

**Horizontaler Gentransfer
von transgenen Pflanzen zu Mikroorganismen
(Bakterien und Pilzen)
und seine ökologische Relevanz**

Kirsten Schlüter und Ingo Potrykus

Institut für Pflanzenwissenschaften, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH),
Universitätsstrasse 2, CH-8092 Zürich

August 1995

Inhaltsverzeichnis

- 1 Einleitung**

- 2 Detektion von mutmaßlichen Horizontalen Gentransfer Ereignissen**
 - 2.1 Hinweise durch Sequenzvergleiche
 - 2.2 Experimenteller Beweis
 - 2.2.1 Horizontaler Gentransfer zu Bakterien
 - 2.2.1.1 Natürliche Kompetenz
 - 2.2.1.2 Zugänglichkeit von pflanzlicher DNA und die Transformation von Bakterien
 - 2.2.1.2.1 Transformation im Boden
 - 2.2.1.2.2 Transformation in marinen Ökosystemen
 - 2.2.1.2.3 Transformation von bakteriellen Pflanzenpathogenen
 - 2.2.1.2.4 Transformation in Magen- und Darmflüssigkeiten
 - 2.2.2 Horizontaler Gentransfer zu Pilzen
 - 2.2.2.1 Natürliche Kompetenz
 - 2.2.2.2 Transformation von Pilzen

- 3 Zusammenfassung**

- 4 Methoden zur Reduktion von Horizontalem Gentransfer**

- 5 Riskobewertung eines Horizontalen Gentransfers von Transgenen, die in der Schweiz für die Transformation von Pflanzen eingesetzt werden sollen**
 - 5.1 Riskobewertung für Resistenzgene gegen Pilz-, Virus- und Insektenbefall
 - 5.2 Riskobewertung für Markergene

- 6 Schlußfolgerungen**

- 7 Referenzen**

1 Einleitung

Eines der größten Sicherheitsbedenken bei der Freisetzung transgener Pflanzen ist die mögliche Ausbreitung vom Transgen über die Artgrenzen hinweg. Horizontaler Gentransfer (HGT) ist eine spezielle Art der Genweitergabe, die zwischen verschiedenen Arten auf ungeschlechtliche Weise erfolgt. Das am besten bekannte Beispiel ist die bakterielle Konjugation. Man vermutet, daß HGT nicht nur zwischen verschiedenen Arten, sondern auch zwischen den verschiedenen Reichen (Kingdoms) stattfindet. In diesem Fall spricht man vom Transkingdom Gentransfer. Für Pflanzen würde diese Art von Gentransfer wohl hauptsächlich in Richtung Bakterien und Pilze ablaufen.

2 Detektion von mutmaßlichen Horizontalen Gentransfer Ereignissen

Die Annahme, daß es HGT gibt, wurde ursprünglich aus Sequenzvergleichen abgeleitet. Daneben versucht man seit kurzem, diesen Gentransfer auch in experimentellen Systemen nachzuweisen.

2.1 Hinweise durch Sequenzvergleiche

Sequenzvergleiche und die darauf beruhende Konstruktion von Stammbäumen liefern einen indirekten Hinweis auf HGT. Normalerweise verändern sich alle Gene eines Organismus im Laufe der Evolution gleich schnell und führen insofern zu identischen Stammbäumen, in denen eine Art immer die gleiche Position einnimmt, gleich welches Gen der jeweilige Stammbaum zur Basis hat. Arten, die ein Gen durch HGT erworben haben, würden in dem diesem Gen entsprechenden Stammbaum an einer unerwarteten Position stehen. Solche Veränderungen im Stammbaumaufbau werden als ein Hinweis auf einen möglichen Gentransfer angesehen. Dieser Eindruck verstärkt sich, wenn die beiden an diesem Gentransfer beteiligten Arten zeitweilig während der Evolution in engem Kontakt miteinander gelebt haben.

Beispiele des HGTs von Eukaryoten zu Bakterien, die allgemein akzeptiert sind, beziehen sich auf die Gene für die Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Glucose-6-phosphat Isomerase (GPI).

Für die GPI wurde gezeigt, daß die Gene von *E. coli* und der Pflanze *Clarkia unguolata* zu 88% identisch sind (Froman et al. 1989, Smith und Doolittle 1992). Das ist bis jetzt die größte Übereinstimmung, die zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Sequenzen gefunden wurde (Smith et al. 1992). Aus diesem Grunde erscheint ein HGT wahrscheinlich. Es wird vermutet, daß das Darmbakterium *E. coli* die Pflanzen-DNA in dem Darm seines Wirts aufgenommen hat.

Das zweite Beispiel eines HGTs zwischen einem Eukaryoten und einem Bakterium bezieht sich auf die **GAPDH**. Von diesem Enzym existieren zwei verschiedene Formen. Die GAPDH A kommt allgemein bei Eukaryoten vor, während die GAPDH B typisch für Bakterien ist. *E. coli* und andere Darmbakterien besitzen sowohl die GAPDH B wie die eukaryotische A Form. Stammbäume lassen auf einen Transfer des GAPDH A Gens schließen, der vor der

Entstehung von Tieren und Pflanzen stattfand (Smith *et al.* 1992). Jedoch ist die Richtung, in der dieser Transfer erfolgte, unklar (Syvanen 1994): entweder von einem Eukaryoten zu einem Bakterium, welches das Gen unter den anderen Darmbakterien mittels Konjugation verbreitet hat, oder von einem Vorfahren der heute existierenden Bakterien zu einem unbekanntem Eukaryoten, welcher gelebt hat, bevor die verschiedenen Reiche entstanden sind. Im zweiten Fall muß das Gen für die GAPDH A bei den meisten Bakterienarten während ihrer weiteren Evolution verlorengegangen sein. Dieses Beispiel zeigt, wie schwierig es ist, die Richtung eines HGT Ereignisses nur von Sequenzhomologieanalysen her abzuleiten.

Doolittle *et al.* (1990) betrachten des **Hämoglobingen** als einen weiteren Kandidaten für den Gentransfer von Pflanzen zu Bakterien. Dieses Gen ist bekannt in Eukaryoten und für das Bakterium *Vitreoscilla*, wurde aber bis jetzt nicht in anderen Bakterienarten gefunden. *Vitreoscilla* zeigt eine maximale Homologie in seiner Aminosäuresequenz mit dem Leghämoglobin der Lupine (Wakabayashi *et al.* 1986) und eine 45 %ige Homologie in seiner Nukleotidsequenz des nicht translatierten 3' Endes mit dem Leghämoglobin Gen A der Sojabohne (Khosla und Baily 1988). Weil *Vitreoscilla* in sauerstoffarmer Umgebung lebt wie z.B. in verwesendem pflanzlichem Abfall, könnte es das Hämoglobingen von dem verrottenden Pflanzenmaterial aufgenommen haben.

Andere Beispiele für einen HGT von Pflanzen zu Mikroorganismen werden kontrovers diskutiert: das **Glutaminsynthetase II (GSII)** Gen und die **T-DNA** Sequenz von *Agrobacterium rhizogenes*.

Zwei Glutaminsynthetasen sind bekannt. GS I ist charakteristisch für Prokaryoten, während **GSII** in Eukaryoten vorkommt. Die Entdeckung des GSII Gens in Bakterien der *Rhizobiaceae*, die in Symbiose mit bestimmten Pflanzen leben, wurde ursprünglich als ein Beispiel für HGT interpretiert (Carlson und Chelm 1986). Die Detektion des GSII Gens in nicht symbiontischen Bakterien der *Streptomytaceae* und die Konstruktion eines neuen Stammbaumes für die GS Gene (Smith *et al.* 1992) ließ auf einen Transfer von Eu- zu Prokaryoten schließen, der vor der Aufspaltung der Eukaryoten in Pflanzen, Tiere und Pilze stattfand. Kürzlich jedoch wurden beide GS Gene in Tandemposition in dem pflanzensymbiontischen Bakterium *Frankia* gefunden (Kumada *et al.* 1993). Dieses könnte bedeuten, daß GS I und II aus einem einzigen Gen hervorgegangen sind, und zwar durch Genduplikation in einem gemeinsamen Vorfahren von Pro- und Eukaryoten.

Sequenzhomologien wurden zwischen der T(Transfer)-DNA des Ri(die Wurzelbildung induzierenden) Plasmids von *Agrobacterium rhizogenes* und dem Genom von *Nicotiana glauca* gefunden. White *et al.* (1983) schlugen zwei Hypothesen vor, um diese Homologie zu erklären:

(1) Ein *Agrobacterium* hat ein pflanzliches Gen aufgenommen, welches in die bakterielle Erbsubstanz inserierte und jetzt bei Agrobakterieninfektionen als Teil der T-DNA zurück in das Pflanzengenom gebracht wird.

(2) Die Pflanze erhielt bakterielle Gene während vergangener Agrobakterieninfektionen und behielt diese Gene in ihrem Genom.

Sequenzanalysen von anderen Arten der Gattung *Nicotiana* und der Familie der *Solanaceae* unterstützen die zweite Hypothese. Da zur T-DNA homologe Sequenzabschnitte nur in den Subgattungen *N. rustica* und *N. tabaccum* vorkommen, wird die Infektion eines gemeinsamen Vorfahren beider Subgenera oder die Infektion einer der Subgattungen gefolgt von zwischenartlicher Auskreuzung angenommen (Furner *et al.* 1986).

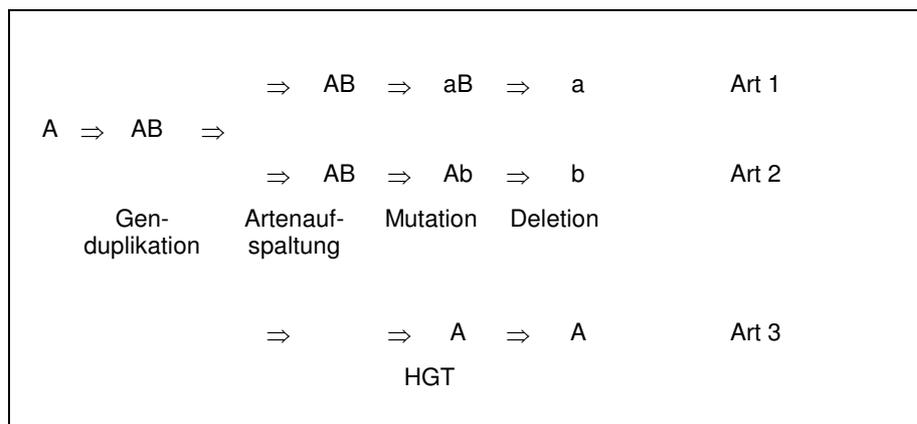
Die erwähnten Beispiele zeigen, daß möglicher HGT nur schwerlich durch Sequenzhomologieanalysen zu ermitteln ist. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, schlägt Syvanen (1994) einen stammesgeschichtlichen Kongruenztest vor. Ein HGT wird durch

diesen Test bestätigt, wenn er die folgenden Kriterien erfüllt: (1) Das transferierte Gen enthält phylogenetische Information, d.h. es bedingt einen Selektionsvorteil für den Rezipienten, da es ansonsten während der weiteren Evolution wieder verloren geht. (2) Die homologen Gene in dem potentiellen Gendonor und Genakzeptor sind ortholog, und nicht paralog. Orthologe Gene sind Nachkommen eines einzelnen Gens, während paraloge Gene durch Genduplikation in einem gemeinsamen Vorfahren beider Arten entstanden sind. Abb. 1 zeigt, daß paraloge Gene leicht als orthologe Sequenzen interpretiert werden können, wenn jeweils nur eines der duplizierten Gene in den untersuchten Arten vorhanden ist und wenn jene Ahnen beider Arten, die beiden Gene enthalten, nicht analysiert werden. Ein Beispiel für eine solche Fehlinterpretation könnten die Glutaminsynthetasen I und II sein (s.o.), da beide Gene in Tandemposition in dem Bakterium *Frankia* existieren. (3) Die Anzahl der Substitutionen ist zwischen orthologen Gene ähnlich, da sich ansonsten nicht zutreffende Abweichungen im Stammbaum ergeben würden. Kleine Datenmengen sind problematisch, weil dann ungleiche Mutationsraten nicht auffallen.

Ein weiteres Problem kann die Unterscheidung zwischen orthologen und konvergenten Sequenzen sein (Syvanen 1994). Proteine, die mittels eines ähnlichen Mechanismus dieselbe Funktion erfüllen, könnten bedingt durch Substitutionen eine ähnliche Aminosäuresequenz haben. Nicht phylogenetisch verwandte, konvergente Sequenzen können jedoch von orthologen durch die Art der Aminosäureaustausche unterschieden werden, die häufig neutral und nur selten identisch ist.

Die Ergebnisse, die man durch Sequenzhomologievergleiche erhält, können im besten Fall andeuten, daß ein HGT von einer Pflanze zu einem Bakterium in der Vergangenheit stattgefunden haben könnte. Diese Methode wird aber niemals ein Transferereignis völlig bestätigen können. Die wenigen bisher gefundenen Ergebnisse, die auf einen HGT gefolgt von stabiler Integration des Transgens in das Genom des Rezipienten hinweisen, zeigen, daß HGT wahrscheinlich ein sehr seltenes Ereignis ist. Eine Sequenzhomologieanalyse gibt keine Auskunft über die Häufigkeit des Gentransfers und ist somit eine rein qualitative, und keine quantitative Methode.

Abb. 1



A, a sind orthologe Gene

HGT von Art 1 oder Art 2 zu Art 3

B, b sind orthologe Gene

Kein HGT zwischen Art 1 und Art 2

A, a sind paralog zu B, b, und umgekehrt

2.2 Experimenteller Beweis

Zum direkten Beweis von HGT dienen experimentelle Untersuchungen. Hier können zwei verschiedene Ansätze unterschieden werden. (1) Künstliche Systeme zeichnen sich durch eine erhöhte Gentransferfrequenz und Sensitivität des Nachweissystems aus. Beides ist notwendig, da HGT als ein sehr seltenes Ereignis erachtet wird. Der Nachteil bei dieser Art von Experimenten besteht in den künstlichen Bedingungen, die nur eine ungefähre Schätzung der Häufigkeit des HGTs erlauben. (2) Es wurde auch versucht, HGT unter natürlichen Bedingungen nachzuweisen während oder im Anschluß an Feldversuche mit transgenen Pflanzen. Bedingt durch die niedrige Frequenz ist es jedoch äußerst schwierig, HGT in dieser Art von Experimenten zu finden.

