
**Eintrag und Reaktivität von Proteinen
in Böden am Beispiel der Proteine
Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 aus der
transgenen Maishybride MON89034 x MON88017
(*Zea mays* L.)**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

M. Sc. Mariana-Christin Albers
geboren am 06. Juli 1983 in Lübeck

2012

Referent: Prof. Dr. sc. agr. Jürgen Böttcher

Korreferent: PD Dr. rer. nat. Jürgen Niemeyer

Tag der Promotion: 01. August 2012

ABSTRACT

Import and reactivity of proteins in soils as shown by the proteins Cry1A.105, Cry2Ab2 and Cry3Bb1 from the transgenic maize hybrid MON89034 x MON88017 (*Zea mays* L.)

During the cultivation of the genetically modified maize hybrid MON88017 x MON89034, the proteins Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 continuously seep into soils where they adsorb onto soil particles. In order to determine the impact of hybrid cultivation on natural soils, the effect of the hybrid on litter degradation and the adsorptive and competitive behaviour of the three Cry proteins towards different grain size fractions were investigated in this study. Accordingly, various soil parameters were determined, solid surface properties of the proteins were modelled and these parameters were then correlated.

Adsorption levels and presence of the three Cry proteins in root exudates were measured by an in-house ELISA using monoclonal and polyclonal antibodies developed, produced and established by the author. Investigation parameters at the fine soil of topsoil and subsoil of the release area included grain size distribution, pH value, organic carbon content, specific outer surface area and the specific negative outer surface charge.

The nitrogen reservoir, representing litter degradation, was unaffected by the cultivation of four different maize strains. The particles of the clay fraction were the most active component of the soils which affected the protein behaviour to at least one magnitude more than the silt and sand fraction. This was due to the size of their specific outer surface area. In addition, the Cry3Bb1 protein was translocated more slowly than the proteins Cry2Ab2 and Cry1A.105. There was no correlation of the distribution coefficients with any other parameter assessed here. The modelling based on protein crystallographic data revealed a uniform distribution of the nonpolar and hydrophobic domains on the outer protein surface. By contrast the electrostatic potential of the Cry2Ab2 protein differed from those of the other proteins without influencing the distribution coefficient. It is suggested that protein-particle interaction may be due to PCEA (patch controlled electrostatic attraction).

Keywords: GM maize, Cry proteins, adsorption, root exudates, ELISA, antibodies

KURZFASSUNG

Eintrag und Reaktivität von Proteinen in Böden am Beispiel der Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 aus der transgenen Maishybride MON89034 x MON88017 (*Zea mays* L.)

Beim Anbau der gentechnisch veränderten Maishybriden MON88017 x MON89034 gelangen die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 kontinuierlich in die Böden und sorbieren dort an Bodenbestandteilen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Auswirkungen des Anbaus der Hybriden auf die Böden der Freisetzungsfäche über den Streuabbau und das Sorptions- und Konkurrenzverhalten der verschiedenen Proteine an unterschiedlichen Korngrößenfraktionen zu erfassen. Dazu wurden Bodenparameter ermittelt, dreidimensionale Oberflächeneigenschaften der Proteine modelliert und diese in Verbindung gesetzt.

Die Messung der Sorptionsstärke und des Vorliegens der drei Cry-Proteine in den gewonnenen Wurzelexsudaten erfolgte u. a. im In-House-ELISA, mit eigenen entwickelten, produzierten und im Assay etablierten mono- und polyklonalen Antikörpern. Ausgewählte Untersuchungsparameter an der Feinerde der Ober- und Unterböden der Freisetzungsfäche waren die Korngrößenverteilung, der pH-Wert, der Gehalt an organischem Kohlenstoff, die spezifische äußere Oberflächengröße und die spezifische negative äußere Oberflächenladung.

Der Stickstoffvorrat als Maß für den Streuabbau blieb vom Anbau von vier unterschiedlichen Maissorten unbeeinflusst. Als proteinbindungsaktivste Komponente der Böden erwiesen sich, aufgrund der Größe der spezifischen äußeren Oberfläche, die Teilchen der Tonfraktion, die das Verhalten der Proteine – um zumindest eine Größenordnung – stärker bestimmten als die der Schluff- und Feinerdefraktion. Auch wurde das Cry3Bb1-Protein in Quarzsand langsamer verlagert als die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2. Eine Korrelation der Verteilungskoeffizienten k mit den anderen untersuchten Parametern konnte nicht festgestellt werden. Die Modellierungen, basierend auf proteinkristallographischen Daten, ergaben eine gleichförmige Verteilung der unpolaren und hydrophoben Bereiche auf der äußeren Proteinoberfläche. Hingegen unterschied sich das elektrostatische Potential des Cry2Ab2-Proteins von den anderen – jedoch ohne Einfluss auf den Verteilungskoeffizienten –, was zumindest die Eingrenzung der Art der möglichen Wechselwirkungsmechanismen auf die PCEA (Patch Controlled Electrostatic Attraction) erlaubte.

Schlagworte: GM-Pflanzen, Cry-Proteine, Sorption, Wurzelexsudate, ELISA, Antikörper

I INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRACT

KURZFASSUNG

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
II	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
III	TABELLENVERZEICHNIS	XI
IV	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIII
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	DIE TRANSGENE MAISHYBRIDE MON89034 x MON88017	3
2.2	DER REAKTANT CRY-PROTEIN	6
2.2.1	<i>Aufbau der Cry-Proteine</i>	6
2.2.2	<i>Der Donator Bacillus thuringiensis</i>	9
2.2.3	<i>Wirkungsweise der Cry-Proteine</i>	10
2.2.4	<i>Eintrag von Cry-Proteinen in die Böden</i>	13
2.2.5	<i>Mobilität von Cry-Proteinen in den Böden</i>	15
2.3	DER REAKTANT BODEN	16
2.3.1	<i>Sorptionsmechanismen</i>	16
2.3.1.1	<i>Einflussfaktor pH-Wert</i>	18
2.3.2	<i>Sorption von Proteinen an Oberflächen</i>	19
2.3.3	<i>Sorption von Cry-Proteinen an Oberflächen</i>	22
2.3.3.1	<i>Einflussfaktoren</i>	23
2.3.4	<i>Abbau von Cry-Proteinen in den Böden</i>	26
2.3.5	<i>Abbau von Cry-Proteinen in pflanzlicher Biomasse</i>	28
2.4	DER ELISA ALS NACHWEISSYSTEM FÜR PROTEINE	30
3	ZIELSETZUNG	33
4	MATERIAL UND METHODEN	35
4.1	CHARAKTERISIERUNG DES REAKTANTEN BODEN	35
4.1.1	<i>Das Versuchsfeld</i>	35
4.1.2	<i>Der Bodentyp</i>	35
4.1.3	<i>Bodenprobenentnahme</i>	36
4.1.3.1	<i>Feinerde- und Schlufffraktionierung</i>	36
4.1.3.2	<i>Tonfraktionierung</i>	37

4.1.4	<i>Bestimmung ausgewählter Bodeneigenschaften</i>	37
4.1.4.1	<i>pH-Werte</i>	37
4.1.4.2	<i>Korngrößenverteilung</i>	38
4.1.4.3	<i>Gehalt an organischem Kohlenstoff (C_{org})</i>	38
4.1.4.4	<i>Spezifische negative äußere Oberflächenladung</i>	39
4.1.4.5	<i>Spezifische äußere Oberflächengröße</i>	39
4.1.4.6	<i>Vergleich der spezifischen Ladung der Tonfraktionen und der Tonpools</i>	40
4.1.4.7	<i>Mineralstickstoffvorrat (N_{min})</i>	40
4.2	WURZELEXSUDATION VON PROTEINEN	41
4.2.1	<i>Pflanzenkultivierung im Substrat Nährlösung - Versuch I</i>	41
4.2.2	<i>Pflanzenkultivierung im Substrat Nährlösung - Versuch II</i>	41
4.2.3	<i>Wurzelexsudatgewinnung im Substrat Nährlösung in den Versuchen I und II</i>	42
4.2.4	<i>Pflanzenkultivierung im Substrat Quarzsand</i>	42
4.2.5	<i>Test kommerzieller ELISA auf Kreuzreaktionen</i>	43
4.2.6	<i>Cry-Proteinnachweis in Wurzelexsudaten</i>	43
4.3	REAKTANTEN: BESCHREIBUNG DER PROTEINE CRY1A.105, CRY2Ab2 UND CRY3Bb1 ..	45
4.3.1	<i>Cry-Proteinmodelle</i>	45
4.3.2	<i>Aggregationsverhalten</i>	45
4.4	DER ELISA ALS NACHWEISSYSTEM FÜR PROTEINE	46
4.4.1	<i>Etablierung Cry1A.105-ELISA</i>	46
4.4.2	<i>Entwicklung und Produktion polyklonaler Antikörper gegen die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1</i>	46
4.4.2.1	<i>Titerkontrolle und Kreuzreaktivität</i>	46
4.4.3	<i>Entwicklung und Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper gegen die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2</i>	47
4.4.3.1	<i>Immunisierung und Fusion</i>	47
4.4.3.2	<i>Screening</i>	49
4.4.3.3	<i>Subklonierung</i>	50
4.4.3.4	<i>Rückstellproben</i>	51
4.4.3.5	<i>Sterilitätskontrolle</i>	51
4.4.3.6	<i>Test der Kulturüberstände der monoklonalen Antikörper gegen das Cry1A.105-Protein auf Kreuzreaktionen</i>	51
4.4.3.7	<i>Test der Kulturüberstände der monoklonalen Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein auf Kreuzreaktionen</i>	52
4.4.3.8	<i>Ig-Untergruppenbestimmung der monoklonalen Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein</i>	52
4.4.3.9	<i>Reinigung und Pufferaustausch monoklonaler Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein</i>	52

4.4.3.10	<i>Biotinylierung der mono- und polyklonalen Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein</i>	53
4.4.4	<i>Etablierung Cry2Ab2-ELISA</i>	54
4.5	SORPTION DER PROTEINE CRY1A.105, CRY2AB2 UND CRY3BB1	55
4.5.1	<i>Probenvorbereitung</i>	55
4.5.2	<i>Anpassung der molaren Konzentrationen</i>	55
4.5.3	<i>Sorption an der Feinerdefraktion</i>	56
4.5.4	<i>Sorption an der Schlufffraktion</i>	57
4.5.5	<i>Sorption an der Tonfraktion</i>	57
4.5.5.1	<i>Einfluss von DTT auf die Sorption</i>	58
4.5.5.2	<i>Überprüfung der pH-Werte in den Sorptionsmessungen</i>	58
4.5.6	<i>Konkurrenzuntersuchungen an der Tonfraktion</i>	59
4.5.8	<i>Zusammenhang zwischen der Sorption der Cry-Proteine und den Parametern der Tonfraktion</i>	59
5	ERGEBNISSE	61
5.1	CHARAKTERISIERUNG DES REAKTANTEN BODEN	61
5.1.1	<i>Der Bodentyp</i>	61
5.1.2	<i>Tonausbeute</i>	62
5.1.3	<i>pH-Werte</i>	63
5.1.4	<i>Korngrößenverteilung</i>	65
5.1.5	<i>Gehalt an organischem Kohlenstoff (C_{org})</i>	68
5.1.6	<i>Spezifische negative äußere Oberflächenladung</i>	69
5.1.7	<i>Spezifische äußere Oberflächengröße</i>	71
5.1.8	<i>Vergleich der spezifischen Ladung der Tonfraktion und der Tonpools</i>	72
5.1.9	<i>Mineralstickstoffvorrat (N_{min})</i>	73
5.2	WURZELEXSUDATION VON PROTEINEN	75
5.2.1	<i>Test kommerzieller ELISA auf Kreuzreaktionen</i>	75
5.2.2	<i>Cry-Proteinnachweis in Wurzelexsudaten</i>	76
5.3	REAKTANTEN: BESCHREIBUNG DER PROTEINE CRY1A.105, CRY2AB2 UND CRY3BB1 ..	77
5.3.1	<i>Cry-Proteinmodelle</i>	77
5.3.2	<i>Aggregationsverhalten</i>	80
5.4	DER ELISA ALS NACHWEISSYSTEM FÜR PROTEINE	80
5.4.1	<i>Etablierung Cry1A.105-ELISA</i>	81
5.4.2	<i>Entwicklung und Produktion polyklonaler Antikörper gegen die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1</i>	81
5.4.3	<i>Entwicklung und Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper gegen das Cry1A.105-Protein</i>	82

5.4.4	<i>Entwicklung und Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein</i>	83
5.4.4.1	<i>Sterilitätskontrolle</i>	84
5.4.4.2	<i>Ig-Untergruppenbestimmung der monoklonalen Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein</i>	84
5.4.4.3	<i>Reinigung und Pufferaustausch der monoklonalen Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein</i>	84
5.4.5	<i>Etablierung Cry2Ab2-ELISA</i>	84
5.5	SORPTION DER PROTEINE CRY1A.105, CRY2AB2 UND CRY3BB1	86
5.5.1	<i>Sorption an der Feinerdefraktion</i>	86
5.5.2	<i>Sorption an der Schlufffraktion</i>	87
5.5.3	<i>Sorption an der Tonfraktion</i>	88
5.5.3.1	<i>Einfluss von DTT auf die Sorption</i>	89
5.5.3.2	<i>Überprüfung der pH-Werte in den Sorptionsmessungen</i>	89
5.5.4	<i>Konkurrenzuntersuchungen an der Tonfraktion</i>	89
5.5.5	<i>Zusammenhang zwischen der Sorption der Cry-Proteine und den Parametern der Tonfraktion</i>	90
6	DISKUSSION	93
6.1	CHARAKTERISIERUNG DES REAKTANTEN BODEN	93
6.1.1	<i>Der Bodentyp</i>	93
6.1.2	<i>Tonausbeute</i>	94
6.1.2.1	<i>Korngrößenverteilung der Tonfraktion</i>	95
6.1.3	<i>pH-Werte</i>	96
6.1.4	<i>Korngrößenverteilung und Bodenart</i>	98
6.1.5	<i>Gehalt an organischem Kohlenstoff (C_{org})</i>	99
6.1.6	<i>Spezifische negative äußere Oberflächenladung</i>	100
6.1.7	<i>Spezifische äußere Oberflächengröße</i>	101
6.1.8	<i>Mineralstickstoffvorrat (N_{min})</i>	103
6.2	WURZELEXSUDATION VON PROTEINEN	104
6.2.1	<i>Wurzelexsudation von Proteinen in den Substraten Nährlösung und Quarzsand</i> . 104	
6.2.2	<i>Test kommerzieller ELISA auf Kreuzreaktionen</i>	109
6.2.3	<i>Cry-Proteinnachweis in Wurzelexsudaten</i>	109
6.2.4	<i>Verlagerung von Proteinen und Risikoabschätzung</i>	110
6.3	REAKTANTEN: BESCHREIBUNG DER PROTEINE CRY1A.105, CRY2AB2 UND CRY3BB1 113	
6.3.2	<i>Cry-Proteinmodelle</i>	113
6.3.2	<i>Aggregationsverhalten</i>	115
6.4	DER ELISA ALS NACHWEISSYSTEM FÜR PROTEINE	116

6.4.1	<i>ELISA-Etablierung</i>	116
6.4.2	<i>Entwicklung und Produktion von Antikörpern</i>	118
6.5	SORPTION DER PROTEINE CRY1A.105, CRY2Ab2 UND CRY3Bb1.....	120
6.5.1	<i>Sorption an der Feinerde- und Schlufffraktion</i>	121
6.5.2	<i>Sorption an der Tonfraktion</i>	122
6.5.2.1	<i>Einfluss von DTT auf die Sorption</i>	125
6.5.2.2	<i>pH-Werte in den Sorptionsmessungen</i>	125
6.5.3	<i>Proteinkonkurrenz</i>	127
6.5.4	<i>Zusammenhang zwischen der Sorption der Cry-Proteine und den Parametern der Tonfraktion</i>	128
7	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	129
8	ZUSAMMENFASSUNG.....	133
9	LITERATURVERZEICHNIS	137
	ANHANG	157
A1	PROTOKOLL: ELISA ZUM NACHWEIS VON CRY1A.105-PROTEINEN	157
A2	PROTOKOLL: ELISA ZUM NACHWEIS VON CRY2Ab2-PROTEINEN.....	158
A3	VORGESCHLAGENE PROTEINADSORPTIONSMECHANISMEN.....	161
	CURRICULUM VITAE.....	163
	DANKSAGUNG	165
	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION.....	167

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-ME	2-Mercaptoethanol C ₂ H ₆ SO
3'-Ende	in der Nukleinsäure ist die Hydroxygruppe an 3'-Position einer Nukleobase mit der Phosphatgruppe der nächsten verbunden
35S-CaMV	Promotor aus dem Cauliflower Mosaic Virus
[-]	dimensionslos
Å	Angstroem
AgNO ₃	Silbernitrat
AG8	Krebszelllinie
AH	Azaserin Hypoxanthin
A _h	mineralischer Oberboden (OB), Anreicherung von Humus (< 15 Masse-%)
Ak	Antikörper
Al	Aluminium
A _l	mineralischer OB, Tonverlagerung = Lessivierung, typisch für Parabraunerde
APS	Ammoniumpersulfat, N ₂ H ₈ S ₂ O ₈
AS	Aminosäure(n)
A.t.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
A/T-Gehalt	Adenin/Thymin (Basenpaarung)
BALB/c	Albinomäuse Inzuchtlinie
B _{bt}	mineralischer Unterboden (UB), Akkumulation von eingewaschenem Ton
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BLAST	basic local alignment search tool
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
B _t	mineralischer Unterboden (UB), Akkumulation von eingewaschenem Ton
B.t.	<i>Bacillus thuringiensis</i>
B _v	verwitterter Mineralhorizont im Unterboden
C ₂ H ₃ NaO ₂	Natriumacetat
C ₃ H ₆ O	Aceton
C ₃ H ₈ O ₃	Glycerin
C ₅ H ₈ O ₂	Glutardialdehyd
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	Natriumcitrat
C ₈ H ₁₆ NCl	Polydiallyldimethylammoniumchlorid, PolyDADMAC
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid Dihydrat
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	Calciumnitrat
CAPS	N-Cyclohexyl-3-Aminopropansulfonsäure - verhindert Oxidation von SH-Gruppen zu SS-Brücken durch Luftsauerstoff
CH ₂ O	Formaldehyd
CO ₂	Kohlendioxid

C _{org}	organischer Kohlenstoff
Cry	crystal, kristallines Protein
CuSO ₄ · 5H ₂ O	Kupfersulfat
Cyt	cytotoxic protein, zytolytisches Protein
DLS	<u>D</u> ynamische <u>L</u> icht <u>s</u> treuung
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DST	<u>D</u> iagnostic <u>S</u> ensitivity <u>T</u> est
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraessigsäure – Komplexbildner, bildet stabile 1:1-Chelatkomplexe mit Kationen mit einer Ladungszahl von mind. 2
ELISA	<u>e</u> nzyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay
EMZ	Europäischer Maiszünsler (<i>Ostrinia nubilalis</i> Hübner) (Lepidoptera: Crambidae)
EPSPS	5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphatsynthaseprotein
<i>et al.</i>	et altera (und andere)
EtOH	Ethanol
Fab	fragment antigen-binding, antigenbindendes Fragment
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
Fe	Ferrum, Eisen
FW	Frischgewicht, Frischmasse
GAU	<u>G</u> eorg- <u>A</u> ugust- <u>U</u> niversität
GM	genetisch modifiziert
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O _{bidest/dest/steril}	zweifach destilliertes/destilliertes/steriles Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
H ₃ BO ₃	Borsäure
ha	Hektar (Flächenmaß)
HCl	Chlorwasserstoff
HELOS	<u>H</u> elium- <u>N</u> eon <u>L</u> aser <u>O</u> ptisches <u>S</u> ystem
HRP	<u>h</u> orseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
ICP	parasporale kristalline Proteine
IEP	<u>I</u> soelektrischer <u>P</u> unkt
IgG ₁	<u>I</u> mmunglobulin Typ <u>G</u> ₁
IL-6	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin- <u>6</u> , Wachstumsfaktor
K	Kalium
κ	leichte Kette des Immunglobulins
KAK	<u>K</u> ationenaustausch <u>k</u> apazität

KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
La	Lanthan
λ	Wellenlänge der elektromagnetischen Strahlung [nm]
LDPE	low-density polyethylene
mAk	monoklonale/r Antikörper
Mg^{2+}	Magnesium
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnesiumsulfat
Mio.	Million
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Manganchlorid
MON89034	transgene Maissorte, die die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 produziert
Mrd.	Milliarde
M_w	Molekulargewicht
MWB	Westlicher Maiswurzelbohrer (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> LeConte)
N	Stickstoff
$N_2(l)$	flüssiger Stickstoff
Na	Natrium
$Na_2CO_3/NaHCO_3$	Natriumcarbonat/Natriumbicarbonat
NaBr	Natriumbromid
NaCl	Natriumchlorid
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	Natriumdihydrogenphosphat
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
$Na_2S_2O_3$	Natriumthiosulfat
$Na_2S_2O_4$	Natriumdithionit
nanoLC-MS/MS	nanoscale capillary liquid chromatography-mass spectrometer
NH_4^+	Ammonium
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
NH_4NO_3	Ammoniumnitrat
$(NH_4)Mo_7O_6 \cdot 4H_2O$	Ammonium hepta Molybdänoxid
N_{min}	mineralischer Stickstoff
NO_3^-	Nitrat
NptII	Neomycin-Phosphotransferase, Antibiotikaresistenzgen
OB	Oberboden
OD	optische Dichte
p.a.	per annum, pro Jahr
pAk	polyklonale/r Antikörper
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS+P/S	phosphate buffered saline + Penicillin/Streptomycin
PCD	particle charge detector

PDB	The <u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank
PEG	<u>P</u> oly <u>e</u> nthylenglykol
PET	<u>P</u> oly <u>e</u> thylent <u>e</u> rephthalat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
PLL	<u>P</u> oly- <u>L</u> - <u>L</u> ysin
PTFE	<u>P</u> olytetrafluor <u>ä</u> thylen/ Teflon
R10F ⁻	Zellkulturmedium RPMI mit 10 % FCS-Zusatz ohne Zusatz von Antibiotika
R ²	Person'scher Korrelationskoeffizient
R20F ⁺	Zellkulturmedium RPMI mit 20 % FCS-Zusatz mit Zusatz von Antibiotika
RH	relative humidity, relative Luftfeuchtigkeit
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute - Zellkulturmedium für Leucozyten
RT	Raumtemperatur
SAB	<u>S</u> abouraud- <u>D</u> extrose
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
Si	Silizium
SiO ₂	Siliziumdioxid
SOM	<u>s</u> oil <u>o</u> rganic <u>m</u> atter, organische Bodensubstanz
sp.	Subspecies
SV	Säulenvolumen
Tefluthrin	Bodeninsektizid, 2,3,5,6-Tetrafluor-4-Methylbenzyl
Temed	N,N,N',N'- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
TMB	<u>T</u> etramethylbenzidi <u>n</u>
Tris/HCl	Pufferbestandteil, tris(hydroxymethyl)aminomethane C ₄ H ₁₁ NO ₃ -HCl
tRNA	<u>t</u> ransfer <u>R</u> ibonukleins <u>ä</u> ure
TW	Trockengewicht, Trockenmasse
Tween20	nicht ionisches Detergenz
u	units, Einheiten
UB	Unterboden
UV	ultraviolette Strahlung
var.	Variante
Vip-Proteine	<u>v</u> egetative <u>i</u> nsecticidal <u>p</u> roteins
vs.	versus, gegen
Well	Vertiefung auf einer Mikrotiterplatte
WO ₃	Wolframtrioxid
xg	Schwerefeldschritte
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	Zinksulfat

III TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 4.2.1:	<i>Zusammensetzung der Nährlösungen.....</i>	<i>41</i>
Tab. 4.2.6:	<i>Zusammensetzung für jeweils zwei Trenn- und Sammelgele (*Seralpur Pro 90 CN, **Tris-base 18,165 g 1,5 M, SDS 0,4 g 0,4 %, Temed (Tetramethylethylendiamin) 400 µl 0,4 %, pro 100ml pH-Wert 8,8, ***Tris-Base 6,055 g 0,5 M, SDS 0,4 g 0,4 %, Temed 400 µl 0,4 %, pro 100ml pH-Wert 6,8, ****30 % Acrylamide/Bis Solution, 37,5:1 (2,6 %C), Bio-Rad, *****Ammoniumpersulfat).....</i>	<i>44</i>
Tab.: 4.4.3.1:	<i>Zusammensetzung von Selektions-, R20F⁺- und R10F⁻-Medium (*L-Glutamin 200 mM, **Penicillin/Streptomycin, Biochrom AG, ***recombinant murine interleukin-6, ****Mercaptoethanol, *****Azaserin/Hypoxanthin).....</i>	<i>49</i>
Tab. 4.5.5.1:	<i>Pufferzusammensetzung der gelieferten Cry-Proteine.....</i>	<i>58</i>
Tab. 4.5.6:	<i>Die drei Varianten der Konkurrenzuntersuchungen.....</i>	<i>59</i>
Tab. 5.1.1a:	<i>Profilbeschreibung der Parzelle A1 (Länge des roten Stifts: 20 cm).....</i>	<i>61</i>
Tab. 5.1.1b:	<i>Profilbeschreibung der Parzelle C6 (Länge des roten Stifts: 20 cm).....</i>	<i>62</i>
Tab. 5.1.1c:	<i>Profilbeschreibung der Parzelle E5 (Länge des roten Stifts: 20 cm).....</i>	<i>62</i>
Tab. 5.3.1a:	<i>Ausgewählte Eigenschaften der drei Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1.....</i>	<i>77</i>
Tab. 5.3.1b:	<i>Eigenschaften der einzelnen Cry-Proteindomänen.....</i>	<i>78</i>
Tab. 5.4.1:	<i>ELISA-Protokoll zum Nachweis des Cry1A.105-Proteins.....</i>	<i>81</i>
Tab. 5.4.5:	<i>ELISA-Protokoll zum Nachweis des Cry2Ab2-Proteins.....</i>	<i>86</i>
Tab. 5.5.3.2:	<i>pH-Werte der Lösungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Einzelwerte).....</i>	<i>89</i>
Tab. 6.2.1:	<i>Wurzelexsudationsraten [ng L⁻¹ h⁻¹].....</i>	<i>106</i>
Tab. 6.2.4a:	<i>Proteineintragsmengen durch Maispflanzen auf einem Hektar Anbaufläche.....</i>	<i>112</i>
Tab. 6.2.4b:	<i>Proteineintragsmengen durch Maiswurzeln auf einem Hektar Anbaufläche.....</i>	<i>112</i>
Tab. 6.2.4c:	<i>Hochrechnung der Proteinexsudationsraten über die Kultivierungsdauer im Versuch I mit Nährlösung.....</i>	<i>113</i>
Tab. A3:	<i>Tabellarische Übersicht über vorgeschlagene Proteinadsorptionsmechanismen.....</i>	<i>161</i>

IV ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2.2.1:	<i>Sekundärstruktur eines Cry-Proteins (Cry2Aa) mit eingezeichneten Domänen.</i>	7
Abb. 2.2.3:	<i>Modell der Wirkungsweise von Cry-Proteinen als aufeinanderfolgende Wechselwirkung mit unterschiedlichen Rezeptormolekülen in Larven von Lepidopteren (verändert nach Bravo et al., 2007).</i>	11
Abb. 2.3.1:	<i>Schematische Darstellung unterschiedlicher Bindungsmechanismen ([1] Dipol-Dipol-Bindung, [2] Wasserstoffbrückenbindung, [3] Ionenbindung, [4] Säure-Base-Reaktion und [5] Ligandenaustauschreaktion).</i>	17
Abb. 2.3.2:	<i>Schematische Darstellung des von Fleer et al. (1993) beschriebenen Adsorptionsvorgangs (Ablauf siehe vorausgegangener Text).</i>	21
Abb. 2.3.3.1:	<i>Schematische Darstellung des Sorbenten Cry1Ab und der intermolekularen PCEA bei zwei pH-Werten gegenüber negativ geladenem SiO₂ bei unterschiedlichen Ionenstärken (I) und gegenüber positiv geladenem Poly-L-Lysin. Das Cry1Ab-Protein adsorbierte mit den positiv geladenen Domänen II und III zur SiO₂-Oberfläche orientiert und mit der negativ geladenen Domäne I zum Poly-L-Lysin (verändert nach Madliger et al., 2010).</i>	25
Abb. 2.4:	<i>Schematischer Ablauf eines Sandwich-ELISAs. HRP = Horseradish Peroxidase, TMB = Tetramethylbenzidin. (verändert nach epitomics.com /images/products/sandwich.jpg, 2012/04/16).</i>	30
Abb. 4.1.1:	<i>Plan des Versuchsfeldes mit eingezeichneten Maissorten (MON = MON89034 x MON88017). Die Parzellen, in denen die Profilvergraben angelegt wurden, sind rot hervorgehoben (A1, C6 und E5).</i>	35
Abb. 4.1.3:	<i>Schematische Darstellung einer Parzelle mit Bodenprobenentnahmestruktur.</i>	36
Abb. 4.2.4:	<i>Maispflanzen in den Versuchen mit dem Substrat Nährlösung (linkes und mittleres Bild) und Mais einzelpflanzen im Substrat Quarzsand (rechtes Bild).</i>	43
Abb. 4.4.3.10:	<i>Berechnung des für die Biotinylierungsreaktion notwendigen Biotins über die verwendete Antikörpermenge $m_{\Sigma}(Ak) = [mg]$, den Biotinylierungsgrad [%] und die Molekulargewichte der Antikörper $M(Ak) = 150.000 \text{ g mol}^{-1}$ und des Biotins $M(\text{Biotin}) = 454,5402 \text{ g mol}^{-1}$.</i>	54
Abb. 4.5.3:	<i>Gleichung für die lineare Isotherme ($X_S =$ Menge des im Gleichgewicht sorbierten Stoffes, $k =$ Verteilungskoeffizient, $X_L =$ Menge des Stoffes in der Gleichgewichtslösung).....</i>	57
Abb. 4.5.5:	<i>Versuchsfeld mit eingezeichnetem Poolungsschema (Tonpool 1 Parzellen ABC 1-4, Tonpool 2 Parzellen ABC 5-8, Tonpool 3 Parzellen DE 1-8).</i>	57
Abb. 5.1.2:	<i>Gewonnene Tonmengen [g] des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Freisetzungsfäche.</i>	63
Abb. 5.1.3a:	<i>pH-Werte des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Freisetzungsfäche.</i>	63

- Abb. 5.1.3b:** *Boxplots der gemessenen pH-Werte des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Feinerdefraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an. 64*
- Abb. 5.1.3c:** *pH-Werte in den angelegten Profilgruben in den Parzellen A1, C6 und E5. 64*
- Abb. 5.1.4a:** *Prozentuale Sandanteile des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens, prozentuale Schluffanteile des Ober(C)- und Unter(D)-Bodens und prozentuale Tonanteile des Ober(E)- und Unter(F)-Bodens der Freisetzungsfäche..... 66*
- Abb. 5.1.4b:** *Boxplots der prozentualen Sandgehalte des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens und der prozentualen Schluffgehalte des Ober(C)- und Unter(D)-Bodens der Feinerdefraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an. 67*
- Abb. 5.1.4c:** *Boxplots der prozentualen Tongehalte im Oberboden der Feinerdefraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an..... 67*
- Abb. 5.1.5a:** *Prozentualer C_{org} -Anteil in der Feinerdefraktion des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens und in der Tonfraktion des Ober(C)- und Unter(D)-Bodens der Freisetzungsfäche. 68*
- Abb. 5.1.5b:** *Boxplots der gemessenen Gehalte an C_{org} im Unterboden der A) Feinerdefraktion und der B) Tonfraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an. 69*
- Abb. 5.1.6a:** *Spezifische negative äußere Oberflächenladung der Schlufffraktion des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Freisetzungsfäche..... 69*
- Abb. 5.1.6b:** *Spezifische negative äußere Oberflächenladung der Tonfraktion des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Freisetzungsfäche..... 70*
- Abb. 5.1.6c:** *Boxplots der gemessenen spezifischen äußeren Oberflächenladung des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Schlufffraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an..... 70*
- Abb. 5.1.6d:** *Boxplots der gemessenen spezifischen äußeren Oberflächenladung des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Tonfraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an..... 71*
- Abb. 5.1.7a:** *Spezifische äußere Oberfläche der Feinerdefraktion des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Freisetzungsfäche..... 71*
- Abb. 5.1.7b:** *Spezifische äußere Oberfläche der Tonfraktion des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Freisetzungsfäche. 72*

- Abb. 5.1.7c:** *Boxplots der gemessenen äußeren Oberfläche des Oberbodens der A) Feinerdefraktion und B) Tonfraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant. (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an..... 72*
- Abb. 5.1.8:** *A) Spezifische Ladung der Tonfraktion im Ober- und Unterboden und B) spezifische Ladung der Tonpools im Ober(OB)- und Unter(UB)-Boden im Vergleich mit den theoretisch berechneten Werten..... 73*
- Abb. 5.1.9a:** *Boxplots der N_{min} -Gehalte der Böden in Abhängigkeit von der angebauten Maissorte (Versuchsjahre 2009 bis 2011). Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an. (B.t.-Mais = MON89034 x MON88017, + T = Tefluthrin (Bodeninsektizid)..... 74*
- Abb. 5.1.9b:** *Boxplots der N_{min} -Gehalte in der Feinerdefraktion des Oberbodens in den Versuchsjahren 2009 bis 2011. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Holm-Sidak, $n = 40$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an. 74*
- Abb. 5.1.9c:** *Boxplots der N_{min} -Gehalte in der Feinerde des Oberbodens in den Versuchsjahren 2010 (A) und 2011 (B). Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an. 75*
- Abb. 5.2.2a:** *Exsudationsraten der Cry-Proteine in den Versuchen mit den Substraten Nährlösung und Quarzsand. 76*
- Abb. 5.2.2b:** *Gelelektrophoretische Auftrennung der Cry-Proteine und der in den Versuchen gewonnenen aufkonzentrierten Wurzelexsudate (Isogen = DKc5143, Bt = MON89034 x MON88017). 77*
- Abb. 5.3.1a:** *Äußere Oberflächen der Cry-Proteine mit Hilfe des Swiss PDB Viewers modelliert (Domäne I: hellblau, Domäne II: lila, Domäne III: grün, elektrostatisches Potential: rot-blaues Gitternetz). 79*
- Abb. 5.3.1b:** *Äußere Oberflächen der Cry-Proteine mit Hilfe des Swiss PDB Viewers modelliert (gelb: unpolare/hydrophobe Aminosäuren)..... 79*
- Abb. 5.3.1c:** *Äußere Oberflächen der Cry-Proteine mit Hilfe des Swiss PDB Viewers modelliert (hellblau: polare/ungeladene Aminosäuren). 79*
- Abb. 5.3.2:** *Teilchengrößenverteilung des Cry3Bb1-Protein in PBST (phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 4,1 mM NaH_2PO_4 , 9,4 mM Na_2HPO_4 , 145 mM NaCl und 0,05 % Tween20) verdünnt (Original-abbildung verändert OmniSIZE Results Report)..... 80*
- Abb. 5.4.2:** *Die Extinktion als Maß für den Titer über alle untersuchten Immunisierungstermine..... 82*
- Abb. 5.4.3:** *Die Extinktion als Maß für A) den Antikörpertiter, sowie B) die Überprüfung des kreuzreaktiven Verhaltens der gegen das Cry1A.105-Protein generierten Klone. 82*

- Abb. 5.4.4:** *Spezifität der gegen das Cry2Ab2-Protein generierten monoklonalen Antikörper (Die Extinktion dient als Maß für die Antikörperspezifität) (FCS = fetales Kälberserum, R20F+ = Medium, IL-6 = Wachstumsfaktor, PBST = phosphatgepufferte Kochsalzlösung). 83*
- Abb. 5.4.5a:** *Auswahl der für den Cry2Ab2-ELISA geeigneten Antikörperkombination..... 84*
- Abb. 5.4.5b:** *Variation der Konzentrationen von Fang- und Detektionsantikörper in Abhängigkeit von der Cry2Ab2-Konzentration. Der gestrichelte Balken kennzeichnet die Nachweisgrenze von $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$ bei einer Extinktion von 0,1. 85*
- Abb. 5.5.1:** *Boxplot der Verteilungskoeffizienten k für die Sorption des Cry3Bb1-Proteins an der Feinerdefraktion. 86*
- Abb. 5.5.2:** *Boxplots der Verteilungskoeffizienten k für die Sorption der Proteine A) Cry3Bb1 und B) Cry1A.105 an der Schlufffraktion des Ober- und Unterbodens. 87*
- Abb. 5.5.3:** *Verteilungskoeffizienten k für die Sorption der Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 an den Tonpools des Ober(OB)- und Unterbodens (UB). 88*
- Abb. 5.5.4:** *In den Konkurrenzuntersuchungen für das Cry1A.105- und Cry2Ab2-Protein ermittelte Verteilungskoeffizienten k 90*
- Abb. 5.5.5.a:** *Höhe des Verteilungskoeffizienten k für die Proteine Cry3Bb1 und Cry1A.105 in Abhängigkeit von der Korngröße (Dunn's Method, Tonfraktion $< 2 \mu\text{m}$, $n = 6$, Schlufffraktion $< 63 \mu\text{m}$, $n = 80$, Feinerdefraktion $< 2 \text{ mm}$, $n = 40$). 91*
- Abb. 5.5.5b:** *Beziehung der Verteilungskoeffizienten k mit A) der spezifischen äußeren Oberflächengröße, B) der Höhe der spezifischen äußeren negativen Oberflächenladung, C) der spezifischen Ladung und D) des C_{org} -Gehalts. 92*

1 EINLEITUNG

Seit Beginn der Kommerzialisierung 1996, als zum ersten Mal gentechnisch veränderte Varianten von Mais verkauft wurden (Schnepf *et al.*, 1998), steigt die Anbaufläche gentechnisch modifizierter (GM)-Pflanzen kontinuierlich an. Die vorherrschenden gentechnischen Veränderungen betreffen die Insekten- und Herbizidresistenz, wobei der Großteil der Pflanzen mehrere veränderte Merkmale aufweist (James, 2009).

Mit der Maishybriden MON89034 x MON88017 (Genuity® VT Triple PRO®) wurde von dem Konzern Monsanto zum ersten Mal eine Maissorte entwickelt, die den oberirdischen Insektenschutz in zweifacher Wirkungsweise mit einem unterirdischem Insektenschutz und einer Herbizidresistenz (Roundup Ready 2® Technology) kombinierte. Zu dieser Hybriden durchgeführte Untersuchungen beschäftigten sich mit der Auswirkung des Anbaus auf die wurzelverbundene Endophytengemeinschaft (Prischl *et al.*, 2012), auf die Weichwanze *Trigonotylus caelestialium* und den Regenwurm *Lumbricus terrestris* (Schultheis, 2011) sowie auf die Schmetterlinge „Kleiner Fuchs“ *Aglais urticae* und das Tagpfauenauge *Inachis io* (Schuppener, 2011). Bislang wurde aber noch keine Studie an den Cry-Proteinen dieser Hybriden bezüglich des Eintrags und der Reaktivität im Boden veröffentlicht.

Die Gene, die die Insektenresistenz hervorrufen, stammen ursprünglich aus dem Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* (Crecchio & Stotzky, 2001, Saxena *et al.*, 2002a, Gatehouse, 2008). Im Bakterium werden diese Gene während der Sporulation exprimiert, wobei aus den gebildeten Proteinen Kristalle entstehen. Diese Kristalle lösen sich nach Aufnahme durch ein anfälliges Insekt in dessen Mitteldarm (Galitsky *et al.*, 2001) bei bestimmten pH-Werten auf, werden proteolytisch aufgespalten und nehmen ihre dreidimensionale Struktur als aktives *B.t.*-Toxin/Cry-Protein ein (Höfte & Whiteley, 1989). Dreidimensionale Strukturen und der damit verbundene Rückschluss auf proteinchemische Eigenschaften sind bisher nur von einzelnen Cry-Proteinen bekannt (Li *et al.*, 1991). Durch die Bindung eines Cry-Proteins an passende Rezeptoren und eine nachfolgende Proteinoligomerisierung (Pigott & Ellar, 2007), öffnen sich Poren im Epithel, was zu einer Vermischung von Hämolymphe und Darminhalt und schließlich zum Tod des Insekts führt (Luthy & Ebersold, 1981). In GM-Pflanzen wird das aktive Toxin direkt exprimiert, sodass die Auflösung und die proteolytische Abspaltung umgangen werden und das Protein bei passenden Rezeptoren sofort aktiv werden kann (Chevallier *et al.*, 2003, Clark *et al.*, 2005).

Problematisch kann sein, dass die Cry-Proteine neben der Aufnahme durch die Insekten über das Pflanzenmaterial auch mit diesem z. B. über Ernterückstände (Zwahlen *et al.*, 2003) oder

Wurzelexsudate (Saxena *et al.*, 1999) in die Böden der Anbauflächen gelangen und dort ihre insektizide Aktivität beibehalten. Ob und wie viele Proteine von der Maishybriden MON89034 x MON88017 exsudiert werden, ist bisher unbekannt.

Im Boden können die frei oder im Pflanzenmaterial vorliegenden Cry-Proteine an vielen Prozessen beteiligt sein, wie z. B. der Bindung an Partikel der Bodenfraktion, dem Abbau der Proteine durch vielfältige Mikroorganismen oder der Verlagerung der Cry-Proteine in tiefere Bodenschichten. Die Bindung von Proteinen an Partikel der Bodenfraktion wird nicht nur durch die Art und die dreidimensionale Struktur eines Proteins beeinflusst. Auch die Partikel der Korngrößenfraktionen und die damit assoziierten Eigenschaften, wie z. B. Oberflächen- (Pagel-Wieder *et al.*, 2007) und Partikelgröße und das umgebende Milieu der Bodenlösung mit seinem spezifischen pH-Wert (Tapp *et al.*, 1994) und darin gelösten Elementen (Koskella & Stotzky, 1997) spielt eine Rolle. Der Abbau reiner Cry-Proteine durch Mikroorganismen ist durch die schnelle und oftmals irreversible Bindung an die Bodenfraktionspartikel stark eingeschränkt (Zang *et al.*, 2000, Nguyen & Harvey, 2001). Auch soll der Abbau der pflanzlichen Biomasse durch die Cry-Proteine beeinflusst werden. Hopkins *et al.* (2001) und Stotzky (2004) sprechen von einem verlangsamten Abbau, sodass z. B. ein Einfluss auf die Mineralisierungsrate des Stickstoffs angenommen werden kann. Der durchaus schnelle Sorptionsprozess, also die Bindung der Proteine an Partikel der Bodenfraktion, der sich unter den Proteinen jedoch unterscheidet (Tapp *et al.*, 1994), hat ebenfalls einen starken Einfluss auf die Verlagerungsgeschwindigkeit (Gisi *et al.*, 1997) dieser Proteine in tiefere Bodenschichten. Unklar ist, ob das Vorliegen verschiedener Cry-Proteine in feldrelevanten Konzentrationen im Boden zu einem Konkurrenzverhalten dieser um Bindungsplätze auf den Bodenpartikeln führt.

Das Verhalten der Cry-Proteine unter kontrollierten Bedingungen kann mit proteinchemischen Nachweisverfahren, wie dem ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) untersucht werden. Für diesen Test werden jedoch Antikörper benötigt, welche die unterschiedlichen Proteine spezifisch erkennen und über eine gekoppelte Farbreaktion nachweisen (Engvall & Perlman, 1971).

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 DIE TRANSGENE MAISHYBRIDE MON89034 x MON88017

Die Kulturpflanze Mais (*Zea mays* L.) wurde vor 10 000 Jahren aus dem Gras Teosinte domestiziert (Gewin, 2003). Inzwischen sind die meisten Menschen bei ihrer Ernährung zu einem größeren Teil von Gräsern, einschließlich Reis, Weizen und Mais, abhängig (Kellogg, 2001). Der Mais gehört zum Gräserstamm Andropogoneae (Wisniewski *et al.*, 2002) und stellt heute weltweit die drittbedeutendste Getreidekulturpflanze dar (Ramessar *et al.*, 2008), die 2010 eine weltweite Produktion von 844 Mio. t erreichte (faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor, 2012/02/24).

Jedoch gibt es an Mais, wie bei allen anderen Kulturpflanzen auch, Schädlinge, die zu großen Ertragseinbußen führen können. Die bedeutendsten Insektenschädlinge in den USA sind der Westliche Maiswurzelbohrer (MWB) (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) – ein Mitglied der Blattkäferfamilie (Coleoptera: Chrysomelidae) (Miethling-Graff *et al.*, 2009) mit zunehmender Bedeutung in Europa (Clark *et al.*, 2006, Gray *et al.*, 2009) –, der Nördliche Maiswurzelbohrer (*Diabrotica barberi* Smith & Lawrence) (Steffey *et al.*, 1999, Moellenbeck *et al.*, 2001, Whitworth *et al.*, 2002, Vaughn *et al.* 2005) und der Europäische Maiszünsler (EMZ) (*Ostrinia nubilalis* Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) (Ostlie *et al.*, 1997, Huang *et al.*, 1999). Aufgrund von Ertragsverlusten und Kontrollkosten beträgt der wirtschaftliche Schaden durch den MWB bzw. den EMZ für die US-Maisbauern je 1 Mrd. \$ p.a. (Metcalf, 1986, Ostlie *et al.*, 1997, ARS 2001, James, 2009).

Der MWB wurde in den frühen 1990er Jahren in Serbien eingeschleppt und verbreitete sich schnell in angrenzenden europäischen Ländern, einschließlich Deutschland (Kuhlmann & van der Burgt, 1998, Miller *et al.*, 2005, Wutke *et al.*, 2005). MWBs ernähren sich von Maiskeimlingswurzeln (Moellenbeck *et al.*, 2001, Nguyen & Jehle, 2009). Der den Wurzeln dadurch zugefügte Schaden kann zu einer Hemmung der Nährstoff- und Wasseraufnahme und zu einer Senkung der Trockentoleranz führen (Reidell, 1990, Levine & Oloumi-Sadegi, 1991, Sloderbeck *et al.*, 2004). Die geschädigten Pflanzen wurden empfänglich für den Befall mit stängel- und wurzelinfizierenden Mikroorganismen (Levine & Oloumi-Sadeghi, 1991). Weiterhin führte der Befall des Wurzelsystems zu umgeknickten (lagernden) Pflanzen (Ahmad *et al.*, 2005) und damit zu einem verminderten Ertrag (Spike & Tollefson, 1991). Der Fruchtwechsel (Moellenbeck *et al.*, 2001) und die Anwendung von Blatt- und Bodeninsektiziden waren generelle Möglichkeiten um den MWB im Mais zu kontrollieren (Peairs & Pilcher, 2001,

Vaughn *et al.*, 2005). Jedoch entfällt aufgrund der Verhaltensanpassung bestimmter MWB-Arten der Fruchtwechsel als Managementstrategie für diese Arten (Vaughn *et al.*, 2005).

Der EMZ konnte mit einer Befallsdichte von einem Zünsler pro Maispflanze den Ertrag um 3 - 7 % reduzieren (Lynch, 1980). Der EMZ und andere Zünsler schädigen Mais, indem sie seine Stiele und Kolben durchtunneln. Dies führt zur Lagerung und zur Reduktion des Saft- und Nährstoffflusses und somit insgesamt zu einer Verminderung des Ertrags (Metcalf & Metcalf, 1993). Der EMZ war sowohl durch konventionelle Insektizide (z. B. Organophosphate, Carbamate, Pyrethroide) als auch durch mikrobielle *B.t.*- δ -Endotoxin-basierte Pestizide schwer zu kontrollieren (Fearing *et al.*, 1997).

Eine Möglichkeit zur Kontrolle dieser Maisschädlinge besteht in der Anwendung von Insektiziden aus dem Bakterium *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) (siehe Kapitel 2.2.2), die seit über 40 Jahren als mikrobielle Insektizide verwendet werden (Flexner *et al.*, 1986). Diese Insektizide enthalten eine Mischung von Sporen, Toxinkristallen (= Cry-Proteinen) und partikelförmigen Rückständen (Kirschbaum, 1985). Derzeit ist *B.t.* das am stärksten genutzte, kommerzielle Biopestizid (Yu *et al.*, 2000). Im Allgemeinen wird angenommen, dass *B.t.*-Proteine sicherer für die Nutzer, die Wildtiere und die Verbraucher sind als die meisten synthetischen Insektizide, die sie ersetzen sollen (Meadows, 1993), da sie nicht warmblütertoxisch sind (Herren & Teare Ketter, 2011). Rückstände von *B.t.*-Sprühanwendungen auf Blättern werden schnell durch UV-Licht inaktiviert (Koskella & Stotzky, 1997) bzw. degradiert, sodass sie in der Umwelt eine kürzere Lebensdauer aufweisen als konventionelle Insektizide (Tabashnik, 1994 zitieren Soares & Quick, 1992). Die schnelle Inaktivierung und die damit kürzere Wirkungsdauer der *B.t.*-Sprühanwendungen wurde als Problem angesehen, das aber durch die Expression eines Insektenkontrollmittels innerhalb der Pflanze umgangen werden könnte (Fearing *et al.*, 1997).

Der ökonomische Bedarf nach einem effektiven Insektizid, die Verfügbarkeit von Cry-Proteinkodierenden Genen aus *B.t.* und die bestätigte Sicherheit von *B.t.*-Sprühanwendungen haben die transgenen *B.t.*-Pflanzen zu Kandidaten für eine frühe, kommerzielle Ausnutzung der Pflanzenbiotechnologie gemacht (de Maagd *et al.*, 1999). Um Gene aus den Bakterien zu isolieren und in das Genom der Kulturpflanze zu übertragen, sodass alle Zellen dieser Pflanze das Proteininsektizid fortlaufend produzieren, konnten rekombinante DNA-Techniken eingesetzt werden (Llewellyn *et al.*, 1994, Saxena & Stotzky, 2000). Seit die transgenen Pflanzen gegen Schädlinge 1987 zum ersten Mal erfolgreich eingesetzt wurden (Vaeck *et al.*, 1987), wurden ab Mitte der 1990er Jahre Kulturpflanzen kommerzialisiert, die *B.t.*-Gene exprimierten (Mendelsohn *et al.*, 2003). Insektenresistente transgene Pflanzen waren unter den ersten

kommerziell genutzten (Wisniewski *et al.*, 2002, Bruns & Abel, 2003). Trotz der anhaltenden öffentlichen Debatte, die mit der Nutzung und Kommerzialisierung von genetisch modifizierten (GM-)Kulturpflanzen einhergeht, nimmt die Gesamtanbaufläche dieser Kulturpflanzen und die Anzahl beteiligter Länder weiterhin zu (Baumgarte & Tebbe, 2005). Im Jahr 2009 stieg die Anzahl der Länder, die GM-Kulturpflanzen anbauten auf 25 an, von denen 16 zu den Entwicklungs- und neun zu den Industrieländern gehörten (James, 2009). Inzwischen werden 99 % aller transgenen Pflanzen in den USA, Brasilien, Argentinien, Indien, Kanada, China, Paraguay und Südafrika angepflanzt (James, 2009). Davon entfielen allein 48 % (64 Mio. ha) auf die USA (James, 2009). In 2009 waren es 134 Mio. ha weltweit, ein 80facher Anstieg seit 1996 (James, 2009). Von dieser Fläche nahm Mais 2009 41,7 Mio. ha ein. 16 % der Maispflanzen waren insektenresistent, 62 % herbizidresistent und 63 % des biotechnologisch veränderten Mais hatte mehrere veränderte Merkmale (James, 2009). *Cry*-Gene aus *B.t.* wurden in Feld-, Flint-, Pop- und Zuckermais eingeführt (James, 2005).

Anfangs wurde für die Expression von *B.t.*-Genen in Pflanzen die bakterienkodierende Region zwischen einen hoch aktiven Promotor und einen Bereich gesetzt, der die Transkription beendete und Polyadenylierungsfunktionen bot (Barton *et al.*, 1987, Fischhoff *et al.*, 1987). Meistens wurde der 35S-CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) für eine Überexpression der Gene eingesetzt (Odell *et al.*, 1985). Die 3'-Enden kamen für gewöhnlich aus den Transfer-DNA-Genen von *Agrobacterium tumefaciens* (*A.t.*) (Llewellyn *et al.*, 1994). Später wurde der Schutz vor Insekten verbessert, indem nur die toxische N-terminale Hälfte des Proteins in den Pflanzen exprimiert wurde (Llewellyn *et al.*, 1994). Für die Selektion der transformierten Pflanzen wurden Antibiotikaresistenzgene (z. B. Neomycin-Phosphotransferase (NptII) (Vaeck *et al.*, 1987)) in Leserichtung mit dem *B.t.*-Gen fusioniert. Anfangs bereitete die unterschiedliche Basenhäufigkeit zwischen Bakterien und Pflanzen Probleme, da Adenin/Thymin(A/T)-reiche Bereiche in Pflanzen oft in Introns auftreten oder eine regulatorische Rolle bei der Determinierung der Polyadenylierung spielen und *B.t.*-Gene oft A/T-reich sind (Perlak *et al.*, 1990). Zusätzlich nutzen Pflanzen tendenziell die Basen Guanin und Cytosin in der dritten Base redundanter Codons; Adenin und Thymin tauchen hier seltener auf (Llewellyn *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu zeigen *B.t.*-Gene eine umgekehrte Tendenz und da angenommen wird, dass die Codonpräferenz mit dem Vorkommen der zugehörigen tRNAs verbunden ist, würde die Überbeanspruchung seltener Codons die Syntheserate eines *B.t.*-Proteins in Pflanzenzellen vermindern (Llewellyn *et al.*, 1994).

Das Unternehmen Monsanto rekonstruierte *B.t.*-Gene so, dass die kodierende Peptidsequenz erhalten blieb, aber die A/T-reichen Regionen zu einem ausgeglichenen Guanin/Cytosin-Gehalt

hin verändert wurden (Perlak *et al.*, 1991). So konnte Monsanto durch die Nutzung von rekombinanten DNA-Techniken die Maissorte MON89034 entwickeln, welche die Cry-Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 produziert. Dabei bietet das Cry1A.105-Protein eine erhöhte Aktivität gegen den Heerwurm *Spodoptera frugiperda* und die Ypsiloneule (*Agrotis ipsilon*) (beide Lepidoptera: Noctuidae) (Drury *et al.*, 2008). Das Cry2Ab2-Protein schränkt die Schäden ein, die vom Amerikanischen Baumwollkapselwurm *Helicoverpa zea* (Ordnung und Familie s. o.) verursacht werden (Drury *et al.*, 2008).

Hingegen enthält die Maissorte MON88017 das *cry3Bb1*-Gen aus *B.t.* var. *kumamotoensis* (Icoz & Stotzky, 2008b) und das *cp4 epsps*-Gen aus *A.t.* sp. Stamm CP4, wobei letzteres eine Resistenz gegenüber Glyphosat (Hetherington *et al.*, 1999), dem aktiven Inhaltsstoff des Herbizids Roundup (Monsanto, St. Louis, MO), verleiht. Das Cry3Bb1-Protein in der Pflanze unterscheidet sich an sechs Aminosäure-(AS)-Positionen vom natürlichen bakteriellen Protein (Nguyen & Jehle, 2009). Die Veränderung der Aminosäuren führt zu einer erhöhten Toxizität des Proteins gegenüber der Insektenordnung Coleoptera (Romano, 2012). Durch die Produktion des Cry3Bb1-Proteins wird die Pflanze resistent gegen den MWB (*Diabrotica virgifera virgifera*) (Rupar *et al.*, 1991, Donovan *et al.*, 1992).

2.2 DER REAKTANT CRY-PROTEIN

Wie bereits dargestellt, ist das Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* die Quelle der insektiziden Proteine, die in den kommerziellen transgenen Pflanzen exprimiert werden und in diesen zu einer Schädlingsresistenz führen (Crecchio & Stotzky, 2001, Saxena *et al.*, 2002b, Gatehouse, 2008).

2.2.1 Aufbau der Cry-Proteine

Cry-Proteine folgen im Allgemeinen einem generellen Aufbau, der die Proteine in drei Domänen (Abb. 2.2.1) mit unterschiedlicher Funktionalität unterteilt.

Für das Cry-Protein aus *B.t.* sp. *tenebrionis* wurde gezeigt, dass die Domäne I aus einem α -helikalen Bündel mit einer Zentralhelix und sechs umgebenden Helices besteht (Li *et al.*, 1991). Die Domäne II ist aus drei antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut, die ein β -Prisma mit einer pseudo dreifachen Symmetrie bilden (Li *et al.*, 1991). Die Domäne II ist von der Struktur her die variabelste unter den drei Toxindomänen der Cry-Proteine (Boonserm *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Variabilität wird angenommen, dass die Domäne II eine bedeutende Determinante der Toxinspezifität ist (Pigott & Ellar, 2007). Die Unterstützung der proteolytischen Stabilität des

Toxins als eine Funktion der Domäne II wird von Li *et al.* (1991) angedeutet. Den Autoren nach formt die Domäne III ein β -Sandwich.

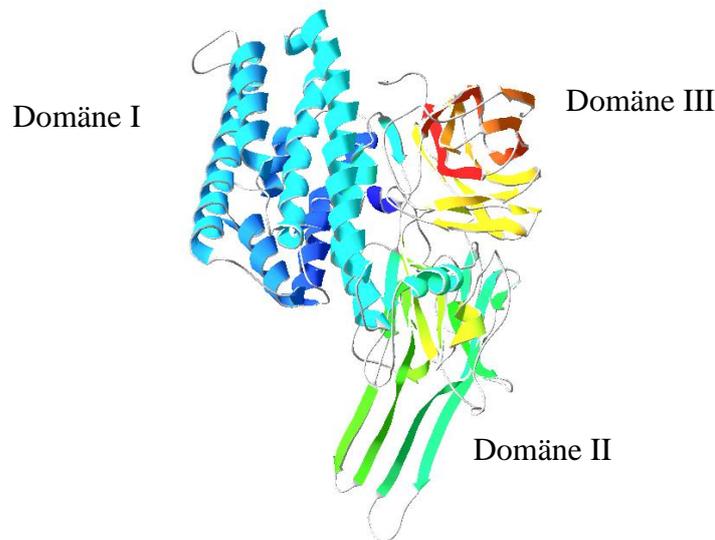


Abb. 2.2.1: Sekundärstruktur eines Cry-Proteins (Cry2Aa) mit eingezeichneten Domänen.

Eine vollständige strukturelle Charakterisierung wurde für das Cry3Bb1-Protein durchgeführt. Das Protein ist demnach aus drei diskreten Domänen aufgebaut. Die Domäne I (Reste 64 - 294) wird aus einem Bündel von sieben Helices geformt, das eine linkshändige Superhelix um eine zentrale Helix bildet (Galitsky *et al.*, 2001). Die Domäne II (Reste 295 - 502) baut sich aus drei antiparallelen β -Faltblättern und die Domäne III (Reste 503 - 652) aus einer Sandwichstruktur mit zwei antiparallelen β -Faltblättern auf (Galitsky *et al.*, 2001). Die Wechselwirkungen zwischen den Domänen I und II werden den Autoren nach durch eine Wasserstoffbrückenbindung verstärkt. Weiterhin bilden sich an den Kontaktstellen der drei Domänen wassergefüllte Hohlräume, deren Wasserstoffatome untereinander und mit den angrenzenden Proteinseitenketten binden. Der Domäne III könnte eine Funktion bei der Oligomerbildung in Lösungen zukommen, was die Proteinstabilität erhöhen könnte (Galitsky *et al.* 2001).

Bisher wurde nur die Struktur von Proteinen proteinkristallographisch aufgelöst, die Cry1A.105 und Cry2Ab2 ähnlich waren. Die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 selbst wurden diesbezüglich noch nicht untersucht. Bekannt ist aber, dass von den in der Maishybriden MON8034 x MON88017 produzierten Proteinen Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 das Cry1A.105-Protein im Gegensatz zu den beiden anderen ursprünglich nicht aus dem Bakterium *Bacillus thuringiensis* stammt. Das Cry1A.105-Protein wurde aus Teilen der Sequenzen der Cry-Proteine Cry1Ab/c und Cry1F neu zusammengesetzt. Die Domänen I und II und das C-terminale Ende wurden zu 100 % aus dem Cry1Ab/c-Protein, die Domäne III zu 99 % aus dem Cry1F-Protein übernommen (Monsanto, 2006).

Die oben genannten Cry-Proteine kennzeichnen jedoch nur einen kleinen Ausschnitt, denn *B.t.*- δ -Endotoxine sind Bestandteil einer großen und immer noch wachsenden Familie homologer Proteine, von denen allein bis 1999 mehr als 130 Gene (de Maagd *et al.*, 1999) identifiziert wurden. Aktuell werden 625 Cry-Proteine unterschieden (lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, 2012/04/15). Die außergewöhnliche Vielfalt der bekannten Cry-Proteine ist das Ergebnis eines kontinuierlichen Aufwands zur Isolation und Charakterisierung neuer Stämme von *B.t.*, in der Hoffnung, Toxine mit neuen Eigenschaften zu finden, die besonders für die Kontrolle von landwirtschaftlich und medizinisch bedeutenden Schädlingen geeignet sind (Pigott & Ellar, 2007). Dabei wurden Cry-Proteine mit Wirkung gegen über 130 empfindliche Insektenarten gefunden (Bulla, 1975). Darunter waren die Insektenordnungen der Hymenoptera, Coleoptera, Diptera, Orthoptera und Lepidoptera, wobei viele der bedeutendsten Schadinsekten auf der Welt zur letztgenannten Ordnung gehören (Bulla, 1975). Auch konnte gezeigt werden, dass bestimmte Kombinationen von Cry-Proteinen synergistische Einflüsse aufwiesen (Chang *et al.*, 1993, Wu *et al.*, 1994, Crickmore *et al.*, 1995, Poncet *et al.*, 1995, Lee *et al.*, 1996, Schnepf *et al.*, 1998).

Eine gemeinsame Charakteristik der *cry*-Gene ist ihre Expression während der stationären Wachstumsphase (Schnepf *et al.*, 1998). Es muss hier jedoch zwischen sporulationsabhängiger und -unabhängiger Genexpression unterschieden werden (Schnepf *et al.*, 1998). *B.t.*-*cry*-Gene sind typische bakterielle Gene, da sie im Vergleich mit Pflanzengenen einen hohen A/T-Basengehalt haben (typische Werte sind 60 - 70 % der Basenpaarungen für *B.t.*- und 40 - 50 % für Pflanzengene) (de Maagd *et al.*, 1999). Einmal an die pflanzliche Transkriptions- und Translationsmaschinerie angepasst, können sowohl die vollständigen als auch die gekürzten Versionen verschiedener *cry*-Gene erfolgreich in Pflanzen exprimiert werden (Feitelson *et al.*, 1992, Koziel *et al.*, 1993, Crecchio & Stotzky, 2001).

Eine erste Klassifizierung der vielen Gene für diese kristallinen Proteine, basierend auf der Aminosäure(AS)-Sequenz und dem Wirtsspektrum, wurde von Höfte & Whiteley (1989) unternommen. Crickmore *et al.* (1998) führten weitere Unterscheidungsmerkmale ein, veränderten die Zuordnung und Benennung der Cry-Proteine und gruppieren die damals bekannten *B.t.*- δ -Endotoxine, basierend auf der Sequenzhomologie, in 22 Klassen ein. Momentan werden die kristallinen Toxine auf Basis der AS-Sequenzhomologie aller Cry-Proteine klassifiziert, bei der jedes Protoxin einen Namen erwirbt, der aus der Abkürzung Cry (oder Cyt) und vier hierarchischen Rängen besteht. Diese sind wiederum abhängig vom Platz des Proteins im phylogentischen Baum und bestehen aus Nummern, Großbuchstaben und Zahlen (de Maagd *et al.*, 2001), die die Familie und Subfamilie anzeigen (Clark *et al.*, 2005). Demnach

unterscheiden sich Proteine mit weniger als 45 % Sequenzidentität in ihrem primären Rang und Identitäten von 78 % bzw. 95 % stellen die Grenzen für den sekundären bzw. tertiären Rang dar (de Maagd *et al.*, 2001). Ein Abgleich von Cry-Toxinsequenzen deckte das Vorhandensein von fünf konservierten Sequenzblöcken auf, die der großen Mehrheit der untersuchten Proteine eigen waren (de Maagd *et al.*, 2001).

2.2.2 *Der Donator Bacillus thuringiensis*

Der Donator der Cry-Proteine, das Bakterium *Bacillus thuringiensis*, ist ein Mitglied der Familie Bacillaceae und gehört zur *Bacillus cereus* Gruppe (Rasko *et al.*, 2005). Dieses weltweit verbreitete Bakterium wurde schon frühzeitig entdeckt. Es kommt für gewöhnlich in Böden (Martin & Travers, 1989), aber z. B. auch im Abrieb von gelagertem Getreide (de Maagd *et al.*, 1999), in Insekten und Insektenkadavern, auf der Blattoberfläche von Laub- und Nadelblättern, auf landwirtschaftlichen Feldern, in Waldböden, Steppen und der Tundra vor (Martin & Travers, 1989, Iriarte *et al.*, 1998, Schnepf *et al.*, 1998). *B.t.* wurde erstmals 1901 von Ishiwata erwähnt (Zhou *et al.*, 2005), offiziell aber erst 1918 entdeckt und in den 1950ern für den kommerziellen Gebrauch eingesetzt (Broderick *et al.*, 2006).

Das Bakterium ist grampositiv, aerob (Zhou *et al.*, 2005) und sporenbildend. Während der Sporulation in der stationären Wachstumsphase produziert es parasporale kristalline Proteine (ICPs) (Feitelson *et al.*, 1992, Crecchio & Stotzky, 2001, Lee *et al.*, 2003). Diese Proteine akkumulieren im Allgemeinen im Mutterzellkompartiment und bilden einen kristallinen Einschluss, der 20 - 30 % des Trockengewichts der sporulierenden Zelle ausmacht (Schnepf *et al.*, 1998). Die Bildung einer Endospore – der dormante Zustand von *B.t.* – ist ein Vorgang der Zellteilung (Bulla, 1975). Dabei produzieren die meisten *B.t.*-Stämme eine Vielzahl verwandter Toxine, von denen jedes durch ein einzelnes Gen kodiert wird (Gould, 1998 zitiert Lereclus *et al.*, 1993). Jedes Toxin hat eine sehr spezifische Zielstelle innerhalb des Insekts (Gill *et al.*, 1992). Zusammen kolonisieren und töten die Subspecies dieses Bakteriums eine große Vielfalt von Wirtsinsekten und sogar Nematoden (de Maagd *et al.*, 2001).

Neben den kristallinen Proteinen produziert das Bakterium mehrere Virulenzfaktoren, einschließlich sekretierter insektizider Proteintoxine (Bernheimer & Grushoff, 1967, Pendleton *et al.*, 1973, Hansen & Salamitou, 2000). Viele Stämme bringen während des Wachstums auch weniger gut charakterisierte insektizide Proteine, die sogenannten vegetativen insektiziden Proteine (Vip-Proteine) (Estruch *et al.*, 1996, Gatehouse, 2008) sowie Cry- und Cyt-Proteine während der Sporulation (Gatehouse, 2008) und andere Pathogenitätsfaktoren hervor (Agaisse *et al.*, 1999). Normalerweise produziert ein bestimmter Stamm zwischen einem und fünf der

Toxine, die in einen einzelnen oder einen multiplen Kristall gepackt sind (de Maagd *et al.*, 2001).

Nach Rennie (1992) könnte die Koevolution eine Erklärung für die enorme Diversität der *B.t.*-Stämme in der Natur sein. Bei der Koevolution haben sich die für die Proteintoxine kodierenden bakteriellen Gene und die Toxinzielgene im Wirt im Gespann entwickelt (Rennie, 1992). Natürliche Populationen von *B.t.* sind auch deswegen divers, da die große Mehrheit der Toxingene auf selbstübertragbaren Plasmiden liegt, die den Transfer zwischen verwandten Zellen erlauben, um neue Kombinationen der Toxine zu erschaffen (Feitelson *et al.*, 1992).

2.2.3 Wirkungsweise der Cry-Proteine

Die Wirkungsweise von *B.t.* ist noch nicht vollständig verstanden, was durch die enorme Vielfalt der Cry-Proteine bedingt sein könnte (Clark *et al.*, 2005). Die Wirkung eines Endotoxins in Insekten wurde als analog zur Botulismusvergiftung beim Menschen angesehen (Heimpel & Angus, 1960). Nach der Nahrungsaufnahme durch die empfindlichen Larven werden die nicht toxischen parasporalen kristallinen Einschlüsse (Protoxine) im alkalischen Mitteldarm (pH > 10) gelöst und durch spezifische Proteasen proteolytisch zu Toxinen aktiviert (Höfte & Whiteley, 1989). Die Toxine werden während der Lyse des Sporangiums zusammen mit der Endospore freigesetzt (Crecchio & Stotzky, 2001). Die C-terminale Verlängerung, die in den längeren Protoxinen gefunden wird, ist nicht Teil des aktiven Toxins, aber es wird angenommen, dass sie eine Rolle bei der Bildung des Kristalls spielt (Schnepf *et al.*, 1998). Weiterhin werden während der Aktivierung auch Peptide vom N-Terminus des Protoxins entfernt (Galitsky *et al.*, 2001).

Der Hauptwirkort der Proteine ist die Bürstensaummembran des Mitteldarmepithels – eine Kombination aus Hals und Dünndarm (Galitsky *et al.*, 2001) – anfälliger Larven der Ordnungen Lepidoptera, Coleoptera und Diptera (Bravo *et al.*, 1992, Denolf *et al.*, 1993).

Bravo *et al.* (2007) stellten ein Modell für die Wirkungsweise von Cry-Proteinen in Lepidopteren (Abb. 2.2.3) vor, demnach:

1. wird ein Toxin gelöst und aktiviert,
2. wird das monomere Toxin an den ersten Rezeptor gebunden (Cadherin- oder Glykokonjugatrezeptor), im Toxin eine Konformationsveränderung induziert und die α -Helix 1 gespalten,
3. werden Oligomere gebildet,
4. wird das oligomere Toxin an einen zweiten Rezeptor gebunden (Aminopeptidase N oder Alkalische Phosphatase), eine Konformationsveränderung auftreten und einen „molten

globule“ Zustand des Toxins („geschmolzenes Kügelchen“, stabiles Intermediärprodukt, das bei der Faltung einiger Proteine auftritt) induziert und

5. wird das oligomere Toxin in die „Lipid Rafts“ (cholesterinreiche Mikrodomänen in Zellmembranen) der Zellmembran eingefügt und eine Porenbildung durch Domäne I erfolgen.

