI-KpnI-DNA-Fragment durch das entsprechende SacI-KpnI-DNA-Fragment, welches aus cry1Ac (pEG857) isoliert worden war, ersetzt wurde. pEG1072 wurde konstruiert, indem das aus pEG1067 isolierte SacI-KpnI-DNA-Fragment durch das entsprechende SacI-KpnI-DNA-Fragment, welches aus cry1Ac (pEG857) isoliert worden war, ersetzt wurde. pEG1074, pEG1076 und pEG1077 wurden konstruiert, indem das SphI-XhoI-DNA-Fragment aus pEG1064 durch mittels PCRTM amplifizierte SphI-XhoI-DNA-Fragment aus pEG1065, pEG1067 bzw. pEG1068 unter Verwendung des Primerpaars C und D ersetzt wurde. pEG1089 wurde konstruiert, indem das SphI-SacI-DNA-Fragment von pEG1064 durch das isolierte und mit SphI und SacI geschnittene PCRTM-Produkt von

cry1F welches unter Verwendung des Primerpaars D und E und der Matrize pEG318 erzeugt worden war, ersetzt wurde.

[0301] pEG 1091 wurde konstruiert, indem das SphI-SacI-DNA-Fragment von pEG 1064 durch das isolierte und mit SphI und SacI geschnittene PCRTM-Produkt von cry1C, welches unter Verwendung des Primerpaars D und H und der Matrize pEG315 erzeugt worden war, ersetzt wurde.

[0302] pEG1088 wurde mittels POE unter Verwendung eines cry1Ac-DNA-Fragments, welches unter Verwendung des Primerpaars B und F erzeugt wurde, und eines cry1C-DNA-Fragments, welches unter Verwendung des Primerpaars A und G erzeugt wurde, konstruiert. Das SacI-KpnI-Fragment wurde aus dem erhaltenen POE-Produkt isoliert und dazu verwendet, das entsprechende SacI-KpnI-Fragment in pEG1064 zu ersetzen.

[0303] pEG365 wurde konstruiert, indem zuerst das SphI-KpnI-DNA-Fragment aus pEG1065 durch das entsprechende cry1Ab-DNA-Fragment, welches aus pEG20 isoliert worden war, ersetzt wurde, um pEG364 zu erhalten. Das SacI-KpnI-DNA-Fragment aus pEG364 wurde dann durch das entsprechende cry1Fb-DNA-Fragment, welches aus pEG318 isoliert worden war, ersetzt.

[0304] pEG1092 wurde konstruiert, indem das KpnI-BamHI-DNA-Fragment aus pEG1088 durch das entsprechende DNA-Fragment, welches aus pEG315 isoliert worden war, ersetzt wurde. pEG1092 unterscheidet sich von dem cryAb/cry1C-Hybrid- δ -Endotoxin-Gen, welches in der Internat. Pat. Anmeldg. Veröffentl.-Nr. WO 95/06730 offenbart ist.

[0305] pEG1093 wurde konstruiert, indem das SphI-AsuII-DNA-Fragment aus pEG1068 durch das entsprechende SphI-AsuII-DNA-Fragment, welches aus pEG20 isoliert worden war, ersetzt wurde.

[0306] pEG378 wurde mittels POE unter Verwendung eines cry1Ac-DNA-Fragments, welches unter Verwendung des Primerpaars B und I und unter Verwendung von pEG857 als Matrize erzeugt wurde, und eines cry1F-DNA-Fragments, welches unter Verwendung des Primerpaars A und J und unter Verwendung von pEG318 als Matrize erzeugt wurde, konstruiert. Das erhaltene POE-Produkt wurde mit AsuII und KpnI geschnitten, und das erhaltene isolierte DNA-Fragment wurde verwendet, um das entsprechende AsuII-KpnI-DNA-Fragment in pEG1064 zu ersetzen.

[0307] pEG381 wurde konstruiert, indem das AsuII-XhoI-DNA-Fragment in pEG1064 durch das entsprechende AsuII-XhoI-DNA-Fragment, welches durch die PCRTM-Amplifikation von pEG378 unter Verwendung des Primerpaars C und K isoliert worden war, ersetzt wurde.

6.2 Beispiel 2 – Herstellung der Hybrid-Toxine in *B. thuringiensis*

[0308] Die Plasmide, welche die in Beispiel 1 beschriebenen Hybrid-Toxine codieren, wurden in *B. thuringiensis* eingeschleust, wie beschrieben wurde (Mettus und Macalusco, 1990). Die erhaltenen *B. thuringiensis*-Stämme wurden in 50 ml C-2-Medium gezüchtet, bis die gesamte Kultur Sporen bildete, und anschließend lysiert (etwa 48 h). Da die Kristallbildung eine Voraussetzung für die effiziente kommerzielle Herstellung von δ -Endotoxinen in *B. thuringiensis* ist, wurde eine mikroskopische Analyse durchgeführt, um Kristalle in den sporenbildenden Kulturen zu identifizieren (Tabelle 5).

Tabelle 5
Kristallbildung durch die Hybrid- δ -Endotoxine

Stamm	Plasmid	Stamm- δ -Endotoxine	Kristall- bildung
EG11060	pEG1065	Cry1Ac + Cry1F	+
EG11062	pEG1067	Cry1Ac + Cry1F	+
EG11063	pEG1068	Cry1Ac + Cry1F	+
EG11065	pEG1070	Cry1Ac + Cry1F	-
EG11067	pEG1072	Cry1Ac + Cry1F	-
EG11071	pEG1074	Cry1Ac + Cry1F	+
EG11073	pEG1076	Cry1Ac + Cry1F	+
EG11074	pEG1077	Cry1Ac + Cry1F	+
EG11087	pEG1088	Cry1Ac + Cry1C	-
EG11088	pEG1089	Cry1F + Cry1Ac	-
EG11090	pEG1091	Cry1C + Cry1Ac	-
EG11091	pEG1092	Cry1Ac + Cry1C	+
EG11092	pEG1093	Cry1Ab + Cry1Ac + Cry1F	+
EG11735	pEG365	Cry1Ab + Cry1F + Cry1Ac	+
EG11751	pEG378	Cry1Ac + Cry1F	+
EG11768	pEG381	Cry1Ac + Cry1F	+

[0309] Die δ -Endotoxin-Produktion für einige der in Tabelle 5 aufgeführten *B. thuringiensis*-Stämme wurde durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), wie durch Baum et al., 1990, beschrieben, untersucht. Ein gleiches Volumen der Kulturen jedes *B. thuringiensis*-Stamms wurde in C-2-Medium gezüchtet, bis die gesamte Kultur Sporen bildete, und anschließend lysiert. Die Kulturen wurden zentrifugiert, und das Sporen/Kristall-Pellet wurde zweimal mit gleichen Volumina von destilliertem, deionisiertem Wasser gewaschen. Das, am Ende erhaltene Pellet wurde in einem Volumen von 0,005% Triton X-100® suspendiert, welches der Hälfte des Kulturvolumens entsprach. Ein gleiches Volumen jeder gewaschenen Kultur wurde durch eine SDS-PAGE analysiert, wie in [Fig. 2](#) dargestellt ist.

[0310] Die Mehrzahl der Hybride, umfassend Cry 1Ac und Cry 1F, bildeten in *B. thuringiensis* stabile Kristalle. Eine bemerkenswerte Ausnahme ist EG11088, worin das aktive Toxinfragment dem reziproken Austausch von EG11063 entsprechen würde. Zwei der drei Hybride, umfassend Cry1Ac und Cry1C, EG11087 und EG11090, bildeten in *B. thuringiensis* keine Kristalle, obwohl diese reziproken Hybride die aktivierten Toxinfragmente der Kristalle bildenden Stämme EG11063 und EG11074 nachahmen.

[0311] Jeder der mittels SDS-PAGE untersuchte Stamm erzeugte eine gewisse δ -Endotoxin-Konzentration. Wie erwartet, stellten jedoch solche Kulturen, welche als Kristall-negativ identifiziert wurden, sehr wenig Protein her (z. B. Bahn e: EG11065; Bahn f: EG11067; Bahn j: EG11088; und Bahn k: EG11090). Als Referenz sind typische Ausbeuten für ein kristallbildendes δ -Endotoxin für Cry1Ac (Bahn a) angegeben. Mehrere Hybrid- δ -Endotoxine stellten vergleichbare Proteinkonzentrationen her, einschließlich EG11060 (Bahn b), EG11062 (Bahn c), EG11063 (Bahn d; SEQ ID NO: 10) und EG11074 (Bahn i; SEQ ID NO: 12). Die Daten zeigen deutlich, daß eine effiziente Hybrid- δ -Endotoxin-Herstellung in *B. thuringiensis* nicht vorhersagbar ist und in Abhängigkeit von den Stamm- δ -Endotoxinen, welche zur Konstruktion des Hybrids verwendet wurden, variiert.

6.3 Beispiel 3 – Proteolytische Prozessierung der Hybrid- δ -Endotoxine

[0312] Der proteolytische Abbau der Protoxinform des δ -Endotoxins zu einem stabilen aktiven Toxin erfolgt, sobald die δ -Endotoxin-Kristalle im Mitteldarm der Larve solubilisiert sind. Eine Maßeinheit für die potentielle Aktivität von δ -Endotoxinen ist die Stabilität des aktiven δ -Endotoxins in einer proteolytischen Umgebung. Um die proteolytische Empfindlichkeit der Hybrid- δ -Endotoxine zu untersuchen, wurden das solubilisierte Toxin einem Trypsinverdau unterzogen. Die δ -Endotoxine wurden aus sporenbildenden *B. thuringiensis*-Kulturen gereinigt und quantifiziert, wie beschrieben wurde (Chambers et al., 1991). Genau 250 μ g jedes Hybrid- δ -Endotoxin-Kristalls wurden in 30 mM NaHCO₃, 10 mM DTT (Gesamtvolumen 0,5 ml) solubilisiert. Das Trypsin wurde zu dem solubilierten Toxin in einem Verhältnis von 1 : 10 zugegeben. Nach geeigneten Zeiträumen wurden 50 μ l-Aliquots entnommen und in 50 μ l Laemmli-Puffer überführt, für 3 min auf 100°C erhitzt und in einem Trockeneis-Ethanol-Bad zur nachfolgenden Analyse eingefroren. Die Trypsin-Spaltprodukte der solubilierten Toxine wurden durch eine SDS-PAGE analysiert, und die Menge des aktiven δ -Endotoxins zu jedem Zeitpunkt wurde mittels Densitometrie quantifiziert. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse aus diesen Untersuchungen ist in [Fig. 3](#) gezeigt.

[0313] Das Wildtyp-Cry1Ac wird schnell zu dem aktiven δ -Endotoxin-Fragment prozessiert, welches für die Dauer der Untersuchung stabil ist. Die Hybrid- δ -Endotoxine aus EG11063 und EG11074 werden auch zu aktiven δ -Endotoxin-Fragmenten prozessiert, welche für die Dauer der Untersuchung stabil sind. Die Prozessierung des EG11063- δ -Endotoxins läuft langsamer ab, und zu jedem Zeitpunkt verbleibt ein höherer Prozentsatz dieses aktiven δ -Endotoxin-Fragments. Obwohl die Hybrid- δ -Endotoxine aus EG11060 und EG11062 zu aktiven δ -Endotoxin-Fragmenten prozessiert werden, sind diese Fragmente gegen eine weitere Spaltung empfindlicher und werden in unterschiedlichen Geschwindigkeiten während des Verlaufs der Untersuchung abgebaut. Die 5'-Austauschstellen zwischen cry1Ac und cry1F für die EG11062- und EG11063- δ -Endotoxine ergeben Toxine, welche sich nur durch 21 Aminosäurereste unterscheiden (vgl. [Fig. 1](#)). Jedoch wird die Wichtigkeit der Beibehaltung von Cry1Ac-Sequenzen an diesen Positionen durch den viel schnelleren Abbau des EG11062- δ -Endotoxins offensichtlich. Diese Daten zeigen, daß verschiedene Hybrid- δ -Endotoxine, welche unter Verwendung derselben Stamm- δ -Endotoxine konstruiert wurden, sich hinsichtlich der biochemischen Eigenschaften, wie der proteolytischen Stabilität, wesentlich unterscheiden können.

6.4 Beispiel 4 – Bioaktivität der Hybrid- δ -Endotoxine

[0314] *B. thuringiensis*-Kulturen, die das gewünschte δ -Endotoxin exprimieren, wurden gezüchtet, bis alle Zellen eine Sporenbildung zeigten, und anschließend lysiert und gewaschen, wie in Beispiel 2 beschrieben wurde. Die δ -Endotoxin-Konzentrationen für jede Kultur wurden durch eine SDS-PAGE quantifiziert, wie beschrieben wurde (Baum et al., 1990). Im Falle von Bioassay-Screenings wurde eine einzige geeignete Konzentration jeder gewaschenen δ -Endotoxin-Kultur topisch in 32 Vertiefungen, enthaltend 1,0 ml Nahrungsersatz pro Vertiefung (Oberfläche 175 mm²), eingebracht. Eine einzelne frisch geschlüpfte Larve wurde in jede der behandelten Vertiefungen gelegt, und die Schale wurde mit einem durchsichtigen, perforierten Mylarfilm abgedeckt. Die Larvenmortalität wurde nach 7-tägiger Fütterung beurteilt, und die Mortalität in Prozent wurde als das Verhältnis der Anzahl der toten Larven zu der Gesamtanzahl an behandelten Larven, 32, ausgedrückt.

[0315] Im Falle von LC₅₀-Bestimmungen (δ -Endotoxin-Konzentration, die eine Mortalität von 50% ergibt) wurden δ -Endotoxine aus den *B. thuringiensis*-Kulturen gereinigt und quantifiziert, wie durch Chambers et al. (1991) beschrieben wurde. Acht Konzentrationen der δ -Endotoxine wurden durch serielle Verdünnung in 0,005% Triton X-100[®] hergestellt, und jede Konzentration wurde topisch in Vertiefungen, enthaltend 1,0 ml Nahrungserersatz, eingebracht. Die Larvenmortalität wurde nach 7-tägiger Fütterung beurteilt (32 Larven für jede δ -Endotoxin-Konzentration). In allen Fällen diente das Verdünnungsmittel als Kontrolle.

[0316] Ein Vergleich der Cry1A/Cry1F-Hybrid-Toxine durch Bioassay-Screenings ist in Tabelle 6 gezeigt. Die Hybrid- δ -Endotoxine aus den Stämmen EG11063 und EG11074 behalten die Aktivitäten der Stamm-Cry1Ac- und -Cry1F- δ -Endotoxine bei. Außerdem behält das Hybrid- δ -Endotoxin aus EG11735 die Aktivität seiner Stamm-Cry1Ab- und -Cry1F- δ -Endotoxine bei. Die durch die Stämme EG11061, EG11062, EG11071 und EG11073 hergestellten δ -Endotoxine besitzen keine Insektizidaktivität gegenüber den getesteten Insektenlarven, obwohl sie (1) mindestens ein Stamm- δ -Endotoxin umfassen, welches gegenüber den angegebenen Larven aktiv ist, und (2) stabile, gut definierte Kristalle in *B. thuringiensis* bilden. Diese Ergebnisse veranschaulichen die nicht vorhersagbaren Eigenschaften von Hybrid-Toxin-Konstruktionen.

[0317] Für die Daten in Tabelle 6 wurden alle Stämme als gewaschene, sporenbildende Kulturen getestet. Für jedes getestete Insekt wurden äquivalente Mengen der δ -Endotoxine verwendet, und die Insektizidaktivität

wurde auf den Stamm bezogen, der die höchste Mortalität in Prozent zeigt (++++).

Tabelle 6
Bioassay-Screenings von Cry1A/Cry1F-Hybrid- δ -Endotoxinen

Stamm	<i>S. frugiperda</i>	<i>S. exigua</i>	<i>H. virescens</i>	<i>H. zea</i>	<i>O. nubilalis</i>
Cry1Ac	-	-	++++	++++	+++
Cry1F	++++	++	++	++	++
Cry1Ab	++	+	+++	++	+++
EG11060	-	-	-	-	-
EG11062	-	-	-	-	-
EG11063	++++	++++	+++	+++	++++
EG11071	-	-	-	-	-
EG11073	-	-	-	-	-
EG11074	++++	++++	+++	+++	++++
EG11090	-	+++	-	-	-
EG11091	++++	++++	-	-	N.D.
EG11092	++++	++++	+++	+++	N.D.
EG11735	++++	++++	+++	+++	N.D.
EG11751	N.D. ^a	++++	N.D.	++++	N.D.

^aN. D. = Nicht bestimmt.

[0318] Die in [Fig. 1](#) beschriebenen δ -Endotoxine und die in Bioassay-Screenings gezeigte Insektizidaktivität wurden in Form von gereinigten Kristallen untersucht, um deren LC_{50} -Werte zu bestimmen (vgl. Tabelle 7). Die aus den Stämmen EG11063, EG11074, EG11091 und EG11735 gereinigten δ -Endotoxine zeigen alle eine erhöhte Aktivität gegenüber dem Heerwurm (*S. frugiperda* und *S. exigua*) im Vergleich zu irgendeinem der getesteten Wildtyp- δ -Endotoxine. Die EG11063- und EG11074- δ -Endotoxine ergeben identische aktive Toxinfragmente ([Fig. 1B](#)), wie durch ihre ähnlichen LC_{50} -Werte bei den untersuchten Insekten erkennbar ist. Ein unerwartetes Ergebnis, welches aus diesen Daten offensichtlich wird, ist, daß ein Hybrid- δ -Endotoxin wie EG11063, EG11092, EG11074, EG11735 oder EG11751 die Aktivität seiner jeweiligen Stamm- δ -Endotoxine beibehalten kann und gegenüber von bestimmten Insekten wie *S. exigua* eine viel höhere Aktivität als jedes Stamm- δ -Endotoxin zeigen kann. Dieses breite Spektrum der Insektizidaktivität bei ähnlichen oder geringeren Dosen als bei den Stamm- δ -Endotoxinen, zusammen mit der Konzentration der Toxinproduktion des Wildtyps (Beispiel 2), machen diese Proteine für die Herstellung in *B. thuringiensis* besonders geeignet. Obwohl das aus EG11091 abgeleitete δ -Endotoxin eine bessere Aktivität gegenüber *S. frugiperda* und *S. exigua* zeigt als seine Stamm- δ -Endotoxine, hat es die Aktivität gegenüber *H. virescens* und *H. zea*, welche dem Cry1Ac-Stamm-Toxin zuzuschreiben ist, verloren. Dieser begrenzte Wirtsbereich, zusammen mit einer geringeren Toxinausbeute, welche für das EG11091- δ -Endotoxin beobachtet wurde (Beispiel 2), machen es für Herstellung in *B. thuringiensis* weniger zugänglich.

Tabelle 7
 LC₅₀-Werte für die gereinigten Hybrid- δ -Endotoxine^a

Toxin	<i>S. frugiperda</i>	<i>S. exigua</i>	<i>H. virescens</i>	<i>H. zea</i>	<i>O. nubilalis</i>
Cry1Ac	>10000	>10000	9	100	23
Cry1Ab	1435	4740	118	400	17
Cry1C	>10000	490	>10000	>10000	>10000
Cry1F	1027	3233	54	800	51
EG11063 (Cry1Ac/1F)	550	114	33	80	7
EG11074 (Cry1Ac/1F)	468	77	25	76	9
EG11091 (Cry1Ac/1C)	21	21	219	>10000	N.D. ^a

^aN. D. = Nicht bestimmt.

[0319] In Tabelle 7 sind die LC₅₀-Werte in Nanogramm gereinigtem δ -Endotoxin pro Vertiefung (175 mm²) ausgedrückt und entsprechen den zusammengenommenen Werten für 2 bis 6 Wiederholungsversuchen. N. D. = Nicht bestimmt.

Tabelle 8

DNA-AUSTAUSCHSTELLEN FÜR CRYI - HYBRID δ -ENDOTOXINE

Plasmid	SEQ ID NO:	5'-Austauschstelle	SEQ ID NO:	3'-Austauschstelle
pEG1065	15	TATCCAATTTCGAACGTCATC	21	ACTACCAGGTACCTTTTGATG
pEG1067	16	TTTAGTCATCGATTAAATCA	21	ACTACCAGGTACCTTTTGATG
pEG1068	17	ATAATAAGAGCTCCAATGTT	21	ACTACCAGGTACCTTTTGATG
pEG1070	15	TATCCAATTTCGAACGTCATC	19	TCATGGAGAGCTCCCTATGTT
pEG1072	16	TTTAGTCATCGATTAAATCA	19	TCATGGAGAGCTCCCTATGTT
pEG1074	15	TATCCAATTTCGAACGTCATC	35	TGCAACACTCGAGGCTGAAT
pEG1076	16	TTTAGTCATCGATTAAATCA	35	TGCAACACTCGAGGCTGAAT
pEG1077	17	ATAATAAGAGCTCCAATGTT	35	TGCAACACTCGAGGCTGAAT
pEG1088	18	TACATCGTAGTGCAACTCTT	22	ACTACCAGGTACCTTTTGATA
pEG1089	19	TCATGGAGAGCTCCCTATGTT	-	NA
pEG1091	20	TTAACAAAGAGCTCCCTATGTT	-	NA
pEG1092	18	TACATCGTAGTGCAACTCTT	-	NA
pEG1093	-	ND ^b	21	ACTACCAGGTACCTTTTGATG
pEG365	17	ATAATAAGAGCTCCAATGTT	21	ACTACCAGGTACCTTTTGATG
pEG378	32	TCAAATACCATGGTAAAAG	21	ACTACCAGGTACCTTTTGATG
pEG381	32	TCAAATACCATGGTAAAAG	35	TGCAACACTCGAGGCTGAAT

^aNA = Nicht zutreffend. Diese Hybrid-Toxine enthalten nur eine Austauschstelle, wie in Fig. 1 gezeigt.

^bND = Nicht Unterscheidbar. Die Austauschstelle für diese Hybrid-Proteine sind durch DNA-Sequenzen definiert, welche zwischen beiden Stamm-Toxinen nicht unterscheidbar sind.

[0320] Tabelle 8 beschreibt die DNA-Sequenzen, welche die 5'- und 3'-Austauschstellen der erfindungsgemäß relevanten Hybrid- δ -Endotoxine umgeben. Wie durch die SEQ ID NO: erkennbar ist, haben bestimmte Hybrid- δ -Endotoxine gemeinsame Austauschstellen.

[0321] Zur Untersuchung des Effekt von anderen kleinen Veränderungen in der Austauschstelle, welche für die Konstruktion des Hybrid-Endotoxins ausgewählt wird, wurde die Aktivität von EG11751 und EG11063 gegenüber *S. exigua* und *H. zea* verglichen (Tabelle 9). Die Daten zeigen deutlich, daß die Eigenschaften des

Hybrid-Endotoxine verbessert werden können, indem die Austauschstelle zwischen den zwei Stamm- δ -Endotoxinen verändert wird. In diesem Beispiel wurde die Austauschstelle in dem EG11751- δ -Endotoxin um 75 Basenpaare in 3'-Richtung verschoben, verglichen mit dem EG11063- δ -Endotoxin, wobei eine verbesserte Insektizidaktivität erhalten wird. Obwohl keine wesentliche Verbesserung der Aktivität gegenüber *S. exigua* zwischen EG11063 und EG11751 beobachtet wird, wird eine wesentliche Verbesserung der *H. zea*-Aktivität um beinahe das 4fache für EG11751 beobachtet. Es ist wichtig anzumerken, daß Verbesserungen im Hinblick auf die Bioaktivität von Hybrid- δ -Endotoxinen durch eine Veränderung der Austauschstellen nicht vorhersagbar sind. Im Falle von EG11062 hebt die Verschiebung der Austauschstelle um 63 Basenpaare 5' zu der EG11063-Austauschstelle die Insektizidaktivität auf, wie in Tabelle 8 gezeigt ist.

Tabelle 9
Bioaktivität von EG11063 und EG11751

<i>B. thuringiensis</i> -Stamm	LC ₅₀ -Werte für gewaschene sporenbildende Kulturen	
	<i>S. exigua</i>	<i>H. zea</i>
EG11063	106	38
EG11751	90	10

[0322] Um den Effekt von Veränderungen in der Austauschstelle für Hybrid- δ -Endotoxine weiter zu untersuchen, wurde das durch pEG381 codierte Hybrid- δ -Endotoxin mit denen verglichen, welche durch pEG378 und pEG1068 codiert werden. In diesem Beispiel wurde die 3'-Austauschstelle für das durch pEG381 codierte Hybrid- δ -Endotoxin im Vergleich zu dem pEG378-Hybrid- δ -Endotoxin um 340 Basenpaare in 5'-Richtung verschoben. Die Daten in Tabelle 9 zeigen, daß diese Veränderung eine Erhöhung der Aktivität gegenüber *S. frugiperda*-Aktivität im Vergleich zu den durch pEG378 und pEG1066 codierten δ -Endotoxinen zur Folge hatte, während die erhöhte Aktivität beibehalten wird, welche für das durch pEG381 codierte δ -Endotoxin im Vergleich zu dem durch pEG1068 codierten δ -Endotoxin beobachtet wurde (vgl. Tabelle 8). Dieses Ergebnis ist unerwartet, da das aus der Proteolyse der codierten δ -Endotoxine von pEG378 und pEG381 erhaltene aktivierte Toxin identisch sein sollte. Dieses Beispiel zeigt ferner, daß Austauschstellen innerhalb des Protoxinfragments von δ -Endotoxinen eine große Auswirkung auf die Insektizidaktivität haben können.

Tabelle 10
Bioaktivität von Toxinen welche durch pEG378, pEG381 und pEG1068 codiert werden

Plasmid	LC ₅₀ -Werte für gereinigte Kristalle			
	<i>S. frugiperda</i>	<i>T. ni</i>	<i>H. zea</i>	<i>P. xylostella</i>
pEG378	464	57.7	37.5	3.02
pEG381	274	56.0	36.6	2.03
pEG1068	476	66.7	72.7	3.83

6.5 Beispiel 5 – Aktivität der Hybrid-Toxine gegenüber anderen Schädlingen

[0323] Die erfindungsgemäßen Toxine wurden auch gegenüber anderen Schädlingen getestet, einschließlich des südwestlichen Maisbohrers und zwei gegenüber der Sojabohne aktiven Schädlingen. Die Toxinproteine wurden solubilisiert, zu der Nahrung zugesetzt und in einem Bioassay gegen die Zielschädlinge getestet. Die Hybrid-Toxine zeigten bei allen drei Schädlingen eine sehr wirksame Bekämpfung.

Tabelle 11

LC₅₀- und EC₅₀-Bereiche von Hybrid-Toxinen beim südwestlichen Maisbohrer^{1,2}

	EG11063	EG11074	EG11091	EG11751
LC ₅₀	20	10-20	10-20	10-20
EC ₅₀	0.2-2	0.2-2	0.2-2	0.2-2

¹Alle Werte sind in µg/ml Nahrung ausgedrückt.²SWCB-Datenbereiche entsprechen den LC₅₀- bzw. EC₅₀-Bereichen (bestimmt durch % > 1. Entwicklungsstadium).

Tabelle 12

LC₅₀-Werte von chimären Kristallproteinen bei Sojabohnenschädlingen¹

Schädling	EG11063	EG11074	EG11091	EG11751	EG11768
Samtbohnenraupe I	0.9	0.6	0.3	0.1	0.06
Sojabohnenwickler	0.9	0.8	0.6	0.7	0.2

¹Alle Werte sind in µg/ml Nahrung ausgedrückt.²Die Samtbohnenraupe (*Anticarsia gemmatilis*) und der Sojabohnenwickler (*Pseudoplusia includens*) sind beide Vertreter der Familie Noctuidae.

6.6 Beispiel 6 – Aminosäuresequenzen der neuen Kristallproteine

6.6.1 Aminosäuresequenz des EG11063-Kristallproteins (SEQ ID NO: 10)

MetAspAsnAsnProAsnIleAsnGluCysIleProTyrAsnCysLeuSerAsnProGluValGluValLeu
 GlyGlyGluArgIleGluThrGlyTyrThrProIleAspIleSerLeuSerLeuThrGlnPheLeuLeuSer
 GluPheValProGlyAlaGlyPheValLeuGlyLeuValAspIleIleTrpGlyIlePheGlyProSerGln
 TrpAspAlaPheLeuValGlnIleGluGlnLeuIleAsnGlnArgIleGluGluPheAlaArgAsnGlnAla
 IleSerArgLeuGluGlyLeuSerAsnLeuTyrGlnIleTyrAlaGluSerPheArgGluTrpGluAlaAsp
 ProThrAsnProAlaLeuArgGluGluMetArgIleGlnPheAsnAspMetAsnSerAlaLeuThrThrAla
 IleProLeuPheAlaValGlnAsnTyrGlnValProLeuLeuSerValTyrValGlnAlaAlaAsnLeuHis
 LeuSerValLeuArgAspValSerValPheGlyGlnArgTrpGlyPheAspAlaAlaThrIleAsnSerArg
 TyrAsnAspLeuThrArgLeuIleGlyAsnTyrThrAspTyrAlaValArgTrpTyrAsnThrGlyLeuGlu
 ArgValTrpGlyProAspSerArgAspTrpValArgTyrAsnGlnPheArgArgGluLeuThrLeuThrVal
 LeuAspIleValAlaLeuPheProAsnTyrAspSerArgArgTyrProIleArgThrValSerGlnLeuThr
 ArgGluIleTyrThrAsnProValLeuGluAsnPheAspGlySerPheArgGlySerAlaGlnGlyIleGlu
 ArgSerIleArgSerProHisLeuMetAspIleLeuAsnSerIleThrIleTyrThrAspAlaHisArgGly

TyrTyrTyrTrpSerGlyHisGlnIleMetAlaSerProValGlyPheSerGlyProGluPheThrPhePro
LeuTyrGlyThrMetGlyAsnAlaAlaProGlnGlnArgIleValAlaGlnLeuGlyGlnGlyValTyrArg
ThrLeuSerSerThrLeuTyrArgArgProPheAsnIleGlyIleAsnAsnGlnGlnLeuSerValLeuAsp
GlyThrGluPheAlaTyrGlyThrSerSerAsnLeuProSerAlaValTyrArgLysSerGlyThrValAsp
SerLeuAspGluIleProProGlnAsnAsnAsnValProProArgGlnGlyPheSerHisArgLeuSerHis
ValSerMetPheArgSerGlyPheSerAsnSerSerValSerIleIleArgAlaProMetPheSerTrpThr
HisArgSerAlaThrProThrAsnThrIleAspProGluArgIleThrGlnIleProLeuValLysAlaHis
ThrLeuGlnSerGlyThrThrValValArgGlyProGlyPheThrGlyGlyAspIleLeuArgArgThrSer
GlyGlyProPheAlaTyrThrIleValAsnIleAsnGlyGlnLeuProGlnArgTyrArgAlaArgIleArg
TyrAlaSerThrThrAsnLeuArgIleTyrValThrValAlaGlyGluArgIlePheAlaGlyGlnPheAsn
LysThrMetAspThrGlyAspProLeuThrPheGlnSerPheSerTyrAlaThrIleAsnThrAlaPheThr
PheProMetSerGlnSerSerPheThrValGlyAlaAspThrPheSerSerGlyAsnGluValTyrIleAsp
ArgPheGluLeuIleProValThrAlaThrPheGluAlaGluTyrAspLeuGluArgAlaGlnLysAlaVal
AsnAlaLeuPheThrSerIleAsnGlnIleGlyIleLysThrAspValThrAspTyrHisIleAspGlnVal
SerAsnLeuValAspCysLeuSerAspGluPheCysLeuAspGluLysArgGluLeuSerGluLysValLys
HisAlaLysArgLeuSerAspGluArgAsnLeuLeuGlnAspProAsnPheLysGlyIleAsnArgGlnLeu
AspArgGlyTrpArgGlySerThrAspIleThrIleGlnArgGlyAspAspValPheLysGluAsnTyrVal
ThrLeuProGlyThrPheAspGluCysTyrProThrTyrLeuTyrGlnLysIleAspGluSerLysLeuLys
AlaPheThrArgTyrGlnLeuArgGlyTyrIleGluAspSerGlnAspLeuGluIleTyrLeuIleArgTyr
AsnAlaLysHisGluThrValAsnValProGlyThrGlySerLeuTrpProLeuSerAlaGlnSerProIle
GlyLysCysGlyGluProAsnArgCysAlaProHisLeuGluTrpAsnProAspLeuAspCysSerCysArg
AspGlyGluLysCysAlaHisHisSerHisHisPheSerLeuAspIleAspValGlyCysThrAspLeuAsn
GluAspLeuGlyValTrpValIlePheLysIleLysThrGlnAspGlyHisAlaArgLeuGlyAsnLeuGlu
PheLeuGluGluLysProLeuValGlyGluAlaLeuAlaArgValLysArgAlaGluLysLysTrpArgAsp
LysArgGluLysLeuGluTrpGluThrAsnIleValTyrLysGluAlaLysGluSerValAspAlaLeuPhe
ValAsnSerGlnTyrAspGlnLeuGlnAlaAspThrAsnIleAlaMetIleHisAlaAlaAspLysArgVal
HisSerIleArgGluAlaTyrLeuProGluLeuSerValIleProGlyValAsnAlaAlaIlePheGluGlu
LeuGluGlyArgIlePheThrAlaPheSerLeuTyrAspAlaArgAsnValIleLysAsnGlyAspPheAsn
AsnGlyLeuSerCysTrpAsnValLysGlyHisValAspValGluGluGlnAsnAsnGlnArgSerValLeu
ValValProGluTrpGluAlaGluValSerGlnGluValArgValCysProGlyArgGlyTyrIleLeuArg
ValThrAlaTyrLysGluGlyTyrGlyGluGlyCysValThrIleHisGluIleGluAsnAsnThrAspGlu
LeuLysPheSerAsnCysValGluGluGluIleTyrProAsnAsnThrValThrCysAsnAspTyrThrVal
AsnGlnGluGluTyrGlyGlyAlaTyrThrSerArgAsnArgGlyTyrAsnGluAlaProSerValProAla
AspTyrAlaSerValTyrGluGluLysSerTyrThrAspGlyArgArgGluAsnProCysGluPheAsnArg
GlyTyrArgAspTyrThrProLeuProValGlyTyrValThrLysGluLeuGluTyrPheProGluThrAsp
LysValTrpIleGluIleGlyGluThrGluGlyThrPheIleValAspSerValGluLeuLeuLeuMetGlu
Glu

6.6.2 Aminosäuresequenz des EG11074-Kristallproteins (SEQ ID NO: 12)

MetAspAsnAsnProAsnIleAsnGluCysIleProTyrAsnCysLeuSerAsnProGluValGluValLeu
GlyGlyGluArgIleGluThrGlyTyrThrProIleAspIleSerLeuSerLeuThrGlnPheLeuLeuSer
GluPheValProGlyAlaGlyPheValLeuGlyLeuValAspIleIleTrpGlyIlePheGlyProSerGln
TrpAspAlaPheLeuValGlnIleGluGlnLeuIleAsnGlnArgIleGluGluPheAlaArgAsnGlnAla
IleSerArgLeuGluGlyLeuSerAsnLeuTyrGlnIleTyrAlaGluSerPheArgGluTrpGluAlaAsp
ProThrAsnProAlaLeuArgGluGluMetArgIleGlnPheAsnAspMetAsnSerAlaLeuThrThrAla
IleProLeuPheAlaValGlnAsnTyrGlnValProLeuLeuSerValTyrValGlnAlaAlaAsnLeuHis
LeuSerValLeuArgAspValSerValPheGlyGlnArgTrpGlyPheAspAlaAlaThrIleAsnSerArg
TyrAsnAspLeuThrArgLeuIleGlyAsnTyrThrAspTyrAlaValArgTrpTyrAsnThrGlyLeuGlu
ArgValTrpGlyProAspSerArgAspTrpValArgTyrAsnGlnPheArgArgGluLeuThrLeuThrVal
LeuAspIleValAlaLeuPheProAsnTyrAspSerArgArgTyrProIleArgThrValSerGlnLeuThr
ArgGluIleTyrThrAsnProValLeuGluAsnPheAspGlySerPheArgGlySerAlaGlnGlyIleGlu
ArgSerIleArgSerProHisLeuMetAspIleLeuAsnSerIleThrIleTyrThrAspAlaHisArgGly
TyrTyrTyrTrpSerGlyHisGlnIleMetAlaSerProValGlyPheSerGlyProGluPheThrPhePro
LeuTyrGlyThrMetGlyAsnAlaAlaProGlnGlnArgIleValAlaGlnLeuGlyGlnGlyValTyrArg
ThrLeuSerSerThrLeuTyrArgArgProPheAsnIleGlyIleAsnAsnGlnGlnLeuSerValLeuAsp
GlyThrGluPheAlaTyrGlyThrSerSerAsnLeuProSerAlaValTyrArgLysSerGlyThrValAsp
SerLeuAspGluIleProProGlnAsnAsnAsnValProProArgGlnGlyPheSerHisArgLeuSerHis
ValSerMetPheArgSerGlyPheSerAsnSerSerValSerIleIleArgAlaProMetPheSerTrpThr
HisArgSerAlaThrProThrAsnThrIleAspProGluArgIleThrGlnIleProLeuValLysAlaHis
ThrLeuGlnSerGlyThrThrValValArgGlyProGlyPheThrGlyGlyAspIleLeuArgArgThrSer
GlyGlyProPheAlaTyrThrIleValAsnIleAsnGlyGlnLeuProGlnArgTyrArgAlaArgIleArg
TyrAlaSerThrThrAsnLeuArgIleTyrValThrValAlaGlyGluArgIlePheAlaGlyGlnPheAsn
LysThrMetAspThrGlyAspProLeuThrPheGlnSerPheSerTyrAlaThrIleAsnThrAlaPheThr
PheProMetSerGlnSerSerPheThrValGlyAlaAspThrPheSerSerGlyAsnGluValTyrIleAsp
ArgPheGluLeuIleProValThrAlaThrLeuGluAlaGluTyrAsnLeuGluArgAlaGlnLysAlaVal
AsnAlaLeuPheThrSerThrAsnGlnLeuGlyLeuLysThrAsnValThrAspTyrHisIleAspGlnVal
SerAsnLeuValThrTyrLeuSerAspGluPheCysLeuAspGluLysArgGluLeuSerGluLysValLys
HisAlaLysArgLeuSerAspGluArgAsnLeuLeuGlnAspSerAsnPheLysAspIleAsnArgGlnPro
GluArgGlyTrpGlyGlySerThrGlyIleThrIleGlnGlyGlyAspAspValPheLysGluAsnTyrVal
ThrLeuSerGlyThrPheAspGluCysTyrProThrTyrLeuTyrGlnLysIleAspGluSerLysLeuLys
AlaPheThrArgTyrGlnLeuArgGlyTyrIleGluAspSerGlnAspLeuGluIleTyrLeuIleArgTyr
AsnAlaLysHisGluThrValAsnValProGlyThrGlySerLeuTrpProLeuSerAlaGlnSerProIle
GlyLysCysGlyGluProAsnArgCysAlaProHisLeuGluTrpAsnProAspLeuAspCysSerCysArg
AspGlyGluLysCysAlaHisHisSerHisHisPheSerLeuAspIleAspValGlyCysThrAspLeuAsn
GluAspLeuGlyValTrpValIlePheLysIleLysThrGlnAspGlyHisAlaArgLeuGlyAsnLeuGlu
PheLeuGluGluLysProLeuValGlyGluAlaLeuAlaArgValLysArgAlaGluLysLysTrpArgAsp

