

Renate Kaiser-Alexnat¹, Jürg Huber¹, Wolfgang Büchs², Gustav-Adolf Langenbruch¹

Untersuchungen zur Verarbeitung der *B.t.*-Toxine Cry3Bb1 und Cry34Ab1/Cry35Ab1 im Mitteldarm des Westlichen Maiswurzelbohrers

Studies on the processing of *B.t.*-toxins Cry3Bb1 and Cry34Ab1/Cry35Ab1 in the midgut of Western corn rootworm

185

Zusammenfassung

Der Westliche Maiswurzelbohrer ist einer der wirtschaftlich bedeutendsten Maisschädlinge weltweit. Eine Bekämpfungsmöglichkeit stellt der Anbau von *B.t.*-Mais dar. Ein großflächiger Anbau von *B.t.*-Mais erhöht jedoch die Wahrscheinlichkeit der Provozierung einer Resistenzentwicklung gegenüber den jeweils verwendeten *B.t.*-Toxinen. Um Testsysteme zu erstellen, die im Falle einer Resistenzentwicklung zur Aufklärung der Resistenzmechanismen herangezogen werden können, wurden verschiedene Parameter zur Verarbeitung von *B.t.*-Toxinen im Mitteldarm von L3 Larven des Westlichen Maiswurzelbohrers untersucht.

Zur Identifizierung der im Darmsaft vorhandenen Proteasen und Quantifizierung ihrer Aktivitäten wurden photometrische Tests durchgeführt. Da der Darmsaft des Westlichen Maiswurzelbohrers mit einem durchschnittlichen pH-Wert von 5,75 leicht sauer ist, war anzunehmen, dass vor allem Proteasen mit saurem pH-Optimum aktiv wären, was die hohen Aktivitäten der Cystein-Endopeptidasen Cathepsin L mit Papain, gefolgt von Cathepsin B und Cathepsin H bestätigten. Die Aspartat-Endopeptidase Pepsin – eine Protease mit stark saurem pH-Optimum – wurde ebenfalls nachgewiesen. Aber auch andere Proteasen aus weiteren Klassen wurden identifiziert. Neben den Serin-Endopeptidasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase wurden die zur gleichen Klasse gehörigen Proteasen Cathepsin G, Plasmin und Thrombin nachgewiesen. Auch die Metallo-Endopeptidase Saccharolysin und die

Exopeptidase Aminopeptidase sowie eine Omegapeptidase waren im Darmsaft des Westlichen Maiswurzelbohrers aktiv.

Weiterhin wurde untersucht, ob wirksame *B.t.*-Toxine mit Darmsaft des Westlichen Maiswurzelbohrers abgebaut werden. Doch weder das 77 kDa Toxin Cry3Bb1 noch die binären Toxine Cry34Ab1 (14 kDa) und Cry35Ab1 (44 kDa) wurden mit Darmsaft abgebaut. Danach scheinen die Toxine – im Unterschied zu denen in *B.t.*-Pflanzenschutzmitteln – in einer aktiven Form vorzuliegen.

Die Ligand-Blot Bindungsstudien mit den *B.t.*-Toxinen Cry3Bb1 und Cry34Ab1/Cry35Ab1 deuten auf verschiedene spezifische Rezeptoren in der Darmwand hin, die Molekulargewichte von ca. 30 kDa (Cry3Bb1), 110 kDa (Cry34Ab1) und 50 kDa (Cry35Ab1) aufweisen.

Stichwörter: Westlicher Maiswurzelbohrer, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, *B.t.*-Mais, *B.t.*-Toxine, Cry3Bb1, Cry34Ab1/Cry35Ab1, Resistenzmechanismen, Darmsaft, Darmwand, pH-Wert, Protease-Aktivität, proteolytischer Abbau, Bindungsstudien

Abstract

The Western corn rootworm is one of the most economically important pests in corn worldwide. One possibility for controlling this pest is the cultivation of *B.t.*-corn. However, widespread cultivation of *B.t.*-corn may in-

Institut

Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt,¹
Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Braunschweig²

Kontaktanschrift

Dr. Renate Kaiser-Alexnat, Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Heinrichstrasse 243, 64287 Darmstadt, Deutschland, E-Mail: renate.kaiser-alexnat@jki.bund.de

Zur Veröffentlichung angenommen

April 2009

crease the probability of the development of pest populations resistant to the respective *B.t.*-toxins. To establish test systems for the identification of resistance mechanisms in the case of resistance development, different parameters involved in the processing of *B.t.*-toxins in the midgut of Western corn rootworm third instars larvae were studied.

For the identification of proteases in the midgut juice and quantification of their activities photometrical tests were conducted. Due to the acid midgut juice of the Western corn rootworm (pH 5.75), mainly proteases with acidic pH optimum were expected. Accordingly, high activities of the cysteine endopeptidases cathepsin L with papain as well as cathepsin B and cathepsin H were observed. Activity of the aspartic endopeptidase pepsin – a protease with very acidic pH optimum – was detected as well. Furthermore proteases from different classes were identified. Besides the serine endopeptidases trypsin, chymotrypsin, and elastase, proteases of the same class – cathepsin G, plasmin, and thrombin – were identified. In addition, the metallo endopeptidase saccharolysin as well as the exopeptidase aminopeptidase and an omegapeptidase were active in the midgut juice of the Western corn rootworm.

Furthermore, the proteolytic processing of effective *B.t.*-toxins with Western corn rootworm midgut juice was examined. But neither the 77 kDa toxin Cry3Bb1 nor the binary toxins Cry34Ab1 (14 kDa) and Cry35Ab1 (44 kDa) were processed with midgut juice. Thus, in contrast to the *B.t.* plant protection agents, the toxins seem to be in an active form.

The Ligand-blot binding analyses with the *B.t.*-toxins Cry3Bb1 and Cry34Ab1/Cry35Ab1 revealed specific receptors in the WCR midgut epithelium. The molecular weights for Cry3Bb1, Cry34Ab1, and Cry35Ab1 receptors were characterized as having molecular weights of approximately 30 kDa, 110 kDa, and 50 kDa, respectively.

Key words: Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, *B.t.*-corn, *B.t.*-toxins, Cry3Bb1, Cry34Ab1/Cry35Ab1, resistance mechanisms, gut juice, gut epithelium, pH value, protease activity, proteolytic processing, binding analyses

Einleitung

Der Westliche Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) ist – neben dem Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis* Hübner) – weltweit der wirtschaftlich bedeutendste Maisschädling. Die Hauptbefallsgebiete sind in den USA zu verzeichnen. In Europa wurde er Anfang der 90er Jahre erstmals beobachtet und breitet sich seitdem – ausgehend von Südosteuropa – zunehmend aus. In Deutschland wurden im Juli 2007 die ersten Käfer in Bayern und Baden-Württemberg gefunden (BAUFELD, 2008).

Die Weibchen des Westlichen Maiswurzelbohrers legen ihre Eier im August in den Boden, wo sie in einer Tie-

fe von bis zu 30 cm überwintern. Der Larvenschlupf erfolgt im darauf folgenden Jahr Mitte Juni bis Ende Juli. Den Hauptschaden verursachen die Larven durch ihren Fraß an den Maiswurzeln (BAUFELD, 2008).

Da die Larven sich an den Wurzeln – also im Boden – aufhalten, sind sie für eine direkte Bekämpfung schwer zu erreichen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Larven durch einen Fruchtwechsel sehr wirkungsvoll dezimiert werden können. In Befallsgebieten mit intensivem Maisanbau werden Insektizide (Saatgutinkrustierung oder Bodengranulat) gegen die Larven eingesetzt (BAUFELD, 2007).

In der Literatur gibt es Hinweise auf verschiedene Toxine des Bodenbakteriums *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) mit Wirksamkeit gegenüber dem Westlichen Maiswurzelbohrer, wenngleich es – mit Ausnahme von Novodor FC, einem *B.t.*-Präparat mit Wirksamkeit gegenüber Kartoffelkäferlarven – keine *B.t.*-Präparate gegen Blattkäfer gibt. So nennen BAUM et al., (2004) eine Reihe von *B.t.*-Toxinen mit Wirksamkeit gegenüber Larven des Wurzelbohrers wie beispielsweise Cry3, Cry8, Cry6Aa1, Cyt1Ba1, Cyt2Ca1 sowie die während des vegetativen Bakterienwachstums ausgeschiedenen Proteine Vip1 und Vip2. Weiterhin berichten DONOVAN et al. (2006) erstmals von einem ca. 41 kDa SipA Protein, dem ersten Mitglied einer neuen Klasse von *B.t.*-Proteinen, wobei die Abkürzung von „Secreted insecticidal proteins“ abgeleitet ist. Aufgrund der Wirksamkeit gegenüber Coleopteren-Larven ist das Aktivitätsspektrum von SipA ähnlich dem von Cry3A und Cry3Bb Kristallproteinen. SipA führt zu hohen Mortalitäten bei Larven des Kartoffelkäfers und einem geringeren Effekt gegenüber Larven des Südlichen und Westlichen Maiswurzelbohrers.

Eine weitere Familie insektizider parasporaler Kristallproteine mit Wirksamkeit gegenüber *Diabrotica*-Larven umfasst die *B.t.*-Toxine Cry34 und Cry35 (ELLIS et al., 2002). In Mischungen hatte das 14 kDa Protein (Cry34) einen größeren Einfluss auf die Effektivität als die 44 kDa (Cry35) Komponente (HERMAN et al., 2002). BAUM et al. (2004) zeigten anhand von Biotests, dass beide Proteinklassen für die insektizide Wirksamkeit gegenüber dem Westlichen Maiswurzelbohrer erforderlich sind. Daher werden sie auch als binäre insektizide Kristallproteine bezeichnet (DE MAAGD et al., 2003). SCHNEPF et al. (2005) stellten fest, dass das Cry34A/Cry35A Paar aktiver war als das Cry34B/Cry35B Paar. Die Gene, die für die Bildung des binären Kristallproteins Cry34Ab1/Cry35Ab1 codieren, wurden in transgenen Mais übertragen, der auch in Feldtests resistent gegenüber dem Westlichen Maiswurzelbohrer war (MOELLENBECK et al., 2001).

In den USA kommt seit 2003 vermehrt gentechnisch veränderter Mais (*B.t.*-Mais) mit Wirksamkeit gegenüber dem Maiswurzelbohrer zur Anwendung (BAUFELD, 2007). Beim *B.t.*-Mais handelt es sich um transgenen Mais, auf den Gene des Bodenbakteriums *Bacillus thuringiensis* – kurz *B.t.* – übertragen wurden, die für spezifische insektizid wirksame *B.t.*-Toxine codieren (KAISER-ALEXNAT, 2008). Zunächst wurde *B.t.*-Mais mit Wirksamkeit gegenüber dem Maiszünsler und schließlich auch gegenü-

ber dem Westlichen Maiswurzelbohrer entwickelt. Inzwischen ist bereits eine neue Generation *B.t.*-Mais verfügbar, die *B.t.*-Toxine gegen beide Maisschädlinge enthält („Stacked Insect Resistance“) und gleichzeitig herbizid-resistent ist.

Zurzeit gibt es verschiedene *B.t.*-Mais-Linien mit Wirksamkeit gegenüber dem Maiszünsler und dem Westlichen Maiswurzelbohrer. Von der Firma Monsanto wird das *B.t.*-Toxin Cry1Ab (z.B. bei Event MON 810) gegen den Maiszünsler verwendet. Weiterhin bieten die Firmen DOW AgroSciences und Pioneer *B.t.*-Mais mit dem *B.t.*-Toxin Cry1F (Event DAS-06275-8) an, das nicht nur gegen den Maiszünsler, sondern auch eine Reihe weiterer schädigender Lepidopteren wirksam ist. Für *B.t.*-Mais mit Wirksamkeit gegenüber dem Westlichen Maiswurzelbohrer wurde bei der Firma Monsanto das *B.t.*-Toxin Cry3Bb1 (z.B. bei Event MON 863 und MON 88017), bei Syngenta Cry3A (Event MIR604) und bei DOW AgroSciences und Pioneer das binäre *B.t.*-Toxin Cry34Ab1/Cry35Ab1 (Event DAS-59122-7) verwendet (siehe <http://www.agbios.com>). Ein großflächiger Anbau von *B.t.*-Mais erhöht jedoch die Wahrscheinlichkeit der Provozierung einer Resistenzentwicklung der Maisschädlinge gegenüber den jeweiligen *B.t.*-Toxinen.

Die Resistenz von Insekten gegenüber *B.t.*-Toxinen kann an jedem Schritt des spezifischen Wirkungsmechanismus ansetzen. Dieser umfasst bei den nativen *B.t.*-Toxinen zunächst die Aufnahme mit der Nahrung und die pH abhängige Lösung im Mitteldarm. Da die *B.t.*-Toxine Proteine sind, schließt deren weitere Verarbeitung den enzymatischen Abbau mit Proteasen des Darmsaftes (proteolytischer Abbau) ein. Dann folgt die Anlagerung an spezifische Rezeptoren der Darmwand (Bindung), die Integration in die Membran und schließlich die Bildung von Poren, was zur Auflösung der Darmwandzellen führt und den Tod des Insekts zur Folge hat (FERRÉ und VAN RIE, 2002).

