

GENOMXPRESS

4.08

Unser dickes Erbe · Wichtiges Krankheitsgen für Sarkoidose entdeckt · Sequenziersysteme der neuen Generation · Renaissance der zellfreien Proteinbiosynthese · Lila Tomaten gegen Krebs · Chromosomale Bakterien-DNA im Pflanzengenom · Metagenomanalyse im Biogas-Reaktor · Einblicke in die Evolution des Parasitismus · Krankheitsresistenzen bei der Honigbiene · »Ecolicence to Kill« · Die Milch macht's



Fugapis – Funktionelle Genomanalyse auf Krankheitsresistenzen bei der Honigbiene
Seite 24

Foto: Helga R. Heilmann

Horizontaler Transfer von chromosomalen bakteriellen Genen aus Agrobakterien zu Pflanzen



Das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* ist in der Lage, seine sogenannte Transfer-DNA (T-DNA) in Pflanzenzellen zu übertragen.

Dieser seit etwa 27 Jahren bekannte Prozess erlaubt dem Agrobakterium, den Stoffwechsel der Pflanzenzellen so umzuprogrammieren, dass nur vom Bakterium selber verwendbare Nährstoffe produziert werden. Die T-DNA und Agrobakterien werden heute dazu verwendet, maßgeschneiderte DNA-Sequenzen in Pflanzengenome zu integrieren, um gezielt genetisch veränderte Pflanzen herzustellen. Üblicherweise sind die vom Bakterium übertragenen DNA-Bereiche auf dem Ti-Plasmid lokalisiert, welches einen vom Bakterien-Hauptgenom zu unterscheidenden, selbstreplizierenden Teil der DNA in den Bakterienzellen darstellt. Nun ist der Nachweis gelungen, dass in seltenen Fällen auch einige Gene aus dem Hauptgenom des Agrobakteriums in das Pflanzengenom übertragen werden, ohne dass diese Gene Bestandteil des Ti-Plasmids oder der T-DNA sind.

Gunnar Huep und Bernd Weisshaar

Agrobacterium tumefaciens – ein Pflanzenpathogen

Das unscheinbare Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* wurde bereits in der Mitte des vergangenen Jahrhunderts als Pflanzenpathogen erkannt. Es ist für die Bildung von Wurzelhals-Gallen, die tumorartigen Wucherungen gleichen, verantwortlich. In den frühen 1980er Jahren wurde der Mechanismus der Gallenbildung durch die Entdeckung der Transfer DNA (T-DNA) aufgeklärt. Mit Hilfe der T-DNA sind Agrobakterien in der Lage, den Stoffwechsel von Pflanzenzellen umzuprogrammieren. Die T-DNA wird in die Pflanzenzellen übertragen und in das pflanzliche Genom integriert. Die auf diese Weise genetisch veränderten Pflanzenzellen wachsen ungebremst und produzieren spezielle Nährstoffe, die nur Agrobakterien aufnehmen und verwenden können.

Das Genom von Agrobakterien besteht üblicherweise aus vier selbstreplizierenden Einheiten: einem linearen Chromosom, einem zirkulären Chromosom und zwei großen Plasmiden. Die Plasmide liegen in den Bakterien in Form von ringförmigen DNA-Molekülen vor. Die T-DNA ist der bakterielle DNA-Abschnitt, der



Abb. 1: Das Bild zeigt mit Kärtchen gekennzeichnete Ackerschmalwand-Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*), wie sie in großer Zahl in vielen Forschungslaboren auf der Welt in Wachstumskammern und Gewächshäusern angezogen werden.

in Pflanzenzellen transferiert wird und befindet sich auf dem Ti-Plasmid (Ti für Tumor induzierend). Neben der T-DNA, die natürlicherweise die Gene für die Tumorinduktion und die Umprogrammierung des Pflanzenstoffwechsels enthält, finden sich auf Ti-Plasmiden Gene, die für die Übertragung der DNA in die Pflanzenzellen sowie für die Integration der Fremd-DNA in das Genom der Pflanze benötigt werden. Der Mechanismus der Übertragung und der Integration der T-DNA aus den Bakterien in Pflanzen wird seit der Entdeckung der T-DNA intensiv untersucht. Neben einer Reihe von bakteriellen Enzymen sind auf der DNA zwei Sequenzen notwendig, die als "left border" (LB) and "right border" (RB) bezeichnet werden. Diese beiden etwa 25 Basenpaare langen Sequenzen begrenzen die T-DNA am linken und rechten Ende.

