

P. Brandt · Robert Koch-Institut, Berlin

# Die neue Generation von Marker-Genen zum frühen Erkennen von gentechnisch veränderten Pflanzen

## Zusammenfassung

Während der letzten zehn Jahre wurden Verfahren zur Eliminierung der Marker-Gene nach der Identifizierung der gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP) entwickelt (z. B. Eliminierung der Marker-Gene durch Transposasen oder durch Sequenz-spezifische Rekombinasen; Co-Transformation zweier T-DNAs in Verbindung mit der Segregation der Transgene in der Folgegeneration). Außerdem wurde versucht, an Stelle der Antibiotika-Resistenzgene andere Marker-Gene für die Identifizierung der GVP einzusetzen („Positive Selektion“ mit Glucuronoiden, Xylose oder Mannose). Dies war notwendig, um das begrenzte Spektrum verfügbarer Marker-Systeme zu erweitern und nach der ersten Transformation Marker-Gen-freie GVP zu erhalten, die unter Verwendung der bereits zuvor benutzten Marker-Systeme mit weiteren Zielgenen erneut transformiert werden können.

## Schlüsselwörter

Gentechnisch veränderte Pflanze · Marker-Gen · Eliminierung von Marker-Genen · Co-Transformation · Rekombinase · Transposase · Mannose · Positive Selektion

In den letzten zehn Jahren sind eine Reihe von Transformationsverfahren – wie z. B. die Transformation mit Hilfe der *Agrobacterium*-Infektion oder durch Beschuss mit der „Particle Gun“ – zum Einbringen von DNA-Konstrukten in das pflanzliche Genom entwickelt und optimiert worden [1], die bei einer Vielzahl von Pflanzenspezies erfolgreich verwendet werden können. Allerdings benötigt man aufgrund der begrenzten Effizienz dieser Transformationsverfahren zur Erzeugung gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP) einen experimentellen Zugang, um frühzeitig (d. h. noch vor der Regeneration vollständiger Pflanzen aus einzelnen Zellen) die transformierten aus der Menge der nicht transformierten Pflanzenzellen selektieren zu können. Der bewährten mikrobiologischen Praxis folgend wurden die DNA-Konstrukte, die in die Empfängerpflanzen übertragen werden sollten, in der Regel zusätzlich mit Antibiotika-Resistenzgenen (z. B. *nptII* oder *hph*) gekoppelt, um jeweils nach Teilschritten des Transformationsverfahrens diejenigen Zellen identifizieren zu können, in deren Genom das DNA-Konstrukt inseriert worden war [1].

War das Vorhandensein dieser Antibiotika-Resistenzgene in den GVP für ihre weiteren Untersuchungen in Klimakammern oder Gewächshäusern zunächst noch ohne wesentliche Bedeutung, so wurde jedoch ihre Anwesenheit im Genom von GVP, die für Freilandversuche oder insbesondere für das Inverkehrbringen vorgesehen waren, in den

letzten Jahren als unnötig oder gar als unerwünscht angesehen. Die Behauptungen kritischer Gruppen gingen soweit anzunehmen, dass die Antibiotika-Resistenzgene aus den GVP auf Mikroorganismen übertragen und auf diese Weise die Zahl Antibiotika-resistenter pathogener Organismen erhöht werden könnte oder dass Kreuzungspartner der GVP die zusätzliche genetische Information via Pollen erhalten und zu „Unkrautpflanzen“ werden könnten [2, 3]. Zur Klärung auf der Grundlage wissenschaftlicher Fakten hat die „Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit“ (ZKBS) 1999 in einer allgemeinen Stellungnahme eine Bewertung der biologischen Sicherheit der als Marker-Gene verwendeten Antibiotika-Resistenzgene wie auch anderer Antibiotika-Resistenzgene vorgenommen, welche in Folge des Transformationsvorganges außerdem in das pflanzliche Genom gelangen können [4]. Darin bringt die ZKBS ihre grundsätzliche Auffassung zum Ausdruck, dass künftig bei der Entwicklung von GVP, die in Verkehr gebracht werden sollen, „die eingeführten heterologen Gene zu beschränken sind auf diejenigen Gene, welche für die angestrebte Veränderung funktionell als Ziel- oder Marker-Gene erforderlich sind.“ Die ZKBS betont, dass „die zukünftige Entwicklung in den Verkehr zu bringender gentechnisch veränderter Pflanzen, die für die