Die bisher bei anderen Insekten beschriebenen Resistenzmechanismen gegenüber *B.t.*-Toxinen sind meist Protease- oder Rezeptor-bedingt. Die Protease-bedingten Resistenzen beruhen auf Veränderungen des Protease-Spektrums oder der Protease-Aktivitäten. Den Rezeptor-bedingten Resistenzen liegt eine verringerte Bindung des Toxins an die spezifischen Rezeptoren der Darmwand zugrunde. Zusätzlich können Veränderungen von physiologischen Parametern – wie beispielsweise dem pH-Wert des Darmsaftes – den Abbau der *B.t.*-Toxine beeinflussen (LIU und TABASHNIK, 1997; MCGAUGHEY und OPPERT, 1998; OPPERT et al., 1997; WRIGHT et al., 1997).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Testsysteme erstellt, die im Falle einer Resistenzentwicklung des Westlichen Maiswurzelbohrers gegenüber den untersuchten *B.t.*-Toxinen zur Aufklärung von Protease- oder Rezeptor-bedingten Resistenzmechanismen herangezogen werden können. Dazu wurde im Einzelnen untersucht, welche Proteasen im Darmsaft vorhanden sind, welche Aktivitäten die vorhandenen Proteasen aufweisen und welche Proteasen für einen möglichen

Abbau der *B.t.*-Toxine infrage kommen. Weiterhin wurde ein Methodenpaket zur Durchführung von Bindungsstudien etabliert um die Anlagerung der untersuchten *B.t.*-Toxine an spezifische Rezeptoren der Darmwand nachzuweisen.

In einer früheren Arbeit wurden im Institut für Biologischen Pflanzenschutz des Julius Kühn-Instituts (JKI) in Darmstadt bereits verschiedene Parameter zur Verarbeitung des *B.t.*-Mais-Toxins Cry1Ab an L5 Larven des Maiszünslers untersucht (KAISER-ALEXNAT und WAGNER, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde in analoger Weise der Verarbeitung des *B.t.*-Mais-Toxins Cry3Bb1 und des binären *B.t.*-Toxins Cry34Ab1/Cry35Ab1 im Mitteldarm von L3 Larven des Westlichen Maiswurzelbohrers nachgegangen.

Material und Methoden

Ausgangsmaterial

Die Untersuchungen wurden mit Darmsaft- und Darmwand-Material von L3 Larven eines europäischen *Diabrotica*-Stammes durchgeführt. Da der Westliche Maiswurzelbohrer in Deutschland ein Quarantäneschädling ist, wurden die Anzucht der erforderlichen Larven und die Präparation der Mitteldärme in der Quarantänestation der BTL Bio-Test Labor GmbH vorgenommen. Von dort wurden die Mitteldärme per Tiefkühl-Express-Versand zum Institut für Biologischen Pflanzenschutz des JKI in Darmstadt verschickt.

Aus den präparierten Mitteldärmen wurde in Darmstadt zunächst der Darmsaft durch Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5417R; 30 min; 20 000 g) gewonnen. Um 1 µl Darmsaft zu gewinnen wurden ca. 5 Mitteldärme benötigt.

pH-Bestimmung

Nach der Zentrifugation wurde bei jeder Einzelprobe – bestehend aus ca. 50 Mitteldärmen – der pH-Wert mit einer Mikroelektrode (Microelectrodes; Bedford, USA; Model MI-414-2-E) im Überstand bestimmt und anschließend aus den Einzelproben eine Mischprobe hergestellt. Letztere wurde weiter zentrifugiert und der Überstand entnommen. Der so gewonnene Darmsaft wurde bei –28°C gelagert.

Photometrische Tests

Zur Identifizierung der im Darmsaft vorhandenen Proteasen und Quantifizierung ihrer Aktivitäten wurden photometrische Tests mit Substraten und Inhibitoren durchgeführt (Tab. 1). Während in der Literatur viele Inhibitoren gegen Serin- und Cystein-Endopeptidasen beschrieben werden (BARRETT et al., 1986; TURK und BODE, 1991), ist nur wenig über Inhibitoren für Aspartat-Endopeptidasen bekannt (RYAN, 1990; JOUANIN et al., 1998). Lediglich Pepstatin A wurde von verschiedenen Autoren (RYMERSON und BODNARYK, 1995; BLANCO-LABRA et al., 1996; OPPERT et al., 2003) als spezifischer Inhibitor für die Aspartat-Endopeptidase Pepsin genannt.

Tab. 1. Verwendete photometrische Testsysteme zum Nachweis von Proteasen

Protease-Klassen	Proteasen	Substrate	Bezug	Inhibitoren	Bezug
Serin-Endopeptidasen	Trypsin	BA pNA (N-Benzoyl-L-Arg pNA · HCl)	Sigma Aldrich	TLCK (N-p-Tosyl-L-Lys Chloromethylketon-HCl) SBTI (Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor)	Sigma Aldrich Sigma Aldrich
	Chymotrypsin	SAAF pNA (N-Succinyl-Ala-Ala-Phe pNA)	Sigma Aldrich	TPCK (N-Tosyl-L-Phe Chloromethylketon) PMSF (Phenylmethansulfonyl Fluorid)	Sigma Aldrich Calbiochem
	Elastase	SAAPL pNA (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu pNA)	Sigma Aldrich	Elastatinal	Calbiochem
	Cathepsin G	N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Met pNA	Sigma Aldrich	PMSF (Phenylmethansulfonyl Fluorid)	Calbiochem
	Granzyme B	Ac-Ile-Glu-Pro-Asp pNA	Bachem AG	–	–
	Plasmin	Isovaleryl-Phe-Lys pNA · HCl	Bachem AG	PMSF, Elastatinal	Calbiochem
	Subtilisin	Z-Gly-Gly-Leu pNA	Bachem AG	–	–
	Thrombin	Sar-Pro-Arg pNA	Bachem AG	PMSF, TLCK	Calbiochem
Cystein-Endopeptidasen	Cathepsin L, Papain	Z-Phe-Arg pNA HCl (N-Benzyl-oxycarbonyl-Phenylalanyl-Arginin pNA)	Bachem AG	E-64 (L-trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamid [4-Guanidino] Butan), PMSF (Phenylmethansulfonyl Fluorid)	Calbiochem
	Cathepsin L	Z-Phe-Arg pNA HCl (N-Benzyl-oxycarbonyl-Phenylalanyl-Arginin pNA)	Bachem AG	Z-Phe-Tyr(tBu)-Diazomethylketon Z-Phe-Tyr-CHO	Bachem AG Calbiochem
	Papain	Ac-Arg pNA · HCl (Acetat-Argenin pNA · HCl)	Bachem AG	E-64 (L-trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamid [4-Guanidino] Butan)	Calbiochem
	Cathepsin B	Z-Arg-Arg pNA·2 HCl (N-Benzyl-oxycarbonyl-Arginin-Arginin pNA)	Bachem AG	E-64 (L-trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamid [4-Guanidino] Butan)	Calbiochem
	Cathepsin H	H-Arg pNA · 2 HCl	Bachem AG	E-64 (L-trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamid [4-Guanidino] Butan)	Calbiochem
	Caspase	N-Acetyl-Val-Ala-Asp pNA	Sigma Aldrich	E-64 (L-trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamid [4-Guanidino] Butan)	Calbiochem
Aspartat-Endopeptidasen	Pepsin	Azoalbumin Azocasein Azocoll HPA (Hide Powder Azure)	Sigma Aldrich Calbiochem	Pepstatin A	Calbiochem
	Metallo-Endopeptidasen	Astacin	Suc-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala pNA	Bachem AG	–
	Saccharolysin	Ac-Ala-Ala-Pro-Phe pNA	Bachem AG	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth
Exopeptidasen	Aminopeptidase	LpNA (Leucin pNA)	Sigma Aldrich	Bestatin	Sigma Aldrich
	Carboxypeptidase A	Hip-Phe (Hippuryl-Phenylalanin)	Sigma Aldrich	CPIP (Carboxypeptidase Inhibitor from Potato)	Calbiochem
	Carboxypeptidase B	Hip-Arg (Hippuryl-Arginin)	Sigma Aldrich	CPIP (Carboxypeptidase Inhibitor from Potato)	Calbiochem
	Omegapeptidasen (z.B. Acylamino-acylpeptidase)	Ac-Ala pNA	Bachem AG	PMSF, E-64 EDTA	Calbiochem Roth

Peptidyl-*p*-Nitroanilid Substrate. Soweit verfügbar wurden spezifische Peptidyl-*p*-Nitroanilid (*p*NA) Substrate verwendet, die nur von bestimmten Proteasen abgebaut werden. Wenn die gesuchte Protease im Darmsaft vorhanden ist, wird das *p*NA Substrat in Oligopeptide und das chromogene Nitroanilin gespalten, und es kommt zu einer Gelbfärbung, die photometrisch gemessen wird. Die Höhe des Substratumsatzes und damit die Intensität der Farbreaktion ist ein Anhaltspunkt für die Aktivität der angesprochenen Protease. Durch Zugabe steigender Konzentrationen spezifischer Protease-Inhibitoren wird der Substratumsatz immer stärker gehemmt. Die Kombination aus geeignetem Substrat und geeignetem Inhibitor führt zum Nachweis der jeweiligen Protease.

Für jede photometrische Messung wurde die Messlösung in Einmal-Küvetten aus Polystyrol frisch angesetzt. Die jeweils 500 µl Messlösung setzte sich bei den Proben mit reinem Substrat aus 10 µl Darmsaft (1:10 verdünnt mit Tricin-Puffer), 10 µl Tricin-Puffer (20 mM Tricin; pH 5,75) und 480 µl Substratlösung (0,2 mM Substrat in Tricin-Puffer) zusammen. Für die Proben mit Inhibitor wurde statt 10 µl Tricin-Puffer 10 µl Inhibitorlösung mit steigenden Inhibitor-Konzentrationen zugegeben. Es wurden stets 3 Wiederholungen durchgeführt. Die Messung erfolgte mit dem „UVIKON Spektrometer 922“ bei 405 nm mit 50 Messungen pro Minute. Als Zeitintervall zwischen erstem und letztem Messwert wurden 10 Minuten gewählt. Die Umrechnung der Extinktionswerte in Konzentrationen erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

Allgemeine Protease-Substrate. Für Aspartat-Endopeptidasen waren keine spezifischen *p*NA Substrate verfügbar. Daher wurden allgemeine Protease-Substrate eingesetzt, die von einer Vielzahl Proteasen geschnitten werden. Auch bei diesen Testsystemen basiert die Bestimmung der Protease-Aktivitäten auf dem Substratumsatz, der mit der Bildung von farbstoffmarkierten Peptiden einhergeht. Die Abbauprodukte bleiben in Lösung, während die intakten Proteine ausfallen und durch Zentrifugation abgetrennt werden. Dann wird die Farbreaktion im Überstand photometrisch gemessen. Die photometrischen Messungen wurden bei der für das jeweilige Substrat optimalen Wellenlängen durchgeführt (Azocasein und Azalbumin bei 440 nm, Azocoll bei 525 nm, HPA bei 595 nm; Methodik in Anlehnung an BEYNON und BOND, 2001).

B.t.-Toxine

Cry3Bb1. Für *B.t.*-Mais mit Wirksamkeit gegenüber dem Westlichen Maiswurzelbohrer wird von der Firma Monsanto das *B.t.*-Toxin Cry3Bb1 aus *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* verwendet. Das für die vorliegenden Untersuchungen von Monsanto bereitgestellte Toxin wurde in *E. coli* produziert.

Cry34Ab1/Cry35Ab1. Das binäre *B.t.*-Toxin Cry34Ab1/Cry35Ab1 wurde im Labor in Darmstadt mit dem *B.t.*-Stamm produziert, aus dem die Firma DOW AgroSciences die codierenden Gene für die Toxine in den entsprechenden *B.t.*-Mais übertragen hat. Dazu wurde der

B.t.-Stamm zunächst vermehrt, um anschließend das bei der Sporulation gebildete binäre Toxin Cry34Ab1/Cry35Ab1 mittels Dichtegradienten durch Zentrifugation zu isolieren (BAUM et al., 2004). Da die Molekulargewichte der beiden Toxine bekannt waren (Cry34Ab1 ca. 14 kDa, Cry35Ab1 ca. 44 kDa; vgl. ELLIS et al., 2002) wurden die isolierten Banden zur Identifikation der Toxine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Um die toxische Wirkung der identifizierten Proteine (Toxine) zu bestätigen, wurden zusätzlich Biotests mit frisch geschlüpften Larven eines *Diabrotica*-verwandten Vergleichsorganismus – dem Ampferblattkäfer (*Gastrophysa viridula*) – durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass mit einer 1:1 Mischung beider Toxine eine Mortalitätsrate von 80% erzielt wurde, während in der Kontrolle mit Wasser alle Larven überlebten.