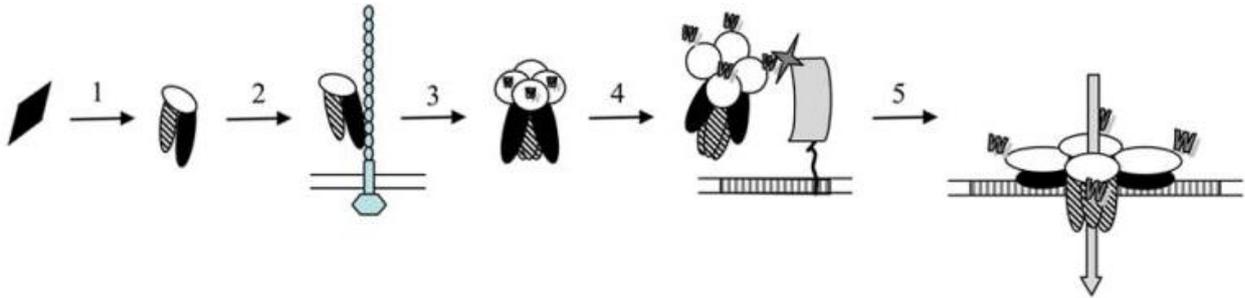


Abb. 2.2.3: Modell der Wirkungsweise von Cry-Proteinen als aufeinanderfolgende Wechselwirkung mit unterschiedlichen Rezeptormolekülen in Larven von Lepidopteren (verändert nach Bravo *et al.*, 2007).

Der offene Kanal bzw. die gebildeten Poren, zerstören die Zellen durch kolloidale osmotische Lyse (Knowles & Ellar, 1987, Wolfersberger, 1990, Adang, 1991), sodass der stark gepufferte, alkalische Darminhalt in das relativ schwach gepufferte Blut sickert (Heimpel & Angus, 1960).

Die Proteine sind hoch toxisch und in ihrer Aktivität spezifisch (Feitelson *et al.*, 1992). Dabei wechselwirkt eine der beiden Domänen II oder III des aktiven Toxins (de Maagd *et al.*, 2001, Gatehouse, 2008) mit Rezeptoren auf den Mitteldarmepithelzellen. Die Spezifität der *B.t.*-Toxine wird zu einem Großteil durch diese Toxin-Rezeptor-Wechselwirkungen bestimmt (Van Rie *et al.*, 1990, Pigott & Ellar, 2007). Auch nach Zhang *et al.* (2005) sind die Zytotoxizität und der Zelltod das Ergebnis einer eindeutigen Bindung eines Cry-Toxinmonomers an seinen entsprechenden Cadherinrezeptor. Jedoch zeigten neueste Untersuchungen, dass weder die Resistenz noch die Zytotoxizität allein durch die Toxinbindung erklärt werden konnten und dass die Cry-Toxizität unabhängig von der Toxinoligomerisierung war (Zhang *et al.*, 2005, 2006). Den Autoren nach war die Toxinwirkung viel komplexer als eine einfache, osmotische Lyse. Sie fanden heraus, dass das Cry1Ab-Protein aus *B.t.* Insektenzellen durch die Aktivierung eines Mg^{2+} -abhängigen, zytotoxischen Vorgangs abtöteten, da die Zugabe von Mg^{2+} -komplexierendem EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) die Membranbläschenbildung und Zellschwellung verhinderte und die Zellen vor dem Tod schützte.

Schon früh wurden zwei Hauptrezeptortypen für die Cry-Proteine vermutet, die Cadherine oder cadherinähnlichen Proteine (Dorsch *et al.*, 2002, Xie *et al.*, 2005) und die Aminopeptidase N (Knight *et al.*, 1994, Sangadala *et al.*, 1994, Luo *et al.*, 1997). Vor kurzem wurden Glycolipide

als eine weitere bedeutende Klasse von mutmaßlichen Cry-Toxinrezeptoren hinzugefügt (Pigott & Ellar, 2007).

Im Allgemeinen wird die Porenbildung nicht als wichtigster bestimmender Faktor der Insektenspezifität angesehen (de Maagd *et al.*, 2001). Eine Rolle für die Funktion als Pore (de Maagd *et al.*, 2001) bzw. bei der Modulation der Ionenkanalaktivität wurde für die Domäne III gefunden (Schnepf *et al.*, 1998). Das Binden der δ -Endotoxine an spezifische Rezeptoren, was das Toxin effektiv am Bürstensaum konzentriert, ist der Vorgang, der wahrscheinlich auch die Fähigkeit der Toxinmoleküle zu oligomerisieren, Porenstrukturen zu bilden und die Doppelschicht des Bürstensaumepithels zu penetrieren, erhöht (Galitsky *et al.*, 2001, Pigott & Ellar, 2007). Bei der Oligomerisierung werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einigen Aminosäuren der Toxinmonomere ausgebildet. Bestimmte Aminosäuren, z. B. Asn¹⁸³ im Cry4Ba-Protein, spielen eine essentielle Rolle für die Larventoxizität, da bei einer Mutation dieser AS die Monomer-Monomer-Wechselwirkung behindert wird (Likitvivatanavong *et al.*, 2006).

Schon früh wurden Hinweise darauf gefunden, dass das gelöste Protoxin als Dimer existiert (Huber & Lüthy, 1981). So traten Cry1Aa- und Cry1Ac-Proteine sowohl als Monomere als auch als Oligomere mit molekularen Massen > 220 kDa in Lösung auf (Feng & Becktel, 1994). Dabei war die relative Oligomermenge dieser Cry-Proteine vom pH-Wert abhängig, wohingegen das Cry3A-Protein bei neutralen pH-Werten als Monomer vorlag (Feng & Becktel, 1994). Die Cry-Proteine 1Aa, 1Ac, 1C und 1D existierten als Mischung von Monomeren und Aggregaten (> 10 Monomere) mit großen molekularen Massen (Güereca & Bravo, 1999). Dennoch sollte ein Protein aufgrund der in kontaminierten Böden vorliegenden geringen Proteinkonzentrationen (bis zu 100 ng des Toxins g⁻¹ Boden) (Tapp & Stotzky, 1995a, Hopkins & Gregorich, 2003), ungeachtet des pH-Werts und der Salzkonzentration, als Monomer vorliegen (Kodaka, 2004, Stradner *et al.*, 2004, Powers & Powers, 2006). Für das Cry3A-Toxin wurde gezeigt, dass es bei pH 10,5 ausschließlich als Monomer auftrat und dass dieses Toxin nach einer Inkubation bei pH 8,5 aggregierte (Güereca & Bravo, 1999). Das isolierte Toxin aus *B.t. sp. kurstaki* war löslich bei alkalischen pH-Werten > 9,5 und sauren pH-Werten < 3,5 (Bietlot *et al.*, 1989). Hingegen lag seine Löslichkeit im pH-Bereich von 5 - 8,5 bei weniger als 0,5 mg mL⁻¹. Ein pH > 6,5 und eine Ionenstärke von mind. 150 mM NaCl waren bei Helassa *et al.* (2009) notwendig, um das Protein in höheren Konzentrationen in Lösung und in einem monomeren Zustand zu halten.

Die nach der Proteinoligomerisierung gebildeten Ionenkanäle (siehe Abb. 2.2.3 Schritt 5), haben in der Zellmembran *in vitro* einen Durchmesser von 10 - 20 Å (Knowles & Ellar, 1987) und

sind hoch divers (Galitsky *et al.*, 2001). So bilden die Proteine Cry1Ac und Cry3A kationenselektive und spannungsunabhängige Kanäle (Slatin *et al.*, 1990), wohingegen die Proteine Cry2A und Cry3Bb1 weniger selektive aber spannungsabhängige Kanäle ausbilden (English *et al.*, 1994, von Tersch *et al.*, 1994). Das Cry1C-Protein prägt hingegen pH-abhängige anionenselektive Kanäle aus (Schwartz *et al.*, 1993, 1997).

Nach der Ionenkanalbildung verlieren die Mikrovilli in hoch empfindlichen Insektenzellen ihre charakteristische Struktur innerhalb von Minuten nach der Toxinaufnahme und die Zellen vakuolisieren und beginnen anzuschwellen (Icoz & Stotzky, 2008b). Dieses Anschwellen setzt sich bis zur Zellyse fort, was zu umfangreichen Schäden an der Mitteldarmwand, zur Paralyse und schlussendlich zum Tod des Insekts führt (Lüthy & Ebersold, 1981). Broderick *et al.* (2006) berichteten, dass die *B.t.*-induzierte Sterblichkeit von Wechselwirkungen mit Mikroorganismen der normalen Darmgemeinschaft abhing. Intoxizierte Insektenlarven stellten die Nahrungsaufnahme ein und starben schlussendlich (Feitelson *et al.*, 1992), sodass ein totes Insekt ausreichend Nährstoffe für die Keimung der dormanten Spore zur Verfügung stellte (de Maagd *et al.*, 2001).

Die transgenen Pflanzen produzieren die beschnittenen aktiven insektiziden Endotoxine anstelle der Protoxine, die von den Bakterien abgegeben werden (Chevallier *et al.*, 2003, Clark *et al.*, 2005). Dementsprechend sind ein hoher pH-Wert (~ 10,5) im Mitteldarm der Insekten für die Solubilisation der Protoxine und spezifische proteolytische Enzyme für die Spaltung der Protoxine in toxische Untereinheiten nicht notwendig (Venkateswerlu & Stotzky, 1992).

2.2.4 Eintrag von Cry-Proteinen in die Böden

B.t.-Proteine wie Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 können auf vielen Wegen in den Boden gelangen. Zum Einen existiert der direkte Eintrag der *B.t.*-Proteine über Wurzelexsudate (Saxena *et al.*, 1999), über den Pollen während der Pollenschüttung (Losey *et al.*, 1999, Hansen-Jesse & Obrycki, 2000), und/oder über Eluate, die aufgrund von Pflanzenverletzungen freigesetzt werden oder mit sich häutenden Wurzelzellen in den Boden eingebracht werden (Clark *et al.*, 2005). Bisher ist unbekannt, ob die Maishybride MON89034 x MON88017 die transgenen Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 über Wurzelexsudate abgibt. Zum Anderen gelangen Proteine über den Abbau der in die Pflanzenmatrix eingeschlossenen *B.t.*-Proteine (z. B. Palm *et al.*, 1996, Zwahlen *et al.*, 2003, Stotzky, 2004) und über den direkten Eintrag des *B.t.*-Proteins über Eluate aus abbauendem Pflanzenmaterial (Zwahlen *et al.*, 2003) in den Boden.

Wird Mais geerntet – 44 t ha⁻¹ Frischmasse (FW) Silomais (ca. 13,2 t ha⁻¹ Trockenmasse (TW)) bzw. 10,7 t ha⁻¹ FW Körnermais (ca. 3,2 t ha⁻¹ TW (maiskomitee.de/web/public/Fakten.aspx/

Statistik/Deutschland/Flächenerträge, 2012/04/24) –, so bleiben ca. 2,5 t ha⁻¹ (bei der Maissilage) bzw. 11,5 bis 12,5 t ha⁻¹ (beim Körnermais) TW auf oder im Boden zurück (Kraume, 2012), wo diese abgebaut wird und das Bodenökosystem betritt (Zwahlen *et al.*, 2003). Kulturpflanzenrückstände sind die primäre Quelle von Kohlenstoff im Boden. Wurzelausscheidungen, die während der Wachstumsphase abgegeben werden, regulieren welche Organismen in der Rhizosphäre vorkommen (Icoz & Stotzky, 2008b). Demnach könnte jede Qualitätsveränderung der Rückstände und des Rhizosphäreintrags die Dynamiken der Organismenzusammensetzung und -Aktivität im Boden modifizieren. Der ansteigende Gebrauch von *B.t.*-Pflanzen könnte, im Vergleich zu kommerziellen Präparaten von *B.t.* (Tapp & Stotzky, 1998), zu einer Zunahme der Cry-Proteine im Boden führen (Icoz & Stotzky, 2008b), da nach der Ernte der kommerziell nutzbaren Pflanzenteile die Restauflage der pflanzlichen Biomasse mit enthaltenen Toxinen in den Boden eingearbeitet wird (Crecchio & Stotzky, 2001).

Pflanzliche Stoffwechselprodukte werden auch von Wurzelrandzellen und randähnlichen Wurzelzellen abgegeben, die sich von der Wurzel ablösen, während diese wächst (Hawes *et al.*, 2000, Vicré *et al.*, 2005). Aktiv wachsende Pflanzenwurzeln entlassen über die Wurzelexsudate eine große Bandbreite von Verbindungen kleinen Molekulargewichts (M_w) in die Rhizosphäre (Bais *et al.*, 2006). Darunter befindet sich eine Vielfalt von organischen Verbindungen, einschließlich organischer Säuren, Aminosäuren, sekundärer Stoffwechselprodukte, Peptide, Proteine, Ureide und Lipide (Walker *et al.*, 2003, Bais *et al.*, 2006). Wurzelexsudate werden oft in zwei Klassen von Verbindungen unterteilt (Bais *et al.*, 2006). Dabei stehen Verbindungen geringen M_w , wie Aminosäuren, organische Säuren, Zucker, Phenolverbindungen und andere sekundäre Stoffwechselprodukte, für den Großteil der Diversität der Wurzelexsudate, wohingegen Exsudate hohen M_w , wie Schleimstoffe (Polysaccharide) und Proteine, weniger vielfältig sind, aber oft einen größeren Masseanteil an den Exsudaten ausmachen. Bei *Arabidopsis thaliana* wurden 111 von den Wurzeln sekretierte Proteine identifiziert, von denen die Mehrheit konstitutiv in allen untersuchten Entwicklungsstadien exsudiert wurde (De-la-Peña *et al.*, 2010). 1979 wurde von Rovira (zitiert von Kuo *et al.*, 1982) noch angenommen, dass die Wurzelexsudation ein unkontrollierter Prozess ist, der durch Schäden an den Wurzelhaubenzellen, an den Auswuchsstellen lateraler Wurzeln und durch die Infektion der Wurzel durch Mikroorganismen verursacht wird. Inzwischen ist bekannt, dass die Pflanze durch die Wurzelexsudation deutlich an Kohlenstoff verliert (Bais *et al.*, 2006 zitieren Marschner, 1995) und dass der Umfang der Photosyntheseprodukte, die als Exsudate abgegeben werden, mit der Bodenart, dem Alter und dem physiologischen Zustand der Pflanze und der Nährstoffverfügbarkeit variiert (Brimecombe *et al.*, 2001). Die Wurzelexsudation macht zusammen mit den Mucilaten einen

Verbrauch von ca. 10 - 30 % der Assimilate aus (Gisi *et al.*, 1997) und die Wurzelexsudate führen – als organische Kohlenstoffquelle für Bodenmikroben – zu reichen mikrobiellen Populationen in der Rhizosphäre (Foster, 1986).

2.2.5 Mobilität von Cry-Proteinen in den Böden

Der Anbau von gentechnisch veränderten Maispflanzen aus verschiedenen Transformationsvorgängen in der Klimakammer oder auf dem Feld führte nicht zu unterscheidbaren bzw. beständigen Unterschieden bei der Toxinabgabe (Saxena *et al.*, 2002b). So kam der Toxinabgabe aus abgelösten bzw. beschädigten Wurzelzellen nur eine untergeordnete Rolle zu (Saxena *et al.*, 1999). Die Hauptmenge müsste aus den Wurzelexsudaten erhalten worden sein, da keine unterscheidbaren Wurzelreste vorlagen (Saxena *et al.*, 1999). Das Cry1Ab-Protein wurde durch Wurzelausscheidungen freigesetzt (Saxena *et al.*, 2002b). Später wurde eingeräumt, dass ein Teil des Cry1Ab-Proteins aus abgelösten oder beschädigten feinem Wurzelmaterial stammen könnte (Saxena *et al.*, 2004).

Eine der potentiellen, ökologischen Auswirkungen gentechnisch konstruierter Organismen in natürlichen Habitaten ist die Abgabe der Produkte, für die die neuen Gene kodieren, in die Umwelt (Chevallier *et al.*, 2003). So nahm die vertikale Bewegung des Cry1Ab-Proteins in neu gepackten Bodensäulen mit zunehmendem Tongehalt ab und die Menge an wiedergefundenem Protein aus Eluaten stieg an, als die Konzentration des zugefügten Proteins zunahm (Saxena *et al.*, 2002a). In den Versuchen wurden 75 % des Proteins im Boden und die geringste Menge (16 %) in Säulen wiedergefunden, die mit 12 % Montmorillonit oder Kaolinit versetzt waren. Das Cry1Ab-Protein zeigte eine stärkere Bindung und höhere Persistenz und verblieb auch näher an der Bodenoberfläche der Böden, die höhere Tongehalte aufwiesen (d. h. eine höhere Kationenaustauschkapazität (KAK) und spezifische Oberfläche hatten) (Saxena *et al.*, 2002a). Dies zeigt an, dass das Protein mit dem Oberflächenwasser (z. B. durch Regen, Bewässerung, Schneeschmelze etc.) über Oberflächenabfluss und Erosion transportiert werden kann (Saxena *et al.*, 2002a). Auch eluierte das Protein schneller durch Böden mit geringen Tongehalten, sodass es das Grundwasser kontaminieren könnte (Saxena *et al.*, 2002a). Die Persistenz der insektiziden Aktivität war in sauren Böden höher – wahrscheinlich aufgrund einer verminderten biologischen Aktivität – und die Persistenz unter aeroben und anaeroben Bedingungen bzw. in feuchtem und trockenem bzw. in gefrorenem und trockenem Boden war ähnlich (Stotzky, 2000). Das Auftreten von *B.t.*-Toxinen im Grundwasser könnte ein Risiko für aquatische Nichtziel-Lepidopteren darstellen (Stotzky, 2004), die in Gewässern reichlicher vorkommen als im Boden (Lange, 1984, Williams & Feltmate, 1994). Jedoch wurde das Cry1Ab-Protein im Allgemeinen meist nicht in

aquatischen Umgebungen gefunden oder war nur in Spurenkonzentrationen vorhanden, wenn es nachgewiesen wurde (Douville *et al.*, 2005, 2007). Auch für das Cry3Bb1-Protein konnte gezeigt werden, dass es aus verfaulem Pflanzenmaterial nicht in den Mineralboden sickerte (Prihoda & Coats, 2008).

Hingegen zeigten Tank *et al.* (2010), dass 86 % der untersuchten Fließgewässer Maisblätter, Kolben, Hüllen und/oder Stängel im aktiven Flussbett enthielten. Außerdem konnten sie das Cry1Ab-Protein in diesen Materialien an 13 % der Standorte und in 23 % der Wassersäulen nachweisen. Bei ihren Untersuchungen grenzten 82 % aller Gewässer an Maisfelder und 100 % der Standorte, auf denen das Cry1Ab-Protein im aktiven Flussbett nachgewiesen werden konnte, befanden sich innerhalb von 500 m zu einem Feld, auf dem im Vorjahr Mais angebaut worden war. Somit konnten gezeigt werden, dass Maispflanzenreste durch Wasserläufe verbreitet werden.

2.3 DER REAKTANT BODEN

Der Boden ist ein hoch komplexes und variables Ökosystem von vorrangiger Bedeutung bei der Neuverteilung von Nährstoffen (Conner *et al.*, 2003) und wegen des Vorkommens von mineralischen, organischen und mikrobiologischen Bestandteilen, die mit dem Bodentyp variieren, eine komplexe Matrix (Rigou *et al.*, 2006).

Die Bodenstruktur kann als eine Anordnung von mineralischen Bodenpartikeln und organischen Bestandteilen, die Aggregate unterschiedlicher Größe und Stabilität bilden, definiert werden (Tisdall & Oades, 1982). Die Tongrößenfraktionen sind eine Mischung von mehr oder weniger aggregierten oberflächenaktiven Partikeln, wie Tonmineralen, Oxiden und organischem Material (Muchaonyerwa *et al.*, 2006). Bei den oberflächenaktiven Partikeln gibt es große Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung und Struktur (Stotzky, 2000). Tonminerale sind im Boden teilweise oder vollständig mit organischem Material bedeckt, unter denen die Huminstoffe, die resistent gegenüber biologischem Abbau sind, die bedeutendsten und vorherrschendsten sind (Crecchio & Stotzky, 2001). Das organische Material im Boden ist aufgrund seiner großen, spezifischen Oberfläche und seiner KAK ein bedeutender Sorbent von Pflanzennährstoffen, Schwermetallen und organischen Verbindungen wie z. B. Pestiziden (Stevenson, 1982).

2.3.1 Sorptionsmechanismen

Es existieren unterschiedliche Bindungsmechanismen physikalischer und chemischer Natur zwischen Adsorbent und Adsorbat, wie Dipol-Dipol-, Wasserstoffbrücken-, Ion-Ion-, Ionenbrückenbindungen sowie Säure-Base-Reaktionen und Ligandenaustausch (Gisi *et al.*,

1997) (siehe *Abb. 2.3.1*). Oft wurde nach allgemeinen Mechanismen gesucht, die für die Bindung aller Proteine an Oberflächen gelten sollten. Inzwischen existieren viele unterschiedliche Vorstellungen über die Art und Weise wie Proteine an Oberflächen sorbieren. Diese Vorstellungen variieren oft sowohl mit der Art des untersuchten Proteins als auch mit der Art der untersuchten Oberfläche.

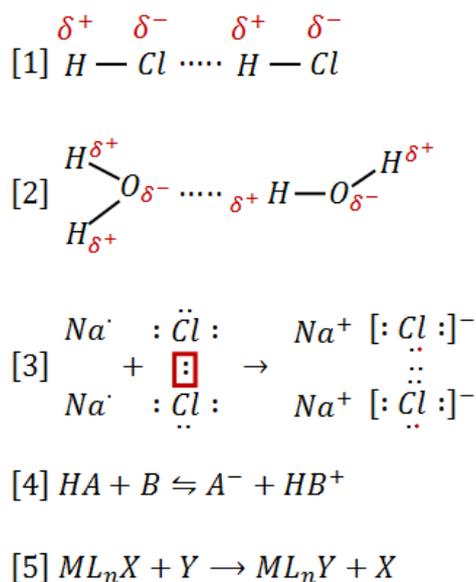


Abb. 2.3.1: Schematische Darstellung unterschiedlicher Bindungsmechanismen ([1] Dipol-Dipol-Bindung, [2] Wasserstoffbrückenbindung, [3] Ionenbindung, [4] Säure-Base-Reaktion und [5] Ligandenaustauschreaktion).

Als Adsorptionsmechanismen wurden u. a. van-der-Waals-Kräfte (MacEwan, 1955, Theng, 1979, Kleijn & Norde, 1995, Quiquampoix, 2000, 2008a, Zhao, 2001, Pagel-Wieder *et al.*, 2004), Wasserstoffbrückenbindungen (Bradley, 1945, Theng, 1979, Stotzky, 1986, Quiquampoix, 2000, 2008a, Zhao, 2001, Crecchio & Stotzky, 2001, Pagel-Wieder *et al.*, 2004), hydrophobe Wechselwirkungen (Norde, 1986, Quiquampoix, 2000, 2008a, Zhao, 2001, Rigou *et al.*, 2006, Helassa *et al.*, 2011), Kationenaustauschreaktionen (Albert & Harter, 1973), Kationenbrücken (Muchaonyerwa *et al.*, 2006), Ionenverbindungen (Macritchie & Alexander, 1963, Tapp *et al.*, 1994), elektrostatische Wechselwirkungen (Kleijn & Norde, 1995, Quiquampoix, 2000, 2008a, Zhao, 2001) und Ligandenaustausch vorgeschlagen (Quiquampoix, 2000, 2008a). Die favorisierten Mechanismen einiger Forschergruppen sind in *Tabelle A3* im Anhang aufgeführt.

Van-der-Waals-Kräfte zwischen Atomen zweier Teilchen sind auf einer Distanz bis etwa 1,5 nm wirksam und praktisch unabhängig von der Art und Konzentration der Außenlösung (Gisi *et al.*, 1997). Die hydrophoben Wechselwirkungen der Proteine mit Oberflächen wie Montmorillonit können paradox erscheinen, sind aber begründet durch die Siloxan-Oberfläche (Rigou *et al.*,

2006). Wenn hydrophile austauschbare Kationen auf der Montmorillonit-Oberfläche durch positiv geladene Aminosäure-Seitenketten der Proteine ausgetauscht werden ist der Bereich, in dem Wechselwirkungen auftreten, die hydrophobe Siloxan-Schicht (Quiquampoix & Ratcliffe, 1992, Staunton & Quiquampoix, 1994).

Die Bedeutung des Vorgangs, der zur irreversiblen Adsorption führt, ist unbekannt (Sander *et al.*, 2010). Bei diesem Vorgang würden konformationelle Veränderungen im Protein die Anzahl der Proteinsegmente, die mit der sorbierenden Oberfläche interagieren, erhöhen und damit die freie Aktivierungsenergie für die Desorption heraufsetzen. Diese Veränderungen könnten die treibende Kraft bei der Adsorption eines Proteins mit geringer konformationeller Stabilität sein, sogar wenn die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Sorbenten abstoßend sind (Sander *et al.*, 2010). Jedoch können auch kleine Veränderungen in den Umgebungsbedingungen, wie die des pH-Werts, der Ionenstärke oder der Temperatur und das Auftreten anderer Substanzen, eine strukturelle Neuordnung im Proteinmolekül verursachen (Norde, 2003).

2.3.1.1 Einflussfaktor pH-Wert

Viele Autoren nennen den im Sorptionsmilieu vorliegenden pH-Wert als wichtigsten, die Sorption beeinflussenden, Faktor. Dabei werden oft unterschiedliche, vom pH-Wert beeinflusste, Bindungsmechanismen genannt. Die Präferenz für einen bestimmten Sorptionsmechanismus veränderte sich dabei in den vergangenen Jahren.

Proteine können über Kationenaustauschreaktion adsorbiert werden, da sie bei pH-Werten unterhalb des isoelektrischen Punkts (IEP) positiv geladen sind (Albert & Harter, 1973). Auch eine Adsorption von Proteinen bei Suspensions-pH-Werten deutlich oberhalb des IEPs in ungepufferten Systemen konnte beobachtet werden (Albert & Harter, 1973). Hingegen wurde bei ansteigendem pH-Wert eine abstoßende elektrostatische Wechselwirkung zwischen der netto negativ geladenen Oberfläche der Tone und den anionischen funktionellen Gruppen der Proteine gezeigt (Quiquampoix *et al.*, 1993). Hingegen würde ein netto neutrales Protein bei pH-Werten nahe dem IEP auf minimale abstoßende Kräfte treffen (Macritchie & Alexander, 1963, Tapp *et al.*, 1994). Dies kann zumindest in der Anfangsphase der Adsorption (Stotzky, 1986) zu einer maximalen Kollision mit geladenen Tonoberflächen und daher zu einer erhöhten Adsorption sowie zur Ausbildung von Ionenverbindungen zwischen dem netto neutral oder positiv geladenen Protein und der netto negativ geladenen Tonoberfläche führen (Macritchie & Alexander, 1963, Tapp *et al.*, 1994). Auch Chevallier *et al.* (2003) diskutierten eine pH-abhängige Proteinadsorption. Sie beschrieben eine maximale Adsorption nahe dem IEP des

Proteins und eine abnehmende Adsorption bei höheren pH-Werten. Diese Beobachtung war das Ergebnis der abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem „Netz“ der negativ geladenen Oberfläche der Tone und den dissoziierten anionischen funktionellen Gruppen des Proteins (Chevallier *et al.*, 2003), da bei pH-Werten oberhalb des IEPs das Protein negativ geladen war (Pagel-Wieder *et al.*, 2004). Unterhalb ihres IEPs konnten elektrostatische Wechselwirkungen bei Proteinen zu einer Proteinfaltung auf den Oberflächen und oberhalb ihres IEPs zu einer verminderten Adsorption führen (Quiquampoix, 2008a). Jedoch schützte das mit den Mineraloberflächen im Boden verbundene organische Material das Protein vor diesen destabilisierenden Wechselwirkungen, wenn es nicht durch einen Austauschmechanismus ersetzt wurde (Quiquampoix, 2008a).

2.3.2 Sorption von Proteinen an Oberflächen

Schon früh war man der Ansicht, dass Untersuchungen der Adsorption, der Bindung und der Transformation von definierten organischen Verbindungen an reinen Tonmineralien *in vitro* Modelle für die Interpretation des Verhaltens von natürlichen polymeren organischen Verbindungen auf Tonmineralien *in situ* liefern könnten (Fusi *et al.*, 1989). So ist es wichtig die Adsorption insektizider Proteine an Bodenbestandteilen zu untersuchen, um die Besonderheiten der Akkumulation und der Freisetzung, das Umweltrisiko und die Methoden zur Risikobewältigung des Toxins zu verstehen (Zhou *et al.*, 2005).

Proteine sind Makromoleküle und haben im Allgemeinen eine starke Affinität sowohl für die Fest-Flüssig-Grenzflächen der Tonminerale und der organischen Kolloide als auch für die Flüssig-Gas-Grenzflächen, die sich in einem Mikroporensystem entwickeln und vom Bodenporenwassergehalt abhängen (Rigou *et al.*, 2006, Quiquampoix & Burns, 2007, Quiquampoix, 2008b). Aufgrund der chemischen Vielfalt der Aminosäuren und der Flexibilität der Polypeptidkette können Proteine im Boden eine große Bandbreite an starken und komplexen Interaktionen mit den ausgedehnten Mineraloberflächen oder den Organo-Mineral-Komplexen ausbilden (Theng, 1979, Stotzky & Burns, 1982, Gianfreda & Bollag, 1996, Quiquampoix *et al.*, 2002, Quiquampoix, 2008ab). Die Aminosäuren als Bausteine der Proteine können u. a. van-der-Waals- und Coulomb-Wechselwirkungen mit den Grenzflächen eingehen oder über hydrophobe Effekte adsorbieren (Czeslik, 2006). Sie weisen eine große Vielfalt in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften auf, die auf einer elektrostatischen Skala als positiv, neutral oder negativ geladen und auf einer Hydrophobizitätsskala von polar bis unpolar eingeordnet werden können (Rigou *et al.*, 2006, Quiquampoix & Burns, 2007). Die Hydrophobizitäten können als Veränderung der molaren Gibbs-Energie, die die Übertragung eines Aminosäurerests aus einem

unpolaren Medium in Wasser hervorruft, definiert werden (Norde, 2003). Die hydrophobe Wechselwirkung ist die Tendenz apolarer Verbindungen in wässriger Umgebung zu aggregieren (Norde, 2003). Nichtkovalente Wechselwirkungen, die die Struktur eines Proteinmoleküls in Wasser bestimmen, sind die hydrophoben, die elektrostatischen, die dipolaren, die Dispersions-Wechselwirkungen und die Wasserstoffbrückenbindungen, die Verzerrung von Bindungslängen und -winkeln und die Rotationsfreiheit entlang der Polypeptidkette (Norde, 2003).

Schon Dashman & Stotzky (1986) diskutierten, dass die Unterschiede in der Fähigkeit der Hydrolysierbarkeit von organischen Molekülen, wenn sie an festen Oberflächen sorbiert sind, wahrscheinlich im Verhältnis zur Adsorptionsstärke stehen; dass die Moleküle also leichter hydrolysiert werden können, wenn sie schwächer adsorbieren. Insbesondere an Tonmineralen ist diese Adsorption oft stark bzw. irreversibel (Helassa *et al.*, 2009). Die Adsorption hat viele Konsequenzen: die Mobilität ist stark beschränkt, die biologischen Eigenschaften können aufgrund von Konformationsveränderungen (Servagent-Noinville *et al.*, 2000) und der Orientierung (Baron *et al.*, 1999) an der Oberfläche modifiziert werden und verschiedenartige Ausprägungen des Schutzes vor mikrobiellem Abbau können erhalten werden (Kleber *et al.*, 2007), insbesondere wenn die Bildung von Zwischenschichtkomplexen mit Tonen auftritt (Quiquampoix, 2008a).

Die Adsorption kann in die Physisorption und die Chemisorption unterteilt werden. Bei der Physisorption sind die Wechselwirkungen physikalischer Natur, wohingegen die Chemisorption die Bildung von chemischen Bindungen zwischen Adsorbat und Adsorbent miteinbezieht (Norde, 2003). Infolgedessen sind die Wechselwirkungen der Chemisorption viel stärker als die der Physisorption (Norde, 2003). Konformationsveränderungen können bei einer starken Bindung des Proteins an eine hydrophobe Oberfläche auftreten (Czeslik, 2006) oder bei der Chemisorption entstehen, bei der durch die chemische Bindung an eine Oberfläche die Struktur des Adsorbats durch die Beeinflussung interner Bindungen verändert werden kann. Hierbei sind sowohl das Ausmaß der Adsorption als auch die daraus resultierenden Konformationsveränderungen oft stark pH-abhängig (Quiquampoix & Burns, 2007, Quiquampoix, 2008a). So tendieren Proteine dazu sich auf Oberflächen auszubreiten (Norde, 2003). Jedoch ist die Ausbreitungsrate der Proteine aufgrund des relativ starken internen Zusammenhalts weitaus geringer als die flexibler Polymere und das Protein bleibt trotz struktureller Neuordnung kompakt (Norde, 2003).

Bei einem Protein kann die Adsorption durch den Anstieg der konformationellen Entropie begünstigt werden (Norde, 2003). Wenn ein Protein mit einer Seite an eine Oberfläche bindet,

nimmt die Bedeutung der intramolekularen hydrophoben Wechselwirkung als struktur-stabilisierender Faktor ab (Norde, 2003). Jedoch kann die Adsorption an einer apolaren nicht wasserstoffbindenden Oberfläche die intramolekularen Peptid-Peptid-Wasserstoffbrückenbindungen stimulieren, was zu einer erhöhten Ordnung in der Proteinstruktur führt (Norde, 2003). Ob eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung innerhalb des Proteinmoleküls auftritt hängt von der Auswirkung gegensätzlicher Effekte auf die energetisch vorteilhaften Wasserstoffbrückenbindungen und die ungünstigen Veränderungen in der Konformationsentropie ab (Norde, 2003). Laut Autor adsorbieren strukturell stabile („harte“) Proteine an polaren Oberflächen nur, wenn sie elektrostatisch angezogen werden. Hingegen unterliegen die strukturell labilen („weichen“) Proteine erheblicher Neuordnung, die zu einem konformationellen Entropiegewinn führen, der groß genug ist, dass die Proteine an einer polaren elektrostatisch abstoßenden Oberfläche adsorbieren (Norde, 2003).

Die Komplexität der vielfältigen involvierten Wechselwirkungstypen macht eine Wechselwirkungsvorhersage für ein vorgegebenes Protein mit den unterschiedlichen Bestandteilen der Bodenoberflächen extrem schwierig (Rigou *et al.*, 2006).

Ein Modell zu allgemeinen Beschreibung der Adsorptionskinetiken von Makromolekülen an festen Oberflächen wurde von Fleer *et al.* (1993) entwickelt. Demnach bestünde die Adsorption aus drei Schritten (siehe Abb. 2.3.2). Als Erstes erfolgt der Transport des Moleküls aus der Lösung an die Oberfläche [1]. Danach lagern sich Segmente des Makromoleküls an die Oberfläche an [2] und im letzten Schritt würden sich die Makromoleküle entfalten [3].

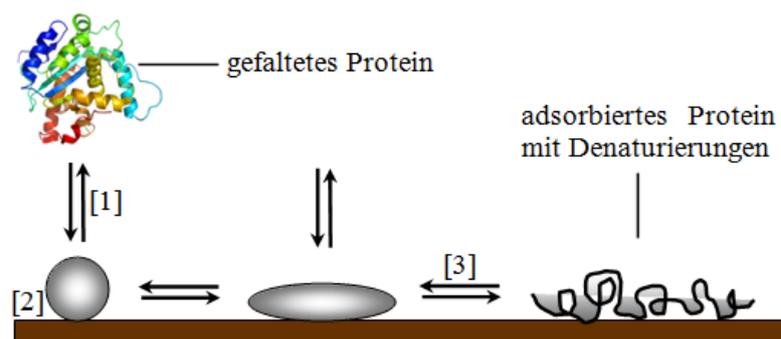


Abb. 2.3.2: Schematische Darstellung des von Fleer *et al.* (1993) beschriebenen Adsorptionsvorgangs (Ablauf siehe vorausgegangener Text).

Eine Grenzfläche wird zuerst von Molekülen bedeckt, die den höchsten Diffusionskoeffizienten aufweisen, am kleinsten sind und am häufigsten vorkommen (Norde, 2003). Später können diese von anderen Proteinen, die eine höhere Affinität für die Oberfläche haben, ersetzt werden (Norde, 2003). Für viele Proteinaggregate wurde jedoch nachgewiesen, dass sie im Vergleich zu den zugehörigen Monomeren bevorzugt adsorbieren. Weiterhin haben die Polarität, die elektro-

statische Ladungsdichte und die strukturelle Stabilität Einfluss auf die Adsorption. Auch wird vermutet, dass die strukturelle Stabilität eine Rolle beim Proteinkonkurrenzverhalten spielt, bei der „weiche“ Proteine im Vergleich zu „harten“ Proteinen bevorzugt adsorbieren (Norde, 2003).

2.3.3 Sorption von Cry-Proteinen an Oberflächen

Die Sorption von Cry-Proteinen wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen an den unterschiedlichsten Oberflächen von Bodenbestandteilen untersucht. Dabei wurde anfänglich kaum zwischen den Cry-Proteinen unterschieden. Erst später wurde der Einfluss des einzelnen Proteins entdeckt und mit einer spezifischeren Beschreibung der Cry-Proteine begonnen.

In einer der ersten Studien bezüglich der Adsorption unterschiedlicher Cry-Proteine wurde gezeigt, dass mehr Toxine von *B.t. sp. kurstaki* als von *sp. tenebrionis* an Tonminerale banden (Tapp *et al.*, 1994).

Im Allgemeinen adsorbierten *B.t.*-Proteine schnell (Saxena & Stotzky, 2000) an reine Tonminerale (Venkateswerlu & Stotzky, 1992, Tapp *et al.*, 1994), Huminsäuren (Crecchio & Stotzky, 1998a) – auch wenn die Huminsäurepartikel und das Protein entgegengesetzt geladen waren (Tan *et al.*, 2008) –, an Modellkomplexe von Tonmineralen mit Fe-Hydroxiden (Tapp *et al.*, 1994) und an Komplexe von Tonmineralen mit Huminsäuren und Al-Hydroxypolymeren (Crecchio & Stotzky, 2001). Mögliche Gründe für die schnelle Adsorption der Proteine wurden von o. g. Autoren nicht aufgeführt. Jedoch vermuteten Crecchio & Stotzky (1998a) einen höheren Polymerisationsgrad von Huminsäuren in Waldböden gegenüber dem in Ackerböden als Verursacher einer schnelleren Adsorption in den Waldböden. Die schnelle Bindung deutete an, dass aufgrund von Umwandlungsprozessen in transgenen Pflanzen und bakteriellen Zellen freigesetzte Toxine im Boden nur kurz in einem freien, gegenüber biologischem Abbau empfindlichen Zustand vorliegen würden (Venkateswerlu & Stotzky, 1992, Tapp & Stotzky, 1995ab, Koskella & Stotzky, 1997, Tapp & Stotzky, 1998, Crecchio & Stotzky, 1998a, 2001, Stotzky, 2000). So reduzierten Tonminerale das Ausmaß und die Rate des biologischen Abbaus einiger Bindungen (Chevallier *et al.*, 2003). *B.t.*-Toxine adsorbierten an Tongrößenfraktionen eines sandigen Lehmbodens (Tapp & Stotzky, 1995a) und eines Vertisols (Muchaonyerwa *et al.*, 2002) sowie an sandigen und tonigen Lehmböden (Sundaram, 1996). Eine Bindung der Toxine an die Schluff- und Sandgrößenfraktion des Bodens konnte nicht gezeigt werden (Koskella & Stotzky, 1997, Crecchio & Stotzky, 2001). Hingegen schien die Toxinbindung an oberflächenaktive Partikel und der dadurch schwierigere Zugang für den mikrobiellen Abbau bei Beibehaltung der Toxizität die Akkumulation und Persistenz sogar zu verstärken (Crecchio & Stotzky, 2001). Auch die Struktur des Toxins schien durch das Binden nicht verändert zu werden

(Crecchio & Stotzky, 2001), da sie ihre insektizide Aktivität beibehielten (Venkateswerlu & Stotzky, 1992, Tapp & Stotzky, 1995b). Ebenso wurde für das an Tonminerale adsorbierte Cry1Ab-Protein eine Beibehaltung der insektiziden Aktivität nachgewiesen (Saxena *et al.*, 2002b). Dies würde der Entfaltungstheorie widersprechen; da die insektizide Aktivität bestehen blieb, konnte sich die Struktur der Cry-Proteine nach der Bindung an eine Oberfläche nicht verändert haben (Crecchio & Stotzky, 2001). Dennoch wurde die konformationelle Stabilität der Cry-Proteine als unbekannt bezeichnet (Sander *et al.*, 2010).

2.3.3.1 Einflussfaktoren

Die Tonart hat einen Einfluss auf die Adsorption von Cry-Proteinen. So war die Adsorption von Cry-Proteinen an Montmorillonit höher als an Kaolinit oder an Illit und hing von der Natur des ersetzten Kations ab (Muchaonyerwa *et al.*, 2006). Montmorillonit adsorbierte über 40mal mehr Toxin als Kaolinit (Helassa *et al.*, 2009). Dieser Unterschied im Adsorptionsmaximum stimmte gut mit dem Unterschied in der spezifischen Oberfläche überein (Helassa *et al.*, 2009). Stotzky zeigte schon 1986, dass die signifikant größere spezifische Oberfläche und die KAK des Montmorillonits im Vergleich zum Kaolinit einen höheren Einfluss auf die Adsorption hatten.

Überzüge auf Mineraloberflächen können die Adsorption ebenfalls beeinflussen. So werden im Boden kontinuierlich Proteine von biologischen Systemen freigesetzt, bilden Umhüllungen auf den Mineraloberflächen und können mit dem Cry-Protein in Konkurrenz um die Adsorption stehen (Rigou *et al.*, 2006). Es wurde diskutiert, dass die organischen Bodenmaterialumhüllungen auf den Bodenaggregaten die *B.t.*-Toxinpolymere teilweise daran hindern innerhalb der Tonaggregate zu adsorbieren (Pagel-Wieder & Fischer, 2001, Pagel-Wieder, 2002). Weiterhin könnten potentielle Bindungsstellen für das *B.t.*-Toxin durch organisches Bodenmaterial blockiert sein (Pagel-Wieder *et al.*, 2004). Es wurde berichtet, dass humifiziertes organisches Material in Böden eine Polymerstruktur mit einer großen Oberfläche hatte, die von Poren mit einer Porengröße von ungefähr 0,5 nm durchzogen wurde (de Jonge & Mittelmejer-Hazeleger, 1996, Malekani *et al.*, 1997). Demnach ist das *B.t.*-Toxin nicht dazu fähig, das organische Bodenmaterial zu penetrieren (Pagel-Wieder *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu zeigten Calamai *et al.* (2000), dass das Vorliegen von mit organischer Substanz umhüllten Tonpartikeln die Adsorption der Proteine förderte. Das organische Material, das mit den Mineraloberflächen im Boden verbunden ist, kann das Protein vor destabilisierenden Wechselwirkungen schützen (Quiquampoix, 2008a). Diese Aussage bietet eine Erklärung für die beschriebene strukturelle Integrität der Cry-Proteine aufgrund der Beibehaltung der insektiziden Aktivität (Crecchio & Stotzky, 2001). Die Adsorption des Toxins aus *B.t. sp. tenebrionis* an den Tongrößenfraktionen

wurde durch organisches Material erhöht, wohingegen Fe-Oxide sie verringerten (Muchaonyerwa *et al.*, 2006).

Zusammenfassend scheint der Beitrag des organischen Materials zur Adsorption und Bindung des Toxins aus *B.t. sp. tenebrionis* nicht nur von seiner Quantität abzuhängen, sondern insbesondere auch vom Tonmineraltyp (Muchaonyerwa *et al.*, 2006). Demnach sollte die Adsorption der *B.t.*-Toxine von der Reaktivität und der relativen Häufigkeit der unterschiedlichen miteinander wechselwirkenden Bodenbestandteile beeinflusst werden. Tatsächlich sorbierte die Smectit-Tonfraktion, im Verhältnis zu ihrer Oberfläche und ihrer Ladung, viel mehr Toxin als die Kaolinit-Fraktion (Muchaonyerwa *et al.*, 2006). Übereinstimmend mit dieser Tatsache wurde festgestellt, dass die Tonart einen größeren Einfluss auf die Sorption des Toxins aus *B.t. sp. israelensis* hatte, als die Kationen Ca^{2+} , Mg^{2+} und Al^{3+} (Lee *et al.*, 2003). Bei der Untersuchung von Montmorillonit homoionisch mit K, Na, Ca, Mg, La oder Al und Kaolinit homoionisch mit Na oder Ca belegt wurde eine schnelle Bindungen der Toxine aus *B.t. sp. kurstaki* und *sp. tenebrionis* an diese festgestellt (Koskella & Stotzky, 1997). Das Kation könnte die Adsorption der Cry-Proteine beeinflussen, wenn ein Kationenaustausch am Adsorptionsprozess beteiligt ist (Tapp *et al.*, 1994). Weiterhin könnte die Adsorption beeinflusst werden, wenn die Proteine, im Wettstreit mit den monovalenten Kationen um die Austauschstellen, konkurrenzfähiger sind (Ensminger & Giesecking, 1941, McLaren, 1954, McLaren *et al.*, 1958, Chiang & Chao, 1964). Jedoch sind Kationen einer höheren Wertigkeit mit einer höheren Energie gebunden und nicht leicht zu ersetzen (Harter & Stotzky, 1971).

Die Toxine aus *B.t. sp. kurstaki* (Cry1-Protein) und *B.t. sp. tenebrionis* (Cry3-Protein) (Koskella & Stotzky, 1997) adsorbierten schnell (< 30 min) sowohl auf „sauberen“ (d. h. negative Ladungen wurden durch monomere Kationen kompensiert) als auch auf „schmutzigen“ (d. h. mit zwei Arten von polymeren Fe-Oxyhydroxiden überzogenen) Tonmineralien und auch an der Tongrößenfraktion des Bodens (Stotzky, 2000). Ihre Adsorption stieg mit der Proteinkonzentration an und erreichte schließlich einen Sättigungsbereich. Die maximale Adsorption lag zwischen pH 6 und pH 8 auf „sauberem“ Ton und ihre Löslichkeit verringerte sich unterhalb von pH 6 (Tapp *et al.*, 1994). Auf „schmutzigen“ Ton lag das Maximum zwischen pH 5 und pH 9. Sie wurde durch den Kationentyp auf dem Tonaustauschkomplex beeinflusst, wobei die Adsorption im Allgemeinen abnahm, wenn die Wertigkeit des Kations zunahm. An Kaolinit war die Adsorption signifikant niedriger als an Montmorillonit und an „schmutzigen“ niedriger als an „sauberen“ Tonen. Die Adsorption des Cry1Ab-Proteins an Montmorillonit und Kaolinit hing diesen Autoren nach sowohl von elektrostatischen (pH-abhängigen) als auch von hydrophoben Wechselwirkungen ab, da die Adsorptionsisothermen für beide Mineralien mit Zunahme des pH-

Werts über den IEP merkbar abnehmen und es eine viel höhere Adsorption an hydrophoben als an hydrophilen Oberflächen gab (Helassa *et al.*, 2010).

Auch an negativ geladenem SiO_2 und positiv geladenem PLL (Poly-L-Lysin) wurde die Adsorption des Cry1Ab-Proteins untersucht (siehe *Abb. 2.3.3.1*) (Sander *et al.*, 2010, Madliger *et al.*, 2010, 2011). Die Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche waren durch PCEA (patch controlled electrostatic attraction, ~ bereichsgesteuerte elektrostatische Anziehung) dominiert, da das Protein mit fallender Ionenstärke und fallendem pH-Wert – wenn Protein und Oberfläche negativ geladen waren – von der Oberfläche angezogen wurde. Die PCEA führte mit abnehmender Ionenstärke aufgrund abnehmender Abschirmung der elektrostatischen Anziehung zu ansteigenden Proteinaffinitäten für Sorbenten ähnlicher Nettoladung (Madliger *et al.*, 2010). Im umgekehrten Fall nahm die Affinität eines gleichförmig geladenen Proteins für ähnlich geladene Sorbenten mit abnehmender Ionenstärke aufgrund der zunehmenden elektrostatischen Abstoßung ab (Madliger *et al.*, 2010).

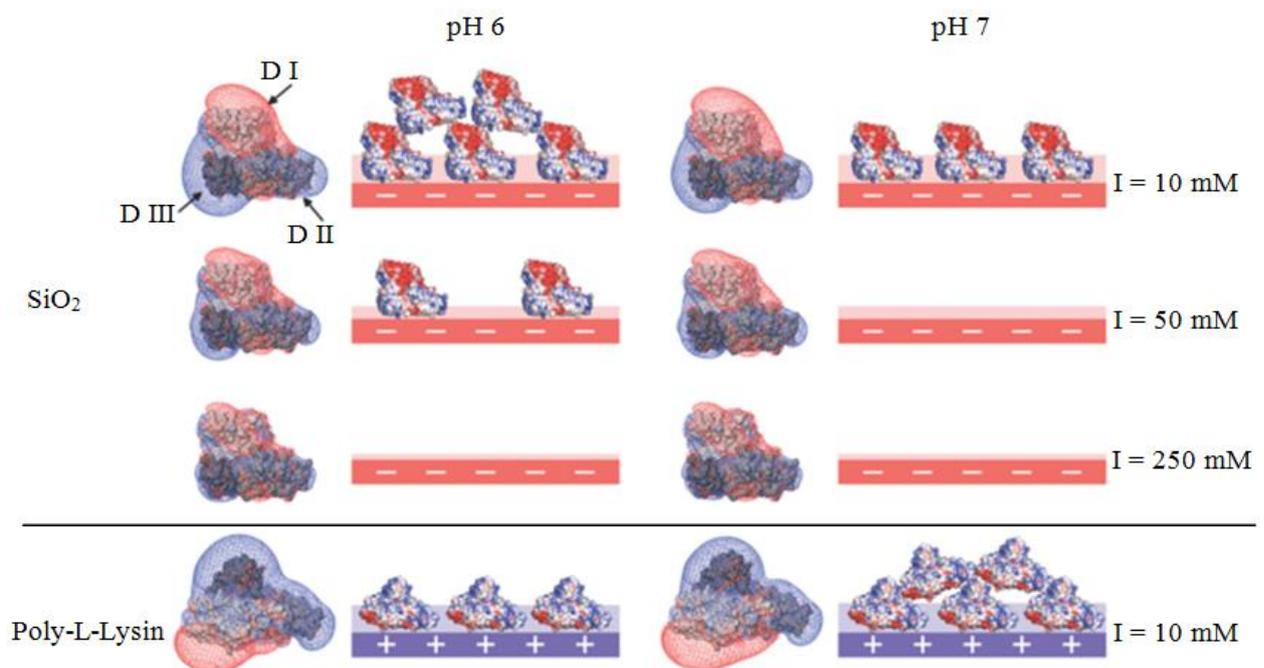


Abb. 2.3.3.1: Schematische Darstellung des Sorbenten Cry1Ab und der intermolekularen PCEA bei zwei pH-Werten gegenüber negativ geladenem SiO_2 bei unterschiedlichen Ionenstärken (I) und gegenüber positiv geladenem Poly-L-Lysin. Das Cry1Ab-Protein adsorbierte mit den positiv geladenen Domänen II und III zur SiO_2 -Oberfläche orientiert und mit der negativ geladenen Domäne I zum Poly-L-Lysin (verändert nach Madliger *et al.*, 2010).

Desweiteren scheint die von Tonmineralen adsorbierte Toxinmenge, zumindest bei Temperaturen zwischen 7 °C und 50 °C, temperaturunabhängig zu sein (Venkateswerlu & Stotzky, 1992, Zhou *et al.*, 2005).

2.3.4 Abbau von Cry-Proteinen in den Böden

Proteine, Peptide, Aminosäuren, DNA und Viren werden vor mikrobiellem Abbau und Inaktivierung geschützt, wenn sie an oberflächenaktiven Partikeln gebunden sind (Lipson & Stotzky, 1986, Stotzky, 1986, 2004, Khanna & Stotzky, 1992, Gallori *et al.*, 1994, Vettori *et al.*, 1996, 1999, Crecchio & Stotzky, 1998b, Calamai *et al.*, 2000, Lozzi *et al.*, 2001), da die mikrobiellen Exoenzyme anscheinend die Peptidbindungen nicht hydrolysieren und somit keine kleinen nutzbaren Peptide und Aminosäuren abgespalten werden können (Dashman & Stotzky, 1986). Diese Unfähigkeit der Mikroben an homoionischen Montmorillonit gebundene Proteine schnell zu nutzen ist noch nicht vollständig verstanden (Dashman & Stotzky, 1986 zitieren Stotzky, 1980).

Die Unterschiede bei der Zersetzung/Persistenz der *B.t.*-Toxine im Boden sowie ihr mikrobieller Abbau hängen vom Bodentyp, den Umweltbedingungen, der Proteinquelle (pflanzenproduziert vs. aufgereinigt) und der Art des untersuchten Cry-Proteins ab (Clark *et al.*, 2005). Weitere Einflüsse werden durch die Cry-Proteinmenge, die Kulturpflanzenart (z. B. chemische Zusammensetzung und Unterschiede im C:N-Verhältnis), die Kulturpflanzenmanagementpraktiken (z. B. Bodenbearbeitung vs. keine Bodenbearbeitung mit Wurzeln, die im Boden verbleiben) und andere ökologische Faktoren hervorgerufen (Icoz & Stotzky, 2008b). Zu den ökologischen Faktoren gehören das Nährstofflevel, die Temperatur, der pH-Wert, die Tonmineralart und -menge und die Fraktion des organischen Materials, die im Boden vorliegen und mit dem Ort und der Klimazone variieren (Icoz & Stotzky, 2008b).

Das Toxin überdauerte sowohl im Boden als auch in der Rhizosphäre der angebauten *B.t.*-Maispflanzen während des Wachstums, einige Monate nach ihrem Absterben und nachfolgendem Frost (Saxena & Stotzky, 2002a). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Mendelsohn *et al.* (2003). Dort wurde der Großteil des durch die *B.t.*-Kulturpflanzen in den Boden ausgeschiedenen Cry-Proteins innerhalb weniger Tage abgebaut. Jedoch konnte ein gewisser Cry-Proteinrest in seiner biologisch aktiven Form für eine viel längere Zeitperiode bestehen (Mendelsohn *et al.*, 2003). 2008 wiesen Lehman *et al.* nach, dass der Abbau von *B.t.*-Mais (Cry3Bb1-Protein) unter Feldbedingungen im Großen und Ganzen zu denselben Abbauraten wie bei unveränderten Varianten führte und dass dabei keine signifikante Beeinflussung der beteiligten Mikro-, Meso- und Makrofauna auftrat (Bitzer *et al.*, 2005, Hönemann *et al.*, 2008, Lawhorn *et al.*, 2009).

Andere Untersuchungen widmeten sich den möglichen Einflussfaktoren auf die Abbauraten. So basierte der Abbau größtenteils auf biotischen Faktoren, die stark vom Bodentyp abhingen

(Glandorf *et al.*, 1997, Crecchio & Stotzky, 1998a). Das Überdauern und der biologische Abbau der Cry-Proteine sowie anderer Proteine, Peptide, Aminosäuren, DNA, Viren und anderer Biomoleküle im Boden hing stark vom Level der mikrobiellen Aktivität ab (z. B. Lipson & Stotzky, 1985, 1986, Stotzky, 1986, Dashman & Stotzky, 1986, Khanna & Stotzky, 1992, Gallori *et al.*, 1994, Palm *et al.*, 1996, Vettori *et al.*, 1996, 1999, Koskella & Stotzky, 1997, Tapp & Stotzky, 1998, Crecchio & Stotzky, 1998a, 2001). Die mikrobielle Aktivität war wiederum stark von ihrer Nährstoffsituation abhängig (Niemeyer & Gessler, 2002). War das *B.t.*-Protein jedoch erst einmal an die Tonpartikel und Huminstoffen gebunden, schien es weniger zugänglich für den mikrobiellen Abbau zu sein (Crecchio & Stotzky, 1998a, Tapp & Stotzky, 1998).

Als wichtig für die Persistenz von organischen Molekülen im Boden wurden abiotische Faktoren wie die oberflächenaktive Partikel – Tonminerale und Huminstoffe – beschrieben (Stotzky, 2000). Viele Bodeneigenschaften, einschließlich der mikrobiellen Aktivität, hingen von den Arten und Mengen der vorliegenden Tonminerale ab (Stotzky, 1986). Das Wachstum und die Stoffwechselaktivität der Bakterien waren in Böden höher, die Montmorillonit enthielten, da diese generell besser gegen pH-Abfall gepuffert waren (Stotzky, 1986, Chenu & Stotzky, 2002). Partikel in Sand- und Schluffgröße schienen generell nicht in die Persistenz involviert zu sein (Stotzky, 1986). Grund hierfür war der Mangel an signifikanter Oberflächenladung der Partikel, da sie hauptsächlich aus primären Mineralien zusammengesetzt waren und kleinere spezifische Oberflächen aufwiesen (Stotzky, 1986). Die deutliche Abnahme extrahierbaren Toxins nach langen Inkubationszeiten war bodenabhängig (Helassa *et al.*, 2011). Die Abnahme war jedoch nicht mit dem mikrobiellen Abbau verknüpft, sondern hauptsächlich durch Wechselwirkungen mit den Oberflächen bedingt. Durch diese Wechselwirkungen kam es zur Veränderung der Proteinstruktur, sodass die Nachweisbarkeit mit immunochemischen Methoden verringert oder die Proteinfixierung verstärkt wurde (Helassa *et al.*, 2011).

Vorausgegangene Untersuchungen zeigten, dass die mikrobielle Aktivität im Boden im Allgemeinen bei höheren Temperaturen stark verbessert wurde (Zogg *et al.*, 1997) und es dadurch zu höheren Abbauraten (Pont & Nentwig, 2005) des Cry1Ab-Proteins kam (Feng *et al.*, 2011). Ein geringerer Abbau in 4 °C kalten Böden spiegelte eventuell die Temperaturabhängigkeit der Adsorption und daraus folgend die konformationellen Veränderungen unabhängig von der mikrobiellen Aktivität wieder (Helassa *et al.*, 2010). Der Wassergehalt des Bodens und der pH-Wert hatten keinen offensichtlichen Einfluss auf den Abbau (Feng *et al.*, 2011). Hingegen wurde eine verminderte insektizide Aktivität in Böden mit einem höheren pH-Wert (5,8 - 7,3) beschrieben als in Böden, in denen die insektizide Aktivität bewahrt wurde (pH

4,9 - 5,1) (Tapp & Stotzky, 1998). Sie vermuteten, dass mehr *B.t. sp. kurstaki*-Toxin in ersteren Böden abgebaut worden war, da die mikrobielle Aktivität bei höheren pH-Werten größer bzw. im Allgemeinen bei pH 7 optimal war (Stotzky, 1974, 1986) und da die Toxinadsorption an den Tonen mit ansteigendem pH-Wert abnahm (Tapp *et al.*, 1994), was sie empfindlicher gegenüber biologischem Abbau gemacht haben könnte. Die Adsorption von Cry1Ab-, Cry3Aa- und Cry4-Proteinen an Tonen nahm ab, wenn durch einen pH-Anstieg die mikrobielle Aktivität in neutralen Böden zunahm (Tapp & Stotzky, 1998, Vettori *et al.*, 1999, Crecchio & Stotzky, 2001, Lee *et al.*, 2003). Weiterhin wurde festgestellt, dass die Abbaustabilität des *B.t. sp. kurstaki*-Toxins unter anaeroben und aeroben Bedingungen ähnlich war (Tapp & Stotzky, 1998). Daher scheint der Sauerstoffgehalt im Boden hierfür nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Zum Cry1Ab-Proteinabbau im Boden liegen gegensätzliche Aussagen vor. So wurde von tagelangen bis zu drei Jahre dauernden Abbauperioden berichtet (z. B. Tapp & Stotzky 1998, Saxena & Stotzky, 2001, 2002, Zwahlen *et al.*, 2003, Stotzky, 2002, 2004). Aber auch von kurzen Abbauperioden von ca. 20 Tagen bis zu wenigen Wochen berichtet (z. B. Ream *et al.*, 1994, Sims & Holden, 1996, Palm *et al.*, 1996, Hopkins & Gregorich, 2003, Muchaonyerwa *et al.*, 2004). Dubelman *et al.* (2005) konnten sogar nach mehr als drei aufeinanderfolgenden Wachstumsperioden von Cry1A-exprimierendem Mais keine Akkumulation oder Persistenz des Proteins im Boden beobachten. Die Gründe für diese gegensätzlichen Ergebnisse sind unbekannt (Icoz & Stotzky, 2008ab). Die Bedeutung des pH-Werts und anderer physikalischer, chemischer, sowie auch biologischer Eigenschaften des Bodens für das Bestehen verschiedener Cry-Proteine bedarf einer weiteren Ermittlung, insbesondere für die Klärung der Unterschiede bezüglich der Persistenz der Proteine.

2.3.5 Abbau von Cry-Proteinen in pflanzlicher Biomasse

Pflanzenzellen enthalten Lignin. Lignin ist eine Hauptstrukturkomponente von Pflanzenzellen, die Stärke, Starrheit und Undurchlässigkeit für Wasser verleiht (Strasburger *et al.*, 1998) und labilere Komponenten, wie Kohlenhydrate und Proteine, gegen den biologischen Abbau schützt (Stotzky, 2004). Sie trägt auch zur Verteidigung gegen Pathogene und Insekten in Gefäßpflanzen bei und dient sowohl als Verbindung zwischen den Zellen zusammen mit der Verstärkung der Zellwände des Xylemgewebes als auch zum Schutz der Zellwand gegen mikrobiellen Angriff (Poerschmann *et al.*, 2005). Ebenso ist Lignin bekannt für seine Fähigkeit die Verträglichkeit und Verdaubarkeit von Pflanzenmaterial für Herbivore und Zersetzer zu beeinflussen (Zwahlen *et al.*, 2003). Daher könnten Veränderungen des Ligningehalts ökologische Auswirkungen haben (Halpin *et al.*, 1994).

Es wurden höhere Ligninkonzentrationen in den Blättern und Stängeln von *B.t.*-Mais (Linien MON810 und 176) im Vergleich zu den nah-isogenen Nicht-*B.t.*-Linien gefunden (Poerschmann *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu wurden ein geringerer Ligningehalt, sowie ein niedrigeres C:N-Verhältnis und ein höherer Gehalt an löslichen Kohlenhydraten in Blättern von *B.t.*-Mais (Linie Bt11), verglichen mit den nah-isogenen Nicht-*B.t.*-Varianten, gemessen (Escher *et al.*, 2000). Ebenso wurden keine beständigen signifikanten Unterschiede im Ligningehalt zwischen sechs *B.t.*-Maishybriden, die das Cry1Ab-Protein exprimierten (Linien MON810 und Bt11) und ihren sechs Nicht-*B.t.*-Isolinien festgestellt (Jung & Shaeffer, 2004). Die *B.t.*-Maisvarianten (CR und B73xMo17, Masoero *et al.*, 1999) (Bt11, MON810 und 176, Saxena & Stotzky, 2001b) enthielten mehr Lignin als die isogenen Nicht-*B.t.*-Maisvarianten. Jedoch muss beachtet werden, dass alle Arbeitsgruppen unterschiedliche Methoden zur Bestimmung des Ligningehalts einsetzen. Zusätzliches Lignin könnte den Verfall verzögern und damit labile Bestandteile des Pflanzenmaterials vor mikrobiellem oder enzymatischem Angriff schützen (Hopkins *et al.*, 2001). Es wurde vermutet, dass die Insertion des *cry1Ab*-Gens in das pflanzliche Genom die Empfindlichkeit des *B.t.*-Mais gegenüber dem biologischen Abbau beeinflusst (Stotzky, 2004). Diese Betrachtung wird in der Fachwelt allerdings intensiv diskutiert (Flores *et al.*, 2005). Das Bestehen des Toxins im Boden sowie seine biologische Aktivität sollte durch die schützenden Mechanismen, die mit der Sorption am Lignin einhergehen, beeinflusst werden (Stotzky, 2000, Poerschmann & Kopinke, 2001, Saxena *et al.*, 2002a). Es wurde vermutet, dass der signifikant höhere Ligningehalt des *B.t.*-Mais im Vergleich zum nah-isogenem Nicht-*B.t.*-Mais eine Erklärung für die langsamere Zersetzung der Biomasse im Boden sein könnte (Stotzky, 2004). Dementsprechend führte ein niedrigerer Ligningehalt in *B.t.*-Mais verglichen mit der isogenen Sorte zu einem schnelleren Abbau (Escher *et al.*, 2000). Dabei könnte ein verlangsamer Biomasseabbau auch Vorteile nach sich ziehen, da das organische Material durch die längere Lebensdauer und die Akkumulation im Boden die Bodenstruktur verbessern und die Bodenerosion verringern könnte (Stotzky, 2004). Jedoch lässt dies im Umkehrschluss die Nachteile zu, dass mehr Biomasse im Boden die Gefahr für Nichtzielorganismen verlängert und die Selektion von toxinresistenten Insekten erhöht. Diese Gefahr scheint im Allgemeinen von Cry-Proteinen, die in den Wurzelexsudaten und von den Pflanzenrückständen der *B.t.*-Kulturpflanzen freigesetzt werden, nicht auszugehen, da keine beständigen signifikanten und langzeitigen Einflüsse auf die mikrobielle Gemeinschaft und ihre Aktivitäten im Boden festgestellt wurden (Icoz & Stotzky, 2008b). Eine Akkumulation des Cry3Bb1-Proteins im Boden über drei Anbauperioden konnte nicht gezeigt werden und auch die bakterielle

Gemeinschaft der Rhizosphäre wurde durch den *B.t.*-Maisanbau nicht beeinflusst (Miethling-Graff *et al.*, 2009).

2.4. DER ELISA ALS NACHWEISSYSTEM FÜR PROTEINE

Da Antikörper mit hoher Spezifität an bestimmte Antigene binden, wurden Testverfahren entwickelt, die ausschließlich auf dem Nachweis spezifischer Antikörper-Antigen-Komplexe basieren, sodass spezielle Erkennungsverfahren für einzelne Markermoleküle überflüssig wurden (Glick & Pasternack, 1995). So werden die in Bakterien und Pflanzen exprimierten oder im Boden vorliegenden Cry-Proteine am einfachsten mit Proteinnachweisverfahren, wie z. B. dem ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) detektiert.

Das System des ELISAs wurde parallel von zwei Arbeitsgruppen in Frankreich (Avrameas & Guilbert, 1971) und Schweden (Engvall & Perlman, 1971) beschrieben. Es gibt zwei ELISA-Arten. Bei der ersten Art wird ein Antikörper bei der zweiten Art ein Antigen detektiert (Lottspeich & Zorbas, 1998). Letzterer wurde hier in der Variante des Sandwich-ELISAs eingesetzt. Im prinzipiellen Aufbau dieses ELISA-Typen befindet sich das Antigen zwischen zwei unterschiedlichen, spezifischen Antikörpern (Raem & Rauch, 2007). Dafür wird zuerst (siehe beispielhaft *Abb. 2.4*) ein Antikörper [1] in Vertiefungen (Wells) von Polyvinylchlorid- oder Polystyrolplatten gebunden (Kemeny, 1994). Danach werden in dieser Reihenfolge Antigen [2], biotinylierter Antikörper [3] und das Enzymkonjugat [4] hinzugefügt. Letzteres weist das Antigen schlussendlich über eine enzymatische Farbreaktion [5] nach (Rehm, 2006).

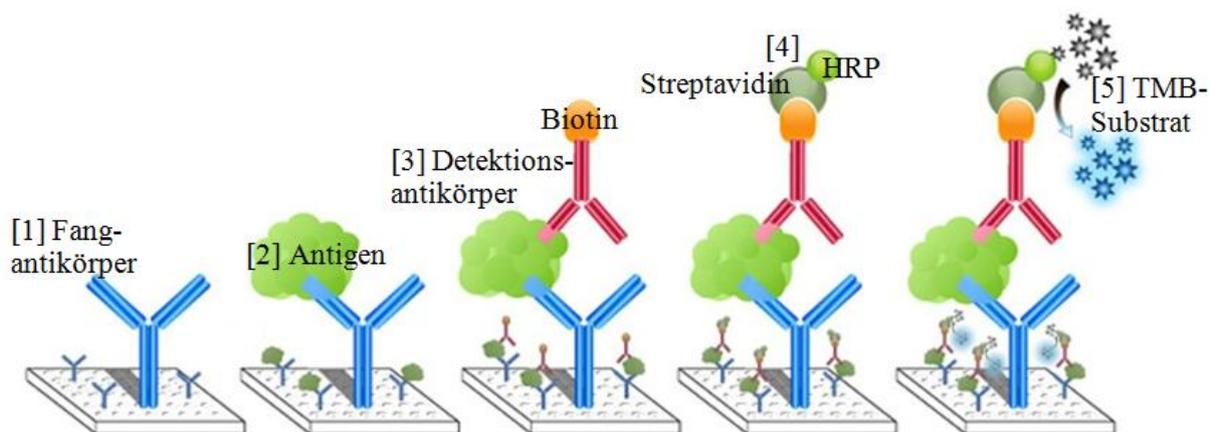


Abb. 2.4: Schematischer Ablauf eines Sandwich-ELISAs. HRP = Horseradish Peroxidase, TMB = Tetramethylbenzidin. (verändert nach epitomics.com/images/products/sandwich.jpg, 2012/04/16).

Die für ein funktionierendes Nachweisverfahren benötigten Antikörper müssen das zu detektierende Protein an mindestens zwei Epitopen spezifisch binden. Dabei richten sich polyklonale Antikörper gegen unterschiedliche Bindungsstellen (Epitope) auf dem Antigen. Hingegen binden monoklonale Antikörper dasselbe Epitop (Raem & Rauch, 2007). Diese poly-

oder monoklonalen Antikörper stehen kommerziell nur eingeschränkt zur Verfügung, so dass diese für eigene Testverfahren entwickelt, produziert und im Testsystem etabliert werden müssen. Der Gesamtpool von polyklonalen Antikörpern, erkennt ein spezifisches Antigen aufgrund vieler unterschiedlicher Epitope und kann dadurch polyklonale Antikörperklone kompensieren, die eventuell ein Epitop des Antigens erkennen, das auch in vielen anderen Strukturen von Proteinen vorkommt und so störende Kreuzreaktionen verursachen würde (Luttmann *et al.*, 2009).