---

Prof. Dr. Peter Brandt  
Zentrum Gentechnologie,  
Robert Koch-Institut, Nordufer 20, 13352 Berlin

P.Brandt

## The New Generation of Marker-Genes for the Early Identification of Genetically Modified Plants

### Abstract

During the last ten years efforts were made to develop strategies for the elimination of marker genes after selection of genetically modified plants (GMP) (for example elimination of marker genes by transposases or by site-specific recombinases; cotransformation of two T-DNAs combined with segregation of the transgenes in the progeny) and to replace antibiotic resistance genes for the identification of GMP by a set of other marker genes ("positive selection" with glucuronoides, xylose or mannose). These efforts were necessary to broaden the limited spectrum of marker strategies as well as to obtain GMP devoid of marker genes for conducting further rounds of transformation.

### Keywords

Genetically modified plant · Marker gene · Elimination of marker genes · Cotransformation · Recombinase · Transposase · Mannose · Positive selection

Herstellung von Lebens- oder Futtermitteln Verwendung finden sollen, darauf abzielen muss, Gene, die Resistenzen gegen therapeutisch bedeutende Antibiotikaklassen<sup>1</sup> bewirken, zu vermeiden.“ In analoger Weise ('clinical use') zielt die Direktive 2001/18/EC (2001) darauf ab, in GVP den Gebrauch von Antibiotika-Resistenzgenen mit möglichen schädlichen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt auszuschließen; als Ausschlussfrist ist im Falle von GVP, die für das Inverkehrbringen vorgesehen sind, das Jahr 2004 und im Fall von GVP, die für Freilandexperimente vorgesehen sind, das Jahr 2008 festgesetzt [5].

### „Anstelle von Antibiotika-Resistenzgenen werden vermehrt andere Marker-Gene für die Identifizierung von gentechnisch veränderten Pflanzen eingesetzt.“

Unabhängig von den Erwägungen zur biologischen Sicherheit der Antibiotika-Resistenzgene in GVP oder von der Akzeptanz von solchen GVP sind in den letzten Jahren die experimentellen Bemühungen verstärkt worden, sowohl das Spektrum der verfügbaren Marker-Gene über den Bereich der Antibiotika-Resistenzgene hinaus zu erweitern als auch Verfahren zu etablieren, die während des Transformationsverfahrens in das pflanzliche Genom inserierten Marker-Gene nach der Identifizierung der erfolgreich transformierten Pflanzenzellen wieder aus diesen zu eliminieren. Notwendig war diese Entwicklung neuer Methoden einerseits, da die verfügbaren Marker-Gene nicht für alle Pflanzenspezies in gleicher Weise geeignet sind<sup>2</sup>, und andererseits, um

- (a) in bereits transformierten Pflanzenzellen unter erneutem Einsatz der zuvor schon benutzten Marker-Gene weitere DNA-Konstrukte kontrolliert einbringen zu können und
- (b) die Möglichkeit zu minimieren, dass die Expression des eingebrachten Gens der ersten Transformation unterbleibt (transkriptionelles Gen-Silencing) [7, 8, 9].