LysArgGluLysLeuGluTrpGluThrAsnIleValTyrLysGluAlaLysGluSerValAspAlaLeuPhe
 ValAsnSerGlnTyrAspGlnLeuGlnAlaAspThrAsnIleAlaMetIleHisAlaAlaAspLysArgVal
 HisSerIleArgGluAlaTyrLeuProGluLeuSerValIleProGlyValAsnAlaAlaIlePheGluGlu
 LeuGluGlyArgIlePheThrAlaPheSerLeuTyrAspAlaArgAsnValIleLysAsnGlyAspPheAsn
 AsnGlyLeuSerCysTrpAsnValLysGlyHisValAspValGluGluGlnAsnAsnGlnArgSerValLeu
 ValValProGluTrpGluAlaGluValSerGlnGluValArgValCysProGlyArgGlyTyrIleLeuArg
 ValThrAlaTyrLysGluGlyTyrGlyGluGlyCysValThrIleHisGluIleGluAsnAsnThrAspGlu
 LeuLysPheSerAsnCysValGluGluGluIleTyrProAsnAsnThrValThrCysAsnAspTyrThrVal
 AsnGlnGluGluTyrGlyGlyAlaTyrThrSerArgAsnArgGlyTyrAsnGluAlaProSerValProAla
 AspTyrAlaSerValTyrGluGluLysSerTyrThrAspGlyArgArgGluAsnProCysGluPheAsnArg
 GlyTyrArgAspTyrThrProLeuProValGlyTyrValThrLysGluLeuGluTyrPheProGluThrAsp
 LysValTrpIleGluIleGlyGluThrGluGlyThrPheIleValAspSerValGluLeuLeuLeuMetGlu
 Glu

6.6.3 Aminosäuresequenz des EG11735-Kristallproteins (SEQ ID NO: 14)

MetAspAsnAsnProAsnIleAsnGluCysIleProTyrAsnCysLeuSerAsnProGluValGluValLeu
 GlyGlyGluArgIleGluThrGlyTyrThrProIleAspIleSerLeuSerLeuThrGlnPheLeuLeuSer
 GluPheValProGlyAlaGlyPheValLeuGlyLeuValAspIleIleTrpGlyIlePheGlyProSerGln
 TrpAspAlaPheLeuValGlnIleGluGlnLeuIleAsnGlnArgIleGluGluPheAlaArgAsnGlnAla
 IleSerArgLeuGluGlyLeuSerAsnLeuTyrGlnIleTyrAlaGluSerPheArgGluTrpGluAlaAsp
 ProThrAsnProAlaLeuArgGluGluMetArgIleGlnPheAsnAspMetAsnSerAlaLeuThrThrAla
 IleProLeuPheAlaValGlnAsnTyrGlnValProLeuLeuSerValTyrValGlnAlaAlaAsnLeuHis
 LeuSerValLeuArgAspValSerValPheGlyGlnArgTrpGlyPheAspAlaAlaThrIleAsnSerArg
 TyrAsnAspLeuThrArgLeuIleGlyAsnTyrThrAspHisAlaValArgTrpTyrAsnThrGlyLeuGlu
 ArgValTrpGlyProAspSerArgAspTrpIleArgTyrAsnGlnPheArgArgGluLeuThrLeuThrVal
 LeuAspIleValSerLeuPheProAsnTyrAspSerArgThrTyrProIleArgThrValSerGlnLeuThr
 ArgGluIleTyrThrAsnProValLeuGluAsnPheAspGlySerPheArgGlySerAlaGlnGlyIleGlu
 GlySerIleArgSerProHisLeuMetAspIleLeuAsnSerIleThrIleTyrThrAspAlaHisArgGly
 GluTyrTyrTrpSerGlyHisGlnIleMetAlaSerProValGlyPheSerGlyProGluPheThrPhePro
 LeuTyrGlyThrMetGlyAsnAlaAlaProGlnGlnArgIleValAlaGlnLeuGlyGlnGlyValTyrArg
 ThrLeuSerSerThrLeuTyrArgArgProPheAsnIleGlyIleAsnAsnGlnGlnLeuSerValLeuAsp
 GlyThrGluPheAlaTyrGlyThrSerSerAsnLeuProSerAlaValTyrArgLysSerGlyThrValAsp
 SerLeuAspGluIleProProGlnAsnAsnAsnValProProArgGlnGlyPheSerHisArgLeuSerHis
 ValSerMetPheArgSerGlyPheSerAsnSerSerValSerIleIleArgAlaProMetPheSerTrpThr
 HisArgSerAlaThrProThrAsnThrIleAspProGluArgIleThrGlnIleProLeuValLysAlaHis
 ThrLeuGlnSerGlyThrThrValValArgGlyProGlyPheThrGlyGlyAspIleLeuArgArgThrSer
 GlyGlyProPheAlaTyrThrIleValAsnIleAsnGlyGlnLeuProGlnArgTyrArgAlaArgIleArg

TyrAlaSerThrThrAsnLeuArgIleTyrValThrValAlaGlyGluArgIlePheAlaGlyGlnPheAsn
 LysThrMetAspThrGlyAspProLeuThrPheGlnSerPheSerTyrAlaThrIleAsnThrAlaPheThr
 PheProMetSerGlnSerSerPheThrValGlyAlaAspThrPheSerSerGlyAsnGluValTyrIleAsp
 ArgPheGluLeuIleProValThrAlaThrPheGluAlaGluTyrAspLeuGluArgAlaGlnLysAlaVal
 AsnAlaLeuPheThrSerIleAsnGlnIleGlyIleLysThrAspValThrAspTyrHisIleAspGlnVal
 SerAsnLeuValAspCysLeuSerAspGluPheCysLeuAspGluLysArgGluLeuSerGluLysValLys
 HisAlaLysArgLeuSerAspGluArgAsnLeuLeuGlnAspProAsnPheLysGlyIleAsnArgGlnLeu
 AspArgGlyTrpArgGlySerThrAspIleThrIleGlnArgGlyAspAspValPheLysGluAsnTyrVal
 ThrLeuProGlyThrPheAspGluCysTyrProThrTyrLeuTyrGlnLysIleAspGluSerLysLeuLys
 AlaPheThrArgTyrGlnLeuArgGlyTyrIleGluAspSerGlnAspLeuGluIleTyrLeuIleArgTyr
 AsnAlaLysHisGluThrValAsnValProGlyThrGlySerLeuTrpProLeuSerAlaGlnSerProIle
 GlyLysCysGlyGluProAsnArgCysAlaProHisLeuGluTrpAsnProAspLeuAspCysSerCysArg
 AspGlyGluLysCysAlaHisHisSerHisHisPheSerLeuAspIleAspValGlyCysThrAspLeuAsn
 GluAspLeuGlyValTrpValIlePheLysIleLysThrGlnAspGlyHisAlaArgLeuGlyAsnLeuGlu
 PheLeuGluGluLysProLeuValGlyGluAlaLeuAlaArgValLysArgAlaGluLysLysTrpArgAsp
 LysArgGluLysLeuGluTrpGluThrAsnIleValTyrLysGluAlaLysGluSerValAspAlaLeuPhe
 ValAsnSerGlnTyrAspGlnLeuGlnAlaAspThrAsnIleAlaMetIleHisAlaAlaAspLysArgVal
 HisSerIleArgGluAlaTyrLeuProGluLeuSerValIleProGlyValAsnAlaAlaIlePheGluGlu
 LeuGluGlyArgIlePheThrAlaPheSerLeuTyrAspAlaArgAsnValIleLysAsnGlyAspPheAsn
 AsnGlyLeuSerCysTrpAsnValLysGlyHisValAspValGluGluGlnAsnAsnGlnArgSerValLeu
 ValValProGluTrpGluAlaGluValSerGlnGluValArgValCysProGlyArgGlyTyrIleLeuArg
 ValThrAlaTyrLysGluGlyTyrGlyGluGlyCysValThrIleHisGluIleGluAsnAsnThrAspGlu
 LeuLysPheSerAsnCysValGluGluGluIleTyrProAsnAsnThrValThrCysAsnAspTyrThrVal
 AsnGlnGluGluTyrGlyGlyAlaTyrThrSerArgAsnArgGlyTyrAsnGluAlaProSerValProAla
 AspTyrAlaSerValTyrGluGluLysSerTyrThrAspGlyArgArgGluAsnProCysGluPheAsnArg
 GlyTyrArgAspTyrThrProLeuProValGlyTyrValThrLysGluLeuGluTyrPheProGluThrAsp
 LysValTrpIleGluIleGlyGluThrGluGlyThrPheIleValAspSerValGluLeuLeuLeuMetGlu
 Glu

6.6.4 Aminosäuresequenz des EG11092-Kristallproteins (SEQ ID NO: 26)

MetAspAsnAsnProAsnIleAsnGluCysIleProTyrAsnCysLeuSerAsnProGluValGluValLeu
 GlyGlyGluArgIleGluThrGlyTyrThrProIleAspIleSerLeuSerLeuThrGlnPheLeuLeuSer
 GluPheValProGlyAlaGlyPheValLeuGlyLeuValAspIleIleTrpGlyIlePheGlyProSerGln
 TrpAspAlaPheLeuValGlnIleGluGlnLeuIleAsnGlnArgIleGluGluPheAlaArgAsnGlnAla
 IleSerArgLeuGluGlyLeuSerAsnLeuTyrGlnIleTyrAlaGluSerPheArgGluTrpGluAlaAsp
 ProThrAsnProAlaLeuArgGluGluMetArgIleGlnPheAsnAspMetAsnSerAlaLeuThrThrAla
 IleProLeuPheAlaValGlnAsnTyrGlnValProLeuLeuSerValTyrValGlnAlaAlaAsnLeuHis

LeuSerValLeuArgAspValSerValPheGlyGlnArgTrpGlyPheAspAlaAlaThrIleAsnSerArg
TyrAsnAspLeuThrArgLeuIleGlyAsnTyrThrAspHisAlaValArgTrpTyrAsnThrGlyLeuGlu
ArgValTrpGlyProAspSerArgAspTrpIleArgTyrAsnGlnPheArgArgGluLeuThrLeuThrVal
LeuAspIleValSerLeuPheProAsnTyrAspSerArgThrTyrProIleArgThrValSerGlnLeuThr
ArgGluIleTyrThrAsnProValLeuGluAsnPheAspGlySerPheArgGlySerAlaGlnGlyIleGlu
ArgSerIleArgSerProHisLeuMetAspIleLeuAsnSerIleThrIleTyrThrAspAlaHisArgGly
TyrTyrTyrTrpSerGlyHisGlnIleMetAlaSerProValGlyPheSerGlyProGluPheThrPhePro
LeuTyrGlyThrMetGlyAsnAlaAlaProGlnGlnArgIleValAlaGlnLeuGlyGlnGlyValTyrArg
ThrLeuSerSerThrLeuTyrArgArgPropheAsnIleGlyIleAsnAsnGlnGlnLeuSerValLeuAsp
GlyThrGluPheAlaTyrGlyThrSerSerAsnLeuProSerAlaValTyrArgLysSerGlyThrValAsp
SerLeuAspGluIleProProGlnAsnAsnAsnValProProArgGlnGlyPheSerHisArgLeuSerHis
ValSerMetPheArgSerGlyPheSerAsnSerSerValSerIleIleArgAlaProMetPheSerTrpThr
HisArgSerAlaThrProThrAsnThrIleAspProGluArgIleThrGlnIleProLeuValLysAlaHis
ThrLeuGlnSerGlyThrThrValValArgGlyProGlyPheThrGlyGlyAspIleLeuArgArgThrSer
GlyGlyProPheAlaTyrThrIleValAsnIleAsnGlyGlnLeuProGlnArgTyrArgAlaArgIleArg
TyrAlaSerThrThrAsnLeuArgIleTyrValThrValAlaGlyGluArgIlePheAlaGlyGlnPheAsn
LysThrMetAspThrGlyAspProLeuThrPheGlnSerPheSerTyrAlaThrIleAsnThrAlaPheThr
PheProMetSerGlnSerSerPheThrValGlyAlaAspThrPheSerSerGlyAsnGluValTyrIleAsp
ArgPheGluLeuIleProValThrAlaThrPheGluAlaGluTyrAspLeuGluArgAlaGlnLysAlaVal
AsnAlaLeuPheThrSerIleAsnGlnIleGlyIleLysThrAspValThrAspTyrHisIleAspGlnVal
SerAsnLeuValAspCysLeuSerAspGluPheCysLeuAspGluLysArgGluLeuSerGluLysValLys
HisAlaLysArgLeuSerAspGluArgAsnLeuLeuGlnAspProAsnPheLysGlyIleAsnArgGlnLeu
AspArgGlyTrpArgGlySerThrAspIleThrIleGlnArgGlyAspAspValPheLysGluAsnTyrVal
ThrLeuProGlyThrPheAspGluCysTyrProThrTyrLeuTyrGlnLysIleAspGluSerLysLeuLys
AlaPheThrArgTyrGlnLeuArgGlyTyrIleGluAspSerGlnAspLeuGluIleTyrLeuIleArgTyr
AsnAlaLysHisGluThrValAsnValProGlyThrGlySerLeuTrpProLeuSerAlaGlnSerProIle
GlyLysCysGlyGluProAsnArgCysAlaProHisLeuGluTrpAsnProAspLeuAspCysSerCysArg
AspGlyGluLysCysAlaHisHisSerHisHisPheSerLeuAspIleAspValGlyCysThrAspLeuAsn
GluAspLeuGlyValTrpValIlePheLysIleLysThrGlnAspGlyHisAlaArgLeuGlyAsnLeuGlu
PheLeuGluGluLysProLeuValGlyGluAlaLeuAlaArgValLysArgAlaGluLysLysTrpArgAsp
LysArgGluLysLeuGluTrpGluThrAsnIleValTyrLysGluAlaLysGluSerValAspAlaLeuPhe
ValAsnSerGlnTyrAspGlnLeuGlnAlaAspThrAsnIleAlaMetIleHisAlaAlaAspLysArgVal
HisSerIleArgGluAlaTyrLeuProGluLeuSerValIleProGlyValAsnAlaAlaIlePheGluGlu
LeuGluGlyArgIlePheThrAlaPheSerLeuTyrAspAlaArgAsnValIleLysAsnGlyAspPheAsn
AsnGlyLeuSerCysTrpAsnValLysGlyHisValAspValGluGluGlnAsnAsnGlnArgSerValLeu
ValValProGluTrpGluAlaGluValSerGlnGluValArgValCysProGlyArgGlyTyrIleLeuArg
ValThrAlaTyrLysGluGlyTyrGlyGluGlyCysValThrIleHisGluIleGluAsnAsnThrAspGlu
LeuLysPheSerAsnCysValGluGluGluIleTyrProAsnAsnThrValThrCysAsnAspTyrThrVal

AsnGlnGluGluTyrGlyGlyAlaTyrThrSerArgAsnArgGlyTyrAsnGluAlaProSerValProAla
 AspTyrAlaSerValTyrGluGluLysSerTyrThrAspGlyArgArgGluAsnProCysGluPheAsnArg
 GlyTyrArgAspTyrThrProLeuProValGlyTyrValThrLysGluLeuGluTyrPheProGluThrAsp
 LysValTrpIleGluIleGlyGluThrGluGlyThrPheIleValAspSerValGluLeuLeuLeuMetGlu
 Glu

6.6.5 Aminosäuresequenz des EG11751-Kristallproteins (SEQ ID NO: 28)

MetAspAsnAsnProAsnIleAsnGluCysIleProTyrAsnCysLeuSerAsnProGluValGluValLeu
 GlyGlyGluArgIleGluThrGlyTyrThrProIleAspIleSerLeuSerLeuThrGlnPheLeuLeuSer
 GluPheValProGlyAlaGlyPheValLeuGlyLeuValAspIleIleTrpGlyIlePheGlyProSerGln
 TrpAspAlaPheLeuValGlnIleGluGlnLeuIleAsnGlnArgIleGluGluPheAlaArgAsnGlnAla
 IleSerArgLeuGluGlyLeuSerAsnLeuTyrGlnIleTyrAlaGluSerPheArgGluTrpGluAlaAsp
 ProThrAsnProAlaLeuArgGluGluMetArgIleGlnPheAsnAspMetAsnSerAlaLeuThrThrAla
 IleProLeuPheAlaValGlnAsnTyrGlnValProLeuLeuSerValTyrValGlnAlaAlaAsnLeuHis
 LeuSerValLeuArgAspValSerValPheGlyGlnArgTrpGlyPheAspAlaAlaThrIleAsnSerArg
 TyrAsnAspLeuThrArgLeuIleGlyAsnTyrThrAspTyrAlaValArgTrpTyrAsnThrGlyLeuGlu
 ArgValTrpGlyProAspSerArgAspTrpValArgTyrAsnGlnPheArgArgGluLeuThrLeuThrVal
 LeuAspIleValAlaLeuPheProAsnTyrAspSerArgArgTyrProIleArgThrValSerGlnLeuThr
 ArgGluIleTyrThrAsnProValLeuGluAsnPheAspGlySerPheArgGlySerAlaGlnGlyIleGlu
 ArgSerIleArgSerProHisLeuMetAspIleLeuAsnSerIleThrIleTyrThrAspAlaHisArgGly
 TyrTyrTyrTrpSerGlyHisGlnIleMetAlaSerProValGlyPheSerGlyProGluPheThrPhePro
 LeuTyrGlyThrMetGlyAsnAlaAlaProGlnGlnArgIleValAlaGlnLeuGlyGlnGlyValTyrArg
 ThrLeuSerSerThrLeuTyrArgArgProPheAsnIleGlyIleAsnAsnGlnGlnLeuSerValLeuAsp
 GlyThrGluPheAlaTyrGlyThrSerSerAsnLeuProSerAlaValTyrArgLysSerGlyThrValAsp
 SerLeuAspGluIleProProGlnAsnAsnAsnValProProArgGlnGlyPheSerHisArgLeuSerHis
 ValSerMetPheArgSerGlyPheSerAsnSerSerValSerIleIleArgAlaProMetPheSerTrpIle
 HisArgSerAlaGluPheAsnAsnIleIleAlaSerAspSerIleThrGlnIleProLeuValLysAlaHis
 ThrLeuGlnSerGlyThrThrValValArgGlyProGlyPheThrGlyGlyAspIleLeuArgArgThrSer
 GlyGlyProPheAlaTyrThrIleValAsnIleAsnGlyGlnLeuProGlnArgTyrArgAlaArgIleArg
 TyrAlaSerThrThrAsnLeuArgIleTyrValThrValAlaGlyGluArgIlePheAlaGlyGlnPheAsn
 LysThrMetAspThrGlyAspProLeuThrPheGlnSerPheSerTyrAlaThrIleAsnThrAlaPheThr
 PheProMetSerGlnSerSerPheThrValGlyAlaAspThrPheSerSerGlyAsnGluValTyrIleAsp
 ArgPheGluLeuIleProValThrAlaThrPheGluAlaGluTyrAspLeuGluArgAlaGlnLysAlaVal
 AsnAlaLeuPheThrSerIleAsnGlnIleGlyIleLysThrAspValThrAspTyrHisIleAspGlnVal
 SerAsnLeuValAspCysLeuSerAspGluPheCysLeuAspGluLysArgGluLeuSerGluLysValLys
 HisAlaLysArgLeuSerAspGluArgAsnLeuLeuGlnAspProAsnPheLysGlyIleAsnArgGlnLeu
 AspArgGlyTrpArgGlySerThrAspIleThrIleGlnArgGlyAspAspValPheLysGluAsnTyrVal

ThrLeuProGlyThrPheAspGluCysTyrProThrTyrLeuTyrGlnLysIleAspGluSerLysLeuLys
 AlaPheThrArgTyrGlnLeuArgGlyTyrIleGluAspSerGlnAspLeuGluIleTyrLeuIleArgTyr
 AsnAlaLysHisGluThrValAsnValProGlyThrGlySerLeuTrpProLeuSerAlaGlnSerProIle
 GlyLysCysGlyGluProAsnArgCysAlaProHisLeuGluTrpAsnProAspLeuAspCysSerCysArg
 AspGlyGluLysCysAlaHisHisSerHisHisPheSerLeuAspIleAspValGlyCysThrAspLeuAsn
 GluAspLeuGlyValTrpValIlePheLysIleLysThrGlnAspGlyHisAlaArgLeuGlyAsnLeuGlu
 PheLeuGluGluLysProLeuValGlyGluAlaLeuAlaArgValLysArgAlaGluLysLysTrpArgAsp
 LysArgGluLysLeuGluTrpGluThrAsnIleValTyrLysGluAlaLysGluSerValAspAlaLeuPhe
 ValAsnSerGlnTyrAspGlnLeuGlnAlaAspThrAsnIleAlaMetIleHisAlaAlaAspLysArgVal
 HisSerIleArgGluAlaTyrLeuProGluLeuSerValIleProGlyValAsnAlaAlaIlePheGluGlu
 LeuGluGlyArgIlePheThrAlaPheSerLeuTyrAspAlaArgAsnValIleLysAsnGlyAspPheAsn
 AsnGlyLeuSerCysTrpAsnValLysGlyHisValAspValGluGluGlnAsnAsnGlnArgSerValLeu
 ValValProGluTrpGluAlaGluValSerGlnGluValArgValCysProGlyArgGlyTyrIleLeuArg
 ValThrAlaTyrLysGluGlyTyrGlyGluGlyCysValThrIleHisGluIleGluAsnAsnThrAspGlu
 LeuLysPheSerAsnCysValGluGluGluIleTyrProAsnAsnThrValThrCysAsnAspTyrThrVal
 AsnGlnGluGluTyrGlyGlyAlaTyrThrSerArgAsnArgGlyTyrAsnGluAlaProSerValProAla
 AspTyrAlaSerValTyrGluGluLysSerTyrThrAspGlyArgArgGluAsnProCysGluPheAsnArg
 GlyTyrArgAspTyrThrProLeuProValGlyTyrValThrLysGluLeuGluTyrPheProGluThrAsp
 LysValTrpIleGluIleGlyGluThrGluGlyThrPheIleValAspSerValGluLeuLeuLeuMetGlu
 Glu

6.6.6 Aminosäuresequenz des EG11091-Kristallproteins (SEQ ID NO: 30)

MetAspAsnAsnProAsnIleAsnGluCysIleProTyrAsnCysLeuSerAsnProGluValGluValLeu
 GlyGlyGluArgIleGluThrGlyTyrThrProIleAspIleSerLeuSerLeuThrGlnPheLeuLeuSer
 GluPheValProGlyAlaGlyPheValLeuGlyLeuValAspIleIleTrpGlyIlePheGlyProSerGln
 TrpAspAlaPheLeuValGlnIleGluGlnLeuIleAsnGlnArgIleGluGluPheAlaArgAsnGlnAla
 IleSerArgLeuGluGlyLeuSerAsnLeuTyrGlnIleTyrAlaGluSerPheArgGluTrpGluAlaAsp
 ProThrAsnProAlaLeuArgGluGluMetArgIleGlnPheAsnAspMetAsnSerAlaLeuThrThrAla
 IleProLeuPheAlaValGlnAsnTyrGlnValProLeuLeuSerValTyrValGlnAlaAlaAsnLeuHis
 LeuSerValLeuArgAspValSerValPheGlyGlnArgTrpGlyPheAspAlaAlaThrIleAsnSerArg
 TyrAsnAspLeuThrArgLeuIleGlyAsnTyrThrAspTyrAlaValArgTrpTyrAsnThrGlyLeuGlu
 ArgValTrpGlyProAspSerArgAspTrpValArgTyrAsnGlnPheArgArgGluLeuThrLeuThrVal
 LeuAspIleValAlaLeuPheProAsnTyrAspSerArgArgTyrProIleArgThrValSerGlnLeuThr
 ArgGluIleTyrThrAsnProValLeuGluAsnPheAspGlySerPheArgGlySerAlaGlnGlyIleGlu
 ArgSerIleArgSerProHisLeuMetAspIleLeuAsnSerIleThrIleTyrThrAspAlaHisArgGly
 TyrTyrTyrTrpSerGlyHisGlnIleMetAlaSerProValGlyPheSerGlyProGluPheThrPhePro
 LeuTyrGlyThrMetGlyAsnAlaAlaProGlnGlnArgIleValAlaGlnLeuGlyGlnGlyValTyrArg

ThrLeuSerSerThrLeuTyrArgArgProPheAsnIleGlyIleAsnAsnGlnGlnLeuSerValLeuAsp
GlyThrGluPheAlaTyrGlyThrSerSerAsnLeuProSerAlaValTyrArgLysSerGlyThrValAsp
SerLeuAspGluIleProProGlnAsnAsnAsnValProProArgGlnGlyPheSerHisArgLeuSerHis
ValSerMetPheArgSerGlyPheSerAsnSerSerValSerIleIleArgAlaProMetPheSerTrpIle
HisArgSerAlaThrLeuThrAsnThrIleAspProGluArgIleAsnGlnIleProLeuValLysGlyPhe
ArgValTrpGlyGlyThrSerValIleThrGlyProGlyPheThrGlyGlyAspIleLeuArgArgAsnThr
PheGlyAspPheValSerLeuGlnValAsnIleAsnSerProIleThrGlnArgTyrArgLeuArgPheArg
TyrAlaSerSerArgAspAlaArgValIleValLeuThrGlyAlaAlaSerThrGlyValGlyGlyGlnVal
SerValAsnMetProLeuGlnLysThrMetGluIleGlyGluAsnLeuThrSerArgThrPheArgTyrThr
AspPheSerAsnProPheSerPheArgAlaAsnProAspIleIleGlyIleSerGluGlnProLeuPheGly
AlaGlySerIleSerSerGlyGluLeuTyrIleAspLysIleGluIleIleLeuAlaAspAlaThrPheGlu
AlaGluSerAspLeuGluArgAlaGlnLysAlaValAsnAlaLeuPheThrSerSerAsnGlnIleGlyLeu
LysThrAspValThrAspTyrHisIleAspGlnValSerAsnLeuValAspCysLeuSerAspGluPheCys
LeuAspGluLysArgGluLeuSerGluLysValLysHisAlaLysArgLeuSerAspGluArgAsnLeuLeu
GlnAspProAsnPheArgGlyIleAsnArgGlnProAspArgGlyTrpArgGlySerThrAspIleThrIle
GlnGlyGlyAspAspValPheLysGluAsnTyrValThrLeuProGlyThrValAspGluCysTyrProThr
TyrLeuTyrGlnLysIleAspGluSerLysLeuLysAlaTyrThrArgTyrGluLeuArgGlyTyrIleGlu
AspSerGlnAspLeuGluIleTyrLeuIleArgTyrAsnAlaLysHisGluIleValAsnValProGlyThr
GlySerLeuTrpProLeuSerAlaGlnSerProIleGlyLysCysGlyGluProAsnArgCysAlaProHis
LeuGluTrpAsnProAspLeuAspCysSerCysArgAspGlyGluLysCysAlaHisHisSerHisHisPhe
ThrLeuAspIleAspValGlyCysThrAspLeuAsnGluAspLeuGlyValTrpValIlePheLysIleLys
ThrGlnAspGlyHisAlaArgLeuGlyAsnLeuGluPheLeuGluGluLysProLeuLeuGlyGluAlaLeu
AlaArgValLysArgAlaGluLysLysTrpArgAspLysArgGluLysLeuGlnLeuGluThrAsnIleVal
TyrLysGluAlaLysGluSerValAspAlaLeuPheValAsnSerGlnTyrAspArgLeuGlnValAspThr
AsnIleAlaMetIleHisAlaAlaAspLysArgValHisArgIleArgGluAlaTyrLeuProGluLeuSer
ValIleProGlyValAsnAlaAlaIlePheGluGluLeuGluGlyArgIlePheThrAlaTyrSerLeuTyr
AspAlaArgAsnValIleLysAsnGlyAspPheAsnAsnGlyLeuLeuCysTrpAsnValLysGlyHisVal
AspValGluGluGlnAsnAsnHisArgSerValLeuValIleProGluTrpGluAlaGluValSerGlnGlu
ValArgValCysProGlyArgGlyTyrIleLeuArgValThrAlaTyrLysGluGlyTyrGlyGluGlyCys
ValThrIleHisGluIleGluAspAsnThrAspGluLeuLysPheSerAsnCysValGluGluGluValTyr
ProAsnAsnThrValThrCysAsnAsnTyrThrGlyThrGlnGluGluTyrGluGlyThrTyrThrSerArg
AsnGlnGlyTyrAspGluAlaTyrGlyAsnAsnProSerValProAlaAspTyrAlaSerValTyrGluGlu
LysSerTyrThrAspGlyArgArgGluAsnProCysGluSerAsnArgGlyTyrGlyAspTyrThrProLeu
ProAlaGlyTyrValThrLysAspLeuGluTyrPheProGluThrAspLysValTrpIleGluIleGlyGlu
ThrGluGlyThrPheIleValAspSerValGluLeuLeuLeuMetGluGlu

6.6.7 Aminosäuresequenz des EG11768-Kristallproteins (SEQ ID NO: 34)

MetAspAsnAsnProAsnIleAsnGluCysIleProTyrAsnCysLeuSerAsnProGluValGluValLeuGlyGlyGluArgIleGluThrGlyTyrThrProIleAspIleSerLeuSerLeuThrGlnPheLeuLeuSerGluPheValProGlyAlaGlyPheValLeuGlyLeuValAspIleIleTrpGlyIlePheGlyProSerGlnTrpAspAlaPheLeuValGlnIleGluGlnLeuIleAsnGlnArgIleGluGluPheAlaArgAsnGlnAlaIleSerArgLeuGluGlyLeuSerAsnLeuTyrGlnIleTyrAlaGluSerPheArgGluTrpGluAlaAspProThrAsnProAlaLeuArgGluGluMetArgIleGlnPheAsnAspMetAsnSerAlaLeuThrThrAlaIleProLeuPheAlaValGlnAsnTyrGlnValProLeuLeuSerValTyrValGlnAlaAlaAsnLeuHisLeuSerValLeuArgAspValSerValPheGlyGlnArgTrpGlyPheAspAlaAlaThrIleAsnSerArgTyrAsnAspLeuThrArgLeuIleGlyAsnTyrThrAspTyrAlaValArgTrpTyrAsnThrGlyLeuGluArgValTrpGlyProAspSerArgAspTrpValArgTyrAsnGlnPheArgArgGluLeuThrLeuThrValLeuAspIleValAlaLeuPheProAsnTyrAspSerArgArgTyrProIleArgThrValSerGlnLeuThrArgGluIleTyrThrAsnProValLeuGluAsnPheAspGlySerPheArgGlySerAlaGlnGlyIleGluArgSerIleArgSerProHisLeuMetAspIleLeuAsnSerIleThrIleTyrThrAspAlaHisArgGlyTyrTyrTyrTrpSerGlyHisGlnIleMetAlaSerProValGlyPheSerGlyProGluPheThrPheProLeuTyrGlyThrMetGlyAsnAlaAlaProGlnGlnArgIleValAlaGlnLeuGlyGlnGlyValTyrArgThrLeuSerSerThrLeuTyrArgArgProPheAsnIleGlyIleAsnAsnGlnGlnLeuSerValLeuAspGlyThrGluPheAlaTyrGlyThrSerSerAsnLeuProSerAlaValTyrArgLysSerGlyThrValAspSerLeuAspGluIleProProGlnAsnAsnAsnValProProArgGlnGlyPheSerHisArgLeuSerHisValSerMetPheArgSerGlyPheSerAsnSerSerValSerIleIleArgAlaProMetPheSerTrpIleHisArgSerAlaGluPheAsnAsnIleIleAlaSerAspSerIleThrGlnIleProLeuValLysAlaHisThrLeuGlnSerGlyThrThrValValArgGlyProGlyPheThrGlyGlyAspIleLeuArgArgThrSerGlyGlyProPheAlaTyrThrIleValAsnIleAsnGlyGlnLeuProGlnArgTyrArgAlaArgIleArgTyrAlaSerThrThrAsnLeuArgIleTyrValThrValAlaGlyGluArgIlePheAlaGlyGlnPheAsnLysThrMetAspThrGlyAspProLeuThrPheGlnSerPheSerTyrAlaThrIleAsnThrAlaPheThrPheProMetSerGlnSerSerPheThrValGlyAlaAspThrPheSerSerGlyAsnGluValTyrIleAspArgPheGluLeuIleProValThrAlaThrLeuGluAlaGluTyrAsnLeuGluArgAlaGlnLysAlaValAsnAlaLeuPheThrSerThrAsnGlnLeuGlyLeuLysThrAsnValThrAspTyrHisIleAspGlnValSerAsnLeuValThrTyrLeuSerAspGluPheCysLeuAspGluLysArgGluLeuSerGluLysValLysHisAlaLysArgLeuSerAspGluArgAsnLeuLeuGlnAspSerAsnPheLysAspIleAsnArgGlnProGluArgGlyTrpGlyGlySerThrGlyIleThrIleGlnGlyGlyAspAspValPheLysGluAsnTyrValThrLeuSerGlyThrPheAspGluCysTyrProThrTyrLeuTyrGlnLysIleAspGluSerLysLeuLysAlaPheThrArgTyrGlnLeuArgGlyTyrIleGluAspSerGlnAspLeuGluIleTyrLeuIleArgTyrAsnAlaLysHisGluThrValAsnValProGlyThrGlySerLeuTrpProLeuSerAlaGlnSerProIleGlyLysCysGlyGluProAsnArgCysAlaProHisLeuGluTrpAsnProAspLeuAspCysSerCysArgAspGlyGluLysCysAlaHisHisSerHisHisPheSerLeuAspIleAspValGlyCysThrAspLeuAsnGluAspLeuGlyValTrpValIlePheLysIleLysThrGlnAspGlyHisAlaArgLeuGlyAsnLeuGluPheLeuGluGluLysProLeuValGlyGluAlaLeuAlaArgValLysArgAlaGluLysLysTrpArgAspLysArgGluLysLeuGluTrpGluThrAsnIleValTyrLysGluAlaLysGluSerValAspAlaLeuPheValAsnSerGlnTyrAspGlnLeuGlnAlaAspThrAsnIleAlaMetIleHisAlaAlaAspLysArgValHisS

erIleArgGluAlaTyrLeuProGluLeuSerValIleProGlyValAsnAlaAlaIlePheGluGluLeuGluGly
 yArgIlePheThrAlaPheSerLeuTyrAspAlaArgAsnValIleLysAsnGlyAspPheAsnAsnGlyLeuSer
 CysTrpAsnValLysGlyHisValAspValGluGluGlnAsnAsnGlnArgSerValLeuValValProGluTrpG
 luAlaGluValSerGlnGluValArgValCysProGlyArgGlyTyrIleLeuArgValThrAlaTyrLysGluGly
 yTyrGlyGluGlyCysValThrIleHisGluIleGluAsnAsnThrAspGluLeuLysPheSerAsnCysValGlu
 GluGluIleTyrProAsnAsnThrValThrCysAsnAspTyrThrValAsnGlnGluGluTyrGlyGlyAlaTyrT
 hrSerArgAsnArgGlyTyrAsnGluAlaProSerValProAlaAspTyrAlaSerValTyrGluGluLysSerTy
 rThrAspGlyArgArgGluAsnProCysGluPheAsnArgGlyTyrArgAspTyrThrProLeuProValGlyTyr
 ValThrLysGluLeuGluTyrPheProGluThrAspLysValTrpIleGluIleGlyGluThrGluGlyThrPheI
 leValAspSerValGluLeuLeuLeuMetGluGlu