Es ist nicht bekannt, **wie** HGT von Pflanzen zu Mikroorganismen funktioniert, jedoch müssen mindestens zwei Kriterien erfüllt sein, damit er überhaupt stattfinden kann. (1) Der potentielle Rezipient muß kompetent sein für die Aufnahme fremder DNA. (2) Die pflanzliche DNA muß für den Rezipienten zugänglich sein. Experimentelle Ergebnisse weisen darauf hin, daß diese beiden Voraussetzungen für das Stattfinden eines HGTs möglicherweise unter natürlichen Bedingungen gegeben sind.

2.2.1 Horizontaler Gentransfer zu Bakterien

2.2.1.1 Natürliche Kompetenz

Als natürliche Kompetenz wird die Fähigkeit von Bakterien definiert, freie DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Für Arten taxonomisch verschiedenster Bakteriengruppen wurde eine natürliche Kompetenz bereits nachgewiesen und eine Transformationshäufigkeit von 10^{-2} bis 10^{-7} bestimmt (Lorenz und Wackernagel 1994). Es konnte gezeigt werden, daß die Kompetenz oft vom **physiologischen Zustand** der Bakterien abhängt (z.B. von der exponentiellen oder stationären Phase in der Wachstumskurve der Bakterien). Die Konzentration der **Nährstoffe** beeinflusst die bakterielle Kompetenz ebenfalls. Für *Pseudomonas stutzeri* wurde gezeigt, daß das Wachstum dieses Bakteriums in Medien aus Bodenextrakten eingeschränkt und es nicht transformierbar ist. Jedoch war in mit Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor angereicherten Bodenextrakten natürliche Transformation möglich. Insofern kann angenommen werden, daß *P. stutzeri* für DNA-Aufnahme kompetent ist in mit Nährstoffen angereicherten Böden, wie z.B. in der Rhizosphäre oder nach erfolgter Bodendüngung (Lorenz und Wackernagel 1992). Die Transformationsfrequenz von *P. stutzeri* kann noch weiter, bis um das 290 fache erhöht werden in teilweise angereicherten Böden, in denen ein Nährstoff, Stickstoff oder Phosphor, in unzureichender Menge vorhanden ist (Lorenz und Wackernagel 1992).

Eine verstärkte DNA-Aufnahme ist ebenfalls bedingt durch **Stressfaktoren**. Hitze, organische Lösungsmittel (Ethanol), Säuren, Basen und Detergenzien (SDS) erhöhten die Häufigkeit des Gentransfers erheblich, wahrscheinlich durch stressbedingte Inaktivierung des Restriktionssystems des bakteriellen Rezipienten (Schäfer 1994, Schäfer *et al.* 1994). Obwohl sich diese Ergebnisse auf den Gentransfer mittels Konjugation und Transduktion beziehen, ist ein ähnliches Ergebnis für die natürliche Transformation denkbar.

2.2.1.2 Zugänglichkeit von pflanzlicher DNA und die Transformation von Bakterien

Pflanzliche DNA ist für Mikroorganismen zugänglich, wenn sie durch die Zerstörung der Zellen aus dem Pflanzengewebe freigesetzt wird. Die **Zerstörung eines Gewebes** kann verursacht werden durch die **Mikroorganismen im Boden**, durch **Pflanzenpathogene** und durch **Magen- und Darmflüssigkeiten von Tieren**. Um eine effektive Transformation bewirken zu können, muß die freigesetzte Pflanzen-DNA bis zur Aufnahme durch einen potentiellen Empfängerorganismus einigermaßen intakt bleiben.

2.2.1.2.1 Transformation im Boden

DNA Persistenz

Im Boden und im Sediment ist die Stabilität von DNA wahrscheinlich bedingt durch die Anheftung der DNA an Bodenpartikel. Das Ausmaß dieser Adsorption ist beeinflusst durch den pH-Wert, die Konzentration und Wertigkeit der Kationen und die Art der Mineralien (Khanna und Stotzky 1992, Khanna *et al.* 1993, Lorenz und Wackernagel 1987, Paget *et al.* 1992, Romanowsky *et al.* 1991). Es wird angenommen, daß die Temperatur, die Konformation (supercoiled, offen zirkulär, linear) und die Größe der DNA Moleküle nur einen geringen Einfluß auf den Bindungsprozeß haben (zusammenfassend dargestellt in Lorenz und Wackernagel 1994).

Es wurde gezeigt, dass DNA gebunden an natürliche Mineralien eine erhöhte Resistenz gegenüber Nukleasen hat. Während freie, sich in Lösung befindende DNA schon bei DNase I Konzentrationen von 50 ng/ml abgebaut wird, ist eine fast 100 fach höhere Konzentration des Enzymes nötig für den Verdau von an Sandpartikel adsorbierter DNA (Romanowsky *et al.* 1991). Es wird vermutet, daß DNasen nur begrenzt Zugang haben zu adsorbierten DNA Molekülen und alternativ, daß an Sand- und Tonpartikel gebundene DNasen in ihrer Aktivität eingeschränkt sind (Khanna und Stotzky 1992). Da die DNase I aus dem Rinderpankreas isoliert wurde und insofern keine Relevanz für die Umwelt hat, führten Wackernagel und Lorenz (1994) ähnliche Experimente mit einer DNase des weit verbreiteten Bakteriums *Serratia marcescens* durch. Erste Ergebnisse zeigen, daß auch in diesem Fall gebundene DNA eine größere Resistenz aufweist.

Die Persistenz von DNA wurde sowohl in Wasser als auch in Böden und Sedimenten untersucht. Hochmolekulare DNA wird innerhalb von Minuten durch die in Abwässern vorhandenen Nukleasen zerstört, während ihre Halbwertszeit in Frischwasser und Meerwasser 3 - 83 Stunden beträgt sowie 9 - 28 Stunden im Boden (zusammengefaßt in Lorenz und Wackernagel 1994).

Romanowsky *et al.* (1993a) zeigten, daß in unsterilem Boden 0,01 % - 0,2 % der anfänglich zugesetzten Plasmid DNA noch nach 60 Tagen auffindbar ist, wobei die Halbwertszeit von der bodenspezifischen Abbaukinetik anhängig ist. Die extrahierte DNA ist für eine künstliche Transformation von kompetenten *E.coli* Zellen noch brauchbar. Dabei betrug die Transformationsfrequenz der DNA nach 60 tägiger Bodeninkubation maximal 0,01 % ihrer nach einer Stunde erreichten Aktivität (Romanowsky *et al.* 1993a).

Eine natürliche Transformation von kompetenten Bakterien ist ebenfalls mit nicht gereinigter DNA möglich, welche von den Bakterien ins Kulturmedium abgegeben wurde (Lorenz *et al.* 1991), durch ein Rohbakterienlysat gewonnen wurde (Juni und Heym 1980) oder welche an Mineralteilchen adsorbiert wurde. Im Fall von *Bacillus subtilis* reduzierte die Bindung der DNA an Tonminerale die Transformationshäufigkeit um eine Größenordnung von 2×10^{-4} bis ungefähr 2×10^{-5} , wobei sich die Tonminerale wahrscheinlich durch eine recht hohe

Adsorptionskapazität auszeichnen (Gallori *et al.* 1994). Wurden diese Ton-DNA Komplexe für 15 Tage in unsterilem Boden inkubiert, so sank die Transformationsfrequenz um eine weitere Größenordnung auf 2×10^{-6} (Gallori *et al.* 1994).

DNA Aufnahme

Die Transformationshäufigkeit wird beeinflusst von Umweltparametern wie dem pH-Wert, der Temperatur, dem Adsorptionsmaterial und der Art von DNA. Ton-DNA Komplexe, die bei niedrigen **pH-Werten** gebildet werden, bedingen eine Abnahme der Transformationsfrequenz. Bei einem pH-Wert von 1 konnten keine bakteriellen Transformanten mehr gefunden werden, wahrscheinlich weil die DNA teilweise denaturiert ist (Khanna und Stotzky 1992). Obwohl eine Transformation **temperaturabhängig** ist, findet sie doch in einem relativ großen Temperaturbereich von 0-45°C statt (Khanna und Stotzky 1992). Die Transformationseffizienz hängt außerdem von den **Mineralien** ab, an die die DNA adsorbiert. Sie wird kleiner, wenn die DNA an Montmorillonit (Gallori *et al.* 1994) oder an sich im Grundwasser befindende Partikel bindet (Romanowski *et al.* 1993b), während sie erhöht ist für an Sandkörnchen gebundene DNA (Lorenz *et al.* 1988).

Die Transformationsfrequenz ist unterschiedlich für **Plasmid-** und **chromosomale DNA**. In aus Grundwasserpartikelchen bestehenden Mikrokosmen wurde die Transformationshäufigkeit von Plasmid DNA 1000 fach reduziert, während jene von chromosomaler DNA nur 10 fach reduziert war im Vergleich zu Standardtransformationen in Flüssigkeit (Romanowsky *et al.* 1993b). Chromosomale DNA auf der Oberfläche von Mineralen scheint die Transformation durch Plasmid DNA zu fördern (Chamier *et al.* 1993). Aus diesen Ergebnissen könnte man schließen, daß in natürlicher Umgebung chromosomale DNA eine stärkere Transformationsaktivität aufweist als Plasmid DNA.

Transformationsexperimente wurde hauptsächlich durchgeführt mit den Bodenbakterien *Bacillus subtilis* (Gallori *et al.* 1994, Lorenz *et al.* 1988, Romanowski *et al.* 1993a), *Pseudomonas stutzeri* (Lorenz und Wackernagel 1990, Paget und Simonet 1993), und *Acinetobacter calcoaceticus* (Chamier *et al.* 1993, Lorenz *et al.* 1992).

Die vorgestellten Daten zeigen, daß eine Transformation von Bakterien in der natürlichen Umwelt möglich wäre. DNA Aufnahme allein führt jedoch noch nicht zu Veränderungen in den Mikroorganismen. Bleibende Veränderungen entstehen erst, wenn die DNA stabil in das Genom des Empfängerorganismus eingebaut und somit **stabil weitervererbt** wird und wenn das transferierte Gen **stabil exprimiert** wird und zu einem **Selektionsvorteil** führt. Aus diesem Grunde ist zu untersuchen, was mit der aufgenommenen DNA passiert. Zwei Alternativen sind für eine stabile Vererbung der transferierten DNA denkbar, sofern sie im Mikroorganismus überlebt: Die DNA integriert in das Genom des Rezipienten oder sie bildet ein extrachromosomales, sich selbst replizierendes Element (s. Kapitel 3). DNA Integration in das Genom des Empfängerorganismus ist gewöhnlich bedingt durch Rekombinationsereignisse.

Rekombination

In *E. coli* Wildtypzellen läuft Rekombination zwischen homologen Sequenzen, die in den Phagen λ und in ein Plasmid eingebracht wurden, mittels des RecBC Wegs ab und in *recBC*⁻ Zellen in geringem Ausmaß mittels des RecF Wegs. Die Rekombinationshäufigkeit hängt linear von der Länge der homologen Sequenzen ab. Eine minimale Homologie von 30-40 Basenpaaren (bp) wird für den RecBC Weg (King und Richardson 1986, Sheng und Huang 1986) und von 44-96 bp für den RecF Weg benötigt (Shen und Huang 1986). Es wird

vermutet, daß dieser Größenunterschied in der minimalen Homologielänge entweder enzyspezifisch ist oder aber in der langsamer ablaufenden Aktion des RecF Wegs begründet ist, welcher eine größere Stabilität der gebildeten Heteroduplex in Form eines längeren Homologiebereichs erfordert. Beide Reaktionswege sind relativ empfindlich gegenüber dem Homologiegrad. Eine Reduktion der Homologie von 100 auf 90 % führt zu einer über 40 fachen Abnahme der Rekombinationshäufigkeit (Shen und Huang 1986). Dafür ist wahrscheinlich das Genprodukt des *recA* Gens verantwortlich, eine beiden Reaktionswegen gemeinsame Komponente, die nicht vollständig gepaarte DNA langsamer verwertet.

Khasanov *et al.* (1992) bestimmten die minimale Länge eines homologen DNA Bereiches, die für die Rekombination zwischen Plasmid- und chromosomaler DNA in *Bacillus subtilis* erforderlich ist. Sie entwickelten dazu ein System, mit welchem sie zwischen homologer und illegitimer Rekombination unterscheiden konnten. Homologien zwischen 12 und 25 bp waren unzureichend für eine homologe Rekombination, und es kam nur zu illegitimen Rekombinationen an verschiedenen Stellen des bakteriellen Chromosoms mit einer Frequenz von ungefähr 10^{-7} . Homologe Bereiche von 77 bp führten zu einer fast gleich großen Rate von homologer (60 %) und illegitimer Rekombination (40 %), während homologe Sequenzen von mehr als 77 bp zu einer linearen Zunahme der der Häufigkeit von homologen Rekombinationen führten, die schließlich bei 165 homologen bp 98 % aller Rekombinationsereignisse ausmachte. Die Frequenz der illegitimen Rekombination war dabei unabhängig von der Länge homologer Sequenzen.