### Positive Selektion von transgenen Pflanzen(zellen)

Die Nachweiseffizienz der zunächst verwendeten Selektionssysteme – vor allem des *nptII* als Marker-Gen – (Tabelle 1; Punkt a und b) lag bei vielen Pflanzenspezies bei 1:10.000 bis 1:100.000. Im Gegensatz zu diesen herkömmlichen Selektionssystemen, die auf der durch die Resistenz- bzw. Toleranzgene vermittelten Überlebensfähigkeit der GVP unter Selektionsbedingungen beruhen, erbrachten neu entwickelte Selektionsverfahren auch höhere Nachweishäufigkeiten. Bei diesen Verfahren eröffneten die zu Selektionszwecken übertragenen neuen Eigenschaften den GVP die Option der Regeneration und des Wachstums („Positive Selektion“) und auch höhere Nachweishäufigkeiten. Bereits die Verwendung des Gens für die  $\beta$ -Glucuronidase als Marker-Gen und Glucuronid-Derivate des Cytokinin als Selektionssubstrat steigerte bei transgenen Tabakpflanzen deren Nachweiseffizienz um das Dreifache im Vergleich zum *nptII* als Marker-Gen [20]. Bei Verwendung des Phosphomannose-Isomerase-Gens aus *E. coli* [21, 22, 23, 24] oder des Xylose-Isomerase-Gens aus *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* [25] konnte die Nachweiseffizienz im Vergleich zum *nptII* als Marker-Gen auf das Zehnfache gesteigert werden. In nicht transformierten Pflanzen(zellen) wird Mannose in der Hexokinase-Reaktion zu Mannose-6-phosphat phosphoryliert und in den Zellen akkumuliert, da es nicht weiter metabolisiert werden kann (Abb. 1). Mannose-6-phosphat inhibiert die Phosphoglucose-Isomerase und damit die Glykolyse [29]; außerdem kommt es durch die Anhäufung von Mannose-6-phosphat und damit der Verarmung der nicht transformierten Pflanzenzellen an Phosphat und ATP zum Wachstumsstillstand [30]. Transgene Pflanzenzellen, die

<sup>1</sup> Die ZKBS zählt z. B. *nptII*, *hph* oder *cm<sup>R</sup>*, die häufig bei der Transformation von Pflanzen als Marker-Gen verwendet werden, nicht zu den Genen, die wegen der therapeutischen Bedeutung der komplementären Antibiotika als Markergene in Pflanzen nicht verwendet werden sollten [4].

<sup>2</sup> Zum Beispiel ist das *nptII* als Selektionsmarker für die Transformation von *Solanaceae* sehr gut, für die von *Fabaceae* dagegen aufgrund ihrer Unverträglichkeit für Neomycin-haltige Nährböden wenig geeignet [6].

Tabelle 1

Beispiele für Marker-Gene zur Selektion von gentechnisch veränderten Pflanzen

Marker-Gen	Gen-Produkt	Herkunft	Selektion durch	Referenz
<b>a) Antibiotika-Resistenzgene:</b>				
<i>nptII</i>	Neomycinphosphotransferase	Tn5	Kanamycin, Paromomycin, Neomycin	[3, 10]
<i>hph</i>	Hygromycinphosphotransferase	<i>E. coli</i>	Hygromycin	[11, 12]
<i>aadA</i>	Streptomycinphosphotransferase	Plasmid R538-1	Streptomycin	[13, 14]
<b>b) Herbizit-Toleranzgene:</b>				
<i>bar</i>	Phosphinothricinacetyltransferase	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Phosphinothricin, Bioalaphos	[15, 16]
EPSPS	5-enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthase	<i>Petunia hybrida</i>	Glyphosat	[17]
<i>csr1-l</i>	Acetolactatsynthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sulfonylharnstoff-Herbizide	[18]
<i>bxn</i>	Bromoxynil-Nitrilase	<i>Klebsiella ozaenae</i>	Bromoxynil	[19]
<b>c) „Positive Selektion“:</b>				
<i>uidA</i>	Glucuronidase	<i>E. coli</i>	Benzyladenin-N-3-glucuronide	[20]
<i>pmi:manA</i>	Phosphomannose-Isomerase	<i>E. coli</i>	Mannose	[21, 22, 23, 24]
<i>xi</i>	Xylose-Isomerase	<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes</i>	D-Xylose	[25, 26]
<i>ipt</i>	Isopentenyltransferase	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Dexamethason	[27, 28]

dagegen das Phosphoisomerase-Gen enthalten, können Mannose als Kohlenstoffquelle (C-Quelle) nutzen und über die Glykolyse verwerten (Abb. 1); sie haben durch die eingebrachte Phosphomannose-Isomerase einen Wachstumsvorteil bei alleiniger Anwesenheit von Mannose als C-Quelle („Positive Selektion“). Wie Mannose kann auch Xylose von vielen Pflanzenspezies nicht metabolisiert werden. Durch Transformation mit dem Xylose-Isomerase-Gen werden sie befähigt, Xylose in Xylulose umzuwandeln, die in den Pentosephosphat-Stoffwechselweg eingespeist wird. Für nicht derartig transformierte Pflanzenzellen kommt es bei Anwesenheit von Xylose als alleiniger C-Quelle zur Hemmung von Wachstum und Entwicklung.