Proteolytischer Abbau der *B.t.*-Toxine

Die Toxine wurden mit Darmsaft und käuflichen Proteasen inkubiert. Dazu wurden für je zwei Proben 6 µl Toxinlösung (= 28 µg Cry3Bb1; 21 µg Cry34Ab1 bzw. 29 µg Cry35Ab1) in 15,6 µl Puffer (200 mM Tris; 20 mM CaCl₂; pH 5,75) gelöst und 2,4 µl verdünnter Darmsaft bzw. die jeweiligen käuflichen Proteasen zugesetzt. Das Probenvolumen betrug insgesamt 24 µl. Nach 10 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten bzw. 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion im Thermoblock für 5 Minuten bei 95°C gestoppt. Für die Probenaufarbeitung wurde der Lämmli Denaturierungs-Puffer der Firma Roth (Roti-Load1 no. K929.1) verwendet.

Da keine aufgereinigten *Diabrotica*-Proteasen zur Verfügung stehen, wurden ersatzweise käufliche Proteasen verwendet, weil diese wie vielfach gezeigt dieselbe Schnittspezifität haben und somit zu gleichen Toxin-Schnittmustern führen. Folgende käufliche Proteasen wurden eingesetzt: Trypsin (bovine pancreas, 2 mg/ml), Chymotrypsin (bovine pancreas, 2 mg/ml), Elastase (porcine pancreas, 1 mg/ml), Cathepsin G (human leukocytes, 0,25 U in 100 µL 50% Ethanol), Plasmin (human plasma, 150 U in 500 mL Ethanol), Thrombin (bovine, 100 U in 500 mL Ethanol), Aminopeptidase (porcine kidney, 1 mg/ml), Cathepsin L (*Paramecium tetraurecia*, 500 mU), Papain (*Papaya carica*, 2 mg/ml), Cathepsin B (bovine spleen, 10 U/ml), Cathepsin H (human liver, 25 µg in 100 µL 50% Ethanol), Ficin (tree latex, 10 U in 500 mL Ethanol), Bromelain (pineapple stem, 2,5% in 50% Ethanol + DMSO), Clostripain (*Clostridium histolyticum*, 250 U in 1000 mL 50% Ethanol + DMSO), Calpain II (rabbit skeletal muscle, 5 U in 100 mL Ethanol) und Pepsin (porcine gastric mucosa, 2% in Ethanol).

Da es sich bei *B.t.*-Toxinen um Proteine handelt, wurden sie bzw. ihre Abbauprodukte mit Hilfe der SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat – Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese) Technik dargestellt. Es wurden 12%ige Fertig-Gele der Firma BioRad verwendet. Die aufgetragene Probenmenge betrug 11 µl.

Zur Identifikation der Banden wurden Molekulargewichtsmarker mit 12 bis 76–78 kD (Low) und 43 kDa bis 200 kDa (High) der Firma BDH Laboratory Supplies Poo-

le in England verwendet. Beide Marker haben Doppelbanden bei 76 und 78 kDa (Ovotransferrin aus Hühner-*e*), sodass die Toxinbande von Cry3Bb1 bei 77 kDa eindeutig identifiziert werden konnte.

Bindungsstudien

Um die Anlagerung der *B.t.*-Toxine an die Rezeptoren der Darmwand zu untersuchen, wurden sogenannte Bindungsstudien durchgeführt. Hierzu wurden zunächst intakte BBMV's (Brush Border Membrane Vesicles) aus dem Darmwand-Material (Epithelien) hergestellt und die *B.t.*-Toxine wurden mittels Biotinylierung markiert. Mit Hilfe der Ligand-Blot Technik wurden die BBMV's aufgetrennt und mit dem biotinylierten Toxin inkubiert. Zum Nachweis der Bindung wurden das Biotin und damit indirekt auch das Toxin mit einem Streptavidin-Meerettich-Peroxidase-Konjugat gekoppelt, wobei das Streptavidin stark an das Biotin bindet. Die Peroxidase katalysierte die Umsetzung der zugeführten ECL-Reagenzien. Dabei wurden Photonen frei, die auf einem Röntgenfilm dokumentiert wurden (vgl. Abb. 1).

Epithelien-Gewinnung. Das erforderliche Darmwand-Material für die Bindungsstudien – die Epithelien – wurden von der BTL Biotest Labor GmbH bereitgestellt. Dort wurden die Mitteldärme nach der Präparation der Länge nach aufgeschnitten und der Darminhalt samt peritrophischer Membran – einer chitinhaltigen Ausscheidung des Mitteldarms – entfernt, indem die Epithelien zweibis dreimal in Waschpuffer (200 mM Tris; 20 mM CaCl₂; pH 5,75) geschwenkt wurden.

BBMV-Herstellung. Die BBMV's sind Abschnitte des apikalen Mitteldarmepithels (Bürstensaum), die die Rezeptoren für die *B.t.*-Toxine enthalten. Sie wurden in Anlehnung an die von WOLFERSBERGER et al. (1987) beschriebene Methode hergestellt. Diese Methode umfasst mehrere Arbeitsschritte, bei denen die Mitteldärme zunächst mit einem „Dounce-Homogenizer“ zerkleinert und anschlie-

ßend zentrifugiert werden, um die Pellets immer wieder zu resuspendieren, bis nach mehreren Wiederholungen die intakten BBMV's vorliegen.

Biotinylierung. Die Bindung der *B.t.*-Toxine an die Rezeptoren der Darmwand wurde indirekt durch Biotinylierung der *B.t.*-Toxine sichtbar gemacht. Dazu wurden die Toxine in Anlehnung an DENDOLF et al. (1993) mit Biotin markiert („labeled toxin“).

Ligand-Blot. Beim Ligand-Blot wurden die BBMV's zunächst mittels SDS-Page aufgetrennt und dann mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Um diese Übertragung zu bewerkstelligen, wurde aus Filterpapier, Membran und Gel zwischen zwei Kohleelektrodenplatten ein Sandwich gebaut und elektrische Spannung angelegt. Anschließend wurde die Membran mit den jeweiligen *B.t.*-Toxinen inkubiert, sodass die Toxine sich an die Rezeptoren der BBMV's anlagern konnten (DEMAAGD et al., 1996).

Ergebnisse

pH-Wert des Darmsaftes

Da das Protease-Muster des Darmsaftes aufgrund der verschiedenen pH-Optima der Proteasen sehr stark vom pH-Wert abhängig ist, wurde zunächst der pH-Wert des Darmsaftes ermittelt. Die pH-Werte der Darmsaft-Proben waren sehr homogen (Standardabweichung 0,05) und der Mittelwert lag bei einem pH-Wert von 5,75 (Tab. 2).

Der pH-Wert kann in verschiedenen Darmabschnitten unterschiedlich sein. Daher wurde er auch in verschiedenen Darmabschnitten bestimmt. Dazu wurden die Mitteldärme gedrittelt und die vorderen, mittleren und hinteren Abschnitte getrennt eingefroren. Insgesamt wurden 170 Mitteldärme auf diese Weise präpariert. Der pH-Wert der Mitteldarm-Abschnitte lag durchschnittlich bei 5,75 ($s = 0,11$) in den vorderen, 5,88 ($s = 0,09$) in den mittleren und 6,03 ($s = 0,03$) in den hinteren Abschnitten des Mitteldarms. Es war also eine gewisse Abstufung zu verzeichnen, die jedoch so geringfügig war, dass die Standardabweichungen teilweise höher waren als die Unterschiede zwischen den verschiedenen Darmabschnitten.

Protease-Aktivitäten im Darmsaft

Um die im Darmsaft vorhandenen Proteasen zu identifizieren und ihre Aktivitäten zu quantifizieren wurden photometrische Tests mit spezifischen chromogenen Peptidyl-*p*-Nitroanilid (*p*NA) Substraten und steigenden Konzentrationen spezifischer Protease-Inhibitoren durchgeführt. Die Ergebnisse der photometrischen Tests sind in Abb. 2 dargestellt (vgl. auch KAISER-ALEXNAT, 2009), wobei jede Spalte den Mittelwert und die Standardabweichung von je drei Wiederholungen einer Variante beinhaltet. Die mit "0" gekennzeichneten Spalten quantifizieren die vorherrschende proteolytische Aktivität, während die folgenden Spalten die proteolytische Aktivität bei steigenden Inhibitor-Konzentrationen darstellen.

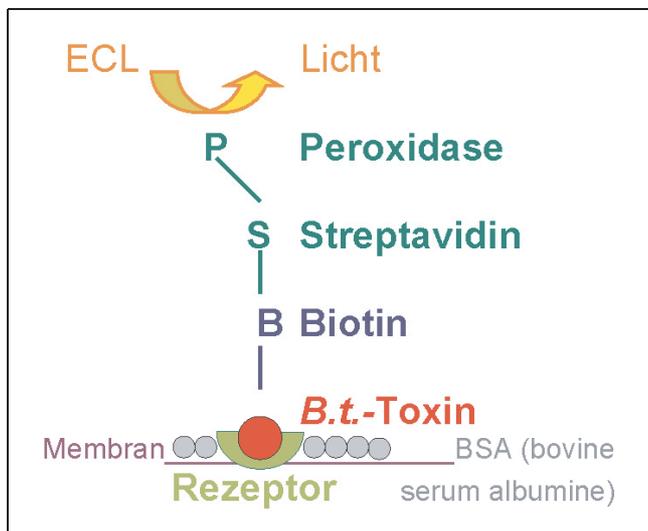


Abb. 1. Schema der Bindungsstudien.

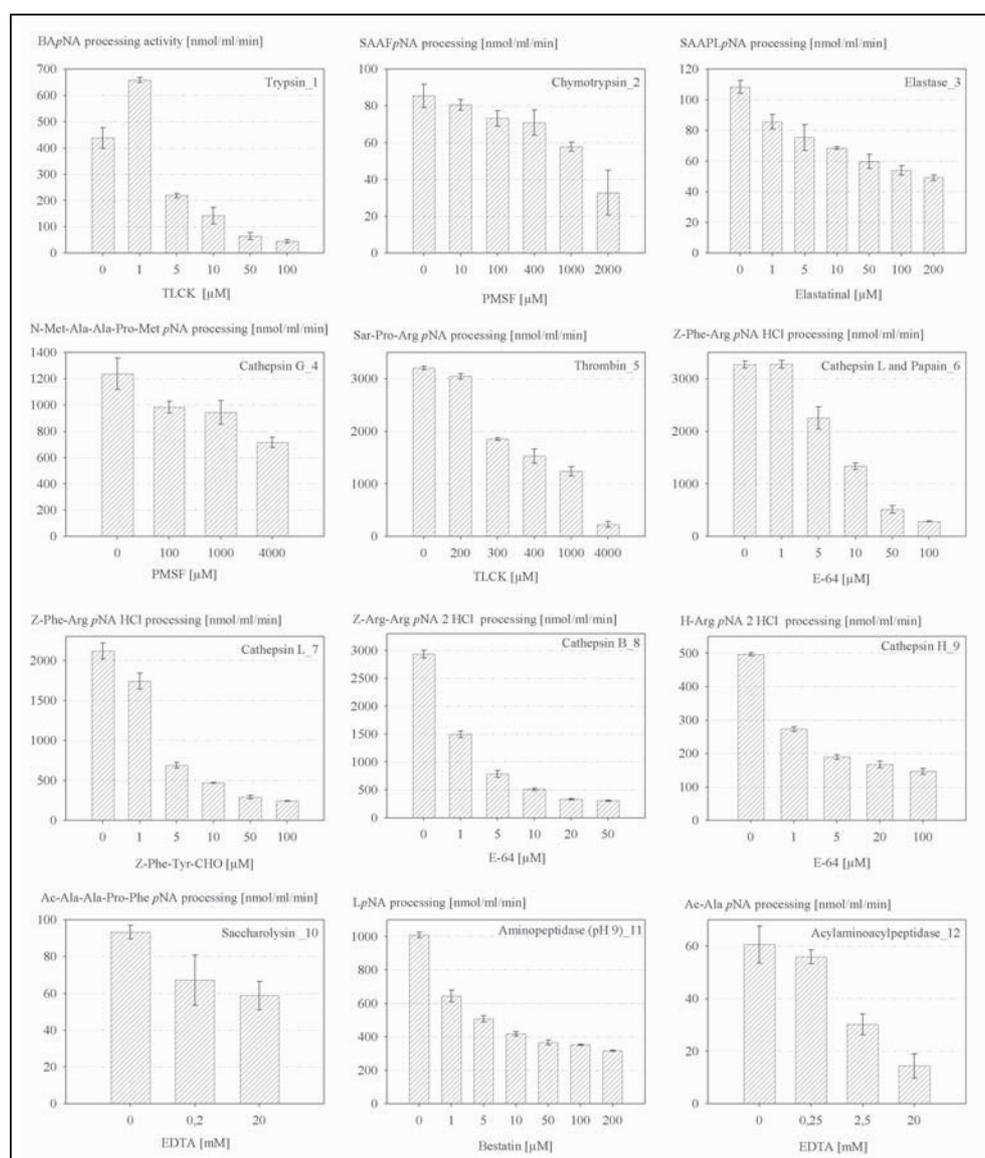
Tab. 2. Bilanz der verwendeten Mitteldärme, Darmsaftgewinnung und pH-Wert des Darmsaftes

	1. Charge (17.08.2005)	2. Charge (4.01.2006)	3. Charge (23.08.2006)	4. Charge (4.04.2007)	Gesamt
Anzahl Mitteldärme [n]	1.757	2.210	1.435	1.928	7.330
Anzahl Proben [n]	35	49	30	42	156
Gewonnener Darmsaft [μ l]	342	591	300	375	1608
Durchschnittlicher pH-Wert	5,75	5,75	5,76	5,75	5,75
Standardabweichung	0,07	0,05	0,02	0,05	0,05

a. Serin-Endopeptidasen. Trypsin. Das Trypsin spezifische Substrat BApNA wurde mit *Diabrotica*-Darmsaft umgesetzt (438 nmol/ml/min). Durch Zugabe steigender Konzentrationen des Trypsin spezifischen Inhibitors SBTI konnte jedoch keine Reduzierung des Umsatzes erzielt werden. Daher wurde TLCK – ein weiterer Trypsin spezifischer Inhibitor – eingesetzt. Durch Zugabe einer sehr geringen Konzentration des Inhibitors TLCK stieg

der Substratumsatz zunächst an, was gelegentlich bei sehr niedrigen Inhibitor-Konzentrationen beobachtet wurde. Doch mit steigenden Inhibitor-Konzentrationen wurde der Substratumsatz deutlich reduziert (Abb. 2-1). Trypsin konnte also mit dem Testsystem BApNA und TLCK nachgewiesen werden.