Berechnung der Häufigkeit von HGT im Boden

Die Frequenz von HGT von Pflanzen zu Bodenbakterien wurde von Calgene (1990) berechnet und basiert auf verschiedenen, der Literatur entnommenen Daten. Die Berechnungen beinhalten Schätzungen für den schlimmsten sowie für einen eher wahrscheinlichen Fall. Die DNA Konzentration im Grundwasser wurde geschätzt auf 0,0067-16 µg/ml. Die Häufigkeit der Entstehung neuer bakterieller Transformanten wurde berechnet, indem die natürliche Transformationsfrequenz der Bakterien mit verschiedenen, sie beeinflussenden Faktoren multipliziert wurde. Diese Faktoren beziehen sich auf die DNA Aufnahme, die Größe der transformierenden DNA, sowie die DNA Rekombination und Genexpression. Zwei mögliche bakterielle Rezipienten dienten als Beispiel: *Bacillus subtilis*, der eine natürliche Transformationsfrequenz von $3,5 \times 10^{-2}$ (Mulder und Venema 1982) besitzt, aber keine Homologie zur aufgenommenen DNA hat, und *Agrobacterium tumefaciens*, das ein weniger effizientes Transformationssystem besitzt (Transformationsfrequenz von 2×10^{-7} , Broer *et al.* 1994), dafür aber Homologie zur aufgenommenen DNA in seinem Ti (Tumor induzierendem) Plasmid aufweist, weil die in den Tomaten enthaltene transgene Sequenz die agrobakteriellen Borders sowie Promoter- und Terminatorregionen von agrobakteriellen Genen enthält. Details über die Rechnung befinden sich in Abb. 2. Die Transformationshäufigkeit wurde für *B. subtilis* auf $2,7 \times 10^{-10}$ bis 2×10^{-4} und für *A. tumefaciens* auf $1,3 \times 10^{-14}$ bis 2×10^{-7} stabile Transformanten pro 1 Gramm Boden geschätzt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Transformationseffizienz stärker vom bakteriellen Transformationssystem als vom Homologiegrad abhängt.

Abb. 2

Berechnung der Wahrscheinlichkeit der natürlichen Transformation von Bodenbakterien mit dem kan^r Gen von transgenen Pflanzenresten (verändert nach Calgene 1990).

Szenario, das sich auf bakterielle Rezipienten bezieht, die ein effizientes Transformationssystem, aber keine Homologie zur aufgenommenen DNA besitzen.

Modelorganismus: *Bacillus subtilis*.

A = Berechnung der DNA Konzentration im Grundwasser

schlimmster Fall = 16 µg/ml

eher wahrscheinlicher Fall = $6,7 \times 10^{-3}$ µg/ml

B = Faktoren, die sich auf eine DNA Aufnahme beziehen

B1 = Anteil an Organismen von transformierbaren Bakteriengattungen

schlimmster Fall = 1 (alle Mikroben sind so gut transformierbar wie *Bacillus subtilis*)

eher wahrscheinlicher Fall = 0,1 (10% der Bodenmikroben sind natürlich transformierbar)

B2 = B1 Fraktion, die kompetent ist

schlimmster Fall = 0,1 (10% ist die maximale Anzahl an kompetenten Zellen, die unter kontrollierten Laborbedingungen erhalten werden, **Cahn und Fox 1968**)

eher wahrscheinlicher Fall = 0,05 (**Cahn und Fox 1968**)

B3 = Anteil an natürlichen Transformanten (wenn DNA im Überschuß ist; *B. subtilis* wurde transformiert mit DNA eines anderen *B. subtilis* Stammes, der eine Kopie des Markergens enthält)

schlimmster Fall = 0,05 (5% ist die höchste Transformationsrate der kompetenten Zellfraktion, **Cahn und Fox 1968**)

eher wahrscheinlicher Fall = 0,002 (**Cahn und Fox 1968**)

B4 = Korrekturfaktor für die DNA Konzentration

schlimmster Fall = 1 (wenn DNA im Überschuß vorhanden ist / > 10 µg/ml, s. Faktor A schlimmster Fall)

eher wahrscheinlicher Fall = 0,1 x DNA Konzentration (wenn DNA nicht im Überschuß vorhanden ist / < 10 µg/ml, s. Faktor A eher wahrscheinlicher Fall) = $6,7 \times 10^{-4}$

B5 = Korrekturfaktor für die Komplexität des transformierenden Genoms; Größe des *B. subtilis* Genoms geteilt durch die Größe des Tomatengenoms und multipliziert mit der Anzahl an kan^r Kopien pro Pflanzengenom

= $(6,3 \times 10^{-3} \text{ pg} / 1,5 \text{ pg}) \times 10 \text{ Kopien} = 0,04$

C = Faktoren, die sich auf die Größe der transformierenden DNA beziehen

(Wahrscheinlichkeit, daß die DNA Fragmente ein intaktes kan^r Gen enthalten)

schlimmster Fall = 1 (alle DNA Fragmente enthalten ein intaktes kan^r Gen)

D = Faktoren, die sich auf die Rekombination und Expression beziehen

D1 = (illegitime) Rekombinationshäufigkeit

schlimmster Fall = 10^{-7} (Rate an veränderten Bakterien, die wahrscheinlich durch spontane Mutation entstanden sind, aber deren Entstehung hier mit illegitimer Rekombination erklärt wird, **Love and Yasbin 1984**)

D2 = Wahrscheinlichkeit, daß das Gen nicht durch Rekombination zerstört wird
schlimmster Fall = 1 (das Gen wird immer intakt transferiert)

D3 = Wahrscheinlichkeit, daß das Gen exprimiert wird
schlimmster Fall = 1 (das Gen wird immer exprimiert)

D4 = Wahrscheinlichkeit, daß das Genprodukt aktiv und stabil ist

schlimmster Fall = 1 (das Genprodukt ist immer aktiv und stabil im Rezipienten)

D5 = Wahrscheinlichkeit, daß die transformierte Zelle nicht schon resistent gegen Kanamycin oder Neomycin ist

schlimmster Fall = 1 (keine der Rezipientenzellen ist bereits kan^r oder neo^r)

Häufigkeit, mit der neue kan^r Organismen entstehen =

B1 x B2 x B3 x B4 x B5 x C x D1 x D2 x D3 x D4 x D5

schlimmster Fall = 2×10^{-11}

eher wahrscheinlicher Fall = $2,7 \times 10^{-17}$

Wenn 10^7 lebende Bakterien in einem Gramm Boden enthalten sind (Stotzky 1989), kann mit $2,7 \times 10^{-10}$ bis 2×10^{-4} Transformanten in diesem Gramm Boden gerechnet werden.

Ähnliche Berechnungen wurden für ein Szenario erstellt, das sich auf bakterielle Rezipienten bezieht, die kein effizientes Transformationssystem, aber Homologie zur aufgenommenen DNA besitzen.
Modelorganismus: *Agrobacterium tumefaciens*.

Häufigkeit, mit der neue kan^r Organismen entstehen =

schlimmster Fall = 2×10^{-14}

eher wahrscheinlicher Fall = $1,3 \times 10^{-21}$

Wenn 10^7 lebende Bakterien in einem Gramm Boden enthalten sind (Stotzky 1989), kann mit $1,3 \times 10^{-14}$ bis 2×10^{-7} Transformanten in diesem Gramm Boden gerechnet werden.

Referenzen

F.H. Cahn und M. . Fox

Fractionation of transformable bacteria from competent cultures of *Bacillus subtilis* on renografin gradients.
Journal of Bacteriology 95 (1968) p. 867-875

P.L. Love und R.E. Yasbin

Genetic characterization of the inducible SOS-like system of *Bacillus subtilis*.
Journal of Bacteriology 160 (1984) p. 910-920

G. Stotzky

Gene transfer among bacteria in soil.

In: S.B. Levy und R.V. Miller (eds). Gene transfer in the environment. McGraw-Hill, New York (1989) p. 165-222

Feldtests über DNA Persistenz im Boden und HGT zu Bodenbakterien

Feldexperimente wurden durchgeführt, um die Persistenz von DNA im Boden zu untersuchen und um in einem weiteren Schritt die Anzahl von natürlichen bakteriellen Transformanten zu bestimmen.

In Bodenproben, die nach Abschluß eines Schweizer Freisetzungsexperiments mit transgenen Kartoffeln genommen wurden, konnte das Markergen nicht gefunden werden (Zeyer *pers. com.*). Dagegen erhielten Becker *et al.* (1994) 4 positive PCR Signale bei der Untersuchung von 400 Bodenproben von einem Feld mit transgenen Petunien, wobei die Pflanzen ein Kanamycin/Neomycin Resistenzgen enthielten. Ein Signal stammte von einer Probe, die während des Experiments genommen wurde, und die anderen drei Signale kamen von Proben, die zwei Monate nach dem Unterpflügen der Pflanzen genommen wurden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die PCR Amplifikationsprodukte von Transgenen aus noch unverrottetem Pflanzenmaterial stammten.

Paget und Simonet (1994) führten einen Feldtest mit transgenem Tabak durch, der ein Markergen für eine Antibiotikumsresistenz enthielt. Ein Jahr nach der Ernte der Pflanzen konnte noch das Markergen mittels PCR in GesamtDNA Extrakten des Bodens nachgewiesen werden. Selbst wenn die DNA entweder in lebenden oder toten Zellen oder als freie DNA im Boden überdauerte, so konnte ein Gentransfer zur einheimischen Mikroflora bis jetzt nicht beobachtet werden.

Analysen des Bodens und der Bodenmikroflora wurden auch in Deutschland begleitend zu Feldexperimenten mit transgenen Kartoffeln und Zuckerrüben durchgeführt. Die Ergebnisse waren ähnlich: eine Überdauerung des Transgens konnte festgestellt werden, aber kein Gentransfer (Smalla *et al.* 1994).

2.2.1.2.2 Transformation in marinen Ökosystemen

Natürliche Transformation wurde ebenfalls für in marinen Ökosystemen vorkommende Bakterien untersucht. Das Bakterium *Vibrio* ist in unsterilem Meerwasser und damit in Gegenwart der umgebenden Mikroflora natürlich transformierbar (Paul *et al.* 1991), und ebenso das Bakterium *Pseudomonas stutzeri* ZoBell in unsterilen Sedimenten (Stewart und Sinigalliano 1990).

10 % der marinen mikrobiellen Populationen, die aus Oberflächen- oder Tiefenwasser, Sedimenten, marinen Schwämmen, Holothurien und Korallenoberflächen extrahiert werden können, waren mit heterologer Plasmid DNA und 14 % mit homologer chromosomaler DNA transformierbar, wobei die meisten Transformanten als *Vibrio* oder *Pseudomonas* Arten identifiziert wurden. Diese bakterielle Aufnahme von Plasmid DNA war begleitet von DNA Veränderungen, die sich in Form eines modifizierten Restriktionsmusters zeigten. Eine quantitative Schätzung ergab Transformationsraten von 0,0005 bis 5 Transformanten pro Liter pro Tag, wobei dieser Wert drei bis neun Größenordnungen niedriger ist als die Transferrate für Plasmide durch natürliche Konjugation. Die Autoren schlossen aus der Extrapolation auf ein Ökosystem, daß natürliche Transformation ein wichtiger Mechanismus für den DNA Austausch zwischen Bakteriengesellschaften sein könnte (Frischer *et al.* 1994).

2.2.1.2.3 Transformation von bakteriellen Pflanzenpathogenen

HGT zu bakteriellen Pflanzenpathogenen wurde mittels Modellsystemen untersucht.

Broer *et al.* (1994) wählten durch *Agrobacterium tumefaciens* verursachte Pflanzentumore als ein System für die Analyse von Gentransfer. Die natürliche Kompetenz der Bakterien für eine DNA Aufnahme wurde überprüft und ergab eine Transformationsrate von 2×10^{-7} beim Einsatz von Plasmid DNA, während keine Transformanten nachgewiesen werden konnten, sobald linearisierte Pflanzen DNA verwendet wurde. Eine Induktion der bakteriellen Virulenzgene durch die Anwendung von Acetosyringon oder eine Zugabe von Pflanzenmaterial bewirken keine Erhöhung der Transformationsrate. Im eigentlichen Experiment wurde transgener Tabak, der in Bakterien aktive Markergene enthielt, mit einem Wildtypstamm von *A. tumefaciens* infiziert. Nach erfolgter Tumorbildung wurden die Bakterien aus den Tumoren wieder isoliert und auf das Vorhandensein der pflanzlichen Transgene analysiert. Bei einem experimentellen Detektionslimit von einem Transformanten pro 6×10^{12} Bakterien konnte kein Gentransfer festgestellt werden. Der Vorteil dieses Modellsystems ist die enge Interaktion zwischen der Pflanze und dem Bakterium. Da aber die pflanzlichen Interzellularen dem Bakterium als Aufenthaltsort dienen, ist es unsicher, ob das Bakterium überhaupt direkten Zugang zu der sich im Zellkern befindenden Pflanzen DNA hat.

Schlüter *et al.* (1995) verwendeten ein kontrolliertes Pflanzen-Pathogen Systems, welches systematisch verändert werden kann, um eine meßbaren DNA Transferrate zu erhalten. Dieses Model System bestand aus dem Bakterium *Erwina chrysanthemi*, welches das Pflanzengewebe lysiert, und aus transgenen Kartoffeln, die eine vom Plasmid pBR322 abgeleitete Sequenz enthalten bestehend aus dem bakteriellen Replikationsursprung oriV und dem vollständigen β -lactamase Gen mit einem bakteriellen Promoter. Auf diese Weise konnte der Einfluß von von verschiedenen Parametern auf den HGT analysiert werden, wie die Markergenkonzentration, die Menge an genomischer DNA sowie die DNA Struktur. Unter Bedingungen, die den natürlichen angenähert waren, wurde eine HGT Frequenz zwischen $2,0 \times 10^{-17}$ und maximal $7,5 \times 10^{-14}$ gefunden. Dieses Ergebnis entspricht ungefähr einem Transformationsereignis pro 10^{17} Bakterien, die 100 000 kg transgene Kartoffeln befallen. In der Natur befinden sich ca. 10^{17} Bakterien verschiedenster Arten in einem Bodenareal von 1000 m² (Metting 1993), und 100 000 kg Kartoffelknollen können von einem 43 000 m² großen Feld geerntet werden (mittlerer Wert für Europa, FAO 1994). Es ist allerdings unwahrscheinlich, daß dieser Kartoffelertrag im Boden bleibt und dem Fäulnisprozeß überlassen wird.