Die Attraktivität eines ELISA-Systems besteht in der Empfindlichkeit und Spezifität des Nachweises, die es diesem System erlaubt an komplexen biologischen Materialien angewendet zu werden (Baumgarte & Tebbe, 2005). Jedoch kann die das Detektionssignal auslösende Antikörper-Antigen-Reaktion auch bei teilweise degradierten Cry-Proteinen auftreten (Baumgarte & Tebbe, 2005). Dies ist der Fall, wenn die Epitopstruktur, auf die die Antikörper reagieren, noch vorhanden ist und damit auch biologisch inaktives Cry-Protein detektiert wird (Baumgarte & Tebbe, 2005).

3 ZIELSETZUNG

Im Rahmen der Biosicherheitsforschung zum Anbau der gentechnisch veränderten Maishybriden MON89034 x MON88017 wurden Untersuchungen durchgeführt, um zur Abschätzung des Anbaurisikos beizutragen.

Die Ziele dieser Arbeit waren:

- der Nachweis der Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 in Wurzelexsudaten der transgenen Maishybriden MON89034 x MON88017,
- die Untersuchung des Einflusses der Kultivierung verschiedener Maissorten auf den Streuabbau über den Gehalt des Oberbodens der Freisetzungsfäche an pflanzenverfügbarem mineralisiertem Stickstoff,
- die Entwicklung und Produktion mono- und polyklonaler Antikörper gegen die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 und die Etablierung dieser Antikörper im Proteinnachweissystem ELISA (enzyme linked immunosorbent assay),
- die Modellierung ausgewählter Eigenschaften der Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 auf Grundlage vorhandener kristallographischer Modelle,
- der Nachweis des Aggregationsverhaltens der Proteine Cry1Ab, Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 in höheren Konzentrationen [$\mu\text{g mL}^{-1}$],
- die Charakterisierung des Versuchsfeldes durch die Erhebung ausgewählter Bodenparameter an der Feinerde-, Schluff- und Tonfraktion der einzelnen Parzellen,
- die Messung der Bindungsstärke der Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 an den Korngrößenfraktionen Feinerde ($< 2 \text{ mm}$), Schluff ($< 63 \mu\text{m}$) und Ton ($< 2 \mu\text{m}$),
- und die Messung des Konkurrenzverhaltens der Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 an der Tonfraktion.

Die in dieser Arbeit geprüften Hypothesen waren:

- dass die transgene Maishybride MON89034 x MON88017 die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 exsudiert,
- dass die Kultivierung der Maishybride MON89034 x MON88017 im Vergleich mit drei weiteren Maissorten den Gehalt des Bodens an pflanzenverfügbarem mineralisiertem Stickstoff, als Maß für den Streuabbau, im Untersuchungszeitraum nicht beeinflusst,
- dass sich die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 in geringen Konzentrationsbereichen mit etablierten ELISA-Systemen nachweisen lassen,
- dass die Proteine Cry1Ab, Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 in höheren Konzentrationen Aggregate bilden,

- dass sich die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 in ihren Eigenschaften unterscheiden,
- dass sich das Versuchsfeld anhand der erhobenen Bodenparameter durch eine große Homogenität auszeichnet,
- dass die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 aufgrund ihrer unterschiedlichen dreidimensionalen Strukturen verschieden stark an den Korngrößenfraktionen Feinerde, Schluff und Ton gebunden werden und deshalb ein unterschiedliches Verlagerungsverhalten aufweisen,
- dass die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 im untersuchten Konzentrationsbereich kein Konkurrenzverhalten bei der Bindung an die Tonfraktion zeigen
- und dass die ausgewählten Bodenparameter keine deutlichen Rückschlüsse auf die Bindungsstärke der Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 zulassen.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 CHARAKTERISIERUNG DES REAKTANTEN BODEN

Die Charakterisierung des Bodens begann mit der feldbodenkundlichen Bodenansprache der Freisetzungsfläche gefolgt von der Standortcharakterisierung. Beides sollte Auskünfte über pedogenetische Parameter geben. Da auch kleinräumige Unterschiede erfasst werden sollten, wurden Proben aus allen Parzellen (A bis E, 1 bis 8) entnommen.

4.1.1 Das Versuchsfeld

Das Versuchsfeld mit einer Größe von 1,12 ha (188 · 356 m) lag in 38114 Braunschweig (Niedersachsen, BRD) auf der Gemarkung Ölper auf Flur 10 in Flurstück 214/3. Im randomisierten Design (*Abb. 4.1.1*) wurden die konventionellen Maissorten Benicia (Pioneer Hi-Bred, Johnston, IA), DKc4250 (Monsanto) sowie die nah-isogene Sorte DKc5143 (AMATO[®]) und die gentechnisch veränderte Sorte MON89034 x MON88017 (Monsanto) angebaut. Die Sorte DKc5143 wurde in zwei Varianten mit und ohne Bodeninsektizidbehandlung (Tefluthrin) eingesetzt.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	MON	Benicia	DKC5143 Tefluthrin	DKC4250	DKC5143	MON	DKC4250	DKC5143 Tefluthrin
B	DKC5143	DKC5143 Tefluthrin	DKC5143	MON	Benicia	DKC5143	DKC5143 Tefluthrin	DKC4250
C	DKC5143 Tefluthrin	Benicia	MON	DKC4250	DKC5143	MON	DKC4250	Benicia
D	Benicia	DKC5143	DKC4250	Benicia	DKC5143 Tefluthrin	Benicia	MON	DKC5143
E	DKC4250	MON	DKC5143 Tefluthrin	DKC5143	MON	DKC5143 Tefluthrin	DKC4250	Benicia

Abb. 4.1.1: Plan des Versuchsfeldes mit eingezeichneten Maissorten (MON = MON89034 x MON88017). Die Parzellen, in denen die Profilgruben angelegt wurden, sind rot hervorgehoben (A1, C6 und E5).

4.1.2 Der Bodentyp

Um einen größeren Einblick in den Boden der Fläche zu erhalten, wurde in drei Parzellen (A1, C6 und E5, *Abb. 4.1.1*) jeweils eine Profilgrube (1 m · 2 m · 1,5 m) angelegt. Der Aushub von Ober- und Unterboden wurde getrennt abgelegt und nach der Aufnahme der Profile wieder in der vorgefundenen Reihenfolge eingefüllt.

4.1.3 Bodenprobenentnahme

Von jeder der 40 Parzellen, in die sich das Versuchsfeld untergliederte, wurden zwei Mischproben aus unterschiedlichen Tiefen entnommen. Proben des Oberbodens wurden aus einer Tiefe von 0 - 20 cm mit einem Bohrstock (\varnothing 2 cm) entnommen. Um repräsentative Mischproben zu erhalten, wurden die einzelnen Parzellen in dem Muster beprobt, wie es in *Abbildung 4.1.3* dargestellt ist. Die Proben für den Unterboden wurden in einer Tiefe von ca. 40 - 60 cm genommen in der ein deutlicher optischer Wechsel der Horizonte zu erkennen war. Die Entnahme erfolgte pro Parzelle an zwei zufällig ausgewählten Stellen.

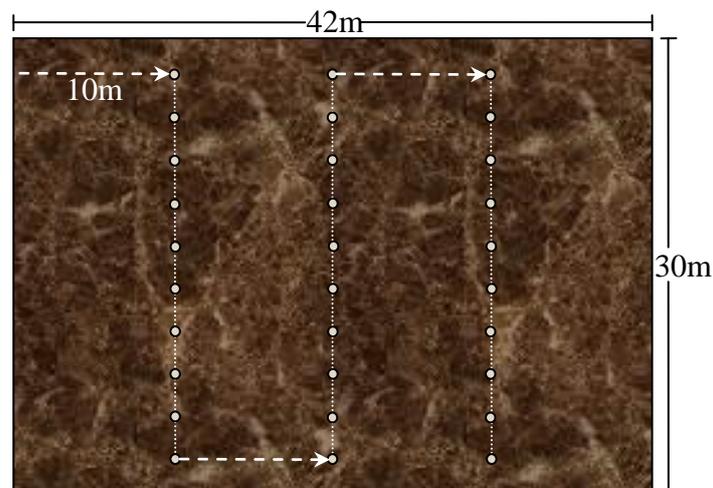


Abb. 4.1.3: Schematische Darstellung einer Parzelle mit Bodenprobenentnahmehemmer.

Für die Sorptions- und Konkurrenzuntersuchungen (*Kapitel 4.5*) sowie für die Bestimmung ausgewählter Bodeneigenschaften (*Kapitel 4.1.4*) wurden die benötigten Bodenfraktionen über die in den folgenden zwei Kapiteln durchgeführten Verfahren gewonnen.

4.1.3.1 Feinerde- und Schlufffraktionierung

Die auf dem Versuchsfeld entnommenen Bodenproben wurden bei 25 °C Raumtemperatur (RT) und gelegentlichem Durchmischen getrocknet. Danach wurden die einzelnen Bodenproben durch ein Metallsieb (Prüfsieb 2 mm/2000 μ m DIN 4188 „Korngrößenverteilungsbestimmung“) mit einer Maschenweite von 2 mm gesiebt, wobei größere Steine und Pflanzenmaterialreste, wie z. B. Wurzeln, entfernt und größere Bodenaggregate zerstoßen wurden. Der gesiebte Boden wurde gewogen (Sartorius BP 34000-P) und bis zur weiteren Verwendung bei 20 °C RT aufbewahrt.

Aus dieser Fraktion konnte wiederum mittels trockener Siebung (0,063 mm/63 μ m DIN 4188) bei einer Maschenweite von 63 μ m die Schlufffraktion gewonnen werden, die u. a. in der boden-

chemischen Analyse für die Untersuchungen zur Ermittlung der spezifischen negativen äußeren Oberflächenladung und auch in den Sorptionsexperimenten eingesetzt wurde.

4.1.3.2 *Tonfraktionierung*

Die Tonfraktion konnte, wie oben für die Schlufffraktion beschrieben, aus der Feinerde gewonnen werden. Dazu wurden in einem Probeansatz 3 L-Glasflaschen (Rettberg) mit 300 g Feinerde befüllt und mit 2,5 L $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgegossen. Die verschlossenen Gefäße wurden aufgeschüttelt, der Verschluss entfernt und die Ablaufvorrichtung eingesetzt. In Abhängigkeit von der Raumtemperatur konnten nach einer bestimmten Zeit die oberen 10 cm der Dispersion abgehoben werden. Die Sinkgeschwindigkeit wurde nach Stokes berechnet (Tributh & Lagaly, 1986). Acht Abhebeversuche pro Probe wurden durchgeführt, um eine für die anstehenden Versuche als ausreichend erscheinende Tonmenge zu gewinnen.

Der abgehobene Überstand wurde in ein 10 L Auffanggefäß überführt. Nach einer Fällung der Tonteilchen über Nacht mit MgCl_2 (Magnesiumchlorid) konnte der klare Überstand verworfen werden. Zur Entfernung des Chlorids aus der Lösung mussten die Tonfraktionen gewaschen werden. Hierzu wurde der Bodensatz in 1 L-Stahlzentrifugenbehälter überführt, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgefüllt und für 15 min bei 2950 rpm (Sigma Type 5K) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert, das Gefäß wieder mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgefüllt und der Bodensatz resuspendiert. Danach wurde die Leitfähigkeit der Dispersion mit einem Potentiometer (Metrohm AG, Conductometer E382) gemessen und der gesamte Ablauf solange wiederholt, bis die Leitfähigkeit der Dispersion $< 500 - 600 \mu\text{S cm}^{-1}$ war.

Die fraktionierten Tondispersionen wurden in Aluschälchen (Typ 150160 Roth) überführt und fünf Tage gefriergetrocknet (Christ[®] Epsilon 2-40). Später wurden die getrockneten Proben im Achatmörser homogenisiert, in Rollrandgefäße überführt und gewogen.

4.1.4 *Bestimmung ausgewählter Bodeneigenschaften*

Im Folgenden werden einige ausgewählte Untersuchungen von Eigenschaften der Bodenfraktionen dargestellt. Diese Analysen waren notwendig, um später Aussagen über eine mögliche Verlagerung sowie die Festlegungsart und -höhe der drei untersuchten Cry-Proteine treffen zu können.

4.1.4.1 *pH-Werte*

Die Bestimmung der pH-Werte der Böden (verändert nach Schlichting *et al.*, 1995) erfolgte in den unterschiedlichen Parzellen und Tiefen sowie in den verschiedenen Schichten der angelegten

Profilgruben. Dazu wurde jeweils 5 g der getrockneten Feinerde in ein Becherglas eingewogen, der dann 12,5 mL einer 0,01 M CaCl_2 -Lösung zugefügt wurde. Die Bechergläser wurden abgedeckt, um die Verdunstung zu minimieren. Nach einer Mindestdauer von 30 min, die durch 3 - 4 Rührvorgänge mit einem Glasstab unterbrochen wurde, konnten die pH-Werte gemessen werden (Knick Type pH 23).

4.1.4.2 Korngrößenverteilung

Die Korngrößenverteilung wurde an der < 2 mm-Fraktion ermittelt (angelehnt an die Schlämme von Atterberg (1912) und die DIN ISO 11 277 „Bestimmung der Partikelgrößenverteilung“). Hierfür wurden pro getrockneter Bodenprobe je 20 g mit ca. 300 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ in eine geeignete Glasflasche gefüllt. Zur Zerstörung des Humusanteils wurden 20 mL H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) hinzugefügt, die Flaschen umgeschwenkt und für zwei Tage bei 80 °C in einem Trockenschrank (Memmert) gelagert. Bei hohem Humusanteil, also einer stark schäumenden Dispersion, wurden die Proben zuerst für einige Zeit auf einen Schüttler gestellt. Um die Kittsubstanzen zu zerstören wurden 1 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (Natriumdithionit) in 5 mL 1,25 % NaOH (Natriumhydroxid) gelöst und zusammen mit 30 mL 0,3 M $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ (Natriumcitrat) den Gefäßen zugefügt. Im Anschluss wurden die Proben für weitere zwei Tage getrocknet. Danach konnte der Inhalt auf einen Siebturm (Retsch) aufgetragen werden, dessen Ebenen unterschiedliche Maschenweiten hatten (2000 - 630 μm , 630 - 200 μm , 200 - 63 μm , 63 - 36 μm und 36 - 20 μm). Der Siebvorgang wurde unter fließendem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ vorgenommen, wobei zur Unterstützung des Siebvorgangs ein weicher spatenförmiger Gummiwischer (Schütt) eingesetzt wurde. Das Spülwasser wurde aufgefangen und diese < 20 μm Siebfraktion wurde in Glaszylinder überführt und aufgeschüttelt, sodass bei einer Temperatur von 25 °C und einer Fallhöhe von 30 cm die Tonfraktion nach 21 h abgehebert werden konnte. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die Dispersion nahezu klar war. Durch eine Verkürzung der Fallzeit auf 2 h und 10 min konnte anschließend die Mittel- und Feinschlufffraktion erhalten werden. Die in den Sieben zurückgehaltenen Korngrößen wurden separat in Abdampfschälchen aufgefangen, über Nacht bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet und die einzelnen Fraktionen nach dem Wiederabkühlen ausgewogen.

4.1.4.3 Gehalt an organischem Kohlenstoff (C_{org})

Der Gehalt an organischem Kohlenstoff (C_{org}) wurde sowohl für die Feinerde- als auch für die Tonfraktion bestimmt. Die C_{org} -Messung an der Feinerde wurde mit dem VarioMax Elementar durchgeführt. Die Tonproben wurden mit dem Analysator elementar vario EL untersucht. Dazu wurde ein Katalysator (WO_3 , 30 - 100 % des Probengewichts) zur Bindung von Alkali- und

Erdalkaliumionen in Zinkschiffchen eingefüllt, danach die zu untersuchenden Tonproben (ca. 70 mg) eingewogen (Mettler Toledo MX5) und die Zinkschiffchen für die Messung gefaltet.

4.1.4.4 Spezifische negative äußere Oberflächenladung

Um einen Hinweis auf den Einfluss der Ladung der Bodenproben auf die Sorption der Cry-Proteine zu erlangen und zur weiteren Charakterisierung der Bodenproben, wurde die spezifische negative äußere Oberflächenladung an der Schluff- und der Tonfraktion mit einem PCD (particle charge detector) bestimmt. Dazu wurde die Probe (Richtwerte ~ 10 mg für Ton und 100 mg für Schluff) in 10 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (Elga Purelab Flex) suspendiert, in ein Probengefäß (Mütek) überführt und mittels eines kationischen Polyelektrolyten (PolyDADMAC, $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NCl}$, Polydiallyldimethylammoniumchlorid) bis zu einer Spannung von 0 mV titriert. Der PCD (Mütek PCD 02) diente zur Endpunktserkennung bei 0 mV. Die automatische Titrationseinheit (Mettler DL 25) war mit der PolyDADMAC-Vorratsflasche ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) verbunden, die wiederum einen Zugang zum PTFE-(Polytetrafluorethylen, Teflon)-Probengefäß hatte. In diesem Probengefäß sorgte ein sich auf und ab bewegender Kolben dafür, dass sich sowohl Probe als auch das hinzutitrierte anionische Polyelektrolyt gut durchmischten (Mütek, 2011). Das positiv geladene Polymer legte sich auf die negativen Ladungen der Gegenionen der Probe bis die Ladungen ausgeglichen waren. Aus dem Verbrauch des Titrationsmittels und der Proben- einwaage konnte die Oberflächenladung [$\text{mmol}_c \text{ kg}^{-1}$] berechnet werden. Nach Abschluss aller Messungen wurden die Probengefäße mit $\text{NaBr} : \text{H}_2\text{O}_{\text{dest}} : \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (Aceton) (1 : 2,5 : 1) gereinigt.

4.1.4.5 Spezifische äußere Oberflächengröße

In der Literatur (Helassa *et al.*, 2009) ist ein Zusammenhang zwischen der spezifischen äußeren Oberfläche und der Sorption von Cry-Proteinen beschrieben worden. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde die spezifische äußere Oberflächengröße an der Feinerde- und Tonfraktion der Ober- und Unterböden aller Parzellen bestimmt.

Ein weit verbreiteter Begriff für ein Analyseverfahren zur Größenbestimmung von porösen Festkörpern mittels Gasadsorption ist die BET-Messung nach der Methode von *Brunauer-Emmet-Teller* (Brunauer *et al.*, 1938). Bei dieser Methode wird aus den experimentell erhaltenen Daten die spezifische Oberfläche errechnet. Die Probe wurde dazu in ein Glasröhrchen (Quantachrome) eingewogen (Sartorius ME 235 P), über Nacht auf 60°C erwärmt und evakuiert. Zur Untersuchung in dem Nova 4000e Surface Area & Pore Size Analyser (QuantachromeTM NovaWin) wurde Stickstoff über die Proben geleitet. Aus dem N_2 -Verbrauch wurde die Oberfläche [$\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$] berechnet.

4.1.4.6 Vergleich der spezifischen Ladung der Tonfraktionen und der Tonpools

Die spezifische Ladung [$\mu\text{mol}_c \text{ m}^2$] wurde aus den gemessenen Werten für die spezifische negative äußere Oberflächenladung [$\text{mmol}_c \text{ kg}^{-1}$] und für die spezifische äußere Oberflächengröße [$\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$] für die Tonfraktion und für die Tonpools (Poolungsschema siehe Abb. 4.5.5) berechnet und miteinander verglichen.

4.1.4.7 Mineralstickstoffvorrat (N_{\min})

Um das Vorliegen eines möglichen Einflusses des gentechnisch veränderten Mais auf den Streuabbau zu erfassen, wurden die Gehalte an mineralischem Stickstoff (N_{\min}) bestimmt. Vor der ersten Düngung der Saison und damit vor Beginn der Anbauperioden in den Versuchsjahren 2009, 2010 und 2011 wurden dazu Bodenproben aus dem Oberboden (Tiefe: 0 - 20 cm) mit einem Bohrstock entnommen. Pro Parzelle wurden 16 Einstiche vorgenommen, die zu einer Mischprobe vereint wurden. Die Proben wurden in Plastikbeuteln in Kühlboxen mit Kühllakkus in eine Kältekammer (4 °C, 90 - 95 % relative Luftfeuchtigkeit (RH)) transportiert. Die Aufarbeitung erfolgte in folgender Weise:

1. Siebung feldfrischer Bodenproben auf eine Korngröße von $\leq 5 \text{ mm}$ (Prüfsieb 5 mm/5000 μm DIN 4188)
2. Entnahme von je zwei Proben pro Parzelle für die Bestimmung des Trockengewichts bzw. des Feuchtigkeitsgehalt [%] (Sartorius universal); Zurückwiegen nach Trocknung bei 105 °C über Nacht (Memmert Ulm 400) und Exsikkation (Duran[®]) über Nacht (siehe Blume *et al.*, 2011)
3. Extraktion von je 75 g Probe mit 300 mL 0,0125 M CaCl_2 -Lösung ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Fluka) in 500 mL Kunststoffflaschen für 1 h im Überkopfschüttler (75 U min^{-1} Glas Gerätebau, P. Ochs, Laborbedarf Bovenden/Lenglein)
4. Schrittweise Überführung der dispergierten Proben auf Faltenfilter (Schleicher & Schuell 602 EH $\frac{1}{2}$); Auffangen des Filtrats und Einfrieren bei -20 °C
5. Auftauen der Proben über Nacht bzw. im Wasserbad (Memmert)
6. Membranfiltration (0,45 μm , Sartorius Cellulose Nitrate Filter) der Lösungen mit einer Vakuumpumpe (Ilmvac) und Überführung in 80 mL Rotilabo[®]-Probendosen mit Schnappdeckel
7. Bestimmung der NO_3^- - (Nitrat) und NH_4^+ - (Ammonium) Ionen in einem Aliquot des Filtrats mit einem ICS-90 Ionenchromatographiesystem (Dionex)
8. Berechnung des N_{\min} -Gehalts durch Addition der NO_3^- - und NH_4^+ -Gehalte und Bezug auf mg kg^{-1} trockenen Boden

4.2 WURZELEXSUDATION VON PROTEINEN

Die Versuche fanden in einer Klimakammer mit einer Belichtungszeit von 16 Stunden pro Tag und einem Tag-/Nacht-Rhythmus statt (Tag: 8:00 - 24:00, 23 ± 3 °C, 60,9 % RH, Nacht: 0:00 - 8:00, 18 ± 3 °C, 60,1 % RH).

4.2.1 Pflanzenkultivierung im Substrat Nährlösung - Versuch I

In diesem Versuch wurden jeweils sechs Keimlinge der Maissorten Benicia, DKc4250, Dkc5143 und MON89034 x Mon88017 in Paaren in ein mit 500 mL Hoaglandlösung gefülltes Glasgefäß eingesetzt. Die Gläser wurden mit Alufolie eingeschlagen, um sie abzdunkeln und das Wachstum von Algen zu vermeiden. An Tag 14 nach Keimungsbeginn wurde die Hoaglandlösung gegen eine im Department für Nutzpflanzenwissenschaften (GAU Göttingen) erfolgreich verwendete Nährlösung ausgetauscht (Tab. 4.2.1).

Tab. 4.2.1: Zusammensetzung der Nährlösungen.

Mikronährstoffe		Lösung A		Lösung B	
Stoff	Konzentration [μ M]	Stoff	Konzentration [mM]	Stoff	Konzentration [mM]
H ₃ BO ₃	46	Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	2,0	NH ₄ NO ₃	0,25
(NH ₄)Mo ₇ O ₆ x 4H ₂ O	0,5	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	0,25	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,25
Fe(EDTA)	17,9			KCl	1,5
MnCl ₂ x 4H ₂ O	9,1				
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,8				
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,3				

Am nächsten Tag wurde eine Nährlösungsbelüftung für eine verbesserte Sauerstoffversorgung des Wurzelsystems installiert. Erneute Nährlösungswechsel fanden an den Tagen 19 und 22 nach Keimungsbeginn statt. An Tag 26 wurden die sechs Pflanzen einer Sorte in größere Kulturgefäße (12 L Volumen, Innenabmessungen: 30,5 · 28 · 19 cm) umgesetzt. Am 32. Tag nach Keimungsbeginn wurde die Lösung erneut ausgetauscht, um eine gute Nährstoffversorgung für die am darauffolgenden Tag stattfindende Wurzelexsudatgewinnung zu gewährleisten. Die Nährlösung wurde regelmäßig erneuert, sodass an den Tagen 40, 47 und 56 Wurzelexsudate gewonnen werden konnten. An Tag 61 wurden die Pflanzen geerntet.

4.2.2 Pflanzenkultivierung im Substrat Nährlösung - Versuch II

Im zweiten Nährlösungsversuch wurden je sechs Keimlinge der Sorten Benicia, DKc4250, MON89034 x Mon88017 und Dkc5143 fünf Tage nach Aussaat in 12 L fassende Wannen

überführt. Die Nährlösungszusammensetzung und das Belüftungssystem entsprachen denen des ersten Versuchs. Nährlösungswechsel fanden in regelmäßigen Abständen statt, sodass Wurzelexsudate an den Tagen 26, 33 und 40 gewonnen werden konnten.

4.2.3 Wurzelexsudatgewinnung im Substrat Nährlösung in den Versuchen I und II

Für die Gewinnung von Wurzelexsudaten wurden die Wurzeln der Pflanzen mit ihrer Halterung durch mehrfaches Eintauchen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gespült und anschließend in einem über eine Wanne gespannten Autoklavierbeutel (600 · 780 mm, Sarstedt), gefüllt mit 2,5 L $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, überführt. Nachfolgend wurde der Zwischenraum zwischen Beutel und Wanne mit ca. 9,5 L $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ befüllt, bis dieser beim Herabdrücken des Deckels überlief. Der Deckel wurde anschließend beschwert, um ein vollständiges Eintauchen der Wurzeln in die Exsudatsammellösung zu gewährleisten. Während der zweistündigen Exsudatsammelzeit blieb das Belüftungssystem aktiv. Danach wurden die Pflanzen zurück in ihr Wachstumsgefäß gesetzt. Die Exsudatsammellösung wurde in Kunststoffflaschen (LDPE low-density polyethylene) aufgefangen und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Analyse eingefroren.

4.2.4 Pflanzenkultivierung im Substrat Quarzsand

Um das Wurzelwachstum der Maispflanzen in festem Substrat zu simulieren, wurden 1,8 kg mittelkörniger Quarzsand (0,7 - 1,2 mm, Quarzwerke) in kopfüberstehende quadratische Kunststoffflaschen (8,4 · 8,4 cm, PET Polyethylenterephthalat) gefüllt und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ befeuchtet (ca. 500 mL Flasche⁻¹). Zuvor wurde der Sand zur Entfernung von Salzen und anderen Verunreinigungen gewaschen (Wanne: Gripline T.R. Plastics BV Holland, 7602 KG Aimelo) und anschließend in Stahlschalen bei $150\text{ }^\circ\text{C}$ (Heraeus) getrocknet. In den Deckeln der Flaschen befand sich ein Bohrloch (6 mm), welches durch einen Gummistopfen (Naturkautschuk, NR nach DIN 12 871, grau „Labor- und Industriestopfen“) verschließbar war. Zusätzlich war eine Siebfolie in den Deckel eingelegt, um beim Öffnen des Stopfens ein Austreten des Quarzsandes zu verhindern. Die Körner wurden direkt im Quarzsand gekeimt (ein Korn Flasche⁻¹). Nach der Keimung (vier Tage nach Aussaat) wurden die Flaschen zum Schutz vor Algenwachstum mit Alufolie, später (Tag 12) mit Filterpapier (25 · 41 cm, Tork Universal Handtuchpapier, 1-lagig) eingeschlagen und abgedunkelt. Eine Woche nach der Aussaat wurden 200 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aus den Flaschen abgelassen und durch Nährlösung ersetzt (*Tab. 4.2.1*). Hiernach wurde aufgenommene bzw. verdunstete Flüssigkeit nur noch mit Nährlösung wieder aufgefüllt. Nach einer Kulturdauer von 32 Tagen wurden die Wurzelexsudate gewonnen. Dazu wurde die noch vorhandene Nährlösung abgelassen, das System mit 500 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gespült und mit 200 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ für 2 h gesättigt. Nach dieser Zeit wurde die Exsudatsammellösung aufgefangen und in einem

Falconröhrchen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die einzelnen Flaschen wurden im Anschluss wieder mit Nährlösung aufgefüllt. Die 2. und 3. Exsudatgewinnung fand nach einer Kulturdauer von 38 und 40 Tagen statt.



Abb. 4.2.4: *Maispflanzen in den Versuchen mit dem Substrat Nährlösung (linkes und mittleres Bild) und Mais-einzelpflanzen im Substrat Quarzsand (rechtes Bild).*

4.2.5 Test kommerzieller ELISA auf Kreuzreaktionen

Die kommerziell erhältlichen ELISA der Firma Agdia für die Proteine Cry3Bb1, Cry2A und Cry1Ab/1Ac wurden auf Kreuzreaktionen mit dem synthetischen Cry1A.105-Protein untersucht, da sich die Entwicklung eigener Testverfahren (*Kapitel 4.4*) verzögerte. Bei fehlenden Kreuzreaktionen können die getesteten drei ELISA anschließend für den Nachweis der Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 eingesetzt werden.

4.2.6 Cry-Proteinnachweis in Wurzelexsudaten

Die Cry-Proteine in den Wurzelexsudaten wurden per ELISA detektiert und in einem SDS-Gel (Sodiumdodecylsulfat) aufgetrennt. Da in frischen Wurzelexsudat- und Nährlösungsproben keine Cry1A.105-Proteine per ELISA nachgewiesen werden konnten (Ergebnisse nicht dargestellt), wurden die Wurzelexsudate aufkonzentriert. Dazu wurden 4 mL Wurzelexsudate in Falconfilter (Sartorius Stedim Biotech VIVASPIN 4) pipettiert und bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 4418 xg zentrifugiert (Heraeus Cryofuge 5500i Centrifuge Thermo Electron Corporation). Durch dreimalige Wiederholung der Schritte konnten im Schnitt 12 mL Wurzelexsudate auf $200\text{ }\mu\text{L}$ Probe eingengt werden. Zur Bestimmung der Proteinexsudationsmenge [$\text{ng L}^{-1}\text{ h}^{-1}$] wurden ELISA-Systeme gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt (Agdia Inc. Cry1Ab-1Ac, Bt-Cry2A, Bt-Cry3Bb1).

Um die Cry- und andere Proteine in den aufkonzentrierten Wurzelexsudaten sichtbar zu machen, wurden sie über SDS-Gele mit anschließender Silberfärbung der Größe nach aufgetrennt und angefärbt. Für die Gele wurden ein Trenngel und später ein Sammelgel hergestellt

(Zusammensetzung siehe *Tab. 4.2.6*) (BioRad Mini-Protan[®]II). Zuerst wurde das Trenngel pipettiert (Eppendorf Reference[®]) und mit EtOH (Ethanol) überschichtet, um eine gerade Geloberfläche zu erhalten. Nach einer Trocknungszeit von $t \geq 30$ min und anschließender Entfernung des EtOH wurde ein Kamm mit gewünschter Kammerzahl eingesetzt und das Sammelgel hinzupipettiert. Die Gelträger wurden in den Puffertank eingesetzt und dieser mit 1xSDS-Puffer gefüllt. Vor der Beladung der Gelkammern wurden die Proben für eine optimale Auftrennung im Gel verdünnt. Die Proteine Cry1A.105 und Cry3Bb1 wurden 1:25 in PBS und anschließend 4:1 in Roti[®]Load 2 verdünnt. Das Cry2Ab2-Protein wurde hingegen 1:10 in PBS verdünnt, da es in einer geringeren Konzentration vorlag. Die aufkonzentrierten Wurzelexsudate wurden unverdünnt eingesetzt. Die Taschenbelegung erfolgte in der Reihenfolge SDS-Standard (1 μ L) und Proben (Proteine und Wurzelexsudate mit jeweils 16 μ L). Das Gel lief 5 min bei 100 V, 40 min bei 200 V und 5 min bei 100 V.

Tab. 4.2.6: *Zusammensetzung für jeweils zwei Trenn- und Sammelgele (*Serapur Pro 90 CN, **Tris-base 18,165 g 1,5 M, SDS 0,4 g 0,4 %, Temed (Tetramethylethyldiamin) 400 μ l 0,4 %, pro 100ml pH-Wert 8,8, ***Tris-Base 6,055 g 0,5 M, SDS 0,4 g 0,4 %, Temed 400 μ l 0,4 %, pro 100ml pH-Wert 6,8, ****30 % Acrylamid/Bis Solution, 37,5:1 (2,6 %C), Bio-Rad, *****Ammoniumpersulfat).*

Chemikalie	Trenngel (7,5 %) [μ L]	Sammelgel (7,5 %) [μ L]
*H ₂ O _{dest}	4900	2060
**Separating Gel Buffer 4x	2500	-
***Stocking Gel Solution	-	830
****Acrylamid Gel Solution	2500	440
umschwenken		
*****APS (N ₂ H ₈ S ₂ O ₈)	125	30
umschwenken		

Für die Silberfärbung (PlusOne[™]-Pharmacia Biotech) wurden die Gele nach dem Gellauf:

1. in die Fixierungslösung (100 mL EtOH, 25 mL C₂H₄O₂ (Eisessig) add 250 mL H₂O_{dest}) in eine Nalgene[®]-Färbeschale gelegt und 30 min bei RT auf einem Schüttler (GFL 3018) fixiert,
2. 30 min sensibilisiert (75 mL EtOH, 1,25 mL C₅H₈O₂ (Glutardialdehyd, 25 % w/v), 17 g C₂H₃NaO₂ (Natriumacetat), 10 mL Na₂S₂O₃ (Natriumthiosulfat, 5 % w/v), add 250 mL H₂O_{dest}),
3. 3 · 5 min in H₂O_{dest} gewaschen,
4. 20 min in Silberreagenz inkubiert (25 mL AgNO₃-Lösung (Silbernitrat, 2,5 % w/v), 0,1 mL CH₂O (Formaldehyd, 37 % w/v), add 250 mL H₂O_{dest}),
5. 2 · 1 min gewaschen s. o.,

6. für 2 - 5 min entwickelt (6,25 g Na_2CO_3 (Natriumcarbonat), 0,05 mL CH_2O (37 % w/v), add 250 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$),
7. die Reaktion 10 min lang gestoppt (3,65 g $\text{EDTA-Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, add 250 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$),
8. 3 · 5 min gewaschen s. o.,
9. bis zur Trocknung in 75 mL EtOH, 11,5 mL $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ (Glycerin, 87 % w/v), add 250 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufbewahrt.

Die Trocknung erfolgte auf Filterpapier. Zur Konservierung wurden die Gele eingeschweißt.

4.3 REAKTANTEN: BESCHREIBUNG DER PROTEINE CRY1A.105, CRY2AB2 UND CRY3BB1

Um die Hypothese, dass die Sorption von Proteinen durch bestimmte Eigenschaften beeinflusst wird, überprüfen zu können, mussten die drei Cry-Proteine genauer charakterisiert werden.

4.3.1 Cry-Proteinmodelle

Die Charakterisierung der Proteine erfolgte über theoretische Berechnungen ausgewählter, bekannter Eigenschaften an Proteinmodellen mit Computerprogrammen. So sind Berechnungen des Molekulargewichts (M_W), der dreidimensionalen Darstellung – basierend auf verfügbaren proteinkristallographischen Daten – sowie Abschätzungen des Isoelektrischen Punkts (IEP) oder der Hydrophobizität durch diese Programme möglich. Einige Werte waren bereits aus den Petitionen für die Maissorten MON89034 und MON88017 (Monsanto 2004, 2006) bekannt. Basierend auf diesen Werten wurden mit den Computerprogrammen *Protparam*, *Phyre* und *Align Sequences Protein BLAST* weitere Daten berechnet bzw. dreidimensionale Proteinmodelle betrachtet (*Swiss PDB Viewer*).

4.3.2 Aggregationsverhalten

Zusätzlich zu diesen theoretischen, auf Modellen basierenden Berechnungen wurden zur weiteren Charakterisierung der Proteine Tastversuche zum Aggregationsverhalten in höheren Proteinkonzentrationen über Dynamische Lichtstreuung (DLS) (Viscotek 802 DLS) am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie (Göttingen) durchgeführt.

Mit der dynamischen Lichtstreuung können hydrodynamische Radien, Verteilungsbreiten und Aggregationseffekte von Proteinproben bestimmt werden. Die Nachweisgrenze dieser Methode wird erreicht, wenn sich die zu messenden Teilchen in ihrer Molekularbewegung nicht mehr vom Lösungsmittel unterscheiden bzw. wenn die Konzentration der Teilchen zu gering ist. Typischerweise werden 1 mg mL^{-1} des Proteins gelöst. Das an den Proben gestreute Licht eines Lasers wurde ausgewertet und der hydrodynamische Radius R_h der gelösten Probe berechnet.

Die Aggregation der Proteine wurde in verschiedenen Konzentrationen ($\mu\text{g mL}^{-1}$ -Bereich) und in dem Puffer PBST sowie in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ untersucht. Die eingesetzten Konzentrationen lagen um den Faktor 10^3 höher als die in den Sorptionsuntersuchungen verwendeten (*Kapitel 4.5*).

4.4 DER ELISA ALS NACHWEISSYSTEM FÜR PROTEINE

Um die Cry-Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 in einer Probe nachzuweisen, wird häufig auf das System des ELISA zurückgegriffen. Jedoch stehen die für die Durchführung Cry-spezifischer ELISA benötigten Antikörper nur eingeschränkt zur Verfügung. Auch ist nur für das Cry3Bb1-Protein ein kommerzieller spezifischer ELISA verfügbar. Deswegen wurde zum Einen ein Cry1A.105-ELISA mit Antikörpern der Firma Monsanto etabliert und zum Anderen wurden polyklonale Antikörper aus Ziegen und monoklonale Antikörper aus fusionierten Maushybridomazellen für eine kommerzielle Unabhängigkeit erzeugt und in einem Cry2Ab2-ELISA etabliert.

4.4.1 Etablierung Cry1A.105-ELISA

Um die Untersuchungen zur Sorption des Cry1A.105-Proteins an den Partikeln der Korngrößenfraktionen (*Kapitel 4.5*) durchführen zu können, musste ein funktionierendes Nachweisverfahren etabliert werden. Dazu lag das Protokoll der Firma Monsanto vor, welches optimiert wurde.

4.4.2 Entwicklung und Produktion polyklonaler Antikörper gegen die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1

Die Produktion von polyklonalen Antikörpern für jedes der drei Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 wurde in Ziegen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde den Ziegen Blut entnommen. Das daraus gewonnene Blutserum fungierte später als Nullwert bei der Bestimmung des Antikörpertiters. Im zweiten Schritt wurde das Antigen (jeweils ein Cry-Protein) als Emulsion (1:2) mit dem vollständigen Freund-Adjuvans der jeweiligen Ziege subkutan injiziert, was die primäre Immunantwort auslöste. Wurde der Ziege einige Zeit nach der Immunisierung Blut entnommen, konnten im Serum polyklonale Antikörper gemessen und aus diesem aufgereinigt werden. Die Antigeninjektion, jedoch dann mit unvollständigem Freund-Adjuvans, und die Blutabnahme wurden mehrfach wiederholt, um den Titerverlauf zu bestimmen.

4.4.2.1 Titerkontrolle und Kreuzreaktivität

Zur Kontrolle des Cry-Proteintiters der immunisierten Ziegen und möglicher Kreuzreaktionen der polyklonalen Antikörper gegen die anderen Cry-Proteine wurden ELISAs wie folgt durchgeführt:

1. Belegung von Maxisorb F Modulen (Nunc) mit $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ des jeweiligen Cry-Proteins in PBS (pH 7,2) über Nacht,
2. Waschen (Skation Instruments Skan Washer 300) (PBS, 0,05 % Tween20 (Merck)),
3. Blockieren der Module (PBS, 5 % Magermilch, 0,1% Tween20) für 1 h bei RT,
4. Waschen s. o.,
5. Einfrieren der blockierten Platten kopfüber bis zur weiteren Verwendung,
6. Verdünnung des Ziegenserums 1:10 in Puffer (PBS, 1 % Magermilch, 0,05 % Tween20) und Einpipettieren von $100 \mu\text{L}$ pro Vertiefung (Well^{-1}),
7. Inkubation für 1 h 37°C auf einer Wippe (GFL), anschließend waschen s. o.,
8. Verdünnung des Anti-Goat Peroxidase-markierten (A5420) Antikörpers 1:40.000 in Puffer (PBS, 1 % Magermilch, 0,05 % Tween20) und Pipettieren von $100 \mu\text{L}$ Well^{-1} ,
9. siehe 7. Schritt,
10. Inkubation der Module mit TMB (Tetramethylbenzidin)- H_2O_2 -Phosphat-Citratpuffer ($0,05 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$, Zitronensäure, pH 5,0) als Färbereagenz ($100 \mu\text{L}$ Well^{-1}) (Schüttler GFL3018), Stoppen mit $50 \mu\text{L}$ H_2SO_4 Well^{-1} und Messen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ im Photometer.

4.4.3 Entwicklung und Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper gegen die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2

Monoklonale Antikörper werden von einer Zelllinie (Zellklon) produziert, die auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgehen und sich gegen ein einzelnes Epitop richten. Das Prinzip basiert auf der Verschmelzung von antikörperproduzierenden B-Zellen mit Zellen einer Myelomzelllinie (Köhler & Milstein, 1975). Die dabei entstehenden Hybridzellen produzieren unbegrenzt Antikörper einer bestimmten Spezifität (Hybridom-Technik).

4.4.3.1 Immunisierung und Fusion

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 wurde zunächst jeweils einer Maus jeweils ein Antigen als 1:2 Emulsion mit dem vollständigen Freund-Adjuvans injiziert. Bei der darauffolgenden Immunantwort wurden spezifische antikörperproduzierende B-Zellen gebildet (Shepherd & Dean, 2000). Da reife B-Zellen schlecht fusionieren, wurde sogenanntes B-Zell-Vorstufengewebe (z. B. aus der Milz (Shepherd & Dean, 2000)) entnommen.

Alle Arbeiten, abgesehen von den Zentrifugationsschritten, fanden in steriler Umgebung unter Werkbänken statt (Prettl Sicherheitswerkbank Typ MRF 06.12-GS, Biohit). Die verwendeten Lösungen (PBS, PBS+Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin, $10\,000 \text{ u mL}^{-1}$, Biochrom AG), RPMI

(Roswell Park Memorial Institute) ohne FCS (Gibco, foetal bovine serum, invitrogen life technologies), PEG (Polyethylenglycol), R10F) wurden kurz vor Gebrauch im 37 °C Wasserbad (Memmert) erwärmt.

Im ersten Arbeitsschritt wurde die immunisierte BALB/c-Maus per Genickbruch getötet und anschließend retrobulbär Blut entnommen (Reaktionsgefäß 1). Weiterhin wurde das Blut aus der Leber (Reaktionsgefäß 2) und dem Herzen (Reaktionsgefäß 3) gewonnen. Dieses Blut diente zur Überprüfung des Antikörpertiters bzw. als Positivkontrolle in den sich anschließenden ELISA-Tests. Die Maus wurde dann mit EtOH (80 %) abgespült und mit Kanülen auf einer Unterlage fixiert. Die Milz wurde steril und verletzungsfrei entnommen, in eine Petrischale mit PBS+P/S überführt und die Fettgewebereste entfernt. Eine Seite der Milz wurde angeschnitten, die andere mit einer mit PBS+P/S aufgezogenen Spritze angestochen und die Milzzellen ausgespült. Milzzellen und Restmilz wurden durch ein Sieb (BD Biosciences) filtriert, dieses mehrfach gespült und alles in ein Falconröhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet gelockert und in PBS+P/S aufgenommen. Filtration, Spülung und Überführung wurden wiederholt und das Pellet nach erneuter Zentrifugation in Lysereagenz (10:1, 1,1 % NH₄Cl (Ammoniumchlorid): 0,17 M Tris/HCl, pH 7,2) aufgenommen und inkubiert. Danach wurde PBS hinzugegeben und die Zellsuspension filtriert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in RPMI 1640 ohne FCS resuspendiert und die Zellzahl in Türckscher-Lösung (Merck) bestimmt (Einmalzählkammer Biochrom C-Chip). Das Röhrchen mit den Splenozyten wurde in einem Wasserbad bei 37 °C bis zum Schritt der Fusion inkubiert.

Zeitgleich mit den Splenozyten wurden die Thymozyten – dienten als Nahrung für die fusionierten Zellen – und die AG8-Zellen – eine Krebszelllinie – vorbereitet. Zur Thymozytengewinnung wurden Thymi aus jungen Mäusen steril entnommen und in einer Schale mit PBS+P/S gespült. Auch die Thymi wurden durch ein Sieb in eine Petrischale mit PBS+P/S filtriert, die Zellsuspension in ein Falconröhrchen überführt und Schale und Sieb mit PBS+P/S gespült. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in R10F⁻ mit 2-ME (Mercaptoethanol) aufgenommen. Die Zellzählung erfolgt hier in Trypanblau (Neubauer Glaszählkammer). Die Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad bis zur Fusion gelagert.

Die AG8-Zellen wurden zentrifugiert und das Pellet in RPMI ohne FCS gelöst. Es folgte eine zweifache Wiederholung von Zentrifugation und Pelletlösung. Die Zellzahl wurde in Trypanblau bestimmt. Danach wurden die AG8-Zellen bis zur Fusion im Wasserbad bei 37 °C inkubiert.

Für die Fusion wurden AG8- und Milzzellen in einem Verhältnis von 1:2 gemischt, anschließend zentrifugiert und das Pellet gelockert. Ab diesem Zeitpunkt fanden alle Arbeiten im 37 °C

Wasserbad statt. In das Röhrchen wurde eine auf die Splenozytenanzahl bezogene Menge an PEG hinzugegeben und danach RPMI 1640 ohne FCS schrittweise hinzugefügt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde zentrifugiert und das Pellet in R10F⁻-Medium aufgenommen, sodass die Endkonzentration der Splenozyten $2 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ betrug. Anschließend wurden Mikrotiterplatten F96 durchnummeriert und das Selektionsmedium (Tab. 4.4.3.1.) vorbereitet. Die im Medium dispergierten Hybridomazellen wurden mit $200 \mu\text{L Well}^{-1}$ auf die Mikrotiterplatten pipettiert und anschließend bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 (Hereaus Hera Cell 150) gelagert. Da die Hybridomazellen per ELISA gescreent wurden, musste an den Zellen eine Woche nach der Fusion ein Pufferwechsel mit frischem Selektionsmedium (R20F⁺ AH (Azaserin/Hypoxanthin)) durchgeführt werden. Kontaminierte Wells wurden gekennzeichnet und das Medium nicht gewechselt. Die gleiche Prozedur wurde am Folgetag wiederholt.

Tab. 4.4.3.1: Zusammensetzung von Selektions-, R20F⁺- und R10F⁻-Medium (*L-Glutamin 200 mM, **Penicillin/Streptomycin, Biochrom AG, ***recombinant murine interleukin-6, ****Mercaptoethanol, *****Azaserin/Hypoxanthin).

Selektionsmedium Menge [mL]	Stoff	R20F ⁺ -Medium Menge [%]	R10F ⁻ -Medium
780	RPMI	80	90 %
1	2-ME****	0,1	50 μM
200	FCS	20	10 %
10	Glutamin*	1	5 mM
0,25	rmu IL-6****	-	-
20	AH*****	-	-
10	Pen/Strep**	1	-

4.4.3.2 Screening

Etwa zehn Tage nach der Fusion der Hybridomazellen konnten einzelne Klone auf ihre Antikörperproduktion mittels ELISA untersucht werden. Aus den markierten Wells, wobei jedes Well nur Zellen eines Typs (einen Klon) enthalten sollte, wurden $60 \mu\text{L}$ Zellkulturüberstand in eine neue 96F-Zellkulturplatte einpipettiert. Damit alle zu testenden Klone möglichst gleichzeitig in die Inkubationszeit starteten, wurde von dieser Platte mit einer 8-Kanalpipette je $50 \mu\text{L Well}^{-1}$ auf eine mit dem Zielprotein (Cry1A.105 bzw. Cry2Ab2) beschichtete Platte (Nunc Maxisorp F-Boden) überführt. Die Originalwells wurden mit $50 \mu\text{L}$ neuer Nährlösung (R20F⁺, 50 u IL-6) versorgt. Die ELISA-Platte wurde nach Ende der Inkubationszeit im Plattenwascher (Skation Instruments Skan Washer 300) gewaschen (PBS, pH 7,2, 0,05 % Tween20) und anschließend ein enzymgekoppelter Antikörper hinzugegeben ($50 \mu\text{L Well}^{-1}$, Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson Immuno Research 115-035-164) (1:5000 in PBS, pH 7,2, 1 % Magermilch,

0,1 % Tween20)). Nach einer Inkubationszeit von 30 min und einem zweiten Waschschrift wurden 100 μL Well⁻¹ Substrat (TMB, Sigma) (1 Tablette in 10 mL Phosphat-Citrat-Puffer gelöst, mit 2 μL H₂O₂ aktiviert) hinzugefügt. Die Inkubationszeit von 10 min erfolgte lichtgeschützt und die Extinktion wurde anschließend bei $\lambda = 655$ nm mittels Photometer (Molecular Devices Spectra max Plus 384) gemessen. Klone mit positiven Signalen wurden in der Folgewoche erneut untersucht und bei erneut positivem Ergebnis in der Subklonierung eingesetzt.

4.4.3.3 Subklonierung

Zu Beginn der Subklonierung wurde die Zahl (C-Chip Neubauer Improved DHC-N 01 peqlab) der Klone mit Trypanblau (0,5 % (w/v) 1:2-Verdünnung, Biochrom AG) bestimmt. Es wurden 5400 Zellen in der Subklonierung eingesetzt. Pro Klon wurden fünf 50 mL Falconröhrchen mit R20F⁺-Medium vorbereitet, wobei in das erste 18 mL und in alle folgenden 12 mL eingefüllt wurden. In Röhrchen Nr. 1 wurde dann das Volumen, das 5400 Zellen entsprach, einpipettiert und das Röhrchen durchmischt. Aus diesem wurden 6 mL in das nächste Röhrchen übertragen usw., sodass eine 1:3-Verdünnungsreihe entstand. Der Inhalt eines jeden Röhrchens wurde auf eine Mikrotiterplatte (NunclonTM Δ Surface nuncTM) mit 96 Wells übertragen (100 μL Well⁻¹), sodass sich für die einzelnen Platten theoretische Zellzahlen Well⁻¹ ergaben (Nr. 1: 30 Zellen, Nr. 2: 10 Zellen, Nr. 3: 3 Zellen, Nr. 4: 1 Zelle, Nr. 5: 0,3 Zellen). Die abgedeckten Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert.

Nach einer Woche wurden die Subklone mit 100 μL Well⁻¹ R20F⁺ 50 u IL-6 versorgt. Zu diesem Zeitpunkt konnte mit der Suche nach Einzelkolonien begonnen und der Zellüberstand per ELISA (Durchführung analog zu *Kapitel 4.4.3.2*) getestet werden. Als Positivkontrolle wurden 1:1000-Verdünnungen des Herz-, Leber- oder Augenblutes aus der Fusion (*Kapitel 4.4.3.1*) verwendet. War das Ergebnis auch in der zweiten Woche positiv, wurden die Subklone auf größere 48-Wellplatten (Cell Culture Cluster 3548 Corning Incorporated Costar®) in 1 mL R20F⁺ 50 u IL-6 übertragen.

Nach einem positiven ELISA-Ergebnis in der Folgewoche wurden die Subklone aus den 48-Wellplatten in Fläschchen (Tissue Culture Flask 25 cm³, Sarstedt) mit 6 mL Medium überführt. Für die durchzuführenden ELISA-Tests wurde 1 mL der Zellkulturen in Reagiergefäße pipettiert, diese abzentrifugiert (Lab Scientific Sprout Micro-Centrifuge) und die Überstände im Test eingesetzt. War ein Klon positiv, konnte er schrittweise vom Wachstumsfaktor IL-6 entwöhnt werden. Dieser Wachstumsfaktor wurde anfänglich mit einer Konzentration von 50 u (u = units, Einheiten) eingesetzt (1:10.000-Verdünnung in R20F⁺). Bei

guten ELISA-Resultaten sah die Konzentrationserniedrigung folgende Schritte vor: 50 u, 37,5 u, 25 u, 12,5 u, 6,25 u, 3 u, 1,5 u und 0 u IL-6. Produzierten die Klone auch ohne Wachstumsfaktor noch Antikörper, konnten 2 - 3 Tropfen in größere Flaschen (Sarstedt) mit 50 mL R20F⁺ überführt werden. Nach zweiwöchigem Wachstum und Sterilitätskontrolle (*Kapitel 4.4.3.5*) wurden Rückstellproben (*Kapitel 4.4.3.4*) angelegt und das restliche Medium in einen 50 mL Falcon umgefüllt und für 10 min bei 4137 xg zentrifugiert (Thermo Scientific Universal 30RF). Der Überstand wurde vorsichtig in neue Röhrchen überführt. Die Falconröhrchen konnten hinterher mit angedrehtem Deckel bei -20°C eingefroren werden.

4.4.3.4 Rückstellproben

Zu Beginn der Subklonierung und zu anderen Zeitpunkten der weiteren Selektion wurden Rückstellproben der Subklone angelegt. Dazu wurden 100 µL Zellkulturüberstand in Schraubdeckelröhrchen (Cryovial® T310-2A Simport) pipettiert, die 800 µL R20F⁺ sowie die gerade eingesetzten Units des Wachstumsfaktors IL-6, 720 µL FCS und 180 µL DMSO (Dimethylsulfoxid Sigma D-8779) enthielten. Pro Klon wurden mehrere Röhrchen angelegt und in N₂(l) eingefroren (MG Messer Griesheim Chronos-Biosafe).

4.4.3.5 Sterilitätskontrolle

Sobald die Subklone in den 50 mL Fläschchen eine Woche gewachsen waren, wurde ihre Sterilität kontrolliert. Dazu wurden Tropfen (100 µL) der Zellkultur auf SAB- (Sabouraud-Dextrose) und DST-Agar (Diagnostic Sensitivity Test) ausgestrichen, auf denen bei einer Kontamination des Mediums Hefen und Pilze gewachsen wären. SAB-Platten wurden bei 30 °C, DST-Platten bei 37 °C über zwei Tage inkubiert.

4.4.3.6 Test der Kulturüberstände der monoklonalen Antikörper gegen das Cry1A.105-Protein auf Kreuzreaktionen

Für den Test auf Kreuzreaktivität wurden Strips von Mikrotiterplatten (Nunc Maxisorb) verwendet, welche mit jeweils einem der vier Proteine oder BSA (0,5 µg mL⁻¹, 50 µL Well⁻¹) beschichtet waren. Die Platten lagerten dann über Nacht bei 4 °C und wurden anschließend gewaschen (PBS, 0,05 % Tween20). Danach erfolgten die Blockierung (PBS, 2 % Magermilch, 0,1 % Tween20) mit 200 µL Well⁻¹ für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler (GFL 3018) und ein abschließender Waschschriff. Für den Test wurden 50 µL Well⁻¹ der Kulturüberstände, der Negativ- und der Positivkontrolle einpipettiert. Der Testablauf folgte dem in *Kapitel 4.4.3.2* vorgestelltem. Jedoch wurde der Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG

hier nur mit 0,05 % Tween20 versetzt und die Farbreaktion wurde gestoppt (50 μL Well⁻¹ 25%iger H_2SO_4) und bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ gemessen.

4.4.3.7 *Test der Kulturüberstände der monoklonalen Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein auf Kreuzreaktionen*

Für den Test wurden Strips von Mikrotiterplatten (Nunc Maxisorb) verwendet, die mit jeweils einem der Proteinen Cry1A.105, Cry1Ab, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) oder einem der Medienbestandteile FCS (20 % in PBS), R20F⁺, IL-6 (50 u in PBS) und PBS beschichtet wurden. Pro Well wurden 50 μL der unterschiedlichen Substanzen eingesetzt. Das Beschichten erfolgte wie in *Kapitel 4.4.3.6* dargestellt. Für den Test wurde die benötigte Anzahl an Strips in Rahmen gesteckt und 50 μL Well⁻¹ der Kulturüberstände, der Negativ- und der Positivkontrolle einpipettiert. Der Testablauf folgte dann dem in *Kapitel 4.4.3.2* vorgestellten.

4.4.3.8 *Ig-Untergruppenbestimmung der monoklonalen Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein*

Für die Antikörperuntergruppenbestimmung wurden von den Subtypen der fünf Klone, die für das Cry2Ab2-Protein entwickelt worden waren, jeweils der Klon mit der höchsten Antikörperproduktion (Maß hier: Extinktion bei $\lambda = 655 \text{ nm}$) ausgewählt und im Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche) eingesetzt. Dazu wurde der Kulturüberstand zwischen 1:10 und 1:1000 verdünnt (PBS, 1 % BSA, pH 7,2) und 150 μL in die mitgelieferten Röhren pipettiert. Die visuelle Auswertung erfolgte nach 10 min Inkubationszeit.

4.4.3.9 *Reinigung und Pufferaustausch monoklonaler Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein*

Die Reinigung von Antikörpern kann mittels Affinitätschromatographie über das Protein G erfolgen. Dabei bindet das Protein G bei pH 7 Antikörper vom Typ IgG₁ stark. Um sie zu eluieren, muss der pH-Wert auf 2,5 - 3,0 abgesenkt werden. Hier wurde für die Affinitätschromatographie die Säule HiTrap Protein G HP (Amersham Biosciences) mit einem Volumen von 1 mL, einer Partikelgröße von 34 μm und einem Agarosegehalt von 6 % bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1} eingesetzt. Die Reinigung erfolgte nach der Vorbereitung und Filtration (0,2 μm , Sartorius, Spritzen: BD) der Puffer wie folgt:

1. Equilibrieren der Säule mit fünf Säulenvolumen Bindungspuffer (0,02 M Na_3PO_4 (Natriumphosphat), pH 7,0),
2. Auftragen der Probe (hier etwa 12 mL),

3. Waschen mit 5 - 10 Säulenvolumen Bindungspuffer, um Verunreinigungen und ungebundenes Material zu entfernen,
4. Eluieren mit fünf Säulenvolumen Elutionspuffer (0,1 M $\text{NH}_6\text{C}_2\text{O}_2\text{Cl}$ (Glyin-HCl, pH 2,7), Auffangen des Eluats in 1,5 mL Reagiergefäßen; Neutralisation von zuerst 0,8 mL, dann je 1 mL des Eluats mit Neutralisationspuffer (1 M $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$ (Tris-HCl, pH 9,0) bis pH = 7 (Test über pH-Papier, Macherey-Nagel),
5. sofortiges Reequilibrieren der Säule mit 5 - 10 Säulenvolumen Bindungspuffer, ggf. sind die Schritte 1 - 5 zu wiederholen.

Nach Abschluss der Arbeiten wurde die Säule mit 5 - 10 Säulenvolumen 20 % EtOH (gasfrei) gespült. Am NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (peqlab Biotechnologie GmbH) wurden die Proteinkonzentrationen (Absorption bei $\lambda = 280$ nm) in den Reagiergefäßen gemessen. Gefäße mit den höchsten Konzentrationen wurden später gepoolt (maximales Volumen: 2,5 mL).

Beim nachfolgenden Pufferaustausch wurden die monoklonalen Antikörper in PBS (pH 7,2) überführt. Dazu wurden PD-10 Desalting Columns (GE Healthcare) eingesetzt. Der Pufferaustausch erfolgte folgendermaßen:

1. die Säule mit Zielpuffer viermal spülen (ca. 25 mL) und zwischendurch trocken laufen lassen; bis zum Gebrauch mit Puffer überschichten und verschließen,
2. den Puffer austropfen lassen und danach 2,5 mL Antikörpermischung aus den gepoolten Reagiergefäßen auftragen; den Überstand verwerfen,
3. 3,5 mL Zielpuffer auftragen und das Eluat (etwa 3,5 mL) in Falconröhrchen (15 mL) auffangen.

Danach erfolgte eine Dreifachbestimmung der Antikörperkonzentration im NanoDrop (Thermo Scientific); der Puffer PBS funktionierte als Blank. Die umgepufferten Antikörper konnten anschließend aliquotiert (0,5 mL) und bei -20°C eingefroren werden.

4.4.3.10 *Biotinylierung der mono- und polyklonalen Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein*

Biotin bindet kovalent an primäre Amine (Lysin) des Immunoglobulins. Da die Biotinylierungsreaktion im Alkalischen abläuft, mussten die monoklonalen Antikörper 102-3, 814-4, 904-5 und der polyklonale Antikörper 6314 gegen das Cry2Ab2-Protein in einen Carbonatpuffer (0,1 M NaHCO_3 , pH 8,65) umgepuffert werden. Dies wurde analog zum beschriebenen Vorgang im vorausgegangenen *Kapitel 4.4.3.9* durchgeführt. Die monoklonalen Antikörper waren im Vorfeld Protein-G-gereinigt und in PBS (pH 7,2) umgepuffert, der polyklonale Antikörper nur

umgepuffert worden (*Kapitel 4.4.3.9*). Die Bestimmung des notwendigen Biotins für die Biotinylierungsreaktion erfolgt nach *Abbildung 4.4.3.10*.

$$m(\text{Biotin}) = m_{\Sigma}(\text{Ak}) \times \text{Biotinylierungsgrad} \times \frac{M(\text{Biotin})}{M(\text{Ak})}$$

Abb. 4.4.3.10: Berechnung des für die Biotinylierungsreaktion notwendigen Biotins über die verwendete Antikörpermenge $m_{\Sigma}(\text{Ak}) = [\text{mg}]$, den Biotinylierungsgrad [%] und die Molekulargewichte der Antikörper $M(\text{Ak}) = 150.000 \text{ g mol}^{-1}$ und des Biotins $M(\text{Biotin}) = 454,5402 \text{ g mol}^{-1}$.

Zur Herstellung der Biotinstammlösung wurde 1,97 mg Biotin in 1 mL wasserfreiem DMSO gelöst und anschließend in einem Verhältnis von 80 µg Biotin pro mg Antikörper hinzugegeben und sofort vermischt. Das Reaktionsgefäß wurde in Alufolie eingeschlagen und lichtgeschützt bei RT für 4 h inkubiert. Danach wurde das Biotin, welches nicht gebunden wurde durch einen Pufferaustausch in PBS (pH 7,2) (analog zu *Kapitel 4.4.3.9*) entfernt und die biotinylierten Antikörper bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

4.4.4 Etablierung Cry2Ab2-ELISA

Mit den entwickelten und produzierten poly- und monoklonalen Antikörpern gegen das Cry2Ab2-Protein wurde als Proteinnachweissystem ein ELISA etabliert. Dazu wurden Aliquots der spezifisch mit dem Cry2Ab2-Protein reagierenden monoklonalen Antikörper 102-3, 814-4, 904-5 und der polyklonale Antikörper 6314 biotinyliert (*Kapitel 4.4.3.10*). Nach der Biotinylierung wurden sie in dem Protokoll, welches für das Cry1A.105-Protein (*Kapitel 4.4.1*) etabliert worden war, eingesetzt und das Protokoll angepasst. Als Fangantikörper wurden die Antikörper 102-3, 814-4, 904-5, 6314 (alle unbiotinyliert) und als Kontrolle ein Blockierungspuffer verwendet. Als Antigene wurden die Toxine Cry1Ab, Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 genutzt und als Detektionsantikörper kamen alle biotinylierten Antikörper zum Einsatz. Die mit diesen Bausteinen möglichen 105 Versuchsaufbauten wurden getestet.

Im nächsten Schritt wurden unterschiedliche Antikörperkonzentrationen gegen eine Kalibriergerade getestet, um herauszufinden, welche Kombination die niedrigste Nachweisgrenze lieferte. Die Bestimmung des Cut-Off-Wertes erfolgte in siebenfacher Wiederholung bei 12 Konzentrationsschritten (1:2-Verdünnung, 50 - 0,024 ng mL⁻¹). Der Cut-Off wurde als Mittelwert der Negativkontrolle (in diesem Fall der Blockierungspuffer (n = 10)) plus der dreifachen Standardabweichung berechnet. Dieser Wert stellte die Grenze dar, nach der ein Ergebnis als positiv oder negativ zu betrachten war.

4.5 SORPTION DER PROTEINE CRY1A.105, CRY2AB2 UND CRY3BB1

Um verallgemeinernde Aussagen über die Sorption von Proteinen im Boden treffen zu können, wurde die Sorption der Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 an den Korngrößenfraktionen der Böden der Freisetzungsfäche erfasst. Aus der Literatur ist bekannt (z. B. Pagel-Wieder *et al.*, 2004), dass die Sorption von Cry-Proteinen im niedrigen Konzentrationsbereich mit einer linearen Isothermen beschrieben werden kann. In den durchgeführten Experimenten wurde geklärt, ob dieser Isothermentyp für die Sorption der Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 ebenfalls gültig ist.

Als Sorbenten für die Messungen der Sorptions- und Austauschisothermen dienten die Partikel der Korngrößenfraktionen. Es war erforderlich die Messungen an die geringe Tonausbeute anzupassen (*Kapitel 5.1.2*). Aufgrund der zu erwartenden geringen Sorptionsraten an der Feinerde- und Schlufffraktion wurde auf die Messung von Sorptionsisothermen verzichtet. Stattdessen wurde der Verteilungskoeffizient (k) mit Hilfe von Verteilungsmessungen bei einer einzigen Gleichgewichtskonzentration ermittelt.

4.5.1 *Probenvorbereitung*

Zur Keimreduktion der hitzeempfindlichen Feinerde-, Schluff- und Tonproben wurde das Tyndallisierungsverfahren (nach J. Tyndall) eingesetzt. Dieses beruht auf einer fraktionierten, diskontinuierlichen Sterilisation des Materials (umsl.edu/~microbes/pdf/tyndallization.pdf, 2012/05/03):

1. Einwaage von Ton/Schluff/Feinerde in Glasröhrchen, Versetzen mit H_2O_{dest} in einem Verhältnis von 1:10 (Ton und Schluff) bzw. 1:4 (Feinerde),
2. Verschluss des Röhrchens, Vortexen (Heidolph reax top) und Kochen für 20 min bei 100 °C im Wasserbad (Memmert),
3. Inkubation > 12 h bei 37 °C zur Auskeimung der stationären Sporen zu vegetativen Zellen,
4. zweiter Kochvorgang zur Abtötung der vegetativen Zellen nach erneuter Dispergierung,
5. zweite Inkubation s. o. und dritter Kochvorgang,
6. Lagern der durch die Tyndallisierung keimreduzierten Probe bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung im Sorptionsversuch.

4.5.2 *Anpassung der molaren Konzentrationen*

In den nachfolgend dargestellten Untersuchungen zur Sorption und zur Konkurrenz wurden die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 in den gleichen molaren Konzentrationen

eingesetzt, sodass die tatsächlich eingesetzten Molekülanzahlen miteinander verglichen werden konnten. Dafür wurde zuerst die molare Konzentration der einzelnen Proteine in den angelieferten Materialien bestimmt und schließlich die in den Versuchen notwendigen einzusetzenden Mengen berechnet.

4.5.3 Sorption an der Feinerdefraktion

Die Verteilungskoeffizienten (k) wurden am Oberboden der Feinerdefraktion für das Cry3Bb1-Protein bei einer Konzentration von $14,36 \text{ ng mL}^{-1}$ aufgenommen. Die Vorgehensweise orientierte sich grob an den Ablaufprotokollen der ELISA-plattenliefernden Firma Agdia:

1. Vorlegen des $\text{H}_2\text{O}_{\text{steril}}$ für die Sorptionspunkte und die Kalibrationsreihe in 1,5 mL Reaktionsgefäßen,
2. Hinzugabe der tyndallisierten Feinerde (50 mg in 200 μL),
3. Verdünnung des Cry3Bb1-Proteins auf $20,52 \text{ ng mL}^{-1}$ (Zugabelösung) und Zugabe von jeweils 700 μL zu den Sorptionspunkt-Reaktionsgefäßen,
4. Vortexen (Heidolph reax top) der Sorptionspunkt-Reaktionsgefäße und Inkubation für 30 min im Überkopfschüttler (Stufe 2 - 3),
5. Erwärmung der ELISA-Platte bei RT von $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf RT,
6. Vorlegen des PBST-Puffer in 1,5 mL Reaktionsgefäßen für die Verdünnungsreihen,
7. Zentrifugation der Sorptionspunkt-Reaktionsgefäße (5 min, $37\,230 \text{ xg}$, Thermo Scientific Universal 30RF Hettich),
8. Hinzufügen der Zugabelösung ($20,52 \text{ ng mL}^{-1}$) zur Kalibrationsreihe (100 - 700 μL),
9. Verdünnung im vorgelegten PBST-Puffer,
10. Pipettieren des Enzymkonjugats (100 $\mu\text{L Well}^{-1}$),
11. Einpipettieren der verdünnten Kalibrations- und Sorptionsreihe in dreifacher Wiederholung (100 $\mu\text{L Well}^{-1}$) und Durchmischung des Platteninhalts (Heidolph),
12. Inkubation für 120 min bei RT oder bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht,
13. Waschen der Platte (siehe *Kapitel 4.4.2.1*); Hinzugabe des TMB-Substrats (100 $\mu\text{L Well}^{-1}$) und lichtgeschützte Inkubation von ca. 15 min auf einem Schüttler,
14. Messen der optischen Dichte (OD) bei $\lambda = 650 \text{ nm}$ im Photometer,
15. Stoppen der Farbreaktion (50 $\mu\text{L Well}^{-1}$, 25% H_2SO_4) und Messen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$.

Die durch die Messung erhaltenen Werte für die Sorptionspunkte konnten in die Gleichung für lineare Isothermen (*Abb. 4.5.3*) eingesetzt werden.

Daraus ergaben sich die Verteilungskoeffizienten k . Diese entsprechen der Steigung der Ausgleichsgeraden durch die einzelnen Sorptionspunkte und sind ein Maß für die Verteilung der Proteine zwischen der Oberfläche der Bodenprobe und der Lösung.

$$X_S = k \times X_L$$

Abb. 4.5.3: Gleichung für die lineare Isotherme (X_S = Menge des im Gleichgewichts sorbierten Stoffes, k = Verteilungskoeffizient, X_L = Menge des Stoffes in der Gleichgewichtslösung)

4.5.4 Sorption an der Schlufffraktion

An der Schlufffraktion wurden die Verteilungskoeffizienten (k) für die Ober- und Unterböden am Cry3Bb1-Protein mit einer Konzentration von $14,36 \text{ ng mL}^{-1}$ und am Cry1A.105-Protein mit einer Konzentration von $101,03 \text{ ng mL}^{-1}$ aufgenommen. Für die einzelnen Sorptionspunkte wurden jeweils 20 mg Schluff eingesetzt. Die Durchführung war analog zur der des vorausgegangenen Kapitels 4.5.3.

4.5.5 Sorption an der Tonfraktion

Für die Messung der Verteilungskoeffizienten (k) an der Tonfraktion wurden, wie in Abb. 4.5.5 dargestellt, die Proben nach Ober- und Unterboden getrennt in drei Gruppen (im Folgenden Tonpools) aufgeteilt.