6.7 Beispiel 7 – DNA-Sequenzen, welche die neuen Kristallproteine codieren

6.7.1 DNA-Sequenz codierend das EG11063-Kristallprotein (SEQ ID NO: 9)

ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC ATT CCT TAT AAT TGT TTA	48
AGT AAC CCT GAA GTA GAA GTA TTA GGT GGA GAA AGA ATA GAA ACT GGT	96
TAC ACC CCA ATC GAT ATT TCC TTG TCG CTA ACG CAA TTT CTT TTG AGT	144
GAA TTT GTT CCC GGT GCT GGA TTT GTG TTA GGA CTA GTT GAT ATA ATA	192
TGG GGA ATT TTT GGT CCC TCT CAA TGG GAC GCA TTT CTT GTA CAA ATT	240
GAA CAG TTA ATT AAC CAA AGA ATA GAA GAA TTC GCT AGG AAC CAA GCC	288
ATT TCT AGA TTA GAA GGA CTA AGC AAT CTT TAT CAA ATT TAC GCA GAA	336
TCT TTT AGA GAG TGG GAA GCA GAT CCT ACT AAT CCA GCA TTA AGA GAA	384
GAG ATG CGT ATT CAA TTC AAT GAC ATG AAC AGT GCC CTT ACA ACC GCT	432
ATT CCT CTT TTT GCA GTT CAA AAT TAT CAA GTT CCT CTT TTA TCA GTA	480
TAT GTT CAA GCT GCA AAT TTA CAT TTA TCA GTT TTG AGA GAT GTT TCA	528
GTG TTT GGA CAA AGG TGG GGA TTT GAT GCC GCG ACT ATC AAT AGT CGT	576
TAT AAT GAT TTA ACT AGG CTT ATT GGC AAC TAT ACA GAT TAT GCT GTA	624
CGC TGG TAC AAT ACG GGA TTA GAA CGT GTA TGG GGA CCG GAT TCT AGA	672
GAT TGG GTA AGG TAT AAT CAA TTT AGA AGA GAA TTA ACA CTA ACT GTA	720
TTA GAT ATC GTT GCT CTG TTC CCG AAT TAT GAT AGT AGA AGA TAT CCA	768
ATT CGA ACA GTT TCC CAA TTA ACA AGA GAA ATT TAT ACA AAC CCA GTA	816
TTA GAA AAT TTT GAT GGT AGT TTT CGA GGC TCG GCT CAG GGC ATA GAA	864
AGA AGT ATT AGG AGT CCA CAT TTG ATG GAT ATA CTT AAC AGT ATA ACC	912
ATC TAT ACG GAT GCT CAT AGG GGT TAT TAT TAT TGG TCA GGG CAT CAA	960
ATA ATG GCT TCT CCT GTA GGG TTT TCG GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG	1008
CTA TAT GGA ACT ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CAA CGT ATT GTT GCT	1056
CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT AGA ACA TTA TCG TCC ACT TTA TAT AGA	1104
AGA CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA CTA TCT GTT CTT GAC	1152

GGG ACA GAA TTT GCT TAT GGA ACC TCC TCA AAT TTG CCA TCC GCT GTA	1200
TAC AGA AAA AGC GGA ACG GTA GAT TCG CTG GAT GAA ATA CCG CCA CAG	1248
AAT AAC AAC GTG CCA CCT AGG CAA GGA TTT AGT CAT CGA TTA AGC CAT	1296
GTT TCA ATG TTT CGT TCA GGC TTT AGT AAT AGT AGT GTA AGT ATA ATA	1344
AGA GCT CCA ATG TTT TCT TGG ACG CAC CGT AGT GCA ACC CCT ACA AAT	1392
ACA ATT GAT CCG GAG AGG ATT ACT CAA ATA CCA TTG GTA AAA GCA CAT	1440
ACA CTT CAG TCA GGT ACT ACT GTT GTA AGA GGG CCC GGG TTT ACG GGA	1488
GGA GAT ATT CTT CGA CGA ACA AGT GGA GGA CCA TTT GCT TAT ACT ATT	1536
GTT AAT ATA AAT GGG CAA TTA CCC CAA AGG TAT CGT GCA AGA ATA CGC	1584
TAT GCC TCT ACT ACA AAT CTA AGA ATT TAC GTA ACG GTT GCA GGT GAA	1632
CGG ATT TTT GCT GGT CAA TTT AAC AAA ACA ATG GAT ACC GGT GAC CCA	1680
TTA ACA TTC CAA TCT TTT AGT TAC GCA ACT ATT AAT ACA GCT TTT ACA	1728
TTC CCA ATG AGC CAG AGT AGT TTC ACA GTA GGT GCT GAT ACT TTT AGT	1776
TCA GGG AAT GAA GTT TAT ATA GAC AGA TTT GAA TTG ATT CCA GTT ACT	1824
GCA ACA TTT GAA GCA GAA TAT GAT TTA GAA AGA GCA CAA AAG GCG GTG	1872
AAT GCG CTG TTT ACT TCT ATA AAC CAA ATA GGG ATA AAA ACA GAT GTG	1920
ACG GAT TAT CAT ATT GAT CAA GTA TCC AAT TTA GTG GAT TGT TTA TCA	1968
GAT GAA TTT TGT CTG GAT GAA AAG CGA GAA TTG TCC GAG AAA GTC AAA	2016
CAT GCG AAG CGA CTC AGT GAT GAG CGG AAT TTA CTT CAA GAT CCA AAC	2064
TTC AAA GGC ATC AAT AGG CAA CTA GAC CGT GGT TGG AGA GGA AGT ACG	2112
GAT ATT ACC ATC CAA AGA GGA GAT GAC GTA TTC AAA GAA AAT TAT GTC	2160
ACA CTA CCA GGT ACC TTT GAT GAG TGC TAT CCA ACA TAT TTG TAT CAA	2208
AAA ATC GAT GAA TCA AAA TTA AAA GCC TTT ACC CGT TAT CAA TTA AGA	2256
GGG TAT ATC GAA GAT AGT CAA GAC TTA GAA ATC TAT TTA ATT CGC TAC	2304
AAT GCA AAA CAT GAA ACA GTA AAT GTG CCA GGT ACG GGT TCC TTA TGG	2352
CCG CTT TCA GCC CAA AGT CCA ATC GGA AAG TGT GGA GAG CCG AAT CGA	2400
TGC GCG CCA CAC CTT GAA TGG AAT CCT GAC TTA GAT TGT TCG TGT AGG	2448
GAT GGA GAA AAG TGT GCC CAT CAT TCG CAT CAT TTC TCC TTA GAC ATT	2496
GAT GTA GGA TGT ACA GAC TTA AAT GAG GAC CTA GGT GTA TGG GTG ATC	2544
TTT AAG ATT AAG ACG CAA GAT GGG CAC GCA AGA CTA GGG AAT CTA GAG	2592
TTT CTC GAA GAG AAA CCA TTA GTA GGA GAA GCG CTA GCT CGT GTG AAA	2640
AGA GCG GAG AAA AAA TGG AGA GAC AAA CGT GAA AAA TTG GAA TGG GAA	2688
ACA AAT ATC GTT TAT AAA GAG GCA AAA GAA TCT GTA GAT GCT TTA TTT	2736
GTA AAC TCT CAA TAT GAT CAA TTA CAA GCG GAT ACG AAT ATT GCC ATG	2784
ATT CAT GCG GCA GAT AAA CST GTT CAT AGC ATT CGA GAA GCT TAT CTG	2832
CCT GAG CTG TCT GTG ATT CCG GGT GTC AAT GCG GCT ATT TTT GAA GAA	2880
TTA GAA GGG CGT ATT TTC ACT GCA TTC TCC CTA TAT GAT GCG AGA AAT	2928
GTC ATT AAA AAT GGT GAT TTT AAT AAT GGC TTA TCC TGC TGG AAC GTG	2976

DE 697 30 730 T2 2005.09.22

AAA GGG CAT GTA GAT GTA GAA GAA CAA AAC AAC CAA CGT TCG GTC CTT	3024
GTT GTT CCG GAA TGG GAA GCA GAA GTG TCA CAA GAA GTT CGT GTC TGT	3072
CCG GGT CGT GGC TAT ATC CTT CGT GTC ACA GCG TAC AAG GAG GGA TAT	3120
GGA GAA GGT TGC GTA ACC ATT CAT GAG ATC GAG AAC AAT ACA GAC GAA	3168
CTG AAG TTT AGC AAC TGC GTA GAA GAG GAA ATC TAT CCA AAT AAC ACG	3216
GTA ACG TGT AAT GAT TAT ACT GTA AAT CAA GAA GAA TAC GGA GGT GCG	3264
TAC ACT TCT CGT AAT CGA GGA TAT AAC GAA GCT CCT TCC GTA CCA GCT	3312
GAT TAT GCG TCA GTC TAT GAA GAA AAA TCG TAT ACA GAT GGA CGA AGA	3360
GAG AAT CCT TGT GAA TTT AAC AGA GGG TAT AGG GAT TAC ACG CCA CTA	3408
CCA GTT GGT TAT GTG ACA AAA GAA TTA GAA TAC TTC CCA GAA ACC GAT	3456
AAG GTA TGG ATT GAG ATT GGA GAA ACG GAA GGA ACA TTT ATC GTG GAC	3504
AGC GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA	3531

6.7.2 DNA-Sequenz, codierend das EG11074-Kristallprotein (SEQ ID NO: 11)

ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC ATT CCT TAT AAT TGT TTA	48
AGT AAC CCT GAA GTA GAA GTA TTA GGT GGA GAA AGA ATA GAA ACT GGT	96
TAC ACC CCA ATC GAT ATT TCC TTG TCG CTA ACG CAA TTT CTT TTG AGT	144
GAA TTT GTT CCC GGT GCT GGA TTT GTG TTA GGA CTA GTT GAT ATA ATA	192
TGG GGA ATT TTT GGT CCC TCT CAA TGG GAC GCA TTT CTT GTA CAA ATT	240
GAA CAG TTA ATT AAC CAA AGA ATA GAA GAA TTC GCT AGG AAC CAA GCC	288
ATT TCT AGA TTA GAA GGA CTA AGC AAT CTT TAT CAA ATT TAC GCA GAA	336
TCT TTT AGA GAG TGG GAA GCA GAT CCT ACT AAT CCA GCA TTA AGA GAA	384
GAG ATG CGT ATT CAA TTC AAT GAC ATG AAC AGT GCC CTT ACA ACC GCT	432
ATT CCT CTT TTT GCA GTT CAA AAT TAT CAA GTT CCT CTT TTA TCA GTA	480
TAT GTT CAA GCT GCA AAT TTA CAT TTA TCA GTT TTG AGA GAT GTT TCA	528
GTG TTT GGA CAA AGG TGG GGA TTT GAT GCC GCG ACT ATC AAT AGT CGT	576
TAT AAT GAT TTA ACT AGG CTT ATT GGC AAC TAT ACA GAT TAT GCT GTA	624
CGC TGG TAC AAT ACG GGA TTA GAA CGT GTA TGG GGA CCG GAT TCT AGA	672
GAT TGG GTA AGG TAT AAT CAA TTT AGA AGA GAA TTA ACA CTA ACT GTA	720
TTA GAT ATC GTT GCT CTG TTC CCG AAT TAT GAT AGT AGA AGA TAT CCA	768
ATT CGA ACA GTT TCC CAA TTA ACA AGA GAA ATT TAT ACA AAC CCA GTA	816
TTA GAA AAT TTT GAT GGT AGT TTT CGA GGC TCG GCT CAG GGC ATA GAA	864
AGA AGT ATT AGG AGT CCA CAT TTG ATG GAT ATA CTT AAC AGT ATA ACC	912
ATC TAT ACG GAT GCT CAT AGG GGT TAT TAT TAT TGG TCA GGG CAT CAA	960
ATA ATG GCT TCT CCT GTA GGG TTT TCG GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG	1008
CTA TAT GGA ACT ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CAA CGT ATT GTT GCT	1056
CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT AGA ACA TTA TCG TCC ACT TTA TAT AGA	1104

AGA CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA CTA TCT GTT CTT GAC	1152
GGG ACA GAA TTT GCT TAT GGA ACC TCC TCA AAT TTG CCA TCC GCT GTA	1200
TAC AGA AAA AGC GGA ACC GTA GAT TCG CTG GAT GAA ATA CCG CCA CAG	1248
AAT AAC AAC GTG CCA CCT AGG CAA GGA TTT AGT CAT CGA TTA AGC CAT	1296
GTT TCA ATG TTT CGT TCA GGC TTT AGT AAT AGT AGT GTA AGT ATA ATA	1344
AGA GCT CCA ATG TTT TCT TGG ACG CAC CGT AGT GCA ACC CCT ACA AAT	1392
ACA ATT GAT CCG GAG AGG ATT ACT CAA ATA CCA TTG GTA AAA GCA CAT	1440
ACA CTT CAG TCA GGT ACT ACT GTT GTA AGA GGG CCC GGG TTT ACG GGA	1488
GGA GAT ATT CTT CGA CGA ACA AGT GGA GGA CCA TTT GCT TAT ACT ATT	1536
GTT AAT ATA AAT GGG CAA TTA CCC CAA AGG TAT CGT GCA AGA ATA CGC	1584
TAT GCC TCT ACT ACA AAT CTA AGA ATT TAC GTA ACG GTT GCA GGT GAA	1632
CGG ATT TTT GCT GGT CAA TTT AAC AAA ACA ATG GAT ACC GGT GAC CCA	1680
TTA ACA TTC CAA TCT TTT AGT TAC GCA ACT ATT AAT ACA GCT TTT ACA	1728
TTC CCA ATG AGC CAG AGT AGT TTC ACA GTA GGT GCT GAT ACT TTT AGT	1776
TCA GGG AAT GAA GTT TAT ATA GAC AGA TTT GAA TTG ATT CCA GTT ACT	1824
GCA ACA CTC GAG GCT GAA TAT AAT CTG GAA AGA GCG CAG AAG GCG GTG	1872
AAT GCG CTG TTT ACG TCT ACA AAC CAA CTA GGG CTA AAA ACA AAT GTA	1920
ACG GAT TAT CAT ATT GAT CAA GTG TCC AAT TTA GTT ACG TAT TTA TCG	1968
GAT GAA TTT TGT CTG GAT GAA AAG CGA GAA TTG TCC GAG AAA GTC AAA	2016
CAT GCG AAG CGA CTC AGT GAT GAA CGC AAT TTA CTC CAA GAT TCA AAT	2064
TTC AAA GAC ATT AAT AGG CAA CCA GAA CGT GGG TGG GGC GGA AGT ACA	2112
GGG ATT ACC ATC CAA GGA GGG GAT GAC GTA TTT AAA GAA AAT TAC GTC	2160
ACA CTA TCA GGT ACC TTT GAT GAG TGC TAT CCA ACA TAT TTG TAT CAA	2208
AAA ATC GAT GAA TCA AAA TTA AAA GCC TTT ACC CGT TAT CAA TTA AGA	2256
GGG TAT ATC GAA GAT AGT CAA GAC TTA GAA ATC TAT TTA ATT CGC TAC	2304
AAT GCA AAA CAT GAA ACA GTA AAT GTG CCA GGT ACG GGT TCC TTA TGG	2352
CCG CTT TCA GCC CAA AGT CCA ATC GGA AAG TGT GGA GAG CCG AAT CGA	2400
TGC GCG CCA CAC CTT GAA TGG AAT CCT GAC TTA GAT TGT TCG TGT AGG	2448
GAT GGA GAA AAG TGT GCC CAT CAT TCG CAT CAT TTC TCC TTA GAC ATT	2496
GAT GTA GGA TGT ACA GAC TTA AAT GAG GAC CTA GGT GTA TGG GTG ATC	2544
TTT AAG ATT AAG ACG CAA GAT GGG CAC GCA AGA CTA GGG AAT CTA GAG	2592
TTT CTC GAA GAG AAA CCA TTA GTA GGA GAA GCG CTA GCT CGT GTG AAA	2640
AGA GCG GAG AAA AAA TGG AGA GAC AAA CGT GAA AAA TTG GAA TGG GAA	2688
ACA AAT ATC GTT TAT AAA GAG GCA AAA GAA TCT GTA GAT GCT TTA TTT	2736
GTA AAC TCT CAA TAT GAT CAA TTA CAA GCG GAT ACG AAT ATT GCC ATG	2784
ATT CAT GCG GCA GAT AAA CGT GTT CAT AGC ATT CGA GAA GCT TAT CTG	2832
CCT GAG CTG TCT GTG ATT CCG GGT GTC AAT GCG GCT ATT TTT GAA GAA	2880
TTA GAA GGG CGT ATT TTC ACT GCA TTC TCC CTA TAT GAT GCG AGA AAT	2928

GTC ATT AAA AAT GGT GAT TTT AAT AAT GGC TTA TCC TGC TGG AAC GTG	2976
AAA GGG CAT GTA GAT GTA GAA GAA CAA AAC AAC CAA CGT TCG GTC CTT	3024
GTT GTT CCG GAA TGG GAA GCA GAA GTG TCA CAA GAA GTF CGT GTC TGT	3072
CCG GGT CGT GGC TAT ATC CTT CGT GTC ACA GCG TAC AAG GAG GGA TAT	3120
GGA GAA GGT TGC GTA ACC ATT CAT GAG ATC GAG AAC AAT ACA GAC GAA	3168
CTG AAG TTT AGC AAC TGC GTA GAA GAG GAA ATC TAT CCA AAT AAC ACG	3216
GTA ACG TGT AAT GAT TAT ACT GTA AAT CAA GAA GAA TAC GGA GGT GCG	3264
TAC ACT TCT CGT AAT CGA GGA TAT AAC GAA GCT CCT TCC GTA CCA GCT	3312
GAT TAT GCG TCA GTC TAT GAA GAA AAA TCG TAT ACA GAT GGA CGA AGA	3360
GAG AAT CCT TGT GAA TTT AAC AGA GGG TAT AGG GAT TAC ACG CCA CTA	3408
CCA GTT GGT TAT GTG ACA AAA GAA TTA GAA TAC TTC CCA GAA ACC GAT	3456
AAG GTA TGG ATT GAG ATT GGA GAA ACG GAA GGA ACA TTT ATC GTG GAC	3504
AGC GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA	3531

6.7.3 DNA-Sequenz, codierend das EG11735-Kristallprotein (SEQ ID NO: 13)

ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC ATT CCT TAT AAT TGT TTA	48
AGT AAC CCT GAA GTA GAA GTA TTA GGT GGA GAA AGA ATA GAA ACT GGT	96
TAC ACC CCA ATC GAT ATT TCC TTG TCG CTA ACG CAA TTT CTT TTG AGT	144
GAA TTT GTT CCC GGT GCT GGA TTT GTG TTA GGA CTA GTT GAT ATA ATA	192
TGG GGA ATT TTT GGT CCC TCT CAA TGG GAC GCA TTT CTT GTA CAA ATT	240
GAA CAG TTA ATT AAC CAA AGA ATA GAA GAA TTC GCT AGG AAC CAA GCC	288
ATT TCT AGA TTA GAA GGA CTA AGC AAT CTT TAT CAA ATT TAC GCA GAA	336
TCT TTT AGA GAG TGG GAA GCA GAT CCT ACT AAT CCA GCA TTA AGA GAA	384
GAG ATG CGT ATT CAA TTC AAT GAC ATG AAC AGT GCC CTT ACA ACC GCT	432
ATT CCT CTT TTT GCA GTT CAA AAT TAT CAA GTT CCT CTT TTA TCA GTA	480
TAT GTT CAA GCT GCA AAT TTA CAT TTA TCA GTT TTG AGA GAT GTT TCA	528
GTG TTT GGA CAA AGG TGG GGA TTT GAT GCC GCG ACT ATC AAT AGT CGT	576
TAT AAT GAT TTA ACT AGG CTT ATT GGC AAC TAT ACA GAT CAT GCT GTA	624
CGC TGG TAC AAT ACG GGA TTA GAG CGT GTA TGG GGA CCG GAT TCT AGA	672
GAT TGG ATA AGA TAT AAT CAA TTT AGA AGA GAA TTA ACA CTA ACT GTA	720
TTA GAT ATC GTT TCT CTA TTT CCG AAC TAT GAT AGT AGA ACG TAT CCA	768
ATT CGA ACA GTT TCC CAA TTA ACA AGA GAA ATT TAT ACA AAC CCA GTA	816
TTA GAA AAT TTT GAT GGT AGT TTT CGA GGC TCG GCT CAG GGC ATA GAA	864
GGA AGT ATT AGG AGT CCA CAT TTG ATG GAT ATA CTT AAC AGT ATA ACC	912
ATC TAT ACG GAT GCT CAT AGA GGA GAA TAT TAT TGG TCA GGG CAT CAA	960
ATA ATG GCT TCT CCT GTA GGG TTT TCG GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG	1008
CTA TAT GGA ACT ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CAA CGT ATT GTT GCT	1056
CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT AGA ACA TTA TCG TCC ACT TTA TAT AGA	1104

AGA CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA CTA TCT GTT CTT GAC	1152
GGG ACA GAA TTT GCT TAT GGA ACC TCC TCA AAT TTG CCA TCC GCT GTA	1200
TAC AGA AAA AGC GGA ACG GTA GAT TCG CTG GAT GAA ATA CCG CCA CAG	1248
AAT AAC AAC GTG CCA CCT AGG CAA GGA TTT AGT CAT CGA TTA AGC CAT	1296
GTT TCA ATG TTT CGT TCA GGC TTT AGT AAT AGT AGT GTA AGT ATA ATA	1344
AGA GCT CCA ATG TTT TCT TGG ACG CAC CGT AGT GCA ACC CCT ACA AAT	1392
ACA ATT GAT CCG GAG AGG ATT ACT CAA ATA CCA TTG GTA AAA GCA CAT	1440
ACA CTT CAG TCA GGT ACT ACT GTT GTA AGA GGG CCC GGG TTT ACG GGA	1488
GGA GAT ATT CTT CGA CGA ACA AGT GGA GGA CCA TTT GCT TAT ACT ATT	1536
GTT AAT ATA AAT GGG CAA TTA CCC CAA AGG TAT CGT GCA AGA ATA CGC	1584
TAT GCC TCT ACT ACA AAT CTA AGA ATT TAC GTA ACG GTT GCA GGT GAA	1632
CGG ATT TTT GCT GGT CAA TTT AAC AAA ACA ATG GAT ACC GGT GAC CCA	1680
TTA ACA TTC CAA TCT TTT AGT TAC GCA ACT ATT AAT ACA GCT TTT ACA	1728
TTC CCA ATG AGC CAG AGT AGT TTC ACA GTA GGT GCT GAT ACT TTT AGT	1776
TCA GGG AAT GAA GTT TAT ATA GAC AGA TTT GAA TTG ATT CCA GTT ACT	1824
GCA ACA TTT GAA GCA GAA TAT GAT TTA GAA AGA GCA CAA AAG GCG GTG	1872
AAT GCG CTG TTT ACT TCT ATA AAC CAA ATA GGG ATA AAA ACA GAT GTG	1920
ACG GAT TAT CAT ATT GAT CAA GTA TCC AAT TTA GTG GAT TGT TTA TCA	1968
GAT GAA TTT TGT CTG GAT GAA AAG CGA GAA TTG TCC GAG AAA GTC AAA	2016
CAT GCG AAG CGA CTC AGT GAT GAG CGG AAT TTA CTT CAA GAT CCA AAC	2064
TTC AAA GGC ATC AAT AGG CAA CTA GAC CGT GGT TGG AGA GGA AGT ACG	2112
GAT ATT ACC ATC CAA AGA GGA GAT GAC GTA TTC AAA GAA AAT TAT GTC	2160
ACA CTA CCA GGT ACC TTT GAT GAG TGC TAT CCA ACA TAT TTG TAT CAA	2208
AAA ATC GAT GAA TCA AAA TTA AAA GCC TTT ACC CGT TAT CAA TTA AGA	2256
GGG TAT ATC GAA GAT AGT CAA GAC TTA GAA ATC TAT TTA ATT CGC TAC	2304
AAT GCA AAA CAT GAA ACA GTA AAT GTG CCA GGT ACG GGT TCC TTA TGG	2352
CCG CTT TCA GCC CAA AGT CCA ATC GGA AAG TGT GGA GAG CCG AAT CGA	2400
TGC GCG CCA CAC CTT GAA TGG AAT CCT GAC TTA GAT TGT TCG TGT AGG	2448
GAT GGA GAA AAG TGT GCC CAT CAT TCG CAT CAT TTC TCC TTA GAC ATT	2496
GAT GTA GGA TGT ACA GAC TTA AAT GAG GAC CTA GGT GTA TGG GTG ATC	2544
TTT AAG ATT AAG ACG CAA GAT GGG CAC GCA AGA CTA GGG AAT CTA GAG	2592
TTT CTC GAA GAG AAA CCA TTA GTA GGA GAA GCG CTA GCT CGT GTG AAA	2640
AGA GCG GAG AAA AAA TGG AGA GAC AAA CGT GAA AAA TTG GAA TGG GAA	2688
ACA AAT ATC GTT TAT AAA GAG GCA AAA GAA TCT GTA GAT GCT TTA TTT	2736
GTA AAC TCT CAA TAT GAT CAA TTA CAA GCG GAT ACG AAT ATT GCC ATG	2784
ATT CAT GCG GCA GAT AAA CGT GTT CAT AGC ATT CGA GAA GCT TAT CTG	2832
CCT GAG CTG TCT GTG ATT CCG GGT GTC AAT GCG GCT ATT TTT GAA GAA	2880
TTA GAA GGG CGT ATT TTC ACT GCA TTC TCC CTA TAT GAT GCG AGA AAT	2928

GTC ATT AAA AAT GGT GAT TTT AAT AAT GGC TTA TCC TGC TGG AAC GTG	2976
AAA GGG CAT GTA GAT GTA GAA GAA CAA AAC AAC CAA CGT TCG GTC CTT	3024
GTT GTT CCG GAA TGG GAA GCA GAA GTG TCA CAA GAA GTT CGT GTC TGT	3072
CCG GGT CGT GGC TAT ATC CTT CGT GTC ACA GCG TAC AAG GAG GGA TAT	3120
GGA GAA GGT TGC GTA ACC ATT CAT GAG ATC GAG AAC AAT ACA GAC GAA	3168
CTG AAG TTT AGC AAC TGC GTA GAA GAG GAA ATC TAT CCA AAT AAC ACG	3216
GTA ACG TGT AAT GAT TAT ACT GTA AAT CAA GAA GAA TAC GGA GGT GCG	3264
TAC ACT TCT CGT AAT CGA GGA TAT AAC GAA GCT CCT TCC GTA CCA GCT	3312
GAT TAT GCG TCA GTC TAT GAA GAA AAA TCG TAT ACA GAT GGA CGA AGA	3360
GAG AAT CCT TGT GAA TTT AAC AGA GGG TAT AGG GAT TAC ACG CCA CTA	3408
CCA GTT GGT TAT GTG ACA AAA GAA TTA GAA TAC TTC CCA GAA ACC GAT	3456
AAG GTA TGG ATT GAG ATT GGA GAA ACG GAA GGA ACA TTT ATC GTG GAC	3504
AGC GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA	3531

6.7.4 DNA-Sequenz, codierend das EG11092-Kristallprotein (SEQ ID NO: 25)

ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC ATT CCT TAT AAT TGT TTA	48
AGT AAC CCT GAA GTA GAA GTA TTA GGT GGA GAA AGA ATA GAA ACT GGT	96
TAC ACC CCA ATC GAT ATT TCC TTG TCG CTA ACG CAA TTT CTT TTG AGT	144
GAA TTT GTT CCC GGT GCT GGA TTT GTG TTA GGA CTA GTT GAT ATA ATA	192
TGG GGA ATT TTT GGT CCC TCT CAA TGG GAC GCA TTT CTT GTA CAA ATT	240
GAA CAG TTA ATT AAC CAA AGA ATA GAA GAA TTC GCT AGG AAC CAA GCC	288
ATT TCT AGA TTA GAA GGA CTA AGC AAT CTT TAT CAA ATT TAC GCA GAA	336
TCT TTT AGA GAG TGG GAA GCA GAT CCT ACT AAT CCA GCA TTA AGA GAA	384
GAG ATG CGT ATT CAA TTC AAT GAC ATG AAC AGT GCC CTT ACA ACC GCT	432
ATT CCT CTT TTT GCA GTT CAA AAT TAT CAA GTT CCT CTT TTA TCA GTA	480
TAT GTT CAA GCT GCA AAT TTA CAT TTA TCA GTT TTG AGA GAT GTT TCA	528
GTG TTT GGA CAA AGG TGG GGA TTT GAT GCC GCG ACT ATC AAT AGT CGT	576
TAT AAT GAT TTA ACT AGG CTT ATT GGC AAC TAT ACA GAT CAT GCT GTA	624
CGC TGG TAC AAT ACG GGA TTA GAG CGT GTA TGG GGA CCG GAT TCT AGA	672
GAT TGG ATA AGA TAT AAT CAA TTT AGA AGA GAA TTA ACA CTA ACT GTA	720
TTA GAT ATC GTT TCT CTA TTT CCG AAC TAT GAT AGT AGA ACG TAT CCA	768
ATT CGA ACA GTT TCC CAA TTA ACA AGA GAA ATT TAT ACA AAC CCA GTA	816
TTA GAA AAT TTT GAT GGT AGT TTT CGA GGC TCG GCT CAG GGC ATA GAA	864
AGA AGT ATT AGG AGT CCA CAT TTG ATG GAT ATA CTT AAC AGT ATA ACC	912
ATC TAT ACG GAT GCT CAT AGG GGT TAT TAT TAT TGG TCA GGG CAT CAA	960
ATA ATG GCT TCT CCT GTA GGG TTT TCG GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG	1008
CTA TAT GGA ACT ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CAA CGT ATT GTT GCT	1056

CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT AGA ACA TTA TCG TCC ACT TTA TAT AGA	1104
AGA CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA CTA TCT GTT CTT GAC	1152
GGG ACA GAA TTT GCT TAT GGA ACC TCC TCA AAT TTG CCA TCC GCT GTA	1200
TAC AGA AAA AGC GGA ACG GTA GAT TCG CTG GAT GAA ATA CCG CCA CAG	1248
AAT AAC AAC GTG CCA CCT AGG CAA GGA TTT AGT CAT CGA TTA AGC CAT	1296
GTT TCA ATG TTT CGT TCA GGC TTT AGT AAT AGT AGT GTA AGT ATA ATA	1344
AGA GCT CCA ATG TTT TCT TGG ACG CAC CGT AGT GCA ACC CCT ACA AAT	1392
ACA ATT GAT CCG GAG AGG ATT ACT CAA ATA CCA TTG GTA AAA GCA CAT	1440
ACA CTT CAG TCA GGT ACT ACT GTT GTA AGA GGG CCC GGG TTT ACG GGA	1488
GGA GAT ATT CTT CGA CGA ACA AGT GGA GGA CCA TTT GCT TAT ACT ATT	1536
GTT AAT ATA AAT GGG CAA TTA CCC CAA AGG TAT CGT GCA AGA ATA CGC	1584
TAT GCC TCT ACT ACA AAT CTA AGA ATT TAC GTA ACG GTT GCA GGT GAA	1632
CGG ATT TTT GCT GGT CAA TTT AAC AAA ACA ATG GAT ACC GGT GAC CCA	1680
TTA ACA TTC CAA TCT TTT AGT TAC GCA ACT ATT AAT ACA GCT TTT ACA	1728
TTC CCA ATG AGC CAG AGT AGT TTC ACA GTA GGT GCT GAT ACT TTT AGT	1776
TCA GGG AAT GAA GTT TAT ATA GAC AGA TTT GAA TTG ATT CCA GTT ACT	1824
GCA ACA TTT GAA GCA GAA TAT GAT TTA GAA AGA GCA CAA AAG GCG GTG	1872
AAT GCG CTG TTT ACT TCT ATA AAC CAA ATA GGG ATA AAA ACA GAT GTG	1920
ACG GAT TAT CAT ATT GAT CAA GTA TCC AAT TTA GTG GAT TGT TTA TCA	1968
GAT GAA TTT TGT CTG GAT GAA AAG CGA GAA TTG TCC GAG AAA GTC AAA	2016
CAT GCG AAG CGA CTC AGT GAT GAG CGG AAT TTA CTT CAA GAT CCA AAC	2064
TTC AAA GGC ATC AAT AGG CAA CTA GAC CGT GGT TGG AGA GGA AGT ACG	2112
GAT ATT ACC ATC CAA AGA GGA GAT GAC GTA TTC AAA GAA AAT TAT GTC	2160
ACA CTA CCA GGT ACC TTT GAT GAG TGC TAT CCA ACA TAT TTG TAT CAA	2208
AAA ATC GAT GAA TCA AAA TTA AAA GCC TTT ACC CGT TAT CAA TTA AGA	2256
GGG TAT ATC GAA GAT AGT CAA GAC TTA GAA ATC TAT TTA ATT CGC TAC	2304
AAT GCA AAA CAT GAA ACA GTA AAT GTG CCA GGT ACG GGT TCC TTA TGG	2352
CCG CTT TCA GCC CAA AGT CCA ATC GGA AAG TGT GGA GAG CCG AAT CGA	2400
TGC GCG CCA CAC CTT GAA TGG AAT CCT GAC TTA GAT TGT TCG TGT AGG	2448
GAT GGA GAA AAG TGT GCC CAT CAT TCG CAT CAT TTC TCC TTA GAC ATT	2496
GAT GTA GGA TGT ACA GAC TTA AAT GAG GAC CTA GGT GTA TGG GTG ATC	2544
TTT AAG ATT AAG ACG CAA GAT GGG CAC GCA AGA CTA GGG AAT CTA GAG	2592
TTT CTC GAA GAG AAA CCA TTA GTA GGA GAA GCG CTA GCT CGT GTG AAA	2640
AGA GCG GAG AAA AAA TGG AGA GAC AAA CGT GAA AAA TTG GAA TGG GAA	2688
ACA AAT ATC GTT TAT AAA GAG GCA AAA GAA TCT GTA GAT GCT TTA TTT	2736
GTA AAC TCT CAA TAT GAT CAA TTA CAA GCG GAT ACG AAT ATT GCC ATG	2784
ATT CAT GCG GCA GAT AAA CGT GTT CAT AGC ATT CGA GAA GCT TAT CTG	2832
CCT GAG CTG TCT GTG ATT CCG GGT GTC AAT GCG GCT ATT TTT GAA GAA	2880

TTA GAA GGG CGT ATT TTC ACT GCA TTC TCC CTA TAT GAT GCG AGA AAT	2928
GTC ATT AAA AAT GGT GAT TTT AAT AAT GGC TTA TCC TGC TGG AAC GTG	2976
AAA GGG CAT GTA GAT GTA GAA GAA CAA AAC AAC CAA CGT TCG GTC CTT	3024
GTT GTT CCG GAA TGG GAA GCA GAA GTG TCA CAA GAA GTT CGT GTC TGT	3072
CCG GGT CGT GGC TAT ATC CTT CGT GTC ACA GCG TAC AAG GAG GGA TAT	3120
GGA GAA GGT TGC GTA ACC ATT CAT GAG ATC GAG AAC AAT ACA GAC GAA	3168
CTG AAG TTT AGC AAC TGC GTA GAA GAG GAA ATC TAT CCA AAT AAC ACG	3216
GTA ACG TGT AAT GAT TAT ACT GTA AAT CAA GAA GAA TAC GGA GGT GCG	3264
TAC ACT TCT CGT AAT CGA GGA TAT AAC GAA GCT CCT TCC GTA CCA GCT	3312
GAT TAT GCG TCA GTC TAT GAA GAA AAA TCG TAT ACA GAT GGA CGA AGA	3360
GAG AAT CCT TGT GAA TTT AAC AGA GGG TAT AGG GAT TAC ACG CCA CTA	3408
CCA GTT GGT TAT GTG ACA AAA GAA TTA GAA TAC TTC CCA GAA ACC GAT	3456
AAG GTA TGG ATT GAG ATT GGA GAA ACG GAA GGA ACA TTT ATC GTG GAC	3504
AGC GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA TAG	3534

6.7.5 DNA-Sequenz, codierend das EG11751-Kristallprotein (SEQ ID NO: 27)

ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC ATT CCT TAT AAT TGT TTA	48
AGT AAC CCT GAA GTA GAA GTA TTA GST GGA GAA AGA ATA GAA ACT GGT	96
TAC ACC CCA ATC GAT ATT TCC TTG TCG CTA ACG CAA TTT CTT TTG AGT	144
GAA TTT GTT CCC GGT GCT GGA TTT GTG TTA GGA CTA GTT GAT ATA ATA	192
TGG GGA ATT TTT GGT CCC TCT CAA TGG GAC GCA TTT CTT GTA CAA ATT	240
GAA CAG TTA ATT AAC CAA AGA ATA GAA GAA TTC GCT AGG AAC CAA GCC	288
ATT TCT AGA TTA GAA GGA CTA AGC AAT CTT TAT CAA ATT TAC GCA GAA	336
TCT TTT AGA GAG TGG GAA GCA GAT CCT ACT AAT CCA GCA TTA AGA GAA	384
GAG ATG CGT ATT CAA TTC AAT GAC ATG AAC AGT GCC CTT ACA ACC GCT	432
ATT CCT CTT TTT GCA GTT CAA AAT TAT CAA GTT CCT CTT TTA TCA GTA	480
TAT GTT CAA GCT GCA AAT TTA CAT TTA TCA GTT TTG AGA GAT GTT TCA	528
GTG TTT GSA CAA AGG TGG GGA TTT GAT GCC GCG ACT ATC AAT AGT CGT	576
TAT AAT GAT TTA ACT AGG CTT ATT GGC AAC TAT ACA GAT TAT GCT GTA	624
CGC TGG TAC AAT ACG GGA TTA GAA CGT GTA TGG GGA CCG GAT TCT AGA	672
GAT TGG GTA AGG TAT AAT CAA TTT AGA AGA GAA TTA ACA CTA ACT GTA	720
TTA GAT ATC GTT GCT CTG TTC CCG AAT TAT GAT AGT AGA AGA TAT CCA	768
ATT CGA ACA GTT TCC CAA TTA ACA AGA GAA ATT TAT ACA AAC CCA GTA	816
TTA GAA AAT TTT GAT GGT AGT TTT CGA GGC TCG GCT CAG GGC ATA GAA	864
AGA AGT ATT AGG AGT CCA CAT TTG ATG GAT ATA CTT AAC AGT ATA ACC	912
ATC TAT ACG GAT GCT CAT AGG GGT TAT TAT TAT TGG TCA GGG CAT CAA	960
ATA ATG GCT TCT CCT GTA GGG TTT TCG GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG	1008