2.2.1.2.4 Transformation in Magen- und Darmflüssigkeiten

Günstige Bedingungen für einen Gentransfer könnten auch im Darm höherer Organismen vorliegen. Für einen experimentellen Beweis wurde von Adamo *et al.* (1993) ein Modellsystem entwickelt, daß sich mit der Aufnahme von transgenen Bakterien durch im Boden lebende Nematoden, z.B. der Gattung *Rhabditis*, und anschließendem Gentransfer zu Darmbakterien befaßt.

Tebbe *et al.* (1994, *pers. com.*) untersuchten das Bodeninsekt *Folsomia candida* hinsichtlich seiner Fähigkeit, Gentransfer in seinem Darm zu induzieren. Das Insekt wurde mit Bakterien und Hefen gefüttert, die als Genspender beim Gentransfer dienen sollten und deshalb selektionierbare Plasmide enthielten, und gleich anschließend mit Streptomycin resistenten Bakterien als potentiellen Rezipienten. Aus dem Insektenkot konnten mit sehr unterschiedlicher Frequenz Empfängerstämme reisoliert werden, die das Plasmid der Donorstämme enthielten. Eine sehr viel niedrigere Transformationsrate (ein Transformant pro mindestens 3×10^7 Bakterien) resultierte aus der Plasmidzugabe zum Kot, was andeutet, daß der Insekten Darm

den Gentransfer stimulieren muß. Da die Transformationsrate für lebende und tote Donorzellen ähnlich war, wurde Transformation als diesem Gentransfer zugrunde liegender Mechanismus angenommen. Eine andere Möglichkeit des natürlichen Plasmidtransfers zwischen verschiedenen Bakteriengattungen wurde von Paul *et al.* (1992) vorgeschlagen. Für den Transfer nicht konjugativer Plasmide von toten bakteriellen Donorzellen zu lebenden bakteriellen Empfängerzellen konnten sie zeigen, daß er vom Zellkontakt abhängig (in Übereinstimmung mit der Konjugation), gleichzeitig aber DNase sensitiv ist (im Gegensatz zur Konjugation). Die Gegenwart von toten Donorzellen erleichtert anscheinend den DNA Transfer im Vergleich zu freier, sich in Lösung befindender DNA. Im Darm könnte deshalb Gentransfer von toten transgenen Bakterien zu natürlich vorhandenen leichter vor sich gehen als von transgenem Pflanzenmaterial aus.

Ein Model zur Berechnung der Transformationshäufigkeit von im Verdauungstrakt vorkommenden Bakterien mit einem in gentechnisch veränderten Tomaten enthaltenen Kanamycinresistenz (kan^r) Gen wurde von Calgene (1990) aufgestellt. Der Ort der natürlichen Transformation ist wahrscheinlich der hintere Bereich des Dünndarms (Ileum) und der Dickdarm (Colon), wo sich eine genügend große Anzahl von Bakterien befindet und die Nahrung eine ausreichende Verweilzeit hat, damit Gentransfer stattfinden kann. *Streptococcus* wurde als potentieller Empfängerorganismus angenommen, da dies die einzige Gattung ist, die am Ort möglicher Transformation vorhanden ist, die natürlich transformierbare Arten enthält und in Gegenwart der Antibiotika Kanamycin und Neomycin durch Gentransfer einen Selektionsvorteil erhält. *Streptococcus* Arten machen jedoch weniger als 1 % der Bakterienpopulationen in Ileum und Colon aus, und keine der am häufigsten in Darm und Kot auftretenden *Streptococcus* Arten ist natürlich transformierbar. Die meisten der anderen Organismen im Dün- und Dickdarm sind obligate Anaerobier. Da jedoch der Elektronenfluß wenigstens durch ein paar Segmente der Atmungskette stattfinden muß, damit eine Aufnahme von Aminoglykosiden erfolgt (Taber *et al.* 1987), werden diese anaeroben Darmbakterien wahrscheinlich weder Kanamycin noch Neomycin aufnehmen und somit keinen Selektionsvorteil durch ein neuerworbenes kan^r Gen erhalten. Die Konzentration der für die Transformation zur Verfügung stehenden DNA und die Anzahl der potentiellen Transformanten wurden berechnet wie in Abb. 3 gezeigt. Die Transformationsrate variiert dabei zwischen $3,9 \times 10^{-15}$ und $3,8 \times 10^{-18}$ (ein ähnlicher Wert von $2,6 \times 10^{-15}$ wurde von Calgene in Redenbaugh *et al.* 1993 publiziert), was einem bakteriellen Transformanten pro 260 - 280 000 Personen mit einem täglichen Konsum von 91 g transgenen Tomaten entspricht.

Abb. 3

Berechnung der Wahrscheinlichkeit einer natürlichen Transformation von Bakterien des Verdauungstrakts mit dem kan^r Gen gentechnisch veränderter Tomaten (verändert nach Calgene).

X = Menge an aufgenommenem kan^r Gen bei einem Konsum von 91 g transgenen Tomaten pro Tag

X1 = Konsum an Tomaten pro Tag
= 91 g/1 Tag

X2 = Umwandlungsfaktor für die Dichte
= 1 cm³/1 g

X3 = Volumen einer Zelle
= 1 cell/10⁻⁶ cm³

X4 = kan^r Kopienanzahl pro Zelle
= 10 kan^r Kopien/1 Zelle

X5 = Größe des kan^r Gens
= 1 kb /1 kan^r Kopie

X6 = Umwandlungsfaktor für DNA Länge in DNA Gewicht
= 1,1 x 10⁻⁹ ng/1 kb

X = X1 x X2 x X3 x X4 x X5 x X6
= 10⁻⁹ g DNA/Tag

A = Bestimmung der DNA Konzentration, die für die Transformation zur Verfügung steht, wenn der tägliche Konsum von Frischen Früchten und Gemüse (ff&v) 2161 g beträgt

A1 = Menge an aufgenommener ff&v DNA
= 2,6 x 10⁻² g DNA/Tag (*Pao et al. 1982*)

A2 = Menge an DNA, die den Verdau übersteht
= 10⁻³ (0,1% der DNA hat ein Gewicht, das dem kan^r Gen entspricht oder größer ist; in Wirklichkeit könnte die Wahrscheinlichkeit, daß eine funktionale Sequenz die Verdauung überlebt, gleich Null gesetzt werden (*Berkowitz 1990*); vollständiger Verdau mit der im Pankreas vorkommenden DNase I reduziert die DNA auf eine Länge von 4 Nukleotiden (*Kornberg 1980*); Experimente von *Calgene* bestätigen diese Angaben)

A3 = Anteil an DNA, der nicht in Nahrungspartikeln gebunden ist und darum als freie DNA der Transformation zur Verfügung steht
schlimmster Fall = 1 (100%)

A4 = Flüssigkeitsvolumen am proximalen und distalen Ende des für die natürlichen Transformation geeigneten Bereichs des Verdauungstrakts
= 1500 ml / 100ml (1500 ml Flüssigkeit erreichen den Dickdarm täglich und 100 ml/Tag werden mit dem Kot ausgeschieden)

Gesamtmenge an ff&v DNA, die zur Transformation verfügbar ist =

A = A1 x A2 x A3 x A4
= 1,7 x 10⁻⁵ mg/ml am proximalen Ende des zur Transformation geeigneten Darmbereichs (mit A4 = 1500 ml)

= 2,6 x 10⁻⁴ mg/ml am distalen Ende des zur Transformation geeigneten Darmbereichs (with A4 = 100ml)

B = Faktoren, die sich auf die DNA Aufnahme beziehen

B1 = Fraktion an Mikroben, die der natürlich transformierbaren Gattung *Streptococcus* angehören

schlimmster Fall = 1 (alle Mikroben sind gleich gut natürlich transformierbar wie *Streptococcus*)

B2 = Anteil an kompetenten Bakterien in der B1 Fraktion

schlimmster Fall = 1 (alle Bakterienzellen sind kompetent, *Stewart 1989*)

B3 x B4 = Frequenz der natürlichen Transformation x Korrekturfaktor für die Konzentration der Donor DNA (s. A)

proximaler Zielbereich = 1,7 x 10⁻⁴

distaler Zielbereich = 2,6 x 10⁻³

(*Streptococcus* wurde mit genomischer, eine Markergenkopie enthaltender DNA eines verwandten *Streptococcus* Stammes transformiert; die Transformationsrate hängt linear von der Konzentration der Donor DNA ab, *Stent and Calendar 1978*)

B5 = Korrekturfaktor für die Komplexität des transformierenden Genoms
Anteil an konsumierten kan^r Genen pro konsumierter ff&v DNA

X/A1 = 10⁻⁹ g DNA / 2,6 x 10⁻² g DNA = 3,8 x 10⁻⁸

Anteil an Markergenen im *Streptococcus* Genom; dieser Faktor ist schon berücksichtigt im Wert B3 x B4

1 kb / 4 x 10³ kb = 2,5 x 10⁻⁴

Korrekturfaktor für den größtmäßig niedrigeren Anteil an kan^r Genen im Tomatengenom im Vergleich zu dem höheren Anteil an Markergenen im *Streptococcus* Genom

B5 = 3,8 x 10⁻⁸ / 2,5 x 10⁻⁴ = 1,5 x 10⁻⁴

C = andere Faktoren, die sich auf die Größe der transformierenden DNA beziehen

(Wahrscheinlichkeit, daß die DNA einer gegebenen Länge ein intaktes kan^r Gen enthält)

= 0,1 (die Transformationshäufigkeit hängt linear von der Größe der transformierenden DNA ab; 1 kb lange Donor DNA ist nur ein Zehntel so effektiv wie "intakte" DNA; DNA Fragmente von weniger als 1 kb bis über 10 kb sind nach dem Eintritt in eine kompetente *Streptococcus* Zelle im Durchschnitt nur noch halb so groß wie ursprünglich, *Morrison and Guild 1972*)

D = Faktoren, die sich auf die Rekombination und Genexpression beziehen

D1 = (illegitime) Rekombinationhäufigkeit

= 10⁻⁸ - 10⁻⁷ (das kan^r Gen von Tn5 ist nur entfernt verwandt mit anderen in natürlichen Bakterienisolaten gefundenen kan^r Genen (*Berg 1989*); darum integriert das kan^r Gen in bakterielle Rezipienten am wahrscheinlichsten durch illegitime Rekombination)

D2 = Wahrscheinlichkeit, daß das Gen durch Rekombination nicht zerstört wird
schlimmster Fall = 1 (das Gen wird immer intakt integriert)

D3 = Wahrscheinlichkeit, daß das Gen exprimiert wird
schlimmster Fall = 1 (das Gen wird immer exprimiert)

D4 = Wahrscheinlichkeit, daß das Genprodukt aktiv und stabil ist
schlimmster Fall = 1 (das Genprodukt ist immer aktiv und stabil in der Rezipientenzelle)

D5 = Wahrscheinlichkeit, daß die transformierte Zelle nicht bereits Kanamycin- oder Neomycin resistent ist
= 0,14 - 1 (75 - 86 % der verschiedenen im Darm vorkommenden *Streptococcus* Arten sind bereits Kanamycin resistent, **Atkinson 1986**)

Häufigkeit, mit der neue kan^r Organismen entstehen =

B1 x B2 x B3 x B4 x B5 x C x D1 x D2 x D3 x D4 x D5

schlimmster Fall = 3.9×10^{-15}

eher wahrscheinlicher Fall = 3.6×10^{-18}

Man kann annehmen, daß 10^{12} *Streptococcus* Arten im menschlichen Verdauungstrakt vorkommen (**Savage 1977**). Nach der berechneten Transformationshäufigkeit können $3,6 \times 10^{-6}$ bis $3,9 \times 10^{-3}$ Transformanten pro Person oder 1 Transformant pro 260 bis $2,8 \times 10^5$ Menschen erwartet werden, die alle 91 g transgene Tomaten pro Tag konsumieren.

Referenzen

B.A. Atkinson

Species incidence and trends of susceptibility to antibiotics in the United States and other countries: MIC and MBC.

In: V. Lorian (ed). Antibiotics in laboratory medicine. 2d ed. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland (1986)

D.E. Berg

Transposable elements in prokaryotes.

In: S.B. Levy und R.V. Miller (eds). Gene transfer in the environment. McGraw-Hill, New York (1989) p. 99-137

D.B. Berkowitz

The food safety of transgenic animals.

BioTechnology 8 (1990) p. 819-825

D.A. Morrison und W.R. Guild

Transformation and deoxyribonucleic acid size: extent of degradation on entry varies with size of donor.

Journal of Bacteriology 112 (1972) p. 1157-1168

A. Kornberg

DNA replication. W.H. Freeman and Company, San Francisco, CA (1980) p. 332

E.M. Pao, K.H. Fleming, P.M. Guenther und S.J. Mickle

Foods commonly eaten by individuals: amount per day and per eating occasion.

Consumer Nutrition Center. Human Nutrition Information Service. US Department of Agriculture. Home Economics Research Report Number 44. Washington, D.C. (1982)

D.C. Savage

Microbial ecology of the gastrointestinal tract.

Annual Review of Microbiology 31 (1977) p. 107-133

G.S. Stent und R. Calender

Efficiency of transformation.

In: Molecular Genetics: An introductory narrative. 2d edition. W.H. Freeman and Company, San Francisco, CA (1978) p. 191-193

G.J. Stewart

The mechanism of natural transformation.