Das Substrat BApNA wurde sowohl mit Darmsaft des Maiszünslers (KAISER-ALEXNAT und WAGNER, 2007) als


Abb. 2. Protease-Aktivitäten im Darmsaft von L3 Larven des Westlichen Maiswurzelbohrers. (siehe auch KAISER-ALEXNAT, 2009)

auch mit Darmsaft des Westlichen Maiswurzelbohrers umgesetzt, wobei der Umsatz beim Maiszünsler deutlich niedriger war (ca. 35 nmol/ml/min) als beim Maiswurzelbohrer (438 nmol/ml/min). Außerdem war die Hemmung des Substratumsatzes mit den eingesetzten Protease-Inhibitoren unterschiedlich. Beim Maiszünsler konnte der Umsatz mit SBTI reduziert werden, aber nicht mit TLCK. Beim Westlichen Maiswurzelbohrer waren die Reaktionen genau umgekehrt. Hier konnte der Substratumsatz mit TLCK reduziert werden, aber nicht mit SBTI. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass im Darmsaft der beiden Maisschädlinge unterschiedliche Isoformen von Trypsin vorliegen.

Chymotrypsin. Auch das Chymotrypsin spezifische Substrat SAAFpNA wurde mit *Diabrotica*-Darmsaft umgesetzt, doch die Umsätze fielen bei steigenden Konzentrationen des Chymotrypsin spezifischen Inhibitors TPCK nicht stetig ab. Daher wurde der allgemeine Serin-Endopeptidase-Inhibitor PMSF eingesetzt. Das Substrat SAAFpNA wurde umgesetzt (85 nmol/ml/min) und mit steigenden PMSF Konzentrationen war ein stetiger Abfall des Substratumsatzes verbunden (Abb. 2-2). Chymotrypsin konnte also mit dem Testsystem SAAFpNA und PMSF nachgewiesen werden.

Elastase. Elastase konnte mit dem spezifischen Substrat SAAPLpNA und dem spezifischen Inhibitor Elastatinal nachgewiesen werden, weil das Substrat umgesetzt wurde (108 nmol/ml/min) und der Umsatz nach Zugabe steigender Inhibitor-Konzentrationen kontinuierlich abnahm (Abb. 2-3).

Auch für weitere Serin-Endopeptidasen wurden spezifische pNA Substrate getestet. Die Substrate für Cathepsin G (N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Met pNA), Plasmin (Isovaleryl-Phe-Lys pNA) und Thrombin (Sar-Pro-Arg pNA) wurden mit *Diabrotica*-Darmsaft abgebaut, während die Substrate für Granzyme B (Ac-Ile-Glu-Pro-Asp pNA) und Subtilisin (Z-Gly-Gly-Leu pNA) nicht abgebaut wurden.

Cathepsin G. Der Umsatz des Cathepsin G spezifischen Substrates N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Met pNA war hoch (1237 nmol/ml/min) und konnte durch Zugabe steigender Konzentrationen des Serin-Endopeptidase-Inhibitors PMSF reduziert werden. Bei der höchsten PMSF Konzentration (4 mM) flockte die klare Inhibitorlösung nach Zugabe zum Substrat aus, sodass keine höheren PMSF Konzentration eingesetzt wurden. Dennoch ist ein deutlicher Rückgang des Substratumsatzes bei Erhöhung der PMSF Konzentration zu verzeichnen (Abb. 2-4), sodass Cathepsin G mit dem Testsystem N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Met pNA und PMSF nachgewiesen werden konnte.

Plasmin. Das spezifische Substrat für Plasmin – Isovaleryl-Phe-Lys pNA – wurde mit *Diabrotica*-Darmsaft mit sehr hohen Aktivitäten umgesetzt (3694 nmol/ml/min). Allerdings konnte mit PMSF – dem allgemeinen Inhibitor für Serin-Endopeptidasen – keine Hemmung des Substratabbaus erzielt werden. Einem Hinweis des Herstellers folgend, wurde auch Elastatinal als Inhibitor getestet, doch es wurde keine Hemmung des Substratabbaus er-

zielt, sodass trotz hoher Substratumsätze kein vollständiges Testsystem für den Nachweis von Plasmin erstellt werden konnte.

Thrombin. Der Grundumsatz des Thrombin spezifischen Substrates Sar-Pro-Arg pNA war sehr hoch (3203 nmol/ml/min). PMSF war als Inhibitor nicht geeignet, während durch Zugabe steigender Konzentrationen des Inhibitors TLCK eine deutliche Reduzierung des Substratumsatzes erzielt werden konnte (Abb. 2-5). Die Serin-Endopeptidase Thrombin konnte also mit dem Testsystem Sar-Pro-Arg pNA und TLCK im *Diabrotica*-Darmsaft mit sehr hoher Aktivität nachgewiesen werden.

b. Cystein-Endopeptidasen. Cathepsin L und Papain. Der Umsatz des spezifischen Substrates für Cathepsin L und Papain – Z-Phe-Arg pNA HCl – mit Darmsaft von *Diabrotica* war sehr hoch (3267 nmol/ml/min) und das Substrat war bereits nach zwei Minuten vollständig umgesetzt. Außerdem nahm der Umsatz mit steigenden Konzentrationen des allgemeinen Cystein-Endopeptidase Inhibitors E-64 kontinuierlich ab (Abb. 2-6). Cathepsin L und Papain wurden folglich mit sehr hoher Aktivität nachgewiesen.

Papain. Das Substrat Ac-Arg pNA·HCl war laut Hersteller als spezifisch für die Cystein-Endopeptidase Papain ausgewiesen. Doch selbst nach Erhöhung der Darmsaft-Konzentration und mit reiner Papain-Lösung war kein Substratumsatz zu erzielen. Somit war Ac-Arg pNA·HCl nicht als Substrat für den Nachweis von Papain geeignet.

Cathepsin L. BOWN et al. (2004) beschrieben Z-Phe-Tyr(tBu)-Diazomethylketon als spezifischen Inhibitor für Cathepsin L. Eine Überprüfung der photometrischen Testsysteme zeigte jedoch, dass Z-Phe-Tyr(tBu)-DMK bei allen verwendeten Substraten (außer LpNA) nicht zu einer Reduzierung, sondern im Gegenteil sogar zu einer deutlichen Erhöhung der Substratumsätze führte. Beim Substrat Z-Phe-Arg pNA HCL war sogar die stärkste Erhöhung zu beobachten, sodass Z-Phe-Tyr(tBu)-DMK nicht als Inhibitor geeignet war. Demgegenüber erwies sich Z-Phe-Tyr-CHO als geeigneter Inhibitor für Cathepsin L. In den entsprechenden photometrischen Tests war der Umsatz des Substrates Z-Phe-Arg pNA HCl mit Darmsaft von *Diabrotica* sehr hoch (2118 nmol/ml/min) und der Substratabbau nahm mit steigender Konzentration des Cathepsin L spezifischen Inhibitors Z-Phe-Tyr-CHO ab (Abb. 2-7).

Da für Cathepsin L und Papain alleine keine spezifischen pNA Substrate erhältlich sind, wurde versucht den Anteil von Cathepsin L und Papain am Umsatz des Substrates Z-Phe-Arg pNA HCl indirekt herauszuarbeiten. Dazu wurde der Darmsaft zunächst mit dem Inhibitor PMSF inkubiert, der neben Serin-Endopeptidasen auch Papain hemmt, sodass die reine Cathepsin L-Aktivität übrig bleiben müsste. Demgegenüber hemmt Z-Phe-Tyr-CHO die Protease Cathepsin L spezifisch, sodass nach Inkubation des Darmsaftes mit diesem Inhibitor die reine Papain-Aktivität übrig bleiben müsste.

Die Varianten mit PMSF (2 mM) inkubiertem Darmsaft führten zu einem höheren Substratumsatz als die Va-

rianten mit Z-Phe-Tyr-CHO (100 μ M) inkubiertem Darmsaft. Außerdem wurde der Substratumsatz mit dem Z-Phe-Tyr-CHO inkubierten Darmsaft selbst bei steigender Konzentration des allgemeinen Cystein-Endopeptidase Inhibitors E-64 nicht gehemmt (Abb. 3). Aus diesen Befunden wurde abgeleitet, dass Cathepsin L das Substrat Z-Phe-Arg pNA HCl am stärksten abbaut.

Cathepsin B. Der Umsatz des Cathepsin B spezifischen Substrates Z-Arg-Arg pNA·2 HCl war nach Zugabe von *Diabrotica*-Darmsaft ebenfalls sehr hoch (2935 nmol/ml/min) und nach Zugabe steigender Konzentrationen des Inhibitors E-64 wurde dieser immer stärker gehemmt (Abb. 2-8), sodass die Cystein-Endopeptidase Cathepsin B nachgewiesen wurde.

Cathepsin H. Auch die Cystein-Endopeptidase Cathepsin H konnte nachgewiesen werden. Der Umsatz des spezifischen Substrates H-Arg pNA·2 HCl war nach Zugabe von *Diabrotica*-Darmsaft relativ hoch (496 nmol/ml/min) und steigende Konzentrationen des Inhibitors E-64 führten zu einer stetigen Abnahme des Substratumsatzes (Abb. 2-9).

Caspase. Der Grundumsatz von N-Acetyl-Val-Ala-Asp pNA – einem spezifischen Substrat für die Cystein-Endopeptidase Caspase – war sehr niedrig (13 nmol/ml/min). Nach Zugabe steigender Konzentrationen des Inhibitors E-64 blieb der Umsatz auf gleichem Niveau. Aufgrund des niedrigen Grundumsatzes und der fehlenden Hemmung nach Zugabe des Inhibitors konnte Caspase nicht nachgewiesen werden.

c. Aspartat-Endopeptidasen. Da für Aspartat-Endopeptidasen keine spezifischen pNA Substrate verfügbar sind, wurde für deren Nachweis mit allgemeinen Protea-

se-Substraten (Azocasein, Azoalbumin, Azocoll, HPA) gearbeitet.

Pepsin. Unter den verfügbaren allgemeinen Protease-Substraten wurde mit Azocasein der stärkste Umsatz erzielt, sodass der Nachweis mit Azocasein durchgeführt wurde. Bei Zugabe von *Diabrotica*-Darmsaft zu Azocasein fand ein deutlicher Substratumsatz statt (OD 0,16). Dieser wurde durch Zugabe des Pepsin spezifischen Inhibitors Pepstatin A vermindert (OD 0,12), sodass die Aktivität von Pepsin nachgewiesen wurde.

d. Metallo-Endopeptidasen. Astacin. Das spezifische Substrat für die Metallo-Endopeptidase Astacin (Suc-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala pNA) wurde nach Zugabe von *Diabrotica*-Darmsaft nicht umgesetzt. Sowohl eine Gelbfärbung als auch ein Anstieg der OD bei 405 nm blieben aus. Aus diesem Befund wurde abgeleitet, dass Astacin im *Diabrotica*-Darmsaft nicht vorhanden ist.

Saccharolysin. Das Substrat Ac-Ala-Ala-Pro-Phe pNA wurde mit *Diabrotica*-Darmsaft abgebaut (93 nmol/ml/min) und nach Zugabe des Inhibitors EDTA konnte eine Hemmung des Abbaus festgestellt werden, sodass der Nachweis für Saccharolysin erbracht wurde (Abb. 2-10).

e. Exopeptidasen. Aminopeptidase. Da Aminopeptidasen bei Insekten ein alkalisches pH-Optimum haben, wurde vermutet, dass die Aminopeptidase-Aktivität im sauren Darmsaft des Westlichen Maiswurzelbohrers reduziert ist, sofern sie überhaupt nachweisbar ist.