CTA TAT GGA ACT ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CGT ATT GTT GCT	1056
CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT AGA ACA TTA TCG TCC ACT TTA TAT AGA	1104
AGA CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA CTA TCT GTT CTT GAC	1152
GGG ACA GAA TTT GCT TAT GGA ACC TCC TCA AAT TTG CCA TCC GCT GTA	1200
TAC AGA AAA AGC GGA ACG GTA GAT TCG CTG GAT GAA ATA CCG CCA CAG	1248
AAT AAC AAC GTG CCA CCT AGG CAA GGA TTT AGT CAT CGA TTA AGC CAT	1296
GTT TCA ATG TTT CGT TCA GGC TTT AGT AAT AGT AGT GTA AGT ATA ATA	1344
AGA GCT CCT ATG TTC TCT TGG ATA CAT CGT AGT GCT GAA TTT AAT AAT	1392
ATA ATT GCA TCG GAT AGT ATT ACT CAA ATA CCA TTG GTA AAA GCA CAT	1440
ACA CTT CAG TCA GGT ACT ACT GTT GTA AGA GGG CCC GGG TTT ACG GGA	1488
GGA GAT ATT CTT CGA CGA ACA AGT GGA GGA CCA TTT GCT TAT ACT ATT	1536
GTT AAT ATA AAT GGG CAA TTA CCC CAA AGG TAT CGT GCA AGA ATA CGC	1584
TAT GCC TCT ACT ACA AAT CTA AGA ATT TAC GTA ACG GTT GCA GGT GAA	1632
CGG ATT TTT GCT GGT CAA TTT AAC AAA ACA ATG GAT ACC GGT GAC CCA	1680
TTA ACA TTC CAA TCT TTT AGT TAC GCA ACT ATT AAT ACA GCT TTT ACA	1728
TTC CCA ATG AGC CAG AGT AGT TTC ACA GTA GGT GCT GAT ACT TTT AGT	1776
TCA GGG AAT GAA GTT TAT ATA GAC AGA TTT GAA TTG ATT CCA GTT ACT	1824
GCA ACA TTT GAA GCA GAA TAT GAT TTA GAA AGA GCA CAA AAG GCG GTG	1872
AAT GCG CTG TTT ACT TCT ATA AAC CAA ATA GGG ATA AAA ACA GAT GTG	1920
ACG GAT TAT CAT ATT GAT CAA GTA TCC AAT TTA GTG GAT TGT TTA TCA	1968
GAT GAA TTT TGT CTG GAT GAA AAG CGA GAA TTG TCC GAG AAA GTC AAA	2016
CAT GCG AAG CGA CTC AGT GAT GAG CGG AAT TTA CTT CAA GAT CCA AAC	2064
TTC AAA GGC ATC AAT AGG CAA CTA GAC CGT GGT TGG AGA GGA AGT ACG	2112
GAT ATT ACC ATC CAA AGA GGA GAT GAC GTA TTC AAA GAA AAT TAT GTC	2160
ACA CTA CCA GGT ACC TTT GAT GAG TGC TAT CCA ACA TAT TTG TAT CAA	2208
AAA ATC GAT GAA TCA AAA TTA AAA GCC TTT ACC CGT TAT CAA TTA AGA	2256
GGG TAT ATC GAA GAT AGT CAA GAC TTA GAA ATC TAT TTA ATT CGC TAC	2304
AAT GCA AAA CAT GAA ACA GTA AAT GTG CCA GGT ACG GGT TCC TTA TGG	2352
CCG CTT TCA GCC CAA AGT CCA ATC GGA AAG TGT GGA GAG CCG AAT CGA	2400
TGC GCG CCA CAC CTT GAA TGG AAT CCT GAC TTA GAT TGT TCG TGT AGG	2448
GAT GGA GAA AAG TGT GCC CAT CAT TCG CAT CAT TTC TCC TTA GAC ATT	2496
GAT GTA GGA TGT ACA GAC TTA AAT GAG GAC CTA GGT GTA TGG GTG ATC	2544
TTT AAG ATT AAG ACG CAA GAT GGG CAC GCA AGA CTA GGG AAT CTA GAG	2592
TTT CTC GAA GAG AAA CCA TTA GTA GGA GAA GCG CTA GCT CGT GTG AAA	2640
AGA GCG GAG AAA AAA TGG AGA GAC AAA CGT GAA AAA TTG GAA TGG GAA	2688
ACA AAT ATC GTT TAT AAA GAG GCA AAA GAA TCT GTA GAT GCT TTA TTT	2736
GTA AAC TCT CAA TAT GAT CAA TTA CAA GCG GAT ACG AAT ATT GCC ATG	2784
ATT CAT GCG GCA GAT AAA CGT GTT CAT AGC ATT CGA GAA GCT TAT CTG	2832

CCT GAG CTG TCT GTG ATT CCG GGT GTC AAT GCG GCT ATT TTT GAA GAA	2880
TTA GAA GGG CGT ATT TTC ACT GCA TTC TCC CTA TAT GAT GCG AGA AAT	2928
GTC ATT AAA AAT GGT GAT TTT AAT AAT GGC TTA TCC TGC TGG AAC GTG	2976
AAA GGG CAT GTA GAT GTA GAA GAA CAA AAC AAC CAA CGT TCG GTC CTT	3024
GTT GTT CCG GAA TGG GAA GCA GAA GTG TCA CAA GAA GTT CGT GTC TGT	3072
CCG GGT CGT GGC TAT ATC CTT CGT GTC ACA GCG TAC AAG GAG GGA TAT	3120
GGA GAA GGT TGC GTA ACC ATT CAT GAG ATC GAG AAC AAT ACA GAC GAA	3168
CTG AAG TTT AGC AAC TGC GTA GAA GAG GAA ATC TAT CCA AAT AAC ACG	3216
GTA ACG TGT AAT GAT TAT ACT GTA AAT CAA GAA GAA TAC GGA GGT GCG	3264
TAC ACT TCT CGT AAT CGA GGA TAT AAC GAA GCT CCT TCC GTA CCA GCT	3312
GAT TAT GCG TCA GTC TAT GAA GAA AAA TCG TAT ACA GAT GGA CGA AGA	3360
GAG AAT CCT TGT GAA TTT AAC AGA GGG TAT AGG GAT TAC ACG CCA CTA	3408
CCA GTT GGT TAT GTG ACA AAA GAA TTA GAA TAC TTC CCA GAA ACC GAT	3456
AAG GTA TGG ATT GAG ATT GGA GAA ACG GAA GGA ACA TTT ATC GTG GAC	3504
AGC GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA TAG	3534

6.7.6 DNA-Sequenz, codierend das EG11091-Kristallprotein (SEQ ID NO: 29)

ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC ATT CCT TAT AAT TGT TTA	48
AGT AAC CCT GAA GTA GAA GTA TTA GGT GGA GAA AGA ATA GAA ACT GGT	96
TAC ACC CCA ATC GAT ATT TCC TTG TCG CTA ACG CAA TTT CTT TTG AGT	144
GAA TTT GTT CCC-GGT GCT GGA TTT GTG TTA GGA CTA GTT GAT ATA ATA	192
TGG GGA ATT TTT GGT CCC TCT CAA TGG GAC GCA TTT CTT GTA CAA ATT	240
GAA CAG TTA ATT AAC CAA AGA ATA GAA GAA TTC GCT AGG AAC CAA GCC	288
ATT TCT AGA TTA GAA GGA CTA AGC AAT CTT TAT CAA ATT TAC GCA GAA	336
TCT TTT AGA GAG TGG GAA GCA GAT CCT ACT AAT CCA GCA TTA AGA GAA	384
GAG ATG CGT ATT CAA TTC AAT GAC ATG AAC AGT GCC CTT ACA ACC GCT	432
ATT CCT CTT TTT GCA GTT CAA AAT TAT CAA GTT CCT CTT TTA TCA GTA	480
TAT GTT CAA GCT GCA AAT TTA CAT TTA TCA GTT TTG AGA GAT GTT TCA	528
GTG TTT GGA CAA AGG TGG GGA TTT GAT GCC GCG ACT ATC AAT AGT CGT	576
TAT AAT GAT TTA ACT AGG CTT ATT GGC AAC TAT ACA GAT TAT GCT GTA	624
CGC TGG TAC AAT ACG GGA TTA GAA CGT GTA TGG GGA CCG GAT TCT AGA	672
GAT TGG GTA AGG TAT AAT CAA TTT AGA AGA GAA TTA ACA CTA ACT GTA	720
TTA GAT ATC GTT GCT CTG TTC CCG AAT TAT GAT AGT AGA AGA TAT CCA	768
ATT CGA ACA GTT TCC CAA TTA ACA AGA GAA ATT TAT ACA AAC CCA GTA	816
TTA GAA AAT TTT GAT GGT AGT TTT CGA GGC TCG GCT CAG GGC ATA GAA	864
AGA AGT ATT AGG AGT CCA CAT TTG ATG GAT ATA CTT AAC AGT ATA ACC	912
ATC TAT ACG GAT GCT CAT AGG GGT TAT TAT TAT TGG TCA GGG CAT CAA	960

ATA ATG GCT TCT CCT GTA GGG TTT TCG GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG	1008
CTA TAT GGA ACT ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CAA CGT ATT GTT GCT	1056
CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT AGA ACA TTA TCG TCC ACT TTA TAT AGA	1104
AGA CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA CTA TCT GTT CTT GAC	1152
GGG ACA GAA TTT GCT TAT GGA ACC TCC TCA AAT TTG CCA TCC GCT GTA	1200
TAC AGA AAA AGC GGA ACG GTA GAT TCG CTG GAT GAA ATA CCG CCA CAG	1248
AAT AAC AAC GTG CCA CCT AGG CAA GGA TTT AGT CAT CGA TTA AGC CAT	1296
GTT TCA ATG TTT CGT TCA GGC TTT AGT AAT AGT AGT GTA AGT ATA ATA	1344
AGA GCT CCT ATG TTC TCT TGG ATA CAT CGT AGT GCA ACT CTT ACA AAT	1392
ACA ATT GAT CCA GAG AGA ATT AAT CAA ATA CCT TTA GTG AAA GGA TTT	1440
AGA GTT TGG GGG GGC ACC TCT GTC ATT ACA GGA CCA GGA TTT ACA GGA	1488
GGG GAT ATC CTT CGA AGA AAT ACC TTT GGT GAT TTT GTA TCT CTA CAA	1536
GTC AAT ATT AAT TCA CCA ATT ACC CAA AGA TAC CGT TTA AGA TTT CGT	1584
TAC GCT TCC AGT AGG GAT GCA CGA GTT ATA GTA TTA ACA GGA GCG GCA	1632
TCC ACA GGA GTG GGA GGC CAA GTT AGT GTA AAT ATG CCT CTT CAG AAA	1680
ACT ATG GAA ATA GGG GAG AAC TTA ACA TCT AGA ACA TTT AGA TAT ACC	1728
GAT TTT AGT AAT CCT TTT TCA TTT AGA GCT AAT CCA GAT ATA ATT GGG	1776
ATA AGT GAA CAA CCT CTA TTT GGT GCA GGT TCT ATT AGT AGC GGT GAA	1824
CTT TAT ATA GAT AAA ATT GAA ATT ATT CTA GCA GAT GCA ACA TTT GAA	1872
GCA GAA TCT GAT TTA GAA AGA GCA CAA AAG GCG GTG AAT GCC CTG TTT	1920
ACT TCT TCC AAT CAA ATC GGG TTA AAA ACC GAT GTG ACG GAT TAT CAT	1968
ATT GAT CAA GTA TCC AAT TTA GTG GAT TGT TTA TCA GAT GAA TTT TGT	2016
CTG GAT GAA AAG CGA GAA TTG TCC GAG AAA GTC AAA CAT GCG AAG CGA	2064
CTC AGT GAT GAG CGG AAT TTA CTT CAA GAT CCA AAC TTC AGA GGG ATC	2112
AAT AGA CAA CCA GAC CGT GGC TGG AGA GGA AGT ACA GAT ATT ACC ATC	2160
CAA GGA GGA GAT GAC GTA TTC AAA GAG AAT TAC GTC ACA CTA CCG GGT	2208
ACC GTT GAT GAG TGC TAT CCA ACG TAT TTA TAT CAG AAA ATA GAT GAG	2256
TCG AAA TTA AAA GCT TAT ACC CGT TAT GAA TTA AGA GGG TAT ATC GAA	2304
GAT AGT CAA GAC TTA GAA ATC TAT TTG ATC CGT TAC AAT GCA AAA CAC	2352
GAA ATA GTA AAT GTG CCA GGC ACG GGT TCC TTA TGG CCG CTT TCA GCC	2400
CAA AGT CCA ATC GGA AAG TGT GGA GAA CCG AAT CGA TGC GCG CCA CAC	2448
CTT GAA TGG AAT CCT GAT CTA GAT TGT TCC TGC AGA GAC GGG GAA AAA	2496
TGT GCA CAT CAT TCC CAT CAT TTC ACC TTG GAT ATT GAT GTT GGA TGT	2544
ACA GAC TTA AAT GAG GAC TTA GGT GTA TGG GTG ATA TTC AAG ATT AAG	2592
ACG CAA GAT GGC CAT GCA AGA CTA GGG AAT CTA GAG TTT CTC GAA GAG	2640
AAA CCA TTA TTA GGG GAA GCA CTA GCT CGT GTG AAA AGA GCG GAG AAG	2688
AAG TGG AGA GAC AAA CGA GAG AAA CTG CAG TTG GAA ACA AAT ATT GTT	2736
TAT AAA GAG GCA AAA GAA TCT GTA GAT GCT TTA TTT GTA AAC TCT CAA	2784

TAT GAT AGA TTA CAA GTG GAT ACG AAC ATC GCA ATG ATT CAT GCG GCA	2832
GAT AAA CGC GTT CAT AGA ATC CGG GAA GCG TAT CTG CCA GAG TTG TCT	2880
GTG ATT CCA GGT GTC AAT GCG GCC ATT TTC GAA GAA TTA GAG GGA CGT	2928
ATT TTT ACA GCG TAT TCC TTA TAT GAT GCG AGA AAT GTC ATT AAA AAT	2976
GGC GAT TTC AAT AAT GGC TTA TTA TGC TGG AAC GTG AAA GGT CAT GTA	3024
GAT GTA GAA GAG CAA AAC AAC CAC CGT TCG GTC CTT GTT ATC CCA GAA	3072
TGG GAG GCA GAA GTG TCA CAA GAG GTT CGT GTC TGT CCA GGT CGT GGC	3120
TAT ATC CTT CGT GTC ACA GCA TAT AAA GAG GGA TAT GGA GAG GGC TGC	3168
GTA ACG ATC CAT GAG ATC GAA GAC AAT ACA GAC GAA CTG AAA TTC AGC	3216
AAC TGT GTA GAA GAG GAA GTA TAT CCA AAC AAC ACA GTA ACG TGT AAT	3264
AAT TAT ACT GGG ACT CAA GAA GAA TAT GAG GGT ACG TAC ACT TCT CGT	3312
AAT CAA GGA TAT GAC GAA GCC TAT GGT AAT AAC CCT TCC GTA CCA GCT	3360
GAT TAC GCT TCA GTC TAT GAA GAA AAA TCG TAT ACA GAT GGA CGA AGA	3408
GAG AAT CCT TGT GAA TCT AAC AGA GGC TAT GGG GAT TAC ACA CCA CTA	3456
CCG GCT GGT TAT GTA ACA AAG GAT TTA GAG TAC TTC CCA GAG ACC GAT	3504
AAG GTA TGG ATT GAG ATC GGA GAA ACA GAA GGA ACA TTC ATC GTG GAT	3552
AGC GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA	3579

6.7.7 DNA-Sequenz, codierend das EG11768-Kristallprotein (SEQ ID NO: 33)

ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC ATT CCT TAT AAT TGT TTA	48
AGT AAC CCT GAA GTA GAA GTA TTA GGT GGA GAA AGA ATA GAA ACT GGT	96
TAC ACC CCA ATC GAT ATT TCC TTG TCG CTA ACG CAA TTT CTT TTG AGT	144
GAA TTT GTT CCC GGT GCT GGA TTT GTG TTA GGA CTA GTT GAT ATA ATA	192
TGG GGA ATT TTT GGT CCC TCT CAA TGG GAC GCA TTT CTT GTA CAA ATT	240
GAA CAG TTA ATT AAC CAA AGA ATA GAA GAA TTC GCT AGG AAC CAA GCC	288
ATT TCT AGA TTA GAA GGA CTA AGC AAT CTT TAT CAA ATT TAC GCA GAA	336
TCT TTT AGA GAG TGG GAA GCA GAT CCT ACT AAT CCA GCA TTA AGA GAA	384
GAG ATG CGT ATT CAA TTC AAT GAC ATG AAC AGT GCC CTT ACA ACC GCT	432
ATT CCT CTT TTT GCA GTT CAA AAT TAT CAA GTT CCT CTT TTA TCA GTA	480
TAT GTT CAA GCT GCA AAT TTA CAT TTA TCA GTT TTG AGA GAT GTT TCA	528
GTG TTT GGA CAA AGG TGG GGA TTT GAT GCC GCG ACT ATC AAT AGT CGT	576
TAT AAT GAT TTA ACT AGG CTT ATT GGC AAC TAT ACA GAT TAT GCT GTA	624
CGC TGG TAC AAT ACG GGA TTA GAA CGT GTA TGG GGA CCG GAT TCT AGA	672
GAT TGG GTA AGG TAT AAT CAA TTT AGA AGA GAA TTA ACA CTA ACT GTA	720
TTA GAT ATC GTT GCT CTG TTC CCG AAT TAT GAT AGT AGA AGA TAT CCA	768
ATT CGA ACA GTT TCC CAA TTA ACA AGA GAA ATT TAT ACA AAC CCA GTA	816
TTA GAA AAT TTT GAT GGT AGT TTT CGA GGC TCG GCT CAG GGC ATA GAA	864
AGA AGT ATT AGG AGT CCA CAT TTG ATG GAT ATA CTT AAC AGT ATA ACC	912

ATC TAT ACG GAT GCT CAT AGG GGT TAT TAT TAT TGG TCA GGG CAT CAA	960
ATA ATG GCT TCT CCT GTA GGG TTT TCG GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG	1008
CTA TAT GGA ACT ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CAA CGT ATT GTT GCT	1056
CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT AGA ACA TTA TCG TCC ACT TTA TAT AGA	1104
AGA CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA CTA TCT GTT CTT GAC	1152
GGG ACA GAA TTT GCT TAT GGA ACC TCC TCA AAT TTG CCA TCC GCT GTA	1200
TAC AGA AAA AGC GGA ACG GTA GAT TCG CTG GAT GAA ATA CCG CCA CAG	1248
AAT AAC AAC GTG CCA CCT AGG CAA GGA TTT AGT CAT CGA TTA AGC CAT	1296
GTT TCA ATG TTT CGT TCA GGC TTT AGT AAT AGT AGT GTA AGT ATA ATA	1344
AGA GCT CCT ATG TTC TCT TGG ATA CAT CGT AGT GCT GAA TTT AAT AAT	1392
ATA ATT GCA TCG GAT AGT ATT ACT CAA ATA CCA TTG GTA AAA GCA CAT	1440
ACA CTT CAG TCA GGT ACT ACT GTT GTA AGA GGG CCC GGG TTT ACG GGA	1488
GGA GAT ATT CTT CGA CGA ACA AGT GGA GGA CCA TTT GCT TAT ACT ATT	1536
GTT AAT ATA AAT GGG CAA TTA CCC CAA AGG TAT CGT GCA AGA ATA CGC	1584
TAT GCC TCT ACT ACA AAT CTA AGA ATT TAC GTA ACG GTT GCA GGT GAA	1632
CGG ATT TTT GCT GGT CAA TTT AAC AAA ACA ATG GAT ACC GGT GAC CCA	1680
TTA ACA TTC CAA TCT TTT AGT TAC GCA ACT ATT AAT ACA GCT TTT ACA	1728
TTC CCA ATG AGC CAG AGT AGT TTC ACA GTA GGT GCT GAT ACT TTT AGT	1776
TCA GGG AAT GAA GTT TAT ATA GAC AGA TTT GAA TTG ATT CCA GTT ACT	1824
GCA ACA CTC GAG GCT GAA TAT AAT CTG GAA AGA GCG CAG AAG GCG GTG	1872
AAT GCG CTG TTT ACG TCT ACA AAC CAA CTA GGG CTA AAA ACA AAT GTA	1920
ACG GAT TAT CAT ATT GAT CAA GTG TCC AAT TTA GTT ACG TAT TTA TCG	1968
GAT GAA TTT TGT CTG GAT GAA AAG CGA GAA TTG TCC GAG AAA GTC AAA	2016
CAT GCG AAG CGA CTC AGT GAT GAA CGC AAT TTA CTC CAA GAT TCA AAT	2064
TTC AAA GAC ATT AAT AGG CAA CCA GAA CGT GGG TGG GGC GGA AGT ACA	2112
GGG ATT ACC ATC CAA GGA GGG GAT GAC GTA TTT AAA GAA AAT TAC GTC	2160
ACA CTA TCA GGT ACC TTT GAT GAG TGC TAT CCA ACA TAT TTG TAT CAA	2208
AAA ATC GAT GAA TCA AAA TTA AAA GCC TTT ACC CGT TAT CAA TTA AGA	2256
GGG TAT ATC GAA GAT AGT CAA GAC TTA GAA ATC TAT TTA ATT CGC TAC	2304
AAT GCA AAA CAT GAA ACA GTA AAT GTG CCA GGT ACG GGT TCC TTA TGG	2352
CCG CTT TCA GCC CAA AGT CCA ATC GGA AAG TGT GGA GAG CCG AAT CGA	2400
TGC GCG CCA CAC CTT GAA TGG AAT CCT GAC TTA GAT TGT TCG TGT AGG	2448
GAT GGA GAA AAG TGT GCC CAT CAT TCG CAT CAT TTC TCC TTA GAC ATT	2496
GAT GTA GGA TGT ACA GAC TTA AAT GAG GAC CTA GGT GTA TGG GTG ATC	2544
TTT AAG ATT AAG ACG CAA GAT GGG CAC GCA AGA CTA GGG AAT CTA GAG	2592
TTT CTC GAA GAG AAA CCA TTA GTA GGA GAA GCG CTA GCT CGT GTG AAA	2640
AGA GCG GAG AAA AAA TGG AGA GAC AAA CGT GAA AAA TTG GAA TGG GAA	2688
ACA AAT ATC GTT TAT AAA GAG GCA AAA GAA TCT GTA GAT GCT TTA TTT	2736

GTA AAC TCT CAA TAT GAT CAA TTA CAA GCG GAT ACG AAT ATT GCC ATG	2784
ATT CAT GCG GCA GAT AAA CGT GTT CAT AGC ATT CGA GAA GCT TAT CTG	2832
CCT GAG CTG TCT GTG ATT CCG GGT GTC AAT GCG GCT ATT TTT GAA GAA	2880
TTA GAA GGG CGT ATT TTC ACT GCA TTC TCC CTA TAT GAT GCG AGA AAT	2928
GTC ATT AAA AAT GST GAT TTT AAT AAT GGC TTA TCC TGC TGG AAC GTG	2976
AAA GGG CAT GTA GAT GTA GAA GAA CAA AAC AAC CAA CGT TCG GTC CTT	3024
GTT GTT CCG GAA TGG GAA GCA GAA GTG TCA CAA GAA GTT CGT GTC TGT	3072
CCG GGT CGT GGC TAT ATC CTT CGT GTC ACA GCG TAC AAG GAG GGA TAT	3120
GGA GAA GGT TGC GTA ACC ATT CAT GAG ATC GAG AAC AAT ACA GAC GAA	3168
CTG AAG TTT AGC AAC TGC GTA GAA GAG GAA ATC TAT CCA AAT AAC ACG	3216
GTA ACG TGT AAT GAT TAT ACT GTA AAT CAA GAA GAA TAC GGA GGT GCG	3264
TAC ACT TCT CGT AAT CGA GGA TAT AAC GAA GCT CCT TCC GTA CCA GCT	3312
GAT TAT GCG TCA GTC TAT GAA GAA AAA TCG TAT ACA GAT GGA CGA AGA	3360
GAG AAT CCT TGT GAA TTT AAC AGA GGG TAT AGG GAT TAC ACG CCA CTA	3408
CCA GTT GGT TAT GTG ACA AAA GAA TTA GAA TAC TTC CCA GAA ACC GAT	3456
AAG GTA TGG ATT GAG ATT GGA GAA ACG GAA GGA ACA TTT ATC GTG GAC	3504
AGC GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA TAG	3534

6.8 Beispiel 8 – Isolierung von transgenen Pflanzen, welche gegen Cry*-Varianten resistent sind

6.8.1 Pflanzengenkonstruktion

[0324] Die Expression eines Pflanzengens, welches in Form einer doppelsträngigen DNA vorliegt, beinhaltet die Transkription einer Boten-RNA (mRNA) von einem Strang der DNA durch ein RNA-Polymeraseenzym und die anschließende Prozessierung des primären mRNA-Transkripts innerhalb des Kerns. An der Prozessierung beteiligt ist eine 3'-nichttranslatierte Region, die Polyadenylatnucleotide an das 3'-Ende der RNA anhängt. Die Transkription von DNA in eine mRNA wird durch eine DNA-Region reguliert, welche üblicherweise als "Promotor" bezeichnet wird. Die Promotorregion enthält eine Basensequenz, welche der RNA-Polymerase das Signal gibt, sich an die DNA anzulagern und die Transkription einer mRNA unter Verwendung von einem der DNA-Stränge als eine Matrize zu initiieren, um einen entsprechenden RNA-Strang herzustellen.

[0325] Eine Reihe von Promotoren, welche in Pflanzenzellen aktiv sind, ist in der Literatur beschrieben worden. Solche Promotoren können aus Pflanzen oder Pflanzenviren erhalten werden und schließen, aber sind nicht darauf begrenzt, die Nopalinsynthase (NOS)- und Octopinsynthase (OCS)-Promotoren (welche auf tumorinduzierenden Plasmiden von *Agrobacterium tumefaciens* getragen werden), die Blumenkohlmosaikvirus (CaMV)-19S- und -35S-Promotoren, den durch Licht induzierbaren Promotor aus der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (ssRUBISCO, ein in sehr großer Zahl vorkommendes Pflanzen-Polypeptid) und den Braunwurzmosaikvirus (FMV)-35S-Promotor ein. Alle diese Promotoren sind verwendet worden, um verschiedene Arten von DNA-Konstrukten zu erzeugen, die in Pflanzen exprimiert worden sind (vgl. z. B. US-Patent Nr. 5,463,175).

[0326] Der einzelne ausgewählte Promotor sollte fähig sein, eine ausreichende Expression der das Enzym codierenden Sequenz zu bewirken, um die Herstellung einer wirksamen Menge des Proteins zu erreichen. Eine Reihe von bevorzugten Promotoren sind konstitutive Promotoren, wie die CaMV35S- oder FMV35S-Promotoren, welche in den meisten Pflanzenorganen hohe Expressionsrate ergeben (US-Patent Nr. 5,378,619, hierin unter Bezugnahme ausdrücklich eingeschlossen). Eine andere Gruppe von bevorzugten Promotoren sind die in Wurzeln vermehrt vorkommenden oder wurzelspezifischen Promotoren, wie der CaMV-gesteuerte 4-as-1-Promotor oder der Weizen POX1-Promotor (US-Patent Nr. 5,023,179, hierin unter Bezugnahme ausdrücklich eingeschlossen; Hertig et al., 1991). Die in Wurzeln vermehrt vorkommenden oder wurzelspezifischen Promotoren werden zur Bekämpfung des Maiswurzelwurms (*Diabrotica sp.*) in transgenen Maispflanzen besonders bevorzugt.

[0327] Die in den erfindungsgemäßen DNA-Konstrukten (d. h. chimären Pflanzengen) verwendeten Pro-

motoren können gegebenenfalls modifiziert werden, um ihre Kontrolleigenschaften zu beeinflussen. Zum Beispiel kann der CaMV35S-Promotor mit dem Teil des ssRUBISCO-Gens ligiert werden, der die Expression von ssRUBISCO in Abwesenheit von Licht unterdrückt, um einen Promotor zu erzeugen, der in Blättern, aber nicht in Wurzeln aktiv ist. Der erhaltene chimäre Promotor kann verwendet werden, wie hierin beschrieben ist. Für die Zwecke dieser Beschreibung schließt der Ausdruck "CaMV35S"-Promotor folglich Variationen eines CaMV35S-Promotors ein, z. B. Promotoren, welche mittels Ligierung mit Operatorregionen, einer zufälligen oder kontrollierten Mutagenese, etc. abgeleitet werden. Ferner können die Promotoren so verändert werden, daß sie mehrere "Enhancersequenzen" enthalten, um die Erhöhung der Genexpression zu begünstigen.

[0328] Die durch ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt hergestellte RNA enthält auch eine 5'-nichttranslatierte Leadersequenz. Diese Sequenz kann aus dem Promotor abgeleitet sein, welcher für die Expression des Gens ausgewählt wurde, und kann spezifisch modifiziert werden, um die Translation der mRNA zu verstärken. Die 5'-nichttranslatierten Regionen können auch aus viralen RNAs, aus geeigneten eukaryontischen Genen oder aus einer synthetischen Gensequenz erhalten werden. Die vorliegende Erfindung ist nicht auf Konstrukte begrenzt, worin die nichttranslatierte Region aus der 5'-nichttranslatierten Sequenz, die mit der Promotorsequenz verbunden ist, abgeleitet ist.

[0329] Für eine optimale Expression in einkeimblättrigen Pflanzen wie Mais sollte auch ein Intron in das DNA-Expressionskonstrukt eingeschlossen werden. Dieses Intron wird typischerweise in der Nähe des 5'-Endes der mRNA in der nichttranslatierten Sequenz eingebracht. Dieses Intron könnte, aber ist nicht darauf beschränkt, aus eine Reihe von Introns, welche das Mais-hsp70-Intron ausmachen (US-Patent Nr. 5,424,412, hierin unter Bezugnahme ausdrücklich eingeschlossen), oder dem Reis-ActI-Intron (McElroy et al., 1990) erhalten werden. Wie nachstehend gezeigt, ist das Mais-hsp 70-Intron in der vorliegenden Erfindung nützlich.

[0330] Wie oben angemerkt, enthält die 3'-nichttranslatierte Region der erfindungsgemäßen chimären Pflanzengene ein Polyadenylierungssignal, welches in Pflanzen wirksam ist, um die Addition von Adenylatnucleotiden an das 3'-Ende der RNA zu bewirken. Beispiele für bevorzugte 3'-Regionen sind (1) die 3'-transkribierten, nichttranslatierten Regionen, enthaltend das Polyadenylierungssignal von tumorinduzierenden (Ti)-Plasmidgenen aus *Agrobacterium*, wie das Nopalinsynthase (NOS)-Gen, und (2) Pflanzengene wie das ssRUBISCO-E9-Gen der Erbse (Fischhoff et al., 1987).

6.8.2 Pflanzentransformation und Expression

[0331] Ein chimäres Transgen, enthaltend eine strukturelle codierende Sequenz der vorliegenden Erfindung, kann durch ein geeignetes Verfahren, wie die hierin ausführlich beschriebenen, in das Genom einer Pflanze inseriert werden. Geeignete Pflanzentransformationsvektoren schließen die aus einem Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* abgeleiteten, sowie die z. B. durch Herrera-Esterella (1983), Bevan (1983), Klee (1985) und die Eur. Pat. Anmelde. Veröffentl.-Nr. EP 0120516 offenbarten ein. Zusätzlich zu den aus dem Ti-Plasmid oder dem die Wurzelbildung induzierenden (Ri)-Plasmid von *Agrobacterium* abgeleiteten Pflanzentransformationsvektoren können andere Verfahren angewendet werden, um die erfindungsgemäßen DNA-Konstrukte in Pflanzenzellen zu inserieren. Solche Verfahren können zum Beispiel die Verwendung von Liposomen, die Elektroporation, Chemikalien, welche die Aufnahme von freier DNA erhöhen, die Übertragung von freier DNA mittels Mikroprojektilbeschuß und die Transformation unter Verwendung von Viren oder Pollen einschließen (Fromm et al., 1986; Armstrong et al., 1990; Fromm et al., 1990).

6.8.3 Konstruktion von Pflanzentransformationsvektoren für Cry*-Transgene

[0332] Für die wirksame Expression der hierin offenbarten cry*-Varianten in transgenen Pflanzen muß das Gen, welches die Varianten codiert, eine geeignete Sequenzzusammenstellung aufweisen (Diehn et al., 1996).

[0333] Um ein cry*-Gen in einen Vektor einzubringen, welcher für die Expression in einkeimblättrigen Pflanzen geeignet ist (d. h. unter der Kontrolle des verstärkten Blumenkohlmosaikvirus-35S-Promotors und verknüpft mit dem hsp70-Intron, gefolgt durch eine Nopalinsynthase-Polyadenylierungsstelle, so wie in US-Patent Nr. 5,424,412; hierin unter Bezugnahme ausdrücklich eingeschlossen), wird der Vektor mit geeigneten Enzymen wie NcoI und EcoRI geschnitten. Die größere Vektorbande von etwa 4,6 kb wird dann einer Elektrophorese unterzogen, gereinigt und mit Hilfe der T4-DNA-Ligase mit dem geeigneten Restriktionsfragment, welches das botanisierte cry*-Gen enthält, ligiert. Das Ligierungsgemisch wird dann in *E. coli* transformiert, Carbenicillin-resistente Kolonien werden gewonnen, und die Plasmid-DNA wird durch DNA-Minipräp-Verfahren gewonnen. Die DNA kann dann einer Restriktionsendonuclease-Analyse mit Enzymen wie NcoI und EcoRI (zusammen), NotI und PstI unterzogen werden, um Clone zu identifizieren, welche die das cry*-Gen codierende Se-

quenz, verknüpft mit dem hsp70-Intron, unter der Kontrolle des verstärkten CaMV35S-Promotors enthalten.

[0334] Um das Gen in einen Vektor einzubringen, der für die Gewinnung von stabil transformierten und insektenresistenten Pflanzen geeignet ist, kann das Restriktionsfragment aus pMON33708, enthaltend die Lysinocodierende Sequenz, verknüpft mit dem hsp70-Intron, unter der Kontrolle des verstärkten CaMV35S-Promotors, mittels Gelelektrophorese und einer Reinigung isoliert werden. Dieses Fragment kann dann mit einem Vektor wie pMON30460 ligiert werden, welcher mit NotI und der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm behandelt wurde (pMON30460 enthält die codierende Sequenz für die Neomycin-Phosphotransferase unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors). Kanamycin-resistente Kolonien können dann durch Transformation dieses Ligierungsgemisches in *E. coli* erhalten werden, und Kolonien, welche das resultierende Plasmid enthalten, können durch einen Restriktionsendonucleaseverdau von Plasmid-Minipräp-DNAs identifiziert werden. Restriktionsenzyme wie NotI, EcoRV, HindIII, NcoI, EcoRI und BglII können verwendet werden, um die geeigneten Clone zu identifizieren, die das Restriktionsfragment richtig inseriert in die entsprechende Stelle von pMON30460 in einer solchen Orientierung enthalten, daß beide Gene in einer Tandemanordnung vorliegen (d. h. das 3'-Ende der cry*-Gen-Expressionskassette ist mit dem 5'-Ende der nptII-Expressionskassette verknüpft). Die Expression des Cry*-Proteins durch den erhaltenen Vektor wird dann in Pflanzenprotoplasten durch Elektroporation des Vektors in Protoplasten, gefolgt durch einen Protein-Blot und eine ELISA-Analyse, bestätigt. Dieser Vektor kann in die genomische DNA von Pflanzenembryonen wie Mais durch Teilchenkanonenbeschuß, gefolgt durch eine Paromomycin-Selektion, um Maispflanzen zu erhalten, welche das cry*-Gen exprimieren, im wesentlichen wie beschrieben in US-Patent Nr. 5,424,412, hierin unter Bezugnahme ausdrücklich eingeschlossen, eingeschleust werden. In diesem Beispiel wurde der Vektor durch den gleichzeitigen Beschuß mit einem Plasmid, welches eine Hygromycin-Resistenz überträgt, in unreife Embryonen-Scutella von Mais, gefolgt durch eine Hygromycin-Selektion und Regeneration, eingeschleust. Transgene Maislinien, welche das cry*-Protein exprimieren, werden dann durch eine ELISA-Analyse identifiziert. Aus Samen gezogene Nachkommen dieser Ereignisse werden dann anschließend auf einen Schutz vor einer Anfälligkeit gegen Insektenfraß getestet.

7.0 Referenzen

US-Patent 4,196,265, erteilt am 1. April 1980.
 US-Patent 4,554,101, erteilt am 19. November 1985.
 US-Patent 4,683,195, erteilt am 28. Juli 1987.
 US-Patent 4,683,202, erteilt am 28. Juli 1987.
 US-Patent 4,702,914, erteilt am 27. Oktober 1987.
 US-Patent 4,757,011, erteilt am 12. Juli 1988.
 US-Patent 4,769,061, erteilt am 6. September 1988.
 US-Patent 4,940,835, erteilt am 10. Juli 1990.
 US-Patent 4,965,188, erteilt am 23. Oktober 1990.
 US-Patent 4,971,908, erteilt am 20. November 1990.
 US-Patent 4,987,071, erteilt am 22. Januar 1991.
 US-Patent 5,004,863, erteilt am 2. April 1991.
 US-Patent 5,015,580, erteilt am 14. Mai 1991.
 US-Patent 5,023,179, erteilt am 11. Juni 1991.
 US-Patent 5,055,294, erteilt am 8. Oktober 1991.
 US-Patent 5,128,130, erteilt am 7. Juli 1992.
 US-Patent 5,176,995, erteilt am 5. Januar 1993.
 US-Patent 5,349,124, erteilt am 20. September 1994.
 US-Patent 5,378,619, erteilt am 3. Januar 1995.
 US-Patent 5,380,831, erteilt am 10. Januar 1995.
 US-Patent 5,384,253, erteilt am 24. Januar 1995.
 US-Patent 5,416,102, erteilt am 16. Mai 1995.
 US-Patent 5,424,412, erteilt am 13. Juni 1995.
 US-Patent 5,441,884, erteilt am 15. August 1995.
 US-Patent 5,449,681, erteilt am 12. September 1995.
 US-Patent 5,463,175, erteilt am 31. Oktober 1995.
 US-Patent 5,500,365, erteilt am 19. März 1996.
 US-Patent 5,631,359, erteilt am 20. Mai 1997.
 US-Patent 5,659,123, erteilt am 19. August 1997.
 Eur. Pat. EP 0120516, erteilt am 3. Oktober 1984.
 Eur. Pat. EP 0360257, erteilt am 28. März 1990.