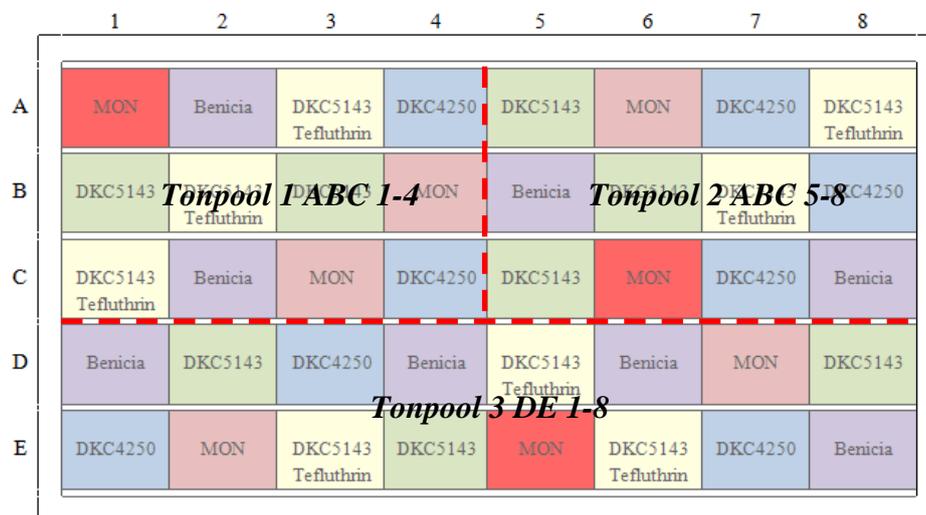


Abb.4.5.5: Versuchsfeld mit eingezeichnetem Poolungsschema (Tonpool 1 Parzellen ABC 1-4, Tonpool 2 Parzellen ABC 5-8, Tonpool 3 Parzellen DE 1-8).

Die Aufteilung richtete sich nach der bodenkundlichen Ansprache (Kapitel 5.1.1) und war aufgrund der sehr niedrigen Tongehalte im Boden und den daraus folgenden niedrigen Mengen bei der Tonfraktionierung (Kapitel 5.1.2) erforderlich. Für die einzelnen Sorptionspunkte wurden jeweils 10 mg Ton eingesetzt. Die Durchführung war analog zur der des Kapitels 4.5.3.

4.5.5.1 Einfluss von DTT auf die Sorption

Die in den Sorptionsuntersuchungen eingesetzten Cry-Proteine wurden in unterschiedlichen Puffern (Tab. 4.5.5.1) angeliefert. Da es bei den Sorptionsuntersuchungen starke Unterschiede nicht nur unter den Proteinen, sondern auch unter den Fraktionen gab (Kapitel 5.5.1 bis 5.5.3), wurde vermutet, dass die Pufferzusammensetzung einen Einfluss haben könnte. Um dies zu Überprüfen, wurde das Cry3Bb1-Protein in seiner Zugabelösung mit der DTT-Konzentration versetzt, die derjenigen in der Zugabelösung des Cry2Ab2-Proteins entsprach, in diesem Fall 0,001 mM DTT (Dithiothreitol). Exemplarisch wurde die Unterbodenprobe des Tonpools 1 untersucht. Die Durchführung war analog zur der des Kapitels 4.5.3.

Tab. 4.5.5.1: Pufferzusammensetzung der gelieferten Cry-Proteine.

Cry1A.105	Cry2Ab2	Cry3Bb1
25 mM CAPS*, pH ~10,3	50 mM CAPS, pH 11	50 mM Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃
1 mM Benzimidin-HCl	2 mM DTT	1mM EDTA
0,1 mM EDTA**		pH 10,1
0,2 mM DTT***		

*CAPS: *N-Cyclohexyl-3-Aminopropansulfonsäure*, **EDTA: *Ehtylendiamintetraessigsäure*, ***DTT: *Dithiothreitol*

4.5.5.2 Überprüfung der pH-Werte in den Sorptionsmessungen

Zur Klärung der Frage, ob die unterschiedlichen Cry-Proteine einen Einfluss auf die pH-Werte in den Lösungen des Sorptionsversuches haben, wurden pH-Wertmessungen (knick Portamess[®], Elektrode: Mettler Toledo InLab[®] micro) für das Cry3Bb1-Protein an 24 Proben (entsprach drei Sorptionsisothermen):

1. in der Proteinlösung,
2. nach der Zugabe der Proteinlösung zu der Tonfraktion und
3. nach 30 min im Überkopfschüttler durchgeführt.

Für das Cry2Ab2- und das Cry1A.105-Protein wurden die pH-Werte danach exemplarisch:

1. in der Zugabelösung und in jeweils einer Probe (200 µL H₂O_{steril} + 100 µL Tondispersion + 700 µL Proteinlösung),
2. nach der Zugabe der Zugabelösung zu der Tonfraktion und
3. nach 30 min im Überkopfschüttler gemessen.

Die Durchführung war analog zur der des Kapitels 4.5.3.

4.5.6 Konkurrenzuntersuchungen an der Tonfraktion

Die Maishybride MON89034 x MON88017 exprimiert die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1. Daher wurde mit Hilfe von Konkurrenzisothermen, bei denen zwei Proteine simultan eingesetzt wurden, geklärt, ob eine Rivalität um Bindungsplätze im Boden besteht. Dazu wurden die Konkurrenz der Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 (Begründung siehe *Kapitel 6.5.3*) an einem Lagerstättenton (Montmorillonit) und am Tonpool 2 (jeweils für den Ober- und den Unterboden) in den Untersuchungen betrachtet. Die Proteinkonzentrationen entsprachen denen in den Sorptionsuntersuchungen eingesetzten. An den unterschiedlichen Proben wurden drei Versuchsvarianten durchgeführt (*Tab. 4.5.6*). Die Varianten 1 und 3 wurden in einem Cry1A.105-ELISA, die Varianten 2 und 3 in einem Cry2Ab2-ELISA untersucht.

Tab. 4.5.6: Die drei Varianten der Konkurrenzuntersuchungen.

Variante	Cry1A.105-Konzentration	Cry2Ab2-Konzentration
1	0 ng mL ⁻¹ bis 101,03 ng mL ⁻¹	-
2	-	0 ng mL ⁻¹ bis 140 ng mL ⁻¹
3	0 ng mL ⁻¹ bis 101,03 ng mL ⁻¹	140 ng mL ⁻¹

4.5.8 Zusammenhang zwischen der Sorption der Cry-Proteine und den Parametern der Tonfraktion

Um das Sorptionsverhalten der drei Cry-Proteine an den Tonpools des Ober- und Unterbodens näher erfassen zu können, wurden die Verteilungskoeffizienten k mit einigen bodenkundlichen und oberflächenchemischen Kenngrößen der Proben über lineare Korrelationen in Beziehung gebracht.

5 ERGEBNISSE

Die meisten der nachfolgend dreidimensional dargestellten Grafiken orientieren sich in ihrem Aufbau am Feldlageplan (*Abb. 4.1.1*). So befinden sich auf der Abszisse die Parzellenreihen A bis E, auf der Ordinate die Parzellenspalten 1 bis 8 und auf der Applikate die jeweils erreichten Werte.

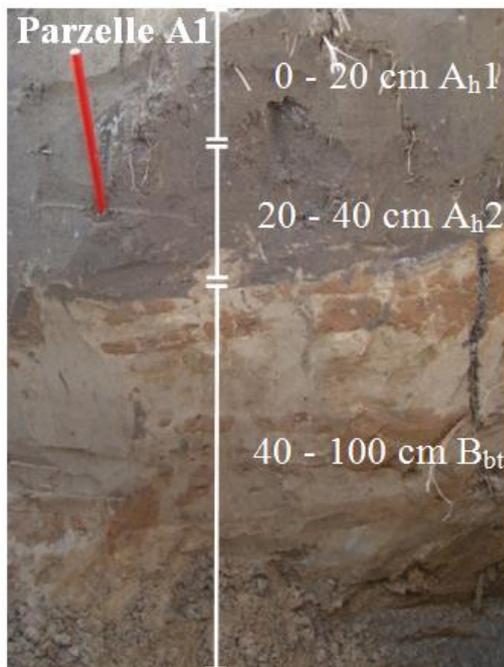
5.1 CHARAKTERISIERUNG DES REAKTANTEN BODEN

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur kleinräumigen Standortcharakterisierung dargestellt. Dazu gehören sowohl die Partikel der Korngrößenfraktionen als auch die Bestimmung ausgewählter Bodeneigenschaften.

5.1.1 Der Bodentyp

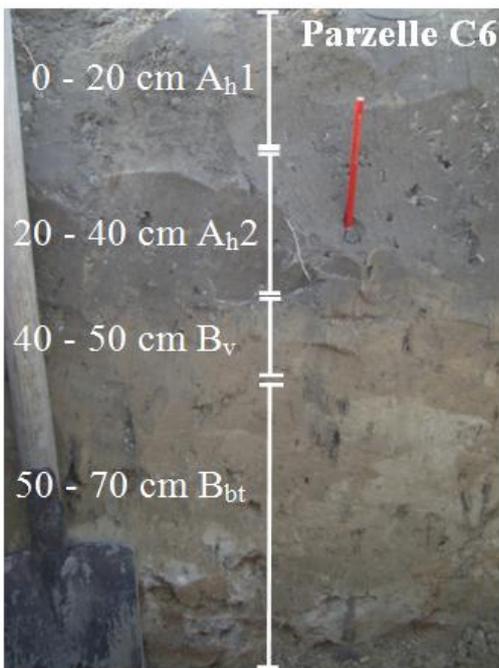
Zur Bestimmung des auf dem Versuchsfeld vorliegenden Bodentyps wurden drei Bodenprofile angelegt (*Tabellen 5.1.1abc*).

Tab. 5.1.1a: Profilbeschreibung der Parzelle A1 (Länge des roten Stifts: 20 cm).



Parzelle A1		
Tiefe [cm]	Horizont	Beschreibung
0 – 20	A _{h1}	dunkelbraun gefärbter Pflughorizont
20 – 40	A _{h2}	Oberbodenhorizont
40 – 100	B _{bt}	Bänderparabraunerde, durchzogen mit hellbraunen 5 - 8 cm dicken Tonbändern, mittel- bis grobsandig

Die Untersuchung der drei Bodenprofile bestätigte die Vermutung, dass es sich bei dem auf dem Versuchsfeld vorliegenden Boden um eine Bänderparabraunerde handelte (hier geht ein großer Dank an Herrn Dr. Christian Ahl, Abteilung Agrarpädologie, GAU Göttingen), die aus Lösssand über glazifluviatilen Sanden entstanden ist.

Tab. 5.1.1b: Profilbeschreibung der Parzelle C6 (Länge des roten Stifts: 20 cm).

Parzelle C6		
Tiefe [cm]	Horizont	Beschreibung
0 – 20	A _{h1}	dunkelbraun gefärbter Pflughorizont
20 – 40	A _{h2}	Oberbodenhorizont
40 – 50	B _v	dunkel- bis hellbraun
50 – 70	B _{bt}	Bänderparabraunerde, durchzogen mit 4 - 6 cm dicken Tonbändern, feinere, schluffig bis feinsandige Struktur

Tab. 5.1.1c: Profilbeschreibung der Parzelle E5 (Länge des roten Stifts: 20 cm).

Parzelle E5		
Tiefe [cm]	Horizont	Beschreibung
0 – 20	A _{h1}	dunkelbraun gefärbter Pflughorizont
20 – 40	A _{h2}	Oberbodenhorizont
40 – 80	B _{bt}	Bänderparabraunerde, durchsetzt mit steinig, kiesigem Grobsandmaterial, Tonbänder von 2 - 4 cm Dicke
> 80	B _v	Materialwechsel zu einer 30 - 40 cm starken Steinsohle

5.1.2 Tonausbeute

Als Grundlage für die vorgesehenen Sorptions- und Konkurrenzuntersuchungen diente die Tonfraktion, die aus der Feinerde gewonnen wurde. Die mittlere Tonmenge der Parzellen lag im Oberboden um $0,8 \pm 0,1$ g und im Unterboden mehr als doppelt so hoch um $1,8 \pm 0,9$ g. Die *Abbildung 5.1.2* zeigt die aus den einzelnen Versuchspartellen erhaltenen Tonmengen für die

Parzellen des Ober- und Unterbodens. Die insbesondere im Oberboden sehr gering ausfallenden Mengen hatten auch Einfluss auf die Art der Sorptionsuntersuchungen (Kapitel 5.5).

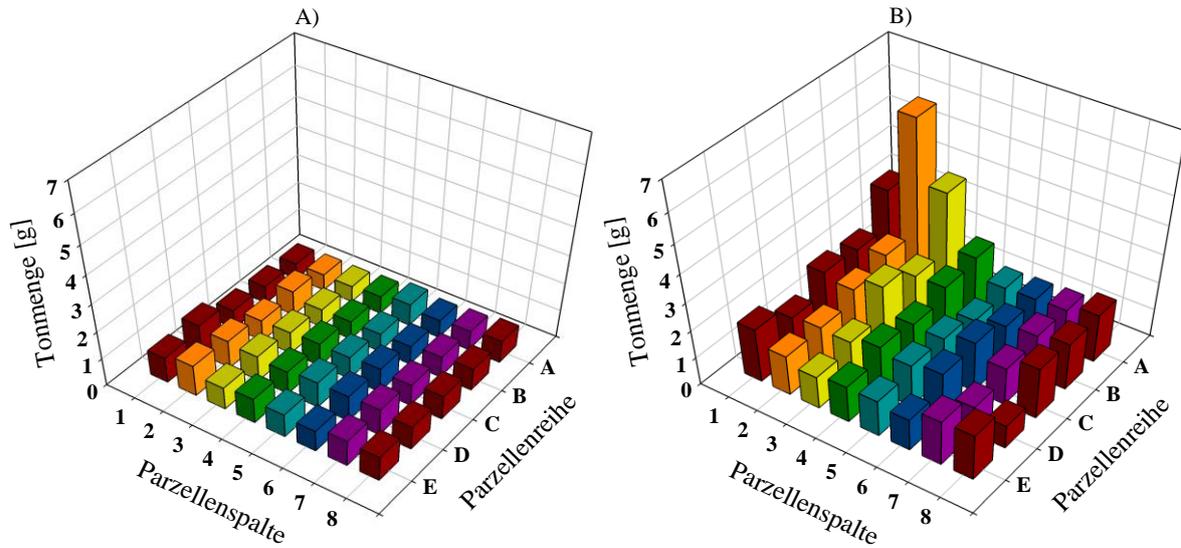


Abb. 5.1.2: Gewonnene Tonmengen [g] des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Freisetzungsfäche.

5.1.3 pH-Werte

Die in Abbildung 5.1.3a grafisch dargestellten Werte zu den pH-Wert-Messungen der Oberbodenproben verteilten sich auf einen Wertebereich zwischen pH 5,8 und pH 6,1 und lagen mit einem mittleren pH-Wert von 6,0 im mäßig bis schwach sauren Bereich.

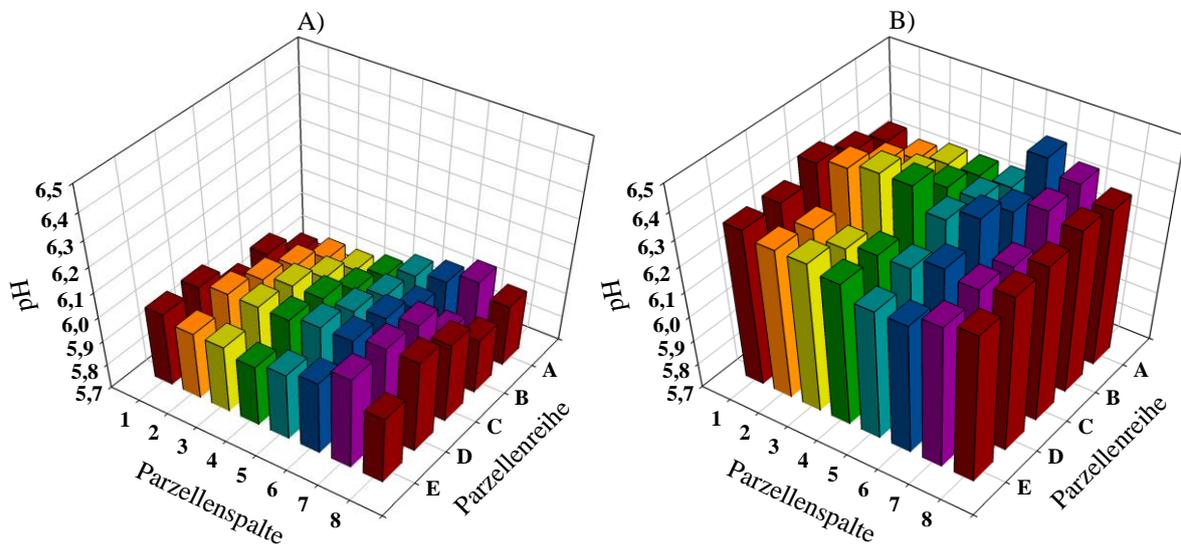


Abb. 5.1.3a: pH-Werte des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Freisetzungsfäche.

Beim Vergleich der gemessenen pH-Werte des Ober- und Unterbodens fällt auf, dass die Werte für den Unterboden in einem anderen und etwas klarer umgrenzten Bereich zwischen pH 6,2 und pH 6,4 schwankten, sich der mittlere pH-Wert von 6,3 damit im schwach sauren Bereich befand und damit generell etwas oberhalb der Werte, die für den Oberboden ermittelt wurden.

Statistisch signifikante Einflüsse zeigten sich bei der Messung des pH-Wertes im Ober- und Unterboden der Feinerde unter den Reihen (Abb. 5.1.3b). Weiterhin unterschieden sich die pH-Werte in Ober- und Unterboden signifikant (nicht dargestellt).

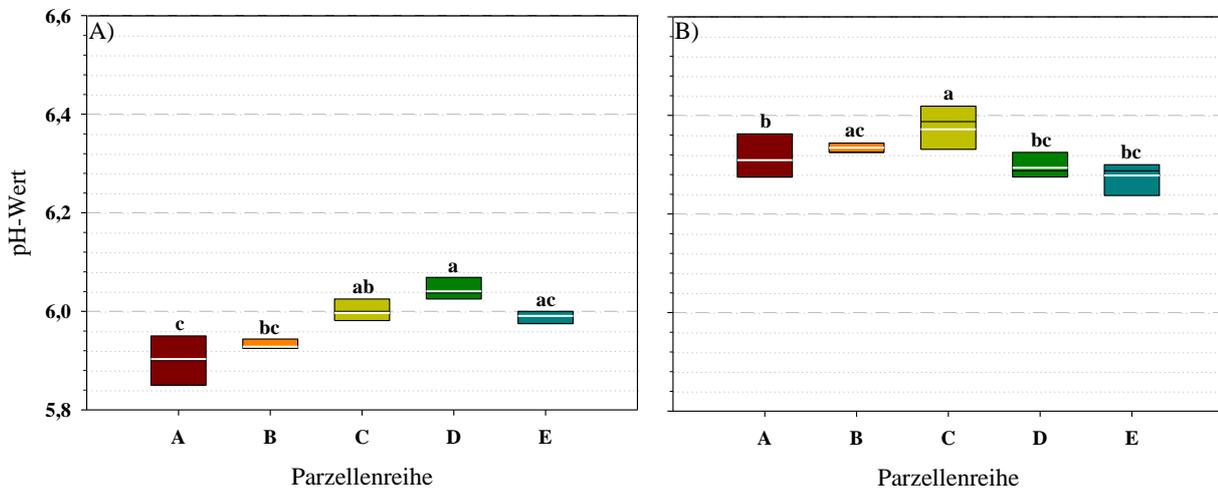


Abb. 5.1.3b: Boxplots der gemessenen pH-Werte des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Feinerdefraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an.

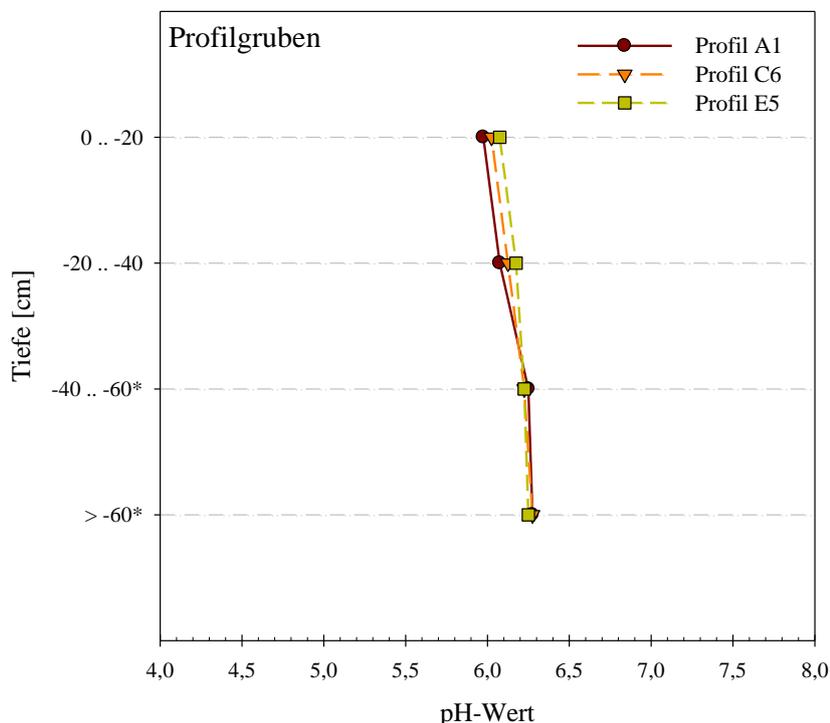


Abb. 5.1.3c: pH-Werte in den angelegten Profilgruben in den Parzellen A1, C6 und E5.

Die pH-Werte wurden auch in den verschiedenen Horizonten der angelegten Profilgruben in den Parzellen A1, C6 und E5 gemessen. Die Abbildung 5.1.3c lässt erkennen, dass der pH-Wert mit zunehmender Bodentiefe vom mäßig sauren in den schwach sauren Bereich anstieg.

5.1.4 Korngrößenverteilung

Aus den folgenden *Abbildung 5.1.4a* gehen die prozentualen Gehalte, die für die Fraktionen Sand, Schluff und Ton für die einzelnen Parzellen des Versuchsstandorts ermittelt wurden, hervor. Die prozentualen Sandgehalte (Korngrößenbereich 2 mm - 63 μ m) schwankten im Oberboden um $53,2 \pm 7,1$ %, wobei der Gehalt in der Reihe A am höchsten und in Reihe E am niedrigsten war. Im Unterboden zeigten sich bei gleichen Tendenzen Werte um $52,4 \pm 9,0$ %, wobei eine etwas weitere Streuung vorlag. Die Partikel der Schlufffraktion (63 - 2 μ m), erstreckten sich in ihrer prozentualen Verteilung für den Oberboden um $40,4 \pm 6,3$ % und für den Unterboden um $41,8 \pm 8,8$ %. Hier zeigte sich eine im Vergleich zum Sandanteil umgekehrte Verteilung mit höheren Gehalten in der Reihe E, die bis zur Reihe A hin abfielen. Der Tonanteil des Oberbodens mit der geringsten Partikelgröße von unter 2 μ m schwankte um $6,4 \pm 1,0$ % und damit in einem dem Unterboden ähnlichen Wertebereich, der sich um $5,8 \pm 1,4$ % verteilte, jedoch etwas stärker streute. Im Unterboden fielen dabei die Parzellen A2 (8,9 %) und A3 (12,3 %) sowie im Oberboden die Parzelle D7 (8,9 %) auf. Daher unterschieden sich die Tongehalte des Ober- und Unterbodens statistisch signifikant (Mann-Whitney Rank Sum Test).

Gemäß dem Dreieckskoordinatensystem der Bodenarten des Feinbodens (Scheffer & Schachtschabel, 2002) ließen sich sowohl der Ober- als auch der Unterboden der Rubrik schluffiger Sand zuordnen.

Die in der Korngrößenanalyse erhaltenen Werte wurden statistisch ausgewertet (*Abb. 5.1.4bc*), sodass sich folgende Resultate ergaben: beim prozentualen Sand- und Schluffgehalt bestanden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Reihen im Ober- und Unterboden. Hingegen zeigten sich beim Tongehalt Unterschiede in den Gehalten zwischen den Reihen nur im Oberboden.

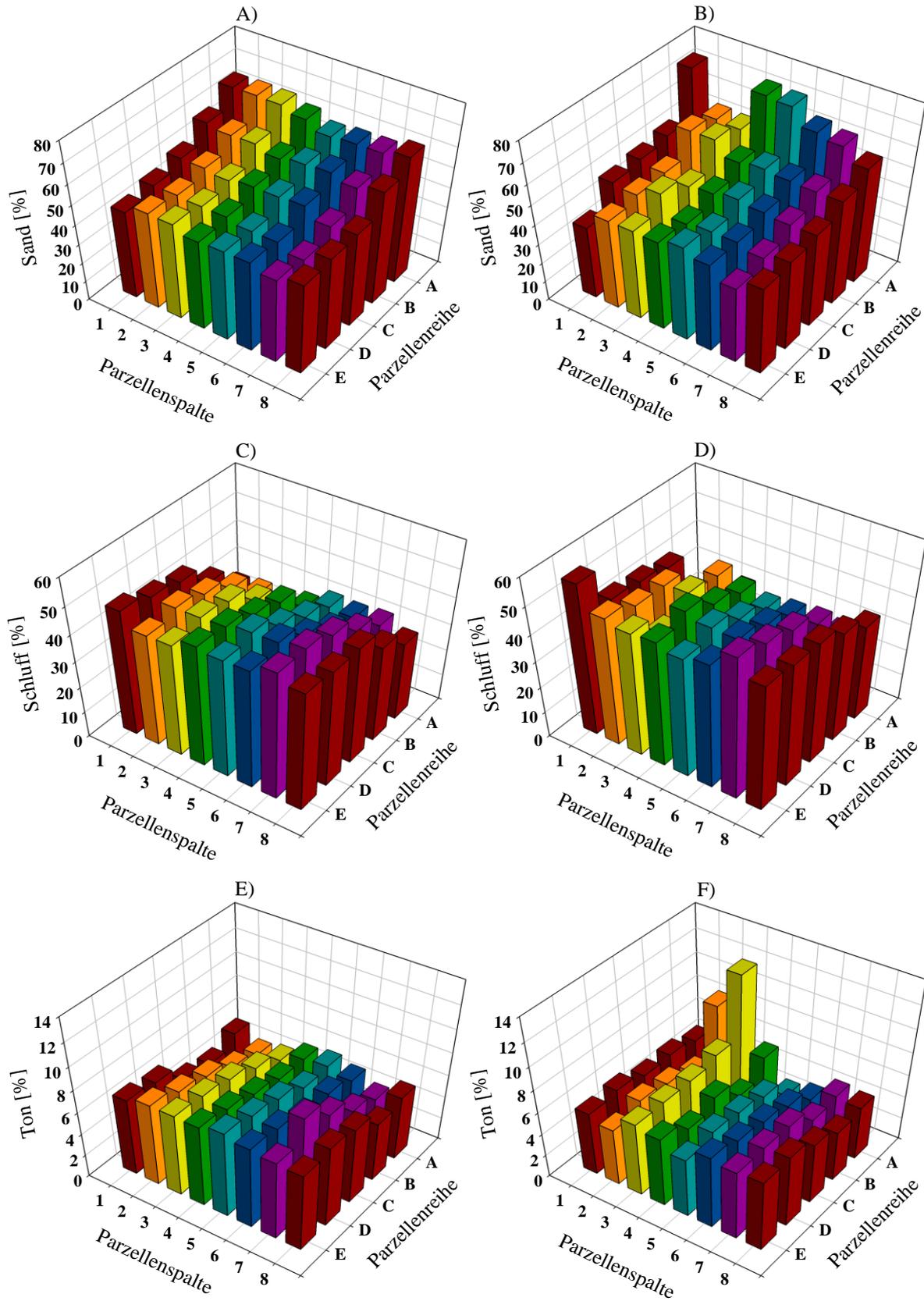


Abb. 5.1.4a: Prozentuale Sandanteile des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens, prozentuale Schluffanteile des Ober(C)- und Unter(D)-Bodens und prozentuale Tonanteile des Ober(E)- und Unter(F)-Bodens der Freisetzungsfäche.

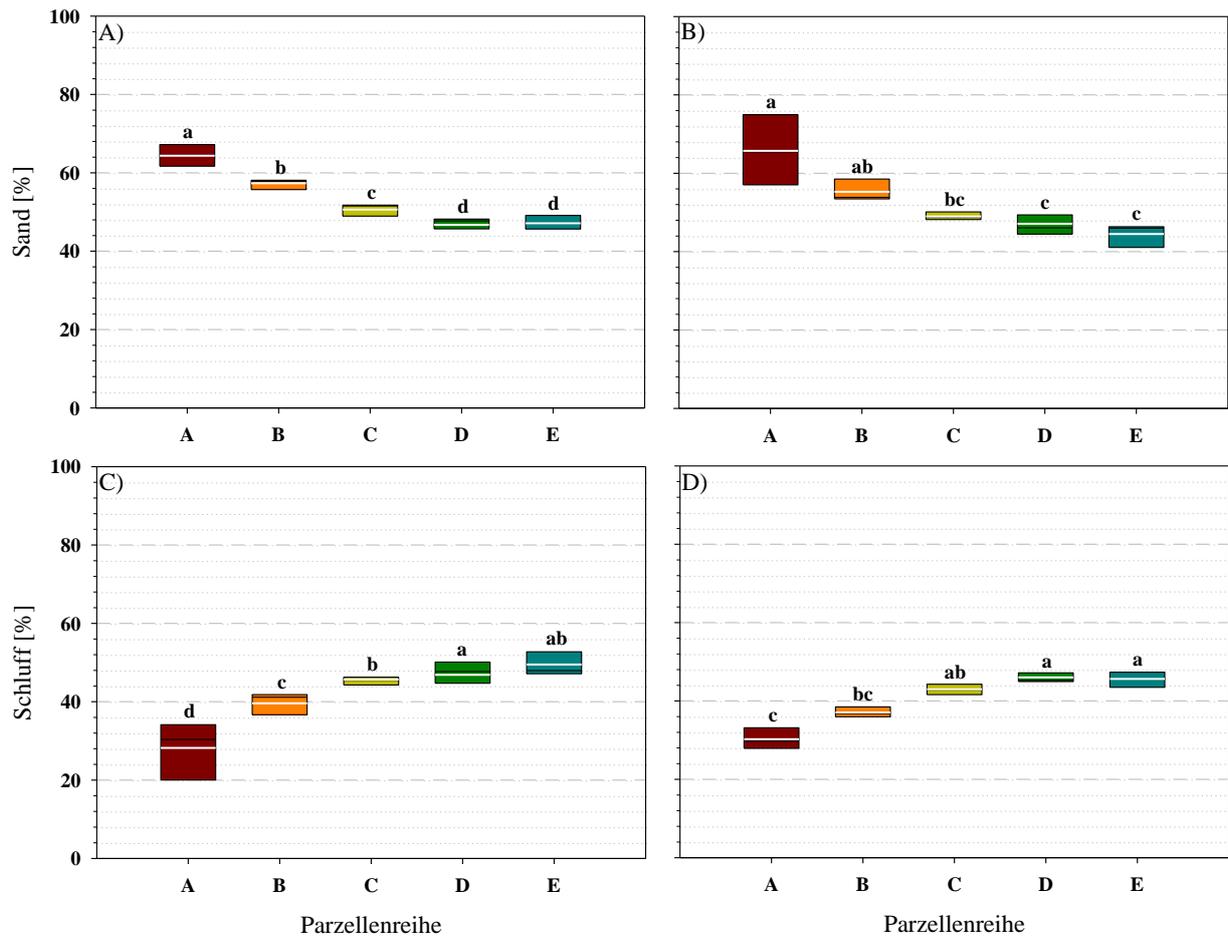


Abb. 5.1.4b: Boxplots der prozentualen Sandgehalte des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens und der prozentualen Schluffgehalte des Ober(C)- und Unter(D)-Bodens der Feinerdefraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an.

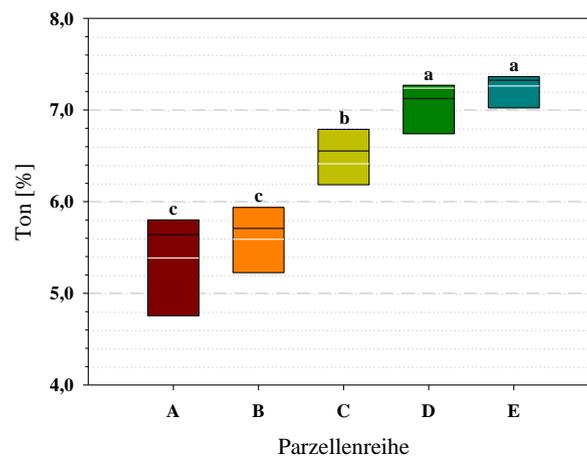


Abb. 5.1.4c: Boxplots der prozentualen Tongehalte im Oberboden der Feinerdefraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an.

5.1.5 Gehalt an organischem Kohlenstoff (C_{org})

Die Abbildung 5.1.5a zeigen die räumlichen Verteilungen der prozentualen C_{org} -Anteile der Feinerde- und Tonfraktion in den Parzellen des Versuchsfeldes. Der C_{org} -Anteil streute in der Feinerde des Oberbodens um $2,5 \pm 0,6$ % wobei mit Ausnahme der Parzellen A1 und B1 eine relative Homogenität in der Verteilung vorlag. Im Unterboden waren die Werte ebenfalls relativ gleichmäßig verteilt, wenn auch auf einem geringeren Niveau um $0,9 \pm 0,4$ %. Hingegen waren die Gehalte in der Tonfraktion mit $5,4 \pm 0,4$ % im Oberboden und $2,4 \pm 0,7$ % im Unterboden höher.

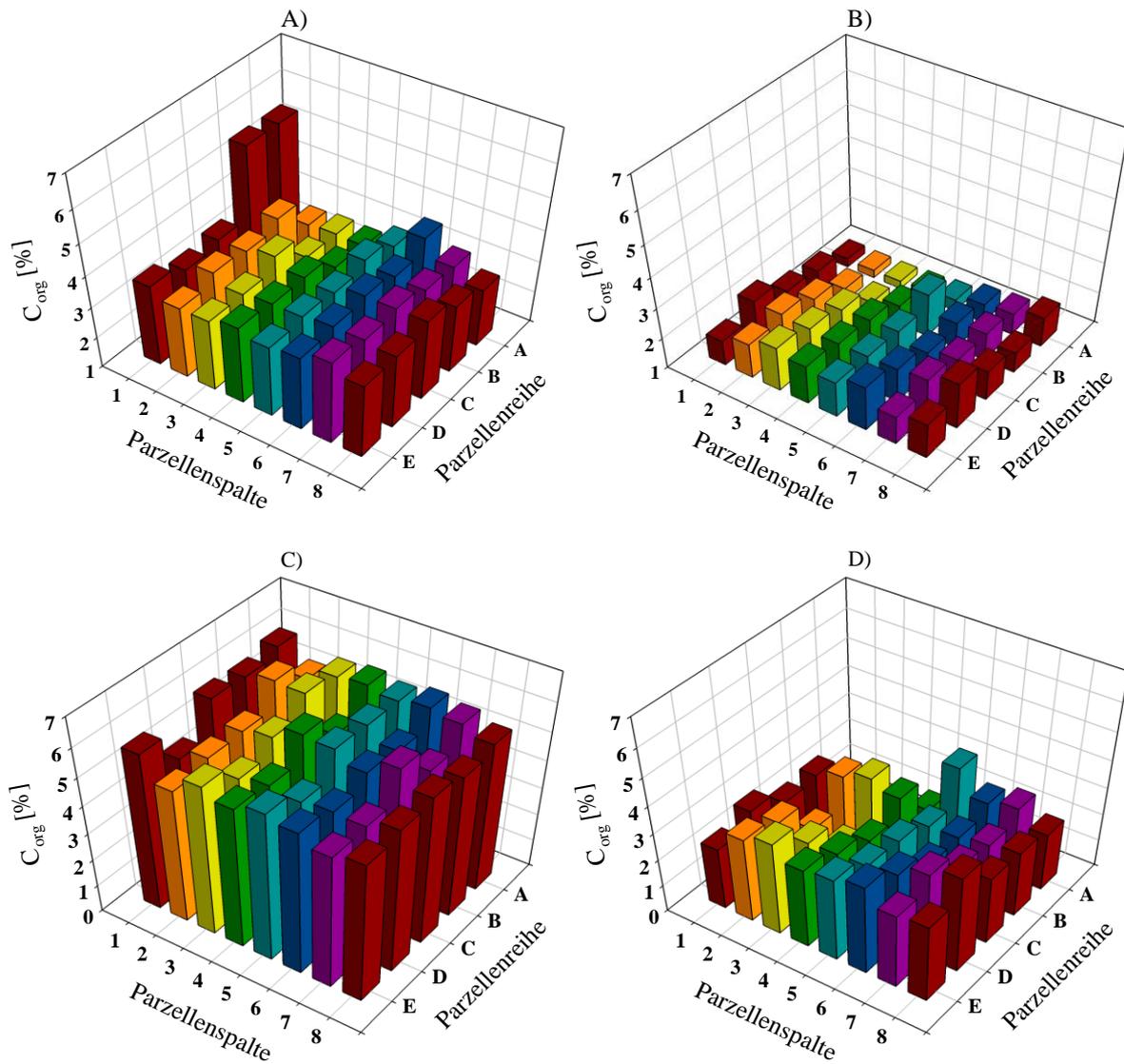


Abb. 5.1.5a: Prozentualer C_{org} -Anteil in der Feinerdefraktion des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens und in der Tonfraktion des Ober(C)- und Unter(D)-Bodens der Freisetzungsfäche.

Die C_{org} -Gehalte in der Feinerde- und Tonfraktion unterschieden sich statistisch signifikant in einigen Reihen des Unterbodens (Abb. 5.1.5b).

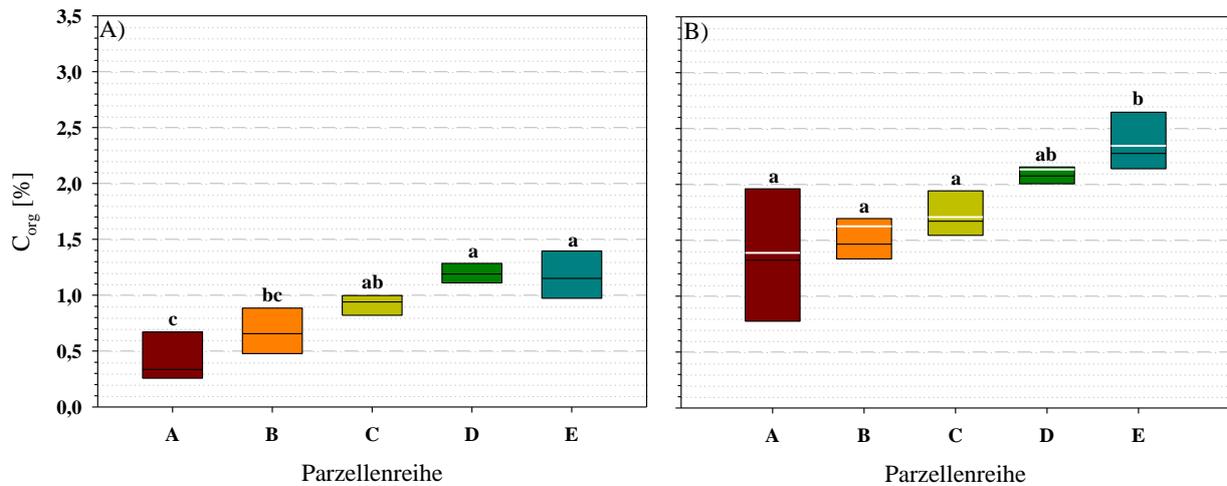


Abb. 5.1.5b: Boxplots der gemessenen Gehalte an C_{org} im Unterboden der A) Feinerdefraktion und der B) Tonfraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an.

5.1.6 Spezifische negative äußere Oberflächenladung

Die Werte der spezifischen negativen äußeren Oberflächenladung sind hier für den Ober- und Unterboden der Schluff- und Tonfraktion grafisch dargestellt (Abb. 5.1.6a).

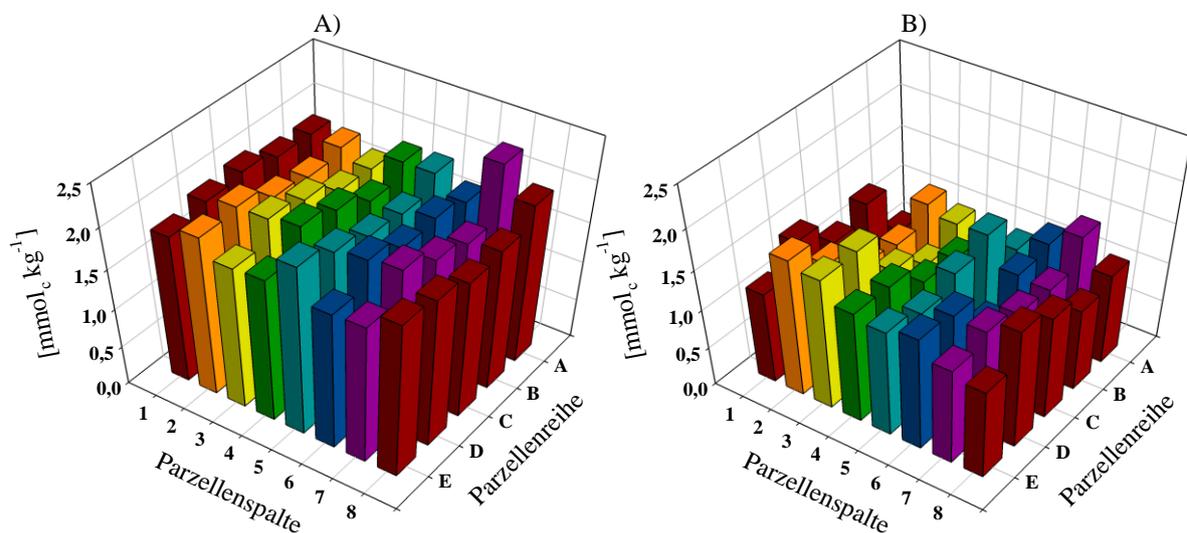


Abb. 5.1.6a: Spezifische negative äußere Oberflächenladung der Schlufffraktion des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Freisetzungsoberfläche.

Die Mittelwerte aus drei einzelnen Messungen lagen für den Schluff des Oberbodens in einem Bereich um $1,9 \pm 0,1 \text{ mmol}_c \text{ kg}^{-1}$. Die Werte im Unterboden waren etwas niedriger und schwankten etwas stärker in einem Bereich um $1,2 \pm 0,2 \text{ mmol}_c \text{ kg}^{-1}$. Generell waren sie aber recht gleichmäßig verteilt. Die Tonfraktion wies wesentlich höhere Werte auf als die

Schlufffraktion. Die Werte für die Oberflächenladung der Tonfraktion befanden sich im Oberboden in einem Bereich um $25,5 \pm 2,3 \text{ mmol}_c \text{ kg}^{-1}$ und im Unterboden in einem Bereich um $19,9 \pm 4,6 \text{ mmol}_c \text{ kg}^{-1}$. Letztere zeigten also eine größere Streuung.

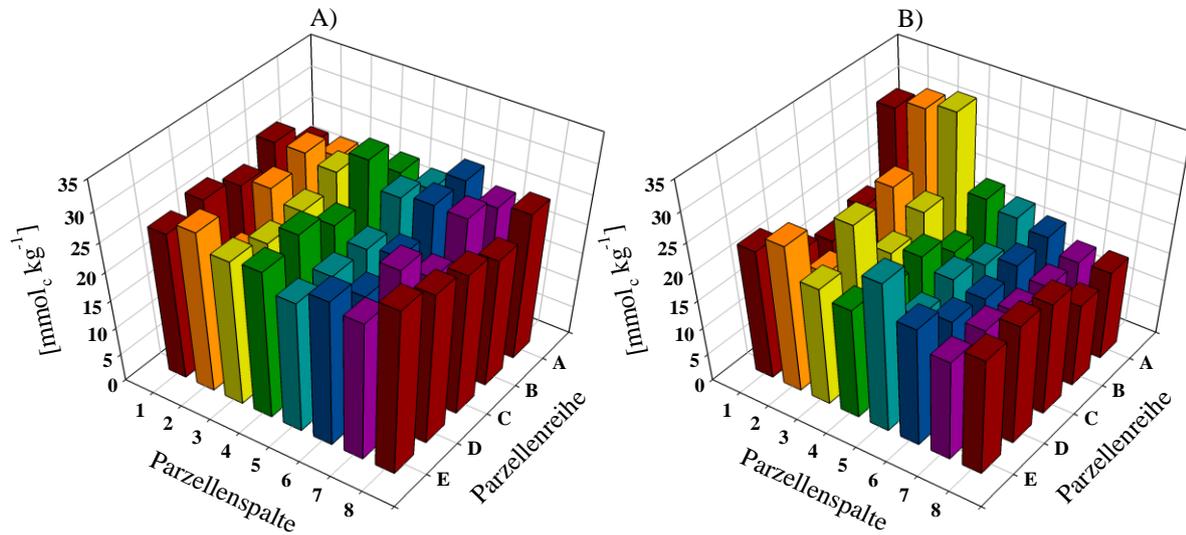


Abb. 5.1.6b: Spezifische negative äußere Oberflächenladung der Tonfraktion des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Freisetzungsfäche.

Es zeigten sich statistische Unterschiede bei der spezifischen negativen äußeren Oberflächenladung der Ton- und Schlufffraktion unter den Reihen des Ober- und Unterbodens (Abb. 5.1.6cd). Die Spalten (1-8) des Versuchsfeldes und die Maissorten zeigten keinen Unterschied.

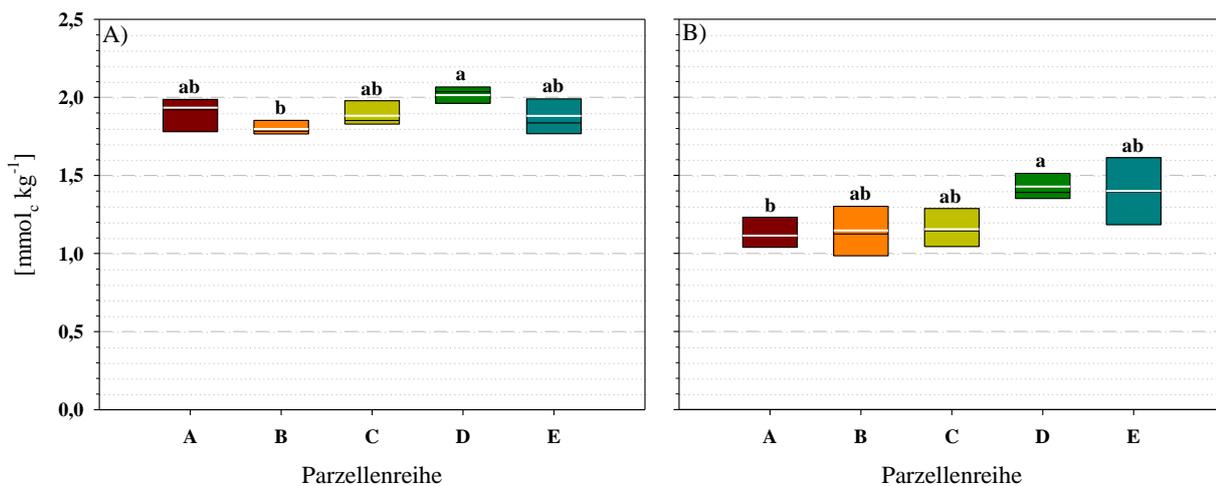


Abb. 5.1.6c: Boxplots der gemessenen spezifischen äußeren Oberflächenladung des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Schlufffraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5 \%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an.

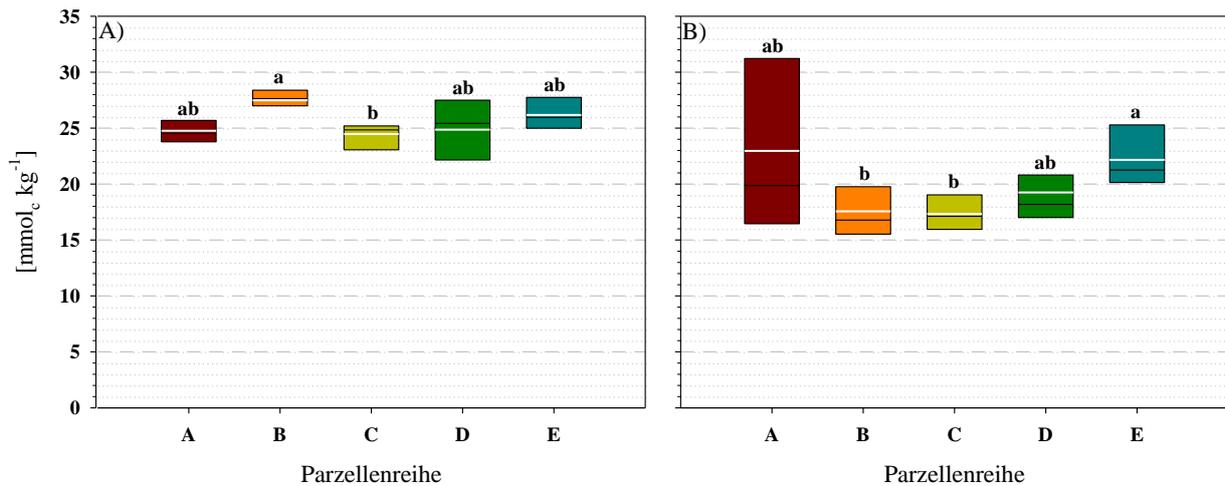


Abb. 5.1.6d: Boxplots der gemessenen spezifischen äußeren Oberflächenladung des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Tonfraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an.

5.1.7 Spezifische äußere Oberflächengröße

Für die Feinerdefraktion ergaben sich durchschnittliche Oberflächengrößen von $2,1 \pm 0,4 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ im Oberboden und höhere Werte von $3,0 \pm 1,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ im Unterboden (Abb. 5.1.7a). In der Tonfraktion zeigten sich höhere Oberflächengrößen um $14,7 \pm 3,0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ für den Ober- bzw. um $27,2 \pm 14,9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ für den Unterboden (Abb. 5.1.7b). Insgesamt schwankten die Werte über einen geringen Bereich, wobei einige deutliche Ausreißer zu beobachten waren. Die Größe der äußeren Oberfläche der Tonfraktion und der Feinerde des Oberbodens zeigten geringere Schwankungen als die der Unterböden, wo vier bzw. drei Proben größere spezifische äußere Oberflächen aufwiesen.

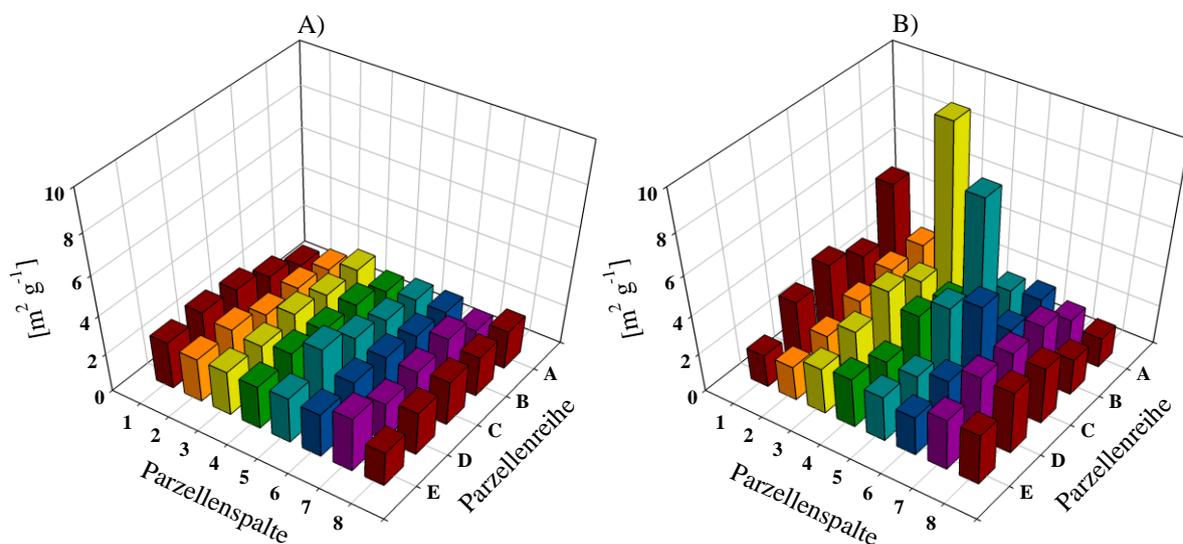


Abb. 5.1.7a: Spezifische äußere Oberfläche der Feinerdefraktion des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Freisetzungsfäche.

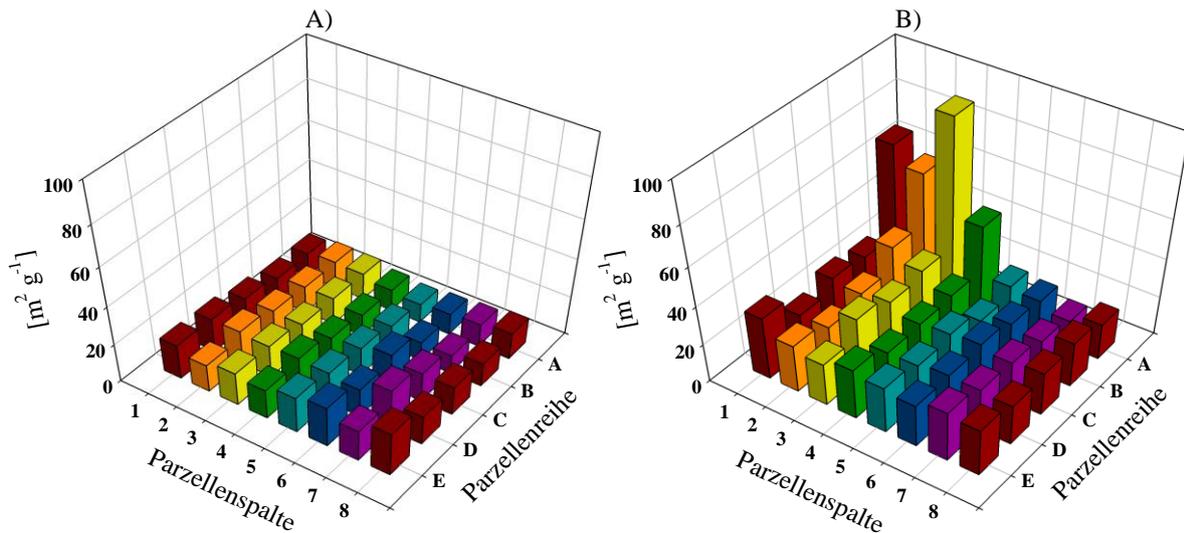


Abb. 5.1.7b: Spezifische äußere Oberfläche der Tonfraktion des Ober(A)- und Unter(B)-Bodens der Freisetzungsfäche.

Es gab keinen statistisch signifikanten Einfluss der Spalten, Reihen und Sorten im Unterboden auf die Größe der spezifischen äußeren Oberfläche von Ton und Feinerde. Hingegen lag ein Reiheneinfluss in den jeweiligen Oberböden vor (Abb. 5.1.7c).

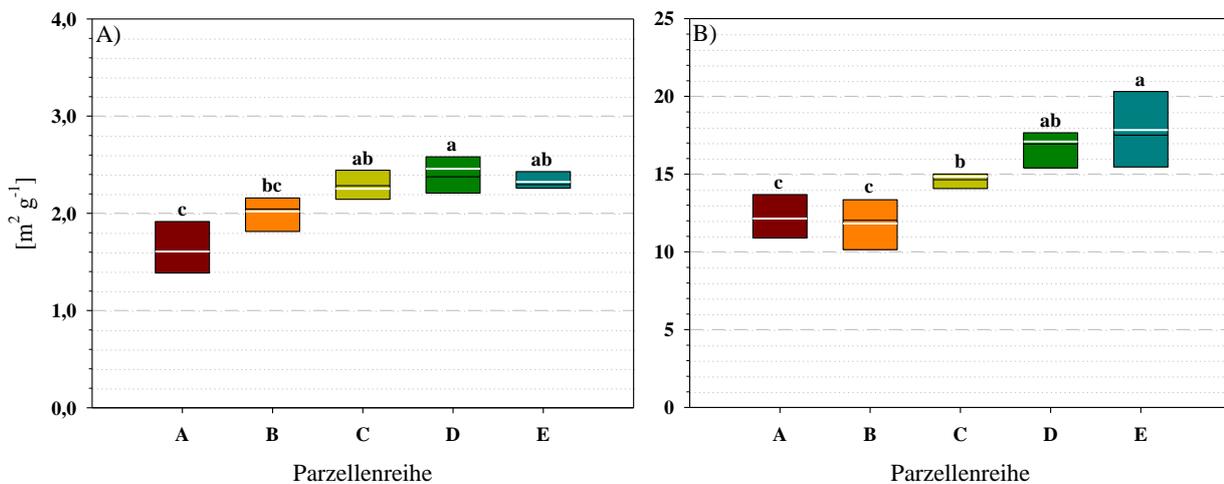


Abb. 5.1.7c: Boxplots der gemessenen äußeren Oberfläche des Oberbodens der A) Feinerdefraktion und B) Tonfraktion. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant. (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an.

5.1.8 Vergleich der spezifischen Ladung der Tonfraktion und der Tonpools

Die aus der spezifischen äußeren Oberfläche und der spezifischen äußeren Oberflächenladung errechnete spezifische Ladung für die Tonfraktion (Abb. 5.1.8 A)) lag im Oberboden in einem Bereich zwischen $1,1 \mu\text{mol}_c \text{m}^{-2}$ und $2,9 \mu\text{mol}_c \text{m}^{-2}$ und damit um einiges höher als im Unterboden, der Werte von $0,3 - 0,12 \mu\text{mol}_c \text{m}^{-2}$ zeigte.

Ein direkter Vergleich der für die Tonpools aus der Oberflächenladung und Oberflächengröße (siehe *Kapitel 4.1.4.6*) berechneten spezifischen Ladungen mit den theoretischen, aus den Messergebnissen für die Einzelparzellen berechneten Werte ist in *Abbildung 5.1.8 B*) dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die spezifische Ladung im Oberboden mit durchschnittlich $2,3 \pm 0,5 \mu\text{mol}_c \text{m}^{-2}$ stets höher war als im Unterboden mit Werten von durchschnittlich $0,8 \pm 0,2 \mu\text{mol}_c \text{m}^{-2}$. Die theoretischen Werte stimmten mit den praktischen, für die Tonpools erhaltenen Werten gut überein.

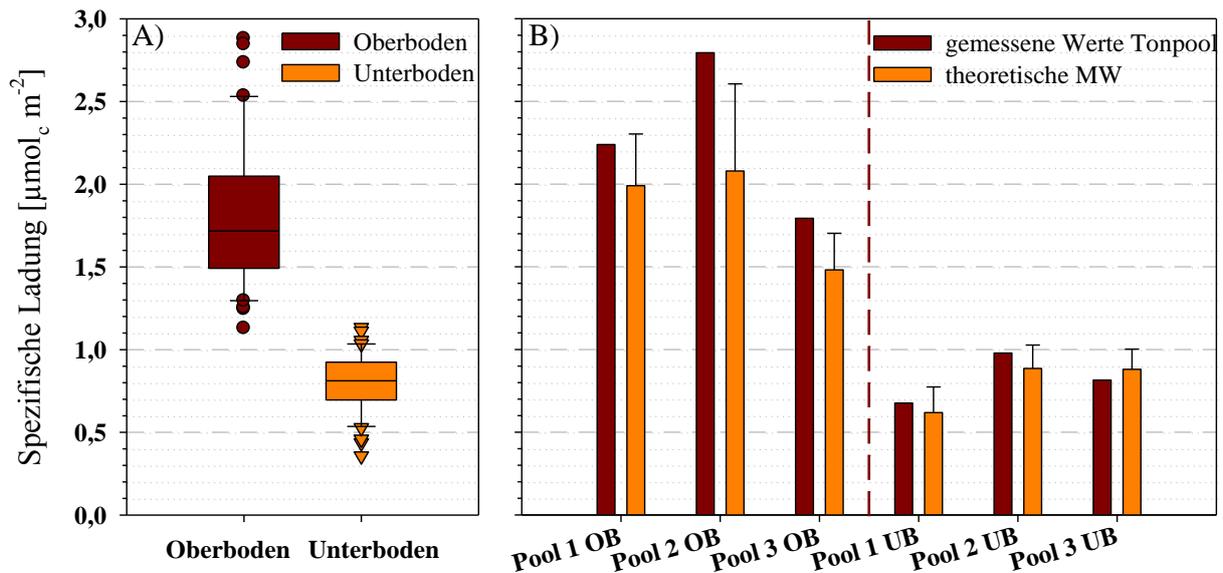


Abb. 5.1.8: A) Spezifische Ladung der Tonfraktion im Ober- und Unterboden und B) spezifische Ladung der Tonpools im Ober(OB)- und Unter(UB)-Boden im Vergleich mit den theoretisch berechneten Werten.

5.1.9 Mineralstickstoffvorrat (N_{\min})

Um einen Eindruck vom möglichen Einfluss des Anbaus der Maishybriden auf die Zersetzung der Streu über den Anteil an pflanzenverfügbaren Stickstoff (N_{\min}) zu bekommen, wurde in den Versuchsjahren 2009, 2010 und 2011 der pflanzenverfügbare, mineralisierte Stickstoff im Boden ermittelt. Aus der *Abbildung 5.1.9a* geht hervor, dass die Sorten in allen Versuchsjahren keinen signifikanten Einfluss auf den N_{\min} -Gehalt der Oberböden hatten.

Die N_{\min} -Gehalte der Böden, die im Versuchsjahr 2009 beprobt wurden, lagen in einem Bereich um $8,4 \pm 1,6 \text{ kg ha}^{-1}$ (entspr. $2,0 - 4,4 \text{ mg kg}^{-1}$). Die N_{\min} -Gehalte in den Böden des Versuchsjahres 2010 waren etwas geringer und zeigten eine engere Streuung um $7,9 \pm 1,4 \text{ mg kg}^{-1}$ (entspr. $1,9 - 4,1 \text{ mg kg}^{-1}$) als die Gehalte des vorausgegangenen Versuchsjahres. Hingegen lagen im letzten Versuchsjahr 2011 die N_{\min} -Gehalte mit $10,5 \pm 1,4 \text{ kg ha}^{-1}$ (entspr. $2,7 - 4,8 \text{ mg kg}^{-1}$) statistisch signifikant höher als in den beiden vorausgegangenen Jahren (*Abb. 5.1.9b*).

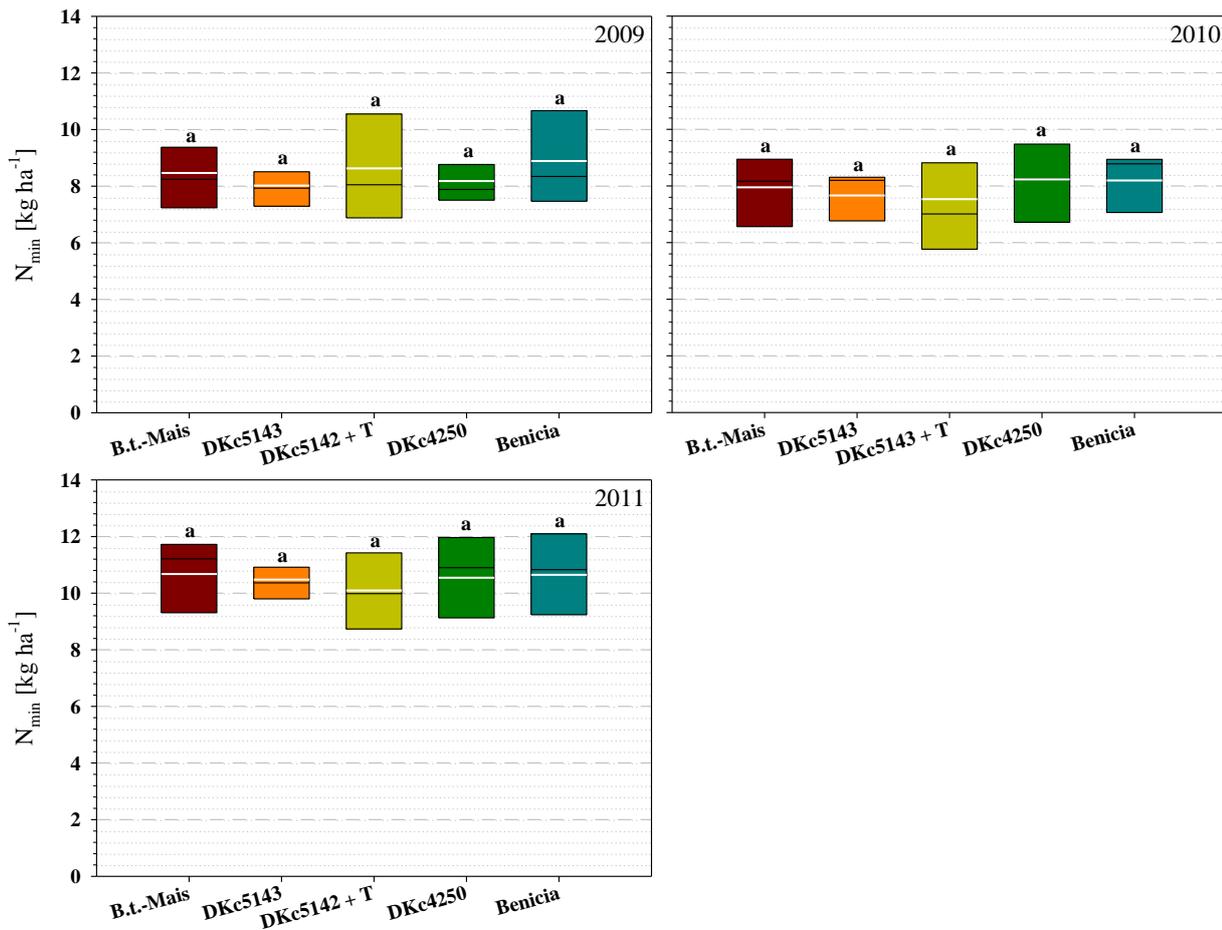


Abb. 5.1.9a: Boxplots der N_{\min} -Gehalte der Böden in Abhängigkeit von der angebauten Maissorte (Versuchsjahre 2009 bis 2011). Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an. (B.t.-Mais = MON89034 x MON88017, + T = Tefluthrin (Bodeninsektizid)).

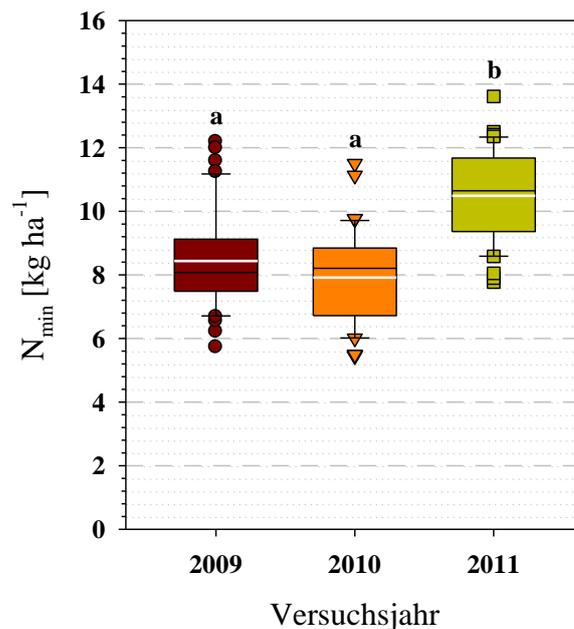


Abb. 5.1.9b: Boxplots der N_{\min} -Gehalte in der Feinerdefraktion des Oberbodens in den Versuchsjahren 2009 bis 2011. Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Holm-Sidak, $n = 40$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an.

Bei der N_{\min} -Bestimmung in der Feinerde gab es im Versuchsjahr 2010 im Gegensatz zum vorausgegangenen Versuchsjahr 2009 einen statistischen Unterschied zwischen den Reihen (Abb. 5.1.9c).

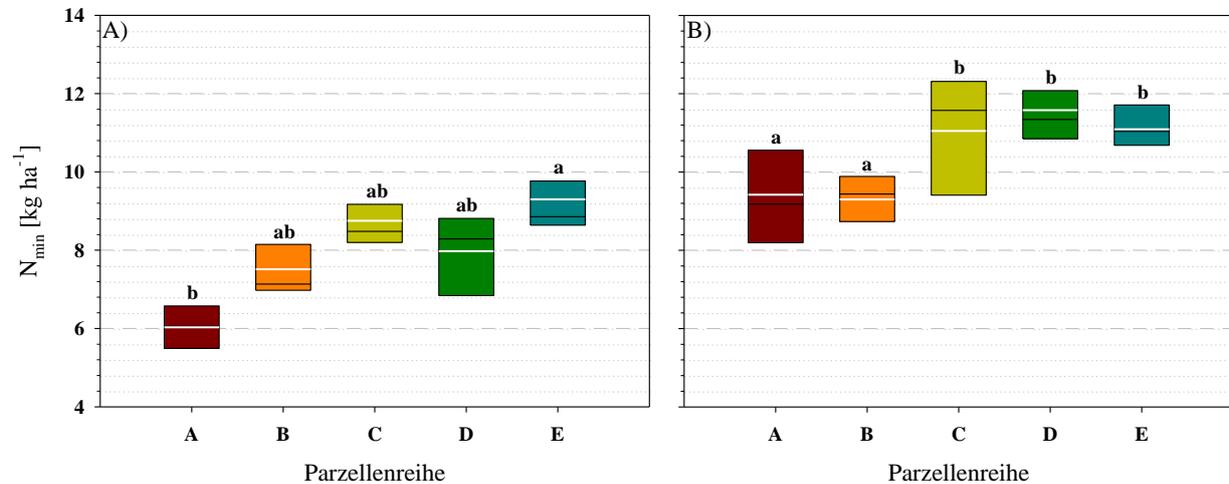


Abb. 5.1.9c: Boxplots der N_{\min} -Gehalte in der Feinerde des Oberbodens in den Versuchsjahren 2010 (A) und 2011 (B). Boxplots, die den gleichen Buchstaben haben, unterscheiden sich für $\alpha = 5\%$ nicht signifikant (Tukey Test, $n = 8$). Die weißen Querstriche zeigen die Mediane an.