Mit LpNA, einem spezifischen Substrat für Aminopeptidase kam es im sauren Milieu (Substratlösung in Tricin-Puffer mit pH 5,75) zwar zu einem Substratumsatz (449 nmol/ml/min), doch durch Zugabe des spezifischen Inhibitors Bestatin konnte diese Reaktion selbst bei steigenden Konzentrationen nur geringfügig reduziert werden. Unter alkalischen Bedingungen (Substratlösung in Tricin-Puffer mit pH 9,0) war die Aminopeptidase-Aktivität mehr als doppelt so hoch (1010 nmol/ml/min). Außerdem konnte eine zunehmende Reduzierung der Aktivität mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors Bestatin erreicht werden (Abb. 2-11). Somit wurde Aminopeptidase mit dem spezifischen Testsystem LpNA und Bestatin nachgewiesen. Da der Mitteldarm Bereiche mit unterschiedlichen pH-Werten aufweist wird angenommen, dass Aminopeptidase in den Darmabschnitten mit alkalischem pH-Wert besonders aktiv ist.

Carboxypeptidase. Hippuryl-Phenylalanin (Hip-Phe) ist ein spezifisches Substrat für Carboxypeptidase A und Hippuryl-Arginin (Hip-Arg) ein spezifisches Substrat für Carboxypeptidase B. Der Nachweis für beide Proteasen konnte nicht erbracht werden, da zum einen nur ein extrem niedriger Substratumsatz festgestellt wurde (< 5 nmol/ml/min) und zum anderen keine Hemmung durch CPIP (Carboxypeptidase Inhibitor from Potato) festzustellen war.

Omegapeptidase. Als weitere Exopeptidase wurde die Omegapeptidase Acylaminoacylpeptidase mit dem spezifischen Substrat Ac-Ala pNA untersucht. Doch weder für

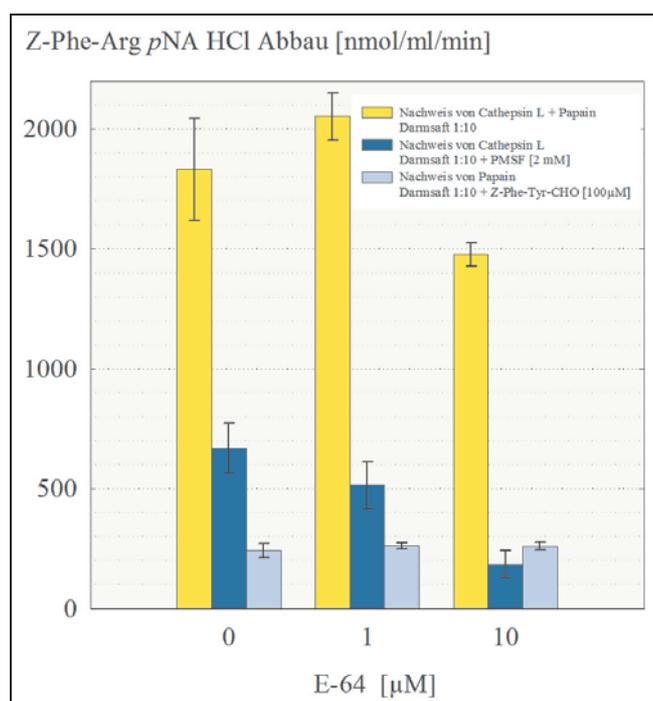


Abb. 3. Abbau des Substrates Z-Phe-Arg pNA HCl mit Cathepsin L und/oder Papain.

Acylaminoacylpeptidase noch für Omegapeptidasen allgemein, war ein spezifischer Inhibitor verfügbar. Deshalb wurden drei vorhandene Inhibitoren getestet, die laut Hersteller eine hemmende Wirkung auf mehrere Proteasen aus zum Teil unterschiedlichen Klassen aufweisen. Mit PMSF wurden sehr starke Schwankungen gemessen, sodass dieser Inhibitor für den Nachweis nicht geeignet war. Demgegenüber wurde mit E-64 und EDTA eine Hemmung des Substratabbaus beobachtet, wobei die Hemmung mit EDTA stärker war als mit E-64.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das komplette Testsystem mit dem spezifischen Substrat Ac-Ala pNA und dem Protease-Inhibitor EDTA erarbeitet. Das Substrat wurde mit *Diabrotica*-Darmsaft abgebaut (61 nmol/ml/min) und der Substratabbau wurde mit EDTA gehemmt (Abb. 2-12), sodass die Omegapeptidase Acylaminoacylpeptidase im Darmsaft aktiv war.

f. Vergleich der pNA Substratumsätze. Im Darmsaft von L3 Larven des Westlichen Maiswurzelbohrers konnten die Serin-Endopeptidasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase nachgewiesen werden. Außerdem wurden mit Serin-Endopeptidasen wie Cathepsin G und insbesondere mit Plasmin und Thrombin sehr hohe Aktivitäten erzielt, die fast an die der Cystein-Endopeptidasen heranreichten. Da Chrysoliden wie der Westliche Maiswurzelbohrer einen sauren Darmsaft haben, wurden vor allem Cystein-Endopeptidasen erwartet. Ein Vergleich der Substratumsätze zeigt, dass mit den Substraten für Cathepsin L – zusammen mit Papain – und Cathepsin B die höchsten Aktivitäten erzielt wurden, während der Substratumsatz mit dem Cathepsin H spezifischen Substrat geringer war. Weiterhin wurden Testsysteme für die Metallo-Endopeptidase Saccharolysin und für die Exopeptidasen Aminopeptidase und eine Omegapeptidase erstellt (Abb. 4).

g. Verdünnung des Darmsaftes. Da die Gewinnung des Darmsaftes sehr aufwendig ist und im Falle einer Resistenzentwicklung nur ein direkter Vergleich der Protease-Aktivitäten von Anfälligen und Resistenten zu verlässlichen Ergebnissen führt, wurde angestrebt die erforderlichen Darmsaft-Mengen auf ein Minimum zu reduzieren. Wie erwartet nahm die Trypsin-Aktivität mit zunehmender Verdünnung des Darmsaftes stetig ab (DS 1:10 – 394 nmol/ml/min; DS 1:100 – 22 nmol/ml/min). Eine Kontrolle mit dem kompletten Testsystem (BApNA und TLCK) zeigte, dass der Nachweis von Trypsin auch mit einer Darmsaftverdünnung von 1:100 noch möglich war (ohne TLCK – 29 nmol/ml/min; mit 100 µM TLCK – 4 nmol/ml/min).

Aufgrund der hohen Aktivität der Cystein-Endopeptidasen Cathepsin L und Papain wurde bei diesem Testsystem mit höheren Verdünnungen gearbeitet als beim Nachweis von Trypsin. Aus der Verdünnungsreihe wurde abgeleitet, dass der Nachweis von Cathepsin L und Papain mit einer Darmsaft-Verdünnung von bis zu 1:1000 noch geführt werden kann (DS 1:10 – 1858 nmol/ml/min; DS 1:1000 – 126 nmol/ml/min). Mit dem

kompletten Testsystem (Z-Phe-Arg pNA und E-64) wurde auch mit einer Darmsaft-Verdünnung von 1:1000 noch ein Nachweis erbracht (ohne E64 – 174 nmol/ml/min; mit 20 µM E64 – 12 nmol/ml/min).

Proteolytischer Abbau

Die Untersuchungen zum proteolytischen Abbau der *B.t.*-Toxine Cry3Bb1 sowie Cry34Ab1 und Cry35Ab1 sollten klären, ob die Toxine mit *Diabrotica*-Darmsaft abgebaut werden und wenn ja, welche der nachgewiesenen Proteasen am Abbau beteiligt sind. Dazu wurde die Verdauung der *B.t.*-Toxine mit *Diabrotica*-Darmsaft und einer Reihe käuflicher Proteasen *in vitro* simuliert.

Cry3Bb1-Abbau mit Darmsaft. Das *B.t.*-Mais-Toxin Cry3Bb1 der Firma Monsanto zeigte eine Bande bei 77 kDa. Weder nach 60 Minuten Inkubation mit 1:25 verdünntem Darmsaft (DS 1:25) noch nach 60 Minuten Inkubation mit 1:100 verdünntem Darmsaft (DS 1:100) wurde das Toxin abgebaut. Auch bei der Kontrolle mit 5 Minuten bei 95 °C erhitztem Darmsaft (Δ DS 1:25 bzw. Δ DS 1:100) wurde das Toxin nicht abgebaut. Weiterhin wurde eine Darmsaft-Probe ohne Toxin als Kontrolle mitgeführt (Abb. 5a und Abb. 5b).

Cry34Ab1/Cry35Ab1-Abbau mit Darmsaft. Mit Darmsaft des Westlichen Maiswurzelbohrers wurde weiterhin der proteolytische Abbau der *B.t.*-Toxine Cry34Ab1 und Cry35Ab1 untersucht. Das Toxin Cry34Ab1 zeigte eine Bande bei ca. 14 kDa und das Toxin Cry35Ab1 bei ca. 44 kDa. Nach 30 Minuten Inkubation mit 1:10 verdünntem Darmsaft (DS 1:10) blieben beide Toxine unverändert, d.h. sie wurden nicht abgebaut (Abb. 6a und Abb. 6b).

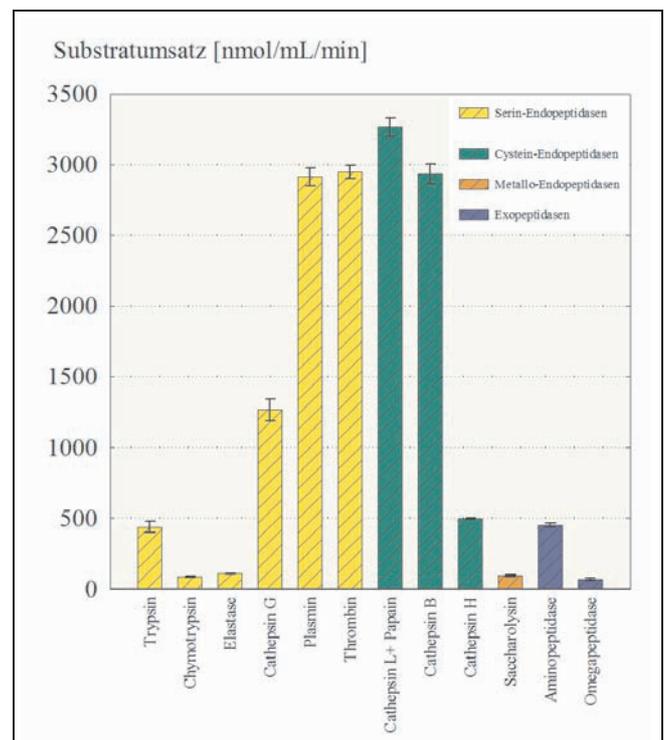


Abb. 4. Vergleich aller untersuchten pNA Substratumsätze.

Cry3Bb1-Abbau mit käuflichen Proteasen. Der proteolytische Abbau des *B.t.*-Mais-Toxins Cry3Bb1 wurde weiterhin mit einzelnen nachgewiesenen Proteasen untersucht, wobei käufliche Proteasen eingesetzt wurden. Für jede nachgewiesene Protease wurden mindestens drei Gelläufe durchgeführt, wobei die Gele stets den gleichen Aufbau hatten. Nach dem Marker zur Bestimmung des Molekulargewichtes folgte zunächst das *B.t.*-Mais-Toxin Cry3Bb1. Die weiteren Proben enthielten Cry3Bb1 und die jeweilige Protease. Als Kontrolle für die Wirkung der Proteasen, d. h. um zu überprüfen, ob der Proteinabbau auf die proteolytische Aktivität der jeweiligen Protease zurückzuführen ist, wurde das Toxin in einer weiteren Probe mit erhitzter Protease (5 Min. bei 95°C) inkubiert. Durch das Erhitzen wurden die Proteasen denaturiert und damit inaktiviert, sodass das Toxin nicht abgebaut wurde. In der letzten Spur wurde die jeweilige Protease aufgetragen um Eigenbanden zu erkennen (Abb. 7).

Bei den beschriebenen Untersuchungen bauten die Proteasen Trypsin, Elastase und Papain das 77 kDa Toxin ab, wobei es von Trypsin zu einem 75 kDa Protein, von Elastase zu Proteinen mit 75 kDa und 40 kDa und von Papain vollständig abgebaut wurde. Demgegenüber bauten Chymotrypsin, Cathepsin G, Plasmin, Thrombin, Cathep-

sin L, Cathepsin B, Cathepsin H, Pepsin und Aminopeptidase das *B.t.*-Mais-Toxin Cry3Bb1 nicht ab (Abb. 7).

Bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die gleichen Ergebnisse erzielt. Proteasen die das Toxin nach 10 Minuten nicht abbauten, bewirkten auch nach 24 Stunden keinen Abbau, während Proteasen, die das Toxin nach 10 Minuten abbauten, es auch nach 24 Stunden in der gleichen Weise abbauten (Abb. 8).