- Internat. Pat. Anmeldg. Veröffentl.-Nr. WO 91/10725, veröffentlicht am 25. Juli 1991.
 Internat. Pat. Anmeldg. Veröffentl.-Nr. WO 93/07278, veröffentlicht am 15. April 1993.
 Internat. Pat. Anmeldg. Veröffentl.-Nr. WO 95/02058, veröffentlicht am 19. Januar 1995.
 Internat. Pat. Anmeldg. Veröffentl.-Nr. WO 95/06730, veröffentlicht am 9. März 1995.
 Internat. Pat. Anmeldg. Veröffentl.-Nr. WO 95/30752, veröffentlicht am 16. November 1995.
 Internat. Pat. Anmeldg. Veröffentl.-Nr. WO 95/30753, veröffentlicht am 16. November 1995.
 Internat. Pat. WO 92/07065, erteilt am 30. April 1992.
 Internat. Pat. WO 93/15187, erteilt am 5. August 1993.
 Internat. Pat. WO 93/23569, erteilt am 25. November 1993.
 Internat. Pat. WO 94/02595, erteilt am 3. Februar 1994.
 Internat. Pat. WO 94/13688, erteilt am 23. Juni 1994.
 Internat. Pat. WO 91/03162, erteilt am 21. März 1991.
 Abdullah et al., *Biotechnology*, 4: 1087, 1986.
 Adami und Nevins, In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 26, 1988.
 Adang et al., In: *Molecular Strategies for Crop Protection*, Alan R. Liss, Inc., S. 345–353, 1987.
 Adelman et al., *DNA*, 2/3: 183–193, 1983.
 Allen und Choun, "Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system"; *FEBS Lett.*, 223: 42–46, 1987.
 Altschul et al., "Basic local alignment search tool"; *J. Mol. Biol.*, 215: 403–410, 1990.
 Arvidson et al., *Mol. Biol.*, 3: 1533–1534, 1989.
 Barton et al., *Plant Physiol.*, 85: 1103–1109, 1987.
 Baum et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3420–3428, 1990.
 Benbrook et al., In: *Proceedings Bio Expo 1986*, Butterworth, Stoneham, MA, S. 27–54, 1986.
 Bevan et al., *Nature*, 304: 184, 1983.
 Bolivar et al., *Gene*, 2: 95, 1977.
 Bosch et al., "Recombinant *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins with New Properties: Possibilities for Resistance Management"; *Bio/Technology*, 12: 915–918, 1994.
 Brady und Wold, In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 224, 1988.
 Brown, *Nucl. Acids Res.*, 14(24): 9549, 1986.
 Bytebier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5345, 1987.
 Callis et al., *Genes Develop.* 1: 1183, 1987.
 Callis, Fromm, Walbot, *Genes and Develop.*, 1: 1183–1200, 1987.
 Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Bd. 13, Burden und Von Knippenberg, Hrsg., S. 75–83, Elsevier, Amsterdam, 1984.
 Capecchi, "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells", *Cell*, 22(2): 479–488, 1980.
 Cashmore et al., *Gen. Eng. of Plants*, Plenum Press, New York, 29–38, 1983.
 Chambers et al., *J. Bacteriol.*, 173: 3966–3976, 1991.
 Chang et al., *Nature*, 375: 615, 1978.
 Chau et al., *Science*, 244: 174–181, 1989.
 Chen et al., *Nucl. Acids Res.*, 20: 4581–9, 1992.
 Clapp, "Somatic gene therapy into hermatopoietic cells. Current status and future implications", *Clin. Perinatol.* 20(1): 155–168, 1993.
 Collins und Olive, *Biochem.*, 32: 2795–2799, 1993.
 Conway und Wickens, In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 40, 1988.
 Cornellssen et al., *EMBO J.*, 5(1): 37–40, 1986.
 Couvreur et al., "Nanocapsules, a new lysosomotropic carrier", *FEBS Lett.*, 84: 323–326, 1977.
 Couvreur, "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, Hu, "High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes", *Hum. Gen. Ther.*, 3(2): 147–154, 1992.
 Daar et al., In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 45, 1988.
 Dean et al., *Nucl. Acids Res.*, 14(5): 2229, 1986.
 Dedrick et al., *J. Biol. Chem.*, 262(19): 9098–1106, 1987.
 Dhir et al., *Plant Cell Reports*, 10: 97, 1991.
 Diehn, De Rocher, Green., "Problems that can limit the expression of foreign genes in plants: Lessons to be

- learned from B. t. toxin genes", In: Genetic Engineering, Bd. 18, hrsg. durch J. K. Setlow, Plenum Press, N. Y., 1996.
- Donovan et al., J. Biol. Chem., 263(1): 561–567, 1988.
- Doyle et al., J. Biol. Chem., 261(20): 9228–9236, 1986.
- Dropulic et al., J. Virol., 66: 1432–41, 1992.
- 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", Adv. Exp. Med. Biol., 241: 19–27, 1988.
- Eichenlaub, J. Bacteriol., 138(2): 559–566, 1979.
- Elionor et al., Mol. Gen. Genet., 218: 78–86, 1989.
- Elroy-Stein und Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6743–7, 1990.
- Fiers et al., Nature, 273: 113, 1978.
- Fischhoff et al., Bio/Technology, 5: 807, 1987.
- Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4803, 1983.
- Fraley et al., Bio/Technology, 3: 629–635, 1985.
- Fromm, Taylor, Walbot, Nature, 319: 791–793, 1986.
- Fromm, Taylor, Walbot, "Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82(17): 5824–5828, 1985.
- Fromm et al., "Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants", Biotechnology (NY), 8(9): 833–839, 1990.
- Fujimura et al., Plant Tissue Culture Letters, 2: 74, 1985.
- Fütterer und Hohn, "Translation in plants – rules and exceptions", Plant Mol. Biol., 32: 159–189, 1996.
- 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.
- Gallego und Nadal-Ginard, In: RNA Processing, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 61, 1988.
- Gao und Huang, Nucl. Acids Res., 21: 2867–72, 1993.
- Gawron-Burke und Baum, Genet. Engineer., 13: 237–263, 1991.
- Gefter et al., Somat. Cell Genet., 3: 231–236, 1977.
- Genovese und Milcarek, In: RNA Processing, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 62, 1988.
- Gil und Proudfoot, Nature, 312: 473, 1984.
- Gill et al., J. Biol. Chem., 270: 27277–27282, 1995.
- Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", S. 60–74, 2. Auflage, Academic Press, Orlando, FL, 1986.
- Goeddel et al., Nature, 281: 544, 1979.
- Goeddel et al., Nucl. Acids Res., 8: 4057, 1980.
- Goodall et al., In: RNA Processing, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 63, 1988.
- Graham und van der Eb, "Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5", Virology, 54(2): 536–539, 1973.
- Green, Nucl. Acids Res. 16(1): 369, 1988.
- Grochulski et al., J. Mol. Biol., 254: 447–464, 1995.
- Gross et al., In: RNA Processing, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 128, 1988.
- Guerrier-Takada et al., Cell, 35: 849, 1983.
- Hampel und Tritz, Biochem., 28: 4929, 1989.
- Hampel et al., Nucl. Acids Res., 18: 299, 1990.
- Hampson und Rottman, In: RNA Processing, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 68, 1988.
- Hanley und Schuler, Nucl. Acids Res., 16(14): 7159, 1988.
- Harlow und Lane, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988.
- Helfman und Ricci, In: RNA Processing, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 219, 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.
- Herrera-Estrella et al., Nature, 303: 209, 1983.
- Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149, 1968.
- Hertig et al., "Sequence and tissue-specific expression of a putative peroxidase gene from wheat (*Triticum aestivum* L.)", Plant Mol. Biol., 16(1): 171–174, 1991.
- Hilber, Bodmer, Smith, Koller, "Biolistic transformation of conidia of *Botryotinia fuckeliana* Curr. Genet., 25(2): 124–127, 1994.
- Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255: 2073, 1980.
- Hoekema et al., Molecular and Cellular Biology, 7: 2914–2924, 1987.

- Höfte und Whiteley, *Microbiol. Rev.*, 53: 242–255, 1989.
- Holland et al., *Biochemistry*, 17: 4900, 1978.
- Honee et al., *Mol. Microbiol.*, 5: 2799–2806, 1991.
- Honee et al., *Nucl. Acids Res.*, 16(13), 1988.
- Hoover et al., (Eds.), In: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15. Auflage, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1975.
- Horsch et al., *Science*, 227: 1229–1231, 1985.
- Horsch et al., *Science*, 227: 1229, 1985.
- Horton et al., *Gene*, 77: 61–68, 1989.
- Humason, "Animal Tissue Techniques", W. H. Freeman & Company, New York, 1967.
- Iannacone, Pasquale, Grieco, Francesco, Cellini, "Specific sequence modifications of a cry3B endotoxin gene results in high levels of expression and insect resistance", *Plant, Mol. Biol.*, 34: 485–496, 1997.
- Itakura et al., *Science*, 198: 1056, 1977.
- Jaeger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 7706–7710, 1989.
- Jameson and Wolf, "The Antigenic Index: A Novel Algorithm for Predicting Antigenic Determinants", *Compu. Appl. Biosci.*, 4(1): 181–6, 1988.
- Jarret et al., *In Vitro*, 17: 825, 1981.
- Jarret et al., *Physiol. Plant*, 49: 177, 1980.
- Johnston und Tang, "Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization", *Methods Cell. Biol.*, 43(A): 353–365, 1994.
- Jones, *Genetics*, 85: 12 1977.
- Jorgensen et al., *Mol. Gen. Genet.*, 207: 471, 1987.
- Kaiser et al., "Amphiphilic secondary structure: design of peptide hormones; *Science*, 223(4633): 249–255, 1984.
- Kashani-Saber et al., *Antisense Res. Dev.*, 2: 3–15, 1992.
- Kay et al., *Science*, 236: 1299–1302, 1987.
- Keller et al., *EMBO J.*, 8: 1309–14, 1989.
- Kessler et al., In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 85, 1988.
- Kingsman et al., *Gene*, 7: 141, 1979.
- Klee et al., *Bio/Technology*, 3: 637, 1985.
- Klee et al., *Bio/Technology*, 3: 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.
- Kohler und Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6: 511–519, 1976.
- Kohler und Milstein, *Nature*, 256: 495–497, 1975.
- Kozak, *Nature*, 308: 241–246, 1984.
- Krebbers et al., *Plant Molecular Biology*, 11: 745–759, 1988.
- Kuby, *Immunology 2nd Edition*, W. H. Freeman & Company, New York, 1994.
- Krunkel, "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82(2): 488–492, 1985.
- Kunkel et al., "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection", *Methods Enzymol*, 154: 367–382, 1987.
- Kyte und Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein", *J. Mol. Biol.*, 157(1): 105–132, 1982.
- Langridge et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3219–3223, 1989.
- Lee et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 216: 306–312, 1995.
- L'Huillier et al., *EMBO J.*, 11: 4411–8, 1992.
- Lieber et al., *Methods Enzymol.*, 217: 47–66, 1993.
- Liszewicz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 8000–4, 1993.
- Lim et al., "Human beta-globin mRNAs that harbor a nonsense codon are degraded in murine erythroid tissues to intermediates lacking regions of exon I or exons I and II that have a cap-like structure at the 5' termini", *EMBO J.*, 11(9): 3271–3278, 1992.
- Lindstrom et al., *Develop. Genet.*, 11: 160, 1990.
- 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.
- Luo et al., *Plant Mol. Biol. Report*, 6: 165, 1988.
- Maddock et al., *Third Intl. Congr. Plant Mol. Biol.*, Abstr. Nr. 372, 1991.

- Maloy et al., In: *Microbial Genetics*, 2. Auflage, Jones & 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.
- Marrone et al., *J. Econ. Entomol.*, 78:290-293, 1985.
- Marzluff und Pandey, In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 244, 1988.
- Masson et al., *J. Biol. Chem.*, 270: 20309-20315, 1995.
- McCabe et al., *Biotechnology*, 6: 923, 1988.
- McCormick et al., *Plant Cell Reports*, 5: 81-84, 1986.
- McDevitt et al., *Cell*, 37: 993-999, 1984.
- McElroy et al., "Characterization of the rice (*Oryza sativa*) actin gene family", *Plant Mol Biol.*, 15(2): 257-268, 1990.
- Mettus und Macaluso, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1128-1134, 1990.
- Murashige und Skoog, *Physiol. Plant*, 15: 473, 1962.
- Murray, Lotzer, Eberle, "Codon usage in plant genes", *Nucleic Acids Research*, 17(2): 477-498, 1989.
- Neuhaus et al., *Theor. Appl. Genet.*, 75: 30, 1987.
- Odell et al., *Nature*, 313: 810, 1985.
- Odell et al., *Nature*, 313: 810, 1985.
- Ojwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10802-6, 1992.
- Ohkawa et al., *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 27: 15-6, 1992.
- Omirulleh et al., *Plant Mol. Biol.*, 21: 415-428, 1993.
- Pandey und Marzluff, In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 133, 1987.
- Pieken et al., *Science*, 253: 314, 1991.
- Pena et al., *Nature*, 325: 274, 1987.
- Perrault et al., *Nature*, 344: 565, 1990.
- Poszkowski et al., *EMBO J.*, 3: 2719, 1989.
- Potrykus et al., *Mol. Gen. Genet.*, 199: 183, 1985.
- Poulsen et al., *Mol. Gen. Genet.*, 205: 193-200, 1986.
- Prokop und Bajpai, "Recombinant DNA Technology I", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Vol. 646, 1991.
- Proudfoot et al., In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 17, 1987.
- Reines et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 299-312, 1987.
- Rogers et al., In: *Methods For Plant Molecular Biology*, A. Weissbach und H. Weissbach, Hrsg., Academic Press Inc., San Diego, CA 1988.
- Rogers et al., *Methods Enzymol.*, 153: 253-277, 1987.
- Rossi et al., *Aids Res. Hum. Retrovir.*, 8: 183, 1992.
- Rouwendal, Odette Mendes, Wolbert Douwe de Boer, "Enhanced expression in tobacco of the gene encoding green fluorescent protein by modification of its codon usage", *Plant Mol. Biol.*, 33: 989-999, 1997.
- Ruud et al., "Different Domains of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxins Can Bind to Insect Midgut Membrane Proteins on Ligand Blots", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(8): 2753-2757, 1996.
- Ruud et al., "Domain III Substitution in *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin CryIA(b) Results in Superior Toxicity for *Spodoptera exigua* and Altered Membrane Protein Recognition", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(5): 1537-1543, 1996.
- Sadofsky und Alwine, *Molecular and Cellular Biology*, 4(8): 1460-1468, 1984.
- Sambrook et al., In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sanden et al., *Nucl. Acids Res.*, 15(4): 1543, 1987.
- Saville und Collins, *Cell*, 61: 685-696, 1990.
- Saville und Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8826-8830, 1991.
- Scanlon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 10591-5, 1991.
- Scaringe et al., *Nucl. Acids Res.*, 18: 5433-5441, 1990.
- Schnepf et al., *J. Biol. Chem.*, 265: 20923-20930, 1990.
- Schuler et al., *Nucl. Acids Res.*, 10(24): 8225-8244, 1982.
- Segal, In: *Biochemical Calculations*, 2. Auflage, John Wiley & Sons, New York, 1976.
- Shaw und Kamen, *Cell*, 46: 659-667, 1986.
- Shaw und Kamen, In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 220, 1987.
- Simpson, *Science*, 233: 34, 1986.
- Spielmann et al., *Mol. Gen. Genet.*, 205: 34, 1986.
- Spoerel, *Methods Enzymol.*, 152: 588-597, 1987.
- Stemmer, "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91(22): 10747-10751, 1994.

- Stinchcomb et al., *Nature*, 282: 39, 1979.
- Taira et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 5125–30, 1991.
- Thompson et al., *Genet. Engineer.*, 17: 99–117, 1995.
- Toriyama et al., *Theor. Appl. Genet.*, 73: 16, 1986.
- Trolinder und Goodin, *Plant Cell Reports*, 6: 231–234, 1987.
- Tschemper et al., *Gene*, 10: 157, 1980.
- Tsurushita und Korn, In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 215, 1987.
- Tumer et al., *Nucl. Acids Res.*, 14: 8, 3325, 1986.
- Uchimiya et al., *Mol. Gen. Genet.*, 204: 204, 1986.
- Usman und Cedergren, *Trends in Biochem. Sci.*, 17: 334, 1992.
- Vaeck et al., *Nature*, 328: 33, 1987.
- Van Tunen et al., *EMBO J.*, 7: 1257, 1988.
- 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.
- Velten und Schell, *Nucl. Acids Res.*, 13: 6981–6998, 1985.
- Velten et al., *EMBO J.*, 3: 2723–2730, 1984.
- Ventura et al., *Nucl. Acids Res.*, 21: 3249–55, 1993.
- Visser et al., *Mol. Gen. Genet.*, 212: 219–224, 1988.
- Vodkin et al., *Cell*, 34: 1023, 1983.
- Vogel et al., *J. Cell Biochem.*, (Suppl.) 13D: 312, 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.
- Webb et al., *Plant Sci. Letters*, 30: 1, 1983.
- Weerasinghe et al., *J. Virol.*, 65: 5531–4, 1991.
- Weissbach und Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, (eds.), Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1988.
- Wenzler et al., *Plant Mol. Biol.*, 12: 41–50, 1989.
- Wickens und Stephenson, *Science*, 226: 1045, 1984.
- Wickens et al., In: *RNA Processing*, Cold Spring Harbor Laboratory, S. 9, 1987.
- Wiebauer et al., *Molecular and Cellular Biology*, 8(5): 2042–2051, 1988.
- Wolf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 7305–7309, 1992.
- Wolf et al., "An Integrated Family of Amino Acid Sequence Analysis Programs", *Compu. Appl. Biosci.*, 4(1): 187–91, 1988.
- Wong und Neumann, "Electric field mediated gene transfer", *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 107(2): 584–587, 1982.
- Yamada et al., *Plant Cell Rep.*, 4: 85, 1986.
- Yamamoto und Iizuka, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 227(1): 233–241, 1983.
- Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87: 4144–48, 1990.
- Zhou et al., *Methods Enzymol.*, 101: 433, 1983.
- Zhou et al., *Mol. Cell Biol.*, 10: 4529–37, 1990.

[0335] Alle der hierin offenbarten und beanspruchten Zusammensetzungen und Verfahren können im Hinblick auf die vorliegende Offenbarung ohne unnötiges Experimentieren hergestellt bzw. ausgeführt werden. Obwohl die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Verfahren im Hinblick auf bevorzugte Ausführungsformen beschrieben worden sind, ist den Fachleuten bewußt, daß Variationen hinsichtlich der Zusammensetzungen und Verfahren sowie der Schritte oder der Reihenfolge von Schritten des hierin beschriebenen Verfahrens vorgenommen werden können, ohne vom Schutzzumfang der Erfindung abzuweichen. Insbesondere ist erkennbar, daß bestimmte Mittel, welche sowohl chemisch als auch physiologisch verwandt sind, die hierin beschriebenen Mittel ersetzen können, während die gleichen oder ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Alle solche ähnlichen Ersatzstoffe und Modifikationen, welche für die Fachleute offensichtlich sind, sind im Schutzzumfang der Erfindung, wie durch die beigefügten Ansprüche definiert, eingeschlossen.

8.0 Sequenzprotokoll

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Ecogen, Inc.
- (B) STRASSE: 2005 Cabot Boulevard West
- (C) STADT: Langhorne
- (D) STAAT: Pennsylvania
- (E) LAND: USA
- (F) POSTLEITZAHL: 19047-3023

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: δ -Endotoxine mit breitem Spektrum

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 35

(iv) COMPUTERLESBARE FORM:

- (A) MEDIUM-TYP: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(vi) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:

- (A) ANMELDUNGSNUMMER: US 08/922,505
- (B) EINREICHUNGSDATUM: 3. September 1997

(vi) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:

- (A) ANMELDUNGSNUMMER: US 08/757,536
- (B) EINREICHUNGSDATUM: 27. November 1996

(vi) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:

- (A) ANMELDUNGSNUMMER: US 08/754,490
- (B) EINREICHUNGSDATUM: 20. November 1996

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGATAGCACT CATCAAAGGT ACC

23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GAAGATATCC AATTCTGAACA GTTTCCC

27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CATATTCTGC CTCGAGTGTT GCAGTAAC

28

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CCCGATCGGC CGCATGC

17

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CATTGGAGCT CTCCATG

17

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 16 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GCACTACGAT GTATCC

16

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CATCGTAGTG CAACTCTTAC

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CCAAGAAAAT ACTAGAGCTC TTGTTAAAAA AGGTGTTCC

39

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 3531 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LÄNGE: 1..3531

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

ATG	GAT	AAC	AAT	CCG	AAC	ATC	AAT	GAA	TGC	ATT	CCT	TAT	AAT	TGT	TTA	48
Met	Asp	Asn	Asn	Pro	Asn	Ile	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	Tyr	Asn	Cys	Leu	
1				5				10						15		
AGT	AAC	CCT	GAA	GTA	GAA	GTA	TTA	GGT	GGA	GAA	AGA	ATA	GAA	ACT	GGT	96
Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Glu	Val	Leu	Gly	Gly	Glu	Arg	Ile	Glu	Thr	Gly	
			20					25					30			
TAC	ACC	CCA	ATC	GAT	ATT	TCC	TTG	TCG	CTA	ACG	CAA	TTT	CTT	TTG	AGT	144
Tyr	Thr	Pro	Ile	Asp	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Gln	Phe	Leu	Leu	Ser	
			35				40					45				
GAA	TTT	GTT	CCC	GGT	GCT	GGA	TTT	GTG	TTA	GGA	CTA	GTT	GAT	ATA	ATA	192
Glu	Phe	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Phe	Val	Leu	Gly	Leu	Val	Asp	Ile	Ile	
	50					55				60						
TGG	GGA	ATT	TTT	GGT	CCC	TCT	CAA	TGG	GAC	GCA	TTT	CTT	GTA	CAA	ATT	240

Trp	Gly	Ile	Phe	Gly	Pro	Ser	Gln	Trp	Asp	Ala	Phe	Leu	Val	Gln	Ile		
65					70					75					80		
GAA	CAG	TTA	ATT	AAC	CAA	AGA	ATA	GAA	GAA	TTC	GCT	AGG	AAC	CAA	GCC		288
Glu	Gln	Leu	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Glu	Glu	Phe	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala		
				85					90					95			
ATT	TCT	AGA	TTA	GAA	GGA	CTA	AGC	AAT	CTT	TAT	CAA	ATT	TAC	GCA	GAA		336
Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Gly	Leu	Ser	Asn	Leu	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Ala	Glu		
			100					105					110				
TCT	TTT	AGA	GAG	TGG	GAA	GCA	GAT	CCT	ACT	AAT	CCA	GCA	TTA	AGA	GAA		384
Ser	Phe	Arg	Glu	Trp	Glu	Ala	Asp	Pro	Thr	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Glu		
		115					120					125					
GAG	ATG	CGT	ATT	CAA	TTC	AAT	GAC	ATG	AAC	AGT	GCC	CTT	ACA	ACC	GCT		432
Glu	Met	Arg	Ile	Gln	Phe	Asn	Asp	Met	Asn	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Ala		
	130					135					140						
ATT	CCT	CTT	TTT	GCA	GTT	CAA	AAT	TAT	CAA	GTT	CCT	CTT	TTA	TCA	GTA		480
Ile	Pro	Leu	Phe	Ala	Val	Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Val		
	145				150					155					160		
TAT	GTT	CAA	GCT	GCA	AAT	TTA	CAT	TTA	TCA	GTT	TTG	AGA	GAT	GTT	TCA		528
Tyr	Val	Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	His	Leu	Ser	Val	Leu	Arg	Asp	Val	Ser		
			165						170						175		
GTG	TTT	GGA	CAA	AGG	TGG	GGA	TTT	GAT	GCC	GCG	ACT	ATC	AAT	AGT	CGT		576
Val	Phe	Gly	Gln	Arg	Trp	Gly	Phe	Asp	Ala	Ala	Thr	Ile	Asn	Ser	Arg		
			180					185					190				
TAT	AAT	GAT	TTA	ACT	AGG	CTT	ATT	GGC	AAC	TAT	ACA	GAT	TAT	GCT	GTA		624
Tyr	Asn	Asp	Leu	Thr	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Tyr	Thr	Asp	Tyr	Ala	Val		
		195					200					205					
CGC	TGG	TAC	AAT	ACG	GGA	TTA	GAA	CGT	GTA	TGG	GGA	CCG	GAT	TCT	AGA		672
Arg	Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Glu	Arg	Val	Trp	Gly	Pro	Asp	Ser	Arg		
	210					215					220						
GAT	TGG	GTA	AGG	TAT	AAT	CAA	TTT	AGA	AGA	GAA	TTA	ACA	CTA	ACT	GTA		720
Asp	Trp	Val	Arg	Tyr	Asn	Gln	Phe	Arg	Arg	Glu	Leu	Thr	Leu	Thr	Val		
	225				230					235					240		
TTA	GAT	ATC	GTT	GCT	CTG	TTC	CCG	AAT	TAT	GAT	AGT	AGA	AGA	TAT	CCA		768
Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp	Ser	Arg	Arg	Tyr	Pro		
			245					250						255			
ATT	CGA	ACA	GTT	TCC	CAA	TTA	ACA	AGA	GAA	ATT	TAT	ACA	AAC	CCA	GTA		816
Ile	Arg	Thr	Val	Ser	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Ile	Tyr	Thr	Asn	Pro	Val		
			260					265					270				
TTA	GAA	AAT	TTT	GAT	GGT	AGT	TTT	CGA	GGC	TCG	GCT	CAG	GGC	ATA	GAA		864
Leu	Glu	Asn	Phe	Asp	Gly	Ser	Phe	Arg	Gly	Ser	Ala	Gln	Gly	Ile	Glu		
		275					280					285					
AGA	AGT	ATT	AGG	AGT	CCA	CAT	TTG	ATG	GAT	ATA	CTT	AAC	AGT	ATA	ACC		912
Arg	Ser	Ile	Arg	Ser	Pro	His	Leu	Met	Asp	Ile	Leu	Asn	Ser	Ile	Thr		

DE 697 30 730 T2 2005.09.22

290				295				300								
ATC	TAT	ACG	GAT	GCT	CAT	AGG	GGT	TAT	TAT	TAT	TGG	TCA	GGG	CAT	CAA	960
Ile	Tyr	Thr	Asp	Ala	His	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Gly	His	Gln	
305					310					315					320	
ATA	ATG	GCT	TCT	CCT	GTA	GGG	TTT	TCG	GGG	CCA	GAA	TTC	ACT	TTT	CCG	1008
Ile	Met	Ala	Ser	Pro	Val	Gly	Phe	Ser	Gly	Pro	Glu	Phe	Thr	Phe	Pro	
				325						330					335	
CTA	TAT	GGA	ACT	ATG	GGA	AAT	GCA	GCT	CCA	CAA	CAA	CGT	ATT	GTT	GCT	1056
Leu	Tyr	Gly	Thr	Met	Gly	Asn	Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Arg	Ile	Val	Ala	
			340						345						350	
CAA	CTA	GGT	CAG	GGC	GTG	TAT	AGA	ACA	TTA	TCG	TCC	ACT	TTA	TAT	AGA	1104
Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Val	Tyr	Arg	Thr	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Tyr	Arg	
		355					360								365	
AGA	CCT	TTT	AAT	ATA	GGG	ATA	AAT	AAT	CAA	CAA	CTA	TCT	GTT	CTT	GAC	1152
Arg	Pro	Phe	Asn	Ile	Gly	Ile	Asn	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser	Val	Leu	Asp	
	370						375								380	
GGG	ACA	GAA	TTT	GCT	TAT	GGA	ACC	TCC	TCA	AAT	TTG	CCA	TCC	GCT	GTA	1200
Gly	Thr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asn	Leu	Pro	Ser	Ala	Val	
385					390					395					400	
TAC	AGA	AAA	AGC	GGA	ACG	GTA	GAT	TCG	CTG	GAT	GAA	ATA	CCG	CCA	CAG	1248
Tyr	Arg	Lys	Ser	Gly	Thr	Val	Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Ile	Pro	Pro	Gln	
				405						410					415	
AAT	AAC	AAC	GTG	CCA	CCT	AGG	CAA	GGA	TTT	AGT	CAT	CGA	TTA	AGC	CAT	1296
Asn	Asn	Asn	Val	Pro	Pro	Arg	Gln	Gly	Phe	Ser	His	Arg	Leu	Ser	His	
			420							425					430	
GTT	TCA	ATG	TTT	CGT	TCA	GGC	TTT	AGT	AAT	AGT	AGT	GTA	AGT	ATA	ATA	1344
Val	Ser	Met	Phe	Arg	Ser	Gly	Phe	Ser	Asn	Ser	Ser	Val	Ser	Ile	Ile	
			435												445	
AGA	GCT	CCA	ATG	TTT	TCT	TGG	ACG	CAC	CGT	AGT	GCA	ACC	CCT	ACA	AAT	1392
Arg	Ala	Pro	Met	Phe	Ser	Trp	Thr	His	Arg	Ser	Ala	Thr	Pro	Thr	Asn	
	450														460	
ACA	ATT	GAT	CCG	GAG	AGG	ATT	ACT	CAA	ATA	CCA	TTG	GTA	AAA	GCA	CAT	1440
Thr	Ile	Asp	Pro	Glu	Arg	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	His	
465						470					475				480	
ACA	CTT	CAG	TCA	GGT	ACT	ACT	GTT	GTA	AGA	GGG	CCC	GGG	TTT	ACG	GGA	1488
Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Val	Arg	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	
				485						490					495	
GGA	GAT	ATT	CTT	CGA	CGA	ACA	AGT	GGA	GGA	CCA	TTT	GCT	TAT	ACT	ATT	1536
Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Ala	Tyr	Thr	Ile	
				500						505					510	
GTT	AAT	ATA	AAT	GGG	CAA	TTA	CCC	CAA	AGG	TAT	CGT	GCA	AGA	ATA	CGC	1584
Val	Asn	Ile	Asn	Gly	Gln	Leu	Pro	Gln	Arg	Tyr	Arg	Ala	Arg	Ile	Arg	
				515						520					525	

TAT GCC TCT ACT ACA AAT CTA AGA ATT TAC GTA ACG GTT GCA GGT GAA	1632
Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu	
530 535 540	
CGG ATT TTT GCT GGT CAA TTT AAC AAA ACA ATG GAT ACC GGT GAC CCA	1680
Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro	
545 550 555 560	
TTA ACA TTC CAA TCT TTT AGT TAC GCA ACT ATT AAT ACA GCT TTT ACA	1728
Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr	
565 570 575	
TTC CCA ATG AGC CAG AGT AGT TTC ACA GTA GGT GCT GAT ACT TTT AGT	1776
Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser	
580 585 590	
TCA GGG AAT GAA GTT TAT ATA GAC AGA TTT GAA TTG ATT CCA GTT ACT	1824
Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr	
595 600 605	
GCA ACA TTT GAA GCA GAA TAT GAT TTA GAA AGA GCA CAA AAG GCG GTG	1872
Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val	
610 615 620	
AAT GCG CTG TTT ACT TCT ATA AAC CAA ATA GGG ATA AAA ACA GAT GTG	1920
Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ile Asn Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Val	
625 630 635 640	
ACG GAT TAT CAT ATT GAT CAA GTA TCC AAT TTA GTG GAT TGT TTA TCA	1968
Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Asp Cys Leu Ser	
645 650 655	
GAT GAA TTT TGT CTG GAT GAA AAG CGA GAA TTG TCC GAG AAA GTC AAA	2016
Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys	
660 665 670	
CAT GCG AAG CGA CTC AGT GAT GAG CGG AAT TTA CTT CAA GAT CCA AAC	2064
His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn	
675 680 685	
TTC AAA GGC ATC AAT AGG CAA CTA GAC CGT GGT TGG AGA GGA AGT ACG	2112
Phe Lys Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr	
690 695 700	
GAT ATT ACC ATC CAA AGA GGA GAT GAC GTA TTC AAA GAA AAT TAT GTC	2160
Asp Ile Thr Ile Gln Arg Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val	
705 710 715 720	
ACA CTA CCA GGT ACC TTT GAT GAG TGC TAT CCA ACA TAT TTG TAT CAA	2208
Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln	
725 730 735	
AAA ATC GAT GAA TCA AAA TTA AAA GCC TTT ACC CGT TAT CAA TTA AGA	2256
Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Phe Thr Arg Tyr Gln Leu Arg	
740 745 750	

GGG TAT ATC GAA GAT AGT CAA GAC TTA GAA ATC TAT TTA ATT CGC TAC	2304
Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr	
755 760 765	
AAT GCA AAA CAT GAA ACA GTA AAT GTG CCA GGT ACG GGT TCC TTA TGG	2352
Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp	
770 775 780	
CCG CTT TCA GCC CAA AGT CCA ATC GGA AAG TGT GGA GAG CCG AAT CGA	2400
Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg	
785 790 795 800	
TGC GCG CCA CAC CTT GAA TGG AAT CCT GAC TTA GAT TGT TCG TGT AGG	2448
Cys Ala Pro His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg	
805 810 815	
GAT GGA GAA AAG TGT GCC CAT CAT TCG CAT CAT TTC TCC TTA GAC ATT	2496
Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile	
820 825 830	
GAT GTA GGA TGT ACA GAC TTA AAT GAG GAC CTA GGT GTA TGG GTG ATC	2544
Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile	
835 840 845	
TTT AAG ATT AAG ACG CAA GAT GGG CAC GCA AGA CTA GGG AAT CTA GAG	2592
Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu	
850 855 860	
TTT CTC GAA GAG AAA CCA TTA GTA GGA GAA GCG CTA GCT CGT GTG AAA	2640
Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys	
865 870 875 880	
AGA GCG GAG AAA AAA TGG AGA GAC AAA CGT GAA AAA TTG GAA TGG GAA	2688
Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu	
885 890 895	
ACA AAT ATC GTT TAT AAA GAG GCA AAA GAA TCT GTA GAT GCT TTA TTT	2736
Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe	
900 905 910	
GTA AAC TCT CAA TAT GAT CAA TTA CAA GCG GAT ACG AAT ATT GCC ATG	2784
Val Asn Ser Gln Tyr Asp Gln Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met	
915 920 925	
ATT CAT GCG GCA GAT AAA CGT GTT CAT AGC ATT CGA GAA GCT TAT CTG	2832
Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu	
930 935 940	
CCT GAG CTG TCT GTG ATT CCG GGT GTC AAT GCG GCT ATT TTT GAA GAA	2880
Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu	
945 950 955 960	
TTA GAA GGG CGT ATT TTC ACT GCA TTC TCC CTA TAT GAT GCG AGA AAT	2928
Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn	
965 970 975	

GTC ATT AAA AAT GGT GAT TTT AAT AAT GGC TTA TCC TGC TGG AAC GTG Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val 980 985 990	2976
AAA GGG CAT GTA GAT GTA GAA GAA CAA AAC AAC CAA CGT TCG GTC CTT Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn Gln Arg Ser Val Leu 995 1000 1005	3024
GTT GTT CCG GAA TGG GAA GCA GAA GTG TCA CAA GAA GTT CGT GTC TGT Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys 1010 1015 1020	3072
CCG GGT CGT GGC TAT ATC CTT CGT GTC ACA GCG TAC AAG GAG GGA TAT Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr 1025 1030 1035 1040	3120
GGA GAA GGT TGC GTA ACC ATT CAT GAG ATC GAG AAC AAT ACA GAC GAA Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu 1045 1050 1055	3168
CTG AAG TTT AGC AAC TGC GTA GAA GAG GAA ATC TAT CCA AAT AAC ACG Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr 1060 1065 1070	3216
GTA ACG TGT AAT GAT TAT ACT GTA AAT CAA GAA GAA TAC GGA GGT GCG Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Val Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala 1075 1080 1085	3264
TAC ACT TCT CGT AAT CGA GGA TAT AAC GAA GCT CCT TCC GTA CCA GCT Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Val Pro Ala 1090 1095 1100	3312
GAT TAT GCG TCA GTC TAT GAA GAA AAA TCG TAT ACA GAT GGA CGA AGA Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Gly Arg Arg 1105 1110 1115 1120	3360
GAG AAT CCT TGT GAA TTT AAC AGA GGG TAT AGG GAT TAC ACG CCA CTA Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Leu 1125 1130 1135	3408
CCA GTT GGT TAT GTG ACA AAA GAA TTA GAA TAC TTC CCA GAA ACC GAT Pro Val Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp 1140 1145 1150	3456
AAG GTA TGG ATT GAG ATT GGA GAA ACG GAA GGA ACA TTT ATC GTG GAC Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp 1155 1160 1165	3504
AGC GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu 1170 1175	3531

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 1177 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
 1 5 10 15
 Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly
 20 25 30
 Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser
 35 40 45
 Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile
 50 55 60
 Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65 70 75 80
 Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala
 85 90 95
 Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu
 100 105 110
 Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
 115 120 125
 Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala
 130 135 140
 Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160
 Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser
 165 170 175
 Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg
 180 185 190
 Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp Tyr Ala Val
 195 200 205
 Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
 210 215 220
 Asp Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu Asp Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Arg Tyr Pro
 245 250 255
 Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val
 260 265 270

Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu
 275 280 285

Arg Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr
 290 295 300

Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln
 305 310 315 320

Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro
 325 330 335

Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala
 340 345 350

Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg
 355 360 365

Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp
 370 375 380

Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val
 385 390 395 400

Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln
 405 410 415

Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His
 420 425 430

Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile
 435 440 445

Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn
 450 455 460

Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His
 465 470 475 480

Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly
 485 490 495

Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile
 500 505 510

Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg
 515 520 525

Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu
 530 535 540

Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro
 545 550 555 560

Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr
 565 570 575

Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser
580 585 590
Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr
595 600 605
Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val
610 615 620
Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ile Asn Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Val
625 630 635 640
Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Asp Cys Leu Ser
645 650 655
Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys
660 665 670
His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn
675 680 685
Phe Lys Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr
690 695 700
Asp Ile Thr Ile Gln Arg Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val
705 710 715 720
Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln
725 730 735
Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Phe Thr Arg Tyr Gln Leu Arg
740 745 750
Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr
755 760 765
Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp
770 775 780
Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg
785 790 795 800
Cys Ala Pro His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg
805 810 815
Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile
820 825 830
Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile
835 840 845
Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu
850 855 860
Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys
865 870 875 880

Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu
 885 890 895

Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe
 900 905 910

Val Asn Ser Gln Tyr Asp Gln Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met
 915 920 925

Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu
 930 935 940

Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu
 945 950 955 960

Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn
 965 970 975

Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val
 980 985 990

Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn Gln Arg Ser Val Leu
 995 1000 1005

Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys
 1010 1015 1020

Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr
 1025 1030 1035 1040

Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu
 1045 1050 1055

Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr
 1060 1065 1070

Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Val Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala
 1075 1080 1085

Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Val Pro Ala
 1090 1095 1100

Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Gly Arg Arg
 1105 1110 1115 1120

Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Leu
 1125 1130 1135

Pro Val Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp
 1140 1145 1150

Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp
 1155 1160 1165

Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1170 1175

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 3531 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 1..3531

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC ATT CCT TAT AAT TGT TTA	48
Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu	
1 5 10 15	
AGT AAC CCT GAA GTA GAA GTA TTA GGT GGA GAA AGA ATA GAA ACT GGT	96
Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly	
20 25 30	
TAC ACC CCA ATC GAT ATT TCC TTG TCG CTA ACG CAA TTT CTT TTG AGT	144
Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser	
35 40 45	
GAA TTT GTT CCC GGT GCT GGA TTT GTG TTA GGA CTA GTT GAT ATA ATA	192
Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile	
50 55 60	
TGG GGA ATT TTT GGT CCC TCT CAA TGG GAC GCA TTT CTT GTA CAA ATT	240
Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile	
65 70 75 80	
GAA CAG TTA ATT AAC CAA AGA ATA GAA GAA TTC GCT AGG AAC CAA GCC	288
Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala	
85 90 95	
ATT TCT AGA TTA GAA GGA CTA AGC AAT CTT TAT CAA ATT TAC GCA GAA	336
Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu	
100 105 110	
TCT TTT AGA GAG TGG GAA GCA GAT CCT ACT AAT CCA GCA TTA AGA GAA	384
Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu	
115 120 125	
GAG ATG CGT ATT CAA TTC AAT GAC ATG AAC AGT GCC CTT ACA ACC GCT	432
Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala	
130 135 140	
ATT CCT CTT TTT GCA GTT CAA AAT TAT CAA GTT CCT CTT TTA TCA GTA	480
Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val	
145 150 155 160	
TAT GTT CAA GCT GCA AAT TTA CAT TTA TCA GTT TTG AGA GAT GTT TCA	528
Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser	

	165		170		175														
GTG TTT GGA CAA AGG TGG GGA TTT GAT GCC GCG ACT ATC AAT AGT CGT																			576
Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg																			
	180																		190
TAT AAT GAT TTA ACT AGG CTT ATT GGC AAC TAT ACA GAT TAT GCT GTA																			624
Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp Tyr Ala Val																			
	195																		205
CGC TGG TAC AAT ACG GGA TTA GAA CGT GTA TGG GGA CCG GAT TCT AGA																			672
Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg																			
	210																		220
GAT TGG GTA AGG TAT AAT CAA TTT AGA AGA GAA TTA ACA CTA ACT GTA																			720
Asp Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val																			
	225																		240
TTA GAT ATC GTT GCT CTG TTC CCG AAT TAT GAT AGT AGA AGA TAT CCA																			768
Leu Asp Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Arg Tyr Pro																			
	245																		255
ATT CGA ACA GTT TCC CAA TTA ACA AGA GAA ATT TAT ACA AAC CCA GTA																			816
Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val																			
	260																		270
TTA GAA AAT TTT GAT GGT AGT TTT CGA GGC TCG GCT CAG GGC ATA GAA																			864
Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu																			
	275																		285
AGA AGT ATT AGG AGT CCA CAT TTG ATG GAT ATA CTT AAC AGT ATA ACC																			912
Arg Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr																			
	290																		300
ATC TAT ACG GAT GCT CAT AGG GGT TAT TAT TAT TGG TCA GGG CAT CAA																			960
Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln																			
	305																		320
ATA ATG GCT TCT CCT GTA GGG TTT TCG GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG																			1008
Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro																			
	325																		335
CTA TAT GGA ACT ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CAA CGT ATT GTT GCT																			1056
Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala																			
	340																		350
CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT AGA ACA TTA TCG TCC ACT TTA TAT AGA																			1104
Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg																			
	355																		365
AGA CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA CTA TCT GTT CTT GAC																			1152
Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp																			
	370																		380
GGG ACA GAA TTT GCT TAT GGA ACC TCC TCA AAT TTG CCA TCC GCT GTA																			1200
Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val																			
	385																		400

TAC	AGA	AAA	AGC	GGA	ACG	GTA	GAT	TCG	CTG	GAT	GAA	ATA	CCG	CCA	CAG	1248
Tyr	Arg	Lys	Ser	Gly	Thr	Val	Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Ile	Pro	Pro	Gln	
				405					410						415	
AAT	AAC	AAC	GTG	CCA	CCT	AGG	CAA	GGA	TTT	AGT	CAT	CGA	TTA	AGC	CAT	1296
Asn	Asn	Asn	Val	Pro	Pro	Arg	Gln	Gly	Phe	Ser	His	Arg	Leu	Ser	His	
			420					425					430			
GTT	TCA	ATG	TTT	CGT	TCA	GGC	TTT	AGT	AAT	AGT	AGT	GTA	AGT	ATA	ATA	1344
Val	Ser	Met	Phe	Arg	Ser	Gly	Phe	Ser	Asn	Ser	Ser	Val	Ser	Ile	Ile	
		435					440					445				
AGA	GCT	CCA	ATG	TTT	TCT	TGG	ACG	CAC	CGT	AGT	GCA	ACC	CCT	ACA	AAT	1392
Arg	Ala	Pro	Met	Phe	Ser	Trp	Thr	His	Arg	Ser	Ala	Thr	Pro	Thr	Asn	
	450					455				460						
ACA	ATT	GAT	CCG	GAG	AGG	ATT	ACT	CAA	ATA	CCA	TTG	GTA	AAA	GCA	CAT	1440
Thr	Ile	Asp	Pro	Glu	Arg	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	His	
465					470				475						480	
ACA	CTT	CAG	TCA	GGT	ACT	ACT	GTT	GTA	AGA	GGG	CCC	GGG	TTT	ACG	GGA	1488
Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Val	Arg	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	
				485				490						495		
GGA	GAT	ATT	CTT	CGA	CGA	ACA	AGT	GGA	GGA	CCA	TTT	GCT	TAT	ACT	ATT	1536
Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Ala	Tyr	Thr	Ile	
			500					505					510			
GTT	AAT	ATA	AAT	GGG	CAA	TTA	CCC	CAA	AGG	TAT	CGT	GCA	AGA	ATA	CGC	1584
Val	Asn	Ile	Asn	Gly	Gln	Leu	Pro	Gln	Arg	Tyr	Arg	Ala	Arg	Ile	Arg	
		515				520						525				
TAT	GCC	TCT	ACT	ACA	AAT	CTA	AGA	ATT	TAC	GTA	ACG	GTT	GCA	GGT	GAA	1632
Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu	Arg	Ile	Tyr	Val	Thr	Val	Ala	Gly	Glu	
	530					535				540						
CGG	ATT	TTT	GCT	GGT	CAA	TTT	AAC	AAA	ACA	ATG	GAT	ACC	GGT	GAC	CCA	1680
Arg	Ile	Phe	Ala	Gly	Gln	Phe	Asn	Lys	Thr	Met	Asp	Thr	Gly	Asp	Pro	
545					550				555						560	
TTA	ACA	TTC	CAA	TCT	TTT	AGT	TAC	GCA	ACT	ATT	AAT	ACA	GCT	TTT	ACA	1728
Leu	Thr	Phe	Gln	Ser	Phe	Ser	Tyr	Ala	Thr	Ile	Asn	Thr	Ala	Phe	Thr	
			565					570					575			
TTC	CCA	ATG	AGC	CAG	AGT	AGT	TTC	ACA	GTA	GGT	GCT	GAT	ACT	TTT	AGT	1776
Phe	Pro	Met	Ser	Gln	Ser	Ser	Phe	Thr	Val	Gly	Ala	Asp	Thr	Phe	Ser	
			580					585					590			
TCA	GGG	AAT	GAA	GTT	TAT	ATA	GAC	AGA	TTT	GAA	TTG	ATT	CCA	GTT	ACT	1824
Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Tyr	Ile	Asp	Arg	Phe	Glu	Leu	Ile	Pro	Val	Thr	
		595				600						605				
GCA	ACA	CTC	GAG	GCT	GAA	TAT	AAT	CTG	GAA	AGA	GCG	CAG	AAG	GCG	GTG	1872
Ala	Thr	Leu	Glu	Ala	Glu	Tyr	Asn	Leu	Glu	Arg	Ala	Gln	Lys	Ala	Val	
	610					615					620					

AAT GCG CTG TTT ACG TCT ACA AAC CAA CTA GGG CTA AAA ACA AAT GTA	1920
Asn Ala Leu Phe Thr Ser Thr Asn Gln Leu Gly Leu Lys Thr Asn Val	
625 630 635 640	
ACG GAT TAT CAT ATT GAT CAA GTG TCC AAT TTA GTT ACG TAT TTA TCG	1968
Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Thr Tyr Leu Ser	
645 650 655	
GAT GAA TTT TGT CTG GAT GAA AAG CGA GAA TTG TCC GAG AAA GTC AAA	2016
Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys	
660 665 670	
CAT GCG AAG CGA CTC AGT GAT GAA CGC AAT TTA CTC CAA GAT TCA AAT	2064
His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Ser Asn	
675 680 685	
TTC AAA GAC ATT AAT AGG CAA CCA GAA CGT GGG TGG GGC GGA AGT ACA	2112
Phe Lys Asp Ile Asn Arg Gln Pro Glu Arg Gly Trp Gly Gly Ser Thr	
690 695 700	
GGG ATT ACC ATC CAA GGA GGG GAT GAC GTA TTT AAA GAA AAT TAC GTC	2160
Gly Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val	
705 710 715 720	
ACA CTA TCA GGT ACC TTT GAT GAG TGC TAT CCA ACA TAT TTG TAT CAA	2208
Thr Leu Ser Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln	
725 730 735	
AAA ATC GAT GAA TCA AAA TTA AAA GCC TTT ACC CGT TAT CAA TTA AGA	2256
Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Phe Thr Arg Tyr Gln Leu Arg	
740 745 750	
GGG TAT ATC GAA GAT AGT CAA GAC TTA GAA ATC TAT TTA ATT CGC TAC	2304
Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr	
755 760 765	
AAT GCA AAA CAT GAA ACA GTA AAT GTG CCA GGT ACG GGT TCC TTA TGG	2352
Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp	
770 775 780	
CCG CTT TCA GCC CAA AGT CCA ATC GGA AAG TGT GGA GAG CCG AAT CGA	2400
Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg	
785 790 795 800	
TGC GCG CCA CAC CTT GAA TGG AAT CCT GAC TTA GAT TGT TCG TGT AGG	2448
Cys Ala Pro His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg	
805 810 815	
GAT GGA GAA AAG TGT GCC CAT CAT TCG CAT CAT TTC TCC TTA GAC ATT	2496
Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile	
820 825 830	
GAT GTA GGA TGT ACA GAC TTA AAT GAG GAC CTA GGT GTA TGG GTG ATC	2544
Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile	
835 840 845	
TTT AAG ATT AAG ACG CAA GAT GGG CAC GCA AGA CTA GGG AAT CTA GAG	2592

Phe	Lys	Ile	Lys	Thr	Gln	Asp	Gly	His	Ala	Arg	Leu	Gly	Asn	Leu	Glu		
850						855					860						
TTT	CTC	GAA	GAG	AAA	CCA	TTA	GTA	GGA	GAA	GCG	CTA	GCT	CGT	GTG	AAA	2640	
Phe	Leu	Glu	Glu	Lys	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Val	Lys		
865					870					875					880		
AGA	GCG	GAG	AAA	AAA	TGG	AGA	GAC	AAA	CGT	GAA	AAA	TTG	GAA	TGG	GAA	2688	
Arg	Ala	Glu	Lys	Lys	Trp	Arg	Asp	Lys	Arg	Glu	Lys	Leu	Glu	Trp	Glu		
				885					890					895			
ACA	AAT	ATC	GTT	TAT	AAA	GAG	GCA	AAA	GAA	TCT	GTA	GAT	GCT	TTA	TTT	2736	
Thr	Asn	Ile	Val	Tyr	Lys	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	Ala	Leu	Phe		
			900					905					910				
GTA	AAC	TCT	CAA	TAT	GAT	CAA	TTA	CAA	GCG	GAT	ACG	AAT	ATT	GCC	ATG	2784	
Val	Asn	Ser	Gln	Tyr	Asp	Gln	Leu	Gln	Ala	Asp	Thr	Asn	Ile	Ala	Met		
		915					920					925					
ATT	CAT	GCG	GCA	GAT	AAA	CGT	GTT	CAT	AGC	ATT	CGA	GAA	GCT	TAT	CTG	2832	
Ile	His	Ala	Ala	Asp	Lys	Arg	Val	His	Ser	Ile	Arg	Glu	Ala	Tyr	Leu		
	930					935				940							
CCT	GAG	CTG	TCT	GTG	ATT	CCG	GGT	GTC	AAT	GCG	GCT	ATT	TTT	GAA	GAA	2880	
Pro	Glu	Leu	Ser	Val	Ile	Pro	Gly	Val	Asn	Ala	Ala	Ile	Phe	Glu	Glu		
945					950					955					960		
TTA	GAA	GGG	CGT	ATT	TTC	ACT	GCA	TTC	TCC	CTA	TAT	GAT	GCG	AGA	AAT	2928	
Leu	Glu	Gly	Arg	Ile	Phe	Thr	Ala	Phe	Ser	Leu	Tyr	Asp	Ala	Arg	Asn		
				965					970					975			
GTC	ATT	AAA	AAT	GGT	GAT	TTT	AAT	AAT	GGC	TTA	TCC	TGC	TGG	AAC	GTG	2976	
Val	Ile	Lys	Asn	Gly	Asp	Phe	Asn	Asn	Gly	Leu	Ser	Cys	Trp	Asn	Val		
			980					985					990				
AAA	GGG	CAT	GTA	GAT	GTA	GAA	GAA	CAA	AAC	AAC	CAA	CGT	TCG	GTC	CTT	3024	
Lys	Gly	His	Val	Asp	Val	Glu	Glu	Gln	Asn	Asn	Gln	Arg	Ser	Val	Leu		
		995					1000					1005					
GTT	GTT	CCG	GAA	TGG	GAA	GCA	GAA	GTG	TCA	CAA	GAA	GTT	CGT	GTC	TGT	3072	
Val	Val	Pro	Glu	Trp	Glu	Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Glu	Val	Arg	Val	Cys		
	1010					1015					1020						
CCG	GGT	CGT	GGC	TAT	ATC	CTT	CGT	GTC	ACA	GCG	TAC	AAG	GAG	GGA	TAT	3120	
Pro	Gly	Arg	Gly	Tyr	Ile	Leu	Arg	Val	Thr	Ala	Tyr	Lys	Glu	Gly	Tyr		
1025					1030					1035					1040		
GGA	GAA	GGT	TGC	GTA	ACC	ATT	CAT	GAG	ATC	GAG	AAC	AAT	ACA	GAC	GAA	3168	
Gly	Glu	Gly	Cys	Val	Thr	Ile	His	Glu	Ile	Glu	Asn	Asn	Thr	Asp	Glu		
				1045				1050						1055			
CTG	AAG	TTT	AGC	AAC	TGC	GTA	GAA	GAG	GAA	ATC	TAT	CCA	AAT	AAC	ACG	3216	
Leu	Lys	Phe	Ser	Asn	Cys	Val	Glu	Glu	Glu	Ile	Tyr	Pro	Asn	Asn	Thr		
		1060					1065						1070				
GTA	ACG	TGT	AAT	GAT	TAT	ACT	GTA	AAT	CAA	GAA	GAA	TAC	GGA	GGT	GCG	3264	
Val	Thr	Cys	Asn	Asp	Tyr	Thr	Val	Asn	Gln	Glu	Glu	Tyr	Gly	Gly	Ala		

1075	1080	1085	
TAC ACT TCT CGT AAT CGA GGA TAT AAC GAA GCT CCT TCC GTA CCA GCT			3312
Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Val Pro Ala			
1090	1095	1100	
GAT TAT GCG TCA GTC TAT GAA GAA AAA TCG TAT ACA GAT GGA CGA AGA			3360
Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Gly Arg Arg			
1105	1110	1115	1120
GAG AAT CCT TGT GAA TTT AAC AGA GGG TAT AGG GAT TAC ACG CCA CTA			3408
Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Leu			
1125	1130	1135	
CCA GTT GGT TAT GTG ACA AAA GAA TTA GAA TAC TTC CCA GAA ACC GAT			3456
Pro Val Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp			
1140	1145	1150	
AAG GTA TGG ATT GAG ATT GGA GAA ACG GAA GGA ACA TTT ATC GTG GAC			3504
Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp			
1155	1160	1165	
AGC GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA			3531
Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu			
1170	1175		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1177 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu			
1	5	10	15
Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly			
20	25	30	
Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser			
35	40	45	
Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile			
50	55	60	
Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile			
65	70	75	80
Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala			
85	90	95	
Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu			
100	105	110	

Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
 115 120 125

Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala
 130 135 140

Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160

Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser
 165 170 175

Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg
 180 185 190

Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp Tyr Ala Val
 195 200 205

Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
 210 215 220

Asp Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240

Leu Asp Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Arg Tyr Pro
 245 250 255

Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val
 260 265 270

Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu
 275 280 285

Arg Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr
 290 295 300

Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln
 305 310 315 320

Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro
 325 330 335

Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala
 340 345 350

Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg
 355 360 365

Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp
 370 375 380

Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val
 385 390 395 400

Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln
 405 410 415

Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His
 420 425 430

Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile
 435 440 445

Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn
 450 455 460

Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His
 465 470 475 480

Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly
 485 490 495

Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile
 500 505 510

Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg
 515 520 525

Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu
 530 535 540

Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro
 545 550 555 560

Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr
 565 570 575

Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser
 580 585 590

Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr
 595 600 605

Ala Thr Leu Glu Ala Glu Tyr Asn Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val
 610 615 620

Asn Ala Leu Phe Thr Ser Thr Asn Gln Leu Gly Leu Lys Thr Asn Val
 625 630 635 640

Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Thr Tyr Leu Ser
 645 650 655

Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys
 660 665 670

His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Ser Asn
 675 680 685

Phe Lys Asp Ile Asn Arg Gln Pro Glu Arg Gly Trp Gly Gly Ser Thr
 690 695 700

Gly Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val
 705 710 715 720

Thr Leu Ser Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln
 725 730 735
 Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Phe Thr Arg Tyr Gln Leu Arg
 740 745 750
 Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr
 755 760 765
 Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp
 770 775 780
 Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg
 785 790 795 800
 Cys Ala Pro His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg
 805 810 815
 Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile
 820 825 830
 Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile
 835 840 845
 Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu
 850 855 860
 Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys
 865 870 875 880
 Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu
 885 890 895
 Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe
 900 905 910
 Val Asn Ser Gln Tyr Asp Gln Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met
 915 920 925
 Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu
 930 935 940
 Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu
 945 950 955 960
 Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn
 965 970 975
 Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val
 980 985 990
 Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn Gln Arg Ser Val Leu
 995 1000 1005
 Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys
 1010 1015 1020

Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr
 1025 1030 1035 1040

Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu
 1045 1050 1055

Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr
 1060 1065 1070

Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Val Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala
 1075 1080 1085

Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Val Pro Ala
 1090 1095 1100

Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Gly Arg Arg
 1105 1110 1115 1120

Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Leu
 1125 1130 1135

Pro Val Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp
 1140 1145 1150

Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp
 1155 1160 1165

Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1170 1175

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 3531 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 1..3531

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC ATT CCT TAT AAT TGT TTA	48
Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu	
1 5 10 15	
AGT AAC CCT GAA GTA GAA GTA TTA GGT GGA GAA AGA ATA GAA ACT GGT	96
Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly	
20 25 30	
TAC ACC CCA ATC GAT ATT TCC TTG TCG CTA ACG CAA TTT CTT TTG AGT	144
Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser	
35 40 45	

GAA TTT GTT CCC GGT GCT GGA TTT GTG TTA GGA CTA GTT GAT ATA ATA Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile 50 55 60	192
TGG GGA ATT TTT GGT CCC TCT CAA TGG GAC GCA TTT CTT GTA CAA ATT Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile 65 70 75 80	240
GAA CAG TTA ATT AAC CAA AGA ATA GAA GAA TTC GCT AGG AAC CAA GCC Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala 85 90 95	288
ATT TCT AGA TTA GAA GGA CTA AGC AAT CTT TAT CAA ATT TAC GCA GAA Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu 100 105 110	336
TCT TTT AGA GAG TGG GAA GCA GAT CCT ACT AAT CCA GCA TTA AGA GAA Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu 115 120 125	384
GAG ATG CGT ATT CAA TTC AAT GAC ATG AAC AGT GCC CTT ACA ACC GCT Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala 130 135 140	432
ATT CCT CTT TTT GCA GTT CAA AAT TAT CAA GTT CCT CTT TTA TCA GTA Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val 145 150 155 160	480
TAT GTT CAA GCT GCA AAT TTA CAT TTA TCA GTT TTG AGA GAT GTT TCA Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser 165 170 175	528
GTG TTT GGA CAA AGG TGG GGA TTT GAT GCC GCG ACT ATC AAT AGT CGT Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg 180 185 190	576
TAT AAT GAT TTA ACT AGG CTT ATT GGC AAC TAT ACA GAT CAT GCT GTA Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val 195 200 205	624
CGC TGG TAC AAT ACG GGA TTA GAG CGT GTA TGG GGA CCG GAT TCT AGA Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg 210 215 220	672
GAT TGG ATA AGA TAT AAT CAA TTT AGA AGA GAA TTA ACA CTA ACT GTA Asp Trp Ile Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val 225 230 235 240	720
TTA GAT ATC GTT TCT CTA TTT CCG AAC TAT GAT AGT AGA ACG TAT CCA Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Thr Tyr Pro 245 250 255	768
ATT CGA ACA GTT TCC CAA TTA ACA AGA GAA ATT TAT ACA AAC CCA GTA Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val 260 265 270	816

TTA GAA AAT TTT GAT GGT AGT TTT CGA GGC TCG GCT CAG GGC ATA GAA Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu 275 280 285	864
GGA AGT ATT AGG AGT CCA CAT TTG ATG GAT ATA CTT AAC AGT ATA ACC Gly Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr 290 295 300	912
ATC TAT ACG GAT GCT CAT AGA GGA GAA TAT TAT TGG TCA GGG CAT CAA Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Glu Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln 305 310 315 320	960
ATA ATG GCT TCT CCT GTA GGG TTT TCG GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro 325 330 335	1008
CTA TAT GGA ACT ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CAA CGT ATT GTT GCT Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala 340 345 350	1056
CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT AGA ACA TTA TCG TCC ACT TTA TAT AGA Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg 355 360 365	1104
AGA CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA CTA TCT GTT CTT GAC Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp 370 375 380	1152
GGG ACA GAA TTT GCT TAT GGA ACC TCC TCA AAT TTG CCA TCC GCT GTA Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val 385 390 395 400	1200
TAC AGA AAA AGC GGA ACG GTA GAT TCG CTG GAT GAA ATA CCG CCA CAG Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln 405 410 415	1248
AAT AAC AAC GTG CCA CCT AGG CAA GGA TTT AGT CAT CGA TTA AGC CAT Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His 420 425 430	1296
GTT TCA ATG TTT CGT TCA GGC TTT AGT AAT AGT AGT GTA AGT ATA ATA Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile 435 440 445	1344
AGA GCT CCA ATG TTT TCT TGG ACG CAC CGT AGT GCA ACC CCT ACA AAT Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn 450 455 460	1392
ACA ATT GAT CCG GAG AGG ATT ACT CAA ATA CCA TTG GTA AAA GCA CAT Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His 465 470 475 480	1440
ACA CTT CAG TCA GGT ACT ACT GTT GTA AGA GGG CCC GGG TTT ACG GGA Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly 485 490 495	1488
GGA GAT ATT CTT CGA CGA ACA AGT GGA GGA CCA TTT GCT TAT ACT ATT	1536

Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile	
500	505 510
GTT AAT ATA AAT GGG CAA TTA CCC CAA AGG TAT CGT GCA AGA ATA CGC	1584
Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg	
515	520 525
TAT GCC TCT ACT ACA AAT CTA AGA ATT TAC GTA ACG GTT GCA GGT GAA	1632
Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu	
530	535 540
CGG ATT TTT GCT GGT CAA TTT AAC AAA ACA ATG GAT ACC GGT GAC CCA	1680
Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro	
545	550 555 560
TTA ACA TTC CAA TCT TTT AGT TAC GCA ACT ATT AAT ACA GCT TTT ACA	1728
Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr	
565	570 575
TTC CCA ATG AGC CAG AGT AGT TTC ACA GTA GGT GCT GAT ACT TTT AGT	1776
Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser	
580	585 590
TCA GGG AAT GAA GTT TAT ATA GAC AGA TTT GAA TTG ATT CCA GTT ACT	1824
Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr	
595	600 605
GCA ACA TTT GAA GCA GAA TAT GAT TTA GAA AGA GCA CAA AAG GCG GTG	1872
Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val	
610	615 620
AAT GCG CTG TTT ACT TCT ATA AAC CAA ATA GGG ATA AAA ACA GAT GTG	1920
Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ile Asn Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Val	
625	630 635 640
ACG GAT TAT CAT ATT GAT CAA GTA TCC AAT TTA GTG GAT TGT TTA TCA	1968
Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Asp Cys Leu Ser	
645	650 655
GAT GAA TTT TGT CTG GAT GAA AAG CGA GAA TTG TCC GAG AAA GTC AAA	2016
Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys	
660	665 670
CAT GCG AAG CGA CTC AGT GAT GAG CGG AAT TTA CTT CAA GAT CCA AAC	2064
His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn	
675	680 685
TTC AAA GGC ATC AAT AGG CAA CTA GAC CGT GGT TGG AGA GGA AGT ACG	2112
Phe Lys Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr	
690	695 700
GAT ATT ACC ATC CAA AGA GGA GAT GAC GTA TTC AAA GAA AAT TAT GTC	2160
Asp Ile Thr Ile Gln Arg Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val	
705	710 715 720
ACA CTA CCA GGT ACC TTT GAT GAG TGC TAT CCA ACA TAT TTG TAT CAA	2208
Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln	

AAA ATC GAT GAA TCA AAA TTA AAA GCC TTT ACC CGT TAT CAA TTA AGA	725	730	735	2256
Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Phe Thr Arg Tyr Gln Leu Arg	740	745	750	
GGG TAT ATC GAA GAT AGT CAA GAC TTA GAA ATC TAT TTA ATT CGC TAC	755	760	765	2304
Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr				
AAT GCA AAA CAT GAA ACA GTA AAT GTG CCA GGT ACG GGT TCC TTA TGG	770	775	780	2352
Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp				
CCG CTT TCA GCC CAA AGT CCA ATC GGA AAG TGT GGA GAG CCG AAT CGA	785	790	795	2400
Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg			800	
TGC GCG CCA CAC CTT GAA TGG AAT CCT GAC TTA GAT TGT TCG TGT AGG	805	810	815	2448
Cys Ala Pro His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg				
GAT GGA GAA AAG TGT GCC CAT CAT TCG CAT CAT TTC TCC TTA GAC ATT	820	825	830	2496
Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile				
GAT GTA GGA TGT ACA GAC TTA AAT GAG GAC CTA GGT GTA TGG GTG ATC	835	840	845	2544
Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile				
TTT AAG ATT AAG ACG CAA GAT GGG CAC GCA AGA CTA GGG AAT CTA GAG	850	855	860	2592
Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu				
TTT CTC GAA GAG AAA CCA TTA GTA GGA GAA GCG CTA GCT CGT GTG AAA	865	870	875	2640
Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys			880	
AGA GCG GAG AAA AAA TGG AGA GAC AAA CGT GAA AAA TTG GAA TGG GAA	885	890	895	2688
Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu				
ACA AAT ATC GTT TAT AAA GAG GCA AAA GAA TCT GTA GAT GCT TTA TTT	900	905	910	2736
Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe				
GTA AAC TCT CAA TAT GAT CAA TTA CAA GCG GAT ACG AAT ATT GCC ATG	915	920	925	2784
Val Asn Ser Gln Tyr Asp Gln Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met				
ATT CAT GCG GCA GAT AAA CGT GTT CAT AGC ATT CGA GAA GCT TAT CTG	930	935	940	2832
Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu				
CCT GAG CTG TCT GTG ATT CCG GGT GTC AAT GCG GCT ATT TTT GAA GAA	945	950	955	2880
Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu			960	

TTA GAA GGG CGT ATT TTC ACT GCA TTC TCC CTA TAT GAT GCG AGA AAT	2928
Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn	
965 970 975	
GTC ATT AAA AAT GGT GAT TTT AAT AAT GGC TTA TCC TGC TGG AAC GTG	2976
Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val	
980 985 990	
AAA GGG CAT GTA GAT GTA GAA GAA CAA AAC AAC CAA CGT TCG GTC CTT	3024
Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn Gln Arg Ser Val Leu	
995 1000 1005	
GTT GTT CCG GAA TGG GAA GCA GAA GTG TCA CAA GAA GTT CGT GTC TGT	3072
Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys	
1010 1015 1020	
CCG GGT CGT GGC TAT ATC CTT CGT GTC ACA GCG TAC AAG GAG GGA TAT	3120
Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr	
1025 1030 1035 1040	
GGA GAA GGT TGC GTA ACC ATT CAT GAG ATC GAG AAC AAT ACA GAC GAA	3168
Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu	
1045 1050 1055	
CTG AAG TTT AGC AAC TGC GTA GAA GAG GAA ATC TAT CCA AAT AAC ACG	3216
Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr	
1060 1065 1070	
GTA ACG TGT AAT GAT TAT ACT GTA AAT CAA GAA GAA TAC GGA GGT GCG	3264
Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Val Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala	
1075 1080 1085	
TAC ACT TCT CGT AAT CGA GGA TAT AAC GAA GCT CCT TCC GTA CCA GCT	3312
Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Val Pro Ala	
1090 1095 1100	
GAT TAT GCG TCA GTC TAT GAA GAA AAA TCG TAT ACA GAT GGA CGA AGA	3360
Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Gly Arg Arg	
1105 1110 1115 1120	
GAG AAT CCT TGT GAA TTT AAC AGA GGG TAT AGG GAT TAC ACG CCA CTA	3408
Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Leu	
1125 1130 1135	
CCA GTT GGT TAT GTG ACA AAA GAA TTA GAA TAC TTC CCA GAA ACC GAT	3456
Pro Val Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp	
1140 1145 1150	
AAG GTA TGG ATT GAG ATT GGA GAA ACG GAA GGA ACA TTT ATC GTG GAC	3504
Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp	
1155 1160 1165	
AGC GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA	3531
Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu	
1170 1175	

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1177 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

```

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
 1           5           10           15

Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly
          20           25           30

Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser
          35           40           45

Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile
 50           55           60

Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65           70           75           80

Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala
          85           90           95

Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu
          100          105          110

Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
          115          120          125

Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala
          130          135          140

Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
          145          150          155          160

Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser
          165          170          175

Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg
          180          185          190

Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val
          195          200          205

Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
          210          215          220

Asp Trp Ile Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
          225          230          235          240

Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Thr Tyr Pro

```

	245		250		255
Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val	260		265		270
Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu	275		280		285
Gly Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr	290		295		300
Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Glu Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln	305		310		315
Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro	325		330		335
Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala	340		345		350
Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg	355		360		365
Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp	370		375		380
Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val	385		390		395
Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln	405		410		415
Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His	420		425		430
Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile	435		440		445
Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn	450		455		460
Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His	465		470		475
Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly	485		490		495
Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile	500		505		510
Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg	515		520		525
Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu	530		535		540
Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro					

545					550					555					560
Leu	Thr	Phe	Gln	Ser	Phe	Ser	Tyr	Ala	Thr	Ile	Asn	Thr	Ala	Phe	Thr
				565					570					575	
Phe	Pro	Met	Ser	Gln	Ser	Ser	Phe	Thr	Val	Gly	Ala	Asp	Thr	Phe	Ser
			580					585					590		
Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Tyr	Ile	Asp	Arg	Phe	Glu	Leu	Ile	Pro	Val	Thr
		595					600					605			
Ala	Thr	Phe	Glu	Ala	Glu	Tyr	Asp	Leu	Glu	Arg	Ala	Gln	Lys	Ala	Val
	610					615					620				
Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Ile	Asn	Gln	Ile	Gly	Ile	Lys	Thr	Asp	Val
625					630					635					640
Thr	Asp	Tyr	His	Ile	Asp	Gln	Val	Ser	Asn	Leu	Val	Asp	Cys	Leu	Ser
				645					650					655	
Asp	Glu	Phe	Cys	Leu	Asp	Glu	Lys	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Lys
			660					665					670		
His	Ala	Lys	Arg	Leu	Ser	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Asn
		675					680					685			
Phe	Lys	Gly	Ile	Asn	Arg	Gln	Leu	Asp	Arg	Gly	Trp	Arg	Gly	Ser	Thr
		690				695					700				
Asp	Ile	Thr	Ile	Gln	Arg	Gly	Asp	Asp	Val	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Val
705					710					715					720
Thr	Leu	Pro	Gly	Thr	Phe	Asp	Glu	Cys	Tyr	Pro	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Gln
				725					730					735	
Lys	Ile	Asp	Glu	Ser	Lys	Leu	Lys	Ala	Phe	Thr	Arg	Tyr	Gln	Leu	Arg
			740					745					750		
Gly	Tyr	Ile	Glu	Asp	Ser	Gln	Asp	Leu	Glu	Ile	Tyr	Leu	Ile	Arg	Tyr
		755					760					765			
Asn	Ala	Lys	His	Glu	Thr	Val	Asn	Val	Pro	Gly	Thr	Gly	Ser	Leu	Trp
				770			775					780			
Pro	Leu	Ser	Ala	Gln	Ser	Pro	Ile	Gly	Lys	Cys	Gly	Glu	Pro	Asn	Arg
785					790					795					800
Cys	Ala	Pro	His	Leu	Glu	Trp	Asn	Pro	Asp	Leu	Asp	Cys	Ser	Cys	Arg
				805					810					815	
Asp	Gly	Glu	Lys	Cys	Ala	His	His	Ser	His	His	Phe	Ser	Leu	Asp	Ile
			820					825					830		
Asp	Val	Gly	Cys	Thr	Asp	Leu	Asn	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Trp	Val	Ile
		835					840					845			
Phe	Lys	Ile	Lys	Thr	Gln	Asp	Gly	His	Ala	Arg	Leu	Gly	Asn	Leu	Glu

850					855					860					
Phe	Leu	Glu	Glu	Lys	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Val	Lys
865					870					875					880
Arg	Ala	Glu	Lys	Lys	Trp	Arg	Asp	Lys	Arg	Glu	Lys	Leu	Glu	Trp	Glu
				885					890					895	
Thr	Asn	Ile	Val	Tyr	Lys	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	Ala	Leu	Phe
			900					905					910		
Val	Asn	Ser	Gln	Tyr	Asp	Gln	Leu	Gln	Ala	Asp	Thr	Asn	Ile	Ala	Met
		915					920					925			
Ile	His	Ala	Ala	Asp	Lys	Arg	Val	His	Ser	Ile	Arg	Glu	Ala	Tyr	Leu
	930					935					940				
Pro	Glu	Leu	Ser	Val	Ile	Pro	Gly	Val	Asn	Ala	Ala	Ile	Phe	Glu	Glu
945					950					955					960
Leu	Glu	Gly	Arg	Ile	Phe	Thr	Ala	Phe	Ser	Leu	Tyr	Asp	Ala	Arg	Asn
				965					970					975	
Val	Ile	Lys	Asn	Gly	Asp	Phe	Asn	Asn	Gly	Leu	Ser	Cys	Trp	Asn	Val
			980					985					990		
Lys	Gly	His	Val	Asp	Val	Glu	Glu	Gln	Asn	Asn	Gln	Arg	Ser	Val	Leu
		995					1000					1005			
Val	Val	Pro	Glu	Trp	Glu	Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Glu	Val	Arg	Val	Cys
	1010					1015					1020				
Pro	Gly	Arg	Gly	Tyr	Ile	Leu	Arg	Val	Thr	Ala	Tyr	Lys	Glu	Gly	Tyr
1025					1030					1035					1040
Gly	Glu	Gly	Cys	Val	Thr	Ile	His	Glu	Ile	Glu	Asn	Asn	Thr	Asp	Glu
				1045				1050						1055	
Leu	Lys	Phe	Ser	Asn	Cys	Val	Glu	Glu	Glu	Ile	Tyr	Pro	Asn	Asn	Thr
			1060					1065					1070		
Val	Thr	Cys	Asn	Asp	Tyr	Thr	Val	Asn	Gln	Glu	Glu	Tyr	Gly	Gly	Ala
		1075					1080					1085			
Tyr	Thr	Ser	Arg	Asn	Arg	Gly	Tyr	Asn	Glu	Ala	Pro	Ser	Val	Pro	Ala
		1090				1095					1100				
Asp	Tyr	Ala	Ser	Val	Tyr	Glu	Glu	Lys	Ser	Tyr	Thr	Asp	Gly	Arg	Arg
1105					1110					1115					1120
Glu	Asn	Pro	Cys	Glu	Phe	Asn	Arg	Gly	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Thr	Pro	Leu
			1125						1130					1135	
Pro	Val	Gly	Tyr	Val	Thr	Lys	Glu	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro	Glu	Thr	Asp
			1140					1145					1150		
Lys	Val	Trp	Ile	Glu	Ile	Gly	Glu	Thr	Glu	Gly	Thr	Phe	Ile	Val	Asp