Auf der direkten Beeinflussung der pflanzlichen Entwicklung basiert die Wirkung eines Marker-Systems mit *ipt* aus der T-DNA (T-DNA: 30-kb-Segment aus dem Ti-Plasmid) von *Agrobacterium tumefaciens*; die durch das *ipt*-Gen kodierte Isopentenyltransferase bewirkt die Bildung von Isopentenyl-adenosin-5-monophosphat, dem ersten Zwischenprodukt der Cytokinin-Biosynthese. Mit dem *ipt*-Gen transformierte Pflanzen zeigen Zwergwuchs, abnorme Blattentwicklung und verzögerte Blattseneszenz. Wird *ipt* mit vorgeschaltetem 35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus in ein Aktivator-Element (AC-Element) aus *Zea mays* inseriert und dieses DNA-

Konstrukt zusammen mit dem Zielgen auf derselben T-DNA zur Transformation verwendet, so zeigen die aus den transformierten Pflanzenzellen das oben genannte veränderte morphologische Erscheinungsbild. Im weiteren Entwicklungsverlauf dieser Transformanten unterbleibt gelegentlich (in 0,5 bis 1% der Fälle) nach der Ausgliederung des AC-Elementes aus seiner Insertionsstelle die Reintegration in das pflanzliche Genom; phänotypisch entwickelt sich dann ein transgener Seiten-

spross mit normalem Habitus aus den transgenen, zwergwüchsigen Sprossen [27]. Aus dem Pflanzenmaterial derartiger transgener, aber normalwüchsiger Seitensprosse können GVP regeneriert werden, die nur noch das gewünschte Zielgen enthalten. Wird dem *ipt* – ohne Integration in ein AC-Element – ein durch Dexamethason induzierbarer Promotor vorangesetzt, so kann die Regeneration von GVP aus transgenen Zellen experimentell gesteuert werden [28].

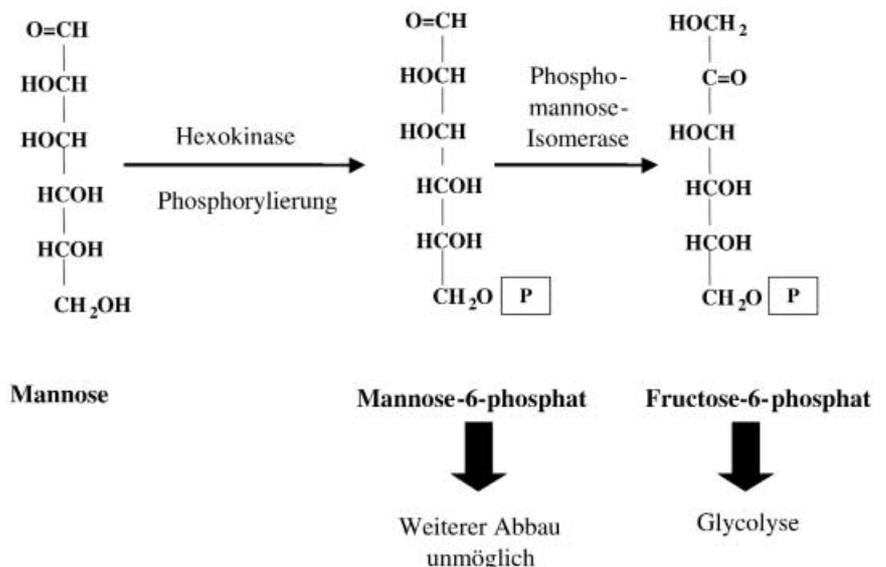


Abb. 1 ▲ Metabolisierung von Mannose in gentechnisch veränderten Pflanzen, die das Phosphomannose-Isomerase-Gen als Marker-Gen enthalten (Erläuterungen im Text)