Für die proteolytischen Versuche mit den einzelnen käuflichen Proteasen wurden die Proben mit einem Puffer angesetzt, der auf den mittleren pH-Wert von *Diabrotica*-Darmsaft (pH 5,75) eingestellt war. Um zu überprüfen, ob sich der Toxinabbau bei abweichendem pH-Wert ändert, wurden weitere Proben angesetzt, bei denen der pH-Wert des Probenpuffers auf das jeweilige pH-Optimum der Proteasen (z. B. für Pepsin pH 2) eingestellt war. Zusätzlich wurde die Inkubationszeit von 10 Minuten auf eine Stunde verlängert. Die Ergebnisse des

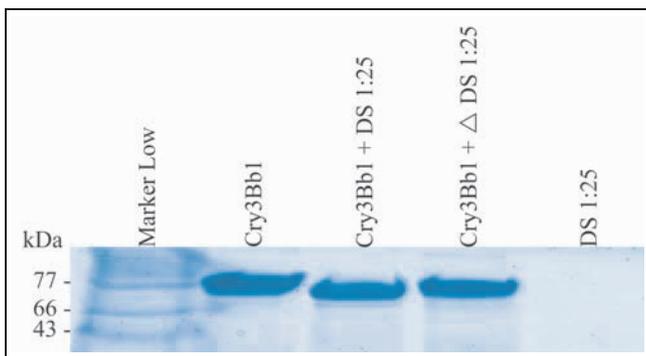


Abb. 5a. Abbau des *B.t.*-Mais-Toxins Cry3Bb1 mit *Diabrotica*-Darmsaft (1:25 verdünnt, 60 min Inkubation).

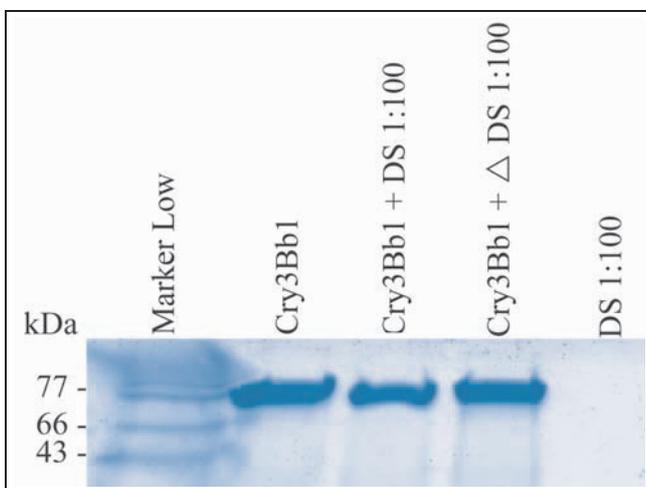


Abb. 5b. Abbau des *B.t.*-Mais-Toxins Cry3Bb1 mit *Diabrotica*-Darmsaft (1:100 verdünnt, 60 min Inkubation).

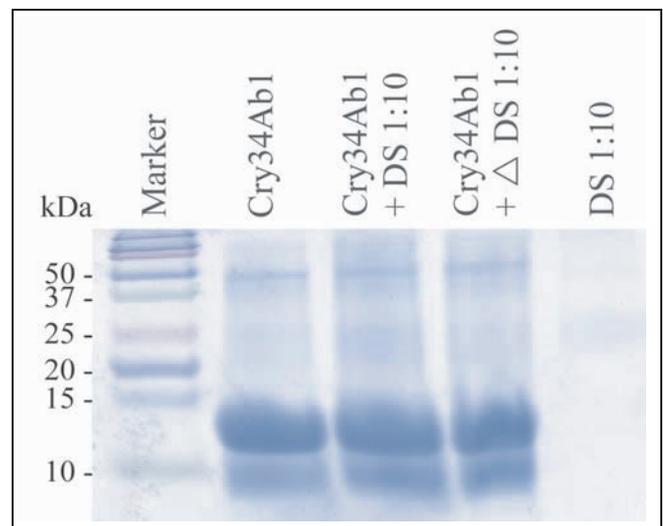


Abb. 6a. Abbau des *B.t.*-Toxins Cry34Ab1 mit *Diabrotica*-Darmsaft (1:10 verdünnt, 30 min Inkubation).

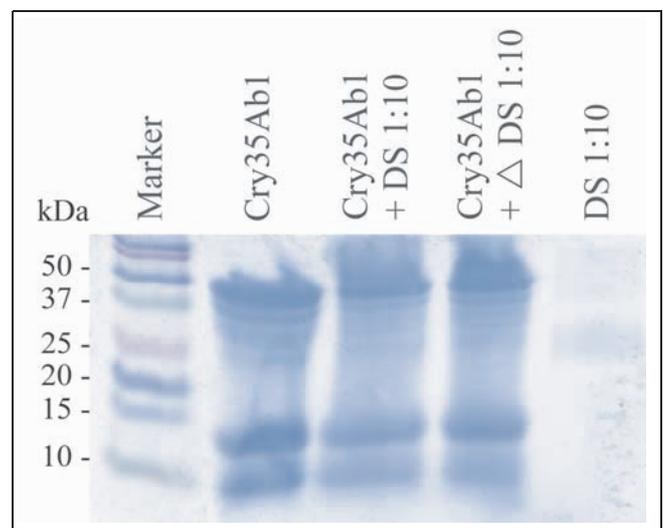


Abb. 6b. Abbau des *B.t.*-Toxins Cry35Ab1 mit *Diabrotica*-Darmsaft (1:10 verdünnt, 30 min Inkubation).

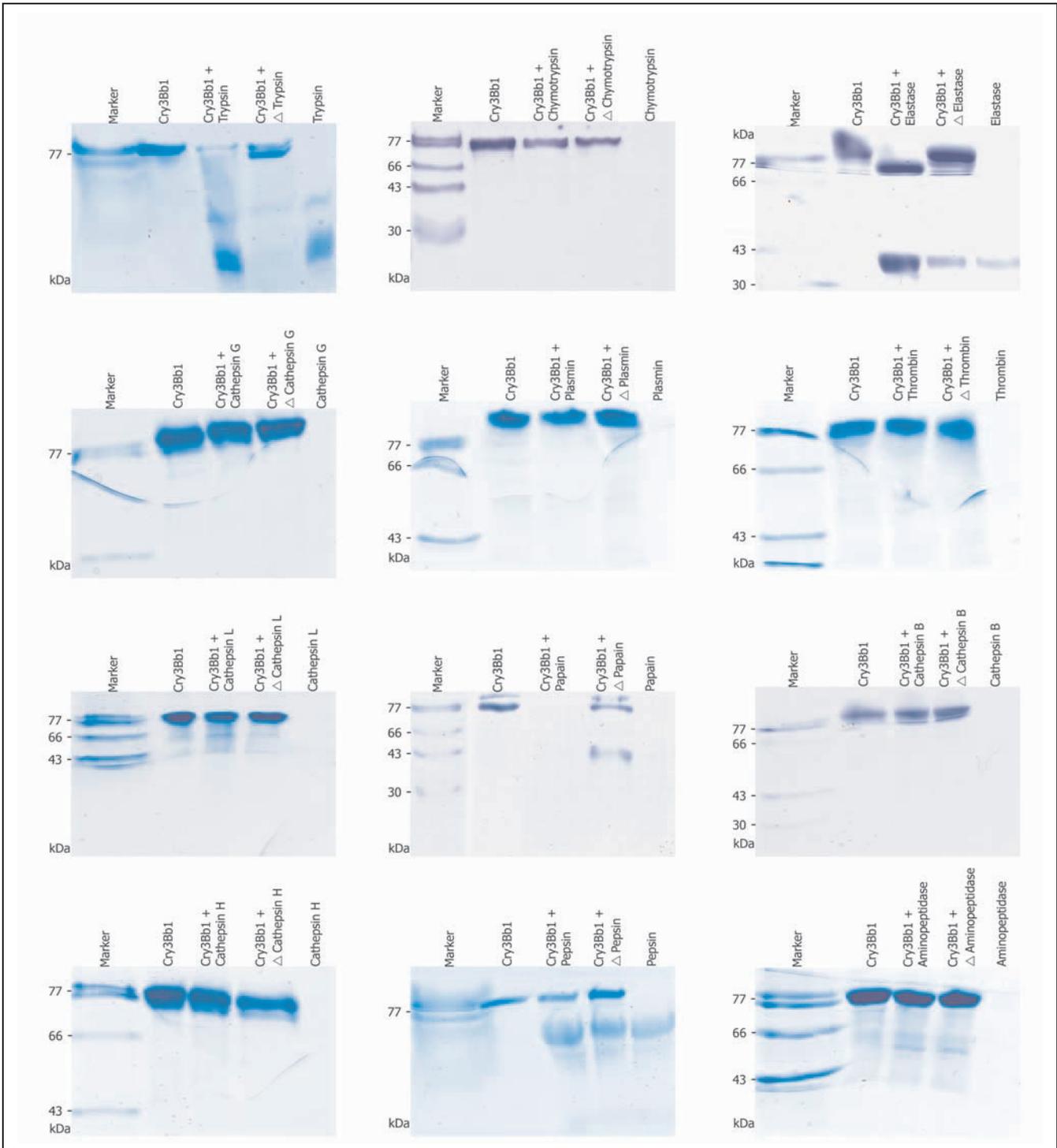


Abb. 7. Abbau des B.t.-Mais-Toxins Cry3Bb1 mit käuflichen Proteasen (10 min Inkubation).

Toxinabbau bei pH 5,75 stimmten mit dem Abbau beim jeweiligen pH-Optimum der Proteasen überein.

Die bisher beschriebenen proteolytischen Versuche wurden mit Proteasen durchgeführt, die im Darmsaft von *Diabrotica* nachgewiesen wurden. Zusätzlich wurden weitere käufliche Proteasen wegen ihrer Zugehörigkeit zu den für *Diabrotica* bedeutenden Cystein-Endopeptidasen in die proteolytischen Untersuchungen einbezogen. Dabei zeigte sich, dass die Proteasen Ficin und Bromelain

das B.t.-Mais-Toxin Cry3Bb1 abbauen, während Clostripain und Calpain II das Toxin nicht abbauten.

Bindungsstudien

Um das umfangreiche Methodenpaket zur Aufklärung einer möglichen Rezeptor-bedingten Resistenz zu etablieren, wurden Testsysteme mit biotinyliertem (*bCry3Bb1*) und nicht-biotinyliertem (*Cry3Bb1*) Toxin erstellt. Dabei enthielten alle Proben biotinyliertes Toxin (*bCry3Bb1*),

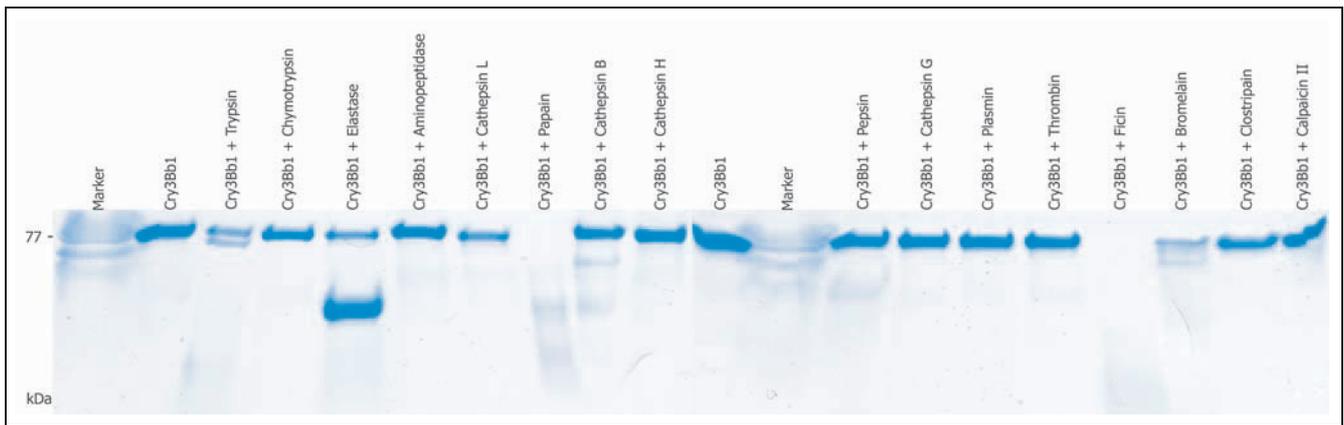


Abb. 8. Abbau des B.t.-Mais-Toxins Cry3Bb1 mit käuflichen Proteasen (24 h Inkubation).

das bei zusätzlicher Anwesenheit von nicht-biotinyliertem Toxin (Cry3Bb1) mit diesem um Bindungsplätze konkurrierte. Mit zunehmender Konzentration an nicht-biotinyliertem Toxin (Cry3Bb1) war daher eine deutliche Abnahme der Bandenstärke zu beobachten.

Da B.t.-Toxine an spezifische Rezeptoren der Darmwand binden, wurden mit dem etablierten Testsystem auch die Rezeptoren charakterisiert. Die Rezeptoren für das Toxin Cry34Ab1 hatten ein Molekulargewicht von ca. 110 kDa und die für Cry35Ab1 von ca. 50 kDa. Nach Zugabe steigender Mengen von Cry3Bb1 wurden insbesondere die Banden der Rezeptoren für Cry34Ab1 (Abb. 9a), aber auch für Cry35Ab1 (Abb. 9b) immer schwächer, während die Banden der Rezeptoren für Cry3Bb1 (ca. 30 kDa) stärker wurden.