Agrobakterien als Werkzeuge der Molekularbiologen

Seit der Entdeckung, dass Agrobakterien DNA stabil in das Genom von Pflanzenzellen integrieren können, wird diese Fähigkeit in der Forschung als wichtiges molekulares Werkzeug verwendet. Hierbei wird ausgenutzt, dass die Sequenz der T-DNA zwischen LB und RB die Integrierbarkeit in das Pflanzengenom nicht beeinflusst. Aufgrund dieser Tatsache ist es möglich, die Sequenzabschnitte zwischen der LB- und RB-Sequenz, die für die Tumorinduktion und die Umprogrammierung des Pflanzenstoffwechsels verantwortlich sind, durch maßgeschneiderte andere Sequenzen zu ersetzen. Auf diese Weise abgewandelte T-DNAs können zusammen mit Ti-Plasmiden und Agrobakterien dazu verwendet werden, definierte Sequenzen und Gene in Pflanzengenome einzuschleusen. Der von den Agrobakterien ausgeführte Transformationsprozess ist eine der wesentlichen Komponenten bei der Produktion transgener Pflanzen. Die in das Pflanzengenom integrierte DNA kann dazu verwendet werden, die Eigenschaften der transgenen Pflanzen zielgerichtet zu verändern. Beispielsweise können Gene übertragen werden, die eine Resistenz gegen Schadinsekten bewirken. Andererseits können mit der eingeschleusten T-DNA auch Insertionsmutanten erzeugt werden, in denen einzelne Pflanzengene ausgeschaltet sind. Diese Insertionsmutanten sind wichtige Ressourcen für die Grundlagenforschung, weil sie es erlauben, die Funktion des ausgeschalteten Pflanzengens zu untersuchen. Derartige Experimente wer-

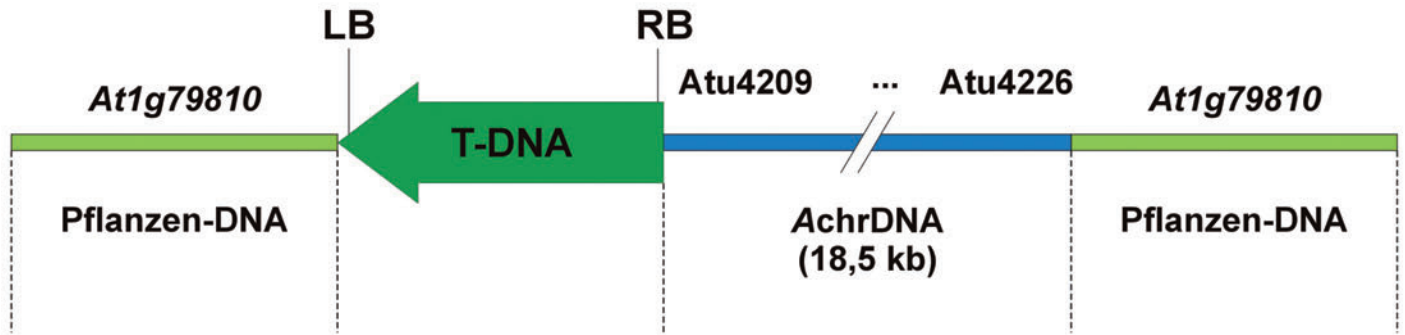


Abb. 2: Die Abbildung zeigt ein Beispiel einer T-DNA Insertionslinie von *A. thaliana* aus der GABI-Kat Population (<http://www.gabi-kat.de>) mit der Bezeichnung GK-086C02. Genauer dargestellt ist der Bereich des Pflanzengenoms, in dem eine Insertion chromosomaler Agrobakterien-DNA (AchrDNA) stattgefunden hat. Das pflanzliche Gen, in dem sich die Insertion befindet, ist mit At1g79810 bezeichnet. Die inserierte T-DNA ist mit „left border“ (LB) und „right border“ (RB) gekennzeichnet, das Fragment der AchrDNA ist blau hervorgehoben. Die AchrDNA umfasst die bakteriellen Gene Atu4209 bis Atu4226.

den häufig an Modellpflanzen, wie zum Beispiel der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*, Abb. 1), durchgeführt. An dieser einfachen Blütenpflanze wurden und werden mit T-DNA-Insertionsmutanten viele grundlegende biologische Prozesse erforscht.