Tabelle 2

## Beispiele für Verfahren zur Gewinnung von Marker-Gen-freien, gentechnisch veränderten Pflanzen

Konstrukte	Herkunft	GVP	Referenz
<b>a) Eliminierung von Marker-Genen durch Sequenz-spezifische Rekombinase</b>			
<i>cre/loxP</i> -System	Bakteriophage P1 von <i>E. coli</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	[32] [35] [34]
FLP/FRT-System	2 $\mu$ Plasmid aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	[36]
R-RS-System	Plasmid pSR1 aus <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	[37, 38]
<b>b) Eliminierung von Marker-Genen durch Transposase</b>			
<i>ipt</i> inseriert in AC-Element	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Zea mays</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Populus tremula</i>	[27]
<b>c) Eliminierung von Marker-Genen durch Co-Transformation</b>			
Vektor mit 2 T-DNA-Bereichen		<i>Oryza sativa</i> , <i>Nicotiana tabacum</i>	[39]
Vektor mit DRB-T-DNA		<i>Oryza sativa</i>	[40]

## Marker-freie transgene Pflanzen(zellen)

Eine Steigerung der Anzahl von GVP, die nur noch das gewünschte Zielgen, nicht aber das Marker-Gen in ihrem Genom enthalten, wird dadurch erreicht, dass an Stelle des Transposon (siehe oben) eine Sequenz-spezifische Rekombinase verwendet wird und das zu eliminierende Marker-Gen von dessen Erkennungssequenzen (target sequences) flankiert wird (z. B. [31]; Tabelle 2). Gleave et al. [32] gewannen Marker-Gen-freie GVP durch zwei aufeinander folgende Transformationsschritte. Im DNA-Konstrukt für den ersten Transformationsvorgang waren die Marker-Gene *nptII* und *codA*<sup>3</sup> durch *loxP*-Sequenzen flankiert (Abb. 2, A). Der zweite Transformationsvorgang erfolgt mit einem DNA-Konstrukt aus *cre* (Rekombinase-Gen) und *hpt* (Abb. 2, B). Er wird experimentell so gestaltet, dass es nur zur transienten Expression der *cre*-Rekombinase kommt, d. h. in einer begrenzten Zeitspanne nach dem Start des Transformationsversuches kann die Rekombinase die *loxP*-Sequenzen bereits erkennen und den zwischen ihnen liegenden DNA-Abschnitt eliminieren, ohne dass es zur Insertion des *cre*-enthaltenden DNA-Konstruktes in

das pflanzliche Genom kommt. Diese Eliminierung von Marker-Genen durch eine Rekombinase ist in einer Reihe weiterer ähnlicher Systeme verwirklicht worden (Tabelle 2).

Es sind außerdem Verfahren mit besonders strukturierten Vektoren entwickelt worden (Tabelle 2), um die Marker-Gene wieder aus dem pflanzlichen Genom zu eliminieren, nachdem sie ihre Funktion, die erfolgreich transformierten Pflanzenzellen kenntlich zu machen, erfüllt haben.

Als Beispiele seien genannt:

- Das „Co-Transformationsverfahren“ mit Vektoren, die zwei separate T-DNA-Abschnitte enthalten, ermöglicht nach erfolgreicher Transformation eine Segregation der Transgene in der Folgegeneration und damit die Erzielung Marker-Gen-freier GVP [39].

- Es wurden Vektoren mit T-DNA-Abschnitten entwickelt, die z. B. das Marker-Gen *hph* zwischen zwei rechten Bordersequenzen (RB) gefolgt von dem „Ziel-Gen“ (*bar*) zwischen der zweiten rechten Bordersequenz und einer linken Bordersequenz (LB) enthalten (Abb. 3) [40]. Diese Art von DNA-Konstrukten mit zweifacher rechter Bordersequenz als „Startpunkte“ für Inserts lassen erwarten, dass drei verschiedene Typen von Inserts bei der *Agrobacterium*-Infektion in die pflanzlichen Zellen gelangen und dort in das Genom integriert werden: (a) das Insert, beginnend am RB<sub>2</sub>, enthält nur das Zielgen (Herbizidtoleranz gegen Basta), (b) das Insert, beginnend am RB<sub>1</sub>, enthält das Marker-Gen (Antibiotikaresistenz gegen Hygromycin) und das Zielgen (Herbizidtoleranz gegen Basta) und (c) das Insert, beginnend