Diskussion

Der Westliche Maiswurzelbohrer gehört weltweit zu den bedeutendsten Maisschädlingen. Im Jahr 2007 gab es auch erste Meldungen über Funde des Käfers in Deutschland. Eine Bekämpfungsmöglichkeit könnte der Anbau von speziellen B.t.-Mais-Linien darstellen. Ein großflächiger Anbau dieser B.t.-Mais-Linien erhöht jedoch die Wahrscheinlichkeit der Provoizierung einer Resistenzentwicklung gegenüber den eingesetzten B.t.-Toxinen.

Bei den B.t.-Toxinen handelt es sich um Proteine, die im Mitteldarm anfälliger Insekten durch einen spezifischen Wirkungsmechanismus verarbeitet werden. Die Resistenz von Insekten gegenüber B.t.-Toxinen kann an jedem Schritt der Verarbeitung der B.t.-Toxine ansetzen. Die bisher beschriebenen Resistenzmechanismen gegenüber B.t.-Toxinen sind jedoch meist Protease- oder Rezeptor-bedingt.

In der vorgestellten Arbeit wurden entsprechende Parameter zur Verarbeitung von B.t.-Toxinen im Mitteldarm von L3 Larven des Westlichen Maiswurzelbohrers (europäischer Stamm) untersucht. Auf diese Weise wurden Testsysteme erstellt, die im Falle einer Resistenzentwicklung zur Aufklärung der Resistenzmechanismen herangezogen werden können.

Da es sich bei den B.t.-Toxinen um Proteine handelt, wurden unter den Verdauungsenzymen von Insekten ausschließlich die Proteasen untersucht, weil nur diese in der Lage sind, Proteine abzubauen (TERRA und FERREIRA, 1994; TERRA et al., 1996). Die meisten Insekten verwenden Serin-Endopeptidasen vom Trypsin- und Chymotrypsin-Typ für die proteolytische Verdauung. Bei vielen Insekten aus der Gruppe der Coleopteren – z. B. den Chrysomeliden, zu denen auch der Westliche Maiswurzelbohrer gehört – und Heminopteren sowie bei Nematoden basiert der Proteinabbau hauptsächlich auf der Aktivität von Cystein-Endopeptidasen, die häufig zusammen mit Aspartat-Endopeptidasen auftreten (TERRA et al., 1996; MURDOCK et al., 1987). Zusätzlich zu den Cystein- und Aspartat-Endopeptidasen ist bei Coleopteren ein komplexes Protease-Muster im Mitteldarm vorhanden (CHEN et al., 1992; GIRARD et al., 1998; BRUNELLE et al., 1999; OPPERT et al., 2000; OPPERT et al., 2003).

Im Mitteldarm von Adulten des Westlichen Maiswurzelbohrers sind aufgrund des leicht sauren pH-Milieus Cystein-Endopeptidasen vorherrschend (KIM und MULLIN, 2003). Etwa 90% der proteolytischen Aktivität bei L2 bzw. L3 Larven des Westlichen Maiswurzelbohrers sind auf Cystein-Endopeptidasen zurückzuführen (ORR et al., 1994; ZHAO et al., 1996; REECK et al., 1999; KOIWA et al., 2000; OPPERT et al., 2003). GILLIKIN et al. (1992) haben die proteolytische Aktivität im Darm von L2 Larven des Westlichen Maiswurzelbohrers mittels SDS Gelen charakterisiert. Es wurden 15 Proteasen nachgewiesen, wobei mittels Inhibitoren gezeigt wurde, dass es sich hauptsächlich um Cystein-Endopeptidasen handelt. KOIWA et al. (2000) konnten die Cystein-Endopeptidasen der Larven des Westlichen Maiswurzelbohrers genauer spezifizieren und fanden verschiedene Cathepsin L-ähnliche Cystein-Endopeptidasen.

SIEGFRIED et al. (2005) beschrieben im Mitteldarm des Westlichen Maiswurzelbohrers 691 EST (Expressed Sequence Tag) Sequenzen, von denen 62% Proteinen mit katalytischen Funktionen zugeschrieben wurden, wobei die Cathepsin-ähnlichen Cystein-Endopeptidasen eine der größten Gruppen darstellten. Auch in den Untersuchungen von BOWN et al. (2004) erwiesen sich die Cy-

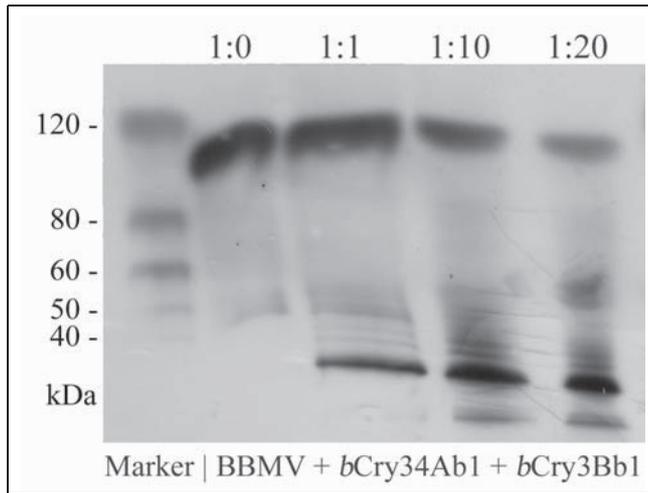


Abb. 9a. Bindungsstudien mit den biotinylierten B.t.-Toxinen Cry34Ab1 und Cry3Bb1.

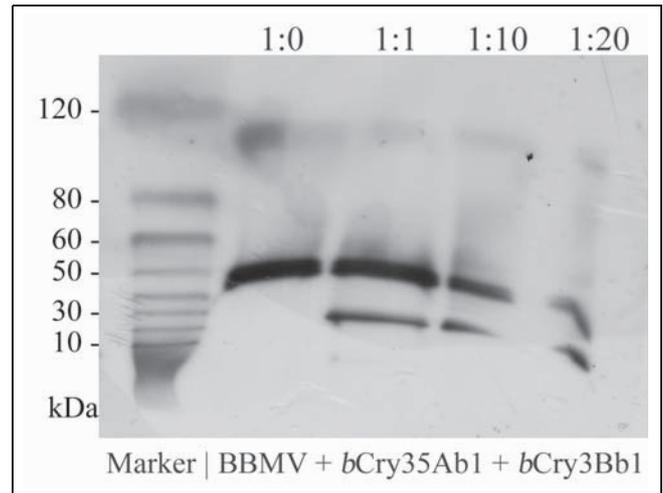


Abb. 9b. Bindungsstudien mit den biotinylierten B.t.-Toxinen Cry35Ab1 und Cry3Bb1.

stein-Endopeptidasen als die wichtigsten Enzyme für den proteolytischen Abbau des Westlichen Maiswurzelbohrers. Sie identifizierten elf Cystein-Endopeptidasen, von denen neun Cathepsin L-ähnliche Enzyme und zwei Cathepsin B-ähnliche Enzyme waren.

Zur Identifizierung der im Darmsaft vorhandenen Proteasen und Quantifizierung ihrer Aktivitäten wurden in den vorliegenden Untersuchungen photometrische Tests mit spezifischen synthetischen Substraten und Protease-Inhibitoren durchgeführt, wobei hauptsächlich Peptidyl-*p*-Nitroanilid (*p*NA) Substrate verwendet wurden, die für bestimmte Proteasen spezifisch sind, d.h. nur von ihnen abgebaut werden. Wenn die angesprochene Protease im Darmsaft vorhanden ist, wird das spezifische Substrat in Oligopeptide und das chromogene Nitroanilin gespalten und es kommt zu einer Farbreaktion, die photometrisch gemessen wird. Nach Zugabe eines ebenfalls spezifischen Inhibitors werden der Substratabbau und die damit einhergehende Farbreaktion gehemmt.

Da der Darmsaft des Westlichen Maiswurzelbohrers mit einem durchschnittlichen pH-Wert von 5,75 leicht sauer ist, wurde angenommen, dass vor allem Proteasen mit saurem pH-Optimum aktiv sind. Diese Annahme wurde durch die hohen Aktivitäten der Cystein-Endopeptidasen Cathepsin L mit Papain, gefolgt von Cathepsin B und Cathepsin H bestätigt. Aber auch andere Proteasen aus verschiedenen Klassen wurden nachgewiesen. Neben den Serin-Endopeptidasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase wurden auch die zur gleichen Klasse gehörigen Proteasen Cathepsin G, Plasmin und Thrombin nachgewiesen. Besonders bemerkenswert sind die hohen Aktivitäten, die mit den spezifischen Substraten für Plasmin und Thrombin erzielt wurden. Auch die Metallo-Endopeptidase Saccharolysin und die Exopeptidase Aminopeptidase sowie eine Omegapeptidase wurden nachgewiesen. Weiterhin wurde mit einem allgemeinen Substrat und einem spezifischen Inhibitor ein Testsystem für die Aspartat-Endopeptidase Pepsin erstellt (vgl. auch KAISER-ALEXNAT, 2009).

Es ist anzunehmen, dass neben den genannten Proteasen auch eine Reihe weiterer Proteasen im Darmsaft des Westlichen Maiswurzelbohrers aktiv sind, diese jedoch in Ermangelung weiterer Testsysteme mit der verwendeten Methodik nicht nachgewiesen werden konnten. Da keine spezifischen Testsysteme für Proteasen von Coleopteren vorliegen, ist bei den Ergebnissen weiterhin zu berücksichtigen, dass die verwendeten Substrate und Inhibitoren oft nicht nur einzelne genau definierte Proteasentypen ansprechen, sondern Vertreter einer ganzen Gruppe enger verwandter Proteasen, so genannte Isoformen. Dies zeigte sich auch bei den im Folgenden beschriebenen Ergebnissen zum proteolytischen Abbau der B.t.-Toxine.

Dabei wurde untersucht, ob die B.t.-Toxine Cry3Bb1 und Cry34Ab1/Cry35Ab1 mit Darmsaft des Westlichen Maiswurzelbohrers abgebaut werden und welche der nachgewiesenen Proteasen am Abbau beteiligt sind. Hierzu wurde die Verdauung mit *Diabrotica*-Darmsaft und einer Reihe käuflicher Proteasen *in vitro* simuliert. Obwohl die käuflichen Proteasen nicht mit den im Insekten Darm identifizierten Proteasen identisch sind, wurde in Anlehnung an GEWECKE (1995) die Hypothese zugrunde gelegt, dass deren Spezifität übereinstimmend ist. Daher wurde angenommen, dass aus den Ergebnissen mit den käuflichen Proteasen Rückschlüsse auf die Toxin abbauenden Proteasen gezogen werden können.

Unter den nachgewiesenen Proteasen bauten die käuflichen Proteasen Trypsin, Elastase und Papain das 77 kDa Toxin Cry3Bb1 ab, wobei es von Trypsin zu einem 75 kDa Protein, von Elastase zu Proteinen mit 75 kDa und 40 kDa und von Papain vollständig abgebaut wurde. Die übrigen Proteasen bauten das Toxin Cry3Bb1 nicht ab. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit käuflichen Proteasen wurde das 77 kDa Toxin Cry3Bb1 mit *Diabrotica*-Darmsaft nicht abgebaut. Auch bei den B.t.-Toxinen Cry34Ab1 und Cry35Ab1 führte die Zugabe von *Diabrotica*-Darmsaft zu keinem Abbau.

Damit wurde zumindest für das Toxin Cry3Bb1 gezeigt, dass die obige Hypothese nicht zutrifft. Das Toxin wurde

mit käuflichen Proteasen, nicht aber mit Darmsaft abgebaut. Die verwendeten Proteasen sind also nicht wirkungsidentisch mit den im Darmsaft vorliegenden Proteasen.

Unter der Voraussetzung, dass die erhaltenen und untersuchten Toxine mit den in den *B.t.*-Mais-Linien produzierten Toxinen absolut identisch sind, ist aufgrund des fehlenden Toxinabbaus mit Darmsaft von L3 Larven des Westlichen Maiswurzelbohrers anzunehmen, dass diese Toxine ohne Aktivierung wirksam sind, dass sie also in der *B.t.*-Mais-Pflanze – im Unterschied zu *B.t.*-Pflanzenschutzmitteln – bereits in aktiver Form vorliegen.

Weiterhin wurden Bindungsstudien durchgeführt, um die Bindung des *B.t.*-Mais-Toxins Cry3Bb1 an spezifische Rezeptoren der Darmwand nachzuweisen und das umfangreiche Methodenpaket zur Aufklärung einer möglichen Rezeptor-bedingten Resistenz zu etablieren. Hierzu wurden Testsysteme mit biotinyliertem (*b*Cry3Bb1) und nicht-biotinyliertem (Cry3Bb1) Toxin erstellt.

Zusätzlich zeigten die Bindungsstudien mit den *B.t.*-Toxinen Cry3Bb1 und Cry34Ab1/Cry35Ab1, dass diese *Diabrotica*-wirksamen Toxine sich an verschiedene Bindungsplätze – also spezifische Rezeptoren der Darmwand – anlagern. Die spezifischen Rezeptoren konnten mit Molekulargewichten von ca. 30 kDa (Cry3Bb1), 110 kDa (Cry34Ab1) und 50 kDa (Cry35Ab1) charakterisiert werden.