In: S.B. Levy und R.V. Miller (eds). Gene transfer in the environment. McGraw-Hill, New York (1989) p. 139-164

2.2.2 Horizontaler Gentransfer zu Pilzen

2.2.2.1 Natürliche Kompetenz

Für Pilze (einschließlich Hefen) konnte gezeigt werden, daß sie DNA unter künstlichen Bedingungen aufnehmen (zusammengefaßt in Fincham 1989): (1) durch die Herstellung von Protoplasten, (2) bei hohen Konzentrationen an Calcium- ($0,1 \text{ M Ca}^{2+}$) und Lithiumionen ($0,2 \text{ M Li}^+$), und (3) nach der Anwendung mechanischer Zerstörungsmethoden. Alternativ können mutierte Stämme mit Membranen oder Zellwänden von erhöhter Durchlässigkeit (*inl* Mutanten oder *inl/os* Mutanten, *inl* = Inositol abhängig, *os* = sensitiv gegenüber hohem osmotischen Druck) in Gegenwart von DNA und niedrigen Ca^{2+} Konzentrationen (gewöhnlich 10 mM) transformiert werden. Natürliche Kompetenz für die Aufnahme von DNA ist für zwei Pilzen bekannt: für *Aspergillus niger* (Hoffmann *et al.* 1994) und *Plasmodiophora brassicae* (Bryngelson *et al.* 1988). Somit ist zumindestens für einige Pilze eine DNA Aufnahme unter natürlichen Bedingungen möglich.

2.2.2.2 Transformation von Pilzen

Eine Transformation von Pilzen mittels Plasmid DNA ist möglich, wobei die aufgenommene DNA entweder episomal oder integriert ins Wirtsgenom vorliegt (Struhl *et al.* 1979). Es wird angenommen, daß eine genomische Integration auf einem homologen Rekombinationsereignis beruht, das entweder in einem Einbau des ganzen Plasmids in die Wirts DNA oder in einem Ersatz des Wirtsgens durch das entsprechende Plasmidgen resultiert (zusammengefaßt in Fincham 1989).

Bryngelson *et al.* (1988) arbeiteten mit dem Wirts-Pathogen System *Brassica napus* - *Plasmodiophora brassicae* und fanden in dem Pilz repetitive DNA Sequenzen des Wirts. Infektion einer anfälligen Varietät von *Sinapsis alba* mit *P. brassicae* führte zur Bildung neuer Dauersporen, denen die *B. napus* Sequenzen fehlten, die dafür aber Sequenzbereiche von *S. alba* enthielten. Daraus wurde geschlossen, daß *P. brassicae* in jedem Infektionszyklus wirtsspezifische Sequenzen aufnimmt und sie als Nährstoffe für die Dauersporen benutzt. Die intrazelluläre Lokalisation dieser Fremd DNA ist nicht bekannt, aber ein gelegentlicher Einbau in das Pilzgenom ist in evolutionären Zeiträumen denkbar.

Hoffmann *et al.* (1994) kultivierten transgene, hygromycinresistente *Brassicaceae* zusammen mit dem saprophytischen, natürlich transformierbaren Pilz *Aspergillus niger* in einem Bodenmikrokosmos unter sterilen Bedingungen. Nur in 5 % der über 200 erhaltenen resistenten *Aspergillus* Kolonien konnte das Transgen mittels Southern Blot Hybridisierung nachgewiesen werden. Nahezu alle dieser mutmaßlichen Transformanten verloren ihren transgenen Charakter bei längerer Kultivierung unter selektiven Bedingungen. Nur in einem Fall behielt der Pilz seine erworbene Resistenz. DNA Isolation und Analyse ergaben, daß ein dem ursprünglichen Pflanzentransformationsvektor entsprechender Sequenzbereich vorlag, jedoch nicht das Hygromycinresistenzgen. Die Ursache der Resistenz bleibt daher unklar.

Über die Häufigkeit von HGT zu Pilzen gibt es bis jetzt keine Berechnungen.

3 Zusammenfassung

Die wichtigsten der zuvor dargelegten Daten sind nochmals in der Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt. Es wurde durch Laborexperimente und mit Modellsystemen gezeigt, daß die Voraussetzungen für einen HGT in der Natur unter bestimmten Umständen gegeben sein könnten: (1) DNA kann durch Bindung an Bodenpartikel in der Umwelt überleben. (2) Mikroorganismen sind zu einem gewissen Grad kompetent für die Aufnahme fremder DNA. Solche DNA Aufnahme findet sogar statt, wenn die DNA an Partikel gebunden ist.

Unabhängig vom bloßen Gentransfer ist für die Existenz stabiler Transformanten eine Vererbung der Transgene entweder als Plasmid oder integriert in das Genom des Empfängerorganismus notwendig. Um eine Bedeutung für die Umwelt zu erhalten, muß das Transgen außerdem exprimiert werden und seinem Wirt einen Selektionsvorteil bieten. All diese Voraussetzungen berücksichtigend wurden Berechnungen für die Transformationshäufigkeit durchgeführt, die auf Daten von optimierten Laborexperimenten basieren. Die errechneten Transformationsfrequenzen sind sehr niedrig und deuten bereits an, daß es äußerst schwierig ist, HGT in einem Freisetzungsexperiment mit transgenen Pflanzen festzustellen. Das Gleiche gilt für den Gentransfer im menschlichen Darm. In Übereinstimmung mit diesen Annahmen ist HGT in keinem einzigen Feldtest beobachtet worden. Nur in einem Laborexperiment wurde ein stabil transformierter Pilz gefunden, doch eine Reisolierung der transferierten Markergene war nicht möglich.

Sequenzhomologieanalysen liefern einige wenige Beispiele, die einen früheren HGT andeuten. Jedoch tragen diese Ergebnisse oftmals das Risiko von falsch interpretierten konvergenten oder paralogen Gene in sich. Insgesamt scheint HGT in der Natur möglich zu sein, doch mit einem Auftreten phänotypischer Veränderungen gekoppelt mit einem Selektionsvorteil für den potentiellen Rezipienten kann bestenfalls in evolutionären Zeiträumen gerechnet werden.

Tabelle 1

| Experimentelles System | Transformationshäufigkeit | Ergebnis | Referenzen |
|--|---|---|-------------------------------|
| Experimente mit freier DNA | | | |
| Intaktheit der DNA in unsterilem Boden | | 0,01% - 0,2% / 60 Tage | Romanowsky <i>et al.</i> 1993 |
| Bakterielle Kompetenz für die Aufnahme von DNA | 10^{-2} - 10^{-7} | | Lorenz und Wackernagel 1994 |
| Transformationshäufigkeit für partikelgebundene DNA | | 10% reduziert | Gallori <i>et al.</i> 1994 |
| Berechnung der Transformationshäufigkeit | | | |
| Im Boden | | | |
| Bakterien mit einem effizienten DNA Aufnahmesystem, aber ohne homologe Sequenzen | 2×10^{-11} - $2,7 \times 10^{-17}$ | $2,7 \times 10^{-10}$ - 2×10^{-4} Transformanten / 1 g Boden | Calgene 1990 |
| Bakterien ohne effizientes DNA Aufnahmesystem, aber mit homologen Sequenzen | 2×10^{-14} - $1,3 \times 10^{-21}$ | $1,3 \times 10^{-14}$ - 2×10^{-7} Transformanten / 1 g Boden | Calgene 1990 |
| In marinen Ökosystemen | | | |
| | | 0,0005 - 1.5 Transformanten / 1 l / 1 Tag | Frischer <i>et al.</i> 1994 |
| Im Verdauungstrakt | | | |
| | $3,9 \times 10^{-15}$ - $3,6 \times 10^{-18}$ | 1 Transformant pro 260 - 280 000 Personen, die täglich 91 g transgene Tomaten konsumieren | Calgene 1990 |
| Koinkubationsexperimente | | | |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> / Tabak | $< 6 \times 10^{-12}$ | kein Transformant / 6×10^{12} Bakterien | Broer <i>et al.</i> 1994 |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i> / Kartoffel | $7,5 \times 10^{-14}$ - 2×10^{-17} | 1 Transformant / 10^{17} Bakterien / 100 000 kg transgene Kartoffelknollen | Schlüter <i>et al.</i> 1995 |
| <i>Aspergillus niger</i> / <i>Datura innoxia</i> | | 1 stabiler Transformant | Hoffmann <i>et al.</i> 1994 |
| Feldexperimente | | | |
| DNA Persistenz | | 1 Jahr | Paget <i>et al.</i> 1994 |
| Transformanten | | 0 | Paget <i>et al.</i> 1994 |

4 Methoden zur Reduktion von Horizontalem Gentransfer

HGT ist, soweit er existiert, ein natürliches Phänomen und trifft für pflanzeigene Gene ebenso zu wie für in Pflanzen eingebrachte Transgene. Es wird angenommen, daß die Transferfrequenz dabei in beiden Fällen gleich ist und in keiner Weise von der Pflanzenart abhängt. Während HGT nicht verhindert werden kann, so wäre jedoch eine Reduktion der folgenden Schritte wie eine stabile Vererbung des Transgens bedingt durch homologe Rekombination oder die Bildung eines eigenständigen Plasmids sowie eine Reduktion der Genexpression möglich. Dieses kann auf verschiedene Weise erfolgen.

Die stabile Vererbung eines Transgens in einem potentiellen mikrobiellen Rezipienten kann reduziert werden, wenn die für die Transformation verwendeten Sequenzen

(1) von einer Pflanze stammen. Solche Sequenzen sollten eine geringe Ähnlichkeit zur DNA von Bakterien und Pilzen haben.

Wenn Agrobakterien als Vektor für die Pflanzentransformation eingesetzt werden, so wird immer ein kurzes Stück bakterieller DNA mit dem eigentlichen Transgen ins pflanzliche Genom integrieren. Bei diesen Sequenzen handelt es sich um die "Borders" der agrobakteriellen T-DNA, die nach der Integration in die PflanzendNA eine maximale Länge von 3 bp auf der rechten und 22 bp auf der linken Seite haben (Bakkeren *et al.* 1989). Diese Bereiche sind zu kurz, als daß sie die Häufigkeit an homologen Rekombinationen nach einem potentiellen Gentransfer von transgenen Pflanzen zu agrobakteriellen Wildtypstämmen signifikant ansteigen lassen könnten. Eine durch die agrobakteriellen Border Sequenzen bedingte Integration des Transgens ins Genom eines neuen Wirts ist somit sehr unwahrscheinlich. Es ist wahrscheinlicher, daß ein für die Pflanzentransformation eingesetzter Agrobakterienstamm die Gegenselektion mit Antibiotika, z.B. mit Cefotaxim, überlebt (Matzk und Schiemann 1994, Schiemann *et al.* 1994), und dann als Gendonor in einer bakteriellen Konjugation dient.

(2) keinen bakteriellen Replikationsursprung enthalten. Bei den direkten Transformationsmethoden für Pflanzen wie z.B. "Partikel-Bombardement" werden oftmals Plasmide benutzt, welche neben dem eigentlichen Transgen, ein Markergen und einen bakteriellen Replikationsursprung (*oriV*) enthalten. Letzterer dient zur Plasmidamplifikation in Bakterien und damit zur Herstellung genügend großer DNA Mengen für die Transformationen. Bei der Transformation kann nicht nur das Transgen ins Pflanzengenom integrieren, sondern ebenfalls der *oriV*. Wenn ein horizontaler Transfer für ein aus dem Transgen und dem *oriV* bestehendes DNA Fragment angenommen wird, und zwar von einer transgenen Pflanze zu einem Bakterium, so könnte dieses Fragment nach erfolgter Religation eine sich selbst replizierende Einheit, d.h. ein autonomes Plasmid bilden, welches stabil vererbt wird. Es wäre deshalb am besten für die Transformation keine ganzen Plasmide, sondern nur Fragmente, die lediglich das Transgen enthalten, zu benutzen.

Die stabile Expression eines Transgens in einem potentiellen mikrobiellen Rezipienten kann reduziert werden, wenn die für die Transformation verwendeten Sequenzen

(1) pflanzliche Promotoren enthalten. Es ist anzunehmen, daß pflanzliche Promotoren in Bakterien und Pilzen weniger aktiv sind als in Pflanzen. Induzierbare Promotoren hängen in ihrer Aktivität von der Art des Gewebes, dem Entwicklungsstadium oder von bestimmten Umweltbedingungen ab, und sollten deshalb gegenüber konstitutiven Promotoren bevorzugt werden. Für einen konstitutiven viralen Promoter, den 35S-Promoter des Blumenkohlmosaikvirus, wurde bereits gezeigt, daß er nicht nur in den meisten Pflanzen,

sondern auch in dem Bakterium *E. coli* (Assaad und Singer 1990) und in Hefen (Hirt *et al.* 1990) aktiv ist.

(2) Introns enthalten. Da bakterielle Gene keine Introns besitzen, sind Bakterien nicht in der Lage, eukaryotische Introns aus einer mRNA herauszuschneiden. Sie können darum kein funktionstüchtiges Protein bilden, wenn Gene innerhalb des Protein-kodierenden Bereichs Introns aufweisen.

(3) für ein inaktives Proprotein / Zymogen kodieren, das erst bestimmten proteolytischen Veränderungen unterzogen werden muß, um aktiviert zu werden. Derart präzise Modifikationen erfordern spezifische Enzyme, die nicht in allen Organismenklassen vorhanden sind.

5 Riskobewertung eines Horizontalen Gentransfers von Transgenen, die in der Schweiz für die Transformation von Pflanzen eingesetzt werden sollen

5.1 Risikobewertung für Resistenzgene gegen Pilz-, Virus- und Insektenbefall

Da HGT gefolgt von stabiler Genintegration und -expression nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, bleibt immer ein Restrisiko. Um dieses Risiko näher zu analysieren, sollten jene Transgene, die sich in den für eine Freisetzung vorgesehenen Pflanzen befinden, bzgl. ihrer ökologische Effekte nach einem potentiellen HGT untersucht werden. Eine Risikobewertung kann durch die Beantwortung der folgenden Fragen stattfinden:

- (1) Von welchem Organismus stammt das Transgen?
- (2) Kommt das Transgen mit einem neuen Artenspektrum an Rezipienten eines möglichen HGTs in Kontakt?
- (3) Ist der Anteil des Transgens in dem gemeinsamen Genpool an zugänglicher, freigesetzter DNA erheblich erhöht?
- (4) Ist das Transgen verändert?
- (5) Wird ein Genprodukt produziert? Was für eine Funktion hat es?
- (6) Schädigt das Genprodukt ein erweitertes oder verändertes Artenspektrum, wenn es im Gegensatz zu transgenen Pflanzen von Pilzen oder Bakterien als Rezipienten eines möglichen HGTs produziert wird?
- (7) Führt das Genprodukt zu einem Selektionsvorteil für den potentiellen mikrobiellen Rezipienten eines HGT?