Die statistische Auswertung zeigte für alle Versuchsjahre, dass die Parzellen der Maishybriden im Gesamtbild über die Jahre keine stärkere Zunahme der N_{\min} -Gehalte der Böden als die Vergleichssorten aufwiesen (Abb. 5.1.9a).

5.2 WURZELEXSUDATION VON PROTEINEN

Neben der Bestimmung der Cry-Protein-Exsudationsmenge in den gewonnenen aufkonzentrierten Wurzelexsudaten, wurden die Konzentrate in einem SDS-Gel aufgetrennt.

5.2.1 Test kommerzieller ELISA auf Kreuzreaktionen

Drei Kits der Firma Agdia Inc. (Bt-Cry1Ab-1Ac, Bt-Cry2A, Bt-Cry3Bb1) wurden auf Kreuzreaktionen mit dem synthetischen Cry1A.105-Protein untersucht. Die Tests Bt-Cry2A und Bt-Cry3Bb1 zeigten keinerlei Kreuzreaktion mit dem Cry1A.105-Protein. Hingegen konnten im Kit Bt-Cry1Ab-1Ac starke Kreuzreaktionen mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,999$ bei $\lambda = 450$ nm gezeigt werden. Daher konnte letzterer für die Detektion des Cry1A.105-Proteins und die beiden anderen Testkits für die Detektion der Proteine Cry2Ab2 und Cry3Bb1 in den Wurzelexsudatversuchen, in den Sorptions- (Kapitel 5.5.1. bis 5.5.3.) und den Konkurrenzuntersuchungen (Kapitel 5.5.4.) eingesetzt werden.

5.2.2 Cry-Proteinnachweis in Wurzelexsudaten

In *Abbildung 5.2.2a* sind die gemessenen Exsudationsraten der Cry-Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 in den Versuchen I und II mit dem Substrat Nährlösung und dem Substrat Quarzsand dargestellt. Alle drei Cry-Proteine, die von der Pflanze exprimiert wurden, konnten nachgewiesen werden. In den Versuchen mit Nährlösung dominierte das Cry3Bb1-Protein, im Versuch mit Quarzsand zeigten sich für dieses hingegen die geringsten Werte. Dies korrelierte sehr gut mit den hohen Verteilungskoeffizienten für dieses Protein (siehe *Kapitel 5.5.3*). Auch die anderen Cry-Proteine wurden im Versuch mit Quarzsand in geringeren Konzentrationen nachgewiesen.

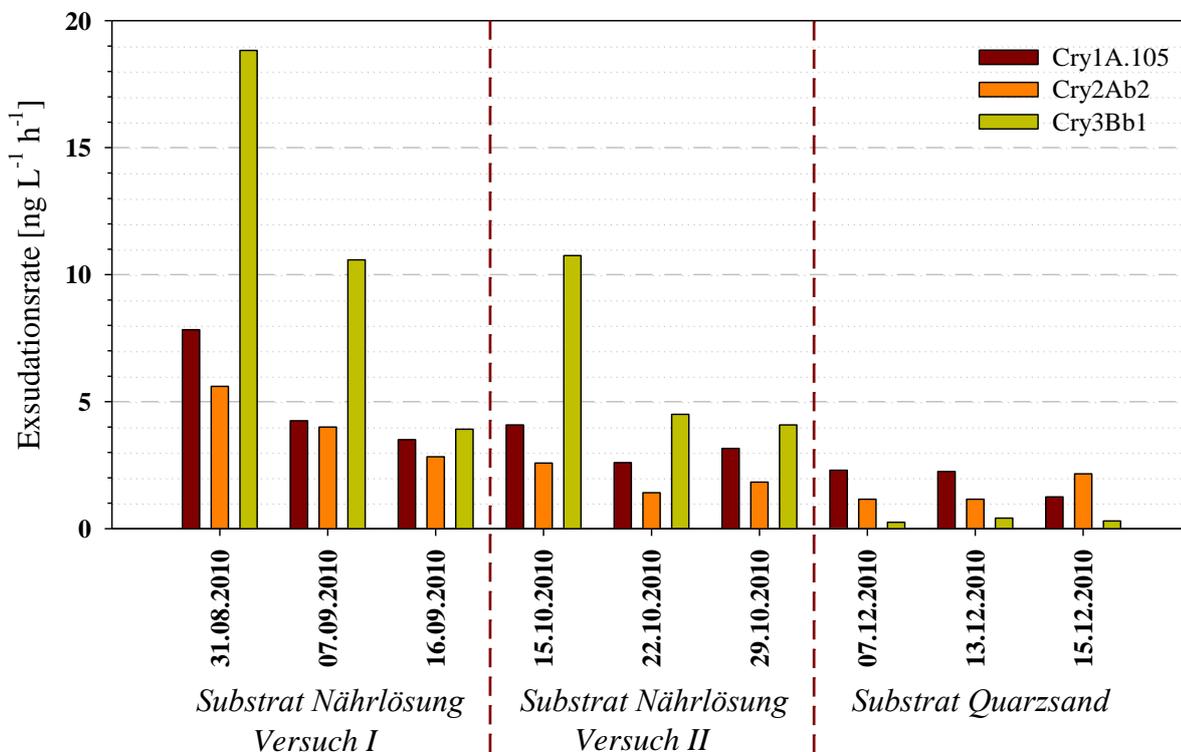


Abb. 5.2.2a: Exsudationsraten der Cry-Proteine in den Versuchen mit den Substraten Nährlösung und Quarzsand.

Die Auftrennung der aufkonzentrierten Wurzelexsudate der Maissorten DKc5143 und MON89034 x MON88017 wurde exemplarisch mit dem Muster der drei von der Firma Monsanto gelieferten Cry-Proteine verglichen (*Abb. 5.2.2b*). Sowohl die Cry-Proteine als auch die Proteine in den Wurzelexsudaten wiesen unterschiedliche Bandenmuster auf. Die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 zeigten im Bereich ihrer errechneten Molekulargewichte (~ 133,34 kDa, ~ 70,86 kDa, ~ 74,52 kDa) die deutlichsten Banden, wohingegen in den Wurzelexsudaten viele ähnlich stark ausgeprägte Banden erkennbar waren. Die Sorten DKc5143 und MON89034 x MON88017 wiesen ein auf den ersten Blick sehr ähnliches Muster auf.



Abb. 5.2.2b: Gelelektrophoretische Auftrennung der Cry-Proteine und der in den Versuchen gewonnenen aufkonzentrierten Wurzelexsudate (Isogen = DKc5143, Bt = MON89034 x MON88017).

5.3 REAKTANTEN: BESCHREIBUNG DER PROTEINE CRY1A.105, CRY2AB2 UND CRY3BB1

Im Folgenden sind die Ergebnisse zur Beschreibung der Cry-Proteine mittels Modellierung über Programme und zu den Messungen zum Aggregationsverhalten dargestellt.

5.3.1 Cry-Proteinmodelle

Es wurden die Molekulargewichte (M_w) sowie Abschätzungen zum Isoelektrischen Punkt (IEP) und der Hydrophobizität berechnet. Weiterhin wurden Modelle der Cry-Proteine dreidimensional dargestellt. In *Tabelle 5.3.1a* sind Daten zu den drei Cry-Proteinen aufgelistet. Die grün hinterlegten Werte wurden aus den Petitionen zu MON89034 und MON88017 (Monsanto, 2004, 2006) entnommen. Basierend auf diesen Werten wurden mit dem Computerprogramm *Protparam* die weiteren Daten berechnet.

Tab. 5.3.1a: Ausgewählte Eigenschaften der drei Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1.

Cry-Protein	Aminosäuren	Molekulargewicht [kDa]	Theoretischer IEP	Negativ geladene Reste (Asp + Glu)*	Positiv geladene Reste (Arg + Lys)**	Durchschnittliche Hydrophobizität***
Cry1A.105	1130	133,3	5,01	154	108	-0,418
Cry2Ab2	634	70,9	8,53	46	49	-0,293
Cry3Bb1	653	74,5	5,73	77	68	-0,431

*Asparagin und Glutamin, **Arginin und Lysin, ***Hydrophobizität der gesamten Aminosäuresequenz.

Das Cry3Bb1-Protein ist röntgenographisch von Galitsky *et al.* (2001) untersucht worden. Für das Cry2Ab2-Protein lagen keine ausreichend detaillierten Informationen vor. Daher wurde das Cry2AA-Protein für die Berechnungen zu Grunde gelegt. Für das Cry1A.105-Protein war die Situation noch komplexer, da das Protein die Domänen I und II aus dem Cry1Ac/1Ab-Protein, die Domäne III aus dem Cry1F-Protein und das C-terminale Ende ebenfalls aus dem Cry1Ac-Protein enthält. Deshalb wurden die Domänen I und II aus dem Protein Cry1Ac und die Domäne III aus dem Protein Cry1F übernommen. Je nach Sequenzvergleich wurden die Domänenbereiche dann angepasst und der IEP und die durchschnittliche Hydrophobizität für die einzelnen Domänen neu berechnet (*Tab. 5.3.1b*). Die Höhe der Sequenzübereinstimmung der Cry-Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 mit Modellen aus *The Protein Data Bank (PDB)* wurde mit Hilfe der Programme *Phyre* und *Align Sequences Protein BLAST* überprüft. Öffentlich zugängliche Datenbanken z. B. *Swiss Model* erlaubten den Zugang zu kristallographischen Proteindaten, die eine hohe Identität in der AS-Sequenzreihenfolge mit den untersuchten Proteinen aufwiesen. Bei dieser Suche wurden Proteine gefunden, die den Proteinen Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 in ihrer Sequenz stark ähnelten. Diese ähnlichen Sequenzen hatten die Datenbankzugangsschlüssel 1ciy, 1i5p und 1ji6 aus der *PDB*. Mit dem Programm *Swiss PDB Viewer* konnten die dreidimensionalen Strukturen dieser verwandten Proteine dargestellt und ihre Oberfläche sowie ihre Domänen und deren elektrostatische Potentiale dreidimensional modelliert werden.

Tab. 5.3.1b: *Eigenschaften der einzelnen Cry-Proteindomänen.*

Cry-Protein	Modell (PDB)	Identität**	Domäne	IEP	Hydrophobizität (ϕ)*
Cry1A.105	Cry1Ac	91 %***	I : Reste 36 - 254	4,76	-0,086
			II: Reste 259 - 460	9,04	-0,330
	Cry1F	67 %***	III: Reste 469 - 598	9,77	-0,130
Cry2Ab2	Cry2AA (1i5p)	88 %	I : Reste 53 - 264	9,21	-0,102
			II: Reste 267 - 472	9,25	-0,253
			III: Reste 494 - 628	6,77	-0,421
Cry3Bb1	Cry3Bb1 (1ji6)	99 %	I : Reste 64 - 294	7,03	-0,192
			II: Reste 295 - 502	5,97	-0,734
			III: Reste 503 - 652	6,49	-0,055

*Durchschnittliche Hydrophobizität der einzelnen Domänen. **Identitätsvergleich von Cry1A.105 mit Cry1A(a) (Grochulski *et al.*, 1995) (1ciy (77 %)) mit dem Programm *Phyre*, ****Align Sequences Protein BLAST*.

In der *Abbildung 5.3.1a* sind die Moleküloberflächen der einzelnen Domänen farbig dargestellt (Domäne I: hellblau, Domäne II: lila, Domäne III: grün). Ebenfalls wurde das elektrostatische Potential (rot-blaues Gitternetz) abgebildet. Dabei kodierte „blau“ für ein positives und „rot“ für ein negatives Coulombpotential.

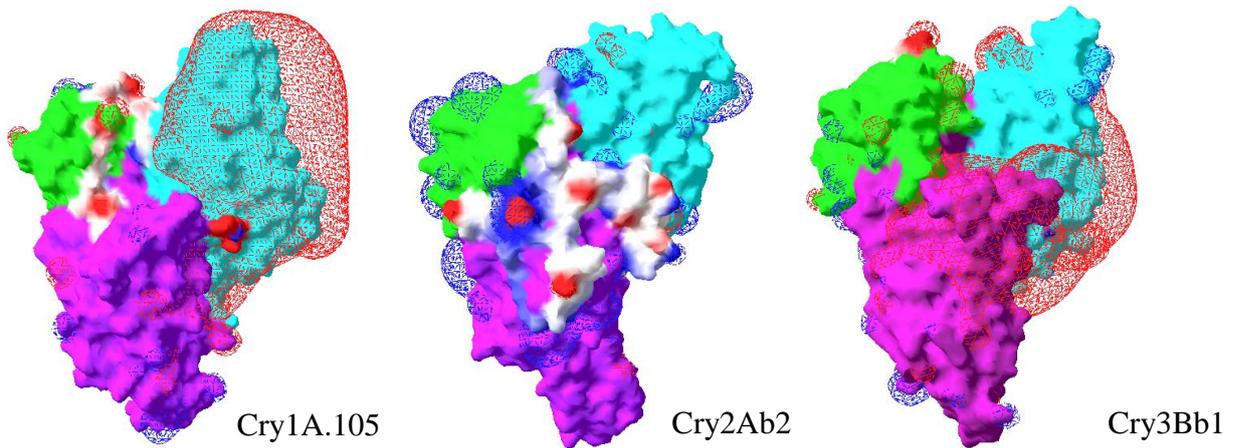


Abb. 5.3.1a: Äußere Oberflächen der Cry-Proteine mit Hilfe des Swiss PDB Viewers modelliert (Domäne I: hellblau, Domäne II: lila, Domäne III: grün, elektrostatisches Potential: rot-blaues Gitternetz).

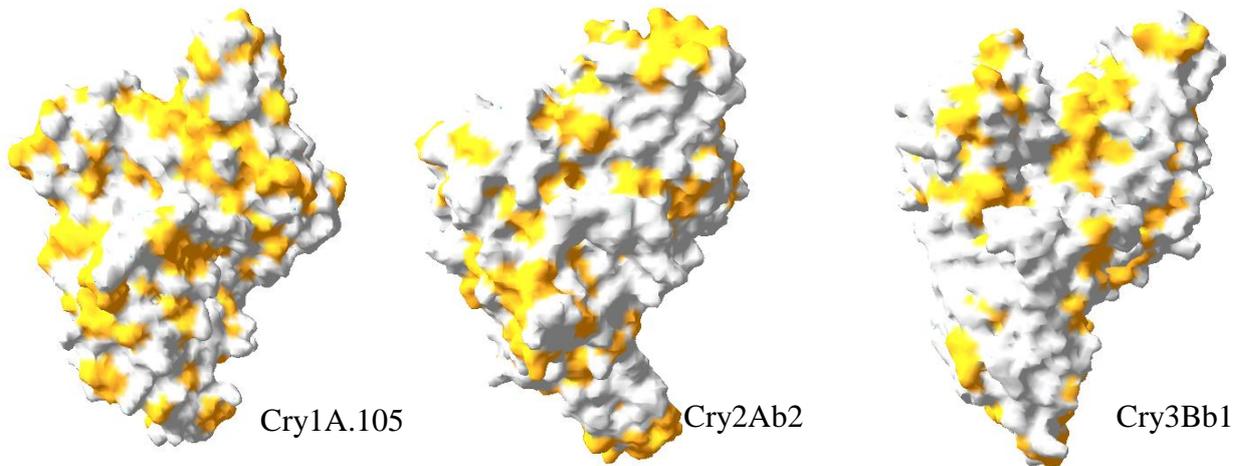


Abb. 5.3.1b: Äußere Oberflächen der Cry-Proteine mit Hilfe des Swiss PDB Viewers modelliert (gelb: unpolare/hydrophobe Aminosäuren).

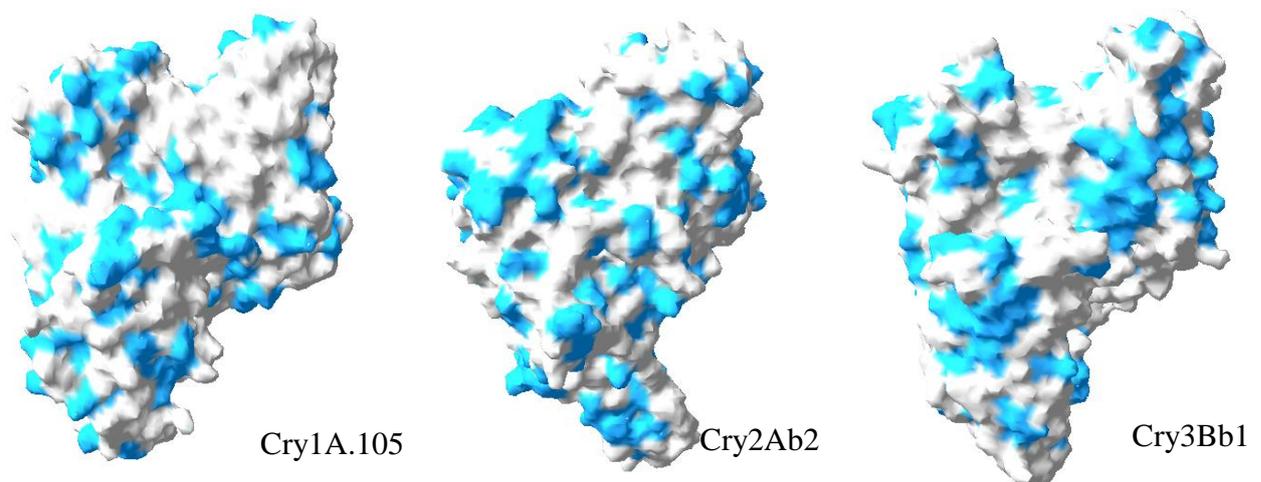


Abb. 5.3.1c: Äußere Oberflächen der Cry-Proteine mit Hilfe des Swiss PDB Viewers modelliert (hellblau: polare/ungeladene Aminosäuren).

Es ist recht deutlich zu erkennen, dass beim Cry2Ab2-Protein das positive Coulombpotential vorherrschte, wohingegen bei den anderen Cry-Proteinen eine große zusammenhängende Fläche auf der Domäne I unter einem negativen Coulombpotential stand. In *Abbildung 5.3.1b* wurden die Moleküloberfläche in Grau und die unpolare/hydrophoben Aminosäuren in Gelb abgebildet und in *Abbildung 5.3.1c* wurden die polaren/ungeladenen Aminosäuren hellblau eingefärbt. Da die unpolaren und polaren Bereiche (*Abb. 5.3.1bc*) recht einheitlich über die gesamte Proteinoberfläche verteilt zu sein schienen, war es hier schwierig Unterschiede unter den drei Cry-Proteinen auszumachen.

5.3.2 Aggregationsverhalten

In der Literatur wurde dargestellt, dass Cry-Proteine aggregieren (Helassa *et al.*, 2009). Dieses würde die Reaktivität und damit das Transportverhalten beeinflussen. Um dieses Aggregationsverhalten für die Proteine Cry1Ab, Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 zu erfassen, wurden Untersuchungen zu diesem durchgeführt.

Abbildung 5.3.2 zeigt am Beispiel des Cry3Bb1-Proteins, dass Proteinaggregation im $\mu\text{g mL}^{-1}$ -Bereich auftrat. Der erste Peak bei 0,2 nm kennzeichnete das Cry3Bb1-Protein als Monomer, der zweite Peak das Molekülaggregat. Alle weiteren Peaks waren auf makroskopische Teilchen, wie z. B. Staub zurückzuführen. Es zeigte sich, dass die untersuchten Proteine in unterschiedlichen Größen aggregierten, wobei weder die Art des Lösungsmittels noch die Verdünnungsstufe einen konsistenten Einfluss auf die Aggregatgröße hatte (Intensitätsverteilungen nicht dargestellt).

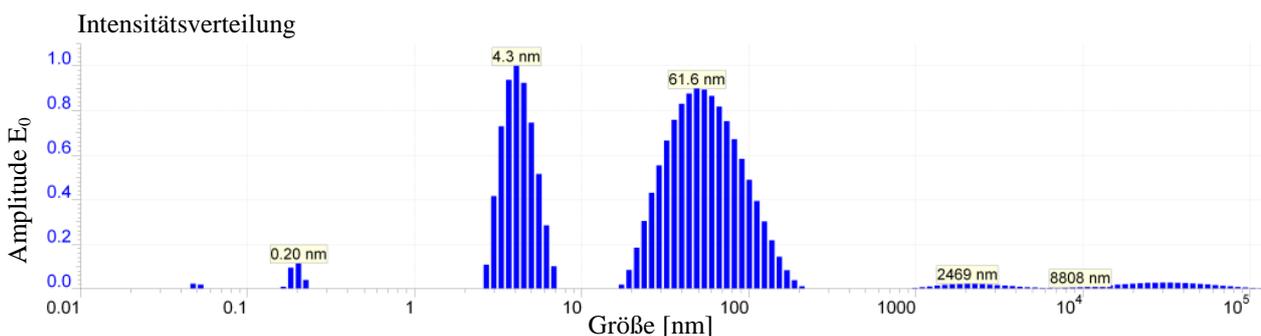


Abb. 5.3.2: Teilchengrößenverteilung des Cry3Bb1-Protein in PBST (phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 4,1 mM NaH_2PO_4 , 9,4 mM Na_2HPO_4 , 145 mM NaCl und 0,05 % Tween20) verdünnt (Originalabbildung verändert OmniSIZE Results Report).

5.4 DER ELISA ALS NACHWEISSYSTEM FÜR PROTEINE

Für das Proteinnachweissystem wurden mono- und polyklonale Antikörper entwickelt, produziert und im ELISA etabliert.

5.4.1 Etablierung Cry1A.105-ELISA

Um die Untersuchungen zur Sorption des synthetischen Cry1A.105-Proteins an den Partikeln der Korngrößenfraktionen durchführen zu können, wurde ein Cry1A.105-ELISA etabliert. In diesem Zusammenhang wurde durch die Blockierung der Platte das hohe Hintergrundrauschen der Nullwerte entfernt, die Durchführung vereinfachte sich v. a. durch die Verringerung der Anzahl verwendeter Puffer. Weiterhin konnte durch die Anpassung der Konzentration des Fangantikörpers ein sparsamerer Umgang mit den zur Verfügung stehenden Materialien erreicht werden. Auch das für die Farbreaktion eingesetzte Enzym wurde ausgetauscht und konnte in einer höheren Verdünnung eingesetzt werden. Bei der Bestimmung des *Limit of Detection* zeigte die Kalibriergerade ein hohes Bestimmtheitsmaß. Auch die Nachweisgrenze für das Cry1A.105-Protein konnte auf ungefähr $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$ gesenkt werden. Ein Überblick über das Protokoll bietet die *Tabelle 5.4.1*, das vollständig etablierte Protokoll ist im *Anhang A1* zu finden. Somit konnte der ELISA verbessert und erfolgreich etabliert werden.

Tab. 5.4.1: ELISA-Protokoll zum Nachweis des Cry1A.105-Proteins.

Komponente	Konzentration	Puffer	Inkubation
Goat anti-Cry1A.105 antibody	$1 \mu\text{g mL}^{-1}$	Beschichtungspuffer*	4 °C über Nacht
Blockierung		miproBLOCK C	37 °C 2 h
Antigen Cry1A.105-Protein		miproBLOCK C	37 °C 1 h
Anti-Cry1A.105-biotin antibody	$1 \mu\text{g mL}^{-1}$	miproBLOCK C	37 °C 1 h
Streptavidin HRP 80	1:5000	miproBLOCK C	37 °C 1 h
TMB, H ₂ O ₂		Phosphat-Citrat-Puffer**	RT 10 min
H ₂ SO ₄	25 %	Stopplösung	

*Beschichtungspuffer: 137 nM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4, **Phosphat-Citrat-Puffer: 0,05 M (Na₂HPO₄, Zitronensäure) pH 5,0.

5.4.2 Entwicklung und Produktion polyklonaler Antikörper gegen die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1

Die Menge der im Serum vorhandenen polyklonalen Antikörper (pAk) wurde mittels ELISA bestimmt. In der *Abbildung 5.4.2* ist als Maß für den Titer die Extinktion bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ für die Daten der Blutentnahme der drei Ziegen abgebildet. Tag 0 steht für die erste Blutentnahme vor der 1. Immunisierung. Die Titer stiegen für alle drei Ziegen und damit für die unterschiedlichen Cry-Proteine mit der Zeit von der ersten Immunisierung bis zur letzten Blutentnahme an. Am dritten Blutentnahmetag wurden die aus dem Blut gewonnenen pAk auf Kreuzreaktionen getestet (Daten nicht dargestellt). Die aus dem Blut gewonnenen pAk der Ziegen 2 (Cry2Ab2) und 3 (Cry3Bb1) wiesen kein kreuzreaktives Verhalten mit dem Cry1A.105-Protein auf.

Hingegen zeigten die Antikörper aus Ziege 1 (Cry1A.105) leichte Reaktionen mit den Proteinen Cry2Ab2 und Cry3Bb1 (nicht dargestellt).

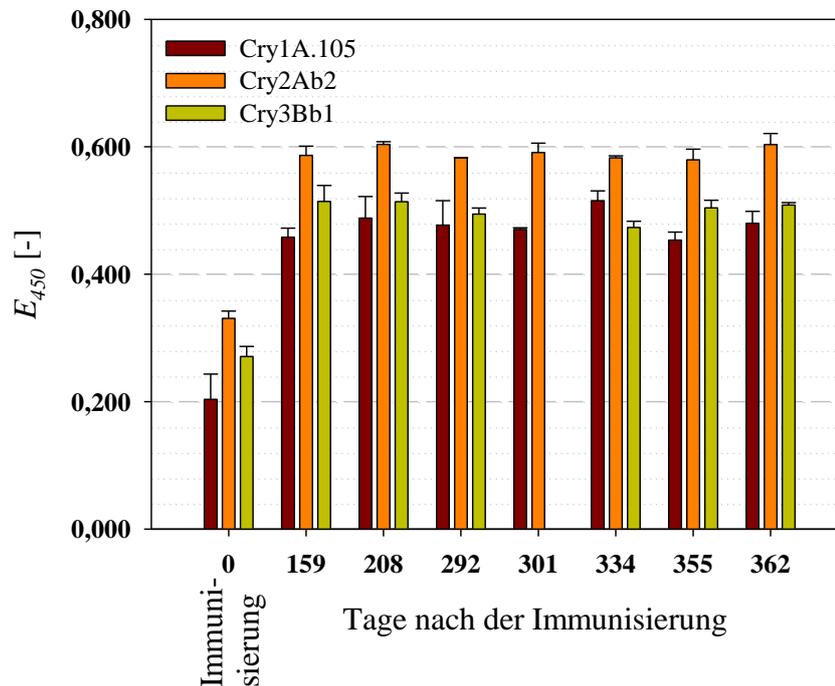


Abb. 5.4.2: Die Extinktion als Maß für den Titer über alle untersuchten Immunisierungstermine.

5.4.3 Entwicklung und Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper gegen das Cry1A.105-Protein

Die aus Mausmilzzellen über Hybridoma produzierten monoklonalen Antikörper (mAk) gegen das Cry1A.105-Protein wurden in einem ELISA auf Kreuzreaktionen mit den Proteinen Cry1A.105, Cry1Ab, Cry2Ab2, Cry3Bb1 und BSA getestet (Abb. 5.4.3 B)).

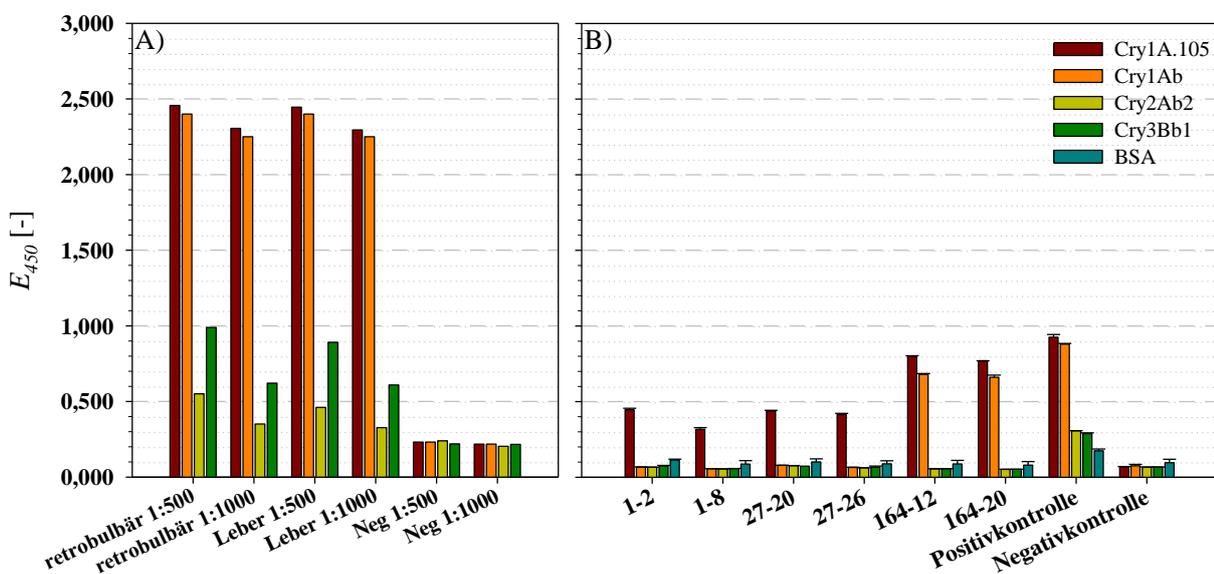


Abb. 5.4.3: Die Extinktion als Maß für A) den Antikörpertiter, sowie B) die Überprüfung des kreuzreaktiven Verhaltens der gegen das Cry1A.105-Protein generierten Klone.

Neben der erwarteten Reaktionen mit dem Cry1A.105-Protein, zeigten sich zusätzlich Kreuzreaktionen mit dem Cry1Ab-Protein in den Klonen 164-12 und 164-20, sowie in der Positivkontrolle. Weiterhin wurde vor der Fusion der antikörperproduzierenden Milzzellen mit den Tumorzellen der Maus Blut aus der Augenhintergrundvene und aus der Leber entnommen, das ebenfalls auf Kreuzreaktionen mit den Proteinen Cry1Ab, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 sowie auf die Antikörperproduktion gegen das geimpfte Cry1A.105-Protein getestet wurde (Abb. 5.4.3 A)). Es zeigte sich, dass die Impfung der Maus einen nachweisbaren Antikörpertiter erzeugt hatte.

5.4.4 Entwicklung und Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein

Gegen das Cry2Ab2-Protein wurden insgesamt 29 antikörperproduzierende Klone generiert, die zu den Klonnummern 102, 112, 814, 904 und 949 gehörten. Sie wurden zur Überprüfung ihrer Spezifität im ELISA getestet (Abb. 5.4.4). Alle Klone reagierten mit dem Cry2Ab2-Protein. Es gab weder Kreuzreaktionen mit den Proteinen Cry1Ab, Cry1A.105 und Cry3Bb1 noch mit den getesteten Medienbestandteilen.

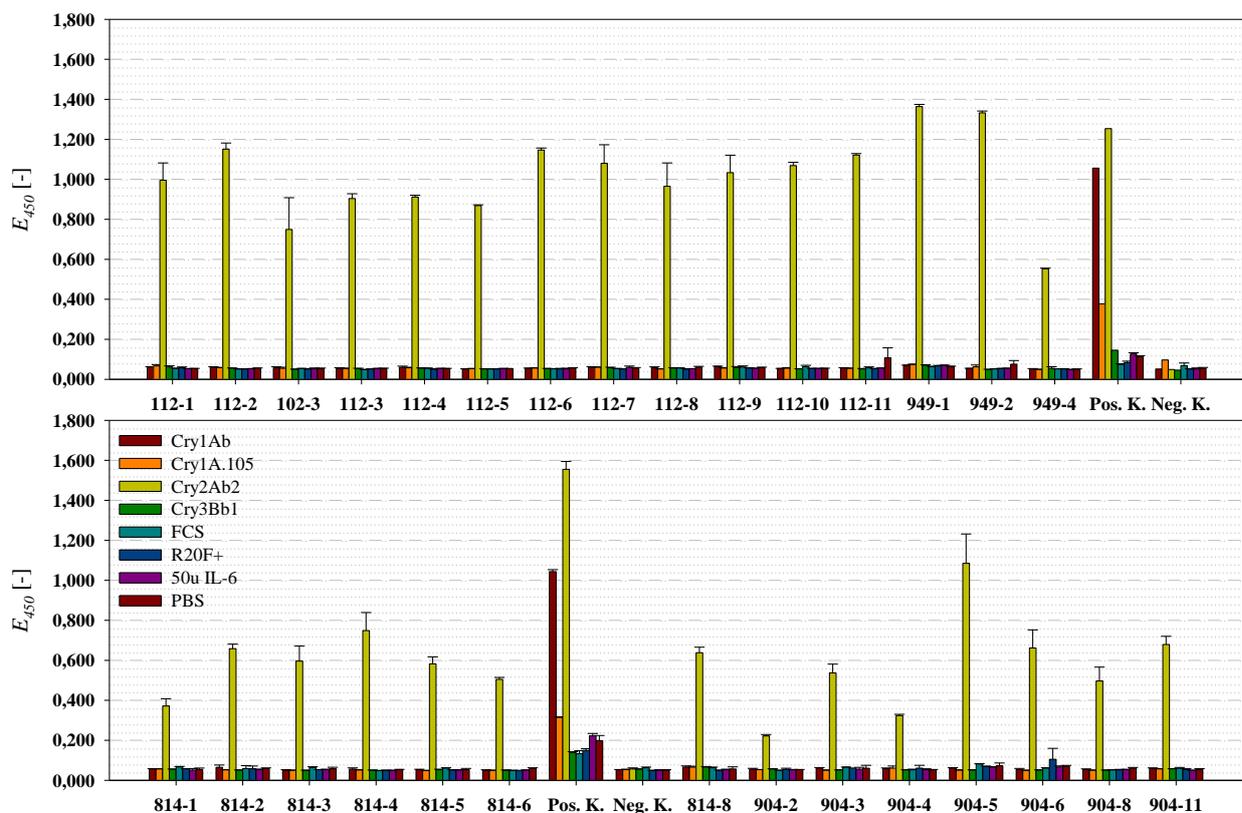


Abb. 5.4.4: Spezifität der gegen das Cry2Ab2-Protein generierten monoklonalen Antikörper (Die Extinktion dient als Maß für die Antikörperspezifität) (FCS = fetales Kälberserum, R20F+ = Medium, IL-6 = Wachstumsfaktor, PBST = phosphatgepufferte Kochsalzlösung).

5.4.4.1 Sterilitätskontrolle

Die Kontrolle der Zellkulturüberstände auf SAB- und DST-Agar zeigte nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen kein Wachstum von Hefen oder Pilzen.

5.4.4.2 Ig-Untergruppenbestimmung der monoklonalen Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein

Die Antikörperuntergruppenbestimmung ergab, dass alle getesteten Zellkulturüberstände die leichte Kette κ besaßen. Die Ig-Untergruppen waren wie folgt: 102-3: IgG₁, 112-2: IgG_{2b}, 814-4 : IgG₁, 904-5: IgG₁ und 949-1: IgG_{2b}. Da die Untergruppe G₁ kein Protein A bindet, wurde eine Protein-G-Reinigung der entsprechenden Klone durchgeführt.

5.4.4.3 Reinigung und Pufferaustausch der monoklonalen Antikörper gegen das Cry2Ab2-Protein

Für die Klone 102-3, 814-4 und 904-5 wurde ein erfolgreicher Pufferaustausch mit einer Ausbeute von jeweils ~ 3,5 mL, die in 0,5 mL Aliquots eingefroren wurden, durchgeführt. Die Konzentrationen lagen bei 0,267 mg mL⁻¹ (102-3), 0,77 mg mL⁻¹ (814-4) und 0,34 mg mL⁻¹ (904-5).

5.4.5 Etablierung Cry2Ab2-ELISA

Mit den zur Verfügung stehenden mono- und polyklonalen Antikörpern aus eigener Entwicklung und Produktion konnte als Nachweissystem für das Cry2Ab2-Protein ein ELISA etabliert werden. Bei Betrachtung aller untersuchten Fang- und Detektions-Antikörperkombinationen zeigten nur die Zusammenstellungen von 102-3 und 6314 Extinktionen für das Cry2Ab2-Protein, die sich deutlich vom Hintergrund der anderen Cry-Proteine abhoben (*Abb. 5.4.5a*).

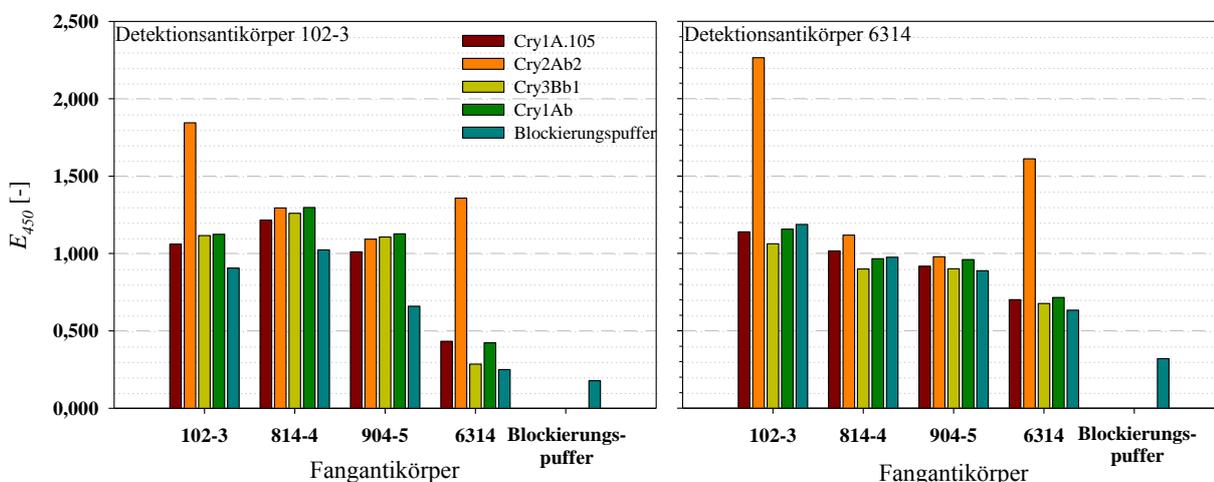


Abb. 5.4.5a: Auswahl der für den Cry2Ab2-ELISA geeigneten Antikörperkombination.

Die Kombination aus 102-3 und 6314 wurde dann mit verschiedenen Cry2Ab2-Protein- und Antikörperkonzentrationen untersucht und dadurch ein Hinweis auf die Nachweisgrenze erhalten. Die Kombination aus monoklonalem Fangantikörper 102-3 und polyklonalem Detektionsantikörper 6314 war die sensitivste (Abb. 5.4.5b). Das Diagramm ist nullwert-korrigiert, zeigt also die tatsächlichen Werte an. ELISA-Messergebnisse mit einer Extinktion von $< 0,1$ bei 450 nm wurden nicht als positiv gewertet. Unter dieser Voraussetzung ergab die Menge von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ für beide Antikörper, auch in geringen Proteinkonzentrationen von bis zu $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$, die besten Ergebnisse. Die Cut-Off-Bestimmung wurde mit den Klon 102-3 als Fang- und dem polyklonalen Antikörper 6314 als Detektionsantikörper durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle untersuchten Cry2Ab2-Proteinkonzentrationen oberhalb des berechneten Cut-Offs bei einer optischen Dichte, gemessen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$, von 0,482 lagen. Somit konnte auch eine Konzentration von nur $0,024 \text{ ng mL}^{-1}$ Cry2Ab2-Protein in diesem etablierten ELISA nachgewiesen werden.

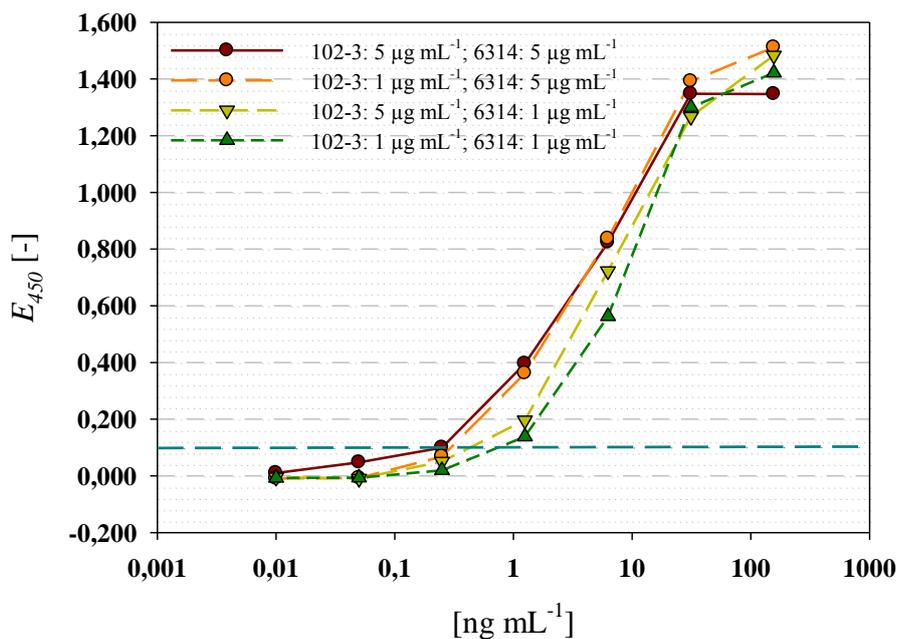


Abb. 5.4.5b: Variation der Konzentrationen von Fang- und Detektionsantikörper in Abhängigkeit von der Cry2Ab2-Konzentration. Der gestrichelte Balken kennzeichnet die Nachweisgrenze von $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$ bei einer Extinktion von 0,1.

Ein Überblick über das Protokoll befindet sich in *Tabelle 5.4.5*, das vollständig etablierte Protokoll ist im *Anhang A2* zu finden.

Tab. 5.4.5: ELISA-Protokoll zum Nachweis des Cry2Ab2-Proteins.

Komponente	Konzentration	Puffer	Inkubation
Monoklonaler Antikörper 102-3	5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	PBS*	4 °C über Nacht
Blockierung		miproBLOCK C	37 °C 2 h
Antigen Cry2Ab2-Protein		miproBLOCK C	37 °C 1 h
Biotinylierter polyklonaler Antikörper 6314	5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	miproBLOCK C	37 °C 1 h
Streptavidin HRP 80	1:5000	miproBLOCK C	37 °C 1 h
TMB, H ₂ O ₂		Phosphat-Citrat-Puffer**	RT 10 min
H ₂ SO ₄	25 %	Stopplösung	

*Phosphate buffered saline 0,5 % Tween20, pH 7,2, **Phosphat- Citrat-Puffer: 0,05 M (Zitronensäure, Na₂HPO₄) pH 5,0.

5.5 SORPTION DER PROTEINE CRY1A.105, CRY2AB2 UND CRY3BB1

Als Sorbenten für die durchgeführten Messungen dienten die Fraktionen Feinerde, Schluff und Ton. Jedoch zeichneten sich die Versuchspartellen durch einen sehr geringen Tongehalt aus (Kapitel 5.1.2), sodass trotz des Einsatzes eines optimierten Verfahrens zur quantitativen Gewinnung der Tonfraktionen, im Schnitt nur 1 - 2 g Ton gewonnen werden konnten. Da diese Mengen weit unter den erwarteten Tonmengen lagen, war es erforderlich, die darauf aufbauenden Messungen anzupassen.

5.5.1 Sorption an der Feinerdefraktion

Die Verteilungskoeffizienten (k) für die Sorption des Cry3Bb1-Proteins an der Feinerdefraktion des Oberbodens lagen in einem Bereich um $k = 31 \pm 15$ (Abb. 5.5.1).

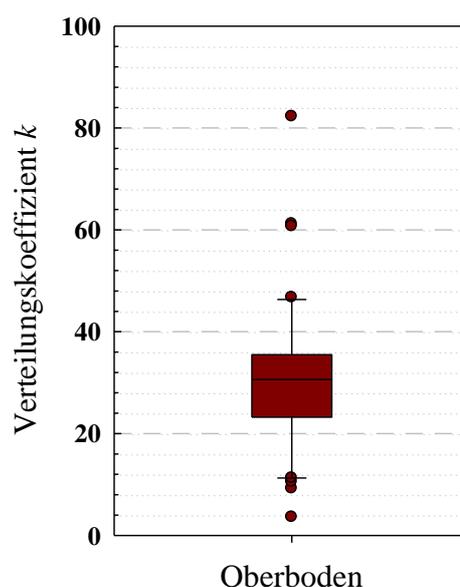


Abb. 5.5.1: Boxplot der Verteilungskoeffizienten k für die Sorption des Cry3Bb1-Proteins an der Feinerdefraktion.

Es konnten keine Zusammenhänge zwischen den k -Werten für das Cry3Bb1-Protein und den prozentualen Ton- und C_{org} -Gehalten, sowie der spezifischen äußeren Oberfläche der Feinerdefraktion gefunden werden (Pearson Product Moment Correlation). Weiterhin konnte bei Messungen am Cry2Ab2-Protein kein Sorptionsverhalten festgestellt werden. Da aus Voruntersuchungen (nicht dargestellt) bekannt war, dass das Protein Cry1A.105 an Lagerstättenton (Montmorillonit) noch schwächer sorbierte als das Cry2Ab2-Protein, wurde auf die Untersuchungen zum Sorptionsverhalten dieses Proteins an der Feinerdefraktion verzichtet.

5.5.2 Sorption an der Schlufffraktion

An den Schlufffraktionen der Ober- und Unterböden wurden die Verteilungskoeffizienten (k) für die Proteine Cry3Bb1 und Cry1A.105 bestimmt. Auch hier war keine Sorption des Cry2Ab2-Proteins messbar. In der folgenden *Abbildung 5.5.2* wurden die erhaltenen k -Werte für die beiden Proteine getrennt nach den Bodentiefen dargestellt. Für das Cry3Bb1-Protein lag die durchschnittliche Sorption im Oberboden bei $k = 111 \pm 48$ und im Unterboden bei $k = 87 \pm 47$. Die Werte für das Cry1A.105-Protein befanden sich im Oberboden um $k = 30 \pm 27$ und im Unterboden um $k = 40 \pm 17$. Auch zeigte sich im Gegensatz zum Cry3Bb1-Protein eine höhere Sorption an den Fraktionen des Unterbodens und generell eine niedrigere Sorption im Oberboden. Beim Cry3Bb1-Protein gab einen schwachen Zusammenhang zwischen der spezifischen negativen äußeren Oberflächenladung der Schlufffraktion und den k -Werten des Unterbodens ($R^2 = 0,379$) bzw. bei der Kombination der k -Werte des Ober- und Unterbodens ($R^2 = 0,359$) (Pearson Product Moment Correlation).

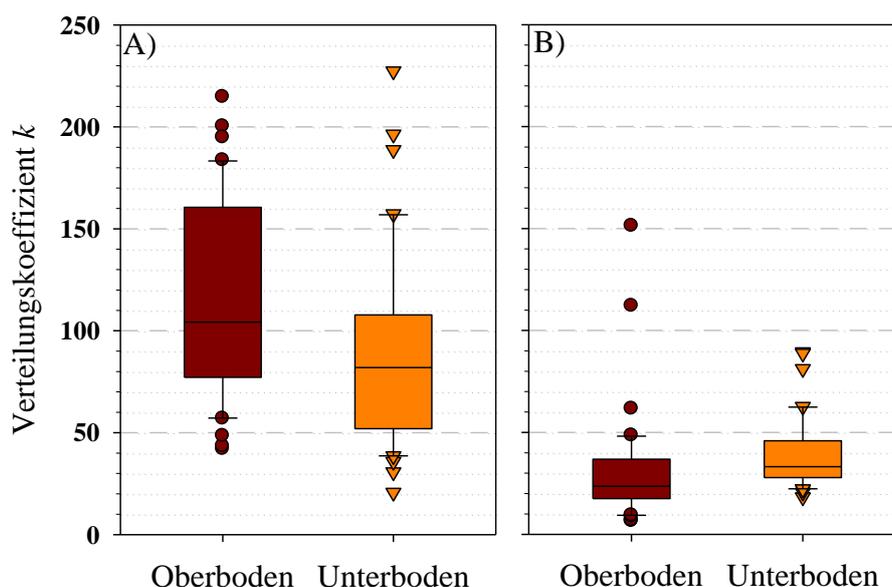


Abb. 5.5.2: Boxplots der Verteilungskoeffizienten k für die Sorption der Proteine A) Cry3Bb1 und B) Cry1A.105 an der Schlufffraktion des Ober- und Unterbodens.

5.5.3 Sorption an der Tonfraktion

In der *Abbildung 5.5.3* sind die Verteilungskoeffizienten k für die untersuchten Cry-Proteine an den unterschiedlichen Tonpools dargestellt.

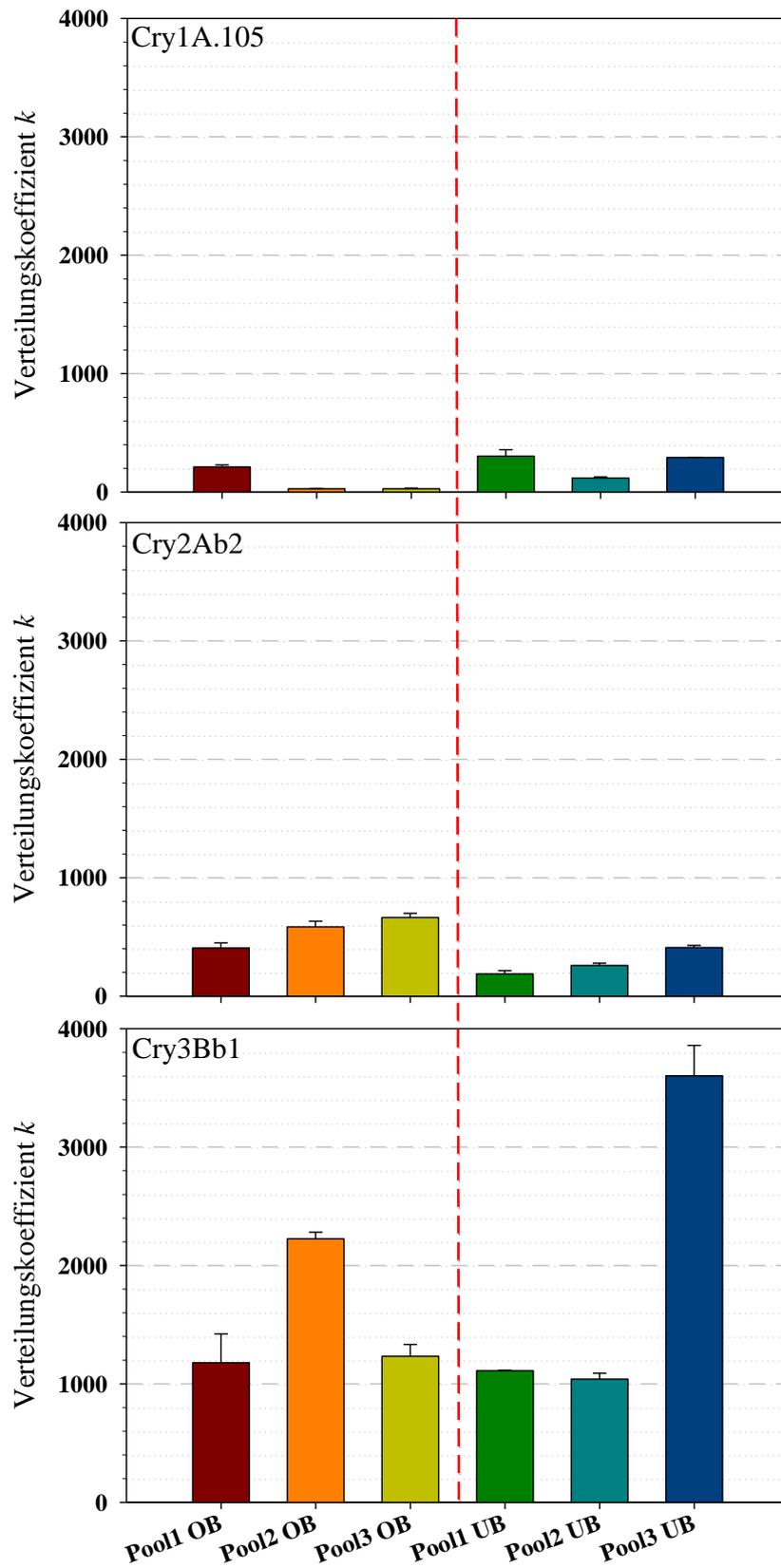


Abb. 5.5.3: Verteilungskoeffizienten k für die Sorption der Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 an den Tonpools des Ober(OB)- und Unterbodens (UB).

Für die Messung der Sorptionsisothermen an der Tonfraktion wurden die Proben des Ober- und Unterbodens in drei Gruppen (im Folgenden Tonpool) aufgeteilt. Die Aufteilung richtete sich wegen der geringen Tongehalte der Böden nach der bodenkundlichen Ansprache (*Kapitel 5.1*). An diesen Tonpools wurden für alle drei Cry-Proteine lineare, gut reproduzierbare Sorptionsisothermen gemessen. Es zeigte sich eine deutlich höhere Sorptionskapazität als an den Fraktionen $< 63 \mu\text{m}$ und $< 2 \text{mm}$ (vergleiche *Abb. 5.5.1* und *5.5.2*). Eine deutlichen Trennung der Verteilungskoeffizienten k zwischen Ober- und Unterboden, wie sie bei Hunfeld (2011) vorlag, ergab sich nur für das Cry2Ab2-Protein. Dieses wurde an den Tonpools des Oberbodens durchweg stärker adsorbiert als an der jeweils zugehörigen Unterbodenprobe. Im Gegensatz dazu sorbierte das Cry1A.105-Protein eher am Unterboden. Das Cry3Bb1-Protein zeigte keine ausgeprägte Präferenz.

5.5.3.1 Einfluss von DTT auf die Sorption

Die Konzentration von 0,001 mM DTT in der Zugabelösung hatte keinen Einfluss auf die Sorption des Cry3Bb1-Proteins am Tonpool 1 des Unterbodens. Die erhaltenen Verteilungskoeffizienten $k = 236,27$ (-DTT) und $k = 236,4$ (+DTT) unterschieden sich marginal voneinander.

5.5.3.2 Überprüfung der pH-Werte in den Sorptionsmessungen

Die gemessenen pH-Werte in dem frisch angesetzten Sorptionsversuchen für das Cry3Bb1-Protein unterschieden sich statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney Rank Sum Test, $n = 8$, $p = 0,234$) von den gemessenen pH-Werten nach 30 min im Überkopfschüttler. Hingegen gab es signifikante Unterschiede (Tukey Test) zwischen unterschiedlichen Reihen im Sorptionsversuch. Die pH-Werte in allen für das Cry3Bb1-Protein untersuchten Proben schwankten zwischen 7,6 und 8,2. In *Tabelle 5.5.3.2* sind die stichprobenartigen Messungen für die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 dargestellt.

Tab. 5.5.3.2: pH-Werte der Lösungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Einzelwerte).

Protein	Zugabelösung	Nach Zugabe	Nach 30 min
Cry1A.105	7,02	6,98	6,92
Cry2Ab2	6,9	7,11	6,94

5.5.4 Konkurrenzuntersuchungen an der Tonfraktion

Mit Hilfe von Konkurrenzuntersuchungen an den Proteinen Cry1A.105 und Cry2Ab2 wurde geklärt, ob eine Konkurrenz um Bindungsplätze im Boden besteht. Die *Abbildung 5.5.4* zeigt deutlich, dass es kaum Unterschiede in der Sorption zwischen den einzeln und den in

Kombination vorliegenden Proteinen gibt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im gewählten Konzentrationsbereich keine messbare Konkurrenz zwischen dem Cry1A.105- und dem Cry2Ab2-Protein auftritt.

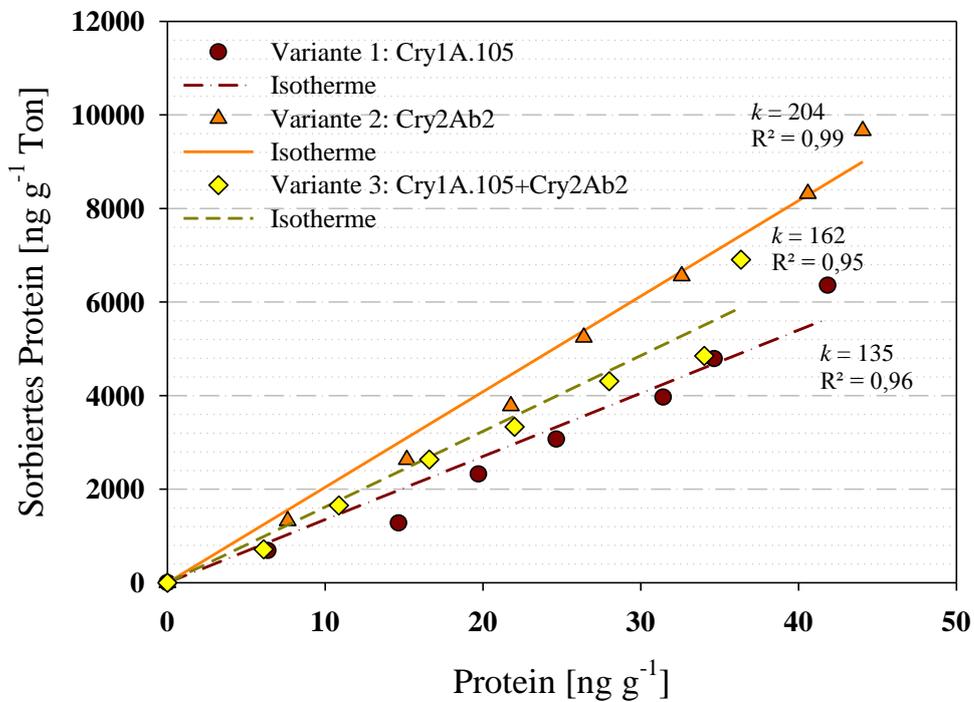


Abb. 5.5.4: In den Konkurrenzuntersuchungen für das Cry1A.105- und Cry2Ab2-Protein ermittelte Verteilungskoeffizienten k .

5.5.5 Zusammenhang zwischen der Sorption der Cry-Proteine und den Parametern der Tonfraktion

Die bestimmten bodenkundlichen und oberflächenchemischen Parameter (Korngröße, C_{org} -Gehalt, spezifische äußere Oberflächengröße, spezifische äußere negative Oberflächenladung, Ladungsdichte) wurden auf der Suche nach einem die Sorption der Cry-Proteine maßgeblich beeinflussenden Faktor aus dem Bereich des Bodens mit den aus den Sorptionsexperimenten erhaltenen, in Abhängigkeit vom jeweiligen Cry-Protein stark unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten k in Beziehung gesetzt.

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Verteilungskoeffizienten und der Korngröße (< 2 mm, < 63 μ m, < 2 μ m), wobei die Sorption umso höher war, je kleiner die Teilchengröße war (Abb. 5.5.5a). Für das Cry1A.105-Protein konnte die Abhängigkeit von der Korngröße nur zwischen der Ton- und der Schlufffraktion bestimmt werden, da keine Untersuchungen an der Feinerdefraktion durchgeführt worden waren. Auch die Abhängigkeit der Sorption des Cry2Ab2-Proteins von der Korngröße kann nur

angenommen werden, da hier nur die Tonfraktion untersucht wurde und in stichprobenartigen Messungen an der Feinerde- und Schlufffraktion keine Sorption dieses Proteins gemessen werden konnte.

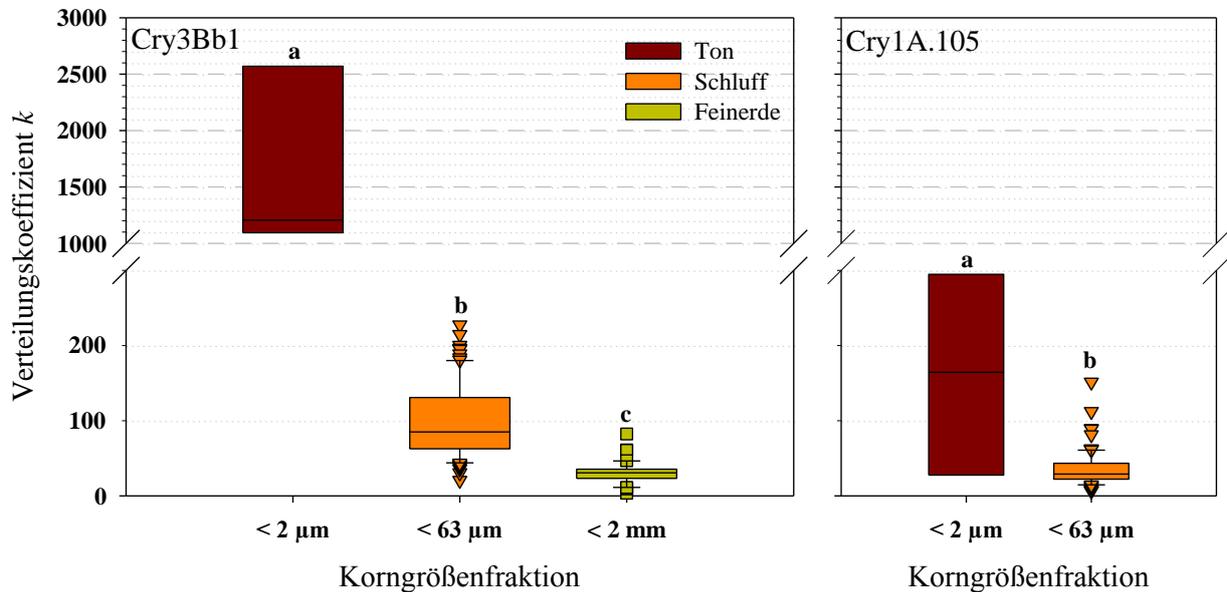


Abb. 5.5.5a: Höhe des Verteilungskoeffizienten k für die Proteine Cry3Bb1 und Cry1A.105 in Abhängigkeit von der Korngröße (Dunn's Method, Tonfraktion $< 2 \mu\text{m}$, $n = 6$, Schlufffraktion $< 63 \mu\text{m}$, $n = 80$, Feinerdefraktion $< 2 \text{mm}$, $n = 40$).

Solche klaren Zusammenhänge wie zwischen der Korngröße und den Verteilungskoeffizienten waren zwischen den k -Werten der drei Cry-Proteine und den vier anderen o. g. Parametern nicht herstellbar. In der *Abbildung 5.5.5b* wurden die Verteilungskoeffizienten k der Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 an den Tonpools 1 - 3 des Ober- und Unterbodens mit den Eigenschaften C_{org} -Gehalt, spezifische äußere Oberflächengröße, spezifische äußere negative Oberflächenladung und Ladungsdichte aufgetragen. Es zeigten sich keine deutlichen Zusammenhänge zwischen den Verteilungskoeffizienten k und den ausgewählten Bodeneigenschaften. Die durchgeführten statistischen Berechnungen (Pearson Product Moment Correlation) ergaben, dass keiner der gewählten Parameter einen Einfluss auf die Sorption der drei Cry-Proteine hatte.

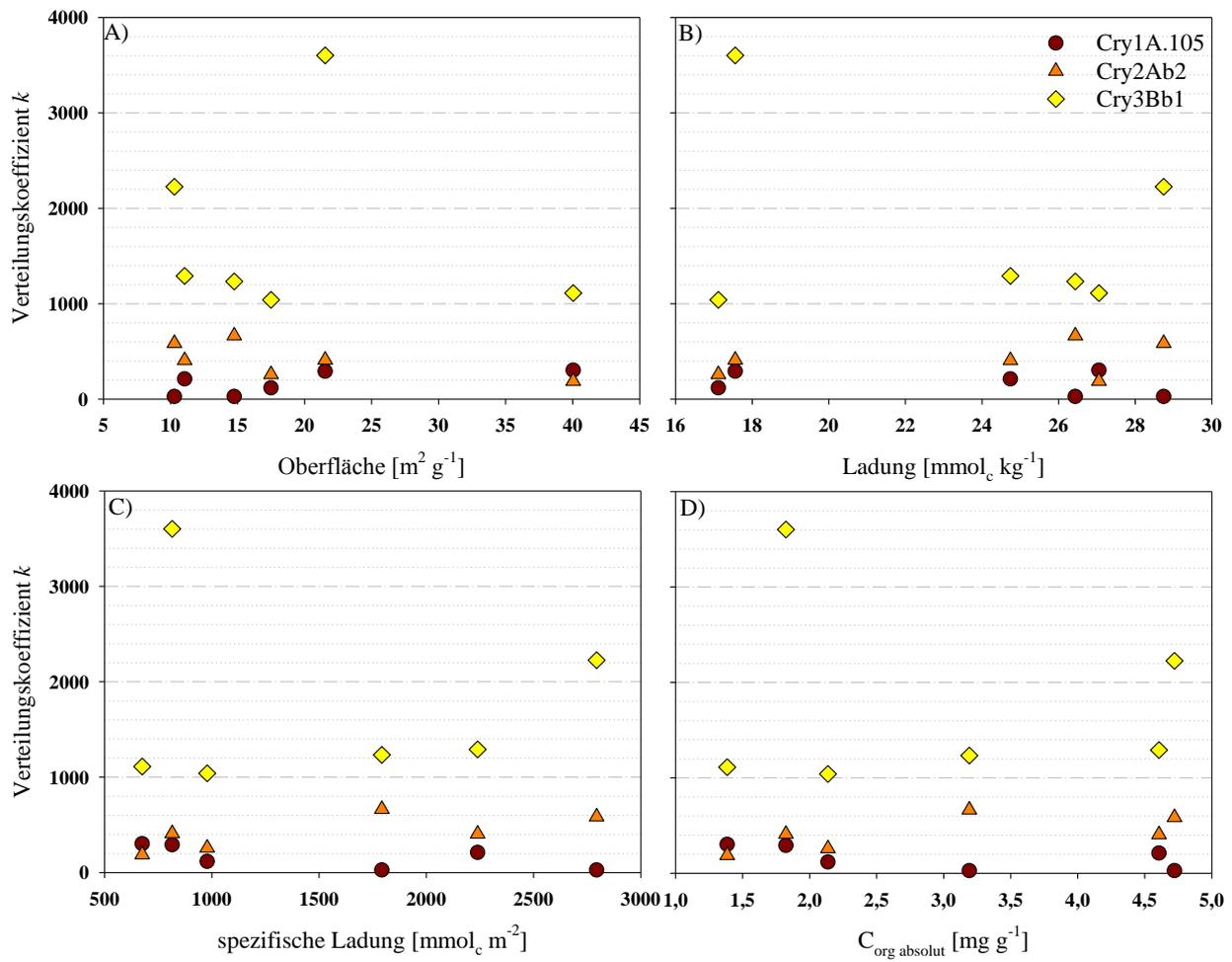


Abb. 5.5.5b: Beziehung der Verteilungskoeffizienten k mit A) der spezifischen äußeren Oberflächengröße, B) der Höhe der spezifischen äußeren negativen Oberflächenladung, C) der spezifischen Ladung und D) des C_{org} -Gehalts.

6 DISKUSSION

6.1 CHARAKTERISIERUNG DES REAKTANTEN BODEN

Als Grundlage für die Bewertung der Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und dem Boden wurde der Standort charakterisiert und ausgewählte Bodenparameter bestimmt, da die Kenntnis des Bodentyps und seiner Zusammensetzung eine Vorhersage über die Adsorptionskapazität der Böden gegenüber *B.t.*-Toxinen erlaubt (Muchaonyerwa *et al.* 2006).

6.1.1 Der Bodentyp

In Übereinstimmung mit Sauerbeck (2004), der für den Standort eine Bänderparabraunerde mit der Übergangsform Haftpseudogley-Bänderparabraunerde angab, wurde die Bänderparabraunerde als charakteristisch für das Versuchsfeld angesehen. Laut Bodenübersichtskarte der BRD (1 : 1 000 000) (bgr.bund.de - BUEK1000_Legende_kurz.pdf, 2012/05/05) kommen Bänderparabraunerden in Böden des wellig-hügeligen Flachlands und den Hügelländer vor und sind dabei a) aus sandigen Deckschichten über Geschiebelehm, b) im engräumigen Wechsel aus sandigen bis lehmigen Bildungen der Endmoränen oder c) aus nährstoffreichen Sanden entstanden. Die empfohlene Größe der angelegten Profilgruben wurde mit einer Mindestbreite von 80 cm sowie einer Mindesttiefe von 120 cm, bzw. bis zum C-Horizont berücksichtigt (Blume *et al.* 2011). Charakteristisch für alle gegrabenen Profile war das Vorhandensein von zwei A_h -Horizonten, von denen der untere wahrscheinlich durch die Auffüllung mit Plaggen (abgeschälten Streifen von Rasen oder Heide, Meyers, 1979) entstanden ist. In Parzelle E5 wurde das Vorkommen eines Materialwechsels zu einer 30 - 40 cm starken Steinsohle entdeckt. Diese ist wahrscheinlich durch die Ablagerung von Kies in einer glazifluviatilen Senke, welche hinterher mit Flugsand überdeckt wurde, zustande gekommen (vgl. auch Blume *et al.*, 2011).

Parabraunerden gehören zur Klasse der Lessivés und damit zur Abteilung der terrestrischen Landböden. Der Name leitet sich vom translokativen Tonverlagerungsprozess ab. Als sog. Lessivierung wird die Abwärtsverlagerung von Bestandteilen der Tonfraktion im festen Zustand bezeichnet (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Laut Autoren sind daran v. a. Bestandteile der Feintonfraktion ($< 2 \mu\text{m}$) wie Tonminerale, feinkörnige Fe-, Al- und Si-Oxide sowie mit Mineralteilchen verbundene Huminstoffe beteiligt, wobei die oberen Horizonte an Ton verarmen und die unteren tonreicher werden. Durch die Verlagerung von Ton mit Eisenoxiden ist der A_1 -Horizont heller und der B_1 -Horizont dunkler gefärbt im Vergleich zum B_v -Horizont der Braunerde (Gisi *et al.*, 1997). Der Übergang von einem Horizont zum nächsten kann, je nach petrografischen, chemischen und biologischen Voraussetzungen extrem scharf (mm-Bereich) bis vollkommen fließend sein (Gisi *et al.*, 1997). Auch in den in dieser Arbeit angelegten Profilen

gab es schärfere Abgrenzungen vom A- zum B-Horizont (Profil A1) und schwächer ausgeprägte Übergänge (Profile C6 und E5).

6.1.2 Tonausbeute

Für eine optimierte Tonausbeute sind einige Einflussfaktoren zu beachten, da sich bei der Durchführung der Abhebeversuche einige Herausforderungen ergaben.