Neben T-DNA übertragen Agrobakterien gelegentlich weitere DNA-Abschnitte

Die Integration von DNA aus Agrobakterien in Pflanzengenome erfordert normalerweise das Vorhandensein von LB- und RB-Sequenzen an den Grenzen der übertragenen DNA, wie es für den T-DNA-Bereich von Ti-Plasmiden der Fall ist. Gelegentlich werden aber neben der T-DNA auch Teile des Ti-Plasmids integriert, die außerhalb der LB- und RB-Bereiche liegen. Bei der Untersuchung von sehr vielen Ackerschmalwand-Pflanzen, die T-DNA-Insertionen in verschiedenen pflanzeigenen Genen aufweisen, hat sich nun herausgestellt, dass darüber hinaus in einigen Fällen auch Bereiche der bakteriellen Chromosomen übertragen werden können (Abb. 2). Derartige Fälle treten recht selten auf. Es wird geschätzt, dass etwa eine in 250 genetisch veränderten Ackerschmalwand-Pflanzen DNA aus Agrobakterien-Chromosomen (AchrDNA) enthält. Die AchrDNA-Abschnitte werden im Pflanzengenom transgener Pflanzen jeweils direkt benachbart zu der übertragenen T-DNA gefunden. Hierbei scheint die AchrDNA häufiger mit RB Bereichen als mit LB Bereichen der T-DNA assoziiert zu sein. Die chromosomalen Abschnitte können hierbei Größen von über 18 kb erreichen. Das heißt, dass mehrere bakterielle Gene komplett in das Pflanzengenom integriert werden können.

Der horizontale Gentransfer zwischen Agrobakterien und Pflanzen könnte einen wichtigen Motor für die Evolution darstellen

Die Erkenntnis, dass in etwa 0,4 % der von Agrobakterien transformierten Pflanzen die Übertragung von AchrDNA erwartet werden kann, und die Tatsache, dass diese DNA mehrere bakterielle Gene enthalten kann, weisen darauf hin, dass der natürliche Austausch von Genen zwischen Agrobakterien und Pflanzen häufiger ist als bisher angenommen. Bislang ist dieser Prozess lediglich unter Laborbedingungen beobachtet worden (Tab. 1), der Nachweis in der freien Natur steht noch aus. Es ist aber deut-

lich geworden, dass Agrobakterien mehr beherrschen als lediglich ihre T-DNA in pflanzliche Genome zu integrieren.

Die Übertragung der AchrDNA in das Pflanzengenom bewirkt in den individuellen transgenen Pflanzen vermutlich wenig. In der Regel fehlen die zur Ausprägung der bakteriellen Gene in den Pflanzenzellen notwendigen regulatorischen Sequenzen in der übertragenen DNA. Der Übertragungsprozess, der vermutlich auch in freier Natur seit Millionen von Jahren abläuft, könnte aber von Bedeutung im Zusammenhang mit evolutionären Vorgängen sein. Mit der Erkenntnis, dass Agrobakterien in der Lage sind, ihre chromosomale DNA in Pflanzengenome zu übertragen, ist nun ein Weg aufgezeigt worden, wie eine Neukombination der DNA aus verschiedenen Spezies in der Natur auch ausserhalb von Mitochondrien erfolgen könnte. Die Auswertung von pflanzlichen Genomsequenzen, die in den kommenden Jahren verfügbar werden, wird zeigen, ob sich Spuren solcher Übertragungen nachweisen lassen und wie häufig ein DNA-Austausch zwischen Organismen im Lauf der Evolution stattgefunden hat.

Bedeutung von Achr-DNA für die Bewertung transgener Pflanzen

Die seit längerem bekannte Möglichkeit der Übertragung von DNA-Bereichen von Ti-Plasmiden, die außerhalb der LB- und RB-Bereichen liegen, wurde bei der Beurteilung künstlich hergestellter transgener Pflanzen schon berücksichtigt. Diese Plasmid-Sequenzen könnten die Wahrscheinlichkeit der unerwünschten Übertragung von Antibiotikaresistenzen in Pflanzengenome erhöhen. In diesem Zusammenhang erscheint die nun entdeckte Möglichkeit der Übertragung chromosomaler DNA von Agrobakterien in Pflanzengenome zunächst bedenklich. Bei genauerer Betrachtung erweist sich aber, dass die Wahrscheinlichkeit, dass zugelassene transgene Nutzpflanzen AchrDNA in ihren Genomen tragen, die im Zuge des Transformationsprozesses eingetragen wurde, als sehr gering einzustufen ist. Genetisch modifizierte Nutzpflanzen werden routinemäßig genau analysiert, um die Insertionsstelle der T-DNA innerhalb der pflanzlichen DNA und die übertragene DNA selbst sehr genau zu charakterisieren. Unerwünschte Insertionsereignisse werden bei diesen Untersuchungen aussortiert. Zusätzlich werden im nachfolgenden Züchtungsprozess die Pflanzen so oft gekreuzt, dass eventuell auftretende unerwünschte Änderungen an anderen Stellen im Genom