Wann immer bakterielle Gene (Frage 1) für die Transformation von Pflanzen eingesetzt werden, ist zu bedenken, daß ein konjugativer Gentransfer von einem Bakterium zu einem anderen oder zu Pilzen, v.a. Hefen, sehr viel leichter stattfindet als ein horizontaler Transfer von einer Pflanze zu einem Mikroorganismus. Darum besteht in diesem Fall kein neues Risiko.

Wann immer pflanzliche Gene (Frage 1) für die Transformation von Pflanzen eingesetzt werden, hängt es von der natürlichen Verbreitung dieser Gene ab, ob sich das Potential für HGT hinsichtlich der Rezipienten verschoben (Frage 2) oder vergrößert hat (Frage 3). Wenn ein Transgen natürlicherweise in vielen verschiedenen Organismen vorkommt, ist es auch in relativ großer Menge in dem gemeinsamen Genpool an freigesetzter DNA vorhanden und hat daher im Vergleich zu seltenen Genen ein höheres Potential für einen HGT in der Evolution. Durch das Einbringen einer zusätzlichen Kopie eines solchen weitverbreiteten Gens in ein Pflanzengenom, wird die Häufigkeit eines HGT also nicht erhöht. Das Spektrum möglicher Rezipienten könnte jedoch leicht verändert werden.

Die Möglichkeit der Rekombination, Genexpression und Bildung eines funktionstüchtigen Proteins ist in einem mikrobiellen Rezipienten erhöht, wenn ein Transgen pflanzlicher

Herkunft modifiziert wird (Frage 4) durch die Insertion mikrobieller Sequenzen, durch den Gebrauch von in Bakterien und Pilzen aktiven Promotoren, durch das Ausschneiden von Introns oder von eventuell vorhandenen Sequenzen, die zur Bildung eines Proproteins dienen.

Wenn HGT in seiner Häufigkeit vergrößert oder in seiner Richtung verändert ist, sollten die Eigenschaften des Genprodukts analysiert werden. Solange das Genprodukt und seine Funktionen vollständig unbekannt sind (Frage 5), sollte das Gen nicht für die Herstellung transgener, kommerziell genutzter Pflanzen dienen. Im Fall von antisense DNA wird kein Protein gebildet, und potentielle Rezipienten eines HGTs erfahren nur dann eine Veränderung, wenn sie das komplementäre Gen in ihrem Genom besitzen. Die Expression dieses Gens wird dann durch die transgene antisense DNA verhindert, und der Rezipient wird wahrscheinlich dem Wildtyp gegenüber im Konkurrenzkampf unterlegen sein. Für den Rezipienten ergibt sich also entweder keine Veränderung oder ein Selektionsnachteil nach der Aufnahme des Antisensekonstrukts.

Falls ein Genprodukt im Rezipienten synthetisiert wird, sollte dessen Spezifität untersucht werden (Frage 6). Wird ein unspezifisches Fungizid oder Bakteriozid produziert, so kann der Rezipient sich selbst durch die Produktion dieses Toxins töten. Ein sehr spezifisches Toxin, welches nur wenige Arten in ihrem Wachsstum hemmt, könnte einen Selektionsvorteil für den Rezipienten bedingen (Frage 7), insofern das Toxin exportiert wird und eine nicht resistente Art erreicht, die in Konkurrenz mit dem Rezipienten des HGT steht. Dieser Selektionsvorteil hält nur solange an, wie die durch das Toxin geschädigte Art keinen neuen Resistenzmechanismus entwickelt hat.

In der Schweiz werden gegenwärtig verschiedene Gene verwendet, um Pflanzen pathogenresistent zu machen. Für bakterielle und Pilzresistenz werden die δ -Aminolevulinsäure (ALA) Synthetase, Chitinasen, ein Antisensekonstrukt der Ferrochelatase, Glucanasen, Osmotin, Peroxidasen, ein Antisensekonstrukt der Protochlorophyllide Reduktase (POR) B, Ribosomen inaktivierende Proteine (RIPs), eine Stilben Synthetase und Thionine genutzt. Für Virusresistenz werden Hüllproteine, eine 2'-5' Oligoadenylat Synthetase von Säugern und virale Replikasen eingesetzt und für Insektenresistenz wird eines der *B.t.* Toxine gebraucht.

Gene, die für Pilzresistenz kodieren

Glucanasen, Chitinasen, RIPs und Peroxidasen sind in Pflanzen weit verbreitet, und darum ist das Risiko eines HGTs in diesem Fall nichts Neues (Chitinasen and Glucanasen: s. Boller 1988; Peroxidasen: s. Krzakowa 1991, Legrimini *et al.* 1990; RIPs: s. Stirpe *et al.* 1992). Die **Antisensekonstrukte** der **Ferrochelatase** und der **POR B** werden keinen Effekt haben oder zu einem Selektionsnachteil in den potentiellen mikrobiellen Rezipienten führen, und bedingen deshalb kein Risiko.

Die **anderen Transgene pflanzlichen Ursprungs** sind vermutlich etwas weniger weit im Pflanzenreich verbreitet (Osmotin: s. Woloshuk *et al.* 1991; Stilben Synthetase: s. Gorham 1980, Hain *et al.* 1993; Thionine: s. Bohlmann and Apel 1991). Jedoch kodieren sie für einen unspezifischen Resistenzmechanismus.

Die **Stilben Synthetase** ist aktiv, wenn sie die entsprechenden Substrate Malonyl-CoA und Zimtsäure-CoA Derivate vorfindet. Zimtsäure-CoA Derivate kommen in vielen Pilzen und dem Bakterium *Streptomyces verticillates* vor (Luckner 1990). HGT zu Bakterien wird wahrscheinlich nicht zu einer Produktion von Stilben Phytoalexinen führen, selbst wenn die

Stilben Synthetase exprimiert wird, da das Substrat des Enzyms in den meisten Bakterien fehlt. HGT zu Pilzen, die Zimtsäure-CoA Derivate enthalten, könnte zu einer Synthese von Stilben Phytoalexinen führen. Da diese Phytoalexine auf Pilze toxisch wirken (Hart 1981), könnte ein transgener Mikroorganismus durch die von ihm produzierten Toxine getötet werden. Jedoch wurde für Pinosylvin und seinen Monomethylether gezeigt, daß einige Pilze bei bestimmten Konzentrationen dieses Stilbens noch wachsen, während anderen Pilzarten in ihrem Wachstum gehemmt werden (Hart 1981). Ein toleranter Pilz, der als Rezipient einer horizontal transferierten Stilben Synthetase fungiert, könnte einen Selektionsvorteil gegenüber sensitiven Arten haben. Allerdings wird sich für solche Rezipienten, die schon vorher in engem Kontakt mit Stilben produzierenden Pflanzen gelebt haben, kein neuer Selektionsvorteil ergeben. Rezipienten eines HGTs könnten das Spektrum von Organismen, die Stilben Phytoalexinen ausgesetzt sind, zwar verändern, jedoch ist dieses sehr schwer nachzuweisen. Eine Risikoreduktion wird in diesem Fall durch die Verwendung von Genkonstrukten erreicht, die in einem möglichen Rezipienten nur schlecht stabil integriert und exprimiert werden (s. Kapitel 3).

Für **Osmotin** und **Thionine** ergibt sich eine ähnliche Situation wie für die Stilben Synthetase, da diese Proteine das Wachstum verschiedener Mikroorganismen wahrscheinlich ebenfalls unterschiedlich stark beeinträchtigen.

Im Fall von transgenen Pflanzen, die die **δ -Aminolevulinsäure (ALA) Synthetase** von Hefen unter der Kontrolle eines pathogeninduzierbaren Promoters besitzen, würde ein HGT dieses Gens zu Pilzen oder Bakterien die heutige Situation wenig verändern, da das Gen bereits in Mikroorganismen verbreitet ist (Borriss und Lippert 1985).

Gene, die für Virusresistenz kodieren

Die **2'-5' Oligoadenylat Synthetase** von Säugern ist ein Enzym, das spezifisch durch in die Zelle eintretende doppelsträngige (ds) RNA, dem Replikationsintermediat von RNA Viren, aktiviert wird und kaum durch zelleigene RNAs. Das aktivierte Enzym polymerisiert ATP zu einer Reihe von 2'-5' Oligoadenylaten, deren Monomere über 2'-5' Phosphodiester- anstatt über 3'-5' Bindungen miteinander verknüpft sind. 2'-5' Oligoadenylate aktivieren eine latente Endoribonuklease (RNase L), welche virale und zelluläre RNA zerstört und selber inaktiviert wird durch eine zelluläre 2' Phosphodiesterase (Truve *et al.* 1993). Da eine aktivierte 2'-5' Oligoadenylat Synthetase zum Zelltod von virusinfizierten eukaryotischen Zellen führt, ist es unwahrscheinlich, daß dieses Enzym einen Selektionsvorteil für prokaryotische Rezipienten haben könnte.

Transfer von **viralen Hüllproteinen (Coat Protein, CP)** oder **viralen Replikasen** von einer transgenen Pflanze zu einem Mikroorganismus würde nur zu einem Selektionsvorteil führen, wenn das jeweilige Genprodukt ebenfalls aktiv ist gegen Viren, die Pilze befallen, oder gegen Bakteriophagen. CPs und virale Replikasen wirken jedoch meistens nur auf den eigenen Virusstamm oder auf nahe verwandte Stämme inhibierend (Fitchen und Beachy 1993, Hull und Davies 1992).

Rekombinationsereignisse zwischen einem infizierenden Virus und einem potentiellen Rezipienten eines HGTs treten wahrscheinlich mit keiner größeren Häufigkeit auf als in transgenen Pflanzen. Es wird vermutet, daß ein durch Blattläuse nicht übertragbarer Virusstamm durch Rekombination mit einem Transgen, das für ein CP eines durch Blattläuse übertragbaren Virus kodiert, eine solche Übertragbarkeit erreichen könnte. Das Risiko einer verstärkten Virusausbreitung durch Blattläuse kann reduziert werden durch die Verwendung von CP Genen, die für defekte CPs kodieren. Bei Potyviren ist das Aminosäuretriplet DTG

(Asparaginsäure - Threonin - Glycin) verantwortlich für eine Läuseübertragbarkeit, und bestimmte Veränderungen, die das Glycin in der dritten Position des Triplets oder benachbarte Aminosäurereste betreffen, verhindern die Läuseübertragbarkeit völlig oder reduzieren sie stark (Altreya *et al.* 1991, Lecoq *et al.* 1993).

Beim Replikasegen wird eine mutierte Version eingesetzt, deren GDD (Glycin - Asparaginsäure - Asparaginsäure) Motif zu ADD (Alanin - Asparaginsäure - Asparaginsäure) verändert wurde. Das GDD Triplet ist in allen Replikasen von RNA(+) Viren und in verwandter Form in anderen RNA Polymerase zu finden (Longstaff *et al.* 1993). Man nimmt an, daß es mit dem katalytischen Bereich der RNA Polymerase assoziiert ist. Ein Austausch von Aminosäuren in dieser Konsensussequenz zerstört wahrscheinlich die Fähigkeit des Enzyms, Nukleotide aneinanderzuheften, aber beeinflusst nicht seine Fähigkeit, das geeignete Substrat zu erkennen (Inokuchi und Hirashima 1987, Longstaff *et al.* 1993). Virale Rekombination in einem Rezipienten von HGT führt also zu keinem Selektionsvorteil für den rekombinierten Virus, weil das modifizierte Enzym inaktiv ist.

Gene, die für Insektenresistenz kodieren

Die Gene für kristalline Toxine (**cry**) des Bakteriums *Bacillus thuringiensis* wurden in Pflanzen eingebracht, um sie gegen Insektenbefall resistent zu machen. Das Genprodukt CryIA(b) gehört zu einer Klasse von **B.t. Toxinen**, die spezifisch gegen *Lepidoptera* wirken (Höfte und Whiteley 1989) und sich in ihrer Toxizität gegenüber den verschiedenen Lepidopterenarten noch unterscheiden (Ahl Goy *et al. in press*). Die gleiche Spezifität wurde ebenfalls für eine verkürzte Form des CryIA(b) Proteins nachgewiesen (Ahl Goy *et al. in press*). Da dieses Gen natürlicherweise in einer Bakterienart vorkommt, wird es sich innerhalb der Prokaryoten sehr viel schneller durch bakterielle Konjugation ausbreiten als durch HGT mit einer Pflanze als Gendonor. Das Spektrum der möglichen Rezipienten könnte allerdings leicht verschoben sein. Pilze, die als Rezipienten das *cry* Gen aufnehmen und exprimieren, könnten z.B. resistent gegen Insektenfraß werden. Da das Toxin jedoch sehr spezifisch wirkt, wird ein Pilz als Rezipient horizontalen Gentransfers nur einen Selektionsvorteil erlangen, wenn er von bestimmten Lepidopterenarten befallen wird.

5.2 Risikobewertung für Markergene

Neben dem eigentlichen Transgen werden zur Erleichterung der anschließenden Selektion fast immer Markergene bei der Transformation in eine Pflanze eingebracht. Diese Markergene kodieren meistens für Proteine, die zu einer Antibiotikums- oder Herbizidresistenz führen. In den Schweizer Projekten für Pflanzentransformationen werden zwei verschiedene bakterielle Markergene erwähnt, das *nptII* Gen und das *bar/pat* Gen.