So war die Einstellung der Fallhöhe schwierig, da ab einer Höhe von > 10 cm über dem Sediment die Flaschen konisch zuliefen und die Flaschen generell von eher quadratischer Form ($H = 15,5$ cm, $\varnothing \sim 16$ cm) waren. Sedimentationsgefäße mit einer größeren Fallhöhe und einem kleineren Durchmesser sind hier vorzuziehen. In der Regel wird die Fallzeit nach der Gleichung von Stokes über die Dichte von runden Quarzkugeln bestimmt, da dieses Mineral häufig in Böden vorliegt (Scheffer & Schachtschabel, 2010).

Nach dem Aufschütteln der Dispersion setzten sich die größeren Fraktionen relativ schnell wieder ab, wobei es zu einer ungleichmäßigen Sedimenthöhenverteilung kam. Dies mag durch den relativ großen Flaschenbodendurchmesser begünstigt worden sein, sodass angenommen werden kann, dass dieser Effekt bei einem geringeren Durchmesser schwächer ausgeprägt wäre. In diesem Zug kann auch davon ausgegangen werden, dass feinere und gröbere Bodenpartikel durch das Aufschütteln nicht ausreichend getrennt wurden, da Blume *et al.* (2011) von einer Disaggregation der Makroaggregate durch Ultraschallbehandlung sprechen

Beim Abhebern konnte nicht die komplette Tondispersion aufgefangen werden, da aufgrund des Aufbaus des Glasstabs, mit dem die Dispersion abgehbert wurde, stets Dispersionsreste in diesem zurückgehalten wurden. Außerdem wurden eventuell zu große Partikel abgehbert, da im Gegensatz zu dem System, das als Vorlage genutzt wurde, am unteren Ende unterhalb der zwei runden Öffnungen eine angebrachte Glaskugel fehlte. Diese wies einen größeren Durchmesser als das Absaugrohr auf, was eventuell Einfluss auf das Einströmverhalten der Dispersion hatte.

Ein weiterer Einflussfaktor auf den Abhebeversuch war die Temperatur des für den Versuch verwendeten H_2O_{dest} . Dieses wurde in 25 L-Standballons über Nacht ($t > 16$ h) im Versuchsraum aufgewärmt. Somit wurde eine konstante H_2O_{dest} -Temperatur angenommen.

Es konnte davon ausgegangen werden, dass bei acht Wiederholungen der Ton nicht komplett abgehbert wurde, da bis zu 29 Wiederholungen bis zur vollständigen Klarheit und Entfernung des Tons aus der Dispersion notwendig sind (Leinweber, 1995). Dies war aber auch nicht notwendig, da hier keine Tongehalte bestimmt wurden, sondern nur für die Versuche (siehe Kapitel 4.5.5) ausreichende Tonmengen erhalten werden sollten.

Nach der Fällung der Tonfraktion war es aufgrund des kleinen Flaschenhalses der Glasauffangflaschen und aufgrund der teilweise porösen Oberfläche des Kunststoffes schwierig, die Partikel von den Seitenwänden und dem Boden zu entfernen, sodass die Tonfraktion nicht vollständig entfernt werden konnte. Für eine erschöpfende Gewinnung der Tonfraktion hätten der Aufbau des Abhebesystems, der Versuchsablauf und die Art der Auffanggefäße optimiert werden müssen.

Das Chlorid, das für die Fällung als $MgCl_2$ zugeführt wurde, musste durch mehrere Waschschriffe aus der Tonfraktion ausgewaschen werden. Der Fortschritt wurde durch die Überprüfung der elektrischen Leitfähigkeit nachvollzogen. Jedoch wurde diese nicht, wie von Blume *et al.* (2011) vorgeschlagen, bei einer RT von 25 °C ermittelt, sondern bei etwa 20 °C. Um Tonverluste zu vermeiden, wurde die Leitfähigkeit nicht in der Dispersion, sondern im Überstand gemessen. Eine probeweise Überprüfung der Dispersion ergab, dass die Leitfähigkeit in dieser sogar noch geringer war als der zu unterschreitende Grenzwert, sodass es ausreichend war die Leitfähigkeit des Überstandes zu messen und diesen anschließend zu verwerfen.

Nach einiger Zeit wurden die in Aluschälchen aufbewahrten Dispersionen gefriergetrocknet. Hierzu sollten die Proben noch möglichst feucht bzw. von Flüssigkeit bedeckt sein, da der Ton dann pulverartig trocknet und fast rückstandsfrei entnommen werden kann. Ist hingegen die Dispersion an der Luft schon stark luftgetrocknet, lässt sich die Tonfraktion nur schwer aus den Aluschälchen lösen, sodass auch hier Verluste entstehen können.

Um das Problem der Kosedimentation (Blume *et al.* 2011) zu reduzieren, hätte der mengenmäßige Anteil der Tonfraktion in der Dispersion durch vorgezogene trockene Siebung der Feinerde auf 63 µm erhöht werden können. Der Einsatz einer kleineren Partikelgröße hätte evtl. den Vorteil geboten, die Kosedimentation kleiner Tonpartikel mit schneller absinkenden Sandfraktionsteilchen zu vermeiden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für eine optimierte Tonausbeute somit einige Einflussfaktoren zu beachten sind.

6.1.2.1 *Korngrößenverteilung der Tonfraktion*

Um die gewählte Methode des Abhebeversuchs zur Tongewinnung zu validieren, wurden Korngrößenverteilungsuntersuchungen an drei Tonfraktionen und einem Lagerstättenton (Montmorillonit) am Fritsch Particle Sizer (Analysette 22© Fritsch GmbH) bzw. am HELOS (Helium-Neon Laser Optisches System) (Sympatec) durchgeführt (Ergebnisse nicht dargestellt). Beide Geräte zeigten ein unterschiedliches Korngrößenverteilungsmuster für dieselbe Probe. Im Gegensatz zum Particle Sizer (0,3 - 13 µm) wurde am HELOS (0,2 – 12 µm) kein normalverteiltes Verteilungsmuster aufgenommen. Die Proben wurden mittels Ultraschall vollständig

dispergiert, da die Laserbeugung die Agglomeratgröße aneinanderhaftender Partikel misst und nicht die Primärpartikelgröße (Sympatec, 2009). Dennoch maßen beide Geräte Partikel mit einem Durchmesser von $> 2 \mu\text{m}$. Damit entsprechen nicht alle – aber der überwiegenden Teil – der Partikel in den gewonnenen Tonfraktionen der Größe von $\leq 2 \mu\text{m}$.

Diese Größenproblematik wird vielerorts diskutiert (Berthold *et al.* 2000). So wird für die Tonfraktion eine Teilchengröße von $\leq 2 \mu\text{m}$ angegeben. Das heißt aber nicht automatisch, dass es sich bei den in den Tonproben gemessenen größeren Partikeln nicht mehr um Ton handelte. Vielmehr ist zu beachten, dass bei dieser Angabe die Größe auch von der Tonzusammensetzung beeinflusst wird. So zeigt z. B. das Schichtsilikat Kaolinit oft eine größere Ausdehnung als $2 \mu\text{m}$. Auch ist bekannt, dass Korngrößenverteilungen, die über Sedimentationsmethoden bestimmt wurden, im Vergleich zu Messungen mit Lasergranulometern teilweise deutlich höhere Feinkornanteile im Bereich $< 2 \mu\text{m}$ aufwiesen (Berthold *et al.* 2000). Bei einer Korngrößenbestimmung über die Sinkgeschwindigkeit werden in der Regel zu hohe Werte für die Feinfraktionen bestimmt, da die Sinkgeschwindigkeit der Tonmineralplättchen deutlich geringer ist als bei einer Kugel mit dem entsprechenden Äquivalentradius. So induzierte die flache Form der Tonpartikel beträchtliche Unterschiede (acht Größenklassen) zwischen Pipett- und Lasermessungen: die $< 2 \mu\text{m}$ Korngröße, definiert durch die Pipettmethode, korrespondierte mit einer Korngröße von $8 \mu\text{m}$, definiert durch den Laser Particle Sizer für die untersuchten Sedimente (Berthold *et al.* 2000). Diese Unterschiede in den o. g. Messmethoden und zu den durch Siebanalysen gemessenen Größen sind schon seit Austin (1998) allgemein bekannt. Nach Konert & Vandenberghe (1997) können Tonpartikel mit einem Stokes-Durchmesser von ungefähr $2 \mu\text{m}$, gemessen durch ein Rasterelektronenmikroskop, eine Länge von $10 \mu\text{m}$ bei einer Dicke von ungefähr $0,4 \mu\text{m}$ haben. Daher ist es möglich, dass die von uns gemessenen Partikel lang und flach waren und aufgrund dessen eignete sich das hier angewendete Verfahren zur Tonabheberung.

6.1.3 pH-Werte

Da der pH-Wert nicht nur das Pflanzenwachstum direkt oder indirekt, sondern auch die biologischen, physikalischen und chemischen Bodeneigenschaften beeinflusst (Scheffer & Schachtschabel, 2002), wurden pH-Einzelmessungen im Ober- und Unterboden aller Parzellen sowie in den Schichtungen der Bodenprofile gemessen.

Die pH-Werte waren homogen verteilt, was von nicht unwichtiger Bedeutung ist, da der pH-Wert eine der wichtigsten Bodenkenngrößen ist und zur Einteilung der Böden verwendet wird (Scheffer & Schachtschabel, 2002). Für den Oberboden lagen die pH-Werte in einem für einen

Ackerstandort typischen Bereich, da intensiv ackerbaulich genutzte Böden z. B. Parabraunerden pH-Werte im schwach sauren Bereich zeigen (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Hingegen waren die pH-Werte des Unterbodens aufgrund des Anteils an verwitterbaren Silikaten höher als im Oberboden. Die chemische Verwitterung vieler Silikate führt größtenteils zu einem Verbrauch von Protonen und damit zu einer Pufferung des pH-Wertes von Böden (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Im Allgemeinen liegen die pH-Werte der meisten natürlichen Böden in einem Bereich zwischen pH 3 und pH 10 – hier zwischen pH 5,8 und pH 6,4 –, jedoch steigt der optimale pH-Wert von ackerbaulich genutzten Böden mit dem Tongehalt an. Ein Boden bedarf umso eher einer Gefügeverbesserung, je mehr Ton er enthält und dies ist durch eine pH-Erhöhung erreichbar (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Der Tongehalt lag hier jedoch in einem Bereich um nur 6,1 %, sodass kein höherer pH-Wert für eine Gefügeverbesserung notwendig war. Zusätzlich ist der Oberboden stärker durch die Auswaschung von Basen betroffen als der Unterboden, der über eine größere Pufferkapazität verfügt. Daher sind schwach alkalische bis schwach saure Böden in der Lage, Säureeinträge rasch und vollständig abzupuffern, da sie entweder Carbonate enthalten oder zumindest eine hohe Basensättigung der Austauschoberflächen besitzen (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Ein Tiefenverlauf der pH-Werte, der eine von oben nach unten fortschreitende Versauerung kennzeichnet, konnte auch in den Profilgruben gemessen werden. Weiterhin könnten die niedrigeren pH-Werte im Oberboden auch auf eine saure Düngerwirkung zurückzuführen sein. So kann die Anwendung von ammoniumbasierten Stickstoffdüngern zu einer signifikanten Zunahme der Acidität führen (Barak *et al.*, 1997) und eine pH-Absenkung durch Schwefeldünger, Harnstoff und ammoniumhaltige Dünger (z. B. Ammoniumsulfat, Ammoniumnitrat und Gülle) erfolgen (Gisi *et al.*, 1997). Der ideale Maisboden ist tiefgründig und gut strukturiert, reich an Nährstoffen, regelmäßig mit Wasser versorgt und hat einen pH-Wert zwischen 6,0 und 7,5 (Dierauer *et al.*, 2008). Die für den Maisanbau angegebenen pH-Werte konnten auf dem Versuchsfeld eingehalten werden.

In gut drainierten Böden schwankt die Totalelektrolytkonzentration der Bodenlösung aufgrund der stark variablen Bodeneigenschaften zwischen 0,001 und 0,01 mol dm⁻³ (Gisi *et al.*, 1997). Um dem Rechnung zu tragen, wurde die luftgetrocknete Feinerdefraktion in 0,01 M CaCl₂-Lösung dispergiert. Messungen in CaCl₂-Lösung liegen etwa 0,6 Einheiten tiefer als jene in reinem Wasser, sind aber besser reproduzierbar und geben die Verhältnisse im Boden besser wieder (Gisi *et al.*, 1997). Die Beeinflussung des Boden-pH-Werts durch die Ca²⁺-Aktivität und den CO₂-Partialdruck bei kalkhaltigen Proben (Schlichting *et al.*, 1995) konnte hier ausgeschlossen werden, da den Proben während der Korngrößenanalyse kein HCl zur Kalkzerstörung beigelegt werden musste und demnach einflussarmen Kalkgehalte angenommen

wurden. Wie eingangs erwähnt, zeichnete sich das Versuchsfeld insgesamt durch eine relativ hohe Homogenität bezüglich des Boden-pHs aus, da kleinräumige Unterschiede durch die Bodenbearbeitung verwischt werden, sodass Ackerflächen daher im Kleinbereich relativ homogene pH-Werte aufweisen (Gisi *et al.*, 1997). Auch wenn eine Homogenität des Standorts bezüglich der pH-Werte vorliegt, bleibt zu erwähnen, dass jeweils nur ein Wert pro Parzelle erfasst wurde, sodass die Werte statistisch nicht abgesichert waren.

6.1.4 Korngrößenverteilung und Bodenart

Die Körner der anorganischen Komponente bestimmen in der Regel den Charakter eines Bodens (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Dabei ist laut Autoren die Körnung eines bestimmten Bodens das Ergebnis des Zusammenwirkens von Ausgangsmaterial und seiner Entstehung, von Verwitterung und Abrundung sowie ggf. von der Sortierung durch Transport in strömendem Wasser oder durch den Wind. Wie durch Konert & Vandenberghe (1997) angegeben, wurden auch für diese Arbeit die Korngrößen der Bodenproben klassisch durch die Siebmethode für die grobkörnigen Fraktionen ermittelt. Die feine Fraktion wurde in Anlehnung an Atterberg (1912), basierend auf den Stoke'schen Sedimentationsraten, gewonnen. Damit ergaben sich für Ober- und Unterboden ähnliche Ergebnisse von ~52 % Sandanteil (abfallend von Reihe E nach A), ~41 % Schluffanteil (umgekehrter Trend) und ~6,1 % Tonanteil.

Im Allgemeinen unterliegt die Korngrößenverteilung im Oberboden aufgrund des Verwitterungsfortschritts und der Pflugbearbeitung einer geringeren Schwankung als die des Unterbodens. An Verwitterung und Mineralbildung sind physikalische, chemische und biologische Prozesse beteiligt, die zu einer Profildifferenzierung führen, da sie in den einzelnen Horizonten mit unterschiedlicher Intensität ablaufen und dabei in unterschiedlichem Maße verschiedene neue Minerale entstehen (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Die höheren Tongehalte, die in einigen Proben aus dem Unterboden der Reihe A gemessen wurden, sind möglicherweise auf eine Überschneidung der zwei Probenentnahmestellen pro Parzelle mit Tonbändern in der für den Versuchsstandort ausgewiesenen Bänderparabraunerde zurückzuführen.

Nachdem die Bodenmatrix durch verschiedene Trennverfahren (z. B. Sieben, Sedimentation) nach Korngrößen(klassen) fraktioniert worden ist, konnte die Bodenart aus den relativen Anteilen der Fraktionen Feinerde, Schluff und Ton abgelesen werden. Diese kann am einfachsten in Körnungsdiagrammen dargestellt werden. Das Versuchsfeld konnte gemäß dem Dreieckskoordinatensystem der Bodenarten des Feinbodens (Scheffer & Schachtschabel, 2002)

wegen der hohen prozentualen Anteile an Feinerde und Schluff und des niedrigen Tonanteils in die Kategorie schluffiger Sand eingeordnet werden.

6.1.5 Gehalt an organischem Kohlenstoff (C_{org})

Der Gehalt an organischem Kohlenstoff (C_{org}) ist ein wichtiger Indikator für die Bodenfruchtbarkeit. Böden mit organischer Substanz haben eine bessere Struktur, die die Wasseraufnahmefähigkeit erhöht und die Anfälligkeit des Bodens für Verdichtung, Erosion, Wüstenbildung und Erdrutsche verringert (Soco, 2009). Die bodenverbessernde Wirkung der organischen Bodensubstanz auf den Ertrag macht bis zu 5 % auf Lehmböden und bis zu 10 % auf Sandböden aus (Körschens, 1997), was bei den hohen Sandgehalten auf dem Versuchsfeld (siehe *Kapitel 5.1.4*) von großer Bedeutung sein kann. Da in der Literatur (Pagel-Wieder *et al.*, 2004) ein enger Zusammenhang zwischen der Sorption des Cry1Ab-Proteins und dem C_{org} -Gehalt der Partikel der Tonfraktion unbehandelter Proben festgestellt wurde, wurde dieser Gehalt auch hier bestimmt.

Der C_{org} -Gehalt wurde sowohl in den Feinerde- als auch in den Tonfraktionen aller Parzellen bestimmt. Laut Scheffer & Schachtschabel (2002) sind die höchsten Konzentrationen und Umsätze der organischen Substanz in den Oberböden zu finden, wobei die Humusgehalte im Unterboden meist zwischen 1 und 10 g kg⁻¹ liegen. Dies ist in Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnis von 8,9 g kg⁻¹. In genutzten Böden werden neben eingepflügten Ernterückständen organische Stoffe auch durch die Düngung zugeführt. Die Speicherung von C_{org} in Böden schwankt in einem weiten Bereich und wird u. a. vom Klima, der Vegetation, dem Grundwasserstand, der Durchwurzelungstiefe und der Textur gesteuert (Scheffer & Schachtschabel, 2002). Auch die Bodenart, die Lagerungsdichte und der Skelettgehalt haben einen Einfluss auf die Speicherung. Körschens (1997) gaben 0,5 – 2,5 % als C_{org} -Gehalt für grundwasserferne Sand- und Lehmböden in Abhängigkeit vom Gehalt des Bodens an Ton und Feinschluff an. Der hier gemessene C_{org} -Anteil für den Ober- und Unterboden der Feinerde befand sich mit ~ 1,7 % in diesem Bereich. Eine Untersuchung getrennt nach Ober- und Unterboden ergab einen höheren Gehalt organischer Substanz im Ober- als im Unterboden. Dies ist durch die ständige Zufuhr neuer Biomasse zur Feinerde im Oberboden durch Vegetationsrückstände und die Düngung zu erklären. An den jeweiligen Tonfraktionen wurden stets höhere C_{org} -Gehalte gemessen als an den entsprechenden Feinerdefraktionen. Dies ist auf das Vorliegen von Ton-Humus-Komplexen zurückzuführen, die die anorganische Bodensubstanz stabilisieren. Diese stammen aus dem Darmtrakt von Regenwürmern und Enchytraeen, in welchen sich organische und anorganische Bestandteile verbinden (Scheffer &

Schachtschabel, 2010). Diese Komplexe verzögern den Abbau der organischen Substanz (Gisi *et al.*, 1997).

6.1.6 Spezifische negative äußere Oberflächenladung

Aufgrund ihrer Kristallstruktur sind Tonminerale elektrisch geladen und können daher sowohl Anionen als auch Kationen binden (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Daher konnte auch hier die negative äußere Oberflächenladung der Ton- und Schlufffraktion gemessen werden. An der Oberfläche der Tonplättchen entsteht durch deren negative Oberflächenladung ein starker Belag an Kationen und über die entstehenden Kationenbrücken halten die Tonplättchen zusammen (Gisi *et al.*, 1997). Negative Ladungen auf Tonmineralien entstehen entweder durch isomorphen Ersatz von höherwertigen Kationen durch niederwertige Kationen in der Kristallstruktur (permanente Ladung), ohne die Kristallstruktur zu verändern, oder durch die Dissoziation von Protonen von der Oberfläche der Austauscher (variable Ladung) (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Die Ladungsverhältnisse in Böden hängen von den vorhandenen Bodenfestphasen (z. B. Tonminerale, Oxide, organische Substanz), dem pH-Wert des Bodens und den Konzentrationen an spezifisch adsorbierten Anionen, Kationen und organischen Substanzen ab (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Wie aus den *Kapiteln 6.1.3, 6.1.4* und *6.1.5* hervorgeht, gab es jedoch keine gravierenden Unterschiede unter den pH- Werten, dem Tongehalt oder der organischen Substanz auf dem Versuchsfeld, sodass eine starke Beeinflussung der Ladungsverhältnisse ausgeschlossen wurde. Die negative Oberflächenladung des Oberbodens wird nicht nur durch den Tongehalt, sondern auch durch den Anteil an organischer Substanz bestimmt. Daher waren im Oberboden mit seinen hohen C_{org} -Gehalten keine Korrelationen zwischen dem Tongehalt und der negativen äußeren Oberflächenladung zu beobachten. Weiterhin zeigte der Oberboden bezüglich der Oberflächenladung der Partikel der Schlufffraktion, aufgrund der Homogenisierung des Pflughorizontes, keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Parzellen und Reihen. Die höheren Werte in der Ton- im Vergleich zur Schlufffraktion sind bedingt durch die Partikelgröße und ihre zugehörige Kristallstruktur, die zu den Ladungsverhältnissen im Boden beitragen. Dabei korreliert die Höhe der negativen äußeren Oberflächenladung mit der Korngrößenverteilung bzw. dem Tongehalt der Böden des Unterbodens.

Bei der Durchführung der Messungen im Labor wurde darauf geachtet, dass nach jedem Titrationsvorgang Zylinder und Stempel unter fließendem Wasser mit Schwamm und Bürste gereinigt, mit voll entsalztem Wasser nach- und Reinstwasser abgespült, mit Kosmetiktüchern getrocknet und evtl. anhaftende Fussel mit Druckluft ausgepustet wurden, um Partikelrückstände zu entfernen und damit eine Beeinflussung der nachfolgenden Messung zu vermeiden.

6.1.7 Spezifische äußere Oberflächengröße

Da fast alle chemischen Reaktionen im Boden an den Grenzflächen zwischen Bodenlösung und Bodenpartikeln ablaufen, ist die spezifische Oberfläche entscheidend für das Ausmaß der Bodenprozesse (Gisi *et al.*, 1997). Daher wurde in dieser Arbeit die spezifische äußere Oberfläche der Feinerde- und Tonfraktionen bestimmt.

Trotz Aufbereitung der Probe zur Entfernung von Verunreinigungen vor der Messung konnte von unveränderten Oberflächeneigenschaften ausgegangen werden. Bei der Aufbereitung wurden verunreinigende Materialien, die das Oberflächenpotential hätten verändern können, entfernt. Schmelzen, Austrocknen, Sintern und Abbau sind die Vorgänge, die die Oberflächeneigenschaften der Bodenpartikel drastisch verändern können (FloVac Degasser Operation Manual P/N 05076). Bei einer bodenschonenden Behandlung beschleunigte die gewählte Temperatur von 60 °C das Ablösen von Kontaminationen und das angelegte Vakuum sorgte für einen Abtransport dieser.

Bei Adsorptionsuntersuchungen von Cry-Proteinen an Böden wurden in den wenigsten Fällen Angaben zur Oberflächengröße der Bodenpartikel gemacht. Ausnahmen sind 26 – 93 m² g⁻¹ für die Tonfraktionen verschiedener Ober- und Unterböden (Pagel-Wieder *et al.*, 2007) sowie 1,8 - 35 m² g⁻¹ für die Feinerdefraktion und 15 - 80 m² g⁻¹ für die Tonfraktion (Hunfeld, 2011). Die hier gemessenen Werte zur Oberflächengröße befanden sich in einem Bereich von 2,56 m² g⁻¹ für die Feinerde- und 20,9 m² g⁻¹ für die Tonfraktion, also in einem Bereich der den Illiten oder Kaoliniten zugeschrieben wird. Eine Bestimmung der genauen Tonmineralzusammensetzung wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die spezifische Oberfläche hängt von der Größe, Form und Oberflächenrauigkeit der Partikel ab (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Da jede Abweichung von der Kugelform die Oberfläche eines Körpers im Verhältnis zu seinem Volumen vergrößert, haben kleine plättchenförmige Partikel eine sehr viel größere spezifische Oberfläche als große kugelförmige Partikel gleicher Dichte. Deshalb hat insbesondere die Korngrößenverteilung (vor allem der Tongehalt) einen Einfluss auf die spezifische Oberfläche (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Entsprechend beträgt die Größe der spezifischen Oberfläche bei der Sandfraktion weniger als 0,1 m² g⁻¹, bei der Schlufffraktion 0,1 - 1 m² g⁻¹ und bei der Tonfraktion 5 - 500 m² g⁻¹. Dies konnte hier durch die kleineren Oberflächengrößen für die Feinerde- im Vergleich zu den größeren Oberflächengrößen für die Tonfraktion bestätigt werden. In Abhängigkeit von der Korngröße, der Mineralzusammensetzung und dem Gehalt an organischer Substanz liegt die spezifische Oberfläche von Böden im Bereich von wenigen m² g⁻¹ und etwa 500 m² g⁻¹ und steigt mit dem Gehalt an Ton, aufweitbaren Materialien und organischer Substanz an (Scheffer & Schachtschabel, 2002). Ein höherer

Tongehalt als Einflussfaktor auf eine höhere Oberflächen-größe konnte hier nur für die Parzelle A3 (Feinerde-Unterboden) und die Parzellen A2 und A3 (Ton-Unterboden) gefunden werden (vergleiche *Kapitel 5.1.4* und *5.1.7*).

Die Tonfraktion ist aufgrund der Größe ihrer spezifischen Oberfläche die wichtigste Fraktion für die Sorption gelöster Stoffe (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Unter den Tonmineralen weisen Smectite, Vermiculite, Illite, Kaolinite, Allophane, Imogolite, Goethite, Hämatite und Ferrihydrite wegen der unterschiedlichen Teilchengröße verschiedene Oberflächengrößen auf (Scheffer & Schachtschabel, 2002). Je größer die spezifische äußere Oberfläche, desto mehr Platz steht auch für die Adsorption der Cry-Proteine zur Verfügung. In den von uns untersuchten Proben zweier Fraktionen zeigte die Tonfraktion bedingt durch eine Partikelgröße von $< 2 \mu\text{m}$ eine wesentlich höhere Oberfläche als die Feinerdefraktion. Allumfassend betrachtet sind die geringen Schwankungen der Messwerte im Oberboden der Feinerde- und der Tonfraktion auf die Bodenbearbeitung und der dadurch erfolgten Homogenisierung des Oberbodens zurückzuführen, wie es bereits in den *Kapiteln 6.1.3* und *6.1.6* beschrieben wurde. Hingegen zeigten vier Proben der Feinerde- und Tonfraktion des Unterbodens größere spezifische äußere Oberflächen (siehe *Kapitel 5.1.7*). Diese Werte sind auf die fehlende Homogenisierung über die Bodenbearbeitung in dieser Bodentiefe von 40 - 60 cm und wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Ausgangsmaterialien der Bodenbildung bzw. auf eine Probenziehung im Bereich einer Tonader, wie sie bei der an diesem Standort vorliegenden Bänderparabraunerde auftreten, zurückzuführen.

Laut Pagel-Wieder & Fischer (2001) kann die Methode zur Bestimmung der äußeren Oberfläche mit N_2 und der BET-Gleichung (Brunauer *et al.*, 1938) bei der Anwendung auf das Bodenmaterial Nachteile haben. So beeinflusste erstens die organische Bodensubstanz (SOM) selbst die Adsorption von N_2 während der Messung, aufgrund der Freisetzung von gasförmigen Bestandteilen, und weiterhin war N_2 vielleicht nicht in der Lage, auf den Oberflächen der SOM zu adsorbieren. Daher wurde gesamte spezifische Oberflächengröße SOM-reicher Böden durch die N_2 -Adsorption eher unterschätzt (Pagel-Wieder & Fischer, 2001). Dennoch wurde diese Methode hier in den Untersuchungen zur Bestimmung der spezifischen äußeren Oberfläche eingesetzt, da die C_{org} -Gehalte in den Bodenproben in einem Bereich um 16 g kg^{-1} für die Feinerde- und um 32 g kg^{-1} für die Tonfraktion lagen und damit viel geringer waren, als die von den Autoren als problematisch angesehene getestete Menge von 141 g kg^{-1} organischer Bodensubstanz im A_h -Horizonts eines Mollic Gleysols (humoser Grundwasserboden).

6.1.8 Mineralstickstoffvorrat (N_{\min})

Der Mineralstickstoff gibt den aktuellen pflanzenverfügbaren N-Anteil eines Bodens an, der gleichzeitig auch der auswaschungsgefährdete Anteil ist (Blume *et al.*, 2011). Die N_{\min} -Gehalte dienen in der vorliegenden Arbeit als Maß für die Beurteilung eines möglichen Einflusses der Maishybriden MON89034 x MON88017 auf die Zersetzung von Streuresten. Im beobachteten Zeitraum konnte ein Einfluss der transgenen Maissorte auf den Streuabbau nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 5.1.9a). Der Streuabbau wird in vier Phasen (Absterbe-, Auswasch-, Zerkleinerungs- und mikrobielle Phase) gegliedert, die nahtlos ineinander übergehen und sich überlappen. Beim mikrobiellen Abbau organischen Materials im Boden entstehen neben Kohlenstoffprodukten durch Stickstoffmineralisierung auch anorganische Stickstoffverbindungen (Gisi *et al.*, 1997).

In den durchgeführten Untersuchungen wurde der pflanzenverfügbare zum Zeitpunkt der Probenentnahme mineralisierte Stickstoff im Oberboden (0 -20 cm) bestimmt. Im Allgemeinen erfolgt die Probenentnahme bis zur durchwurzelbaren Bodentiefe, um eine aussagekräftige Düngeempfehlung abgeben zu können, was hier aber nicht beabsichtigt war. Der Vorgang der Mineralisierung läuft in der Rhizosphäre bis zu viermal rascher ab als im wurzelfreien Boden (Gisi *et al.*, 1997). Deswegen wurden die Bodenproben zur N_{\min} -Bestimmung nur zwischen den Reihen und nicht innerhalb dieser genommen.

Die nach der Filtration der extrahierten Proben gemessenen NH_4^+ -Gehalte könnten durch die verwendeten Filter beeinflusst worden sein. Dies kann durch eine CaCl_2 -Spülung der Filter vor Gebrauch verhindert werden (Blume *et al.*, 2011).

Die biologische N_2 -Bindung über Mikroorganismen variiert stark in Abhängigkeit von klimatischen Einflüssen wie Einstrahlung, Temperatur und Niederschlag (Scheffer & Schachtschabel, 2010) und ein Temperaturanstieg verstärkt die Mikroorganismenaktivität. Da dies zu einer Erhöhung des N_{\min} -Wertes führen kann, wurden die Proben nach Entnahme in einer Isolierbox mit Kühlakkus vor Erwärmung und Sonneneinstrahlung geschützt.

Der pflanzenverfügbare Stickstoff im Boden ist sehr mobil, d. h. bei Regen findet eine Verlagerung in tiefere Schichten und bei Erwärmung durch die Kapillarwirkung des Bodens ein Transport zur Oberfläche statt. Die N-Auswaschung aus dem Wurzelraum in das Grundwasser erfolgt überwiegend als NO_3^- bei leicht durchlässigen Sandböden teilweise auch als NH_4^+ und in löslichen organischen Verbindungen (N_{org}) (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Der Anstieg der N_{\min} -Werte der Böden über die betrachteten Versuchsjahre basiert auf den zwei aufeinanderfolgenden strengen Wintern. In diesen wurde kaum N_{\min} aus dem Boden ausgewaschen, da die

Temperaturen sehr gering waren und der Boden lange schneebedeckt blieb. So lag die durchschnittliche Tagestemperatur in den meteorologischen Wintermonaten (Dezember, Januar und Februar) im Versuchsjahr 2009 (01.12.2008 - 28.02.2009) nur bei $1 \pm 3,6$ °C, im Versuchsjahr 2010 (01.12.2009 - 28.02.2010) bei $-1,1 \pm 4,7$ °C und im Versuchsjahr 2011 (01.12.2010 - 28.02.2011) bei $-0,1 \pm 4,7$ °C (DWD, 2012). Auch die durchschnittlichen Niederschlagsmengen für die o. g. Zeiträume deuteten auf eine geringe N_{\min} -Auswaschung hin. So fielen pro Tag $1,4 \pm 2,2$ mm Niederschlag im Zeitraum für das Versuchsjahr 2009, im Versuchsjahr 2010 $1,9 \pm 3,3$ mm und $1,8 \pm 2,6$ mm im Versuchsjahr 2011 (DWD, 2012). Die N_{\min} -Gehalte können je nach Bewirtschaftung, Witterung und Bodenverhältnissen 10 - 200 kg N ha⁻¹ betragen und sind u. a. vom Düngungsniveau und der Art der Vorfrucht abhängig (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Zwischenfrüchte haben u. a. die Aufgabe N_{\min} im Herbst aus dem Boden aufzunehmen und damit dessen Verlagerung in tiefere Bodenschichten und letztendlich ins Grundwasser zu verhindern. Durch Umbruch und Einarbeitung der Zwischenfrucht in den Boden kann dieser Stickstoff der nachfolgenden Kultur zur Verfügung gestellt werden (Rinnofner *et al.*, 2005). Die von uns gemessenen Werte lagen für die Versuchsjahre 2009 und 2010 ($8,4$ kg ha⁻¹ bzw. $7,9 \pm 1,4$ mg kg⁻¹) knapp unterhalb und im Versuchsjahr 2011 ($10,5 \pm 1,4$ kg ha⁻¹) knapp oberhalb der unteren Grenze. Auf tonarmen Sandböden ist der N-Vorrat nach niederschlagsreichen Wintern jedoch sehr gering (Scheffer & Schachtschabel, 2010).

Es stellt sich auch die Frage, ob die Wahl der Größe des Mineralstoffvorrats ein passender Anzeiger für die Ermittlung des Einflusses transgener Maishybriden auf den Streuabbau ist oder ob andere Methoden, wie z. B. die direkte Nachverfolgung des Streuabbaus, z. B. in Litterbags (Icoz & Stotzky, 2008a, Zurbrügg *et al.*, 2010), geeigneter wären. In diesen könnten die Abbauraten des pflanzlichen Materials beispielsweise auch über die Gehalte an Lignin oder Zellulose bzw. über die noch vorhandenen Cry-Proteine (Miethling-Graff *et al.*, 2009) über lange Zeiträume *in situ* auf dem Versuchsfeld bestimmt werden.

6.2 WURZELEXSUDATION VON PROTEINEN

Der Gehalt von Mineralstoffen im Boden wird nicht nur indirekt über den Eintrag von pflanzlicher Biomasse beeinflusst, sondern auch direkt über die kontinuierliche Abgabe von Wurzelexsudaten während der Wachstumsphase (Gisi *et al.*, 1997).

6.2.1 Wurzelexsudation von Proteinen in den Substraten Nährlösung und Quarzsand

Die Wurzelexsudation von Proteinen wurde schon oft untersucht (Borisjuk *et al.*, 1999, Charmont *et al.*, 2005, Basu *et al.*, 2006, Wen *et al.*, 2007). Im Laufe dieser Arbeit wurden

diesbezüglich neue Erkenntnisse gewonnen. So wurden in Mucilaten, die von 3 - 4 Tage alten keimfreien Maisprimärwurzeln abgesondert wurden, über nanoLC-MS/MS (nanoscale capillary liquid chromatography-mass spectrometer) 2848 unterschiedliche extrazelluläre Proteine identifiziert (Ma *et al.*, 2010ab), obwohl der Proteinanteil in den Mucilaten nur 1 – 6 % ausmachte (Chaboud, 1983, Bacic *et al.*, 1986). So wie in den in dieser Arbeit durchgeführten Nährlösungsversuchen ließen auch Bais *et al.* (2006) ihre Pflanzen *in vitro* in belüftetem Flüssigmedium wachsen und ernteten anschließend die Wurzelexsudate. Die von uns anfangs eingesetzte Hoaglandlösung, die auch bei Icoz & Stotzky (2008a) Verwendung fand, wurde wegen morphologischer Auffälligkeiten, bedingt durch Nährstoffmangel, gegen eine im Department für Nutzpflanzenwissenschaften (GAU Göttingen) erfolgreich verwendete Nährlösung ausgetauscht. Für die Gewährleistung eines guten Versorgungszustands der Pflanzen mit Nährstoffen fanden Nährlösungswechsel statt. Um eine bestmögliche Versorgung der Pflanzen sicherzustellen, sollte die Frequenz dieses Wechsels mit zunehmendem Pflanzenalter wegen des Biomassezugewinns erhöht werden.

Während unter sterilen Anzuchtbedingungen Wurzelexsudate meist qualitativ und quantitativ charakterisierbar sind, kann im natürlichen Rhizosphärenboden kaum zwischen echten Wurzelexsudaten, Mucilaten, Lysaten und mikrobiellen Metaboliten unterschieden werden (Gisi *et al.*, 1997). Jedoch darf nicht unbeachtet bleiben, dass die Flüssigkultur nicht die natürlichen Verhältnisse widerspiegelt, unter denen Maispflanzen normalerweise im Feld wachsen. So kommt es in Stängeln und Wurzeln aquatischer und überflutungstoleranter Pflanzen durch Zellseparation während der Entwicklung (Schizogenie) oder durch Zelltod (Lysogenie) zur Bildung von aerenchymatischem Gewebe (Sell, 2004). Dabei ist die Fähigkeit, lysogenes Aerenchym zu bilden, auch bei Pflanzen trockener Standorte weit verbreitet und wird insbesondere bei verminderter O₂-Versorgung induziert (Sell, 2004). Dennoch wurde auch in Pflanzen mit aerenchymatischen Wurzeln aufgrund eines erniedrigten Energiemetabolismus und gesteigerter Produktion von Ethanol, Alanin sowie Lactat eine begrenzte Sauerstoffversorgung festgestellt (Gibbs *et al.*, 1995). Daher wurde das Wurzelsystem der Pflanzen in den hier durchgeführten Versuchen zur Wurzelexsudation belüftet, was zu einem verbesserten Wurzelwachstum führte (Ergebnisse nicht dargestellt).

Nach Rovira (1969) ist es bei der Nährlösungskultur durch den Lösungswechsel möglich, die Exsudation stufenweise zu bewerten. Jedoch sind solche Wachstumsbedingungen künstlich und eine Extrapolation auf den Boden muss mit Bedacht vorgenommen werden. Dem Autor nach kommen die Bedingungen der Sandkultur dem Boden näher und erlauben die schrittweise

Probennahme durch Durchsickern, wobei dem Sand immer noch die chemische und physikalische Komplexität des Bodens fehlt.

Die Maishybride MON89034 x MON88017 exprimiert die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 zeitgleich. In den durchgeführten Versuchen mit den Substraten Nährlösung und Quarzsand wurde eine unterschiedlich hohe Exsudationsrate für die einzelnen Proteine und die verschiedenen Versuchseinstellungen gemessen. Dabei wurde das Cry3Bb1-Protein in den Nährlösungsversuchen stärker als die anderen Cry-Proteine exsudiert. Dies stimmte mit den Angaben von Monsanto (2004, 2006) überein, wo für die Sorten MON88017 und MON89034 unterschiedliche Proteinmengen in Abhängigkeit vom betrachteten Pflanzenteil (Blatt, gesamte Pflanze, Wurzel) und vom betrachteten Protein (Cry3Bb1, Cry2Ab2, Cry1A.105) gemessen wurden. Insbesondere in den Wurzeln, in denen die Cry3Bb1-Proteinmengen bei weitem die der Proteine Cry2Ab2 und Cry1A.105 überwogen, gab es große Unterschiede (Monsanto, 2004, 2006).

Bei den hier erzielten Ergebnissen ist zu beachten, dass alle Versuche entweder eine unterschiedliche Wachstumszeit und/oder einem anderen Aufbau folgten, sodass die Ergebnisse untereinander nicht unbedingt vergleichbar sind. Vergleiche zwischen Pflanzen sind nur gültig, wenn sie in identischen Umwelten und zu vergleichbaren Stadien der Pflanzenentwicklung durchgeführt wurden (Rovira, 1969). Es konnte mit den durchgeführten Exsudationsversuchen jedoch gezeigt werden, dass die Maishybride MON89034 x MON88017 über die untersuchten Wachstumszeiträume kontinuierlich alle drei Cry-Proteine exprimierte und über die Wurzeln im $\text{ng L}^{-1} \text{h}^{-1}$ -Bereich exsudierte (siehe *Abb. 5.2.2a*). In *Tabelle 6.2.1* sind die Proteinexsudationsraten aufgeführt.

Tab. 6.2.1: Wurzelexsudationsraten [$\text{ng L}^{-1} \text{h}^{-1}$].

Versuch	Protein / Datum	Cry1A.105 [$\text{ng L}^{-1} \text{h}^{-1}$]	Cry2Ab2 [$\text{ng L}^{-1} \text{h}^{-1}$]	Cry3Bb1 [$\text{ng L}^{-1} \text{h}^{-1}$]
In Nährlösung I	31.08.2010	7,83	5,6	18,83
	07.09.2010	4,25	4	10,58
	16.09.2010	3,5	2,83	3,92
In Nährlösung II	15.10.2010	4,08	2,58	10,75
	22.10.2010	2,6	1,42	4,5
	29.10.2010	3,16	1,83	4,08
In Quarzsand	07.12.2010	2,3	1,16	0,25
	13.12.2010	2,25	1,16	0,42
	15.12.2010	1,25	2,16	0,3

Pro Stunde wurden viele Proteine von den Wurzeln in das umgebende Medium abgegeben und würden somit auch unter natürlichen Bedingungen in die Umwelt gelangen. Icoz & Stotzky (2008a) fanden in Wurzelexsudaten $7,5 \pm 1,2 \text{ ng mL}^{-1}$ Cry3Bb1-Protein, also eine im Schnitt 10^3 höhere Konzentration. Die Versuchsaufbauten sind jedoch nicht miteinander vergleichbar, da dort Einzelpflanzen in 12 mL Nährlösung und hier sechs Pflanzen in 12 L Nährlösung angezogen wurden.

Die Wurzelexsudate wurden in allen durchgeführten Versuchen über einen Zeitraum von zwei Stunden in destilliertem Wasser gewonnen. Um eine mögliche Schwächung der Zellintegrität zu vermeiden, können Pflanzen mit $5 \cdot 10^{-4} \text{ M CaSO}_4$ ausgewaschen werden (Rovira 1969 zitieren McDougall & Rovira, 1965).

Die Daten von Monsanto (2004, 2006) zeigten, dass mit zunehmender Kulturdauer, also mit zunehmender Pflanzenbiomasse, die Produktion der Cry-Proteine in unterschiedlichen Pflanzengeweben abnahm. Dieser Trend konnte durch die Messungen in den Wurzelexsudaten bestätigt werden (siehe *Tab.6.2.1*). Hier handelte es sich um unsterile Versuche. Daher könnte ein Teil der exsudierten Proteine von proteinabbauenden Mikroorganismen verstoffwechselt worden sein, die auf den Wurzeln anhafteten und über die Kulturdauer mit der Wurzelmasse zunahmen.

Pflanzen, die in ihrer natürlichen Umwelt wachsen, unterstützen eine reiche Population von Bakterien und Pilzen auf und um ihre Wurzeln (Rovira, 1969, Brimecombe *et al.*, 2001). Dabei können die Mikroorganismen die Exsudation auf viele Weisen beeinflussen. Die wichtigsten Wirkungen sind der Einfluss auf die Permeabilität der Wurzelzellen, der Einfluss auf den Wurzelmetabolismus und die Adsorption bestimmter Verbindungen aus den Wurzelexsudaten durch Mikroorganismen und die Abgabe anderer Verbindungen (Rovira, 1969). Dabei sollte beachtet werden, dass die Bedingungen, unter denen die Organismen, wachsen sich sowohl physikalisch als auch bei der Ernährung von jenen unterscheiden, unter denen eine Rhizosphärenpopulation wächst. Aber nicht nur die Mikroorganismen beeinflussen die Exsudation, auch sie selbst werden durch die Exsudation organischen Materials in den Boden beeinflusst (Rovira, 1969). Der Autor schreibt weiterhin, dass die Exsudation organischer Verbindungen durch viele Faktoren verändert werden kann, was es erschwert, die Ergebnisse einer Pflanzenart oder aus einem Labor zu generalisieren. So variieren seiner Ansicht nach Menge, Bandbreite und Ausgewogenheit der Wurzelexsudate für die unterschiedlichen Pflanzenarten, das Pflanzenalter, die Raumtemperatur, die Lichtintensität, den Ernährungszustand der Pflanzen, die Mikroorganismen, das wurzelunterstützende Medium, die Boden-

feuchte und die Wurzelschäden. Auch hier unterschied sich die Cry-Proteinexsudatmenge zwischen den einzelnen Versuchen und den Zeitpunkten der Probeentnahme. Bei der Exsudatgewinnung konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es bei dieser sowohl in den Versuchen in Nährlösung als auch im Quarzsand zu physikalischen Verletzungen am Wurzelsystem der Pflanzen gekommen ist. So wurden die Pflanzen für die Exsudatgewinnung in den Nährlösungsversuchen in andere Gefäße umgesetzt und das Wurzelsystem vorher mehrmals mit destilliertem Wasser gespült. Beim Wachsen im Quarzsand könnten sich die Wurzeln bzw. die Wurzelhaare und -spitzen am Substrat verletzt haben. Auch Saxena *et al.* (2004) räumten ein, dass möglicherweise einiges des von Ihnen in Wurzelexsudaten detektierten Cry1Ab-Protein aus abgelösten oder beschädigten feinem Wurzelmaterial stammen könnte. So wurden bei alleiniger Betrachtung von Maiswurzelhaaren schon 2573 unterschiedliche Proteine in diesen nachgewiesen (Nestler *et al.*, 2011). Unklar ist wie das 66kDa-große Cry1Ab-Protein aus den Wurzeln intakt freigesetzt wird, da hierfür für gewöhnlich die Anwesenheit eines „Signalpeptids“ notwendig ist (Borisjuk *et al.*, 1999). Wenn die in den Pflanzen produzierten Cry-Proteine glykosyliert werden, werden sie ins extrazelluläre Medium bzw. an die Zellmembran transportiert (Rehm, 2006). Jedoch zeigte Monsanto (2004, 2006) für die in der Pflanze produzierten Cry1A.105-, Cry2Ab2- und Cry3Bb1-Proteine, dass sie nicht glykosyliert werden.

Nach Rovira (1969) darf erwartet werden, dass Schäden an den Wurzeln die Menge der organischen Substanzen, die von den Wurzeln abgegeben wird, beeinflussen. In der Natur sind Verletzungen durch Pflanzenwachstum oder Organismenbefall normal. Beim Wurzelwachstum werden Mucilate und Wurzelrand- und Wurzelspitzenzellen abgestreift (Gregory, 2006). In diese Richtung zielt auch die Frage von Ayers & Thornton (1968), die über einen experimentell induzierten Schaden diskutierten, der gleichwertig zu dem natürlicherweise auftretenden ist. Hier wurden mechanische Wachstumsschäden durch das Wachstum in Nährlösung vermieden. Schäden konnten aber beim Vorgang der Exsudatgewinnung auftreten. Andersherum traten im Substrat Quarzsand zwar Wachstumsverletzungen auf, aber höchstwahrscheinlich keine bei der Exsudatgewinnung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bei der Untersuchung der Exsudation von Pflanzen viele Einflussfaktoren sowohl biotischer als auch abiotischer Natur gibt, sodass sich hier kaum generelle, sondern meist nur fallbezogene Aussagen treffen lassen. Das komplexe Wechselspiel zwischen der Pflanze, ihren Exsudaten und der Umwelt bzw. den Mikroorganismen bietet ein weites Feld für tiefgreifendere Untersuchungen.

6.2.2 Test kommerzieller ELISA auf Kreuzreaktionen

Untersuchungen zeigten, dass die Cry-Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 auch mit den kommerziell erhältlichen Nachweissystemen für das Cry1Ab/1Ac- bzw. das Cry2A-Protein zuverlässig nachgewiesen werden können. Bedingt ist die hohe Reaktivität mit den Proteinen Cry1A.105 und Cry2Ab2 wahrscheinlich durch die große Sequenzhomologie (88 % und 87 % *Align Sequences Protein BLAST*) mit den Proteinen Cry1Ab/1Ac bzw. Cry2A. Demzufolge wird auch eine stark ähnliche dreidimensionale Struktur der Proteine auftreten, sodass die eingesetzten Fang- und Detektionsantikörper die gleichen Sequenzabschnitte binden könnten.

6.2.3 Cry-Proteinnachweis in Wurzelexsudaten

Immunologische Verfahren eignen sich besonders gut zum Nachweis von Proteinen auch in geringen Konzentrationen, also auch für die im Versuchsfeld erwarteten. Im ELISA konnten alle drei Cry-Proteine in den aufkonzentrierten Wurzelexsudaten im ng-Bereich nachgewiesen werden. Saxena *et al.* (2002b) zeigten per Toxizitätstest und Lateral Flow Quickstixs, dass das Cry1Ab-Protein durch Wurzeausscheidungen freigesetzt wurde. 2004 wiesen sie Cry-Proteine in Wurzelexsudaten transgener Maispflanzen nach. 1999 nutzten sie neben den Larventoxizitäts- auch immunologische Tests.

Die durch den Gellauf nach Größe aufgetrennten und angefärbten Proteine und Wurzelexsudate wiesen Banden in unterschiedlichen Stärken und Höhen auf. Dabei fanden sich durchaus Übereinstimmungen zwischen den aufkonzentrierten Wurzelexsudaten und den Cry-Proteinen (siehe *Abb. 5.2.2b*). Die Wurzelexsudate der Maissorten MON89034 x MON88017 und DKc5143 zeigten ein auf den ersten Blick sehr ähnliches Muster, was insofern zu erwarten war, als dass sich beide Sorten nur in den gentechnisch eingefügten Genkonstrukten unterscheiden, ansonsten aber identisch sind. Neben den Cry-Proteinen wurde ein breites Spektrum anderer Proteine, die nicht im Einzelnen identifiziert wurden, exsudiert. Auf eine nähere Bestimmung der Proteine konnte verzichtet werden, da eine kompositionelle Gleichwertigkeit zwischen MON89034 und konventionellen Maiskörnern gezeigt wurde (Monsanto, 2006) und Monsanto (2004) ebenfalls Untersuchungen zur substanziellen Gleichwertigkeit eingeleitet hatte. Daher konnte angenommen werden, dass sich die nah-isogene und die Sorte MON88017 nur in den eingefügten *cp4 epsps*- und *cry3Bb1*-Genen unterscheiden.

Trotz des Verzichts auf die Bestimmung der Exsudatzusammensetzung bzw. der in den Exsudaten enthaltenen Proteine kann jedoch laut Literatur davon ausgegangen werden, dass in den Exsudaten eine Vielfalt von organischen Verbindungen, einschließlich organischer Säuren, Aminosäuren, sekundärer Stoffwechselprodukte, Peptide, Proteine, Ureide, Lipide (Walker *et*

al., 2003, Bais *et al.*, 2006), Ionen, freier Sauerstoff und Wasser, Enzyme, Schleimstoffe und ein vielfältiges Spektrum von kohlenstoffhaltenden primären und sekundären Stoffwechselprodukten vorkommen (Bertin *et al.*, 2003). Außerdem werden Zucker, Enzyme, Vitamine, Nukleotide, Wachstumshormone, Flavone und anorganische Ionen erwähnt (Rovira, 1969, Schroth & Hildebrand, 1964).

6.2.4 Verlagerung von Proteinen und Risikoabschätzung

Intakte Wurzeln exsudieren laut Rovira (1969) relativ geringe Mengen organischen Materials. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Proteine auch auf dem Feld kontinuierlich in die Böden gelangen und in diesen verlagert werden (Saxena *et al.*, 2002a). Die Distanzen, die Wurzel-exsudate zurücklegen, sind abhängig von der exsudierten Menge, den chemischen Eigenschaften der Verbindungen (pH-Wert), der Empfindlichkeit der Verbindungen gegenüber mikrobieller Absorption und Abbau, den Tontypen und -mengen im Boden und der Bodenfeuchte (Rovira, 1969).

Im hier durchgeführten Versuch in Quarzsand wurden im Vergleich zu den Nährlösungsversuchen die geringsten Cry-Proteinkonzentrationen gemessen. Dies war insbesondere für das Cry3Bb1-Protein am deutlichsten zu sehen. Grund hierfür könnten die starken Sorptionseigenschaften des Proteins sein (siehe *Kapitel 6.5.2*), sodass es stärker an den Quarz bindet als die anderen Cry-Proteine. Überträgt man diese Daten auf das Feld, scheint es, dass das Cry3Bb1-Protein aufgrund seiner starken Affinität für jede Art von Grenzfläche im Boden nur über eine sehr geringe Distanz verlagert werden würde. Das Cry1A.105- und das Cry2Ab2-Protein könnten hingegen aufgrund ihrer schwächer ausgeprägten Sorptionsstärke schneller und weiter verlagert werden. Dies wird durch die Arbeiten von Prihoda & Coats (2008) unterstützt, in denen für das Cry3Bb1-Protein gezeigt wurde, dass dieses aus verfaulendem Pflanzenmaterial nicht in den Mineralboden sickert. Chevallier *et al.* (2003) fanden eine abnehmende vertikale Bewegung des Cry1Ab-Proteins in neu gepackten Bodensäulen mit zunehmendem Tongehalt. Für das Cry1Ab-Protein wurde eine stärkere Bindung und eine höhere Persistenz gezeigt und das Protein verblieb auch näher an der Oberfläche der Böden, die höhere Tonkonzentrationen enthielten (d. h. eine höhere Kationenaustauschkapazität (KAK) und spezifische Oberfläche hatten) (Saxena *et al.*, 2002a). Dies bedeutet, dass das Protein mit dem Oberflächenwasser (z. B. Regen, Bewässerung, Schneeschmelze etc.) über Oberflächenabfluss und Erosion transportiert werden kann. Weiterhin eluierte das Protein schneller durch Böden mit geringer Tonkonzentration, sodass es das Grundwasser kontaminieren könnte (Saxena *et al.*, 2002a). Aufgrund der Ähnlichkeit des Cry1Ab- und Cry1A.105-Proteins (50 %) (Monsanto, 2006) könnte vermutet

werden, dass das Cry1A.105-Protein auch schneller in tiefere Bodenschichten verlagert wird. Das Vorkommen von *B.t.*-Toxinen im Grundwasser könnte ein Risiko für aquatische Nichtziel-Lepidopteren darstellen (Stotzky, 2004). Zumindest hatte das Toxin, das im Boden über Wurzelausscheidungen und aus der Biomasse des *B.t.*-Mais freigesetzt wurde, keinen offensichtlichen Einfluss auf Regenwürmer, Nematoden, Protozoa, Bakterien und Pilze (Saxena & Stotzky, 2001a). Disperse Stoff, wie organische Moleküle, werden mit dem Bodenwasser durch Schwerkraft und Kapillarsog passiv transportiert (Gisi *et al.*, 1997). Douville *et al.* (2005, 2007) konnten das Cry1Ab-Protein meist nicht oder nur in Spurenkonzentrationen in aquatischen Umgebungen finden.

Der ansteigende Gebrauch von *B.t.*-Pflanzen könnte, im Vergleich zu kommerziellen Präparaten von *B.t.* (Tapp & Stotzky, 1998), zu einer Zunahme der Cry-Proteine im Boden führen (Icoz & Stotzky, 2008b), da nach der Ernte der kommerziell nutzbaren Pflanzenteile die Restauflage der pflanzlichen Biomasse mit enthaltenen Toxinen in den Boden eingearbeitet wird (Crecchio & Stotzky, 2001). Aufgrund dieser Befürchtungen wurde eine theoretische Berechnung der Verbleibmenge der Proteine Cry3Bb1, Cry2Ab2 und Cry1A.105 aus den Maissorten MON88017 und MON89034 auf dem Feld im Vergleich zur eingesetzten Proteinmenge in einer *B.t.*-Sprühanwendung durchgeführt. Dipel ist ein biologisches Insektizid, das auf einer natürlich vorkommenden Komponente aus *B.t.* sp. *kurstaki* basiert und eine ausgewogene Mischung aus fünf bakteriellen Proteintoxinen (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2a, Cry2Ab) und Sporen enthält, die die Effizienz erhöhen und beim Resistenzmanagement unterstützen (valentbiosciences.com/agricultural_products/agricultural_products_5.asp, 2012/05/04). Laut Quelle enthält die Formulierung Dipel Dupont (Stähler, Stade) 33,2 g Cry-Protein L⁻¹. Pro Hektar werden 2 L des Kontaktmittels benötigt, womit sich bei einer einmaligen Spritzung eine Gesamtproteinmenge von 66,4 g Cry-Protein ha⁻¹ ergibt. Hingegen werden die Cry-Proteine in den GM-Pflanzen kontinuierlich über die gesamte Wachstumsperiode in unterschiedlichen Geweben produziert. Nach den Daten von Monsanto (2004, 2006) wurde die maximal zu erwartende Gesamt-Cry-Proteinmenge in den Pflanzen in kg ha⁻¹ und die Proteinkonzentration in mg kg⁻¹ berechnet, wenn die vollständige Biomasse in die oberen 15 cm des Bodens eingearbeitet würden (*Tabelle 6.2.4a* grün hinterlegt). Es wurde von 25.000 Pflanzen Acre⁻¹ (entspr. ca. 61774 Pflanzen ha⁻¹) ausgegangen. Das Trockengewicht (TW) einer Pflanze lag bei 650 g, die Dichte des Bodens bei 1500 kg m⁻³, die Bodentiefe bei 15 cm und somit das Bodenvolumen eines Hektars bis 15 cm Tiefe bei 1500 m³ (Monsanto, 2004) sowie das Gewicht dieses Volumens bei 2250 t. Die Proteinkonzentrationen in der Trockenmasse wurde Monsanto (2006) entnommen. Für das Cry3Bb1-Protein wurde das Mittel über die während der Wachstumsstadien gesammelten Werte

von Monsanto (2004) eingesetzt. Werden die kg Protein ha⁻¹-Werte direkt auf die äquivalente Anzahl einzusetzender Spritzungen bezogen, ergeben sich über 100 Spritzungen p.a.. Im Vergleich zu den hier berechneten Werten fanden Nguyen & Jehle (2009) in ihren Untersuchungen, deutlich weniger Protein und liegen damit bei etwa 14 Spritzungen. Zu beachten ist, dass die verwendeten Zahlen aus den Elternlinien MON89034 und MON88017 stammen und nicht aus der Maishybriden, für die keine Daten vorlagen. Weiterhin sind die tatsächlichen Eintragsmengen, die in den Boden gelangen können, abhängig von der über die Ernte vom Feld abgeführten Biomasse.

Tab. 6.2.4a: Proteineintragsmengen durch Maispflanzen auf einem Hektar Anbaufläche.

Protein	Quelle	µg Protein g ⁻¹ TW gesamte Pflanze	kg Protein ha ⁻¹	mg Protein kg ⁻¹ Boden
Cry1A.105	Monsanto, 2006	240	9,64	4,28
Cry2Ab2	Monsanto, 2006	210	8,43	3,75
Cry3Bb1	Monsanto, 2004	352,5	14,15	6,29
Cry3Bb1	Nguyen & Jehle, 2009	-	0,905	-

Wird das exemplarisch in dieser Arbeit ermittelte Frischmasse-(FW)-Wurzel/Spross-Verhältnis (0,312) bzw. das TW-Wurzel/Spross-Verhältnis (0,209) (Ergebnisse nicht dargestellt) eingesetzt (vergleiche auch FW-Wurzel/Spross-Verhältnis von 0,44 aus Degenhardt (2000)), kann eine theoretische Berechnung der allein durch das Maiswurzelsystem auf dem Feld zurückbleibenden Cry-Proteinmenge durchgeführt werden. Um eine ähnliche Menge Cry-Protein über die Anwendung von *B.t.*-Sprühanwendungen in das Feld einzutragen, müssten theoretisch 5 - 21 Spritzungen bei Betrachtung der unterschiedlichen Proteine pro Jahr erfolgen.

Tab. 6.2.4b: Proteineintragsmengen durch Maiswurzeln auf einem Hektar Anbaufläche.

Protein	Quelle	µg Protein g ⁻¹ TW Wurzel*	kg Protein ha ⁻¹	mg Protein kg ⁻¹ Boden
Cry1A.105	Monsanto, 2006	39,5	0,33	0,147
Cry2Ab2	Monsanto, 2006	37	0,31	0,138
Cry3Bb1	Monsanto, 2004	206,7	1,73	0,771

* theoretisches Wurzel-TW von 135,85 g

Auch die theoretische Exsudatmenge kann berechnet werden (Tab. 6.2.4c). Dabei wird hier pauschal angenommen, dass die Proteine unabhängig vom Pflanzenalter, dem Ernährungszustand und der Tageszeit abgegeben werden. Im längsten durchgeführten Versuch I (Kapitel 4.2.1) wurden die Maispflanzen für 60 Tage kultiviert, sodass im betrachteten Zeitraum Proteine im µg-Bereich exsudiert wurden. Für alle Proteine sind die hier errechneten Werte etwa halb so

hoch, wie die in *Tabelle 6.2.4b* berechneten Proteineintragsmengen durch Maiswurzeln (Spalte: mg Protein kg⁻¹ Boden). Diese Werte werden aber sehr wohl durch die oben ausgeschlossenen Faktoren beeinflusst, so dass diese Rechnung nur als Annäherung angesehen werden darf.

Tab. 6.2.4c: Hochrechnung der Proteinexsudationsraten über die Kultivierungsdauer im Versuch I mit Nährlösung.

Protein	Ø ng L ⁻¹ h ⁻¹	Kulturdauer [d]	Kulturdauer [h]	Exsudatmenge [µg L ⁻¹]
Cry1A.105	5,19	60	1440	7,47
Cry2Ab2	4,14	60	1440	5,96
Cry3Bb1	11,11	60	1440	15,99

Interessant wäre eine Überprüfung dieser berechneten Werte im Feld über die Aufnahme von Langzeitexsudationen, um einen Vergleich zwischen der gesamten Cry-Proteinexsudation über die Wurzeln in einer Maispflanzenkulturphase und dem Eintrag über die Biomasse ziehen zu können. Weiterhin stellt sich die Frage, ob die Pflanzen zu viele Cry-Proteine für ihren Schutz vor herbivoren Insekten produzieren oder ob nicht eine Limitierung der Expression auf bestimmte den Insekten exponierte Gewebe sinnvoll wäre, um die Eintragsmengen der Proteine in den Boden zu verringern.

6.3 REAKTANTEN: BESCHREIBUNG DER PROTEINE CRY1A.105, CRY2AB2 UND CRY3BB1

Nicht nur die Wechselbeziehungen zwischen Wurzelexsudation und Pflanze bedürfen weiterer Betrachtung; geklärt werden müssen auch die Eigenschaften und das Verhalten der Cry-Proteine, die die Wechselwirkungen mit den Partikeln der Korngrößenfraktionen beeinflussen.

6.3.2 Cry-Proteinmodelle

Da u. a. die insektizide Aktivität der Monsanto-Konstrukte erhalten bleibt (Monsanto, 2004, 2006), wurde angenommen, dass die in *E. coli* produzierten Proteine, die in unseren Untersuchungen zum Einsatz kamen, mit denen aus der Pflanze identisch sind. Deswegen konnten mit Hilfe des Programms *Dialign* Sequenzvergleiche der Proteine mit dem AS-Muster ähnlicher Proteine durchgeführt und dadurch die Werte für das M_w, den Isoelektrischen Punkt und die Hydrophobizität für die einzelnen Domänen annähernd bestimmt werden. Die Proteine zeichneten sich durch unterschiedliche M_w aus, wobei sich das Cry2Ab2- und Cry3Bb1-Protein in einer ähnlichen Größenklassen (70,9 kDa und 74,5 kDa) befanden und das Cry1A.105-Protein mit 133,3 kDa viel schwerer war. Das M_w kann Einfluss auf die Bindung eines Proteins an die Tonoberfläche haben. So schien die an Tone gebundene Proteinmenge mit dem M_w des Proteins

anzusteigen (Stotzky, 1986). Später wurde jedoch gezeigt, dass das größere Protoxin schlechter bindet als das kleinere Toxin (Venkateswerlu & Stotzky, 1992).

Beim IEP wiederum sind sich das Cry1A.105- und das Cry3Bb1-Protein ähnlicher (5,01 und 5,73) und unterscheiden sich vom Cry2Ab2-Protein mit einem IEP von 8,53. Der IEP hat Einfluss auf die Ladung eines Proteins in einer Lösung. Wenn in der Lösung ein durchschnittlicher pH-Wert von 7 (siehe *Kapitel 5.5.3.2*) vorherrscht, trügen die Proteine Cry1A.105 und Cry3Bb1 eine negative und das Cry2Ab2-Protein eine positive Summenladung. Bei pH-Werten unterhalb des IEPs positiv geladene Proteine können über Kationenaustauschreaktion adsorbiert werden (Albert & Harter, 1973). Da bei pH-Werten oberhalb des IEPs das Protein negativ geladen ist, nimmt die Adsorption als Ergebnis der abstoßenden, elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem „Netz“ der negativ geladenen Tonoberfläche der Tone und den dissoziierten anionischen funktionellen Gruppen des Proteins ab (Pagel-Wieder *et al.*, 2004). Dennoch konnte hier für das Cry3Bb1-Protein die höchste Adsorption gezeigt werden (*Kapitel 5.5.3*).

Auch bei der durchschnittlichen Hydrophobizität ähnelten sich die Proteine Cry1A.105 und Cry3Bb1 (-0,429 und -0,431). Das Cry2Ab2-Protein war mit 0,293 etwas hydrophober und wird damit eher von Wasser abgestoßen (Ben-Naim, 1980). So wurde die Adsorption von Cry1Ab als abhängig von hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen beschrieben (Helassa *et al.*, 2009, 2011).

Die dreidimensionale Struktur von Proteinen kann durch kristallographische Verfahren ermittelt werden (Rhodes, 1993). Der Einfluss der Proteinkonformation auf das Sorptionsverhalten wird detailliert in *Kapitel 6.5* diskutiert. Alle Methoden zur Proteinstrukturaufklärung haben ihre Stärken und Schwächen und werden unzweifelhaft als komplementäre Methoden für die vorhersehbare Zukunft koexistieren (Rhodes, 1993). Es stellt sich aber die Frage, ob das kristallisierte Protein mit dem natürlicherweise vorliegenden Protein identisch ist. Viele Proteine besitzen im kristallinen Zustand noch ihre Funktion, kristallographische Modelle sind kompatibel mit chemischen Proteinuntersuchungsergebnissen und manchmal wurde die identische Struktur von mehr als einem Kristalltyp für dasselbe Protein erhalten. Daher ist von einer unveränderten Proteinstruktur im Kristall auszugehen (Rhodes, 1993). Die Autorin weist darauf hin, dass stabile Proteinkristalle eine große Menge von geordneten und ungeordneten Wassermolekülen enthalten, sich der Kristall also immer noch in einem wässrigen Zustand befindet, abhängig von denselben Lösungseinflüssen, die die Struktur in der Lösung stabilisieren. Insofern kann davon ausgegangen werden, dass die per Proteinkristallographie von

anderen Autoren erhaltenen Daten, für die Interpretation des unterschiedlichen Sorptionsverhaltens der Cry-Proteine (*Kapitel 6.5*) in dieser Arbeit herangezogen werden können.

Wichtig ist insbesondere der Umgang mit den durch die Kristallographie erhaltenen Daten zur dreidimensionalen Proteinstruktur. So dürfen diese Modelle nur als statische Abbildung dynamischer Objekte wahrgenommen werden, die aus vielen ähnlichen Strukturen gemittelt wurde, die aber auch fehlerbehaftet sein kann (Rhodes, 1993). Dieser Satz hat auch eine große Bedeutung für die Interpretation der von uns erhaltenen Daten. Auf den ersten Blick gibt es zwischen den Proteinen trotz stark unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten (siehe *Kapitel 5.3* und *5.5*) keine Unterschiede. Es ist ungewiss, ob es ausreichend ist, die Proteine in ihrer Gesamtheit zu betrachten oder ob vielleicht nur kleine Abweichungen in einer einzelnen Domäne des Proteins, wie es z. B. die PCEA (siehe *Kapitel 6.5*) darstellt, den Unterschied bei der Bindung ausmachen. Insbesondere muss bei der Proteinbeschreibung darauf geachtet werden, dass von den für die Modellierung eingesetzten Proteinen nur das Modell für das Cry3Bb1-Protein diesem zu 100 % entsprachen. Für die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 standen keine identischen Strukturen zur Verfügung. Hier wurde stattdessen mit möglichst identischen Modellen gearbeitet. So stimmte das Modell 1ciyA zu 77 % mit dem Cry1A.105-Protein, das Modell 1i5pA immerhin zu 88 % mit dem Cry2Ab2-Protein überein.

6.3.2 Aggregationsverhalten

Mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) wurde in Tastversuchen ein Aggregationsverhalten der Cry-Proteine in höheren Konzentrationen [$\mu\text{g mL}^{-1}$] festgestellt. Es zeigte sich, dass die verschiedenen Proteine in unterschiedlichen Größen aggregierten, wobei weder die Art des Lösungsmittels noch die Verdünnungsstufe einen gleichbleibenden Einfluss auf die Aggregatgröße hatte, sodass die Ergebnisse im Detail nicht weiter dargestellt wurden. Das Aggregationsverhalten der Proteine mit der Methode der DLS konnte nicht bei den niedrigen Konzentrationen [ng mL^{-1}], die in den Sorptionsversuchen eingesetzt wurden, untersucht werden. Daher ist diese Methode nicht dazu geeignet, die in unseren Versuchen (siehe *Kapitel 4.5*) vorliegenden Bedingungen realistisch abzubilden. Bedingt durch niedrigere Konzentrationen im Sorptionsversuch kann eine Proteinaggregation als weniger wahrscheinlich angesehen werden und aufgrund der pH-Werte von $> 6,5$ könnte eine Polymerisation der in den Sorptionsuntersuchungen (siehe *Kapitel 6.5.2.2*) eingesetzten Cry-Proteine sogar ausgeschlossen werden. So wurde ein pH-Wert von $> 6,5$ und eine Ionenstärke von mind. 150 mM NaCl als notwendig angegeben, um das Cry1Aa-Protein in Lösung und in einem monomeren Zustand zu halten (Helassa *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass ein pH $< 6,5$ auch bei hohen

Ionenstärken von 350 mM NaCl eine Polymerisation nach sich zog. Der pH-Wert in den hier durchgeführten Versuchen lag (siehe *Kapitel 5.5.3.2*) bei $> 6,5$, die Ionenstärke wurde allerdings nicht gemessen. Da die Cry-Proteine ein hohes Oligomerisierungspotential aufweisen, müssen die Proteinkonzentrationen in der Lösung so gering sein, dass ein Aufeinandertreffen der Proteine unwahrscheinlich ist bzw. die Inhaltsstoffe in der Lösung eine Aggregation verhindern. Um ein Aggregationsverhalten der Cry-Proteine in den Kalibrationsgeraden der Sorptionsuntersuchungen über die Zeit auszuschließen, wurden diese direkt vor ihrer Verdünnung und dem anschließenden Auftrag auf die ELISA-Platte angesetzt.