Falls Resistenzen des Westlichen Maiswurzelbohrers gegenüber den untersuchten *B.t.*-Toxinen auftreten, können durch einen direkten Vergleich von Anfälligen und Resistenten Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Resistenzmechanismus gezogen werden. In Bezug auf die Proteasen wäre dann zu prüfen, ob die nachgewiesenen Proteasen bei den Resistenten eine veränderte Aktivität im Vergleich zu den Anfälligen aufweisen. Beim proteolytischen Abbau wäre nach Unterschieden im Toxin-Abbau von resistenten und anfälligen Tieren zu suchen, die sich bei resistenten Tieren in Form von Abbauprodukten der Toxine zeigen könnten. Eine genetisch bedingte Veränderung der Proteasen könnte dazu führen, dass diese die Toxine zu unwirksamen Bruchstücken abbauen, sodass die Toxine bereits abgebaut wären bevor sie wirksam werden konnten. In Bezug auf die Toxin-Bindung an die Rezeptoren der Darmwand wäre im Falle einer Resistenzentwicklung zu klären, ob die Toxin-Bindung bei resistenten im Vergleich zu anfälligen Larven vermindert ist oder gar völlig zum Erliegen kommt.

Danksagung

Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) förderte innerhalb des Schwerpunkts „Biologische Sicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen“ den Forschungsverbund „Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung bei transgenem *Diabrotica*-resistentem Bt-Mais: Entwicklung und Validierung von Monitoringmethoden“, zu dem auch das vorgestellte Teilprojekt (Förderkennzeichen 031 32 79 D, Projektlaufzeit 1.04.2005 – 30.09.2008) gehörte. Daher gilt unser besonderer Dank dem BMBF für die Finanzierung der vor-

liegenden Forschungsarbeit. Innerhalb des Verbundes stellte die BTL Bio-Test Labor GmbH in Sagerheide Mitteldärme des Westlichen Maiswurzelbohrers bereit. Dr. Thomas Thieme und seinen Mitarbeitern Kai Gloyna und Ines Rogotzki gilt unser Dank für die Anzucht der Larven und die Präparation der Mitteldärme. Der Firma Monsanto danken wir für die Bereitstellung des *B.t.*-Mais-Toxins Cry3Bb1 und dem Verbundpartner Dr. Johannes Jehle von der DLR Rheinpfalz in Neustadt/Weinstraße für die Weiterleitung des Monsanto Toxins. Jim Swezey von der ARS Patent Culture Collection in Pretoria, Illinois danken wir für die Zusendung der *B.t.*-Linie, die von der Firma DOW AgroSciences als Quelle für die gentechnische Übertragung des binären *B.t.*-Toxins Cry34Ab1/Cry35Ab1 verwendet wurde. Weiterhin danken wir dem technischen Assistenten Simon Feiertag für die Durchführung der biochemischen Untersuchungen im Labor sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Biologischen Pflanzenschutz des JKI in Darmstadt für die vielfältige Unterstützung.

References

- BARRETT, A.J., N.D. RAWLINGS, E.M. DAVIES, M. MACHELEIDT, G. SALVESEN, V. TURK, 1986: Proteinase inhibitors. Amsterdam, Elsevier Science Publishers.
- BAUFELD, P., 2007: *Diabrotica virgifera*. Internetseite des Julius Kühn-Instituts, http://www.jki.bund.de/cdn_044/nn_1171854/DE/Home/pflanzengesundheit/schadorganismen/aktuelleProbleme/datenblaetter/diabvi_datenblatt.html.
- BAUFELD, P., 2008: Westlicher Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera virgifera*) – Aktuelle Situation und Hintergründe. Internetseite des Julius Kühn-Instituts, http://www.jki.bund.de/cdn_044/nn_1171854/DE/Home/pflanzengesundheit/schadorganismen/diabrotica/diabrotica_aktuell.html.
- BAUM, J.A., C.-R. CHU, M. RUPAR, G.R. BROWN, W.P. DONOVAN, J.E. HUESING, O. ILAGAN, T.M. MALVAR, M. PLEAU, M. WALTERS, T. VAUGHN, 2004: Binary toxins from *Bacillus thuringiensis* active against the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4889-4898.
- BEYNON, R., J.S. BOND, 2001: Proteolytic enzymes. A practical approach. Oxford, University Press,.
- BLANCO-LABRA, A., N.A. MARTINEZ-GALLARDO, L. SANDOVAL-CARDOSO, J. DELANO-FRIER, 1996: Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* larvae (Herbst). *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26**, 95-100.
- BOWN, D.P., H.S. WILKINSON, M.A. JONGSMA, J.A. GATEHOUSE, 2004: Characterisation of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 305-320.
- BRUNELLE, F., B. NGUYEN-QUOC, C. CLOUTIER, D. MICHAUD, 1999: Protein hydrolysis by Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, digestive proteases: The catalytic role of cathepsin D. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **42**, 88-98.
- CHEN, M.-S., B. JOHNSON, L. WEN, S. MUTHUKRISHNAN, K.J. KRAMER, T.D. MORGAN, G.R. REECK, 1992: Rice cystatin: Bacterial expression, purification, cysteine proteinase inhibitory activity and insect growth suppressing activity of a truncated form of the protein. *Protein Expression and Purification* **3**, 41-49.
- DE MAAGD, R.A., A. BRAVO, C. BERRY, N. CRICKMORE, H.E. SCHNEPF, 2003: Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **37**, 409-433.
- DE MAAGD, R.A., M.S.G. KWA, H. VAN DER KLEIJ, T. YAMAMOTO, B. SCHIPPER, J.M. VLAK, W.J. STIEKEMA, D. BOSCH, 1996: 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**, 1537-1543.
- DENOLF, P., S. JANSSENS, S. VAN HOUDT, M. PEFFEROEN, D. DEGHEELE, J. VAN RIE, 1993: Biotinylation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1821-1827.

- DONOVAN, W.P., J.T. ENGLEMAN, J.C. DONOVAN, J.A. BAUM, G.J. BUNKERS, D.J. CHI, W.P. CLINTON, L. ENGLISH, G.R. HECK, O.M. ILAGAN, K.C. KRASOMIL-OSTERFELD, J.W. PITKIN, J.K. ROBERTS, M.R. WALTERS, 2006: Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 713-719.
- ELLIS, R.T., B.A. STOCKHOFF, L. STAMP, H.E. SCHNEPF, G.E. SCHWAB, M. KNUTH, J. RUSSELL, G.A. CARDINEAU, K.E. NARVA, 2002: Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1137-1145.
- FERRÉ, J., J. VAN RIE, 2002: Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* **47**, 501-533.
- GEWECKE, M., 1995: Physiologie der Insekten. Stuttgart, Jena, New York, Gustav Fischer Verlag.
- GILLIKIN, J.W., S. BEVILACQUA, J.S. GRAHAM, 1992: Partial characterization of digestive tract proteinases from western corn rootworm larvae, *Diabrotica virgifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **19**, 285-298.
- GIRARD, C., M.L. MÉTAYER, M. BONADÉ-BOTTINO, M.H. PHAM-DELEGUE, L. JOUANIN, 1998: High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**, 229-237.
- HERMAN, R.A., P.N. SCHERER, D.L. YOUNG, C.A. MIHALIAK, T. MEADE, A.T. WOODSWORTH, B.A. STOCKHOFF, K.E. NARVA, 2002: Binary insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*, strain PS149B1: Effects of individual protein components and mixtures in laboratory bioassays. *J. Econ. Entomol.* **95**, 635-639.
- JOUANIN, L., M. BONADÉ-BOTTINO, C. GIRARD, G. MORROT, M. GIBAND, 1998: Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science* **131**, 1-11.
- KAISER-ALEXNAT, R., 2008: *Bacillus thuringiensis*. Internetseite des Julius Kühn-Instituts, http://www.jki.bund.de/nn_807134/DE/Home/pflanzen_schuetzen/biologisch_alternativ/bacillus_thuringiensis/bacillus_thuringiensis_node.html_nnn=true.
- KAISER-ALEXNAT, R., 2009: Protease activities in the midgut of Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *J. Invert. Path.* **100**, 169-174.
- KAISER-ALEXNAT, R., W. WAGNER, 2007: Untersuchungen zur frühzeitigen Entdeckung einer Resistenzentwicklung des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) gegenüber dem B.t.-Mais-Toxin Cry1Ab und zur Aufklärung möglicher Resistenzmechanismen. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **59**, 302-309.
- KIM, J.H., C.A. MULLIN, 2003: Impact of cysteine protease inhibition in midgut fluid and oral secretion on fecundity and pollen consumption of Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **52**, 139-154.
- KOIWA, H., R.E. SHADE, K. ZHU-SALZMAN, M. PAINO D'URZO, L.L. MURDOCK, R.A. BRESSAN, P.M. HASEGAWA, 2000: A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive cysteine proteinases (DvCALs) in the larval midgut of Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *FEBS Lett.* **471**, 67-70.
- LIU, Y.B., B.E. TABASHNIK, 1997: Synergism of *Bacillus thuringiensis* by ethylenediamine tetraacetate in susceptible and resistant larvae of diamondback moth (Lepidoptera: *Plutellidae*). *J. Econ. Entomol.* **90**, 287-292.
- MCGAUGHEY, W.H., B. OPPERT, 1998: Mechanisms of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Israel Journal of Entomology* **32**, 1-14.
- MOELLENBECK, D.J., M.L. PETERS, J.W. BING, J.R. ROUSE, L.S. HIGGINS, L. SIMS, T. NEVSHEMAL, L. MARSHALL, R.T. ELLIS, P.G. BYSTRAK, B.A. LANG, J.L. STEWART, K. KOUBA, V. SONDAG, V. GUSTAFSON, K. NOUR, D.P. XU, J. SWENSON, J. ZHANG, T. CZAPLA, G. SCHWAB, S. JAYNE, B.A. STOCKHOFF, K. NARVA, H.E. SCHNEPF, S.J. STELMAN, C. POUTRE, M. KOZIEL, N. DUCK, 2001: Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms. *Nature Biotechnology* **19**, 668-672.
- MURDOCK, L.L., G. BROOKHART, P.E. DUNN, D.E. FOARD, S. KELLEY, L. KITCH, R.E. SHADE, R.H. SHUKLE, J.L. WOLFSON, 1987: Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol. B* **87**, 783-787.
- OPPERT, B., K. HARTZER, C.M. SMITH, 2000: Characterization of the digestive proteinases of *Hypera postica* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae). *Trans. Kansas Acad. Sci.* **103**, 99-110.
- OPPERT, B., K.J. KRAMER, W.H. MCGAUGHEY, 1997: Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *The Chemist* **74**, 7-10.
- OPPERT, B., T.D. MORGAN, K. HARTZER, B. LENARCIC, K. GALESA, J. BRZIN, V. TURK, K. YOZA, K. OHTSUBO, K.J. KRAMER, 2003: Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinases and growth of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **134**, 481-490.
- ORR, G.L., J.A. STRICKLAND, T.A. WALSH, 1994: Inhibition of *Diabrotica* larval growth by a multicystatin from potato tubers. *Journal of Insect Physiology* **40**, 893-900.
- REECK, G., B. OPPERT, M. DENTON, M. KANOST, J. BAKER, K. KRAMER, 1999: Insect proteinases. In: Turk, V.: Proteases - New perspectives. Basel, Birkhäuser Verlag, 125-148.
- RYAN, C.A., 1990: Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**, 425-429.
- RYMERSON, R.T., R.P. BODNARYK, 1995: Gut proteinase activity in insect pests of canola. *Can. Entomol.* **127**, 41-48.
- SCHNEPF, H.E., S. LEE, J. DOJILLO, P. BURMEISTER, K. FENCIL, L. MORERA, L. NYGAARD, K.E. NARVA, J.D. WOLT, 2005: Characterization of Cry34/Cry35 binary insecticidal proteins from diverse *Bacillus thuringiensis* strain collections. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1765-1774.
- SIEGFRIED, B.D., N. WATERFIELD, R.H. FRENCH-CONSTANT, 2005: Expressed sequence tags from *Diabrotica virgifera virgifera* midgut identify a coleopteran cadherin and a diversity of cathepsins. *Insect Molecular Biology* **14**, 137-143.
- TERRA, W.R., C. FERREIRA, 1994: Insect digestive enzymes: Properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. B* **109**, 1-62.
- TERRA, W.R., C. FERREIRA, B.P. JORADAO, R.J. DILLON, 1996: Digestive enzymes. In: Lehane, M. J., P. F. Billingsley: Biology of the insect midgut. London, Chapman and Hall, 153-194.
- TURK, V., W. BODE, 1991: The cystatins - protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* **285**, 213-219.
- WOLFERSBERGER, M.G., P. LUTHY, P. PARENTI, V.F. SACCHI, B. GIORDANA, G.M. HANOZET, 1987: Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol. A* **86**, 301-308.
- WRIGHT, D.J., M. IQBAL, F. GRANERO, J. FERRÉ, 1997: A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Applied and Environmental Microbiol.* **63**, 1814-1819.
- ZHAO, Y., M.A. BOTELLA, L. SUBRAMANIAN, X. NIU, S.S. NIELSEN, R.A. BRESSAN, P.M. HASEGAWA, 1996: Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. *Plant Physiology* **111**, 1299-1306.