Das *nptII* (*aphA2*) Gen stammt vom Tn5 Transposon auf einem R-Plamid von *E. coli* und kodiert für eine Neomycin Phosphotransferase, welche die Aminoglycosid Antibiotika Kanamycin und Neomycin detoxifiziert (Nap *et al.* 1992). Gegen eine Verwendung dieses Markergens wird z.T. eingewandt, daß ein HGT zu pathogenen Mikroorganismen stattfinden könnte, die damit eine Resistenz gegenüber diesen Antibiotika erlangen und sie dadurch wirkungslos machen. Übertragung durch HGT ist jedoch wesentlich weniger wahrscheinlich als durch Konjugation bedingter Plasmidaustausch zwischen Bakterien. Außerdem ist Kanamycinresistenz bereits weit unter Bakterien verbreitet. Kanamycinresistente Bakterien, die ihre Resistenz durch horizontalen Transfer des von untergepflügten Pflanzenresten freigesetzten *nptII* Gens erlangen, würden nur 10^{-11} bis 10^{-5} % der bereits existierenden

kanamycinresistenten Population von $7,2 \times 10^{12}$ Bodenmikroorganismen pro Hektar ausmachen (Henschke und Schmidt 1989). Im menschlichen Verdauungstrakt sind 75 - 86 % der vorhandenen 10^{12} *Streptococcus* Bakterien bereits resistent gegenüber Kanamycin. Dieses entspricht 8×10^{11} Bakterien, wogegen pro Person nur mit einem durch HGT resistent gewordenen Bakterium in einem bis 770 Jahren zu rechnen ist (Calgene 1990).

Die **bar** und **pat** Gene wurden aus *Streptococcus hygroscopicus* (Thompson *et al.* 1987) bzw. *Streptococcus viridochromogenes* (Wohlleben *et al.* 1988) isoliert und kodieren für eine Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT). Das Enzym verleiht eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Bialaphos, das von *S. hygroscopicus* produziert wird. In Bakterien und Pflanzen wird Bialaphos durch eine interzelluläre Peptidase zerlegt und dadurch die eigentlich aktive Substanz Phosphinotricin (PPT) freigesetzt, welche ein Substratanalog der L-Glutaminsäure ist. Es inhibiert die Glutaminsynthetase in Pflanzen und Bakterien, wodurch es zu einer schnellen Anreicherung von Ammonium und damit zum Zelltod kommt (Thompson *et al.* 1987). Gentransfer von einer Bakterienart zu einer anderen erscheint wahrscheinlicher als von einer Pflanze zu einem Bakterium, selbst wenn das Gen in *Streptomyces* auf der genomischen DNA lokalisiert ist (Murakami *et al.* 1986), und nicht wie das *nptII* Gen in *E. coli* auf einem Plasmid. Potentielle mikrobielle Rezipienten eines HGTs könnten in jenen Gebieten einen Selektionsvorteil haben, in denen PPT als Herbizid verwendet wird. Allerdings ist dieser Selektionsvorteil von kurzer Dauer, da PPT nur wenige Male pro Jahr appliziert und relativ schnell im Boden abgebaut wird (Broer und Pühler 1994).

Eine Alternative zu den erwähnten Markergenen sind **negative Selektionssysteme**, welche in Gegenwart des selektiven Agens eine Wachstumshemmung und damit schließlich den Tod der transgenen Organismen verursachen. Der Nachteil dieser Systeme ist, daß sie für die meisten Pflanzenarten nicht etabliert sind und daß nur ein Teil der transformierten Pflanzen die Selektion überlebt. Drei Beispiele für die negative Selektion sind in Harding (1995) beschrieben.

Die agrobakteriellen Gene **tms2** und **aux2** hemmen die Bildung des Wurzelsystems durch eine Überproduktion an Indoleessigsäure (IAA) und Naphthalinessigsäure, wenn das Selektionsmedium Indolacetamid oder Naphthalinacetamid enthält (Béclin *et al.* 1993).

Das **codA** Gen von *E. coli* kodiert für eine Cytosindeaminase. Diese wandelt das Selektionsmittel 5-Fluorocytosin in das stark toxische 5-Fluorouracil um, welches zum Tod der transformierten Pflanze führt (Stougaard 1993).

Die dissimilatorische **Nitratreduktase** ist in den meisten Pflanzen vorhanden und katalysiert die Umwandlung von Nitrat in Nitrit als dem ersten Schritt der Nitratassimilation. Durch Chlorat werden die Pflanzen in ihrem Wachstum gehemmt, indem wahrscheinlich die Nitratreduktase das Chlorat in toxischen Mengen zu Chlorit reduziert. Diese Chlorattoxizität ist nicht gegeben, wenn sich Ammonium anstelle von Nitrat im Nährmedium befindet, denn in Gegenwart von Ammonium wird die pflanzliche Nitratreduktase nur schwach exprimiert. Transgene Pflanzen, die eine bakterielle und damit kontinuierlich, d.h. auch in der Anwesenheit von Ammonium exprimierte Nitratreduktase als Selektionsmarker haben, werden somit auf einem Ammonium- und Chlorat haltigen Medium in ihrem Wachstum gehemmt (Nussaume *et al.* 1991).

Soweit möglich, wäre eine **Eliminierung der Markergene** nach der Selektion der transformierten Pflanzen anzustreben. Verschiedene Methoden werden hierzu in Yoder und Goldsbrough (1994) zusammenfassend dargestellt:

(1) Kotransformation und unabhängige Segregation des Markergens und des eigentlichen Transgens während nachfolgender Kreuzungen.

(2) Ortsspezifische Rekombination in Zweikomponenten-Systemen. Dieses System erfordert spezifische, sich wiederholende DNA Sequenzen, die das Markergen flankieren, sowie Enzyme, die in *trans* agieren und ein Ausschneiden des Markergens bewirken durch Rekombination zwischen den Sequenzwiederholungen. Vier Beispiele sind hierfür bekannt: (2.1) das *Saccharomyces cerevisiae* FLP-, (2.2) das Bacteriophagen P1 *Cre/lox*-, (2.3) das *Zygosaccharomyces rouxii* pSR1-, und (2.4) das Phagen Mu Gin Rekombinase System.

(3) Intragenomische Relokation des Transgens durch transponierbare Elemente und nachfolgende Auskreuzung. Am besten bekannt sind die Systeme *Ac/Ds* und *Spm/dSpm* des Mais.

Eine Entfernung der Markergene aus den transgenen Pflanzen ist jedoch nur dann gut möglich, wenn das Gen nur in wenigen, weit im Genom verstreuten Kopien vorliegt, da ansonsten pflanzeigene Sequenzen, die zwischen zwei benachbarten Markergenen liegen, herauskombiniert bzw. -geschnitten werden könnten.

Ein generelles Problem bei der Kotransformation ist, daß oftmals sowohl die eigentlichen Transgene als auch die Markergene am selben Ort ins Pflanzengenom integrieren (z.T. bis zu 78 %) und abhängig von der jeweiligen Transformationsmethode in mehreren Kopien vorliegen können. Eine Trennung der Trans- und Markergene ist folglich nur schwer zu erreichen. Bei den Rekombinations- und Relokationssystemen zur Markergeneliminierung können beim Vorliegen mehrerer Markergene nicht nur diese selbst, sondern auch die zwischen ihnen liegenden DNA Abschnitte durch Rekombinationsereignisse entfernt werden. Damit würden das Transgen oder pflanzeigene Gene verloren gehen. Da die Transformation vieler Kulturpflanzen (v.a. monokotyler Pflanzen) z.Z. jedoch noch recht uneffizient ist, ist vorerst nicht an einen Einsatz der zur Markergeneliminierung vorgeschlagenen Methoden zu denken, v.a. nicht unter dem Aspekt eines möglichen HGTs, der nur eine minimale Eintrittswahrscheinlichkeit hat.

6 Schlußfolgerungen

Die präsentierten und in Kapitel 2 zusammengefaßten Daten zeigen, daß HGT von Pflanzen zu Mikroorganismen gefolgt von einer stabilen Integration, Expression und Weitergabe des Transgens an die Nachkommenschaft als ein äußerst seltenes Ereignis angesehen werden kann. Es ist deshalb anzunehmen, daß Rezipienten, die einen Selektionsvorteil durch das Transgen erhalten, höchstens in evolutionären Zeiträumen entstehen. Darum ist es sinnvoll, eine Risikoanalyse in bezug auf die Umwelt nur für spezielle Transgene durchzuführen, die z.B. stark toxische Produkte bilden. Da HGT keine Besonderheit von Transgenen ist, sondern eine natürliche Eigenschaft der DNA und da die für die Produktion transgener Pflanzen verwendeten Gene entweder schon in Mikroorganismen vorkommen oder ansonsten während Hunderten von Millionen Jahren von Pflanzen auf Mikroorganismen hätten übertragen werden können, sollte von transgenen Pflanzen im allgemeinen kein neues Risiko ausgehen. Die Wahrscheinlichkeit der Rekombination und Genexpression könnte dagegen bei einer Verwendung mikrobieller Sequenzen leicht erhöht sein. Falls dieses als wichtig erachtet werden sollte, so könnte die Frequenz von Rekombination und Genexpression reduziert werden durch die Verwendung einer Art von idealisiertem Genkonstrukt, das eine oder mehr der folgenden Eigenschaften erfüllt: das Konstrukt ist begrenzt auf die Sequenzbereiche, die unabdingbar für die angestrebten Veränderungen sind; das Transgen ist pflanzlichen Ursprungs, natürlicherweise bereits in vielen Arten vorhanden und fusioniert mit einem pflanzenspezifischen, induzierbaren Promoter; es enthält Introns und kodiert falls möglich für ein Proprotein, welches erst durch spezifische Enzyme in das aktive Protein umgewandelt wird. Jedoch sind diese Kriterien nur von untergeordneter Bedeutung, da die experimentellen Daten (Kapitel 2) besagen, daß HGT von Pflanzen zu Mikroorganismen so selten ist, daß er mehr oder weniger irrelevant für jede realistische Risikobewertung bei der Freisetzung von transgenen Pflanzen ist.

Danksagung

Wir danken Johannes Fütterer für das Durchlesen des Manuskriptes.

7 Referenzen

J.A. Adamo, C.M. Stadnick und M.A. Gealt

A nematode model system for the study of gene transfer in soil organisms.

93rd general meeting of the American Society for Microbiology. May 16-20, 1993. Atlanta, Georgia, United States p. 164 (Q-214)

P. Ahl Goy, G. Warren, J. White, L. Privalle, P. Fearing und D. Vlachos

Interaction of an insect tolerant maize with organisms in the ecosystem.

In: Key biosafety aspects of genetically modified organisms. Workshop. April 10-11, 1995. Braunschweig *in press*

F. Assaad und E.R. Signer

Cauliflower mosaic virus P35S promoter activity in *E. coli*.

Molecular & General Genetics 223 (1990) p. 517-520

P.L. Atreya, C.D. Atreya und T.P. Pirone

Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88 (1991) p. 7887-7891

G. Bakkeren, Z. Koukoliková-Nicola, N. Girmsley und B. Hohn

Recovery of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA molecules from whole plants early after transfer.

Cell 57 (1989) p. 847-857

J. Becker, H. Siegert, J. Logemann und J. Schell

Begleitende Sicherheitsforschung zur Freisetzung gentechnisch veränderter Petunien.

In: Bundesministerium für Forschung und Technik (ed). Biologische Sicherheit. Forschung Biotechnologie. Band 3 (1994) p. 563-578

C. Béclin, F. Charlot, E. Botton, L. Jouanin und C. Doré

Potential use of the *aux2* gene from *Agrobacterium rhizogenes* as a conditional negative marker in transgenic cabbage.

Transgenic Research 2 (1993) p. 48-55

H. Bohlmann und K. Apel

Thionins.

Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42 (1991) p. 227-240

T. Boller

Ethylene and the regulation of antifungal hydrolases in plants.

Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology 5 (1988) p. 145-174

H. Borris und E. Libbert

Wörterbuch der Biologie. Pflanzenphysiologie.

Gustav Fischer Verlag (1985)

I. Broer und A. Pühler

Stabilität von HR-Genen in transgenen Pflanzen und ihr spontaner horizontaler Gentransfer auf andere Organismen.

In: W. van den Daele, A. Pühler und H. Sukopp (eds). Verfahren zur Technikfolgenabschätzung des Anbaus von Kulturpflanzen mit gentechnisch erzeugter Herbizidresistenz. Heft 3. FS II. Wissenschaftszentrum Berlin für Sozialforschung (WZB) (1994) p.94-303

I. Broer, W. Dröge-Laser, M. Gerke, I-M. Pretorius-Güth und A. Pühler

Horizontal gene transfer from transgenic plants to associated soil bacteria.

In: Horizontal gene transfer - mechanisms and implications. Workshop. July 25-27, 1994. Bielefeld

T. Bryngelsson, M. Gustafsson, B. Gréen und C. Lind

Uptake of host DNA by the parasitic fungus *Plasmodiophora brassicae*.

Physiological and Molecular Plant Pathology 33 (1988) p. 163-171

Calgene

***kan^r* gene: safety and use in the production of genetically engineered plants. Request for advisory opinion.**

Calgene Inc., CA, USA (1990)

T.A. Carlson und B.K. Chelm

Apparent eukaryotic origin of glutamine synthetase II from the bacterium *Bradyrhizobium japonicum*.

Nature 322 (1986) p. 568-570

B. Chamier, M.G. Lorenz und W. Wackernagel

Natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* by plasmid DNA adsorbed on sand and groundwater aquifer material.

Applied and Environmental Microbiology 59 (1993) p. 1662-1667

R.F. Doolittle, D.F. Feng, K.L. Anderson und M.R. Alberro

A naturally occurring horizontal gene transfer from a eukaryote to a prokaryote.

Journal of Molecular Evolution 31 (1990) p. 383-388

FAO

FAO yearbook. Production 1993. 47 (1994) p. 89-90

J.R.S. Fincham

Transformation in fungi.