1155

1160

1165

Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1170 1175

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

TATCCAATTC GAACGTCATC

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

TTTAGTCATC GATTAAATCA

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

ATAATAAGAG CTCCAATGTT

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

TACATCGTAG TGCAACTCTT

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

TCATGGAGAG CTCCTATGTT

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 20:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

TTAACAAGAG CTCCTATGTT

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 21:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

ACTACCAGGT ACCTTTGATG

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 22:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

ACTACCGGST ACCTTTGATA

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 23:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 - (B) TYP: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

ATTTGAGTAA TACTATCC

18

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

ATTACTCAAA TACCATTGG

19

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 3534 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..3531

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA TGC ATT CCT TAT AAT TGT TTA	48
Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu	
1 5 10 15	
AGT AAC CCT GAA GTA GAA GTA TTA GGT GGA GAA AGA ATA GAA ACT GGT	96
Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly	
20 25 30	
TAC ACC CCA ATC GAT ATT TCC TTG TCG CTA ACG CAA TTT CTT TTG AGT	144
Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser	
35 40 45	
GAA TTT GTT CCC GGT GCT GGA TTT GTG TTA GGA CTA GTT GAT ATA ATA	192
Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile	
50 55 60	
TGG GGA ATT TTT GGT CCC TCT CAA TGG GAC GCA TTT CTT GTA CAA ATT	240
Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile	
65 70 75 80	
GAA CAG TTA ATT AAC CAA AGA ATA GAA GAA TTC GCT AGG AAC CAA GCC	288
Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala	

85					90					95					
ATT TCT AGA TTA GAA GGA CTA AGC AAT CTT TAT CAA ATT TAC GCA GAA															336
Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu															
			100					105					110		
TCT TTT AGA GAG TGG GAA GCA GAT CCT ACT AAT CCA GCA TTA AGA GAA															384
Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu															
			115					120					125		
GAG ATG CGT ATT CAA TTC AAT GAC ATG AAC AGT GCC CTT ACA ACC GCT															432
Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala															
			130					135					140		
ATT CCT CTT TTT GCA GTT CAA AAT TAT CAA GTT CCT CTT TTA TCA GTA															480
Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val															
			145					150					155		160
TAT GTT CAA GCT GCA AAT TTA CAT TTA TCA GTT TTG AGA GAT GTT TCA															528
Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser															
			165					170					175		
GTG TTT GGA CAA AGG TGG GGA TTT GAT GCC GCG ACT ATC AAT AGT CGT															576
Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg															
			180					185					190		
TAT AAT GAT TTA ACT AGG CTT ATT GGC AAC TAT ACA GAT CAT GCT GTA															624
Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val															
			195					200					205		
CGC TGG TAC AAT ACG GGA TTA GAG CGT GTA TGG GGA CCG GAT TCT AGA															672
Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg															
			210					215					220		
GAT TGG ATA AGA TAT AAT CAA TTT AGA AGA GAA TTA ACA CTA ACT GTA															720
Asp Trp Ile Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val															
			225					230					235		240
TTA GAT ATC GTT TCT CTA TTT CCG AAC TAT GAT AGT AGA ACG TAT CCA															768
Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Thr Tyr Pro															
			245					250					255		
ATT CGA ACA GTT TCC CAA TTA ACA AGA GAA ATT TAT ACA AAC CCA GTA															816
Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val															
			260					265					270		
TTA GAA AAT TTT GAT GGT AGT TTT CGA GGC TCG GCT CAG GGC ATA GAA															864
Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu															
			275					280					285		
AGA AGT ATT AGG AGT CCA CAT TTG ATG GAT ATA CTT AAC AGT ATA ACC															912
Arg Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr															
			290					295					300		
ATC TAT ACG GAT GCT CAT AGG GGT TAT TAT TAT TGG TCA GGG CAT CAA															960
Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln															
			305					310					315		320

ATA ATG GCT TCT CCT GTA GGG TTT TCG GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG	1008
Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro	
325 330 335	
CTA TAT GGA ACT ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CAA CGT ATT GTT GCT	1056
Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala	
340 345 350	
CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT AGA ACA TTA TCG TCC ACT TTA TAT AGA	1104
Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg	
355 360 365	
AGA CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA CTA TCT GTT CTT GAC	1152
Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp	
370 375 380	
GGG ACA GAA TTT GCT TAT GGA ACC TCC TCA AAT TTG CCA TCC GCT GTA	1200
Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val	
385 390 395 400	
TAC AGA AAA AGC GGA ACG GTA GAT TCG CTG GAT GAA ATA CCG CCA CAG	1248
Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln	
405 410 415	
AAT AAC AAC GTG CCA CCT AGG CAA GGA TTT AGT CAT CGA TTA AGC CAT	1296
Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His	
420 425 430	
GTT TCA ATG TTT CGT TCA GGC TTT AGT AAT AGT AGT GTA AGT ATA ATA	1344
Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile	
435 440 445	
AGA GCT CCA ATG TTT TCT TGG ACG CAC CGT AGT GCA ACC CCT ACA AAT	1392
Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn	
450 455 460	
ACA ATT GAT CCG GAG AGG ATT ACT CAA ATA CCA TTG GTA AAA GCA CAT	1440
Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His	
465 470 475 480	
ACA CTT CAG TCA GGT ACT ACT GTT GTA AGA GGG CCC GGG TTT ACG GGA	1488
Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly	
485 490 495	
GGA GAT ATT CTT CGA CGA ACA AGT GGA GGA CCA TTT GCT TAT ACT ATT	1536
Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile	
500 505 510	
GTT AAT ATA AAT GGG CAA TTA CCC CAA AGG TAT CGT GCA AGA ATA CGC	1584
Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg	
515 520 525	
TAT GCC TCT ACT ACA AAT CTA AGA ATT TAC GTA ACG GTT GCA GGT GAA	1632
Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu	
530 535 540	

CGG	ATT	TTT	GCT	GGT	CAA	TTT	AAC	AAA	ACA	ATG	GAT	ACC	GGT	GAC	CCA	1680
Arg	Ile	Phe	Ala	Gly	Gln	Phe	Asn	Lys	Thr	Met	Asp	Thr	Gly	Asp	Pro	
545					550					555					560	
TTA	ACA	TTC	CAA	TCT	TTT	AGT	TAC	GCA	ACT	ATT	AAT	ACA	GCT	TTT	ACA	1728
Leu	Thr	Phe	Gln	Ser	Phe	Ser	Tyr	Ala	Thr	Ile	Asn	Thr	Ala	Phe	Thr	
				565					570					575		
TTC	CCA	ATG	AGC	CAG	AGT	AGT	TTC	ACA	GTA	GGT	GCT	GAT	ACT	TTT	AGT	1776
Phe	Pro	Met	Ser	Gln	Ser	Ser	Phe	Thr	Val	Gly	Ala	Asp	Thr	Phe	Ser	
			580					585					590			
TCA	GGG	AAT	GAA	GTT	TAT	ATA	GAC	AGA	TTT	GAA	TTG	ATT	CCA	GTT	ACT	1824
Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Tyr	Ile	Asp	Arg	Phe	Glu	Leu	Ile	Pro	Val	Thr	
		595					600					605				
GCA	ACA	TTT	GAA	GCA	GAA	TAT	GAT	TTA	GAA	AGA	GCA	CAA	AAG	GCG	GTG	1872
Ala	Thr	Phe	Glu	Ala	Glu	Tyr	Asp	Leu	Glu	Arg	Ala	Gln	Lys	Ala	Val	
	610					615					620					
AAT	GCG	CTG	TTT	ACT	TCT	ATA	AAC	CAA	ATA	GGG	ATA	AAA	ACA	GAT	GTG	1920
Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Ile	Asn	Gln	Ile	Gly	Ile	Lys	Thr	Asp	Val	
625					630					635					640	
ACG	GAT	TAT	CAT	ATT	GAT	CAA	GTA	TCC	AAT	TTA	GTG	GAT	TGT	TTA	TCA	1968
Thr	Asp	Tyr	His	Ile	Asp	Gln	Val	Ser	Asn	Leu	Val	Asp	Cys	Leu	Ser	
				645					650					655		
GAT	GAA	TTT	TGT	CTG	GAT	GAA	AAG	CGA	GAA	TTG	TCC	GAG	AAA	GTC	AAA	2016
Asp	Glu	Phe	Cys	Leu	Asp	Glu	Lys	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Lys	
			660					665					670			
CAT	GCG	AAG	CGA	CTC	AGT	GAT	GAG	CGG	AAT	TTA	CTT	CAA	GAT	CCA	AAC	2064
His	Ala	Lys	Arg	Leu	Ser	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Asn	
		675					680					685				
TTC	AAA	GGC	ATC	AAT	AGG	CAA	CTA	GAC	CGT	GGT	TGG	AGA	GGA	AGT	ACG	2112
Phe	Lys	Gly	Ile	Asn	Arg	Gln	Leu	Asp	Arg	Gly	Trp	Arg	Gly	Ser	Thr	
	690					695					700					
GAT	ATT	ACC	ATC	CAA	AGA	GGA	GAT	GAC	GTA	TTC	AAA	GAA	AAT	TAT	GTC	2160
Asp	Ile	Thr	Ile	Gln	Arg	Gly	Asp	Asp	Val	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Val	
705					710					715					720	
ACA	CTA	CCA	GGT	ACC	TTT	GAT	GAG	TGC	TAT	CCA	ACA	TAT	TTG	TAT	CAA	2208
Thr	Leu	Pro	Gly	Thr	Phe	Asp	Glu	Cys	Tyr	Pro	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Gln	
				725						730				735		
AAA	ATC	GAT	GAA	TCA	AAA	TTA	AAA	GCC	TTT	ACC	CGT	TAT	CAA	TCA	AGA	2256
Lys	Ile	Asp	Glu	Ser	Lys	Leu	Lys	Ala	Phe	Thr	Arg	Tyr	Gln	Leu	Arg	
			740					745					750			
GGG	TAT	ATC	GAA	GAT	AGT	CAA	GAC	TTA	GAA	ATC	TAT	TTA	ATT	CGC	TAC	2304
Gly	Tyr	Ile	Glu	Asp	Ser	Gln	Asp	Leu	Glu	Ile	Tyr	Leu	Ile	Arg	Tyr	
		755					760					765				
AAT	GCA	AAA	CAT	GAA	ACA	GTA	AAT	GTG	CCA	GGT	ACG	GGT	TCC	TTA	TGG	2352

Asn	Ala	Lys	His	Glu	Thr	Val	Asn	Val	Pro	Gly	Thr	Gly	Ser	Leu	Trp		
770						775					780						
CCG	CTT	TCA	GCC	CAA	AGT	CCA	ATC	GGA	AAG	TGT	GGA	GAG	CCG	AAT	CGA	2400	
Pro	Leu	Ser	Ala	Gln	Ser	Pro	Ile	Gly	Lys	Cys	Gly	Glu	Pro	Asn	Arg		
785					790					795					800		
TGC	GCG	CCA	CAC	CTT	GAA	TGG	AAT	CCT	GAC	TTA	GAT	TGT	TCG	TGT	AGG	2448	
Cys	Ala	Pro	His	Leu	Glu	Trp	Asn	Pro	Asp	Leu	Asp	Cys	Ser	Cys	Arg		
				805					810						815		
GAT	GGA	GAA	AAG	TGT	GCC	CAT	CAT	TCG	CAT	CAT	TTC	TCC	TTA	GAC	ATT	2496	
Asp	Gly	Glu	Lys	Cys	Ala	His	His	Ser	His	His	Phe	Ser	Leu	Asp	Ile		
			820					825						830			
GAT	GTA	GGA	TGT	ACA	GAC	TTA	AAT	GAG	GAC	CTA	GGT	GTA	TGG	GTG	ATC	2544	
Asp	Val	Gly	Cys	Thr	Asp	Leu	Asn	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Trp	Val	Ile		
		835					840					845					
TTT	AAG	ATT	AAG	ACG	CAA	GAT	GGG	CAC	GCA	AGA	CTA	GGG	AAT	CTA	GAG	2592	
Phe	Lys	Ile	Lys	Thr	Gln	Asp	Gly	His	Ala	Arg	Leu	Gly	Asn	Leu	Glu		
	850					855					860						
TTT	CTC	GAA	GAG	AAA	CCA	TTA	GTA	GGA	GAA	GCG	CTA	GCT	CGT	GTG	AAA	2640	
Phe	Leu	Glu	Glu	Lys	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Val	Lys		
865					870					875					880		
AGA	GCG	GAG	AAA	AAA	TGG	AGA	GAC	AAA	CGT	GAA	AAA	TTG	GAA	TGG	GAA	2688	
Arg	Ala	Glu	Lys	Lys	Trp	Arg	Asp	Lys	Arg	Glu	Lys	Leu	Glu	Trp	Glu		
				885					890					895			
ACA	AAT	ATC	GTT	TAT	AAA	GAG	GCA	AAA	GAA	TCT	GTA	GAT	GCT	TTA	TTT	2736	
Thr	Asn	Ile	Val	Tyr	Lys	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	Ala	Leu	Phe		
			900					905					910				
GTA	AAC	TCT	CAA	TAT	GAT	CAA	TTA	CAA	GCG	GAT	ACG	AAT	ATT	GCC	ATG	2784	
Val	Asn	Ser	Gln	Tyr	Asp	Gln	Leu	Gln	Ala	Asp	Thr	Asn	Ile	Ala	Met		
		915					920						925				
ATT	CAT	GCG	GCA	GAT	AAA	CGT	GTT	CAT	AGC	ATT	CGA	GAA	GCT	TAT	CTG	2832	
Ile	His	Ala	Ala	Asp	Lys	Arg	Val	His	Ser	Ile	Arg	Glu	Ala	Tyr	Leu		
	930					935					940						
CCT	GAG	CTG	TCT	GTG	ATT	CCG	GGT	GTC	AAT	GCG	GCT	ATT	TTT	GAA	GAA	2880	
Pro	Glu	Leu	Ser	Val	Ile	Pro	Gly	Val	Asn	Ala	Ala	Ile	Phe	Glu	Glu		
945					950					955					960		
TTA	GAA	GGG	CGT	ATT	TTC	ACT	GCA	TTC	TCC	CTA	TAT	GAT	GCG	AGA	AAT	2928	
Leu	Glu	Gly	Arg	Ile	Phe	Thr	Ala	Phe	Ser	Leu	Tyr	Asp	Ala	Arg	Asn		
				965					970					975			
GTC	ATT	AAA	AAT	GGT	GAT	TTT	AAT	AAT	GGC	TTA	TCC	TGC	TGG	AAC	GTG	2976	
Val	Ile	Lys	Asn	Gly	Asp	Phe	Asn	Asn	Gly	Leu	Ser	Cys	Trp	Asn	Val		
		980						985					990				
AAA	GGG	CAT	GTA	GAT	GTA	GAA	GAA	CAA	AAC	AAC	CAA	CGT	TCG	GTC	CTT	3024	
Lys	Gly	His	Val	Asp	Val	Glu	Glu	Gln	Asn	Asn	Gln	Arg	Ser	Val	Leu		

995	1000	1005	
GTT GTT CCG GAA TGG GAA GCA GAA GTG TCA CAA GAA GTT CGT GTC TGT Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys 1010	1015	1020	3072
CCG GGT CGT GGC TAT ATC CTT CGT GTC ACA GCG TAC AAG GAG GGA TAT Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr 1025	1030	1035	3120
GGA GAA GGT TGC GTA ACC ATT CAT GAG ATC GAG AAC AAT ACA GAC GAA Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu 1045	1050	1055	3168
CTG AAG TTT AGC AAC TGC GTA GAA GAG GAA ATC TAT CCA AAT AAC ACG Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr 1060	1065	1070	3216
GTA ACG TGT AAT GAT TAT ACT GTA AAT CAA GAA GAA TAC GGA GGT GCG Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Val Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala 1075	1080	1085	3264
TAC ACT TCT CGT AAT CGA GGA TAT AAC GAA GCT CCT TCC GTA CCA GCT Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Val Pro Ala 1090	1095	1100	3312
GAT TAT GCG TCA GTC TAT GAA GAA AAA TCG TAT ACA GAT GGA CGA AGA Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Gly Arg Arg 1105	1110	1115	3360
GAG AAT CCT TGT GAA TTT AAC AGA GGG TAT AGG GAT TAC ACG CCA CTA Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Leu 1125	1130	1135	3408
CCA GTT GGT TAT GTG ACA AAA GAA TTA GAA TAC TTC CCA GAA ACC GAT Pro Val Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp 1140	1145	1150	3456
AAG GTA TGG ATT GAG ATT GGA GAA ACG GAA GGA ACA TTT ATC GTG GAC Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp 1155	1160	1165	3504
AGC GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA TAG Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu 1170	1175		3534

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1177 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
 1 5 10 15
 Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile-Glu Thr Gly
 20 25 30
 Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser
 35 40 45
 Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile
 50 55 60
 Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65 70 75 80
 Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala
 85 90 95
 Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu
 100 105 110
 Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
 115 120 125
 Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala
 130 135 140
 Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160
 Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser
 165 170 175
 Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg
 180 185 190
 Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val
 195 200 205
 Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
 210 215 220
 Asp Trp Ile Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Thr Tyr Pro
 245 250 255
 Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu
 275 280 285
 Arg Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr
 290 295 300

Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln
 305 310 315 320

Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro
 325 330 335

Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala
 340 345 350

Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg
 355 360 365

Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp
 370 375 380

Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val
 385 390 395 400

Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln
 405 410 415

Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His
 420 425 430

Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile
 435 440 445

Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn
 450 455 460

Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His
 465 470 475 480

Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly
 485 490 495

Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile
 500 505 510

Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg
 515 520 525

Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu
 530 535 540

Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro
 545 550 555 560

Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr
 565 570 575

Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser
 580 585 590

Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr
 595 600 605

Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val
610 615 620

Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ile Asn Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Val
625 630 635 640

Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Asp Cys Leu Ser
645 650 655

Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys
660 665 670

His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn
675 680 685

Phe Lys Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr
690 695 700

Asp Ile Thr Ile Gln Arg Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val
705 710 715 720

Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln
725 730 735

Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Phe Thr Arg Tyr Gln Leu Arg
740 745 750

Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr
755 760 765

Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp
770 775 780

Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg
785 790 795 800

Cys Ala Pro His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg
805 810 815

Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile
820 825 830

Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile
835 840 845

Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu
850 855 860

Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys
865 870 875 880

Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu
885 890 895

Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe
900 905 910

Val Asn Ser Gln Tyr Asp Gln Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met
 915 920 925
 Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu
 930 935 940
 Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu
 945 950 955 960
 Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn
 965 970 975
 Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val
 980 985 990
 Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn Gln Arg Ser Val Leu
 995 1000 1005
 Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys
 1010 1015 1020
 Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr
 1025 1030 1035 1040
 Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu
 1045 1050 1055
 Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr
 1060 1065 1070
 Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Val Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala
 1075 1080 1085
 Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Val Pro Ala
 1090 1095 1100
 Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Gly Arg Arg
 1105 1110 1115 1120
 Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Leu
 1125 1130 1135
 Pro Val Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp
 1140 1145 1150
 Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp
 1155 1160 1165
 Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1170 1175

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 27:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 3534 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..3531

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

ATG	GAT	AAC	AAT	CCG	AAC	ATC	AAT	GAA	TGC	ATT	CCT	TAT	AAT	TGT	TTA	48
Met	Asp	Asn	Asn	Pro	Asn	Ile	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	Tyr	Asn	Cys	Leu	
1				5				10						15		
AGT	AAC	CCT	GAA	GTA	GAA	GTA	TTA	GGT	GGA	GAA	AGA	ATA	GAA	ACT	GGT	96
Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Glu	Val	Leu	Gly	Gly	Glu	Arg	Ile	Glu	Thr	Gly	
			20					25						30		
TAC	ACC	CCA	ATC	GAT	ATT	TCC	TTG	TCG	CTA	ACG	CAA	TTT	CTT	TTG	AGT	144
Tyr	Thr	Pro	Ile	Asp	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Gln	Phe	Leu	Leu	Ser	
			35				40							45		
GAA	TTT	GTT	CCC	GGT	GCT	GGA	TTT	GTG	TTA	GGA	CTA	GTT	GAT	ATA	ATA	192
Glu	Phe	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Phe	Val	Leu	Gly	Leu	Val	Asp	Ile	Ile	
	50					55					60					
TGG	GGA	ATT	TTT	GGT	CCC	TCT	CAA	TGG	GAC	GCA	TTT	CTT	GTA	CAA	ATT	240
Trp	Gly	Ile	Phe	Gly	Pro	Ser	Gln	Trp	Asp	Ala	Phe	Leu	Val	Gln	Ile	
65					70				75						80	
GAA	CAG	TTA	ATT	AAC	CAA	AGA	ATA	GAA	GAA	TTC	GCT	AGG	AAC	CAA	GCC	288
Glu	Gln	Leu	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Glu	Glu	Phe	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala	
				85				90						95		
ATT	TCT	AGA	TTA	GAA	GGA	CTA	AGC	AAT	CTT	TAT	CAA	ATT	TAC	GCA	GAA	336
Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Gly	Leu	Ser	Asn	Leu	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Ala	Glu	
			100					105						110		
TCT	TTT	AGA	GAG	TGG	GAA	GCA	GAT	CCT	ACT	AAT	CCA	GCA	TTA	AGA	GAA	384
Ser	Phe	Arg	Glu	Trp	Glu	Ala	Asp	Pro	Thr	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Glu	
			115				120						125			
GAG	ATG	CGT	ATT	CAA	TTC	AAT	GAC	ATG	AAC	AGT	GCC	CTT	ACA	ACC	GCT	432
Glu	Met	Arg	Ile	Gln	Phe	Asn	Asp	Met	Asn	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Ala	
	130					135					140					
ATT	CCT	CTT	TTT	GCA	GTT	CAA	AAT	TAT	CAA	GTT	CCT	CTT	TTA	TCA	GTA	480
Ile	Pro	Leu	Phe	Ala	Val	Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Val	
145					150				155						160	
TAT	GTT	CAA	GCT	GCA	AAT	TTA	CAT	TTA	TCA	GTT	TTG	AGA	GAT	GTT	TCA	528
Tyr	Val	Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	His	Leu	Ser	Val	Leu	Arg	Asp	Val	Ser	
			165					170						175		
GTG	TTT	GGA	CAA	AGG	TGG	GGA	TTT	GAT	GCC	GCG	ACT	ATC	AAT	AGT	CGT	576
Val	Phe	Gly	Gln	Arg	Trp	Gly	Phe	Asp	Ala	Ala	Thr	Ile	Asn	Ser	Arg	
			180					185						190-		

TAT AAT GAT TTA ACT AGG CTT ATT GGC AAC TAT ACA GAT TAT GCT GTA	624
Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp Tyr Ala Val	
195 200 205	
CGC TGG TAC AAT ACG GGA TTA GAA CGT GTA TGG GGA CCG GAT TCT AGA	672
Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg	
210 215 220	
GAT TGG GTA AGG TAT AAT CAA TTT AGA AGA GAA TTA ACA CTA ACT GTA	720
Asp Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val	
225 230 235 240	
TTA GAT ATC GTT GCT CTG TTC CCG AAT TAT GAT AGT AGA AGA TAT CCA	768
Leu Asp Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Arg Tyr Pro	
245 250 255	
ATT CGA ACA GTT TCC CAA TTA ACA AGA GAA ATT TAT ACA AAC CCA GTA	816
Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val	
260 265 270	
TTA GAA AAT TTT GAT GGT AGT TTT CGA GGC TCG GCT CAG GGC ATA GAA	864
Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu	
275 280 285	
AGA AGT ATT AGG AGT CCA CAT TTG ATG GAT ATA CTT AAC AGT ATA ACC	912
Arg Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr	
290 295 300	
ATC TAT ACG GAT GCT CAT AGG GGT TAT TAT TAT TGG TCA GGG CAT CAA	960
Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln	
305 310 315 320	
ATA ATG GCT TCT CCT GTA GGG TTT TCG GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG	1008
Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro	
325 330 335	
CTA TAT GGA ACT ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CAA CGT ATT GTT GCT	1056
Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala	
340 345 350	
CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT AGA ACA TTA TCG TCC ACT TTA TAT AGA	1104
Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg	
355 360 365	
AGA CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA CTA TCT GTT CTT GAC	1152
Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp	
370 375 380	
GGG ACA GAA TTT GCT TAT GGA ACC TCC TCA AAT TTG CCA TCC GCT GTA	1200
Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val	
385 390 395 400	
TAC AGA AAA AGC GGA ACG GTA GAT TCG CTG GAT GAA ATA CCG CCA CAG	1248
Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln	
405 410 415	
AAT AAC AAC GTG CCA CCT AGG CAA GGA TTT AGT CAT CGA TTA AGC CAT	1296

Asn	Asn	Asn	Val	Pro	Pro	Arg	Gln	Gly	Phe	Ser	His	Arg	Leu	Ser	His		
			420					425					430				
GTT	TCA	ATG	TTT	CGT	TCA	GGC	TTT	AGT	AAT	AGT	AGT	GTA	AGT	ATA	ATA	1344	
Val	Ser	Met	Phe	Arg	Ser	Gly	Phe	Ser	Asn	Ser	Ser	Val	Ser	Ile	Ile		
		435					440					445					
AGA	GCT	CCT	ATG	TTC	TCT	TGG	ATA	CAT	CGT	AGT	GCT	GAA	TTT	AAT	AAT	1392	
Arg	Ala	Pro	Met	Phe	Ser	Trp	Ile	His	Arg	Ser	Ala	Glu	Phe	Asn	Asn		
	450					455				460							
ATA	ATT	GCA	TCG	GAT	AGT	ATT	ACT	CAA	ATA	CCA	TTG	GTA	AAA	GCA	CAT	1440	
Ile	Ile	Ala	Ser	Asp	Ser	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	His		
465					470				475					480			
ACA	CTT	CAG	TCA	GGT	ACT	ACT	GTT	GTA	AGA	GGG	CCC	GGG	TTT	ACG	GGA	1488	
Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Val	Arg	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly		
			485						490					495			
GGA	GAT	ATT	CTT	CGA	CGA	ACA	AGT	GGA	GGA	CCA	TTT	GCT	TAT	ACT	ATT	1536	
Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Ala	Tyr	Thr	Ile		
			500					505					510				
GTT	AAT	ATA	AAT	GGG	CAA	TTA	CCC	CAA	AGG	TAT	CGT	GCA	AGA	ATA	CGC	1584	
Val	Asn	Ile	Asn	Gly	Gln	Leu	Pro	Gln	Arg	Tyr	Arg	Ala	Arg	Ile	Arg		
		515					520					525					
TAT	GCC	TCT	ACT	ACA	AAT	CTA	AGA	ATT	TAC	GTA	ACG	GTT	GCA	GGT	GAA	1632	
Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu	Arg	Ile	Tyr	Val	Thr	Val	Ala	Gly	Glu		
	530					535					540						
CGG	ATT	TTT	GCT	GGT	CAA	TTT	AAC	AAA	ACA	ATG	GAT	ACC	GGT	GAC	CCA	1680	
Arg	Ile	Phe	Ala	Gly	Gln	Phe	Asn	Lys	Thr	Met	Asp	Thr	Gly	Asp	Pro		
545					550					555				560			
TTA	ACA	TTC	CAA	TCT	TTT	AGT	TAC	GCA	ACT	ATT	AAT	ACA	GCT	TTT	ACA	1728	
Leu	Thr	Phe	Gln	Ser	Phe	Ser	Tyr	Ala	Thr	Ile	Asn	Thr	Ala	Phe	Thr		
				565					570					575			
TTC	CCA	ATG	AGC	CAG	AGT	AGT	TTC	ACA	GTA	GGT	GCT	GAT	ACT	TTT	AGT	1776	
Phe	Pro	Met	Ser	Gln	Ser	Ser	Phe	Thr	Val	Gly	Ala	Asp	Thr	Phe	Ser		
			580					585					590				
TCA	GGG	AAT	GAA	GTT	TAT	ATA	GAC	AGA	TTT	GAA	TTG	ATT	CCA	GTT	ACT	1824	
Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Tyr	Ile	Asp	Arg	Phe	Glu	Leu	Ile	Pro	Val	Thr		
		595					600					605					
GCA	ACA	TTT	GAA	GCA	GAA	TAT	GAT	TTA	GAA	AGA	GCA	CAA	AAG	GCG	GTG	1872	
Ala	Thr	Phe	Glu	Ala	Glu	Tyr	Asp	Leu	Glu	Arg	Ala	Gln	Lys	Ala	Val		
	610						615				620						
AAT	GCG	CTG	TTT	ACT	TCT	ATA	AAC	CAA	ATA	GGG	ATA	AAA	ACA	GAT	GTG	1920	
Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Ile	Asn	Gln	Ile	Gly	Ile	Lys	Thr	Asp	Val		
625						630				635				640			
ACG	GAT	TAT	CAT	ATT	GAT	CAA	GTA	TCC	AAT	TTA	GTG	GAT	TGT	TTA	TCA	1968	
Thr	Asp	Tyr	His	Ile	Asp	Gln	Val	Ser	Asn	Leu	Val	Asp	Cys	Leu	Ser		

645					650					655						
GAT	GAA	TTT	TGT	CTG	GAT	GAA	AAG	CGA	GAA	TTG	TCC	GAG	AAA	GTC	AAA	2016
Asp	Glu	Phe	Cys	Leu	Asp	Glu	Lys	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Lys	
			660					665						670		
CAT	GCG	AAG	CGA	CTC	AGT	GAT	GAG	CGG	AAT	TTA	CTT	CAA	GAT	CCA	AAC	2064
His	Ala	Lys	Arg	Leu	Ser	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Asn	
		675						680						685		
TTC	AAA	GGC	ATC	AAT	AGG	CAA	CTA	GAC	CGT	GGT	TGG	AGA	GGA	AGT	ACG	2112
Phe	Lys	Gly	Ile	Asn	Arg	Gln	Leu	Asp	Arg	Gly	Trp	Arg	Gly	Ser	Thr	
	690							695						700		
GAT	ATT	ACC	ATC	CAA	AGA	GGA	GAT	GAC	GTA	TTC	AAA	GAA	AAT	TAT	GTC	2160
Asp	Ile	Thr	Ile	Gln	Arg	Gly	Asp	Asp	Val	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Val	
705				710							715				720	
ACA	CTA	CCA	GGT	ACC	TTT	GAT	GAG	TGC	TAT	CCA	ACA	TAT	TTG	TAT	CAA	2208
Thr	Leu	Pro	Gly	Thr	Phe	Asp	Glu	Cys	Tyr	Pro	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Gln	
				725					730						735	
AAA	ATC	GAT	GAA	TCA	AAA	TTA	AAA	GCC	TTT	ACC	CGT	TAT	CAA	TTA	AGA	2256
Lys	Ile	Asp	Glu	Ser	Lys	Leu	Lys	Ala	Phe	Thr	Arg	Tyr	Gln	Leu	Arg	
			740					745						750		
GGG	TAT	ATC	GAA	GAT	AGT	CAA	GAC	TTA	GAA	ATC	TAT	TTA	ATT	CGC	TAC	2304
Gly	Tyr	Ile	Glu	Asp	Ser	Gln	Asp	Leu	Glu	Ile	Tyr	Leu	Ile	Arg	Tyr	
		755					760							765		
AAT	GCA	AAA	CAT	GAA	ACA	GTA	AAT	GTG	CCA	GGT	ACG	GGT	TCC	TTA	TGG	2352
Asn	Ala	Lys	His	Glu	Thr	Val	Asn	Val	Pro	Gly	Thr	Gly	Ser	Leu	Trp	
	770					775						780				
CCG	CTT	TCA	GCC	CAA	AGT	CCA	ATC	GGA	AAG	TGT	GGA	GAG	CCG	AAT	CGA	2400
Pro	Leu	Ser	Ala	Gln	Ser	Pro	Ile	Gly	Lys	Cys	Gly	Glu	Pro	Asn	Arg	
785						790				795					800	
TGC	GCG	CCA	CAC	CTT	GAA	TGG	AAT	CCT	GAC	TTA	GAT	TGT	TCG	TGT	AGG	2448
Cys	Ala	Pro	His	Leu	Glu	Trp	Asn	Pro	Asp	Leu	Asp	Cys	Ser	Cys	Arg	
			805							810					815	
GAT	GGA	GAA	AAG	TGT	GCC	CAT	CAT	TCG	CAT	CAT	TTC	TCC	TTA	GAC	ATT	2496
Asp	Gly	Glu	Lys	Cys	Ala	His	His	Ser	His	His	Phe	Ser	Leu	Asp	Ile	
			820					825						830		
GAT	GTA	GGA	TGT	ACA	GAC	TTA	AAT	GAG	GAC	CTA	GGT	GTA	TGG	GTG	ATC	2544
Asp	Val	Gly	Cys	Thr	Asp	Leu	Asn	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Trp	Val	Ile	
		835					840							845		
TTT	AAG	ATT	AAG	ACG	CAA	GAT	GGG	CAC	GCA	AGA	CTA	GGG	AAT	CTA	GAG	2592
Phe	Lys	Ile	Lys	Thr	Gln	Asp	Gly	His	Ala	Arg	Leu	Gly	Asn	Leu	Glu	
	850					855								860		
TTT	CTC	GAA	GAG	AAA	CCA	TTA	GTA	GGA	GAA	GCG	CTA	GCT	CGT	GTG	AAA	2640
Phe	Leu	Glu	Glu	Lys	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Val	Lys	
865						870					875				880	

AGA GCG GAG AAA AAA TGG AGA GAC AAA CGT GAA AAA TTG GAA TGG GAA	2688
Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu	
885 890 895	
ACA AAT ATC GTT TAT AAA GAG GCA AAA GAA TCT GTA GAT GCT TTA TTT	2736
Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe	
900 905 910	
GTA AAC TCT CAA TAT GAT CAA TTA CAA GCG GAT ACG AAT ATT GCC ATG	2784
Val Asn Ser Gln Tyr Asp Gln Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met	
915 920 925	
ATT CAT GCG GCA GAT AAA CGT GTT CAT AGC ATT CGA GAA GCT TAT CTG	2832
Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu	
930 935 940	
CCT GAG CTG TCT GTG ATT CCG GGT GTC AAT GCG GCT ATT TTT GAA GAA	2880
Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu	
945 950 955 960	
TTA GAA GGG CGT ATT TTC ACT GCA TTC TCC CTA TAT GAT GCG AGA AAT	2928
Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn	
965 970 975	
GTC ATT AAA AAT GGT GAT TTT AAT AAT GGC TTA TCC TGC TGG AAC GTG	2976
Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val	
980 985 990	
AAA GGG CAT GTA GAT GTA GAA GAA CAA AAC AAC CAA CGT TCG GTC CTT	3024
Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn Gln Arg Ser Val Leu	
995 1000 1005	
GTT GTT CCG GAA TGG GAA GCA GAA GTG TCA CAA GAA GTT CGT GTC TGT	3072
Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys	
1010 1015 1020	
CCG GGT CGT GGC TAT ATC CTT CGT GTC ACA GCG TAC AAG GAG GGA TAT	3120
Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr	
1025 1030 1035 1040	
GGA GAA GGT TGC GTA ACC ATT CAT GAG ATC GAG AAC AAT ACA GAC GAA	3168
Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu	
1045 1050 1055	
CTG AAG TTT AGC AAC TGC GTA GAA GAG GAA ATC TAT CCA AAT AAC ACG	3216
Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr	
1060 1065 1070	
GTA ACG TGT AAT GAT TAT ACT GTA AAT CAA GAA GAA TAC GGA GGT GCG	3264
Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Val Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala	
1075 1080 1085	
TAC ACT TCT CGT AAT CGA GGA TAT AAC GAA GCT CCT TCC GTA CCA GCT	3312
Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Val Pro Ala	
1090 1095 1100	

GAT TAT GCG TCA GTC TAT GAA GAA AAA TCG TAT ACA GAT GGA CGA AGA 3360
 Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Gly Arg Arg
 1105 1110 1115 1120

GAG AAT CCT TGT GAA TTT AAC AGA GGG TAT AGG GAT TAC ACG CCA CTA 3408
 Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Leu
 1125 1130 1135

CCA GTT GGT TAT GTG ACA AAA GAA TTA GAA TAC TTC CCA GAA ACC GAT 3456
 Pro Val Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp
 1140 1145 1150

AAG GTA TGG ATT GAG ATT GGA GAA ACG GAA GGA ACA TTT ATC GTG GAC 3504
 Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp
 1155 1160 1165

AGC GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA TAG 3534
 Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1170 1175

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 1177 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
 1 5 10 15

Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly
 20 25 30

Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser
 35 40 45

Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile
 50 55 60

Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala
 85 90 95

Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu
 100 105 110

Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
 115 120 125

Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala
 130 135 140

Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160

Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser
 165 170 175

Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg
 180 185 190

Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp Tyr Ala Val
 195 200 205

Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
 210 215 220

Asp Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240

Leu Asp Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Arg Tyr Pro
 245 250 255

Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val
 260 265 270

Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu
 275 280 285

Arg Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr
 290 295 300

Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln
 305 310 315 320

Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro
 325 330 335

Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala
 340 345 350

Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg
 355 360 365

Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp
 370 375 380

Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val
 385 390 395 400

Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln
 405 410 415

Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His
 420 425 430

Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile
 435 440 445

Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala Glu Phe Asn Asn
 450 455 460

Ile Ile Ala Ser Asp Ser Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His
 465 470 475 480

Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly
 485 490 495

Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile
 500 505 510

Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg
 515 520 525

Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu
 530 535 540

Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro
 545 550 555 560

Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr
 565 570 575

Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser
 580 585 590

Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr
 595 600 605

Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val
 610 615 620

Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ile Asn Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Val
 625 630 635 640

Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Asp Cys Leu Ser
 645 650 655

Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys
 660 665 670

His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn
 675 680 685

Phe Lys Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr
 690 695 700

Asp Ile Thr Ile Gln Arg Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val
 705 710 715 720

Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln
 725 730 735

Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Phe Thr Arg Tyr Gln Leu Arg
 740 745 750

Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr
 755 760 765
 Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp
 770 775 780
 Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg
 785 790 795 800
 Cys Ala Pro His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg
 805 810 815
 Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile
 820 825 830
 Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile
 835 840 845
 Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu
 850 855 860
 Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys
 865 870 875 880
 Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu
 885 890 895
 Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe
 900 905 910
 Val Asn Ser Gln Tyr Asp Gln Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met
 915 920 925
 Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu
 930 935 940
 Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu
 945 950 955 960
 Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn
 965 970 975
 Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val
 980 985 990
 Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn Gln Arg Ser Val Leu
 995 1000 1005
 Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys
 1010 1015 1020
 Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr
 1025 1030 1035 1040
 Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu
 1045 1050 1055

Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr
 1060 1065 1070
 Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Val Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala
 1075 1080 1085
 Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Val Pro Ala
 1090 1095 1100
 Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Gly Arg Arg
 1105 1110 1115 1120
 Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Leu
 1125 1130 1135
 Pro Val Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp
 1140 1145 1150
 Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp
 1155 1160 1165
 Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1170 1175

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 3579 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

ATGGATAACA ATCCGAACAT CAATGAATGC ATTCCTTATA ATTGTTTAAG TAACCCCTGAA	60
GTAGAAGTAT TAGGTGGAGA AAGAATAGAA ACTGGTTACA CCCCAATCGA TATTCCTTG	120
TCGCTAACGC AATTTCTTTT GAGTGAATTT GTTCCCGGTG CTGGATTTGT GTTAGGACTA	180
GTTGATATAA TATGGGGAAT TTTTGGTCCC TCTCAATGGG ACGCATTCT TGTACAAATT	240
GAACAGTTAA TTAACCAAG AATAGAAGAA TTCGCTAGGA ACCAAGCCAT TTCTAGATTA	300
GAAGGACTAA GCAATCTTTA TCAAATTTAC GCAGAATCTT TTAGAGAGTG GGAAGCAGAT	360
CCTACTAATC CAGCATTAAG AGAAGAGATG CGTATTCAAT TCAATGACAT GAACAGTGCC	420
CTTACAACCG CTATTCCTCT TTTTGCAGTT CAAAATTATC AAGTTCCTCT TTTATCAGTA	480
TATGTTCAAG CTGCAAATTT ACATTTATCA GTTTTGAGAG ATGTTTCAGT GTTTGGACAA	540
AGGTGGGGAT TTGATGCCGC GACTATCAAT AGTCGTTATA ATGATTTAAC TAGGCTTATT	600
GGCAACTATA CAGATTATGC TGTACGCTGG TACAATACGG GATTAGAACG TGTATGGGGA	660

CCGGATTCTA	GAGATTGGGT	AAGGTATAAT	CAATTTAGAA	GAGAATTAAC	ACTAACTGTA	720
TTAGATATCG	TTGCTCTGTT	CCCGAATTAT	GATAGTAGAA	GATATCCAAT	TCGAACAGTT	780
TCCCAATTAA	CAAGAGAAAT	TTATACAAC	CCAGTATTAG	AAAATTTTGA	TGGTAGTTTT	840
CGAGGCTCGG	CTCAGGGCAT	AGAAAGAAGT	ATTAGGAGTC	CACATTTGAT	GGATATACTT	900
AACAGTATAA	CCATCTATAC	GGATGCTCAT	AGGGGTTATT	ATTATTTGGTC	AGGGCATCAA	960
ATAATGGCTT	CTCCTGTAGG	GTTTTCGGGG	CCAGAATTCA	CTTTTCCGCT	ATATGGAECT	1020
ATGGGAAATG	CAGCTCCACA	ACAACGTATT	GTTGCTCAAC	TAGGTCAGGG	CGTGTATAGA	1080
ACATTATCGT	CCACTTTATA	TAGAAGACCT	TTTAATATAG	GGATAAATA	TCAACAACATA	1140
TCTGTTCTTG	ACGGGACAGA	ATTGCTTAT	GSAACCTCCT	CAAATTTGCC	ATCCGCTGTA	1200
TACAGAAAAA	GCGGAACGGT	AGATTGCTG	GATGAAATAC	CGCCACAGAA	TAACAACGTG	1260
CCACCTAGGC	AAGGATTTAG	TCATCGAATA	AGCCATGTTT	CAATGTTTCG	TTCAGGCTTT	1320
AGTAATAGTA	GTGTAAGTAT	AATAAGAGCT	CCTATGTTCT	CTTGGATACA	TCGTAGTGCA	1380
ACTCTTACAA	ATACAATTGA	TCCAGAGAGA	ATTAATCAAA	TACCTTTAGT	GAAAGGATTT	1440
AGAGTTTGGG	GGGGCACCTC	TGTCATTACA	GGACCAGGAT	TTACAGGAGG	GGATATCCTT	1500
CGAAGAAATA	CCTTTGGTGA	TTTTGTATCT	CTACAAGTCA	ATATTAATTC	ACCAATTACC	1560
CAAAGATACC	GTTTAAGATT	TCGTTACGCT	TCCAGTAGGG	ATGCACGAGT	TATAGTATTA	1620
ACAGGAGCGG	CATCCACAGG	AGTGGGAGGC	CAAGTTAGTG	TAAATATGCC	TCTTCAGAAA	1680
ACTATGGAAA	TAGGGGAGAA	CTTAACATCT	AGAACATTTA	GATATACCGA	TTTTAGTAAT	1740
CCTTTTTCAT	TTAGAGCTAA	TCCAGATATA	ATTGGGATAA	GTGAACAACC	TCTATTTGGT	1800
GCAGGTTCTA	TTAGTAGCGG	TGAACTTTAT	ATAGATAAAA	TTGAAATTAT	TCTAGCAGAT	1860
GCAACATTTG	AAGCAGAATC	TGATTTAGAA	AGAGCACAAA	AGGCGGTGAA	TGCCCTGTTT	1920
ACTTCTTCCA	ATCAAATCGG	GTTAAAACC	GATGTGACGG	ATTATCATAT	TGATCAAGTA	1980
TCCAATTTAG	TGGATTGTTT	ATCAGATGAA	TTTTGTCTGG	ATGAAAAGCG	AGAATTGTCC	2040
GAGAAAGTCA	AACATGCGAA	GCGACTCAGT	GATGAGCGGA	ATTTACTTCA	AGATCCAAC	2100
TTCAGAGGGA	TCAATAGACA	ACCAGACCGT	GGCTGGAGAG	GAAGTACAGA	TATTACCATC	2160
CAAGGAGGAG	ATGACGTATT	CAAAGAGAAT	TACGTCACAC	TACCGGGTAC	CGTTGATGAG	2220
TGCTATCCAA	CGTATTTATA	TCAGAAAATA	GATGAGTCGA	AATTAAGC	TTATACCCGT	2280
TATGAATTA	GAGGTATAT	CGAAGATAGT	CAAGACTTAG	AAATCTATTT	GATCCGTTAC	2340

```

AATGCAAAAC ACGAAATAGT AAATGTGCCA GGCACGGGTT COTTATGGCC GCTTTCAGCC 2400
CAAAGTCCAA TCGGAAAGTG TGGAGAACCG AATCGATGCG CGCCACACCT TGAATGGAAT 2460
CCTGATCTAG ATTGTTCTCG CAGAGACGGG GAAAAATGTG CACATCATTG CCATCATTTC 2520
ACCTTGGATA TTGATGTTGG ATGTACAGAC TTAAATGAGG ACTTAGGTGT ATGGGTGATA 2580
TTCAAGATTA AGACGCAAGA TGGCCATGCA AGACTAGGGA ATCTAGAGTT TCTCGAAGAG 2640
AAACCATTAT TAGGGGAAGC ACTAGCTCGT GTGAAAAGAG CGGAGAAGAA GTGGAGAGAC 2700
AAACGAGAGA AACTGCAGTT GGAAACAAAT ATTGTTTATA AAGAGGCAAA AGAATCTGTA 2760
GATGCTTTAT TTGTAAACTC TCAATATGAT AGATTACAAG TGGATACGAA CATCGCAATG 2820
ATTCATGCGG CAGATAAACG CGTTCATAGA ATCCGGGAAG CGTATCTGCC AGAGTTGTCT 2880
GTGATTCCAG GTGTCAATGC GGCCATTTTC GAAGAATTAG AGGGACGTAT TTTTACAGCG 2940
TATTCCTTAT ATGATGCGAG AAATGTCATT AAAAATGGCG ATTTCAATAA TGGCTTATTA 3000
TGCTGGAACG TGAAAGGTCA TGTAGATGTA GAAGAGCAAA ACAACCACCG TTCGGTCTTT 3060
GTTATCCCAG AATGGGAGGC AGAAGTGTCA CAAGAGGTTT GTGTCTGTCC AGGTCGTGGC 3120
TATATCCTTC GTGTCACAGC ATATAAAGAG GGATATGGAG AGGGCTGCGT AACGATCCAT 3180
GAGATCGAAG ACAATACAGA CGAACTGAAA TTCAGCAACT GTGTAGAAGA GGAAGTATAT 3240
CCAAACAACA CAGTAACGTG TAATAATTAT ACTGGGACTC AAGAAGAATA TGAGGGTACG 3300
TACACTTCTC GTAATCAAGG ATATGACGAA GCCTATGGTA ATAACCCTTC CGTACCAGCT 3360
GATTACGCTT CAGTCTATGA AGAAAAATCG TATACAGATG GACGAAGAGA GAATCCTTGT 3420
GAATCTAACA GAGGCTATGG GGATTACACA CCACTACCGG CTGGTTATGT AACAAAGGAT 3480
TTAGAGTACT TCCCAGAGAC CGATAAGGTA TGGATTGAGA TCGGAGAAAC AGAAGGAACA 3540
TTCATCGTGG ATAGCGTGGG ATTACTCCTT ATGGAGGAA 3579

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1193 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

```

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
1           5           10           15

```

```

Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly

```


930						935						940					
Asp	Lys	Arg	Val	His	Arg	Ile	Arg	Glu	Ala	Tyr	Leu	Pro	Glu	Leu	Ser		
945					950					955					960		
Val	Ile	Pro	Gly	Val	Asn	Ala	Ala	Ile	Phe	Glu	Glu	Leu	Glu	Gly	Arg		
				965					970					975			
Ile	Phe	Thr	Ala	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Asp	Ala	Arg	Asn	Val	Ile	Lys	Asn		
			980					985					990				
Gly	Asp	Phe	Asn	Asn	Gly	Leu	Leu	Cys	Trp	Asn	Val	Lys	Gly	His	Val		
	995						1000					1005					
Asp	Val	Glu	Glu	Gln	Asn	Asn	His	Arg	Ser	Val	Leu	Val	Ile	Pro	Glu		
	1010					1015					1020						
Trp	Glu	Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Glu	Val	Arg	Val	Cys	Pro	Gly	Arg	Gly		
1025					1030					1035					1040		
Tyr	Ile	Leu	Arg	Val	Thr	Ala	Tyr	Lys	Glu	Gly	Tyr	Gly	Glu	Gly	Cys		
				1045					1050						1055		
Val	Thr	Ile	His	Glu	Ile	Glu	Asp	Asn	Thr	Asp	Glu	Leu	Lys	Phe	Ser		
			1060					1065						1070			
Asn	Cys	Val	Glu	Glu	Glu	Val	Tyr	Pro	Asn	Asn	Thr	Val	Thr	Cys	Asn		
	1075						1080					1085					
Asn	Tyr	Thr	Gly	Thr	Gln	Glu	Glu	Tyr	Glu	Gly	Thr	Tyr	Thr	Ser	Arg		
	1090					1095					1100						
Asn	Gln	Gly	Tyr	Asp	Glu	Ala	Tyr	Gly	Asn	Asn	Pro	Ser	Val	Pro	Ala		
1105					1110					1115					1120		
Asp	Tyr	Ala	Ser	Val	Tyr	Glu	Glu	Lys	Ser	Tyr	Thr	Asp	Gly	Arg	Arg		
				1125					1130					1135			
Glu	Asn	Pro	Cys	Glu	Ser	Asn	Arg	Gly	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Thr	Pro	Leu		
			1140					1145					1150				
Pro	Ala	Gly	Tyr	Val	Thr	Lys	Asp	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro	Glu	Thr	Asp		
	1155						1160					1165					
Lys	Val	Trp	Ile	Glu	Ile	Gly	Glu	Thr	Glu	Gly	Thr	Phe	Ile	Val	Asp		
	1170					1175					1180						
Ser	Val	Glu	Leu	Leu	Leu	Met	Glu	Glu									
1185					1190												

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 31:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 16 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

CGTTGCTCTG TTCCCG 16

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 32:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

TCAAATACCA TTGSTAAAAG 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 33:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 3534 Basenpaare
 (B) TYP: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

ATGGATAACA ATCCGAACAT CAATGAATGC ATTCCTTATA ATTGTTTAAG TAACCCTGAA 60
 GTAGAAGTAT TAGGTGGAGA AAGAATAGAA ACTGGTTACA CCCCAATCGA TATTTCTTTG 120
 TCGCTAACGC AATTTCTTTT GAGTGAATTT GTTCCCGGTG CTGGATTTGT GTTAGGACTA 180
 GTTGATATAA TATGGGGAAT TTTTGGTCCC TCTCAATGGG ACGCATTTCT TGTACAAATT 240
 GAACAGTTAA TTAACCAAAG AATAGAAGAA TTCGCTAGGA ACCAAGCCAT TTCTAGATTA 300
 GAAGGACTAA GCAATCTTTA TCAAATTTAC GCAGAATCTT TTAGAGAGTG GGAAGCAGAT 360
 CCTACTAATC CAGCATTAG AGAAGAGATG CGTATTCAAT TCAATGACAT GAACAGTGCC 420
 CTTACAACCG CTATTCCTCT TTTTGCAGTT CAAAATTATC AAGTTCCTCT TTTATCAGTA 480
 TATGTTCAAG CTGCAAATTT ACAATTIATCA GTTTTGAGAG ATGTTTCAGT GTTTGGACAA 540
 AGGTGGGGAT TTGATGCCGC GACTATCAAT AGTCGTTATA ATGATTTAAC TAGGCTTATT 600
 GGCAACTATA CAGATTATGC TGTACGCTGG TACAATACGG GATTAGAACG TGTATGGGGA 660
 CCGGATTCTA GAGATTGGGT AAGGTATAAT CAATTTAGAA GAGAATTAAC ACTAACTGTA 720
 TTAGATATCG TTGCTCTGTT CCCGAATTAT GATAGTAGAA GATATCCAAT TCGAACAGTT 780
 TCCCAATTAA CAAGAGAAAT TTATACAAAC CCAGTATTAG AAAATTTTGA TGGTAGTTTT 840

CGAGGCTCGG	CTCAGGGCAT	AGAAAGAAGT	ATTAGGAGTC	CACATTTGAT	GGATATACTT	900
AACAGTATAA	CCATCTATAC	GGATGCTCAT	AGGGGTTATT	ATTATTGGTC	AGGGCATCAA	960
ATAATGGCTT	CTCCTGTAGG	GTTTTCGGGG	CCAGAATTCA	CTTTTCCGCT	ATATGGAECT	1020
ATGGGAAATG	CAGCTCCACA	ACAACGTATT	GTTGCTCAAC	TAGGTCAGGG	CGTGTATAGA	1080
ACATTATCGT	CCACTTTATA	TAGAAGACCT	TTAATATAG	GGATAAATAA	TCAACAACTA	1140
TCTGTTCTTG	ACGGGACAGA	ATTTGCTTAT	GGAACCTCCT	CAAATTTGCC	ATCCGCTGTA	1200
TACAGAAAAA	GCGGAACGGT	AGATTGCTG	GATGAAATAC	CGCCACAGAA	TACAACGTC	1260
CCACCTAGGC	AAGGATTTAG	TCATCGATTA	AGCCATGTTT	CAATGTTTCG	TCAGGCTTT	1320
AGTAATAGTA	GTGTAAGTAT	AATAAGAGCT	CCTATGTTCT	CTTGGATACA	TCGTAGTGCT	1380
GAATTTAATA	ATATAATTGC	ATCGGATAGT	ATTACTCAA	TACCATTGGT	AAAAGCACAT	1440
ACACTTCAGT	CAGGTACTAC	TGTTGTAAGA	GGGCCCGGGT	TTACGGGAGG	AGATATTCTT	1500
CGACGAACAA	GTGGAGGACC	ATTTGCTTAT	ACTATTGTTA	ATATAAATGG	GCAATTACCC	1560
CAAAGGTATC	GTGCAAGAAT	ACGCTATGCC	TCTACTACAA	ATCTAAGAAT	TTACGTAACG	1620
GTTGCAGGTG	AACGGATTTT	TGCTGGTCAA	TTAACAATAA	CAATGGATAC	CGGTGACCCA	1680
TTAACATTCC	AATCTTTTAG	TTACGCAACT	ATTAATACAG	CTTTTACATT	CCCAATGAGC	1740
CAGAGTAGTT	TCACAGTAGG	TGCTGATACT	TTTAGTTCAG	GGATGAAGT	TTATATAGAC	1800
AGATTTGAAT	TGATTCCAGT	TACTGCAACA	CTCGAGGCTG	AATATAATCT	GGAAAGAGCG	1860
CAGAAGGCCG	TGAATGCGCT	GTTTACGTCT	ACAAACCAAC	TAGGGCTAAA	AACAAATGTA	1920
ACGGATTATC	ATATTGATCA	AGTGTCCAAT	TTAGTTACGT	ATTTATCGGA	TGAATTTTGT	1980
CTGGATGAAA	AGCGAGAATT	GTCCGAGAAA	GTCAAACATG	CGAAGCGACT	CAGTGATGAA	2040
CGCAATTTAC	TCCAAGATTC	AAATTTCAA	GACATTAATA	GGCAACCAGA	ACGTGGGTGG	2100
GGCGGAAGTA	CAGGGATTAC	CATCCAAGGA	GGGGATGACG	TATTTAAAGA	AAATTACGTC	2160
ACACTATCAG	GTACCTTTGA	TGAGTGCTAT	CCAACATATT	TGTATCAAAA	AATCGATGAA	2220
TCAAAATTAA	AAGCCTTTAC	CCGTTATCAA	TTAAGAGGGT	ATATCGAAGA	TAGTCAAGAC	2280
TTAGAAATCT	ATTAATTCG	CTACAATGCA	AAACATGAAA	CAGTAAATGT	GCCAGGTACG	2340
GTTTCCCTAT	GGCCGCTTTC	AGCCCAAAGT	CCAATCGGAA	AGTGTGGAGA	GCCGAATCGA	2400
TGCGCGCCAC	ACCTTGAATG	GAATCCTGAC	TTAGATTGTT	CGTGTAGGGA	TGGAGAAAAG	2460
TGTGCCCATC	ATTCGCATCA	TTTCTCCTTA	GACATTGATG	TAGGATGTAC	AGACTTAAAT	2520

GAGGACCTAG GTGTATGGGT GATCTTTAAG ATTAAGACGC AAGATGGGCA CGCAAGACTA 2580
GGGAATCTAG AGTTTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCGCTAGC TCGTGTGAAA 2640
AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATCGTT 2700
TATAAAGAGG CAAAAGAATC TGTAGATGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATCAATTA 2760
CAAGCGGATA CGAATATTGC CATGATTCAT GCGGCAGATA AACGTGTTCA TAGCATTCGA 2820
GAAGCTTATC TGCCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTCA ATGCGGCTAT TTTTGAAGAA 2880
TTAGAAGGGC GSTATTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT 2940
GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAGAAGAA 3000
CAAAACAACC AACGTTCCGT CCTTGTGTT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA 3060
GTTCTGTCT GTCCGGGTCC TGGCTATATC CTTCTGTGCA CAGCGTACAA GGAGGGATAT 3120
GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC 3180
AACTGCGTAG AAGAGGAAAT CTATCCAAAT AACACGGSTAA CGTGTAAATGA TTATACTGTA 3240
AATCAAGAAG AATACGGAGG TCGGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATAA CGAAGCTCCT 3300
TCCGTACCAG CTGATTATGC GTCAGTCTAT GAAGAAAAT CGTATACAGA TGGACGAAGA 3360
GAGAATCCTT GTGAATTTAA CAGAGGSTAT AGGGATTACA CGCCACTACC AGTTGGTTAT 3420
GTGACAAAAG AATTAGAATA CTTCCCAGAA ACCGATAAGG TATGGATTGA GATTGGAGAA 3480
ACGGAAGGAA CATTATCGT GGACAGCGTG GAATTACTCC TTATGGAGGA ATAG 3534

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1177 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
1 5 10 15
Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly
20 25 30
Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser
35 40 45
Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile
50 55 60

Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65 70 75 80
 Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala
 85 90 95
 Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu
 100 105 110
 Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
 115 120 125
 Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala
 130 135 140
 Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160
 Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser
 165 170 175
 Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg
 180 185 190
 Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp Tyr Ala Val
 195 200 205
 Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
 210 215 220
 Asp Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu Asp Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Arg Tyr Pro
 245 250 255
 Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu
 275 280 285
 Arg Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr
 290 295 300
 Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln
 305 310 315 320
 Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro
 325 330 335
 Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala
 340 345 350
 Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg
 355 360 365

Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp
 370 375 380

Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val
 385 390 395 400

Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln
 405 410 415

Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His
 420 425 430

Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile
 435 440 445

Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala Glu Phe Asn Asn
 450 455 460

Ile Ile Ala Ser Asp Ser Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His
 465 470 475 480

Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly
 485 490 495

Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile
 500 505 510

Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg
 515 520 525

Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu
 530 535 540

Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro
 545 550 555 560

Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr
 565 570 575

Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser
 580 585 590

Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr
 595 600 605

Ala Thr Leu Glu Ala Glu Tyr Asn Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val
 610 615 620

Asn Ala Leu Phe Thr Ser Thr Asn Gln Leu Gly Leu Lys Thr Asn Val
 625 630 635 640

Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Thr Tyr Leu Ser
 645 650 655

Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys
 660 665 670

His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Ser Asn
 675 680 685

Phe Lys Asp Ile Asn Arg Gln Pro Glu Arg Gly Trp Gly Gly Ser Thr
 690 695 700

Gly Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val
 705 710 715 720

Thr Leu Ser Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln
 725 730 735

Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Phe Thr Arg Tyr Gln Leu Arg
 740 745 750

Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr
 755 760 765

Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp
 770 775 780

Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg
 785 790 795 800

Cys Ala Pro His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg
 805 810 815

Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile
 820 825 830

Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile
 835 840 845

Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu
 850 855 860

Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys
 865 870 875 880

Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu
 885 890 895

Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe
 900 905 910

Val Asn Ser Gln Tyr Asp Gln Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met
 915 920 925

Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu
 930 935 940

Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu
 945 950 955 960

Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn
 965 970 975

Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val
980 985 990

Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn Gln Arg Ser Val Leu
995 1000 1005

Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys
1010 1015 1020

Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr
1025 1030 1035 1040

Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu
1045 1050 1055

Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr
1060 1065 1070

Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Val Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala
1075 1080 1085

Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Val Pro Ala
1090 1095 1100

Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Gly Arg Arg
1105 1110 1115 1120

Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Leu
1125 1130 1135

Pro Val Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp
1140 1145 1150

Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp
1155 1160 1165

Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
1170 1175

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

TGCAACACTC GAGGCTGAAT

20

Patentansprüche

1. Isoliertes Nucleinsäuresegment, umfassend ein Gen, welches ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 kodiert.

2. Nucleinsäuresegment nach Anspruch 1, worin das Gen ein Polypeptid mit einer Insektizidaktivität gegenüber *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* oder *Ostrinia nubilalis* kodiert.

3. Nukleinsäuresegment nach Anspruch 2, worin das Nukleinsäuresegment aus dem *Bacillus thuringiensis*-Stamm NRRL B-21579, NRRL B-21580, NRRL B-21581, NRRL B-21635, NRRL B-21636 oder NRRL B-21781 isolierbar ist.

4. Nukleinsäuresegment nach Anspruch 3, worin das Nukleinsäuresegment spezifisch zu einem Nukleinsäuresegment, welches eine Sequenz von SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 33 darstellt oder komplementär dazu ist, hybridisiert.

5. Nukleinsäuresegment nach Anspruch 4, worin das Nukleinsäuresegment die Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 33, oder ein Komplement dazu umfasst.

6. Nukleinsäuresegment nach Anspruch 5, worin das Gen funktionsfähig an einen Promotor, welcher das Gen in einer Wirtszelle exprimiert, gebunden ist.

7. Rekombinanter Vektor, umfassend das Nukleinsäuresegment des Anspruchs 6.

8. Verwendung eines Nukleinsäuresegments gemäß Anspruch 6 zur Herstellung einer insektenresistenten transgenen Pflanze.

9. Verwendung des Nukleinsäuresegments gemäß Anspruch 6, umfassend das Exprimieren des Gens in einer Wirtszelle und Sammeln des exprimierten Polypeptids.

10. Verwendung des Nukleinsäuresegments gemäß Anspruch 6 zur Herstellung einer rekombinanten Polypeptidzusammensetzung.

11. Wirtszelle nach Anspruch 9, worin die Wirtszelle eine Bakterienzelle ist.

12. Wirtszelle nach Anspruch 11, worin die Zelle eine *E. coli*-, *B. thuringiensis*-, *B. subtilis*-, *B. megaterium*- oder eine *Pseudomonas* spp.-Zelle ist.

13. Wirtszelle nach Anspruch 12, worin die Zelle ein *B. thuringiensis*-Stamm NRRL B-21579, NRRL B-21580, NRRL B-21581, NRRL B-21635, NRRL B-21636 oder NRRL B-21781 ist.

14. Wirtszelle nach Anspruch 9, worin die Wirtszelle eine Pflanzenzelle ist.

15. Wirtszelle nach Anspruch 14, worin die Zelle ein Polypeptid mit Insektizidaktivität gegenüber *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* oder *Ostrinia nubilalis* bildet.

16. Verwendung einer Wirtszelle gemäß Anspruch 15 zur Herstellung einer transgenen Pflanze.

17. Zusammensetzung, umfassend ein isoliertes Polypeptid, welches die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 umfasst.

18. Zusammensetzung nach Anspruch 17, worin das Polypeptid gegenüber *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* oder *Ostrinia nubilalis* insektizide Wirkung aufweist.

19. Zusammensetzung nach Anspruch 18, worin das Polypeptid aus dem *Bacillus thuringiensis*-Stamm NRRL B-21579, NRRL B-21580, NRRL B-21581, NRRL B-21635, NRRL B-21636 oder NRRL B-21781 isolierbar ist.

20. Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin das Polypeptid 0,5 Gew.-% bis 99 Gew.-% der Zusammensetzung, vorzugsweise 50 Gew.-% bis 99 Gew.-% der Zusammensetzung umfasst.

21. Zusammensetzung, umfassend ein Polypeptid, herstellbar mittels eines Verfahrens, umfassend die Schritte:

(a) Kultivierung einer Zelle eines *B. thuringiensis*-Stamms NRRL B-21579, NRRL B-21580, NRRL B-21581, NRRL B-21635, NRRL B-21636 oder NRRL B-21781 unter Bedingungen, welche zur Bildung einer Zusammensetzung, welche ein *B. thuringiensis*-Polypeptid von SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 34 umfasst, mit Insektizidwirksamkeit in der Lage sind;

(b) Erhalten der Zusammensetzung aus der Zelle.

22. Verwendung einer Zusammensetzung mit Insektizidaktivität gemäß Anspruch 21 zur Herstellung einer Pflanzenschutzsprühzubereitung.

23. Verfahren zur Herstellung eines *B. thuringiensis*-Kristallproteins, umfassend:

(a) Kultivierung einer Zelle eines *B. thuringiensis*-Stamms NRRL B-21579, NRRL B-21580, NRRL B-21581, NRRL B-21635, NRRL B-21636 oder NRRL B-21781 unter Bedingungen, welche zur Herstellung eines *B. thuringiensis*-Kristallproteins mit Insektizidaktivität wirksam sind; und

(b) Erhalt des *B. thuringiensis*-Kristallproteins aus der Zelle, worin das Kristallprotein ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 und SEQ ID NO: 34.

24. Verfahren zum Abtöten einer Insektenzelle, umfassend das Bereitstellen einer insektizidwirksamen Menge einer Zusammensetzung gemäß Ansprüchen 17 bis 21 in einer Insektenzelle.

25. Verfahren nach Anspruch 24, worin die Insektenzelle in einem Insekt umfasst ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, worin das Insekt die Zusammensetzung durch Einnahme einer mit der Zusammensetzung beschichteten Pflanze zu sich nimmt.

27. Verfahren nach Anspruch 25, worin das Insekt die Zusammensetzung durch Einnahme einer transgenen Pflanze, welche die Zusammensetzung exprimiert, zu sich nimmt.

28. Transgene Pflanze oder Samen davon mit in deren/dessen Genom eingefügtem Transgen, welches ein Polypeptid kodiert, umfassend die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 und SEQ ID NO: 34.

29. Transgene Pflanze oder Samen davon nach Anspruch 28, worin das Transgen die Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 und SEQ ID NO: 33 umfasst.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

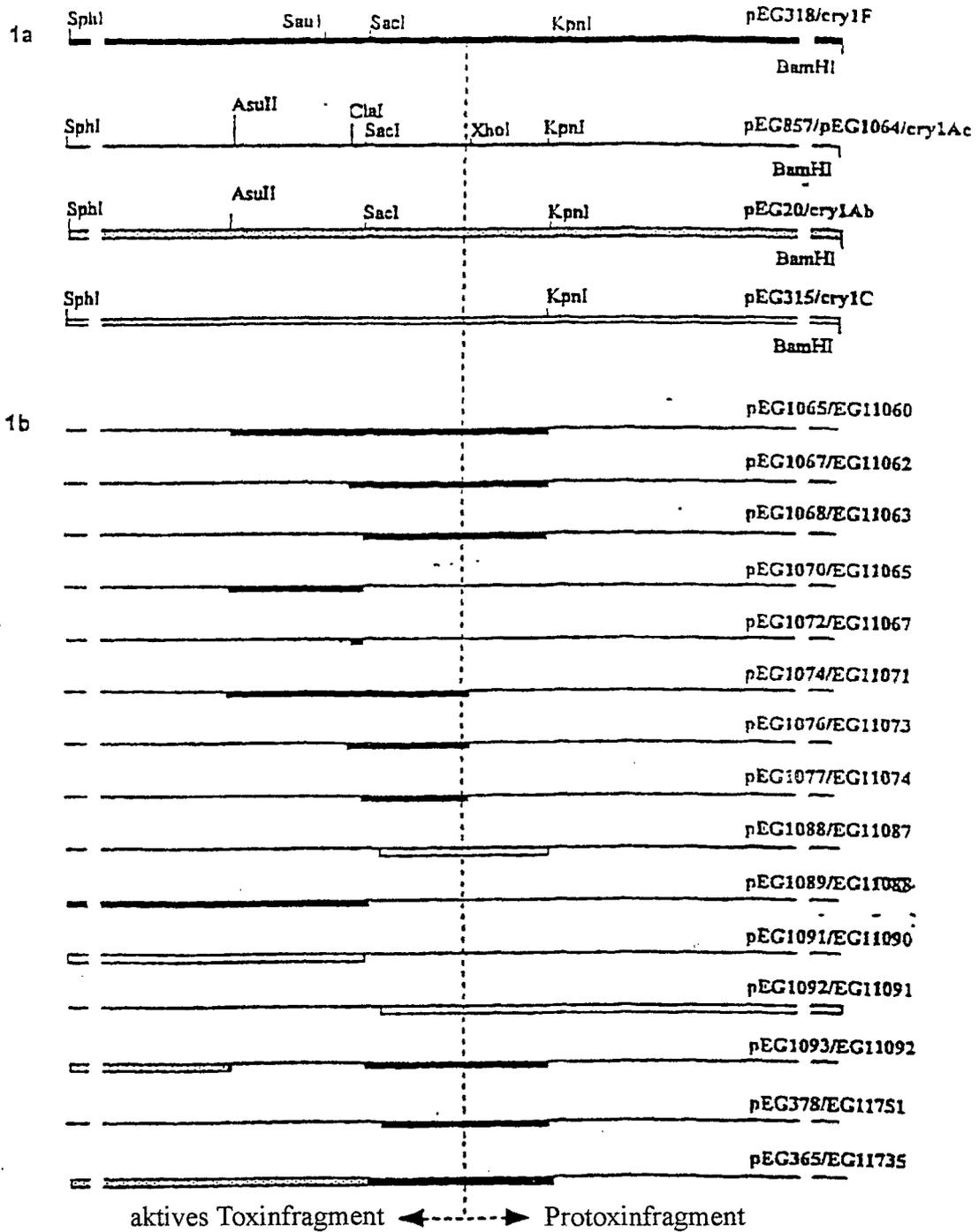


FIG. 1

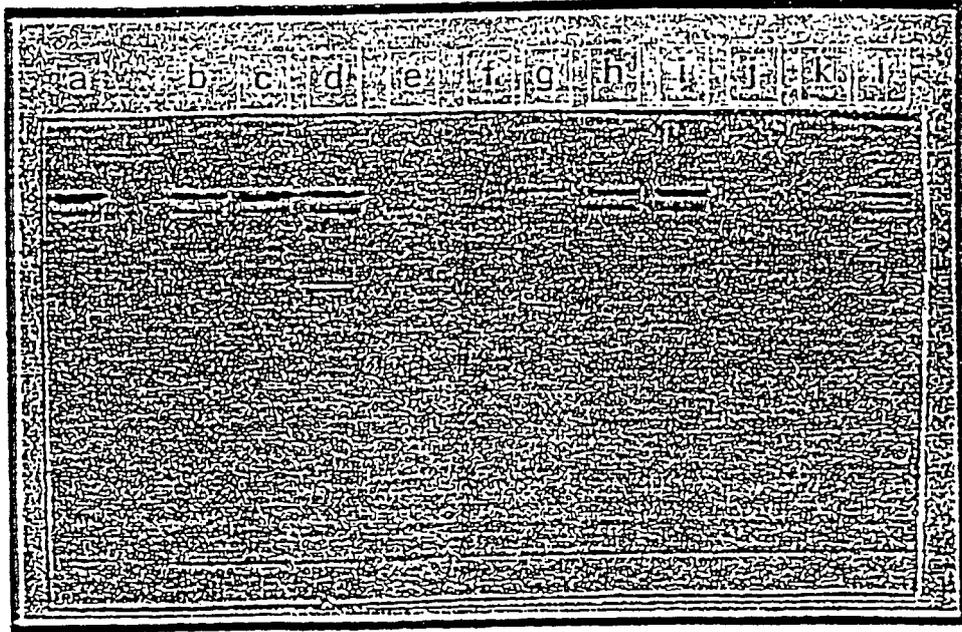


FIG. 2

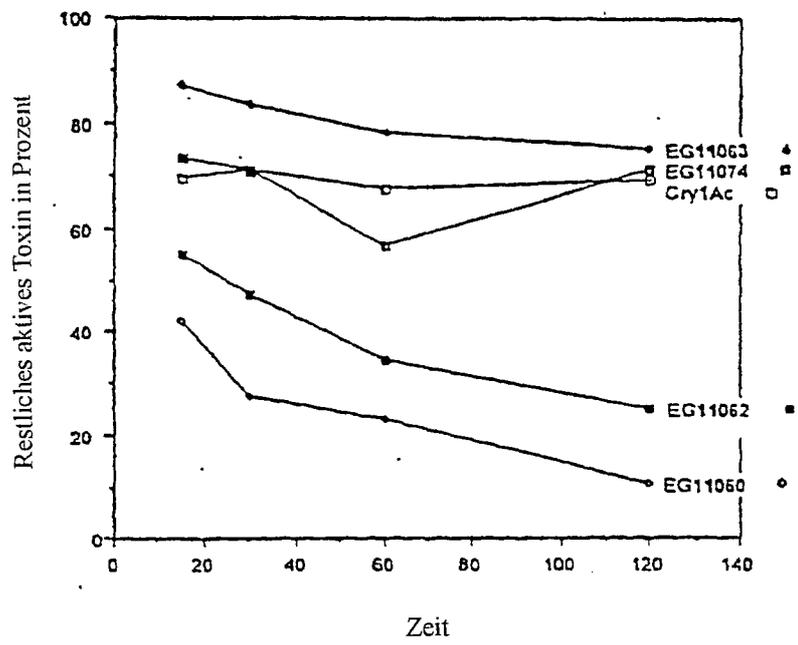


FIG. 3

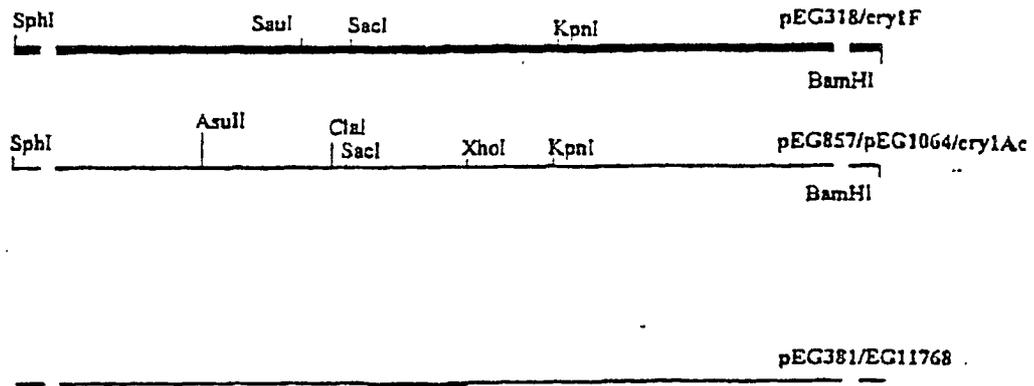


FIG. 4