| GABI-Kat FST (GenBank Acc No) | Insertionsposition im linearem <i>A. tumefaciens</i> Chromosom (bp) | Gen-ID des direkt mit der T-DNA assoziierten <i>A. tumefaciens</i> Gens | Annotation des <i>A. tumefaciens</i> Gens |
|----------------------------------|--|---|--|
| CU462808 | 940354 | Atu3846 / Atu3847 | Hypothetisches Protein |
| AL952899 | 1042731 | Atu3937 | SSU 16S rRNA |
| CU462788 | 1089184 | Atu3977 | „Ice nucleation protein“ Homolog |
| BX285569 | 1309526 | Atu4184 / Atu4185 | SSU 23S rRNA und hypothetisches Protein |
| AL771291 | | | |
| CU462780 | 1333053 | Atu4209 | ABC-Transporter, Zucker |
| CU462787 | 1333031 | | |
| CU462792 | 1333034 | | |
| CU462794 | 1333078 | | |
| CU462800 | 1333185 | | |
| CU462779 | 1341809 | Atu4219 | Kationen-Effluxsystem Protein |
| BX652122 | 1342486 | | |
| CU462802 | 1341142 | | |
| CU462809 | 1350301 | Atu4225 | Transkriptionsregulator, AraC Familie |
| CU462799 | 1364015 | Atu4239 | Flavoprotein Oxidoreduktase |
| CU462811 | 1372909 | Atu4248 | Hypothetisches Protein |
| AL771424 | 1380524 | Atu4255 | Hypothetisches Protein |
| CU462785 | 1380681 | | |
| AL769139 | 1388778 | Atu4262 | ABC-Transporter, Substrat bindendes Protein |
| AL767046 | 1394146 | Atu4268 | RhtB Familie Transporter |
| CU462789 | 1428255 | Atu4304 | Hypothetisches Protein |
| CU462810 | 1470193 | Atu4337 | Hypothetisches Protein |
| CU462795 | 1485197 | Atu4350 | Hypothetisches Protein |
| CU462813 | 1485081 | | |
| CU462778 | 1496010 | Atu4359 | ABC-Transporter, Transmembranprotein, Zucker |
| CU462797 | 1748137 | Atu4601 | IS426 Transposase |
| CU462786 | 1748300 | | |
| CU462783 | 1748540 | | |
| CU462798 | 1748137 | | |
| AL766427 | 1748549 | | |

In der Tabelle sind weitere Sequenzdaten aus der GABI-Kat Population aufgeführt, die auf AchrDNA-Fragmente in weiteren Linien hindeuten. Die erste Spalte nennt die GenBank-ID derjenigen "flanking sequence tags" (FSTs), die Sequenzähnlichkeit mit dem linearen *A. tumefaciens* Chromosom aufweisen. Die jeweilige Bezeichnung und angenommene Funktion der mit der T-DNA assoziierten bakteriellen Gene sind angegeben. Das Gen im AchrDNA-Bereich, das die T-DNA in der Linie 086C02 flankiert und der entsprechende GABI-Kat FST sind fett markiert.

eliminiert werden. Die theoretische Möglichkeit eines Gentransfers von Bakterien in transgene Pflanzen mindert den Nutzen der Anwendung von Agrobakterien in Forschung und Entwicklung nicht. Die Resultate helfen aber, auch seltene Ereignisse, die bei der Erzeugung transgener Pflanzen auftreten können, besser zu verstehen.

Literatur

- Zambryski P, Holsters M, Kruger K, Depicker A, Schell J, Van Montagu M, Goodman HM (1980) Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*. *Science* 209:1385-1391.
- Chilton MD, Saiki RK, Yadav N, Gordon MP, Quetier F (1980) T-DNA from *Agrobacterium Ti*-Plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *PNAS* 77:4060-4064.

- Kononov ME, Bassuner B, Gelvin SB (1997) Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J.* 11:945-957.
- Richardson AO and JD (2007) Horizontal gene transfer in plants. *J. exp. Botany* 58:1-9.
- Uelker B, Li Y, Rosso MG, Logemann E, Somssich IE, Weisshaar B (2008) T-DNA-mediated transfer of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal DNA into plants. *Nature Biotech.* 26:1015-1017.
- Gelvin SB (2008) *Agrobacterium*-mediated DNA transfer, and then some. *Nature Biotech.* 26:1015-1017.

Kontakt

Prof. Dr. Bernd Weisshaar
Lehrstuhl für Genomforschung
CeBiTec, Universität Bielefeld
E-Mail: genomforschung@uni-bielefeld.de