Microbiological Reviews 53 (1989) p. 148-170

J.H. Fitch und R.N. Beachy

Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants.

Annual Review of Microbiology 47 (1993) p. 739-763

M.E. Frischer, G.J. Stewart und J.H. Paul

Plasmid transfer of indigenous marine bacterial populations by natural transformation.

FEMS Microbiology Ecology 15 (1994) p. 127-136

B.E. Froman, R.C. Tait und L.D. Gottlieb

Isolation and characterization of the phosphoglucose isomerase gene from *Escherichia coli*.

Molecular & General Genetics 217 (1989) p. 126-131

I.J. Furner, G.A. Huffman, R.M. Amasino, D.J. Garfinkel, M.P. Gordon und E.W. Nester

An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*.

Nature 319 (1986) p. 422-427

E. Gallori, M. Bazzicalupo, L.D. Canto, R. Fani, P. Nannipieri, C. Vettori und G. Stotzky

Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-steril soil.

FEMS Microbiology Ecology 15 (1994) p. 119-126

J Gorham

The stilbenoids.

Progress in Phytochemistry 6 (1980) p. 203-252

R. Hain, H.-J. Reif, E. Krause, R. Langebartels, H. Kindl, B. Vornam, W. Wiese, E. Schmelzer, P.H. Schreier, R.H. Stöcker und K. Stenzel

Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant.

Nature 361 (1993) p. 153-156

K. Harding

Biosafety of selectable marker genes.

AgBiotech News and Information 7 (1995) p. 47N-52N

J.H. Hart

Role of phytoalexins in decay and disease resistance.

Annual Review of Phytopathology 19 (1981) p. 437-458

R.B. Henschke und F.R.J. Schmidt

Survival, distribution and gene transfer of bacteria in a compact soil microcosm system.

Biology and Fertility of Soils 8 (1989) p. 19-24

H. Hirt, M. Kogl, T. Murbacher und E. Heberle-Bors

Evolutionary conservation of transcriptional machinery between yeast and plants as shown by the efficient expression from CaMV 35S promoter and 35S terminator.

Current Genetics 17 (1990) 473-479

T. Hoffmann, C. Golz und O. Schieder

Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants.

Current Genetics 27 (1994) p. 70-76

H. Höfte und H.R. Whiteley

Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*.

Microbiological Reviews 53 (1989) p. 242-255

R. Hull und J.W. Davies

Approaches to nonconventional control of plant virus diseases.

Critical Reviews in Plant Sciences 11 (1992) p. 17-33

Y. Inokuchi und A. Hirashima

Interference with viral infection by defective RNA replicase.

Journal of Virology 61 (1987) p. 3946-3949

E. Juni und G.A. Heym

Transformation assay for identification of psychrotrophic achromobacters.

Applied and Environmental Microbiology 40 (1980) p. 1106-1114

M. Khanna und G. Stotzky

Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA.

Applied and Environmental Microbiology 58 (1992) p. 1930-1939

M. Khanna, M. Roy und G. Stotzky

Adsorption of DNA from *Bacillus subtilis* on clay minerals and transformation in soil.

93rd general meeting of the American Society for Microbiology, May 16-20, 1993. Atlanta, Georgia, United States (1993) p. 377 (Q-172)

F.K. Khasanov, D.J. Zvingila, A.A. Zainullin, A.A. Prozorov und V.I. Bashkirov

Homologous recombination between plasmid and chromosomal DNA in *Bacillus subtilis* requires approximately 70 bp of homology.

Molecular & General Genetics 234 (1992) p. 494-497

C. Khosla und J.E. Bailey

The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*.

Molecular & General Genetics 214 (1988) p. 158-161

S.R. King und J.P. Richardson

Role of homology and pathway specificity for recombination between plasmids and bacteriophage λ .

Molecular & General Genetics 204 (1986) p. 141-147

M. Krzakowa

Peroxidases in genetic and taxonomic investigations.

In: J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel und T. Gaspar (eds). Biochemical, Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. University M. Curie-Sklodowska, Lublin, Poland and University of Geneva, Switzerland (1991) p.15-20

Y. Kumada, D.R. Benson, D. Hillemann, T.J. Hosted, D.A. Rochefort, C.J. Thompson, W. Wohlleben und Y. Tateno

Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (1993) p. 3009-3013

H. Lecoq, M. Ravelonandro, C. Wipf-Scheibl, M. Monsion, B. Raccah und J Dunez

Aphid transmission of a non-aphid-transmissible strain of zucchini yellow mosaic potyvirus from transgenic plants expressing the capsid protein of plum pox potyvirus.

Molecular Plant-Microbe Interactions 6 (1993) p. 403-406

L.M. Legrimini, S. Bradford und S. Rothstein

Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants.

The Plant Cell 2 (1990) p. 7-18

M. Longstaff, G. Brigneti, F. Boccoard, S. Chapman und D. Baulcombe

Extreme resistance to potato virus X infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase.

The EMBO Journal 12 (1993) p. 379-386

M.G. Lorenz und W. Wackernagel

Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment.

Microbiological Reviews 58 (1994), p. 563-602

M.G. Lorenz und W. Wackernagel

Stimulation of natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in extracts of various soils by nitrogen or phosphorus limitation and influence of temperature and pH.

Microbial Releases 1 (1992) p. 173-176

M.G. Lorenz und W. Wackernagel

Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-adsorbed DNA.

Archives of Microbiology 154 (1990) p. 380-385

M.G. Lorenz und W. Wackernagel

Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA.

Applied and Environmental Microbiology 53 (1987) p. 2948-2952

M.G. Lorenz, B.W. Aardema und W. Wackernagel

Highly efficient genetic transformation of *Bacillus subtilis* attached to sand grains.

Journal of General Microbiology 134 (1988) p. 107-112

M.G. Lorenz, D. Gerjets und W. Wackernagel

Release of transforming plasmid and chromosomal DNA from cultured soil bacteria.

Archives of Microbiology 156 (1991) p. 319-326

M.G. Lorenz, K. Reipschläger und W. Wackernagel

Plasmid transformation of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* in non-sterile soil extract and groundwater.

Archives of Microbiology 157 (1992) p. 355-360

M. Luckner

Secondary metabolism in microorganisms, plants, and animals.

Springer-Verlag Berlin (1990)

A. Matzk und J. Schiemann

Persistence of *Agrobacterium tumefaciens* in transgenic plants.

In: Horizontal gene transfer - mechanisms and implications. Workshop. July 25-27, 1994. Bielefeld

F.B. Metting Jr.

Structure and physiological ecology of soil microbial communities.

In: F.B. Metting Jr. (ed). Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management. Dekker, New York (1993) p. 3-25

J.A. Mulder und G. Venema

Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* mutants impaired in DNA entry.

Journal of Bacteriology 150 (1982) p. 260-268

T. Murakami, H. Anzai, S. Imai, A. Satoh, K. Nagaoka und C.J. Thompson

The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster.

Molecular & General Genetics 205 (1986) p. 42-50

J.P. Nap, J. Bijvoet und W.J. Stiekema

Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants.

Transgenic Research 1 (1992) p. 239-249

L. Nussaume, M. Vincentz und M. Caboche

Constitutive nitrate reductase: a dominant conditional marker for plant genetics.

The Plant Journal 1 (1991) p. 267-274

E. Paget und P. Simonet

On the track of natural transformation in soil.

FEMS Microbiology Ecology 15 (1994) p. 109-118

E. Paget und P. Simonet

Evidence of gene transfer in soil via transformation.

In: Commission of the European Communities (ed). BRIDGE/BIOTECH. Final sectorial meeting on biosafety and first sectorial meeting on microbial ecology. October 24-27,1993. Granada (1993) p. 32

E. Paget, L.J. Monrozier und P. Simonet

Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNase I and influence on gene transfer.

FEMS Microbiology Letters 97 (1992) p. 31-40

J.H. Paul, M.E. Frischer und J.M. Thurmond

Gene transfer in marine water column and sediment microcosms by natural plasmid transformation.

Applied and Environmental Microbiology 57 (1991) p. 1509-1515

J.H. Paul, J.M. Thurmond, M.E. Frischer und J.P. Cannon

Intergeneric natural plasmid transformation between *E. coli* and a marine *Vibrio* species.

Molecular Ecology 1 (1992) p. 37-46

K. Redenbaugh, T. Berner, D. Emlay, B. Frankos, W. Hiatt, C. Houck, M. Kramer, L. Malyj, B. Martineau, N. Rachman, L. Rudenko, R. Sanders, R. Sheehy und R. Wixtrom

Regulatory issues for commercialization of tomatoes with an antisense polygalacturonase gene.

In Vitro Cellular & Developmental Biology 29P (1993) p. 17-26

G. Romanowski, M.G. Lorenz und W. Wackernagel

Use of Polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils.

Applied and Environmental Microbiology 59 (1993a) p. 3438-3446

G. Romanowski, M.G. Lorenz und W. Wackernagel

Plasmid DNA in a groundwater aquifer microcosm - adsorption, DNase resistance and natural genetic transformation of *Bacillus subtilis*.

Molecular Ecology 2 (1993b) p. 171-181

G. Romanowski, M.G. Lorenz und W. Wackernagel

Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I.

Applied and Environmental Microbiology 57 (1991) p. 1057-1061

A. Schäfer, J. Kalinowski und A. Pühler

Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergeneric matings with *Escherichia coli* after stress induction.

Applied and Environmental Microbiology 60 (1994) p. 756-759

A. Schäfer, J. Kalinowski und A. Pühler

Analysis of the major restriction system of *Corynebacterium glutamicum* by conjugation with *E. coli*.

In: Horizontal gene transfer - mechanisms and implications. Workshop. July 25-27, 1994. Bielefeld

J. Schiemann, J. Landsmann, C.v. der Hoeven, A. Riedel-Preuss, R. Zweigerdt, A. Matzk, R.S. Conlau und H. Gunson

Extrachromosomale Fremd-DNA in transgenen Pflanzen - Untersuchungen zur Persistenz von Agrobakterien und zum Gentransfer in Endophyten.

In: Bundesministerium für Forschung und Technik (ed) Biologische Sicherheit . Forschung Biotechnologie. Band 3 (1994) p. 223-241

K. Schlüter, J. Fütterer und I. Potrykus

"Horizontal" gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs - if at all - at an extremely low frequency.

BioTechnology (1995) *in press*

P. Shen und H.V. Huang

Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology.

Genetics 112 (1986) p. 441-457

K. Smalla, F. Gebhard, J.D. van Elsas, A. Matzk und J. Schiemann

Bacterial communities influenced by transgenic plants.

In: D. D. Jones (ed). Proceedings of the 3rd international symposium on the biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms. November 13-16 1994. Monterey. p.157-167

M.W. Smith und R.F. Doolittle

Anomalous phylogeny involving the enzyme glucose-6-phosphate isomerase.

Journal of Molecular Evolution 34 (1992) p. 544-545

M.W. Smith, D-F. Feng und R.F. Doolittle

Evolution by acquisition: the case for horizontal gene transfers.

Trends in Biochemical Sciences 17 (1992) p. 489-493

G.J. Stewart und C.D. Sinigalliano

Detection of horizontal gene transfer by natural transformation in native and introduced species of bacteria in marine und synthetic sediments.

Applied and Environmental Microbiology 56 (1990) p. 1818-1824

F. Stirpe, L. Barbieri, M. G. Battelli, M. Soria und D. A. Lappi

Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects.

BioTechnology 10 (1992) p. 405-412

J. Stougaard

Substrate-dependent negative selection in plants using a bacterial cytosine deaminase gene.

The Plant Journal 3 (1993) p. 755-761

K. Struhl, D.T. Stinchcomb, S. Scherer und R.W. Davis

High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76 (1979) p. 1035-1039

M. Syvanen

Horizontal gene transfer: evidence and possible consequences.

Annual Review of Genetics 28 (1994) p. 237-261

H.W. Taber, J.P. Mueller, P.F. Miller und A.S. Arrow

Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics.

Microbiological Reviews 51 (1987) p. 439-457

C.C. Tebbe, W. Vahjen und H. Borkott

Interspecies gene transfer by "artificial" transformation of recombinant, broad host range plasmids in the gut of the soil insect *Folsomia candida*.

In: Horizontal gene transfer - mechanisms and implications. Workshop. July 25-27, 1994. Bielefeld

C.J. Thompson, N.R. Mowbray, R. Tizard, R. Cramer, J.E. Davies, M. Lauwereys und J. Botterman

Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*.

The EMBO Journal 6 (1987) p. 2519-2523

E. Truve, A. Aaspõllu, J. Honkanen, R. Puska, M. Mehto, A. Hassi, T.H. Teeri, M. Kelve, P. Seppänen und M. Saarma

Transgenic potato plants expressing mammalian 2'-5' oligoadenylate synthetase are protected from potato virus X infection under field conditions.

BioTechnology 11 (1993) p. 1048-1052

W. Wackernagel and M.G. Lorenz

DNA-Entlassung aus Bakterien, DNA-Übertragung und genetische Transformation im natürlichen Lebensraum.

In: Bundesministerium für Forschung und Technik (ed). Biologische Sicherheit. Forschung Biotechnologie. Band 3 (1994), p. 9-33

S. Wakabayashi, H. Matsubara und D.A. Webster

Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*.

Nature 322 (1986) p. 481-483

F.F. White, D.J. Garfinkel, G.A. Huffman, M.P. Gordon und E.W. Nester

Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genome of uninfected plants.

Nature 301 (1983) p. 348-350

W. Wohlleben, W. Arnold, I. Broer, D. Hillemann, E. Strauch und A. Pühler

Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*.

Gene 70 (1988) p. 25-37

C.P. Woloshuk, J.S. Meulenhoff, M. Sela-Buurlage, P.J.M. van den Elzen und B.J.C. Cornelissen

Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*

The Plant Cell 3 (1991) 619-628

J.I. Yoder und A.P. Goldsbrough

Transformation systems for generating marker-free transgenic plants.

BioTechnology 12 (1994) p. 263-267