6.4 DER ELISA ALS NACHWEISSYSTEM FÜR PROTEINE

So wie für die Bindung eines Proteins an eine Oberfläche per PCEA (*Kapitel 6.5.2*) nur kleine Bereiche auf dem Protein notwendig zu sein scheinen, so werden ebenfalls nur kleine Bereiche auf den Cry-Proteinen von Antikörpern erkannt. Auch die entwickelten und produzierten monoklonalen und polyklonalen Antikörper aus den Systemen Maus und Ziege binden einzelne bzw. verschiedene Epitope.

6.4.1 ELISA-Etablierung

Der hier eingesetzte Sandwich-ELISA diente vor allem der Quantifizierung von Antigenen, in diesem Fall der Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1, die in niedriger Konzentration im ng mL^{-1} -Bereich in komplexen Mischungen, in Suspensionen von unterschiedlichen Korngrößenfraktionen vorlagen (Lottspeich & Zorbas, 1998).

Der erste Schritt bei der Entwicklung eines ELISAs betrifft die Wahl der geeigneten Festphase, die hoch, mittel oder niedrig proteinbindend ist und runde, konische oder flache Böden aufweist (Raem & Rauch, 2007). Im etablierten Test wurde eine hoch proteinbindende Festphase mit flachen Böden aufgrund der Messung im Plattenphotometer ausgewählt. Der Vorteil des eingesetzten direkten Sandwich-ELISAs gegenüber einem indirekten liegt darin, dass er weniger Inkubationsschritte umfasst, wodurch das Auftreten von unspezifischen Bindungen minimiert wird. In diesem System ist in einem definierten Konzentrationsbereich das Messsignal direkt proportional zur Analytkonzentration in der zu messenden Probe (Raem & Rauch, 2007).

Bei der Etablierung von ELISAs werden Inkubationszeiten, -temperaturen, Puffer und Antigen-, Antikörper- sowie Konjugatkonzentrationen solange variiert, bis eine möglichst kleine Antigenmenge sicher und spezifisch nachgewiesen werden kann. Dabei finden die ausreichend stabilen Reaktionspartner bei höheren Temperaturen schneller zueinander (Luttmann *et al.*, 2009). Unterschiedliche Temperaturen während der Inkubation betreffen die äußeren Wells

stärker als die Inneren und dieser Gradient kann das Verhalten der Reaktionspartner negativ beeinflussen (Raem & Rauch, 2007), sodass hier die Inkubationszeiten hauptsächlich in konstanten Wärmeschränken bei 37 °C durchgeführt wurden.

Ein Fangantikörper wurde eingesetzt, um einen Einfluss auf die Orientierung des Antigens zu haben, der bei einer Antigenbindung direkt an die Oberfläche nicht gegeben ist (Rehm, 2006). Die Art der Bindung auf der Mikrotiterplatte ist verhältnismäßig pH-unabhängig, da sie hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht. Das Blockieren der Platte soll verhindern, dass alle nach dem Fangantikörper hinzugefügten Substanzen an die Platte binden und zu einem ungewollten Hintergrundrauschen führen (Luttmann *et al.*, 2009). Ein Verlust durch Reagenzienbindung an die Wände der Wells wurde durch die Verdünnung aller Substanzen in Blockierungspuffer, mit Ausnahme des Substrats, vermieden (Raem & Rauch, 2007). Eine Bedingung des Sandwich-ELISAs ist, dass Fang- und enzymmarkierte Detektionsantikörper unterschiedliche Epitopspezifitäten besitzen, da sonst das Epitop bereits vom Fangantikörper besetzt ist (Schütt & Bröker, 2011). Daher wurde hier als Fangantikörper ein monoklonaler und als Detektionsantikörper ein polyklonaler Antikörper eingesetzt, da polyklonale Antikörper unterschiedliche Epitope erkennen (Schütt & Böker, 2011). Die Bildung von Bi- oder Multilayern, die sich kontraproduktiv auf den ELISA auswirken, konnte durch die Wahl einer Konzentration von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Antikörper ausgeschlossen werden. Die optimal einzusetzende Antikörperkonzentration liegt zwischen $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Höhere Konzentrationen würden zur Bildung instabiler Bi- bzw. Multilayer führen (Luttmann *et al.*, 2009). Diese Konzentrationsvorgabe der Autoren sowie die Angaben zum Volumen pro Well (50 - 200 μL) und zur Inkubationszeit (2 – 8 °C, 10 – 18 h) wurden eingehalten. Auch für die Enzymkonjugatkonzentration eines Sandwich-ELISAs gibt es Angaben, nach denen 0,05 - 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in Frage kommen. Für eine hohe Sensitivität des Assays wird eine Kombination von HRP (horseradish peroxidase) als Marker und dem kolorimetrisch detektierbaren Substrat TMB vorgeschlagen (Luttmann *et al.*, 2009), die hier auch eingesetzt wurde. Weiterhin sollen die ELISA-Platten zwischen den Inkubationsschritten mit dem Antigen bzw. den Antikörper gut gewaschen werden, um die Spezifität der Signale zu erhöhen (Rehm, 2006). Jedoch wird beim ELISA die Gefahr beschrieben, dass stringente Wasch- und Inkubationsschritte einen Teil des adsorbierten Antigens oder Antikörpers wieder ablösen. Hier wurde mit einem automatischen Plattenwascher gewaschen, der den Puffer PBS pH 7,2 mit 0,5 % Tween20 verwendete und dabei pro Waschung die Platte dreimal mit je 200 μL Puffer Well⁻¹ spülte. Eine negative Auswirkung des Waschvorgangs wurde aufgrund der hohen ELISA-Sensitivität ausgeschlossen.

Die theoretisch maximale Sensitivität eines Sandwich-Assays liegt bei 10^{-15} bis 10^{-16} mol L⁻¹ (Luttmann *et al.*, 2009). Zur Berechnung der Nachweisgrenze, des sogenannten „Cut-Off“-Wertes, wurde zum Mittelwert des Nullwerts die mit drei multiplizierte Standardabweichung addiert (Cut-Off = M + (3 · SD)). Die etablierten Nachweissysteme erreichten hohe Sensitivitäten mit Nachweisgrenzen im ng mL⁻¹-Bereich von 0,5 ng mL⁻¹ für den Cry1A.105-ELISA und 0,024 ng mL⁻¹ für den Cry2Ab2-ELISA. Damit liegt der in dieser Arbeit etablierte Cry1A.105-ELISA am unteren Ende des Nachweisbereichs (0,438 – 14 ng mL⁻¹) des Herstellerprotokolls (Monsanto, 2006), ist also vergleichbar gut. Der etablierte Cry2Ab2-ELISA war sogar um eine Zehnerpotenz sensitiver als das Herstellerprotokoll (0,219 - 7 ng mL⁻¹) (Monsanto, 2006). Die Nachweisgrenze ist abhängig vom verwendeten ELISA-Typen (z. B. direkter, indirekter oder Sandwich-ELISA), von der Art des eingesetzten Proteins und von der Reinheit der genutzten Agenzien. So könnten sich im Cry2Ab2-ELISA durch eine Protein-G-Reinigung des Serums 6314 (pAK Cry2Ab2) eine mögliche Sensitivitätssteigerung und damit ein geringerer Antikörpereinsatz ergeben.

6.4.2 *Entwicklung und Produktion von Antikörpern*

Sowohl monoklonale Antikörper gegen Cry1A.105 und Cry2Ab2 im System Maus als auch polyklonale Antikörper gegen Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 im System Ziege wurden erfolgreich entwickelt, produziert, in ausreichenden Mengen aufgereinigt und im ELISA für die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 etabliert.

Bei der Entwicklung und Produktion von Antikörpern gibt es Einiges zu beachten. Je größer und komplexer ein Protein ist und je weniger es mit körpereigenen Proteinen verwandt ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass es Peptidfragmente enthält, die sich von körpereigenen Peptiden unterscheiden (Ream & Rauch, 2007). Die hier für die Immunisierung eingesetzten Cry-Proteine hatten eine Masse zwischen 70 kDa und 128 kDa und wurden in *E. coli* produziert, sodass angenommen werden kann, dass sie groß und fremd genug waren, um Immunreaktionen in Säugetieren auszulösen. Die gleichen Proteine wurden auch in den Sorptionsuntersuchungen eingesetzt (Kapitel 4.5). Wichtig hierbei ist die Beachtung des Organismus, der das Protein produziert. So können in Pflanzen produzierte Proteine möglicherweise pflanzliche Glykosylierungsmuster enthalten, die die Proteine vor proteolytischem Verdau schützen und als Signal für den intrazellulären Transport dienen (Rehm, 2006). Dies hätte dazu führen können, dass die hier produzierten Antikörper die Proteine aufgrund der Blockierung von Epitopen durch das Glykosylierungsmuster nicht hätten erkennen können. Jedoch zeigte Monsanto (2004, 2006) für die in der Pflanze produzierten Cry1A.105-, Cry2Ab2- und Cry3Bb1-Proteine, dass sie nicht

glykosyliert werden, sodass auch die pflanzenproduzierten Cry-Proteine hier im ELISA hätten detektiert werden können.

Soll das Antiserum spezifisch sein, darf das zur Immunisierung verwendete Antigen keine antigenen Verunreinigungen enthalten (Rehm, 2006). Die eingesetzten Proteine Cry3Bb1, Cry2Ab2 und Cry1A.105 hatten eine Reinheit von 87 %, 87 % und 80 %.

Für eine erfolgreiche Immunisierung werden je nach Tier zwischen 1 µg und 100 µg Antigen benötigt (Rehm, 2006), da die meisten Antigen unterhalb einer bestimmten Schwelle keine Reaktion auslösen (Raem & Rauch, 2007). Antigenbooster aktivieren die während der Primärimmunisierung generierten Gedächtniszellen (Luttmann *et al.*, 2009). Bei der ersten Immunisierung wurde das vollständige Freund'sche Adjuvans eingesetzt, dessen Zusammensetzung die Antigenfreisetzung verzögert und zusätzlich durch den Mykobakterienanteil eine lokale Entzündungsreaktion induziert, sodass der Organismus dem Antigen über einen längeren Zeitraum ausgesetzt ist und mehr Immunzellen ausbildet (Raem & Rauch, 2007). Polyklonale Antiseren werden häufig aus Mäusen, Ratten, Hühnern, Schafen, Ziegen, Pferden und anderen Spezies gewonnen (Luttmann *et al.*, 2009). Hier wurden zur Produktion von polyklonalen Antikörpern den Ziegen 500 µg Antigen und zur Produktion von monoklonalen Antikörpern den Mäusen 100 µg Antigen injiziert. Zu beachten ist dabei, dass sich umso mehr Serum gewinnen lässt, je größer das Tier ist. Dementsprechend mehr Antigen muss für die Immunisierung eingesetzt werden (Luttmann *et al.*, 2009). Das aus Ziegen gewonnene polyklonale Antiserum enthält laut Autoren eine Vielzahl von Antikörpern, die, unabhängig von der Immunisierung, entweder schon bereits im Serum des Tieres vorhanden waren oder während der Immunisierungsphase generiert wurden. Die Menge der polyklonalen Antikörper (pAk) ist durch die Zahl und Größe der verwendeten Tiere begrenzt. Hingegen vereinigen die praktisch unbegrenzt monoklonale Antikörper produzierenden Hybridomazellen die Fähigkeit einer Plasmazelle einen spezifischen Antikörper zu produzieren mit der Immortalität der Myelomazelle (Luttmann *et al.*, 2009). Monoklonale Antikörper bieten im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern ein minimales Maß an zu erwartenden Kreuzreaktionen und damit an unspezifischer Bindung. Doch auch die Gesamtspezifität eines polyklonalen Antiserums kann wegen der Erkennung unterschiedlicher Epitope trotz einiger unspezifisch bindender Klone sehr hoch sein (Luttmann *et al.*, 2009).

Nach der Antikörpergewinnung wurden die pAk und mAk auf Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen getestet. Bei den polyklonalen Antikörpern zeigten die aus Ziege 1 (CryA1.05) schwache Reaktionen mit den Proteinen Cry2Ab2 und Cry3Bb1, wobei die Werte leicht über die

Nullwerte hinausgingen. Es kommt z. B. vor, dass verschiedene Antigene ähnliche Epitope tragen, sodass in diesem Fall ein spezifischer Antikörper an unterschiedliche Antigene bindet (Schütt & Bröker, 2011). Ob dies hier der Fall ist, ist nicht bekannt.

Für die monoklonalen Antikörper gegen Cry1A.105 zeigten zwei der sechs Klone starke Kreuzreaktionen mit dem Cry1Ab-Protein. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das synthetische Cry1A.105-Protein zu 50% sequenzhomolog mit dem Cry1Ab-Protein ist, da seine Domänen I und II zu 100% aus der Cry1Ab/1Ac-Sequenz bestehen (Monsanto, 2006). Hingegen reagierten die monoklonalen Antikörper, die gegen das Cry2Ab2-Protein hergestellt worden waren, spezifisch nur mit diesem. Da das Protein auch nur eine relativ geringe AS-Sequenz-übereinstimmung mit den getesteten Proteinen Cry1Ab (40 %), Cry1A.105 (48 %) und Cry3Bb1 (56 %) (*Align Sequences Protein BLAST*) zeigte, konnte erwartet werden, dass sich die Antikörper gegen unterschiedliche Bindungsstellen richten würden.

Eine Affinitätsreinigung von Antikörpern ist für die Herstellung enzymkonjugierter Antikörper notwendig (Rehm & Letzel, 2010). Auch hier wurden die mAk gegen Cry2Ab2 gereinigt und umgepuffert um sie hinterher zu biotinylieren. Jedoch ist die Reinigung immer ein Kompromiss aus Ausbeute und Reinheit (Luttmann *et al.*, 2009). Dieser Kompromiss führte in diesem Fall zu relativ geringen Antikörperausbeuten (102-3: 0,267 mg mL⁻¹, 814-4: 0,77 µg mL⁻¹ und 904-5: 0,34 mg mL⁻¹). Laut Autoren bindet Biotin das Protein Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* sehr spezifisch. Da mehrere Biotinmoleküle an einen Antikörper gekoppelt werden können, führt die Verwendung eines Biotin-Streptavidin-Detektionssystems zu einer Amplifikation des Signals. Hier wurden als Konjugat das Streptavidin HRP 80 dem biotinylierten Antikörper zugesetzt, das zu guten Signalen im ELISA-Test führte.

6.5 SORPTION DER PROTEINE CRY1A.105, CRY2AB2 UND CRY3BB1

Die Fähigkeit eines Bodens, gelöste Stoffe zu adsorbieren, hängt wesentlich von der Art (Ladungsdichte, Reaktivität, Hydrophobizität) und Größe (Fläche, Rauheit) seiner Oberflächen ab (Scheffer & Schachtschabel, 2010). Untersucht wurden die Sorption und das Konkurrenzverhalten der Proteine Cry3Bb1, Cry2Ab2 und Cry1A.105 an den Fraktionen Feinerde (< 2 mm), Schluff (< 63 µm) und Ton (< 2 µm).

Dabei wurde die Konzentration der Cry-Proteine so niedrig gewählt, dass insbesondere an der Tonfraktion theoretisch genug Bindungsplätze für die Proteine zur Verfügung stehen müssten. Beruhend auf den Größenabmessungen für das Cry3Bb1-Protein (Galitsky *et al.*, 2001), würden die Proteine bei der höchsten Konzentration von 14,36 ng mL⁻¹ eine Fläche von 18,7 mm² einnehmen. Diese Fläche ist wesentlich kleiner als die in den Versuchen angebotene Tonober-

fläche von 96 000 mm² bis 920 000 mm². Die eingenommene Fläche für die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 können nur näherungsweise über die ähnlichen Proteine Cry2AA (Morse *et al.*, 2001) und Cry1A(a) (Grochulski *et al.*, 1995) bestimmt werden. Danach ergeben sich belegte Flächen von 166,9 mm² bzw. 82,1 mm².

Bevor die Verteilungskoeffizienten an den Fraktionen Feinerde, Schluff und Ton gemessen werden konnten, wurden die Proben tyndallisiert. Bei dieser fraktionierten, diskontinuierlichen Sterilisation sollten vegetative Bakterien- und Pilzzellen abgetötet werden (Meyers, 1979).

Die meisten Untersuchungen zur Sorption werden in Anwesenheit von Puffern durchgeführt. Da die Bodenlösung selten gut gepuffert ist, werden Informationen über Reaktionen in ungepufferten Systemen benötigt (Harter & Stotzky, 1971). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sorptionsuntersuchungen wurden ebenfalls in ungepufferten Systemen (Zugabe von H₂O_{steril}) durchgeführt. Lediglich die zur späteren Messung notwendigen Verdünnungsschritte wurden in für das ELISA-Messsystem notwendigem PBST-Puffer unternommen.

Bei den Untersuchungen wurde der Verteilungskoeffizient k ermittelt. Dieser entspricht mathematisch der Steigung der Ausgleichsgeraden durch die einzelnen Sorptionspunkte und ist ein Maß für die Verteilung der Proteine zwischen der Oberfläche der Bodenprobe und der umgebenden Lösung (Hunfeld, 2011). Je höher der Wert für k , desto stärker ist die Affinität des Proteins zur Partikeloberfläche. So bedeutet ein k -Wert von z. B. 100, dass von 100 Proteinen in der Lösung nur eines nicht an die Tonfraktion gebunden wurde. In den durchgeführten Messungen wurden k -Werte zwischen 2,1 und 3600 für die unterschiedlichen Korngrößenfraktionen erzielt. Damit streuten die Werte etwas stärker als die von Hunfeld (2011) erzielten k -Werte zwischen 19,2 und 2443. Für die Berechnung der Verteilungskoeffizienten wurden lineare Funktionen eingesetzt, da in einem sehr geringen Konzentrationsbereich bis 140 ng mL⁻¹ gearbeitet wurde, in dem die Sorption linear anstieg.

6.5.1 Sorption an der Feinerde- und Schlufffraktion

Eine Bindung an die Feinerdefraktion konnte nur für das Cry3Bb1-Protein gemessen werden. Generell ist aufgrund der geringen Oberflächengröße von einer stark verminderten Bindung der verwendeten Cry-Proteine an dieser Fraktion auszugehen (Hunfeld, 2011).

Aufgrund der erhöhten äußeren Oberflächengröße der Schlufffraktion konnte an dieser die Sorption der Proteine Cry1A.105 und Cry3Bb1 gezeigt werden. Diese Fraktion wurde auch untersucht, um einen möglichen Einfluss der an dieser Fraktion gemessenen, spezifischen äußeren negativen Oberflächenladung zu bestimmen. Diese Werte konnten an der

Feinerdefraktion nicht ermittelt werden, da gröbere Bodenpartikel aufgrund ihrer geringen spezifischen Oberfläche wenig zur Gesamtladung des Bodens beitragen (Gisi *et al.*, 1997). Für das Cry3Bb1-Protein wurde ein schwacher Zusammenhang zwischen der spezifischen negativen äußeren Oberflächenladung der Schlufffraktion und den k -Werten des Unterbodens gezeigt. Dieser Zusammenhang bestand bei einer Kombination der k -Werte des Ober- und Unterbodens fort. Diese Ergebnisse harmonisieren mit dem im nachfolgenden Abschnitt für das Cry3Bb1-Protein an der Tonfraktion vorgeschlagenen Sorptionsmechanismus.

6.5.2 Sorption an der Tonfraktion

An der Tonfraktion konnten nicht nur die höchsten Verteilungskoeffizienten sondern auch die unterschiedlichsten für die untersuchten Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 gemessen werden. Es müssen daher für die einzelnen Cry-Proteine unterschiedlich stark ausgeprägte Sorptionsmechanismen wirksam sein. So sind für das Cry2Ab2-Protein hauptsächlich Wechselwirkungen mit der organischen Bodensubstanz anzunehmen, da die höheren Humusgehalte im Oberboden mit höheren Verteilungskoeffizienten und die niedrigeren Humusgehalte im Unterboden mit geringeren Verteilungskoeffizienten zusammenfallen (siehe *Abb. 5.5.5b*). Es ergab sich aber keine signifikante Korrelation für diese Beobachtung. Für die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 konnte dies ebenfalls nicht beobachtet werden. Für unpolare Moleküle, die zur Hauptsache über Van-der-Waals-Kräfte gebunden werden, existiert eine enge Beziehung zwischen dem K_{om} -Wert (Verteilungskoeffizient k bezogen auf den Gehalt an organischem Material) und der Größe des Moleküls (Moleküloberfläche) (Gisi *et al.*, 1997). Für polare Moleküle ist den Autoren nach diese Beziehung wegen der verschiedenartigen Bindungsmöglichkeiten weniger gut. Die hier betrachteten Proteine waren, gekennzeichnet über ihre negativen Hydrophobizitätswerte, eher polarer Natur, wonach die von Gisi *et al.* (1997) vorgeschlagene Beziehung eher nicht in Frage kommt.

Das Cry3Bb1-Protein wies von allen untersuchten Proteinen die höchsten Verteilungskoeffizienten auf. Es ist nachgewiesen worden, dass Tonminerale eine starke Bindungskapazität für große Mengen des Cry3Bb1-Proteins – bis in den mg pro g-Bereich – haben (Miethling-Graff *et al.*, 2009). Mit dem Cry3Bb1-Protein wurde in einem Konzentrationsbereich bis $14,36 \text{ ng mL}^{-1}$ gearbeitet. Bei einem in den Versuchen vorliegendem pH-Wert von ca. 7, sind die Domänen II und II dieses Proteins negativ geladen, die Domäne I neutral (siehe *Tabelle 5.3.1b*). Beim Cry1A.105-Protein ist die Domäne I negativ, die Domänen II und III positiv geladen. Daher kann vermutet werden, dass dieses Protein von den negativ geladenen Tonoberflächen stärker elektrostatisch angezogen wird, als das Cry3Bb1-Protein. Eine stärkere Bindung konnte

jedoch nicht beobachtet werden. Daher scheint diese Art der Bindung zumindest für das Cry3Bb1-Protein keine große Rolle zu spielen. Allerdings muss beachtet werden, dass das für das Cry1A.105-Protein herangezogene Modell 1ciy (Cry1Aa-Protein) mit 577 Aminosäuren Länge um 533 AS kürzer ist als das in *E. coli* bzw. in der Maishybriden produzierte Cry1A.105-Protein. Wie sich diese nahezu verdoppelte Sequenz dreidimensional darstellt, ist noch nicht bekannt. Sie scheint aber einen großen Einfluss auf das Sorptionsverhalten zu haben, welches im Vergleich zum Cry3Bb1-Protein sehr viel geringer ausfällt. Bei der Betrachtung der vollständigen AS-Sequenz des Cry1A.105-Proteins wird ein IEP von 5,01 errechnet, sodass es bei den experimentellen pH-Werten um 7 negativ geladen wäre und somit von den Tonteilchen elektrostatisch nicht angezogen würde. Dies wäre in Übereinstimmung mit den geringen Verteilungskoeffizienten, die für dieses Protein erhalten wurden.

Möglicherweise hat die Größe des Cry1A.105-Proteins einen entscheidenden negativen Einfluss auf die Sorption. Schon Harter & Stotzky (1971) beschrieben die Adsorptionshöhe als direkt proportional zum Proteinmolekulargewicht und auch Albert & Harter (1973) nennen das Proteinmolekulargewicht als kontrollierenden Faktor. So scheint die an Tone gebundene Proteinmenge im Allgemeinen mit dem M_w des Proteins anzusteigen (Stotzky, 1986). Im Gegensatz dazu wurde herausgefunden, dass mehr des Toxins mit einem kleineren M_w als der des Protoxins an Ton bindet (Venkateswerlu & Stotzky, 1992). Dies kann vielleicht durch mehr potentielle Bindestellen im Toxin als im Protoxin erklärt werden, sodass wenige Toxinmoleküle ausreichen, um die Bindungsstellen des Tons abzusättigen (Stotzky, 1986).

Eine weitere Annahme, dass die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 und den Oberflächen der Bodenpartikel auf elektrostatischer Anziehung beruhen könnte, wird nicht gestützt. Aufgrund der Berechnungen des elektrostatischen Potentials (siehe *Abb. 5.3.1a*) hätte in diesem Fall eine Reihenfolge von Cry3Bb1 > Cry1A.105 > Cry2Ab2 bei der Sorption erhalten werden müssen. Diese Reihenfolge konnte zwar bei der Sorption an der Schlufffraktion gezeigt werden, jedoch wurde an der Tonfraktion stattdessen die Reihung Cry3Bb1 > Cry2Ab2 > Cry1A.105 gemessen. Zu beachten ist, dass die Modellierung des elektrostatischen Potentials an Modellproteinen durchgeführt worden ist, von denen das 1ciy für das Cry1A.105-Protein nur etwa 45 % der Sequenz abdeckt. Es ist also unbekannt, inwieweit die modellierte Oberfläche mit der Realität übereinstimmt.

Um die generelle Problematik der Proteinmodellierung zu meistern, gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum Einen könnten die Proteine einer kristallographischen Strukturaufklärung unterzogen werden, was ein zeit- und kostenintensiver Prozess ist und zum Anderen stehen

öffentliche Ressourcen zur Verfügung, wie z. B. Fold.it/portal/ (2012/05/04), die bis dato unbekannt dreidimensionalen Strukturen von Protein-AS-Sequenzen aufklären.

Zum derzeitigen Zeitpunkt lässt sich vermuten, dass elektrostatische Wechselwirkungen bei der Sorption von Cry-Proteinen auf Partikeloberflächen eine Rolle spielen, wie kürzlich über die PCEA (patch controlled electrostatic attraction) vorgeschlagen (Madliger *et al.*, 2011). Aufgrund der PCEA wird angenommen, dass das Cry1Ab-Protein mit seinen positiv geladenen Bereichen auf den Domänen II und III – mit hohem IEP – zum negativ geladenen SiO₂ gerichtet und mit den negativ geladenen Bereichen auf der Domäne I – mit niedrigem IEP – zum positiv geladenen PLL (Poly-L-Lysin) gerichtet sein könnte (Sander *et al.*, 2010). Die Modellsubstanzen SiO₂ und PLL wurden eingesetzt, da beide über einen weiten pH-Bereich ihre negative bzw. positive Ladung beibehalten (Sander *et al.*, 2010). Der Mechanismus der PCEA bietet eine plausible Erklärung für die umkehrbare Adsorption des Proteins an SiO₂ und die unumkehrbare Adsorption an PLL. Die Erklärung ist, dass die sauren AS auf Domäne I in einem relativ kleinen Oberflächenbereich mit einer hohen Ladungsdichte konzentriert sind (Grochulski *et al.*, 1995, Madliger *et al.*, 2010) und die basischen AS in den Domänen II und III weit über die Oberflächenbereiche verbreitet sind. Dies führt zu einer geringeren positiven Oberflächenladungsdichte (Sander *et al.*, 2010).

Die PCAE, die aus der ungleichmäßigen Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche herrührt, ist auch für die Einordnung des Bindungsverhaltens der hier untersuchten Proteine interessant. Diese „fleckige“ Oberfläche führt zu einer bestimmten Orientierung des adsorbierten Proteins auf einer geladenen Oberfläche und damit zu einer elektrostatischen Anziehung (Madliger *et al.*, 2011). Die PCAE des Proteins mit seinen positiv geladenen Domänen zur negativ geladenen Oberfläche führt bei einem pH-Wert oberhalb des globalen IEP des Proteins, bei dem beide netto negativ geladen sind, zu einer starken Adsorption. Diese Ausführung von Madliger *et al.* (2011) erklärt die gefundene, stärkere Adsorption des bei pH 7 netto negativ geladenen Cry3Bb1-Proteins an der ebenfalls negativ geladenen Tonfraktion in den Sorptionsversuchen. Das Cry2Ab2-Protein, das unter diesen Bedingungen hingegen positiv geladen ist, sorbierte schwächer. Jedoch passen die Sorptionsergebnisse für das Cry1A.105-Protein nicht ganz in dieses System hinein. Das Protein wäre hier ebenfalls netto negativ geladen, wird aber dennoch viel schwächer sorbiert als das Cry3Bb1-Protein. Möglicherweise spielt beim Cry1A.105-Protein z. B. der Faktor Größe doch noch eine Rolle oder aber auch die von Harter & Stotzky (1971) vorgeschlagene Anzahl an aktiven Stellen auf dem Protein, die für eine Reaktion mit den Tonadsorptionsstellen zur Verfügung stehen. Wenn die Zahl der aktiven Stellen bei jedem Protein dieselbe ist, hängt die Adsorption stark von der Molekülanzahl ab, die auf die

Tonoberfläche passen könnten (Harter & Stotzky, 1971). Hier stand aber genug Oberfläche für die Adsorption zur Verfügung (vgl. *Kapitel 6.5*). Die Autoren sind jedoch der Ansicht, dass aufgrund der variablen AS-Zusammensetzung und der differentiellen Proteinfaltung sich die aktiven Stellen bei verschiedenen Proteinen unterscheiden. Über die Art und Menge der aktiven Stellen auf den hier eingesetzten Proteinen ist nichts bekannt. Nach dem Prinzip der PCEA müsste es auf den Proteinen aber mindestens eine aktive Stelle für die Bindung geben.

Momentan existiert keine Methode, die die direkte Messung der Proteinkonformation im adsorbierten Zustand erlaubt (Quiquampoix, 2008a).

6.5.2.1 *Einfluss von DTT auf die Sorption*

DTT (Dithiothreitol) findet Verwendung in der Proteinbiochemie ([gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/e/109233.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$vid=gestisdeu:sdbdeu\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/e/109233.xml?f=templates$fn=default.htm$vid=gestisdeu:sdbdeu$3.0), 2012/05/04). Es konserviert zelluläre Proteine in ihrer funktionalen Form, indem es die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff verhindert. Andererseits kann es die Faltung von Proteinen, deren Struktur durch Disulfidbrücken stabilisiert wird, durch deren Reduktion zerstören. Jedoch hatte die Zugabe von DTT zur Cry3Bb1-Proteinlösung keinen Einfluss auf die Höhe der Verteilungskoeffizienten an der untersuchten Tonfraktion. Dies mag auch an der sehr niedrigen eingesetzten Konzentration von 1 μM gelegen haben.

6.5.2.2 *pH-Werte in den Sorptionsmessungen*

Die in Stichproben untersuchten pH-Werte in den Sorptionsversuchen für das Cry3Bb1-Protein schwankten zwischen pH 7,6 und pH 8,2 und lagen damit in einem Bereich, der eine Oligomerisierung der Proteine ausschließt (Helassa *et al.*, 2009). Der pH-Wert an sich kann einen Einfluss auf die Bindungsstärke von Proteinen an Oberflächen haben. So wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass das Adsorptionsmaximum für die meisten Proteine nahe ihres IEPs auftritt (McLaren *et al.*, 1958). Für $\text{pH} > \text{IEP}$ wurde interpretiert, dass abstoßende elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Protein und der negativ geladenen Oberfläche bestanden. Für $\text{pH} < \text{IEP}$ wurde geschlossen, dass entweder eine Konkurrenz der Protonen in der Lösung um die Adsorptionsstellen (McLaren *et al.*, 1958) oder eine Abnahme der für die Absättigung der negativen Ladung des Tons benötigten Proteinmenge vorlag, da die positive Ladung eines Proteins mit abnehmendem pH-Wert anstieg (Armstrong & Chesters, 1964). Also werden Proteine in Lösungen mit einem pH-Wert oberhalb ihres IEPs eine vornehmlich negative Ladung und in Lösungen mit einem pH-Wert unterhalb ihres IEPs eine überwiegend positive Ladung haben (Harter & Stotzky, 1971). Die Beobachtung, dass Proteine

an einer unvorteilhaft geladenen Oberfläche adsorbieren, könnte den Autoren nach auf mindestens zwei Weisen erklärt werden. Zu Einem war die Azidität der Smectitoberfläche allem Anschein nach geringer als der in der Suspension gemessene pH-Wert (Harter & Ahlrichs, 1967, Mortland & Raman, 1968). Daher könnte der tatsächliche pH-Wert auf der Tonoberfläche, auf den ein Protein mit einem geringeren IEP stößt, nicht so unvorteilhaft sein, wie durch den pH-Wert in der Suspension angezeigt. Zum Anderen zeigt der IEP nur den pH-Wert an, bei dem die Netto-Ladung eines Moleküls Null ist. Jedoch könnte das Protein eine verbleibende positive Ladung an irgendeiner Stelle bei pH-Werten am oder oberhalb des IEPs haben (Harter & Stotzky, 1971). Die IEPs der Proteine Cry3Bb1, Cry2Ab2 und Cry1A.105 (siehe *Tab. 5.3.1a*) lagen bei 5,73, 8,53 und 5,01 und damit befand sich der pH-Wert in den Versuchslösungen für Cry3Bb1 und Cry1A.105 immer oberhalb des IEPs und für Cry2Ab2 darunter. Zumindest für das Cry3Bb1-Protein könnte die Erklärung zutreffen, da das im Sorptionsversuch mit einem pH-Wert von ~ 7 negativ geladene Cry3Bb1-Protein dennoch sehr stark an der Tonfraktion gebunden wurde (Harter & Stotzky, 1971). Hingegen wurde das Cry2Ab2-Protein trotz positiver Summenladung nur in einem ähnlichen Ausmaß wie das negativ geladene Cry1A.105-Protein gebunden. Daher scheint tatsächlich nicht nur der Gesamt-IEP eines Proteins einen Einfluss auf die Bindungsstärke zu haben, sondern auch die IEPs der Domänen. Die Berechnung der IEPs der einzelnen Domänen (*Tab. 5.3.1b*) zeigen bei einem angenommenen pH-Wert von ~ 7 im Sorptionsversuch für Cry3Bb1 negativ geladene Domänen (II, III) und eine ungeladene Domäne (I). Hingegen sind die Domänen I und II beim Cry2Ab2-Protein positiv und die Domäne III negativ geladen. Da das Cry2Ab2-Protein trotz passender Domänenladungen weniger stark sorbiert als das Cry3Bb1-Protein, müssen hier andere Mechanismen greifen (siehe *Kapitel 6.5.2*). Das Cry1A.105 besitzt ebenfalls positiv (II, II) und negativ (I) geladene Domänen. Da jedoch die für diese Berechnungen eingesetzten Modelle nur etwa die Hälfte der Cry1A.105-AS-Sequenz abdecken, sind die berechneten IEPs unter Umständen nicht repräsentativ für das Protein. Hier fehlt es leider noch an kristallographischen Daten.

Um zu überprüfen, inwiefern die Sorption der einzelnen Proteine durch den pH-Wert beeinflusst wird, müssten Untersuchungen bei definierten pH-Werten durchgeführt werden, wie z. B. für das Cry3Bb1-Protein bei Hunfeld (2011). Die Ergebnisse des Autors widersprechen allerdings der Aussage wonach eine maximale Adsorption nahe des IEPs des betreffenden Proteins auftritt (McLaren *et al.*, 1958). Bei Hunfeld (2011) lag die maximale Sorption bei den untersuchten pH-Werten von 4,5 und 8. Somit könnte auch für die hier untersuchten Proteine bei Variation des pH-Werts durchaus noch höhere bzw. niedrigere Sorptionen gemessen werden. Es stellt sich weiterhin die Frage (siehe *Kapitel 6.5.2*), ob der IEP des gesamten Proteins interessant ist oder

ob einzelne Bereiche auf Domänen mit durchaus unterschiedlichen IEPs (siehe *Tab. 5.3.1b*) für den Adsorptionsprozess wichtiger sind, wie das Prinzip der PCEA (siehe *Kapitel 6.5.2*) vorschlägt.

6.5.3 Proteinkonkurrenz

Bei den Untersuchungen zur Proteinkonkurrenz um Bindungsplätze auf der Tonfraktion wurde das Cry3Bb1-Protein nicht mit einbezogen, da aus den Sorptionsuntersuchungen (siehe *Kapitel 6.5.2*) hervorging, dass es um ein Vielfaches stärker adsorbiert als die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2. Daher konnte eine direkte Beeinflussung der Sorptionsfähigkeit des Cry3Bb1-Proteins durch die schwächer sorbierenden Proteine ausgeschlossen werden. Auch bei diesen Untersuchungen wurden feldrelevante Konzentrationen bis 140 ng mL^{-1} (Hunfeld, 2011) der Cry-Proteine verwendet, sodass im Vergleich zu den Sorptionsuntersuchungen identische Konzentrationen eingesetzt wurden.

In den untersuchten Konzentrationsbereichen wurde keine Konkurrenz zwischen dem Cry1A.105- und dem Cry2Ab2-Protein festgestellt. Dieses lässt sich durch das sehr große Oberflächenangebot auf den Tonpartikeln erklären (Scheffer & Schachtschabel, 2010), sodass ein großer Überschuss an Sorptionsplätzen zur Verfügung steht (siehe *Kapitel 6.5*). Um eine Konkurrenz zwischen den beiden Proteinen zu provozieren, müsste die Proteinkonzentration entsprechend hoch bzw. die Menge an verfügbaren Bindungsplätzen entsprechend niedrig sein, also die zur Verfügung gestellte Tonmenge reduziert werden. Die Sorptionsuntersuchungen (*Kapitel 6.5.2*) konnten keine einheitlichen Hinweise darauf liefern, welches der Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 tatsächlich stärker sorbierte. Da es starke Unterschiede zwischen der Sorption an der Ton- und Schlufffraktion gab, kann auch hier nur vermutet werden, ob und wenn ja welches Protein konkurrenzfähiger ist. So wurde die Angabe, dass Proteine mit hohem M_w stärker adsorbieren (Stotzky, 1986), später von Venkateswerlu & Stotzky (1992) wieder abgeschwächt. In deren Untersuchung band das kleinere aktive Toxin stärker als seine Protoxin-vorstufe. Je nach untersuchter Probenart wie z. B. Feldproben bzw. untersuchter Modellsubstanz wie z. B. an einem Lagerstättenton (Ergebnisse nicht dargestellt) können divergente Ergebnisse auftreten (siehe auch *Kapitel 5.5.3* und *5.5.4*). Deswegen ist die Vorhersage, ob das größere Cry1A.105-Protein (133,3 kDa) stärker bindet als das kleinere Cry2Ab2-Protein (70,9 kDa) nicht treffbar.

6.5.4 Zusammenhang zwischen der Sorption der Cry-Proteine und den Parametern der Tonfraktion

Die Verteilungskoeffizienten k wurden mit den unterschiedlichen Parametern (spezifische äußere Oberflächengröße, spezifische negative äußere Oberflächenladung, spezifische Ladungsdichte, Gehalt an organischer Substanz) korreliert, um einen beschreibbaren Einfluss eines oder mehrerer Faktoren auf die Bindung der unterschiedlichen Proteine festzustellen.

Es konnte keine deutliche Korrelation zwischen der Sorption der drei Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 und einem der untersuchten Parameter gefunden werden. Aus der Literatur sind aber durchaus Zusammenhänge bekannt. So zeigten Pagel-Wieder *et al.* (2004) eine Beziehung zwischen der Adsorption des Cry1Ab-Proteins und dem C_{org} -Gehalt der untersuchten Tonfraktionen. Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen der Adsorption des Cry1Ab- bzw. des Cry3Bb1-Proteins und der spezifischen äußeren Oberflächengröße gezeigt (Pagel-Wieder *et al.*, 2007, Hunfeld, 2011). Es gab außerdem eine negative Relation der Cry1Ab-Adsorption mit der Höhe des C_{org} -Gehalts und der spezifischen negativen äußeren Oberflächenladung (Pagel-Wieder *et al.*, 2007). Hingegen beeinflusste weder die Menge an zugefügter Huminsäure noch Unterschiede in der spezifischen Oberfläche, der KAK und der Ausdehnbarkeit die Adsorption des Toxins (*B.t. sp. kurstaki*) an den verwendeten Organomineralkomplexen signifikant (Crecchio & Stotzky, 2001). Laut Autoren war die hohe Affinität die wichtigste Komponente, wohingegen die Bindung an reinen Tonmineralen und Huminsäuren abhängiger von den physikochemischen Eigenschaften dieser zu sein schien (Tapp *et al.*, 1994, Crecchio & Stotzky, 1998).

Eine mögliche Erklärung für die hier erzielten, abweichenden Ergebnisse könnte darin liegen, dass andere Proteine (Cry1A.105 und Cry2Ab2) als in den oben genannten Quellen eingesetzt und die Untersuchungen an einem anderen Standort mit anderen Bodeneigenschaften durchgeführt wurden. Die hier nicht aussagekräftigen Zusammenhänge könnten aber auch durch die geringe Datenbasis mit nur jeweils drei untersuchten Proben für den Ober- und Unterboden hervorgerufen worden sein, sodass sich bei einer ausreichenden Wiederholungszahl durchaus Zusammenhänge zeigen könnten.

7 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Im deutschsprachigen Raum waren 1997 etwa 200 Pflanzenschutzmittel auf der Basis von ungefähr 350 unterschiedlichen Wirkstoffen im Einsatz (Gisi *et al.*, 1997). In der Regel werden bei Getreide pro Saison 2 bis 6 Applikationen verschiedener Pflanzenschutzmittel durchgeführt. Das Risiko einer Grundwasserkontamination durch diese hängt im Wesentlichen davon ab, in welcher Beziehung die Verlagerungsgeschwindigkeit im Boden zur Abbaubarkeit der Wirkstoffe steht (Gisi *et al.*, 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1, die zur Kontrolle von Schadinsekten gentechnisch in die Maishybride MON89034 x MON88017 eingebracht worden sind, über Wurzelexsudate im $\text{ng L}^{-1} \text{h}^{-1}$ -Bereich von der Pflanze abgegeben werden. Dabei waren die Exsudationsraten abhängig von der Versuchsanstellung, dem Kulturfortschritt und dem betrachteten Protein. Es zeigte sich, dass die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 in Quarzsand schneller verlagert wurden als das Cry3Bb1-Protein. Eine Abschätzung des Rückhaltevermögens anderer Böden kann nur dann möglich sein, wenn eine umfangreiche Datengrundlage hinsichtlich der Eigenschaften dieser Böden vorhanden ist. Die Versuche bestätigten die Erkenntnisse anderer Forscher (Saxena *et al.*, 1999, Saxena *et al.*, 2002b, Clark *et al.*, 2005), wonach Proteine während der Wachstumsperiode der Pflanzen kontinuierlich in die Böden gelangen. Die hier erzielten Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass möglicherweise schwächer bindende Proteine, wie es für das Cry2Ab2- und Cry1A.105-Protein der Fall zu sein scheint, mit dem Bodenwasser schneller in tiefere Bodenschichten und damit in Grundwassernähe gelangen (Saxena *et al.*, 2002a, Douville *et al.*, 2005, 2007). Das komplexe Wechselspiel zwischen der Pflanze, ihren Exsudaten und der Umwelt bzw. den Mikroorganismen bietet ein weites Feld für weiterführende, tiefgreifendere Untersuchungen.

Ob und wie weit ein Stoff in unsere Nahrung gelangt, hängt davon ab, ob er im Boden fixiert und damit immobilisiert wird (Gisi *et al.*, 1997). Die drei untersuchten Cry-Proteine wiesen insbesondere an der Tonfraktion ein stärkeres Bindungsverhalten auf, welches das an der Schluff- und Feinerdefraktion in Abhängigkeit vom eingesetzten Protein bei weitem überwog. Es konnte damit die Vermutung, dass die drei Cry-Proteine an unterschiedlichen Korngrößenfraktionen ein verschiedenartiges Bindungsverhalten aufweisen, bestätigt werden. Hingegen konnte nicht gezeigt werden, dass die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 in den eingesetzten, feldrelevanten Konzentrationen um Bindungsplätze an der Tonfraktion konkurrierten, da auf den Bodenpartikeln vermutlich eine ausreichende Zahl an Bindungsplätzen zur Verfügung stand. Da im betrachteten Reaktionszeitraum von 30 min jedoch nicht alle angebotenen Cry-Proteine an die Bodenfraktion banden, ist davon auszugehen, dass auch auf dem Versuchsfeld stets freie

Proteine vorliegen werden, die dann von Mikroorganismen abgebaut oder in tiefere Bodenschichten verlagert werden können.

Es stellt sich die Frage, ob die untersuchten insektiziden Proteine zur Klasse der Schadstoffe gehören. Die in der Landwirtschaft verwendeten organischen Pflanzenschutzmittel werden im Allgemeinen nicht zu den Schadstoffen gezählt, doch müssen sie aus ökologischer Sicht und aus dem Blickwinkel der Nichtzielorganismen ebenfalls als Schadstoffe angesehen werden (Gisi *et al.*, 1997). Zu den Nichtzielorganismen gehören Insekten der Arthropoden (z. B. Prädatoren und Parasitoide) und Lepidopteren (Monsanto, 2006). Ebenfalls wurden Nichtzielorganismen aus dem Bereich der Wildtiere, der aquatischen und Bodenorganismen betrachtet (Monsanto, 2004). Wegen der starken Bindung an den Humus finden sich erhöhte Gehalte organischer Schadstoffe vorwiegend in oberflächennahen Bodenschichten und eine Verlagerung in tiefere Bodenschichten erfolgt durch die Bodenbearbeitung, Bioturbation und innere Erosion von schadstoffbeladenen kolloidalen Partikeln und gelösten Huminstoffen (Gisi *et al.*, 1997). Laut Autoren nimmt die Abbauresistenz mit der Molekülgröße und Komplexität der chemischen Struktur zu und hydrophile Verbindungen werden im Allgemeinen schneller mineralisiert als hydrophobe. Die in dieser Arbeit betrachteten Cry-Proteine zeichneten sich durch hohe Molekulargewichte (70,9 – 133,3 kDa) und eine negative Hydrophobizität (-0,293 - -0,431) aus. Dabei spräche das hohe M_w für eine schlechtere, die negative Hydrophobizität für eine bessere Abbaubarkeit im nicht sorbierten Zustand.

Ob das System Boden wirklich geschützt wird, wenn die Cry-Proteinmenge, die über *B.t.*-Sprühanwendungen auf das Feld gelangt, bei weitem von der Menge an Cry-Proteinen überwogen wird, die über Wurzelexsudate und Rückstände pflanzlicher Biomasse in den Boden gelangt, ist fraglich (siehe *Kapitel 6.2.4*). Hier müssten ggf. die Expressionshöhen der Cry-Proteine reduziert oder die Expressionssorte auf bestimmte, den Schadinsekten besonders exponierte Gewebe beschränkt werden. In Deutschland kann derzeit nicht mit einem großflächigen Anbau von *B.t.*-Mais als Lebens- und Futtermittel gerechnet werden. Eine Möglichkeit bestünde im Anbau des *B.t.*-Mais als Energiequelle z. B. für Biogasanlagen, bei dessen Ernte – abgesehen vom Wurzelsystem – keine Rückstände auf den Feldern zurückbleiben. Bei der Verwendung eines Lebensmittels als Energiepflanze stehen jedoch ethische Diskussionen im Vordergrund.

Die Bewertung des Maisstreuabbaus über die Ermittlung des Stickstoffvorrats im Boden zeigte in den hier durchgeführten Untersuchungen keinen Einfluss der vier Sorten auf den Streuabbau in den drei Versuchsjahren. Generell sollte es für nachhaltige, ressourcenerhaltende

Anbausysteme Monitoringverfahren geben. Icoz *et al.* (2009) fanden heraus, dass manche Pflanzenarten, die in Böden angebaut wurden, auf denen *B.t.*-Mais angebaut worden war, das Cry1Ab-Protein aufnehmen, wenn auch in geringen Mengen. Insbesondere seit der Veröffentlichung dieser Ergebnisse ist klar, dass neben der Erforschung der Verlagerung und des Abbaus von Cry-Proteinen auch die Aufnahme dieser durch andere Kulturpflanzen in der Fruchtfolge, einer Beobachtung bedarf. Für das Monitoring von gentechnisch verändertem Mais ist aus bodenkundlich-bodenchemischer Sicht die quantitative Bestimmung der Tonfraktion an den Anbaustandorten erforderlich, da diese Partikel den größten Einfluss auf den Rückhalt der Cry-Proteine besitzen (siehe *Kapitel 5.5.3*). Durch die Charakterisierung der Freisetzungsfäche und die Erhebung von Bodendaten (Bodenart- und typ, Korngrößenverteilung, pH-Werte, C_{org}-Gehalte, spezifische äußere Oberfläche, spezifische negative äußere Oberflächenladung) sollten mögliche Unterschiede bzw. Ähnlichkeiten im Verhalten der Proteine an den Bodenfraktionen erklärt werden. Schlussendlich konnte keiner der untersuchten Faktoren als sorptionsbestimmend gekennzeichnet werden. Um einen Einflussfaktor zu ermitteln, erscheint es sinnvoll, weiterführende Experimente mit bis ins Detail charakterisierten Böden zu unternehmen, da dann die Wahrscheinlichkeit eine Korrelation zwischen einem Bodenfaktor und dem Sorptionsverhalten der Cry-Proteine zu finden, höher ist. Blume *et al.* (2011) führen in ihrem Buch zum Bodenkundlichen Praktikum eine Vielzahl von möglichen Untersuchungen und ihre möglichen Fehlerquellen und Alternativen auf.

Auch das Protein hat einen ganz erheblichen Einfluss auf das Bindungsgeschehen im Boden, weshalb der Fokus möglicher weiterführender Untersuchungen nicht allein auf der Charakterisierung des Bodens liegen sollte. So ist es nicht verwunderlich, dass von sehr vielen Autoren eine große Zahl von Bindungsmechanismen (siehe *Kapitel 2.3*) vorgeschlagen worden ist. Hier scheint es noch keine allgemeine Lösung zu geben, wobei der von Sander *et al.* (2011) vorgeschlagene Mechanismus der PCEA (patch controlled electrostatic attraction) weiter erforschenswert erscheint. Über diesen Mechanismus konnte zumindest die starke Bindung des Cry3Bb1- und die schwache Bindung des Cry2Ab2-Proteins erklärt werden. Die PCEA kam hingegen als Erklärung für das Bindungsverhalten des Cry1A.105-Proteins nicht in Frage, das aber aufgrund der schwachen Datenlage auch am schwierigsten zu beschreiben war. Die testweisen Messungen des Proteinaggregationsverhaltens zeigten, dass alle untersuchten Cry-Proteine in höheren Konzentrationen aggregierten. Dieses Verhalten wurde für die Sorptionsuntersuchungen aufgrund der viel niedrigeren Konzentrationen und der vorliegenden pH-Werte nicht angenommen. So vielfältig wie der Boden sind also auch die Proteine, sodass Fragen zum Proteinverhalten meist nur durch genaue Betrachtung der einzelnen Reaktanten

– Protein und Boden – aufzuklären sein werden, bis der Hinweis auf einen bestimmten Einflussfaktor oder das Zusammenspiel mehrerer Einflussfaktoren gefunden und für eine Voraussage zum Verhalten von Proteinen in Böden anwendbar sein wird. So müssen auf proteinchemischer Seite die dreidimensionalen Modellierungen, basierend auf bereits vorhandenen Datenbanken, zusätzlich auf einer breiten Datenbasis hinsichtlich des Verhaltens der Proteine in Lösung aufbauen.

Sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zum Sorptions- und Exsudationsverhalten wurden im Proteinnachweissystem ELISA durchgeführt, für das mono- und polyklonale Antikörper gegen die Cry-Proteine entwickelt, produziert und erfolgreich im Test etabliert wurden. Dabei lagen die erzielten Nachweisgrenzen im Bereich der von Monsanto (2006) angegebenen oder waren deutlich sensitiver. Im Allgemeinen würde es aber eine große Einsparung an Ressourcen und Arbeitsaufwand bedeuten, wenn unterschiedliche Cry-Proteine mit demselben Antikörper nachweisbar wären. Dazu müssen aber die nach außen zeigenden AS-Reste der Proteine, die als Epitop für eine Antikörperbindung in Frage kommen, bekannt und unter den Proteinen identisch sein. Sollen die Cry-Proteine in der Zelle genauer beobachtet und zum Beispiel Informationen über ihre Phosphorylierungen gesammelt werden, so bietet sich der Einsatz von PAN-Antikörpern (Erkennung der phosphorylierten und nichtphosphorylierten Proteinform) kombiniert mit einem phosphospezifischen Antikörper an. Hingegen empfiehlt sich für den Nachweis einer möglichst großen Bandbreite an Proteinen in einer Probe eher die Entwicklung und Anwendung von Proteinchips. Auf diesen befindet sich eine große Anzahl proteinspezifischer Antikörperpunkte, die unterschiedliche Proteine über Fluoreszenz anzeigen, wenn diese gebunden werden (Thiemann & Palladino, 2007).

8 ZUSAMMENFASSUNG

Trotz der anhaltenden öffentlichen Debatte über den Gebrauch und die Kommerzialisierung von gentechnisch modifizierten (GM)-Kulturpflanzen, nimmt die Gesamtanbaufläche dieser Kulturpflanzen und die Anzahl der diese Pflanzen anbauenden Länder weiterhin zu (Baumgarte & Tebbe, 2005). Im Jahr 2009 wurden in 25 Ländern 134 Mio. ha GM-Pflanzen angebaut (James, 2009). Von dieser Fläche nahm Mais 41,7 Mio. ha ein und 16 % dieser Pflanzen waren insektenresistent, 62 % herbizidresistent und 63 % des biotechnologisch entwickelten Mais hatte mehrere veränderte Merkmale (James, 2009).

Der ökonomische Bedarf nach einem effektiven Insektizid, die Verfügbarkeit von Genen aus dem Bakterium *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*), die eine relevante Insektizität kodieren und die bestätigte Sicherheit von *B.t.*-Sprühanwendungen haben die transgenen *B.t.*-Pflanzen zu offensichtlichen Kandidaten für eine frühe, kommerzielle Ausnutzung der Grünen Gentechnik in der Pflanzenbiotechnologie gemacht (de Maagd *et al.*, 1999). Inzwischen wurden *cry*-Gene aus *B.t.* in Feld-, Flint-, Pop- und Zuckermais eingeführt (James, 2005). Jedoch müssen Fragen zur Sicherheit und Risikoabschätzung des Anbaus von GM-Mais beantwortet werden, da die Anbauflächen gegenüber stofflichen Veränderungen, bedingt durch die Freisetzung von GM-Pflanzen, geschützt und ein boden- und ressourcenschonendes pflanzenbauliches Produktionssystem sichergestellt werden sollen. Als Beitrag zur Beantwortung dieser Fragen, wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen durchgeführt.

Das Exsudations-, Sorptions- und Konkurrenzverhalten der Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 aus der Maishybriden MON89034 x MON88017 wurde an den Böden der Freisetzungsfläche erfasst, da diese Proteine von der Maishybriden exprimiert werden und während der Vegetationsperiode über Polleneintrag, Erntereste und Wurzelexsudate in die Böden gelangen und dort an Bodenbestandteilen sorbieren (Losey *et al.*, 1999, Saxena *et al.*, 1999, Hansen-Jesse & Obrycki, 2000, Zwahlen *et al.*, 2003, Clark *et al.*, 2005). Um sorptionsbestimmende Faktoren zu ermitteln, wurden sowohl ausgewählte Bodeneigenschaften der Anbaufläche untersucht als auch Eigenschaften der Proteine an Modellen dargestellt.

Die Auswirkung der Freisetzung der Maishybriden im Vergleich mit drei weiteren Maissorten (DKc5143, DKc4250 und Benicia) auf die Böden der Freisetzungsfläche wurde untersucht, da bekannt war, dass die Sorption den mikrobiologischen Abbau der Cry-Proteine reduziert (Dashman & Stotzky, 1986). Dadurch bleibt ihre insektizide Wirkung erhalten und der durch die Makro- und Mesofauna eingeleitete Streuabbau kann möglicherweise gehemmt werden. Das

könnte zur Folge haben, dass sich sowohl die Humusbildung als auch der Humusvorrat und die Zusammensetzung der organischen Substanz verändert.

Für das Cry1A.105- und das Cry2Ab2-Protein standen keine kommerziellen Nachweissysteme zur Verfügung. Daher wurden polyklonale Antikörper gegen alle drei und monoklonale Antikörper gegen die Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 erfolgreich entwickelt, produziert und im ELISA etabliert.

Die Bindungshöhe, sowie das Vorliegen der Cry-Proteine in den Wurzelexsudaten wurden im Proteinnachweisverfahren bestimmt. Dafür wurden die in den Substraten Nährlösung und Quarzsand gewonnenen Wurzelexsudaten aufkonzentriert und die Exsudationsrate für die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 in $\text{ng L}^{-1} \text{h}^{-1}$ gemessen. Die Rate nahm mit zunehmender Kulturdauer ab und unterschied sich in Abhängigkeit vom Protein in den Substraten Nährlösung und Quarzsand. Dabei zeigte sich im Substrat Quarzsand eine schnellere Verlagerung der Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 im Vergleich zum Cry3Bb1-Protein, was vermuten lässt, dass die Proteine unter natürlichen Bedingungen im Feld, aufgrund ihrer verschieden starken Bindung an die Bodenbestandteile unterschiedlich schnell in der Bodensäule verlagert werden.

Die Freisetzungsfläche war durch eine hohe Homogenität bezüglich der untersuchten bodenkundlichen und bodenchemischen Parameter (Bodentyp, pH-Werte, Korngrößenverteilung, spezifische äußere Oberflächengröße, spezifische äußere negative Oberflächenladung, Gehalt an organischem Kohlenstoff, Mineralstickstoffvorrat) gekennzeichnet.

Die Sorptionsversuche zeigten, dass die Höhe der Sorption der Cry-Proteine an den Böden der Freisetzungsfläche sowohl von der Fraktionsgröße (Ton, Schluff oder Feinerde) als auch vom chemischen Aufbau der Proteine bestimmt wurde, wobei die Cry-Proteine insbesondere für die Tonfraktion stark unterschiedliche Affinitäten aufwiesen. Insofern bestätigt sich die Vermutung, dass nicht nur die Bodenzusammensetzung, sondern auch der chemisch-strukturelle Aufbau der verschiedenen Proteine eine maßgebliche Rolle bei der Sorption dieser an den unterschiedlichen Bodenfraktionen spielte. Es erwies sich, dass die Teilchen der Tonfraktion, aufgrund der Größe der spezifischen Oberfläche, das Verhalten der Proteine in den Böden stärker – um zumindest eine Größenordnung – bestimmten als die Teilchen der Schluff- und Feinerdefraktion. Als Maß diente der Verteilungskoeffizient k , der aus der Steigung der Sorptionsisotherme ermittelt wurde. Die Höhe der Sorption der Cry-Proteine konnte nicht auf eine bestimmte oberflächenchemische Eigenschaft der Tonfraktion (spezifische äußere Oberflächengröße, spezifische äußere negative Oberflächenladung, spezifische Ladungsdichte, Gehalt an organischem Kohlenstoff) zurück-

geführt werden. Das Fehlen von Korrelationen führt zu der Vermutung, dass überlagernde Effekte hier eine Rolle spielen könnten.

Eine Konkurrenz der Proteine Cry1A.105 und Cry2Ab2 um Bindungsplätze an der Tonfaktion trat in den untersuchten feldrelevanten Konzentrationen nicht auf. In diesem Konzentrationsbereich kann von einer ausreichenden Anzahl an Bindungsplätzen auf der Tonoberfläche ausgegangen werden, sodass eine Konkurrenz nicht zu erwarten war.

Für die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 konnte im $\mu\text{g mL}^{-1}$ -Bereich in DLS-Messungen ein Aggregationsverhalten gezeigt werden. Dieses Verhalten wurde aber für die durchgeführten Sorptionsuntersuchungen im ng mL^{-1} -Bereich bei pH-Werten $> 6,5$ ausgeschlossen. Weiterhin zeigte sich, dass die recht ungenauen Vorstellungen zu den Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Tonoberflächen nicht zur Verhaltensbeschreibung der unterschiedlichen Cry-Proteine ausreichten. Es wurden aus den AS-Sequenzen das Molekulargewicht, der IEP, die Hydrophobizität und die negativ und positiv geladenen Reste der einzelnen Proteine berechnet. Zur Interpretation der Ergebnisse der Sorptionsuntersuchungen wurde eine detaillierte Modellierung der Proteinoberflächen, basierend auf proteinkristallographischen Daten, mit dem Programm *Swiss PDB Viewer* durchgeführt. Diese Modellierung ergab für die drei Proteine eine gleichförmige Verteilung der polaren und hydrophoben Bereiche. Im elektrostatischen Potential unterschied sich das Cry2Ab2-Protein von den anderen, was sich jedoch nicht auf den Verteilungskoeffizienten k auswirkte. Dabei ergab sich die Schwierigkeit, dass nur für das Cry3Bb1-Protein ein exaktes kristallographisches Modell zur Verfügung stand. Daher können Ungenauigkeiten, basierend auf unzureichendem Wissen über die Proteinstruktur, bei der Interpretation der Bindungsmechanismen nicht ausgeschlossen werden. Als Bindungsmechanismus ist die PCEA (patch controlled electrostatic attraction) interessant, bei der die ungleichmäßige Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche zu einer bestimmten Orientierung des adsorbierten Proteins auf einer geladenen Oberfläche, und bei einem pH-Wert oberhalb des globalen IEP des Proteins, bei dem Protein und Oberfläche netto negativ geladen sind, zu einer starken Adsorption führt (Madliger *et al.*, 2011). Mit diesem Mechanismus konnte die Bindung der Proteine Cry3Bb1 und Cry2Ab2, jedoch nicht die des Cry1A.105-Proteins, plausibel erklärt werden. So scheint eine Voraussage des Verhaltens eines bestimmten Proteins in einem bestimmten Boden daher nur bei genauer Kenntnis der Eigenschaften der beiden Reaktanten – Boden und Protein – möglich.