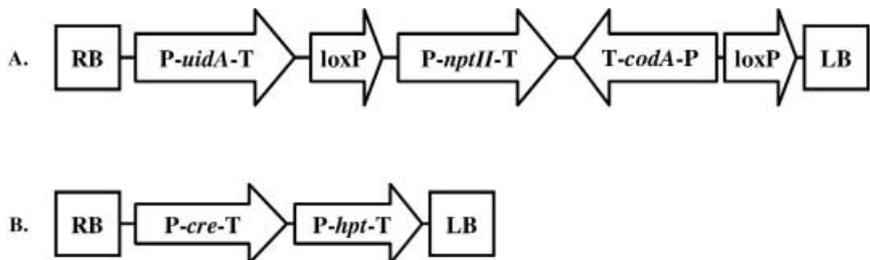


Abb. 2 ▲ Beispiel für die Abfolge der DNA-Abschnitte zwischen der rechten (RB) und der linken (LB) Bordersequenz auf Ti-Plasmiden zur Erzeugung Marker-Gen-freier GVP (verändert nach [32]). Das DNA-Konstrukt unter A dient als Insert für den ersten Transformationsvorgang und wird in das pflanzliche Genom inseriert; das DNA-Konstrukt unter B wird nach Einschleusung in die pflanzliche Zelle transient exprimiert. *P* Promotor, *T* Terminator, *uidA* Glucuronidase-Gen, *nptII* und *hpt* Antibiotikaresistenzgene; *codA* Cytosindeaminase-Gen, *cre* Rekombinase-Gen, *loxP* Erkennungssequenz für Rekombinase (Erläuterungen im Text)

<sup>3</sup> *codA* codiert für eine Cytoindeaminase, die 5-Fluorocytosin in toxisches 5-Fluorouracil umwandelt. 5-Fluorouracil ist eine Vorstufe des 5-Fluoro-dUMP, durch das die Thymidylat-synthase irreversibel gehemmt und schließlich die DNA-Synthese aufgrund der Verarmung an dTTP eingestellt wird [33].

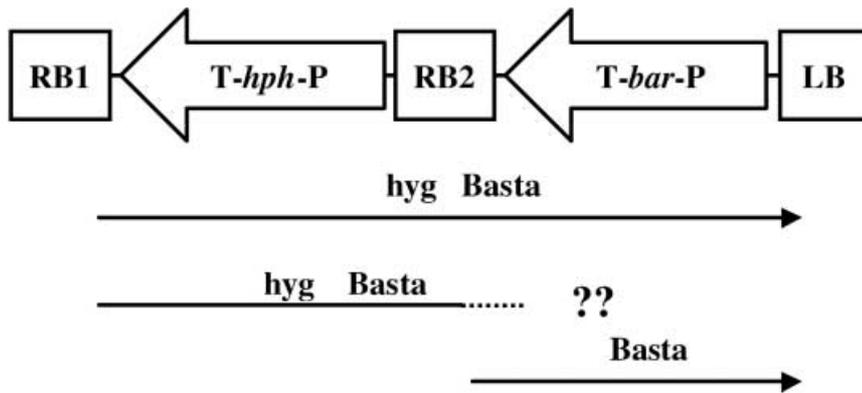


Abb.3 ▲ Beispiel für die Abfolge der DNA-Abschnitte in einer T-DNA mit zwei rechten Bordersequenzen (RB1, RB2) und einer linken Bordersequenz (LB), dem Marker-Gen *hph* und dem Zielgen *bar* sowie den bei der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation zu erwartenden drei Insert-Typen im pflanzlichen Genom (verändert nach 34). *P* Promotor, *T* Terminator, *hph* Hygromycin-Resistenzgen, *bar* Phosphinothricin-Toleranzgen (Erläuterungen im Text)

am RB1, enthält das Marker-Gen (Antibiotikaresistenz gegen Hygromycin) und möglicherweise Teile des Zielgens (Herbizidtoleranz gegen Basta). Markergen-freie GVP erhält man in der Folgegeneration nach Segregation der verschiedenen Insert-Typen.