Bei den Untersuchungen zur Auswirkung des Anbaus von GM-Mais bezüglich der stofflichen Veränderungen im Boden zeigte sich, dass die gentechnisch veränderten Pflanzen im Vergleich

zu drei anderen untersuchten Maissorten keinem reduzierten biologischen Streuabbau unterworfen war, wie es hier über die Stickstoffvorratsbestimmung (N_{\min}) ermittelt wurde. Somit kann nach diesen Ergebnissen eine negative Beeinflussung der Bodenflora bezüglich des Stickstoffvorrats ausgeschlossen werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 von der Maishybriden MON89034 x MON88017 in geringen Mengen über Wurzelexsudate in die Böden der Freisetzungsfläche abgegeben wurden, an denen sie, in feldrelevanten Konzentrationen, trotz hoher Homogenität der ausgewählten Bodeneigenschaften, in Abhängigkeit von der betrachteten Korngröße und dem betrachteten Protein, unterschiedlich stark sorbierten, ohne – aufgrund der Fülle an zu Verfügung stehenden Bindungsplätzen auf den Tonteilchen – miteinander in Konkurrenz zu treten, oder als Bestandteil von Kulturpflanzenrückständen den Streuabbau zu beeinflussen.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Adang M.J. (1991)** - *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: gene structure, action, and utilization - In: *Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors*, Maramorosch K. (Ed.), CRC Press, Boston, MA, ff. 3-24
- Agaisse H., Gominet M., Økstad O.A., Kolsto A.-B. & Lereclus D. (1999)** - PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis* - *Mol. Microbiol.*, Vol. 32, ff. 1043-1053
- Ahmad A., Wilde G.E. & Zhu K.Y. (2005)** - Detectability of coleopteran-specific Cry3Bb1 protein in soil and its effect on nontarget surface and below-ground arthropods - *Entomological Society of America*, Vol. 34, Nr. 2, ff. 385-394
- Albert J.T. & Harter R.D. (1973)** - Adsorption of lysozyme and ovalbumin by clay: effect of clay suspension pH and clay mineral type - *Soil Science*, Vol. 115, Nr. 2, ff. 130-136
- ARS (Agricultural Research Service) (2001)** - Areawide pest management of corn rootworm in maize production systems - annual report - *USDA-ARS, Washington, DC*
- Armstrong D.E. & Chesters G. (1964)** - Properties of protein-bentonite complexes as influenced by equilibrium conditions - *Soil Sci.*, Vol. 98, ff. 39-52
- Atterberg A. (1912)** - Die mechanische Bodenanalyse und die Klassifikation der Mineralböden Schwedens - *Int. Mitt. f. Bodenk.*, Vol. 2, ff. 312-342
- Austin L.G. (1998)** - Conversion factors to convert particle size distributions measured by one method to those measured by another method - *Part. Part. Syst. Charact.*, Vol. 15, ff. 108-111
- Avrameas S. & Guilbert B. (1971)** - A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies - *Eur. J. Immunol.*, Vol. 1, ff. 394-396
- Ayers W.A. & Thornton R.H. (1968)** - Exudation of amino acids by intact and damaged roots of wheat and peas - *Plant and Soil*, Vol. 28, Nr. 2, ff. 193-207
- Bacic A., Moody S.F. & Clarke A.E. (1986)** - Structural analysis of secreted root slime from maize (*Zea mays* L.) - *Plant Physiol.*, Vol. 80, ff. 771-777
- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S. & Vivanco J.M. (2006)** - The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms - *Annu. Rev. Plant Biol.*, Vol. 57, ff. 233-266
- Ben-Naim A. (1980)** - Hydrophobic interaction - *Plenum Press, New York*
- Barak P., Jobe B.O., Krueger A.R., Peterson L.A. & Laird D.A. (1997)** - Effects of long-term soil acidification due to nitrogen fertilizer inputs in Wisconsin - *Plant and Soil*, Vol. 197, Nr. 1, ff. 61-69
- Baron M.H., Revault M., Servagent-Noinville S., Abadie J. & Quiquampoix H. (1999)** - Chymotrypsin adsorption on montmorillonite: enzymatic activity and kinetic FTIR structural analysis - *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 214, ff. 319-332
- Barton K.A., Whiteley H.R. & Yang N.-S. (1987)** - *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects - *Plant Physiol.*, Vol. 85, ff. 1103-1109
- Basu U., Francis J.L., Whittall R.M., Stephens J.L., Wang Y., Zaiane O.R., Goebel R., Muench D.G., Good A.G. & Taylor, G.J. (2006)** - Extracellular proteomes of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots: analysis and comparison by MudPIT and LC-MS/MS - *Plant and Soil*, Vol. 286, Nr. 1-2, ff. 357-376

- Baumgarte S. & Tebbe C.C. (2005)** - Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab *Bt*-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere - *Molecular Ecology*, Vol. 14, ff. 2539-2551
- Bernheimer A.W. & Grushoff P. (1967)** - Cereolysin: production, purification and partial characterization - *Journal of General Microbiology*, Vol. 46, ff. 143-150
- Berthold C., Lühmann J., Klein R. & Nickel K.G. (2000)** - Partikelmesstechniken im Vergleich - Untersuchungen zur Korngrößenbestimmung toniger Rohstoffe - *Aufbereitungstechnik*, Vol. 41, Nr. 7
- Bertin C., Yang X.H. & Weston L.A. (2003)** - The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere - *Plant Soil*, Vol. 256, ff. 67-83
- Bietlot H., Carey P.R., Choma C., Kaplan H., Lessard T. & Pozsgay M. (1989)** - Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* - *Biochem. J.*, Vol. 260, ff. 87-91
- Bitzer R.J., Rice M.E., Pilcher C.D., Pilcher C.L. & Lam W.-K.F. (2005)** - Biodiversity and community structure of epedaphic and eudaphic springtails (Collembola) in transgenic rootworm *Bt* corn - *Environ. Entomol.*, Vol. 34, Nr. 5, ff. 1346-1376
- Blume H.-P., Stahr K. & Leinweber P. (2011)** - Bodenkundliches Praktikum - *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*, 3. Auflage, S. 38, 81, 111, 139f., 177
- Boonserm P., Davis P., Ellar D.J. & Li J. (2005)** - Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications - *J. Mol. Biol.*, Vol. 348, ff. 363-382
- Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Logendra S., Petersen F., Gleba Y. & Raskin I. (1999)** - Production of recombinant proteins in plant root exudates - *Nature Biotechnology*, Vol. 17, ff. 466-469
- Bradley W.F. (1945)** - Molecular associations between montmorillonite and some poly-functional organic liquids - *Am. Chem. Soc. Jour.*, Vol. 67, ff. 975-981
- Bravo A., Hendricks K., Janssens S. & Peferoen M. (1992)** - Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes - *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 60, ff. 247-253
- Bravo A., Gill S.S. & Soberón M. (2007)** - Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control - *Toxicon.*, Vol. 49, Nr. 4, ff. 423-435
- Brimecombe M.J., De Leij Frans A.A.M. & Lynch J.M. (2001)** - Nematode community structure as a sensitive indicator of microbial perturbations induced by a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* strain - *Biol. Fertil. Soils*, Vol. 34, ff. 270-275
- Broderick N.A., Raffa K.F. & Handelsman J. (2006)** - Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity - *PNAS*, Vol. 103, Nr. 41, ff. 15196-15199
- Brunauer S., Emmet P.H. & Teller E. (1938)** - Adsorption of gases in multimolecular layers - *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 60, Nr. 2, f. 309-319
- Bruns H.A. & Abel C.A. (2003)** - Nitrogen fertility effects on *Bt* delta-endotoxin and nitrogen concentrations of maize during early growth - *Agron. J.*, Vol. 95, ff. 207-211
- Bulla L.A.Jr. (1975)** - Bacteria as insect pathogens - *Annu. Rev. Microbiol.*, Vol. 29, ff. 163-190
- Calamai L., Lozzi I., Stotzky G., Fusi P. & Ristori G.G. (2000)** - Interaction of catalase with montmorillonite homoionic to cations with different hydrophobicity effect on enzymatic activity and microbial utilization - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 32, ff. 815-823

- Chaboud A. (1983)** - Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime - *Plant Soil*, Vol. 73, ff. 395-402
- Chang C., Yu Y.-M., Dai S.-M., Law S.K. & Gill S.S. (1993)** - High-level cryIVD and cytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes - *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 59, ff. 815-821
- Charmont S., Jamet E., Pont-Lezica R. & Canut H. (2005)** - Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds - *Phytochemistry*, Vol. 66, Nr. 4, ff. 453-461
- Chevallier T., Muchaonyerwa P. & Chenu C. (2003)** - Microbial utilisation of two proteins adsorbed to a vertisol clay fraction: toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and bovine serum albumin - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 35, ff. 1211-1218
- Chenu C. & Stotzky G. (2002)** - Interactions between microorganisms and soil particles: an overview - In: *Interactions between soil particles and microorganisms. Impact on the terrestrial ecosystem*, Huang P.M., Bollag J.M., Senesi N. (Eds.), John Wiley & Sons, New York, NY, ff. 3-40
- Chiang C.-M. & Chao C.-H. (1964)** - Adsorption of proteins by soil colloids - *Tu Jang Hsuck Pao*, Vol. 12, ff. 411-420 (cf. *Chem. Abstr.*, Vol. 65, f. 1429a)
- Clark B.W., Phillips T.A. & Coats J.R. (2005)** - Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: a review - *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 53, ff. 4643-4653
- Clark P.L., Vaughn T.T., Meinke L.J., Molina-Ochoa J. & Foster J.E. (2006)** - *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) larval feeding behavior on transgenic maize (MON 863) and its isoline - *J. Econ. Entomol.*, Vol. 99, Nr. 3, ff. 722-727
- Conner A.J., Glare T.R. & Nap J.-P. (2003)** - The release of genetically modified crops into the environment - *The Plant Journal*, Vol. 33, ff. 19-46
- Crecchio C. & Stotzky G. (1998a)** - Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil - *Soil Biol. Biochem.*, Vol. 30, Nr. 4, ff. 463-470
- Crecchio C. & Stotzky G. (2001)** - Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite-humic acids-Al hydroxypolymers - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 33, ff. 573-581
- Crickmore N., Bone E.J., Williams J.A. & Ellar D.J. (1995)** - Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* - *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 131, ff. 249-254
- Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J. & Dean D.H. (1998)** - Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins - *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 62, Nr. 3, ff. 807-813
- Czeslik C. (2006)** - Proteinadsorption an festen Grenzflächen. Erwünscht und unerwünscht - *Chemie in unserer Zeit*, Vol. 40, Nr. 4, ff. 238-245
- Dashman T. & Stotzky G. (1986)** - Microbial utilization of amino acids and a peptide bound on homoionic montmorillonite and kaolinite - *Soil Biol. Biochem.*, Vol. 18, Nr. 1, ff. 5-14
- Degenhardt B. (2000)** - Wachstum und physiologisches Verhalten von *Zea mays* bei multiplem Stress unter besonderer Berücksichtigung des Wurzelsystems - *Dissertation, Julius-Maximilian-Universität Würzburg*

- de Jonge H. & Mittelmeijer-Hazeleger M.C. (1996)** - Adsorption of CO₂ and N₂ on soil organic matter: nature of porosity, surface area, and diffusion mechanism - *Environmental Science and Technology*, Vol. 30, ff. 408-413
- De-la-Peña C., Badri D.V., Lei Z., Watson B.S., Brandão M.M., Silva-Filho M.C., Sumner L.W. & Vivanco J.M. (2010)** - Root secretion of defense-related proteins is development-dependent and correlated with flowering time - *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 285, Nr.40, ff. 30654-30665
- de Maagd R.A., Bosch D. & Stiekema W. (1999)** - *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants - *Trends in Plant Science*, Vol. 4, Nr. 1, ff. 9-13
- de Maagd R.A., Bravo A. & Crickmore N. (2001)** - How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world - *TRENDS in Genetics*, Vol. 17, Nr. 4, ff. 193-199
- Denolf P., Jansens S., Peferoen M., Degheele D. & Van Rie J. (1993)** - Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) - *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, ff. 1828-1837
- Dierauer H., Anken T., Hiltbrunner J., Kessler W., Mayer J. & Strasser F. (2008)** - Merkblatt Biomais - *Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Frick*
- Donovan W.P., Rupar M., Slanley A.C., Malvar T., Gawron-Burke M.C. & Johnson T.B. (1992)** - Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species - *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, Nr. 12, ff. 3921-3927
- Dorsch J.A., Candas M., Griko N.B., Maaty W.S.A., Midboe E.G., Vadlamudi R.K. & Bulla L.A. Jr. (2002)** - Cry 1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of Bt-R 1 in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis* - *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 32, ff. 1025-1036
- Douville M., Gagné F., Masson L., McKay J. & Blaise C. (2005)** - Tracking the source of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab endotoxin in the environment - *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 33, ff. 219-232
- Douville M., Gagné F., Blaise C. & Andre C. (2007)** - Occurrence and persistence of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and transgenic Bt corn cry1Ab gene from an aquatic environment - *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 66, ff. 195-203
- Drury S.M., Reynolds T.L., Ridley W.P., Bogdanova N., Riordan S., Nemeth M.A., Sorbet R., Trujillo W.A. & Breeze M.L. (2008)** - Composition of forage and grain from second-generation insect-protected corn MON 89034 is equivalent to that of conventional corn (*Zea mays* L.) - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 56, Nr. 12, ff. 4623-4630
- Dubelman S., Ayden B.R., Bader B.M., Brown C.R., Jiang C. & Vlachos D. (2005)** - Cry1Ab protein does not persist in soil after 3 years of sustained Bt corn use - *Environ. Entomol.*, Vol. 34, Nr. 4, ff. 915-921
- DWD (Deutscher Wetterdienst) (2012)** - Wetterdaten Braunschweig 2008-2011 - *persönliche Kommunikation Herr Tobias Vogt, 2012/01/13*
- English L.H., Robbins H.L., von Tersch M.A., Kulesza C.A., Ave D., Coyle D., Jany C.S. & Slatin S.L. (1994)** - Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin - *J. Insect. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 24, ff. 1025-1035

- Engvall E. & Perlman P. (1971)** - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. - *Immunochemistry*, Vol. 8, Nr. 9, ff. 871-874
- Ensminger L.E. & Gieseking T.E. (1941)** - The adsorption of proteins by montmorillonite clays and its effect on base exchange capacity - *Soil Sci.*, Vol. 51, ff. 125-133
- Escher N., Käch B. & Nentwig W. (2000)** - Decomposition of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize by microorganisms and woodlice *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda) - *Basic Appl. Ecol.*, Vol. 1, ff. 161-169
- Estruch J.J., Warren W., Mullins M., Nye G.J., Craig Y.A. & Koziel M.G. (1996)** - Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93, ff. 5389-5394
- Fearing P.L., Brown D., Vlachos D., Meghji M. & Privalle L. (1997)** - Quantitative analysis of CryIA(b) expression in *Bt* maize plants, tissues, and silage and stability of expression over successive generations - *Molecular Breeding*, Vol. 3, ff. 169-176
- Feitelson J.S., Payne J. & Kim L. (1992)** - *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond - *Biotechnology*, Vol. 10, ff. 271-275
- Feng Q. & Becktel W.J. (1994)** - pH-induced conformational transitions of CryIA(a), CryIA(c), and CryIII δ -endotoxins in *Bacillus thuringiensis* - *Biochemistry*, Vol. 33, ff. 8521-8526
- Feng Y., Ling L., Fan H., Liu Y., Tan F., Shu Y. & Wang J. (2011)** - Effects of temperature, water content and pH on degradation of Cry1Ab protein released from *Bt* corn straw in soil - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 43, ff. 1600-1606
- Fischhoff D.A., Bowditch K.S., Perlak F.J., Marrone P.G., McCormick S.H., Niedermeyer J.G., Dean D.A., Kusano-Kretzmer K., Mayer E.J., Rochester D.E., Rogers S.G. & Fraley R.T. (1987)** - Insect tolerant transgenic tomato plants - *Bio/Technology*, Vol. 5, ff. 807-813
- Fleer G.J., Cohen Stuart M.A., Scheutjens J.M.H.M., Cosgrove T. & Vincent B. (1993)** - Polymers at interfaces - *Chapman & Hall, London*, ff. 520
- Flexner J.L., Lighthart B. & Croft B.A. (1986)** - The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods - *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Vol. 16 ff. 203-254
- Flores S., Saxena D. & Stotzky G. (2005)** - Transgenic *Bt* plants decompose less in soil than non-*Bt* plants - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 37, ff. 1073-1082
- Foster R.C. (1986)** - The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere - *Annu. Rev. Phytopathol.*, Vol. 24, ff. 211-234
- Fusi P., Ristori G.G., Calamai L. & Stotzky G. (1989)** - Adsorption and binding of protein on "clean" (homoionic) and "dirty" (coated with Fe oxyhydroxides) montmorillonite, illite and kaolinit - *Soil Biol. Biochem.*, Vol. 21, Nr. 7, ff. 911-920
- Galitsky N., Cody V., Wojtczak A., Ghosh D., Luft J.R., Pangborn W. & English L. (2001)** - Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis* - *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, Vol. 57, ff. 1101-1109
- Gallori E., Bazzicalupo M., Dal Canto L., Fani R., Nannipieri P., Vettori C. & Stotzky G. (1994)** - Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-sterile soil - *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 15, ff. 119-126
- Gatehouse J.A. (2008)** - Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants - *Plant Physiology*, Vol. 146, ff. 881-887

- Gewin (2003)** - Genetically modified corn - Environmental benefits and risks - *PLoS Biology*, Vol. 1, Nr. 1, ff. 15-19
- Gianfreda L. & Bollag J.M. (1996)** - Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil - In: *Soil Biochemistry*, Stotzky G., Bollag J.M. (Eds.), Marcel Dekker: New York, Vol. 9, ff. 123-193
- Gibbs J., de Bruxelle G., Armstrong W. & Greenway H. (1995)** - Evidence for anoxic zones in 2-3 mm tips of aerenchymatous maize roots under low O₂ supply - *Aust. J. Plant Physiol.*, Vol. 22, ff. 723-730
- Gill S.S., Cowles E.A. & Pietrantonio P.V. (1992)** - The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins - *Annu. Rev. Entomol.*, Vol. 37, ff. 615-636
- Gisi U., Schenker R. & Schulin R. (1997)** - Bodenökologie - *Thieme Georg Verlag*, S. 6f., 12, 15f., 23f., 37, 112, 114f., 123, 125, 153f., 173, 179, 181, 211, 251ff., 266, 277, 288, 290, 298-301, 308
- Glandorf D.C.M., Bakker P.A.H.M. & van Loon L.C. (1997)** - Influence of the production of antibacterial and antifungal proteins by transgenic plants on the saprophytic soil microflora - *Acta Bot. Neerl.*, Vol. 46, ff. 85-104
- Glick B.R. & Pasternack J.J. (1995)** - Molekulare Biotechnologie - *Spektrum Akademischer Verlag*
- Gould F. (1998)** - Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology - *Annu. Rev. Entomol.*, Vol. 43, ff. 701-726
- Gray M.E., Sappington T.W., Miller N.J., Moeser J. & Bohn M.O. (2009)** - Adaptation and invasiveness of Western corn rootworm: intensifying research on a worsening pest - *Annu. Rev. Entomol.*, Vol. 54, ff. 303-321
- Gregory P.J. (Ed.) (2006)** - Plant roots: growth, activity and interaction with soils - *Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK*
- Grochulski P., Masson L., Borisova S., Pusztai-Carey M., Schwartz J.-L., Brousseau R. & Cygler M. (1995)** - *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation - *J. Mol. Biol.*, Vol. 254, ff. 447-464
- Güereca L. & Bravo A. (1999)** - The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution - *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1429, ff. 342-350
- Halpin C., Knight M.E., Foxon G.A., Campbell M.M., Boudet A.M., Boon J.J., Chabbert B., Tollier M.-T. & Schuch W. (1994)** - Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase - *The Plant Journal*, Vol. 6, Nr. 3, ff. 339-350
- Hansen B.M. & Salamitou S. (2000)** - Virulence of *Bacillus thuringiensis* - In: *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*, Charles J. et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, ff. 41-64
- Hansen-Jesse L.C. & Obrycki J.J. (2000)** - Field deposition of *Bt* transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly - *Oecologia*, Vol. 125, ff. 241-248
- Harter R.D. & Ahlrichs J.L. (1967)** - Determination of clay surface acidity by infrared spectroscopy - *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, Vol. 31, ff. 30-33
- Harter R.D. & Stotzky G. (1971)** - Formation of clay-protein complexes - *Soil. Sci. Soc. Amer. Proc.*, Vol. 35, ff. 383-388
- Hawes M.C., Gunawardena U., Miyasaka. S. & Zhao X. (2000)** - The role of root border cells in plant defense - *Trends Plant Sci.*, Vol. 5, ff. 128-133

- Heimpel A.M. & Angus T.A. (1960)** - Bacterial insecticides - *Bacteriol Rev.*, Vol. 24, Nr. 3, ff. 266-288
- Helassa N., Quiquampoix H., Noinville S., Szponarski W. & Staunton S. (2009)** - Adsorption and desorption of monomeric *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) Cry1Aa toxin on montmorillonite and kaolinite - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 41, ff. 498-504
- Helassa N., Daudin G., Noinville S., Janot J.-M., Déjardin P., Staunton S. & Quiquampoix H. (2010)** - Mobility of adsorbed Cry1Aa insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) on montmorillonite measured by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) - *Philosophical Magazine*, Vol. 90, Nr. 17, ff. 2365-2371
- Helassa N., M'Charek A., Quiquampoix H., Noinville S., Déjardin P., Frutos R. & Staunton S. (2011)** - Effects of physicochemical interactions and microbial activity on the persistence of Cry1Aa *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) toxin in soil - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 43, ff. 1089-1097
- Herren R.V. & Teare Ketter C.A. (2011)** - The science of agriculture: a biological approach - *Cengage Learning*, 4. Auflage
- Hetherington P.R., Reynolds T.L., Marshall G. & Kirkwood R.C. (1999)** - The absorption, translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene - *Journal of Experimental Botany*, Vol. 50, Nr. 339, ff. 1567-1576
- Hönemann L., Zurbrügge C. & Nentwig W. (2008)** - Effects of *Bt*-corn decomposition on the composition of the soil meso- and macrofauna - *Applied Soil Ecology*, Vol. 40, ff. 203-209
- Höfte H. & Whiteley H.R. (1989)** - Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* - *Microbiological Reviews*, Vol. 53, Nr. 2, ff. 242-255
- Hopkins D.W., Webster E.A., Chudek J.A. & Halpin C. (2001)** - Decomposition in soil of tobacco plants with genetic modifications to lignin biosynthesis - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 33, ff. 1455-1462
- Hopkins D.W. & Gregorich E.G. (2003)** - Detection and decay of the *Bt* endotoxin in soil from a field trial with genetically modified maize - *European Journal of Soil Science*, Vol. 54, ff. 793-800
- Huang F., Buschman L.L., Higgins R.A. & McGaughey W.H. (1999)** - Inheritance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer - *Science*, Vol. 284, Nr. 5416, f. 965
- Huber H.E. & Lüthy P. (1981)** - *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: composition and activation - In: *Pathogenesis of invertebrate microbial diseases*, Davidson E.W. (Ed.), Allenheld, Osmun Publishers, Totowa, NJ, ff. 209-234
- Hunfeld H. (2011)** - Einfluss ausgewählter Bodeneigenschaften auf das Sorptionsverhalten des Cry3Bb1 Proteins - *Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover*
- Icoz I., Andow D., Zwahlen C. & Stotzky G. (2009)** - Is the Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) taken up by plants from soils previously planted with *bt* corn and by carrot from hydroponic culture? - *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 83, ff. 48-58
- Icoz I. & Stotzky G. (2008a)** - Cry3Bb1 protein from *Bacillus thuringiensis* in root exudates and biomass of transgenic corn does not persist in soil - *Transgenic Res*, Vol. 17, ff. 609-620
- Icoz I. & Stotzky G. (2008b)** - Fate and effects of insect-resistant *Bt* crops in soil ecosystems - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 40, ff. 559-586

- Iriarte J., Bel Y., Ferrandis M.D., Andrew R., Murillo J., Ferré J. & Caballero P. (1998)** - Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain - *Systematic Applied Microbiology*, Vol. 21, ff. 97-106
- James C. (2005)** - Global status of commercialized biotech/GM crops: 2005 - ISAAA (*International service for the acquisition of agri-biotech applications*), brief 34
- James C. (2009)** - Global status of commercialized biotech/GM crops - ISAAA (*International service for the acquisition of agri-biotech applications*), brief 41
- Jung H.G. & Shaeffer C.C. (2004)** - Influence of *Bt* transgenes on cell wall lignification and digestibility of maize stover for silage - *Crop Sci.*, Vol. 44, ff. 1781-1789
- Kellogg E.A. (2001)** - Evolutionary history of the grasses - *Plant Physiology*, Vol. 125, ff. 1198-1205
- Kemeny D. (1994)** - ELISA - Anwendungen des Enzyme Linked Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischen Labor - *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*
- Khanna M. & Stotzky G. (1992)** - Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA - *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, Nr. 6, ff. 1930-1939
- Kirschbaum J.B. (1985)** - Potential implications of genetic engineering and other biotechnologies to insect control - *Ann. Rev. Entomol.*, Vol.30, ff. 51-70
- Kleber M., Sollins P. & Sutton R. (2007)** - A conceptual model of organo-mineral interactions in soils: self-assembly of organic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces - *Biogeochemistry*, Vol. 85, ff. 9-24
- Kleijn M. & Norde W. (1995)** - The adsorption of proteins from aqueous solution on solid surfaces - *Heterogen. Chem. Rev.*, Vol. 2, Nr. 3, ff. 157-172
- Knight P.J., Crickmore N. & Ellar D.J. (1994)** - The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) δ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N - *Mol. Microbiol.*, Vol. 11, ff. 429-436
- Knowles B.H. & Ellar D.J. (1987)** - Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* & endotoxins with different insect specificity - *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 924, ff. 509-518
- Kodaka M. (2004)** - Interpretation of concentration-dependence in aggregation kinetics - *Biophysical Chemistry*, Vol. 109, ff. 325-332
- Köhler G.J.F. & Milstein C. (1975)** - Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity - *Nature*, Vol. 256, ff. 495-497
- Konert M. & Vandenberghe J. (1997)** - Comparison of laser grain size analysis with pipette and sieve analysis: a solution for the underestimation of the clay fraction - *Sedimentology*, Vol. 44, ff. 523-535
- Körschens M. (1997)** - Abhängigkeit der organischen Bodensubstanz (OBS) von Standort und Bewirtschaftung sowie ihr Einfluss auf Ertrag und Bodeneigenschaften - *Arch. Acker-Pfl. Boden.*, Vol. 41, ff. 435-463
- Koskella J. & Stotzky G. (1997)** - Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes - *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, Nr. 9, ff. 3561-3568

- Koziel M.G., Beland G.L., Bowman C., Carozzi N.B., Crenshaw R., Crossland L., Dawson J., Desai N., Hill M., Kadwell S., Launis K., Lewis K., Maddox D., McPherson K., Meghji M.R., Merlin E., Rhodes R., Warren G.W., Wright M. & Evola S.V. (1993)** - Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis* - *Biotechnology*, Vol. 11, ff. 194-200
- Kraume S. (2012)** - Deutsches Maiskomitee e.V. (DMK), Brühler Straße 9, 53119 Bonn - persönliche Kommunikation Frau Susanne Kraume
- Kuhlmann U. & van der Burgt W.A.C.M. (1998)** - Possibilities for biological control of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, in central europe - *Biocontrol News Inf.*, Vol. 19, ff. 59-68
- Kuo Y.-H., Lambein F., Ikegami F. & van Parus R. (1982)** - Isoxazolin-5-ones and amino acids in root exudates of pea and sweet pea seedlings - *Plant Physiol.*, Vol. 70, ff. 1283-1289
- Lange W.H. (1984)** - Aquatic and semiaquatic Lepidoptera - In: *An introduction to the aquatic insects of North America*, Merritt R.W. & Cummins K.W. (Eds.), Kendall/Hunt, Dubuque, Iowa, ff. 348-360
- Lawhorn C.N., Neher D.A. & Dively G.P. (2009)** - Impact of coleopteran targeting toxin (Cry3Bb1) of *Bt* corn on microbially mediated decomposition - *Appl. Soil Ecol.*, Vol. 41, ff. 364-368
- Lee M.K., Curtiss A., Alcantara E. & Dean D.H. (1996)** - Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc on the gypsy moth, *Lymantria dispar* - *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, ff. 583-586
- Lee L.N., Saxena D. & Stotzky G. (2003)** - Activity of free and clay-bound insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against the mosquito *Culex pipiens* - *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, Nr. 7, ff. 4111-4115
- Lehman R.M., Osborne S.L. & Rosentrater K.A. (2008)** - No differences in decomposition rates observed between *Bacillus thuringiensis* and non-*Bacillus thuringiensis* corn residue incubated in the field - *Agronomy Journal*, Vol. 10, Nr. 1, ff. 163-168
- Leinweber P. (1995)** - Organische Substanzen in Partikelgrößenfraktionen: Zusammensetzung, Dynamik und Einfluss auf Bodeneigenschaften - *Vechtaer Studien zur angewandten Geographie und Regionalwissenschaft*, Band 15, Vechtaer Druckerei und Verlag, S. 148
- Lereclus D., Delecluse A. & Lecadet M.-M. (1993)** - Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*, Entwistle P.F., Cory J.S., Bailey M.J., Higgs S. (Eds.), Chichester, UK, Wiley, ff. 37-69
- Levine E. & Oloumi-Sadeghi H. (1991)** - Management of diabroticite rootworms in corn - *Annu. Rev. Entomol.*, Vol. 36, ff. 229-255
- Li J., Carroll J. & Ellar D.J. (1991)** - Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5Å resolution - *Nature*, Vol. 353, ff. 815-821
- Likitvivatanavong S., Katzenmeier G. & Angsuthanasombat C. (2006)** - Asn183 in $\alpha 5$ is essential for oligomerisation and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin - *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 445, Nr. 1, ff. 46-55
- Lipson S.M. & Stotzky G. (1985)** - Infectivity of reovirus adsorbed to homoionic and mixed-cation clays - *Water Res.*, Vol. 19, ff. 227-234
- Lipson S.M. & Stotzky G. (1986)** - Effect of kaolinite on the specific infectivity of reovirus - *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 37, ff. 83-88

- Llewellyn D., Cousins Y., Mathews A., Hartweck L. & Lyon B. (1994)** - Expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein genes in transgenic crop plants - *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Vol. 49, ff. 85-93
- Losey J.E., Rayor L.S. & Carter M.E. (1999)** - Transgenic pollen harms monarch larvae - *Nature*, Vol. 399, f. 214
- Lottspeich F. & Zorbas H. (1998)** - Bioanalytik - Heidelberg, Berlin, Spektrum Akad. Verlag
- Lozzi I., Calamai L., Fusi P., Bosetto M. & Stotzky G. (2001)** - Interaction of horseradish peroxidase with montmorillonite homoionic to Na⁺ and Ca²⁺: effects on enzymatic activity and microbial degradation - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 33, ff. 1021-1028
- Luo K.-E., Sangadala S., Masson L., Mazz A., Brousseau R. & Adang M.J. (1997)** - The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase function as "receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxin binding and pore formation - *Insect Biochem.*, Vol. 27, ff. 735-743
- Luthy P. & Ebersold H.R. (1981)** - *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: histopathology and molecular mode of action - In: *Pathogenesis of invertebrate microbial diseases*, Davidson E.W. (Ed.), ff. 235-268, Allanheld Osmun, New Jersey
- Luttmann W., Bratke K., Küpper M. & Myrtek D. (2009)** - Der Experimentator: Immunologie - Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage, S. 16f., 19, 26, 30, 108, 111, 116, 118f.
- Lynch R.E. (1980)** - European corn borer: yield losses in relation to hybrid and stage of corn development - *Journal of Economic Entomology*, Vol. 73, ff. 159-164
- Ma W., Hochholdinger F. & Li C. (2010a)** - Comparative studies on identification of maize secreted proteome by different analyzing techniques - *Guang Pu Xue Guang Pu Fen Xi*, Vol. 30, Nr. 10, ff. 2762-2766
- Ma W., Muthreich N., Liao C., Franz-Wachtel M., Schütz W., Zhang F., Hochholdinger F. & Li C. (2010b)** - The mucilage proteome of maize (*Zea mays* L.) primary roots - *Journal of Proteome Research*, Vol. 9, ff. 2968-2976
- Madliger M., Sander M. & Schwarzenbach R.P. (2010)** - Adsorption of transgenic insecticidal Cry1Ab protein to SiO₂. 2. Patch-Controlled Electrostatic Attraction - *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 44, ff. 8877-8883
- Madliger M., Gasser C.A., Schwarzenbach R.P. & Sander M. (2011)** - Adsorption of transgenic insecticidal Cry1Ab protein to silica particles. Effects on transport and bioactivity - *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 45, ff. 4377-4384
- Malekani K., Rice J.A. & Jackson M.L. (1997)** - The effect of sequential removal of organic matter on the surface morphology of humin - *Soil Science*, Vol. 162, ff. 333-342
- Marschner H. (1995)** - Mineral nutrition of higher plants - London, Academic, 2. Ausgabe
- Martin P.A.W. & Travers R.S. (1989)** - Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates - *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 55, Nr. 10, ff. 2437-2442
- Masoero F., Moschini M., Rossi F., Prandini A. & Pietri A. (1999)** - Nutritive value, mycotoxin contamination and in vitro rumen fermentation of normal and genetically modified corn (Cry1A(b)) grown in northern Italy - *Maydica*, Vol. 44, ff. 205-209

- Meadows M.P. (1993)** - *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment - In: *Bacillus thuringiensis, an experimental biopesticide: theory and practice*, Entwistle P.F., Cory J.S., Bailey M.J., Higgs S. (Eds.), Chichester, New York, Wiley, ff. 193-220
- MacEwan D.M.C. (1955)** - Interlamellar sorption by clay minerals - *Proc. 1st Natl. Conf. Clay Technol., Calif. Nat. Res. Div. Mins. Bull., Vol. 169, ff. 78-85*
- Macritchie F. & Alexander A.E. (1963)** - Kinetics of adsorption of proteins at interfaces: III. The role of electrical barriers in adsorption - *Journal of Colloid Science, Vol. 18, ff. 464-469*
- McDougall B.M. & Rovira A.D. (1965)** - Carbon-14 labelled photosynthate in wheat root exudates - *Nature, Vol. 207, ff. 1104-1105*
- McLaren A.D. (1954)** - The adsorption and reactions of enzymes and proteins on kaolinite - *J. Phys. Chem., Vol. 58, ff. 129-137*
- McLaren A.D., Peterson G.H. & Barshad C.I. (1958)** - The adsorption and reactions of enzymes and proteins on clay minerals. IV. Kaolinite and montmorillonite - *Soil Sci. Soc. Amer. Proc., Vol. 22, ff. 239-244*
- Mendelsohn M., Kough J., Vaituzis Z. & Matthews K. (2003)** - Are *Bt* crops safe? - *Nature Biotechnology, Vol. 21, Nr. 9, ff. 1003-1009*
- Metcalf R.L. (1986)** - Forward: pp. vii-xv. In: *Methods for the study of pest Diabrotica*, Krysan J.L. & Miller T.A. (Eds.), Springer, New York
- Metcalf R.L. & Metcalf R.A. (1993)** - *Destructive and useful insects: their habits and control* - 5. Auflage, McGraw-Hill, New York
- Meyers (1979)** - *Enzyklopädisches Lexikon in 25 Bänden* - Bibliographisches Institut, Mannheim, 9. Auflage
- Miethling-Graff R., Dockhorn S. & Tebbe C.C. (2009)** - Release of the recombinant Cry3Bb1 protein of *Bt* maize MON88017 into field soil and detection of effects on the diversity of rhizosphere bacteria - *European Journal of Soil Biology, Vol. 46, Nr. 1, ff. 41-48*
- Miller N., Estoup A., Toepfer S., Bourguet D., Lapchin L., Derridj S., Kim K.S., Renyaud P., Furlan L. & Guillemaud T. (2005)** - Multiple transatlantic introduction of the Western corn rootworm - *Science, Vol. 310, Nr. 5750, f. 992*
- Moellenbeck D.J., Peters M.L., Bing J.W., Rouse J.R., Higgins L.S., Sims L., Nevshemal T., Marshall L., Ellis T.R., Bystrak P.G., Lang B.A., Stewart J.L., Kouba K., Sondag V., Gustafson V., Nour K., Xu D., Swenson J., Zhang J., Czapla T., Schwab G., Jayne S., Stockhoff B.A., Narva K., Schnepf H.E., Stelman S.J., Poutre C., Koziel M. & Duck N. (2001)** - Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms - *Nature Biotechnology, Vol. 19, ff. 668-672*
- Monsanto (2004)** - Petition for the determination of nonregulated status for MON88017 corn - *Monsanto Petition # 04-CR-108U*
- Monsanto (2006)** - Petition for the determination of nonregulated status for MON89034 - *Monsanto Petition # 06-CR-166U*
- Morse R.J., Yamamoto T. & Stroud R.M. (2001)** - Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope structure - *Structure, Vol. 9, ff. 409-417*
- Mortland M.M. & Raman K.V. (1968)** - Surface acidity of smectites in relation to hydration, exchangeable cation, and structure - *Clays Clay Min., Vol. 16, ff. 393-398*

- Muchaonyerwa P., Chenu C., Pantani O.L. & Calamai L. (2002)** - Adsorption of toxin from *Bacillus thuringiensis* subspecies *tenebrionis* to clay fractions of tropical soils - In: *Developments in Soil Science*, Violante A., Huang P.M., Bollag J.M., Gianfreda L. (Eds.), Elsevier, ff. 59- 68
- Muchaonyerwa P., Waladde S., Nyamugafata P., Mpeperek S. & Ristori G.G (2004)** - Persistence and impact on microorganisms of *Bacillus thuringiensis* proteins in some Zimbabwean soils - *Plant and Soil*, Vol. 266, ff. 41-46
- Muchaonyerwa P., Chevallier T., Pantani O.L., Nyamugafata P., Mpeperek S. & Chenu C. (2006)** - Adsorption of the pesticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* on tropical soils and their particle-size fractions - *Geoderma*, Vol. 133, ff. 244-257
- Mütek (2011)** - MÜTEK PCD - Genau und präzise gelöste Ladung messen - btg.com/products.asp?langage=12&cat=prod&appli=5&numProd=357&criteres=M%C3%9CCTEK%20PCD, 2011/05/12
- Nestler J., Schütz W. & Hochholdinger F. (2011)** - Conserved and unique features of the maize (*Zea mays* L.) root hair proteome - *J. Proteome Res.*, Vol. 10, ff. 2525-2537
- Niemeyer J. & Gessler F. (2002)** - Determination of free DNA in soils - *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, Vol. 165, ff. 121-124
- Norde W. (1986)** - Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface - *Adv. Colloid Interface Sci.*, Vol. 25, ff. 267-340
- Norde W. (2003)** - Colloids and interfaces in life sciences - *Marcel Dekker Inc, 1. Auflage*
- Nguyen H.T. & Jehle J.A. (2009)** - Expression of Cry3Bb1 in transgenic corn MON88017 - *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 57, ff. 9990-9996
- Nguyen R.T. & Harvey H.R. (2001)** - Preservation of protein in marine systems: hydrophobic and other noncovalent associations as major stabilizing forces - *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 65, Nr. 9, ff. 1467-1480
- Odell J., Nagy F. & Chua N.-H. (1985)** - Identification of the DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter - *Nature*, Vol. 313, ff. 810-812
- Ostlie K.R., Hutchinson W.D. & Hellmich R.L. (1997)** - *Bt* corn and European corn borer - *NCR Publication 602*, - Univ. of Minnesota, St. Paul
- Pagel-Wieder S. & Fischer W.R. (2001)** - Estimation of the specific surface area of soil particles by adsorption of polyvinylalcohol in aqueous suspension - *J. Plant. Nutr. Soil Sci.*, Vol. 164, ff. 441-443
- Pagel-Wieder S. (2002)** - Estimation of the specific surface area of soil particles by adsorption of polyvinylalcohol in aqueous suspension - *Horizonte, Herrenhäuser Forschungsbeiträge, Der andere Verlag*, f. 119
- Pagel-Wieder S., Gessler F., Niemeyer J. & Schröder D. (2004)** - Adsorption of the *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) on Na-montmorillonite and on the clay fractions of different soils - *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, Vol. 167, ff. 184-188
- Pagel-Wieder S. Niemeyer J., Fischer W.R. & Gessler F. (2007)** - Effects of physical and chemical properties of soils on adsorption of the insecticidal protein (Cry1Ab) from *Bacillus thuringiensis* at Cry1Ab protein concentrations relevant for experimental field sites - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 39, ff. 3034-3042

- Palm C.J., Schaller D.L., Donegan K.K. & Seidler R.J. (1996)** - Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin - *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 42, ff. 1258-1262
- Peairs F.B. & Pilcher S.D. (2001)** - Western corn rootworm - *Fact sheet 05570, Colorado State University Cooperative Extension., Fort Collins*
- Pendleton I.R., Bernheimer A.W. & Grushoff P. (1973)** - Purification and partial characterization of hemolysins from *Bacillus thuringiensis* - *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 21, ff. 131-135
- Perlak F.J., Deaton R.W., Armstrong T.A., Fuchs R.L., Sims S.R., Greenplate J.T. & Fiscoff D.A (1990)** - Insect resistant cotton plants - *Bio/Technology*, Vol. 8, ff. 939-943
- Perlak F.J., Fuchs R.L., Dean D.A., McPherson S.L. & Fiscoff D.A. (1991)** - Modifications of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 88, ff. 3324-3328
- Pigott C.R. & Ellar D.J. (2007)** - Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity - *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 71, Nr. 2, ff. 255-281
- Poerschmann J. & Kopinke F. (2001)** - Sorption of very hydrophobic organic compounds (VHOCs) on dissolved humic organic matter (DOM). 2. Measurement of sorption and application of a Flory-Huggins concept to interpret the data - *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 35, ff. 1142-1148
- Poerschmann J., Gathmann A., Augustin J., Langer U. & Górecki T. (2005)** - Molecular composition of leaves and stems of genetically modified *Bt* and near-isogenic non-*Bt* maize - Characterization of lignin patterns - *J. Environ. Qual.*, Vol. 34, ff. 1508-1518
- Poncet S., Delécluse A., Klier A. & Rapoport G. (1995)** - Evaluation of synergistic interactions between the CryIVA, CryIVB and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals - *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 66, ff. 131-135
- Pont B. & Nentwig W. (2005)** - Quantification of *Bt*-protein digestion and excretion by the primary decomposer *Porcellio scaber*, fed with two *Bt*-corn varieties - *Biocontrol Science and Technology*, Vol. 15, ff. 341-352
- Powers E.T. & Powers D.L. (2006)** - The kinetics of nucleated polymerizations at high concentrations: amyloid fibril formation near and above the “supercritical concentration” - *Biophysical Journal*, Vol. 91, ff. 122-132
- Prihoda K.R. & Coats J.R. (2008)** - Fate of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Cry3Bb1 protein in a soil microcosm - *Chemosphere*, Vol. 73, ff. 1102-1107
- Prischl M., Hackl E., Pastar M., Pfeiffer S. & Sessitsch A. (2012)** - Genetically modified *Bt* maize lines containing cry3Bb1, cry1A105 or cry1Ab2 do not affect the structure and functioning of root-associated endophyte communities - *Applied Soil Ecology*, Vol. 54, ff. 39-48
- Quiquampoix H. & Ratcliffe R.G (1992)** - A ³¹P NMR study of the adsorption of bovine serum albumin on montmorillonite using phosphate and the paramagnetic cation Mn²⁺: modification of conformation with pH - *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 148, Nr. 2, ff. 343-352
- Quiquampoix H., Staunton S., Baron M. H. & Ratcliffe R. G. (1993)** - Interpretation of the pH dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extracellular enzyme activity in soil - *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vol. 75, ff. 85-93

- Quiquampoix H. (2000)** - Mechanisms of protein adsorption on surfaces and consequences for extracellular enzyme activity in soil - *In: Soil Biochemistry, Bollag J.M., Stotzky G. (Eds.), Vol. 10, Marcel Dekker Inc., New York, ff. 171-206*
- Quiquampoix H., Servagent-Noinville S. & Baron M.-H. (2002)** - Enzyme adsorption on soil mineral surfaces and consequences for the catalytic activity - *In: Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications, Burns R.G., Dick R.P. (Eds.), Marcel Dekker, New York, ff. 285-306*
- Quiquampoix H. & Burns R.G. (2007)** - Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences - *Elements, Vol. 3, ff. 401-406*
- Quiquampoix H. (2008a)** - Enzymes and proteins, interactions with soil constituent surfaces - *In: Encyclopedia of Soil Science, Chesworth W. (Ed.), ff. 210-216*
- Quiquampoix H. (2008b)** - Interaction with soil constituents determines the environmental impact of proteins - *Keynote Paper, 5th International Symposium ISMOM 2008, Pucón, Chile*
- Raem A.M. & Rauch P. (2007)** - Immunoassays - *1. Auflage Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, München, S. 9f., 45, 52, 57f., 61*
- Ramessar K., Sabalza M., Capell T. & Christou P. (2008)** - Maize plants: an ideal production platform for effective and safe molecular pharming - *Plant Science, Vol. 174, ff. 409-419*
- Rasko D.A., Altherr M.R., Han C.S. & Ravel J. (2005)** - Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms - *FEMS Microbiology Reviews, Vol. 29, ff. 303-329*
- Ream J.E., Sims S.R. & Leach J.N. (1994)** - Aerobic soil degradation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73 protein bioactivity - *Monsanto Company Laboratory Project MSL 13267, Monsanto, St. Louis, MO*
- Rehm H. (2006)** - Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics - *Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, München, 5. Auflage, S. 10, 16, 17, 182, 187, 195, 197, 339*
- Rehm H. & Letzel T. (2010)** - Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics - *Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage*
- Reidell W.E. (1990)** - Rootworm and mechanical damage effects on root morphology and water relations in maize - *Crop. Sci., Vol. 30, ff. 628-631*
- Rennie J. (1992)** - Trends in parasitology. Living together - *Scientific American, Vol. 266, ff. 123-133*
- Rhodes G. (1993)** - Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models - *Academic Press, San Diego*
- Rigou P., Rezaei H., Grosclaude J., Staunton S. & Quiquampoix H. (2006)** - Fate of prions in soil: adsorption and extraction by electroelution of recombinant ovine prion protein from montmorillonite and natural soils - *Environ. Sci. Technol., Vol. 40, Nr. 5, ff. 1497-1503*
- Rinnofner T., Friedel J.K., Farthofer R., Pietsch G. & Freyer B. (2005)** - Effizienz verschiedener Zwischenfruchtvarianten unterschiedlich hohen Leguminosenanteils in der Reduktion der Mineralstickstoffgehalte im Boden unter pannonischen Standortbedingungen - *Mitt. Ges. Pflanzenbauwiss., Vol. 17, ff. 391-392*
- Romano C.P. (2012)** - Expression of Cry3B insecticidal protein in plants - *United States Patent, Patent Nr. US 8.101.826 B2, Patentdatum: 2012/01/24*
- Rovira A.D. (1969)** - Plant root exudates - *The Botanical Review, Vol. 35, Nr. 1, ff. 35-57*

- Rovira A.D. (1979)** - Biology of the soil-root interface - In: *The Soil-Root Interface*, Harley J.L., Russel R.S. (Eds.), Academic Press, London, ff. 145-160
- Rupar M.J., Donovan W.P., Groat R.G., Slaney A.C., Mattison J.W., Johnson T.B., Charles J.-F., Dumanoir V.C. & de Barjac H. (1991)** - Two novel strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopterans - *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 57, Nr. 11, ff. 3337-3344
- Sander M, Madliger M. & Schwarzenbach R.P. (2010)** - Adsorption of transgenic insecticidal Cry1Ab protein to SiO₂. 1. Forces driving adsorption - *Environmental Science & Technology*, Vol. 44, Nr. 23, ff. 8870-8876
- Sangadala S., Walters F.S., English L.H. & Adang M.J.A (1994)** - Mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1A(c) toxin binding and 86Rb(+)-K(+) efflux in vitro - *J. Biol. Chem.*, Vol. 269, ff. 10088-10092
- Sauerbeck G. (2004)** - Bodenkundliche Detailkartierung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft - *Erläuterungen zu geographischen Informationssystem zu Boden und Nutzung des Geländes (unveröffentlicht)*
- Saxena D., Flores S. & Stotzky G. (1999)** - Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn - *Nature*, Vol. 402, f. 480
- Saxena D. & Stotzky G. (2000)** - Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic *Bt* corn in vitro and in situ - *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 33, ff. 35-39
- Saxena D. & Stotzky G. (2001a)** - *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxin released from root exudates and biomass of *Bt* corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 33, ff.1225-1230
- Saxena D. & Stotzky G. (2001b)** - *Bt* corn has a higher lignin content than non-*Bt* corn - *American Journal of Botany*, Vol. 88, Nr. 9, ff. 1704-1706
- Saxena D., Flores S. & Stotzky G. (2002a)** - Vertical movement in soil of insecticidal Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 34, ff. 111-120
- Saxena D., Flores S. & Stotzky G. (2002b)** - *Bt* toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events - *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 34, ff. 133-137
- Saxena D., Stewart C.N., Altosaar I., Shu Q. & Stotzky G. (2004)** - Larvicidal Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* are released in root exudates of transgenic *B. thuringiensis* corn, potato, and rice but not of *B. thuringiensis* canola, cotton, and tobacco - *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 42, ff. 383-387
- Scheffer F. & Schachtschabel P. (2002)** - Lehrbuch der Bodenkunde - *Spektrum Akademischer Verlag*, 15. Aufl., S. 52, 62, 158
- Scheffer F. & Schachtschabel P. (2010)** - Lehrbuch der Bodenkunde - *Spektrum Akademischer Verlag*, 16. Aufl., S. 10, 15, 52, 55, 62, 111, 135 f., 138, 175 f., 151, 157, 159f., 282, 288, 309, 401 - 403, 408, 410
- Schlichting E., Blume H.-P. & Stahr K. (1995)** - Bodenkundliches Praktikum - *Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin Wien*, 2. Auflage, S. 132
- Schnepf E., Chrickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R. & Dean D.H. (1998)** - *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins - *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 62, Nr. 3, ff. 775-806

- Schroth M.N. & Hildebrand D.C. (1964)** - Influence of plant exudates on root-infecting fungi - *Annu. Rev. Phytopathol.*, Vol. 2, ff. 101-132
- Schultheis E. (2011)** - Faunistische Umweltrisikobewertung von *Bt*-Mais mit multiplen Resistenzgenen und Evaluierung von *Trigonotylus caelestialium* (Kirkaldy) und *Lumbricus terrestris* Linnaeus als Modellorganismen - *Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen*
- Schuppener M. (2011)** - Risikobewertung von gentechnisch verändertem Mais im Hinblick auf ausgewählte Schmetterlinge der Agrarlandschaft - *Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen*
- Schütt C. & Bröker B. (2011)** - Grundwissen Immunologie - *Spektrum Akademischer Verlag*, 3. Auflage, S. 9f, 127
- Schwartz J.L., Garneau L., Savaria D., Masson L., Brousseau R. & Rousseau E. (1993)** - Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers - *J. Membr. Biol.*, Vol 132, ff. 53-62
- Schwartz J.L., Lu Y.-J., Sohnlein P., Brousseau R., Laprade R., Masson L. & Adang M.J. (1997)** - Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors - *FEBS Lett.*, Vol. 412, Nr. 2, ff. 270-276
- Sell S. (2004)** - Molekulare Untersuchung anaerob induzierter Transkriptionsfaktoren aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*) - *Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig*
- Servagent-Noinville S., Revault M., Quiquampoix H. & Baron M.-H. (2000)** - Conformational changes of bovine serum albumin induced by adsorption on different clay surfaces: FTIR analysis - *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 221, ff. 273-283
- Shepherd P. & Dean C. (2000)** - Monoclonal antibodies - *Oxford University Press*
- Sims S.R. & Holden L.R. (1996)** - Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(b) protein in corn tissues - *Environ. Entomol.*, Vol. 25, ff. 659-664
- Slatin S.L., Abrams C.K. & English L. (1990)** - Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers - *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 169, Nr. 2, ff. 765-772
- Sloderbeck P.E., Whitworth R.J. & Higgins R.A. (2004)** - Corn insect management - *Kansas State University, Manhattan*
- Soares G.G. & Quick T.C. (1992)** - MVP, a novel bioinsecticide for the control of diamondback moth, ff. 129-137 - In: *Proceedings of the second international workshop on the management of diamondback moth and other crucifer pests*, Talekar N. S. (Ed.), Asian Vegetable Research and Development Center, Taipei
- Soco (Sustainable Agriculture and Soil Conservation) (2009)** - Soil degradation processes - Fact sheet no. 3 - Organic matter decline - eussoils.jrc.ec.europa.eu/projects/SOCO/FactSheets.html, 2012/05/05
- Spike B.P. & Tollefson J.J. (1991)** - Yield response of corn subjected to Western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) infestation and lodging - *J. Econ. Entomol.*, Vol. 84, ff. 1585-1590

- Staunton S. & Quiquampoix H. (1994)** - Adsorption and conformation of bovine serum albumin on montmorillonite: modification of the balance between hydrophobic and electrostatic interactions by protein methylation and pH variation - *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 166, f. 89
- Steffey K.L., Rice M.E., All J., Andow D.A., Gray M.E. & Van Duyn J.W. (1999)** - Handbook of corn insects - *Entomological Society of America, Lanham, Maryland*
- Stevenson F.J. (1982)** - Humus chemistry: genesis, composition, reactants - *Wiley, New York*
- Stotzky G. (1974)** - Activity, ecology, and population dynamics of microorganisms in soil - In: *Microbial Ecology, Laskin A.I. & Lechevalier H. (Eds.), ff. 57-135, Chemical Rubber Co., Cleveland*
- Stotzky G. (1980)** - Surface interactions between clay minerals and microbes, viruses, and soluble organics, and the probable importance of these interactions to the ecology of microbes in soil - In: *Microbial adhesion to surfaces, Berkeley R.C.W., Lynch J.M., Melling J., Rutter P.R. & Vincent B. (Eds.), ff. 231-249, Horwood, Chichester*
- Stotzky G. & Burns R.G. (1982)** - The soil environment: clay-humus-microbe interactions. - In: *Experimental microbial ecology, Burns R.G. & Slater J.H. (Eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, ff 105-133*
- Stotzky G. (1986)** - Influence of soil mineral colloids on metabolic processes, growth, adhesion, and ecology of microbes and viruses - In: *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes, Huang P.M. & Schnitzer M. (Eds.), Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, ff. 305-428*
- Stotzky G. (2000)** - Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids - *J. Environ. Qual.*, Vol. 29, ff. 691-705
- Stotzky G. (2002)** - Clays and humic acids affect the persistence and biological activity of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* in soil - *Developments in Soil Sciences*, Vol. 28, Nr. 2, ff. 1-16
- Stotzky G. (2004)** - Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants - *Plant and Soil*, Vol. 266, ff. 77-89
- Stradner A., Sedgwick H., Cardinaux F., Poon W.C.K., Egelhaaf S.U. & Schurtenberger P. (2004)** - Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids - *Nature*, Vol. 432, ff. 492-495
- Strasburger E., Noll F., Schenk H. & Schimper A.F.W. (1998)** - Lehrbuch der Botanik für Hochschulen- 34. Auflage, *Gustav Fischer Verlag, neubearbeitet von Sitte P., Ziegler H., Ehrendorfer F. & Bresinsky A.*
- Sundaram K. (1996)** - Sorptive interactions and binding of "delta" endotoxin protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in forest soils - *Journal of Environmental Science and Health, Part B, Pesticides, Food Contaminants and Agricultural wastes*, Vol. 31, ff. 1321-1340
- Sympatec (2009)** - Laserbeugung - Partikelgrößenanalyse von 0,1 µm bis 8,75 mm - sympatec.com/DE/LaserDiffraction/LaserDiffraction.html, 2012/05/05
- Tabashnik B.E. (1994)** - Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis* - *Annu. Rev. Entomol.*, Vol. 39, ff. 47-79
- Tan W.F., Koopal L.K., Weng L.P., van Riemsdijk W.H. & Norde W. (2008)** - Humic acid protein complexation - *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 72, ff. 2090-2099

- Tank J.L., Rosi-Marshall E.J., Royer T.V., Whiles M.R., Griffiths N.A., Frauendorf T.C. & Treering D.J. (2010)** - Occurrence of maize detritus and a transgenic insecticidal protein (Cry1Ab) within the stream network of an agricultural landscape - *PNAS*, Vol. 107, Nr. 41, ff. 17645-17650
- Tapp H., Calamai L. & Stotzky G. (1994)** - Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals - *Soil Biol. Biochem.*, Vol. 26, Nr. 6, ff. 663-679
- Tapp H. & Stotzky G. (1995a)** - Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays - *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, Nr. 5, ff. 1786-1790
- Tapp H. & Stotzky G. (1995b)** - Dot blot enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring the fate of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in soil - *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, Nr. 2, ff. 602-609
- Tapp H. & Stotzky G. (1998)** - Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil - *Soil Biol. Biochem.*, Vol. 30, Nr. 4, ff. 471-476
- Theng B.K.G. (1979)** - In: *Formation and properties of clay-polymer complexes*, Theng B.K.G. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, ff. 157
- Thiemann W.J. & Palladino M.A. (2007)** - *Biotechnologie* - Pearson Education Deutschland GmbH, S. 142
- Tisdall J.M. & Oades J.M. (1982)** - Organic matter and water stable aggregates in soils - *Journal of Soil Science*, Vol. 33, ff. 141-163
- Tributh H. & Lagaly G. (1986)** - Aufbereitung und Identifizierung von Boden- und Lagerstättenton. II. Korngrößenanalyse und Gewinnung von Tonsubfraktionen - *GIT-Fachzeitschrift für das Laboratorium*, Vol. 30, ff. 771-776
- Vaeck M., Rexnaerts A., Höfte H., Jansens S., De Beuckeleer M., Dean C., Zabeau M., Van Montague M. & Leemans J. (1987)** - Transgenic plants protected from insect attack - *Nature*, Vol. 328, ff. 33-37
- Van Rie J., Jansens S., Höfte H., Degheele D. & van Mellaert H. (1990)** - Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins - *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, Nr. 5, ff. 1378-1385
- Vaughn T., Cavato T., Brar G., Coombe T., DeGooyer T., Ford S., Groth M., Howe A., Johnson S., Kolacz K., Pilcher C., Purcell J., Romano C., English L. & Pershing J. (2005)** - A method of controlling corn rootworm feeding using a *Bacillus thuringiensis* protein expressed in transgenic maize - *Crop Sci.*, Vol. 45, ff. 931-938
- Venkateswerlu G. & Stotzky G. (1992)** - Binding of the protoxin and toxin proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay minerals - *Current Microbiology*, Vol. 25, ff. 225-233
- Vettori C., Paffetti D., Pietramellara G., Stotzky G. & Gallori E. (1996)** - Amplification of bacterial DNA bound on clay minerals by the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique - *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 20, ff. 251-260
- Vettori C., Calamai L., Yoder M., Stotzky G., & Gallori E. (1999)** - Adsorption and binding of AmpliTaq1 DNA polymerase on the clay minerals, montmorillonite and kaolinite - *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 31, ff. 587-593

- Vicré M., Santaella C., Blanchet S., Gateau A. & Driouich A. (2005)** - Root border-like cells of *Arabidopsis*. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. - *Plant Physiol.*, Vol. 138, ff. 998-1008
- von Tersch M.A., Slatin S.L., Kulesza C.A. & English L.H. (1994)** - Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIb2 and CryIIIb2 domain I peptide - *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, Nr. 10, ff. 3711-3717
- Walker T.S., Bais H.P., Grotewold E. & Vivanco J.M. (2003)** - Root exudation and rhizosphere biology - *Plant Physiol.*, Vol. 132, ff. 44-51
- Wen F., Vanetten H.D., Tsapralis G. & Hawes M.C. (2007)** - Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates - *Plant Physiology*, Vol. 143, Nr. 2, ff. 773-783
- Whitworth R.J., Wilde G.E., Shufran R.A. & Milliken G.A. (2002)** - Comparison of adult corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) sampling methods - *J. Econ. Entomol.*, Vol. 95, ff. 96-105
- Wisniewski J.-P., Frangne N., Massonneau A. & Dumas C. (2002)** - Between myth and reality: genetically modified maize, an example of a sizeable scientific controversy - *Biochimie* Vol. 84, ff. 1095-1103
- Williams D.D. & Feltmate B.W. (1994)** - Aquatic insects - *CAB International, Oxford*, ff. 358
- Wolfersberger M.G. (1990)** - The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins - *Experientia*, Vol. 46, ff. 475-477
- Wu D., Johnson J.J. & Federici B.A. (1994)** - Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis* - *Mol. Microbiol.*, Vol. 13, ff. 965-972
- Wutke A., Hummel H.E. & Ulrichs C. (2005)** - Der Westliche Maiswurzelbohrer *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Col.: Chrysomelidae) auf dem Weg nach Deutschland - *Gesunde Pflanzen*, Vol. 57, ff. 73-80
- Xie R., Zhuang M., Ross L.S., Gomez I., Oltean D.I., Bravo A., Soberon, M., Gill S.S. (2005)** - Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins - *J. Biol. Chem.*, Vol. 280, Nr. 9, ff. 8416-8425
- Yu Z., Liu Z. & Sun M. (2000)** - Application and polices of microbe pesticides in standing control of plant diseases and insect pests - In: *Micropesticides and its industrialization*, Yu Z. (Ed.), Science Press, ff. 1-11
- Zang X., van Heemst J.D.H., Dria K.J. & Hatcher P.G. (2000)** - Encapsulation of protein in humic acid from a histosol as an explanation for the occurrence of organic nitrogen in soil and sediment - *Organic Geochemistry*, Vol. 31, ff. 679-695
- Zhang X., Candas M., Griko N.B., Rose-Young L. & Bulla L.A. Jr. (2005)** - Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R 1 expressed in insect cells - *Cell Death and Differentiation*, Vol. 12, ff. 1407-1416
- Zhang X., Candas M., Griko N.B., Taussig R. & Bulla L.A. Jr. (2006)** - A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclasePKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* - *PNAS*, Vol. 103, Nr. 26, ff. 9897-9902
- Zhao Z. (2001)** - Adsorption of amino acids at solid/liquid interfaces - *Chemical Research and Application*, Vol. 13, ff. 599-610

- Zhou X., Huang Q., Chen S. & Yu Z. (2005)** - Adsorption of the insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* on montmorillonite, kaolinite, silica, goethite and red soil - *Applied Clay Science*, Vol. 30, ff. 87-93
- Zogg G.P., Zak D.R., Ringelberg D.B., MacDonald N.W., Pregitzer K.S. & White D.C. (1997)** - Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming - *Soil Science Society of America Journal*, Vol. 61, Nr. 2, ff. 475-481
- Zurbrügg C., Hönemann L., Meissle M., Romeis J. & Nentwig W. (2010)** - Decomposition dynamics and structural plant components of genetically modified *Bt* maize leaves do not differ from leaves of conventional hybrids - *Transgenic Res.*, Vol. 19, ff. 257-267
- Zwahlen C., Hilbeck A., Gugerli P. & Nentwig W. (2003)** - Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field - *Molecular Ecology*, Vol. 12, ff. 765-775

ANHANG

A1 PROTOKOLL: ELISA ZUM NACHWEIS VON CRY1A.105-PROTEINEN1 Plattenbelegung

- Module in Rahmen stecken (*Nunc Maxisorb Kat. Nr. 469914*)
- Module gemäß gewünschter Plattenbelegung beschriften
- Verdünnen des Fangantikörpers (*Goat anti-Cry1A.105 antibody, #7509175*):

Stammkonzentration	Zielkonzentration	Verdünnung	Zu verwendender Puffer	Pro Modul benötigtes Volumen
0,93 mg mL ⁻¹	1 µg mL ⁻¹	1:930	Beschichtungspuffer	1,6 mL

- 100 µL verdünnter anti-Cry1A.105 Antikörper Well⁻¹ pipettieren
- Platte abkleben
- Inkubation bei 4 °C über Nacht Start: _____ Ende: _____

2 Blockierung

- Module mit dem Plattenwascher waschen
 - Waschpuffer: PBST
- 200 µL miproBLOCK C-Puffer Well⁻¹ pipettieren
- Inkubation (37 °C, 2 h) Start: _____ Ende: _____

➤ *Vor Ablauf der Inkubationszeit: Verdünnung der zu testenden Proben (siehe 3)*

3 Verdünnung der zu testenden Proben

- Minimale Nachweisgrenze: etwa 0,05 ng mL⁻¹
- Zu verwendender Puffer: miproBLOCK C
- Verdünnte Proben werden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert

4 Plattenbeladung*4.1 Proben*

- Module mit Plattenwascher waschen
- 100 µL Probe Well⁻¹ pipettieren
- Inkubation (37 °C, 1 h) Start: _____ Ende: _____

➤ *Vor Ablauf der Inkubationszeit: biotinylierten Antikörper verdünnen (siehe 4.2)*

4.2 biotinylierter Antikörper

- Module mit Plattenwascher waschen
- Verdünnen des biotinylierten Antikörpers (*Anti-Cry1A.105-biotin antibody, # G-839022-B*):

Stammkonzentration	Zielkonzentration	Verdünnung	Zu verwendender Puffer	Pro Modul benötigtes Volumen
6,0 mg mL ⁻¹	1 µg mL ⁻¹	1:6000	miproBLOCK C	1,6 mL

- 100 μL biotinylierten Antikörper Well^{-1} pipettieren
 - Inkubation (37 °C, 1 h) Start: _____ Ende: _____
- Vor Ablauf der Inkubationszeit: Konjugat verdünnen (siehe 4.3)

4.3 Konjugat

- Module mit Plattenwascher waschen
- Verdünnen des Konjugats (*Streptavidin HRP 80*):

Verdünnung	Zu verwendender Puffer	Pro Modul benötigtes Volumen
1:5000	miproBLOCK C	1,6 mL

- 100 μL Konjugat Well^{-1} pipettieren
 - Inkubation bei 37 °C für 1 h Start: _____ Ende: _____
- Vor Ablauf der Inkubationszeit: Substrat ansetzen (zunächst ohne H_2O_2) (siehe 5)

5 Plattenauswertung

- Module mit Plattenwascher waschen
- Substrat ansetzen (Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid (TMB) Tabletten (Sigma-Aldrich, Best.-Nr. T3405) (permanent vor Licht schützen!):
 - 1 Tablette in 10 mL Substratpuffer (Phosphat-Citrat-Puffer) auflösen lassen, unmittelbar vor Benutzung (!) pro Tablette 2 μL 30 % H_2O_2 hinzugeben
- 100 μL Substrat Well^{-1} pipettieren
- sofort Aludeckel auflegen
- Inkubation bei RT für 10 Minuten auf Plattenschüttler bei 120 rpm
- Platte bei $\lambda = 650 \text{ nm}$ auswerten
- Färbung mit 50 μL 25%iger H_2SO_4 Well^{-1} stoppen
- Platte bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ auswerten

A2 PROTOKOLL: ELISA ZUM NACHWEIS VON CRY2AB2-PROTEINEN

1 Plattenbelegung

- Module in Rahmen stecken (*Nunc Maxisorb Cat. No. 469914*)
- Module gemäß gewünschter Plattenbelegung beschriften
- Verdünnen des Fangantikörpers (*Protein G gereinigter monoklonaler Antikörper 102-3* ($0,27 \text{ mg mL}^{-1}$):

Zielkonzentration	Verdünnung	Zu verwendender Puffer	Pro Modul benötigtes Volumen
$5 \mu\text{g mL}^{-1}$	1:54	PBS	0,8 mL

- 50 μL verdünnter anti-Cry2Ab2-Antikörper Well^{-1} pipettieren
- Platte abkleben
- Inkubation bei 4 °C über Nacht Start: _____ Ende: _____

2 Blockierung

- Module mit Plattenwascher waschen
 - Waschpuffer: PBST
- 200 μL miproBLOCK C-Puffer Well^{-1} pipettieren
- Inkubation (37 °C, 2 h) Start: _____ Ende: _____

➤ *Vor Ablauf der Inkubationszeit: Verdünnung der zu testenden Proben (siehe 3)*

3 Verdünnung der zu testenden Proben

- Minimale Nachweisgrenze: etwa 0,024 ng mL^{-1}
- Zu verwendender Puffer: miproBLOCK C
- Verdünnte Proben werden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert

4 Plattenbeladung

4.1 Proben

- Module mit Plattenwascher waschen
- 50 μL Probe Well^{-1} pipettieren
- Inkubation (37 °C, 1 h) Start: _____ Ende: _____

➤ *Vor Ablauf der Inkubationszeit: biotinylierten Antikörper verdünnen (siehe 4.2)*

4.2 biotinylierter Antikörper

- Module mit Plattenwascher waschen
- Verdünnen des biotinylierten Antikörpers (*Polyklonaler Antikörper 6314 aus Ziege biotinyliert, PD10 Pufferaustausch und Vivaspin 300.000, 0,671 mg mL^{-1}*):

Ziel-konzentration	Zu verwendender Puffer	Pro Modul benötigtes Volumen
5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	miproBLOCK C	0,8 mL

- 50 μL biotinylierten Antikörper Well^{-1} pipettieren
- Inkubation (37 °C, 1 h) Start: _____ Ende: _____

➤ *Vor Ablauf der Inkubationszeit: Konjugat verdünnen (siehe 4.3)*

4.3 Konjugat

- Module mit Plattenwascher waschen
- Verdünnen des Konjugats (*Streptavidin HRP 80*):

Verdünnung	Zu verwendender Puffer	Pro Modul benötigtes Volumen
1:5000	miproBLOCK C	0,8 mL

- 50 μL Konjugat Well^{-1} pipettieren
- Inkubation bei 37 °C für 1 h Start: _____ Ende: _____

- Vor Ablauf der Inkubationszeit: Substrat ansetzen (zunächst ohne H_2O_2) (siehe 5)

5 Plattenauswertung

- Module mit Plattenwascher waschen
- Substrat ansetzen (Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid (TMB) Tabletten (Sigma-Aldrich, Best.-Nr. T3405) (permanent vor Licht schützen!):
 - 1 Tablette in 10 mL Substratpuffer (Phosphat-Citrat-Puffer) auflösen lassen, unmittelbar vor Benutzung (!) pro Tablette 2 μ L 30 % H_2O_2 hinzugeben
- 100 μ L Substrat $Well^{-1}$ pipettieren
- sofort Aludeckel auflegen
- Inkubation bei RT für 10 Minuten auf Plattenschüttler bei 120 rpm
- Platte bei $\lambda = 650$ nm auswerten
- Färbung mit 50 μ L 25%iger H_2SO_4 $Well^{-1}$ stoppen
- Platte bei $\lambda = 450$ nm auswerten

Pufferrezepte

→ Lagerung der Puffer bei 4 °C (Ausnahme: 10x PBS bei RT)

Beschichtungspuffer

(50 mM Natriumcarbonat/-bicarbonat mit 150 mM NaCl, pH 9,6) - für 100 mL

- 0,159 g Na_2CO_3
- 0,293 g $NaHCO_3$
- 0,877 g NaCl
- ad 100 mL H_2O_{dest}
- pH 9,6 einstellen

miproBLOCK C-Puffer (steril!)

Rezeptur firmenintern

10x PBS - für 1 L

(phosphate buffered saline)

- 85,0 g NaCl
- 16,7 g $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$
- 5,7 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
- ad 1 L H_2O_{dest}
- pH nicht einstellen, erst beim Verdünnen auf 1x

Waschpuffer für Plattenwascher

(PBST: PBS mit 0,05% Tween20, pH 7,2) - für 2 L

- 200 mL 10x PBS
- ad 1800 mL H_2O_{dest}
- pH 7,2 einstellen
- 1 mL Tween20

Substratpuffer

(0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5,0) - für 300 mL

- 0,2 M Na_2HPO_4 -Stammlösung ansetzen:
2,839 g Na_2HPO_4 in 100 mL H_2O_{dest}
lösen
- 0,1 M Zitronensäure-Stammlösung ansetzen:
1,921 g Zitronensäure in 100 mL H_2O_{dest}
lösen
- 77,1 mL 0,2 M Na_2HPO_4 -Lösung
- 72,9 mL 0,1 M Zitronensäure-Lösung
- ad 150 mL H_2O_{dest}
- pH 5,0 einstellen

A3 VORGESCHLAGENE PROTEINADSORPTIONSMECHANISMEN

Tab. A3: Tabellarische Übersicht über vorgeschlagene Proteinadsorptionsmechanismen.

Sorptionmechanismus	Van-der-Waals-Kräfte	Wasserstoffbrückenbindungen	Hydrophobe Wechselwirkungen	Kationenaustauschreaktion	Ionenverbindungen	Elektrostatische Wechselwirkungen	Ligandenaustausch	Physi-sorption	Bemerkung
		x							Zw. den α -C-Atomen und den Mineraloberflächen-O-Atomen
	x								Neutrale Moleküle
	x*	x**							*Bei allen pH-Werten, ** oberhalb des IEP
					x				IEP = pH, Bindung auch an netto negativen Oberflächen
			x						An künstlichen org. Oberflächen
		x							Kontinuierliche Proteinsegmentablösung u. -wiederbindung
				x					IEP > pH
					x				IEP = pH, Bindung auch an netto negativ geladener Oberfläche
	x					x			Hydrophober Einfluss weniger bedeutend
	x	x	x			x	x		Bei Tonmineralien übertrumpfen die elektrostatischen für gewöhnlich die hydrophoben Wechselwirkungen

Sorptionen- mechanismus	Van-der- Waals- Kräfte	Wasserstoff- brücken- bindungen	Hydrophobe Wechsel- wirkungen	Kationen- austausch- reaktion	Ionen- verbin- dungen	Elektro- statische Wechsel- wirkungen	Ligan- denaus- tausch	Physi- sor- ption	Bemerkung
2001, Zhao	x	x	x			x			
2001, Crecchio & Stotzky		x							Vgl. Protein- u. Polymerbindung
2003, Chevallier <i>et al.</i>									Proteinadsorption ist pH- abhängig
2004, Pagel- Wieder <i>et al.</i>	x	x							Ausschluss der kovalenten Bindung zw. Protein u. Bodenpartikeloberfläche
2006, Muchaonyerwa <i>et al.</i>				Kationen- brücken					z. B. über Ca^+ , Mg^{2+} und Fe^{2+}
2006, Rigou <i>et al.</i>			x						Aufgrund der Siloxanoberfläche
2009, Fu <i>et al.</i>								x	B.t. sp. kurstaki an Mont- morillonit, Kaolinit u. SiO_2
2011, Helassa <i>et al.</i>			x						

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Mariana-Christin Albers	Name
06. Juli 1983	Geburtsdatum
Lübeck	Geburtsort

SCHULISCHE UND BERUFLICHE AUSBILDUNG

Promotionsstudent	Seit 10/2010
miprolab GmbH Institut für angewandte Biotechnologie der Tropen e.V. Wissenschaftlicher Mitarbeiter Doktorand der Naturwissenschaften	Promotion 11/2011 - 12/2011 11/2008 - 09/2011
Leibniz Universität Hannover M. Sc. Pflanzenbiotechnologie	Studium 10/2006 - 03/2009
Leibniz Universität Hannover B. Sc. Pflanzenbiotechnologie	Studium 10/2003 - 09/2006
Lauenburgische Gelehrtenschule in Ratzeburg Grundschule in Berkenthin	Schulbildung 08/1994 - 06/2003 08/1990 - 06/1994

VERÖFFENTLICHUNGEN

DPST 2010 (Deutsche Pflanzenschutztagung), Berlin
 “Sorptionsmultipler Cry-Proteine (*Bt*-Mais)
 in Böden einer Freisetzungsfäche”

Vorträge

BMBF-Statusseminar 2011, Berlin
 “Quantifizierung der Retardation sowie des Konkurrenz-
 und Mobilitätsverhaltens multipler Cry-Proteine in den
 Böden der Freisetzungsfäche unter Berücksichtigung
 der Standorteigenschaften”

DBG 2009 (Deutsche Bodenkundliche Gesellschaft),
 Bonn

Poster

„Böden und gentechnisch veränderter Mais (*Bt*-Mais)
 - Teil II - Effekt der physico-chemischen Parameter der
 Böden auf die Retardation von Cry3Bb1“
 „Böden und gentechnisch veränderter Mais (*Bt*-Mais)
 - Teil III - Aggregationsreaktionen von Cry3Bb1-Protein
 in der Bodenlösung“

DBG 2011 (Deutsche Bodenkundliche Gesellschaft),
 Berlin

“Organische Bodensubstanz beeinflusst die Ad-
 und die Desorption von Cry-Proteinen”

"Molekulare Analyse des Hitzeeinflusses auf die
 Resistenz von Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) gegen
Ralstonia solanacearum“

M. Sc. Arbeit

„Der Einfluss von Silizium auf die Arsenaufnahme
 von Reis (*Oryza sativa*)“

B. Sc. Arbeit

DANKSAGUNG

Ich danke Prof. Dr. Jürgen Böttcher, der mir ein guter Ansprechpartner war und mein Projekt durch seine Ideen, seine Anregungen und seine konstruktive Kritik bereicherte.

Bedanken möchte mich bei PD. Dr. Jürgen Niemeyer, der nicht nur in fachspezifischen, sondern auch in privaten Gesprächen immer dafür gesorgt hat, dass ich meinen Geist anstrenge.

Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen gilt mein besonderer Dank für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes

„Sapere aude“

(Horaz, Epist. I,2,40)

Ich bedanke mich bei meinen ehemaligen Chefs Prof. Dr. Helge Böhnel, PD. Dr. Frank Gessler, Dr. Sibylle Pagel-Wieder und den Mitarbeitern der Firma miprolab GmbH für die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit, die guten Ratschläge und Hinweise und die Geduld für meine Fragen.

An der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität standen mir viele Personen aus den Instituten für Bodenkunde und Biostatistik unterstützend und beratend zur Seite.

An der Georg-August-Universität Göttingen gilt mein Dank vielen Unterstützern aus den Abteilungen Agrarpedologie, Pflanzenzüchtung, Pflanzenernährung und Ertragsphysiologie, dem Department für Nutzpflanzenwissenschaften, der Abteilung Qualität pflanzlicher Erzeugnisse und dem Institut für physikalische Chemie.

Bei der Realisierbarkeit und Durchführung der Feldversuche geht mein Dank an das Friedrich-Löffler-Institut in Braunschweig, das Institut für Biologie III an der RWTH Aachen und an die Monsanto Agrar Deutschland GmbH.

Nicht außer Acht gelassen werden darf das psychologische Mitwirken meiner Mitdoktoranden Dr. Stefanie Engels, Dr. Heinz Hunfeld und Sibylle Reinmuth.

Weiterhin danke ich Dr. Thorsten Bornwaßer, Dr. Alexandra Ritsert und Annika Venzke, die meine Doktorarbeit gegengelesen haben, sich nicht gescheut haben, Kritik zu üben und Verbesserungsvorschläge vorzubringen und mir auch moralisch immer zu Seite standen.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht den Grundstein für meinen Weg gelegt haben.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und dem Projektträger Jülich gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung des Projekt (FKZ: 0315215D).

ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Eintrag und Reaktivität von Proteinen in Böden am Beispiel der Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und Cry3Bb1 aus der transgenen Maishybride MON89034 x MON88017 (*Zea mays* L.)“

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den