### Ausblick

Bei der weiteren Entwicklung von Methoden zur Selektion von gentechnisch veränderten Pflanzen(zellen) ist davon auszugehen, dass es generell Ziel sein wird, die inserierten DNA-Konstrukte auf die erwünschten Zielgene zu beschränken und sich damit auch Optionen auf weitere Transformationen dieser GVP offen zu halten. Im Ergebnis werden damit die experimentellen Bemühungen bei der Beschränkung auf die wesentlichen Zielgene in den Inserts übereinstimmen mit den aus Sicherheitserwägungen erhobenen Forderungen z. B. der ACNFP (Advisory Committee on Novel Foods and Processes) nach Eliminierung der Marker-Gene, insbesondere der Antibiotika-Resistenzgene [41], obwohl diese pauschale Forderung im Einzelfall auch ganz anders bewertet worden ist [4, 42].

Es sollte daher beachtet werden, dass die Möglichkeit einer zukünftigen Entwicklung von Marker-Gen-freien GVP nicht die Kriterien der Bewertung der biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen als Marker-Gene verändert [4]. Da z. B. *nptII*, *hph* und *cm<sup>R</sup>* in Boden- und Enterobakterien

weit verbreitet sind und deren relevante Antibiotika daher eine begrenzte therapeutische Bedeutung in der Human- bzw. Veterinärmedizin besitzen, geht die ZKBS davon aus, „dass – wenn überhaupt – das Vorhandensein dieser Antibiotika-Resistenzgene im Genom transgener Pflanzen keine Auswirkung auf die Verbreitung dieser Antibiotika-Resistenzgene in der Umwelt hat“ [4].

### Literatur

1. Brandt P (1995) Transgene Pflanzen. Herstellung, Anwendung, Risiken und Richtlinien. Birkhäuser, Basel, S 306
2. Dale PJ (1992) Spread of enigeered genes to wild relatives. *Plant Physiol* 100:13–15
3. Nap JP, Bijvoet J, Stiekema WJ (1992) Biosafety of kanamycin resistant plants: an overview. *Transgenic Res* 1:239–249
4. ZKBS (1999) Stellungnahme der ZKBS zur „Biologische Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen“ In: Eberbach W, Lange P, Ronellenfisch M (Hrsg) *Recht der Gentechnik und Biomedizin, GenTR/BioMedR*. C.F. Müller, Band 2, G. ZKBS-Empfehlungen, S 8
5. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council on the Deliberate Release into the Environment of Genetically Modified Organisms and Repealing Council Directive 90/220/EC (2001) <http://www.rki.de/GENTEC/GESETZ/GESETZ.HTM>
6. Schroeder HE, Schotz AH, Wardley-Richardson T, Spencer D, Higgins TJV (1993) Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol* 101:751–757
7. Peach C, Velten J (1991) Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol Biol* 17:49–60

8. Bhattacharyya MK, Stermer BA, Dixon RA (1994) Reduced variation in transgene expression from a binary vector with selectable markers at the right and left T-DNA borders. *Plant J* 6:957–968
9. Ye F, Singer ER (1996) RIGS (repeat induced gene silencing) in *Arabidopsis* is transcriptional and alters chromatin configuration. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10881–10886
10. Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB et al. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4803–4807
11. Gritz L, Davies J (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25:179–188
12. Waldron C, Murphy EB, Roberts JL, Gustafson GD, Armour SL, Malcoln SK (1985) Resistance to hygromycin B. A new marker for plant transformation. *Plant Mol Biol* 5:103–108
13. Hollingshead S, Vapnek D (1985) Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase. *Plasmid* 13:17–30
14. Jones JDG, Svab Z, Harper EC, Hurwitz CD, Maliga P (1987) A dominant nuclear streptomycin resistance marker for plant cell transformation. *Mol Gen Genet* 210:86–91
15. de Block M, Bottermann J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gossele V, Rao Movva N, Thompson C, von Montagu M, Leemans J (1987) Engineering herbicide resistance in plants with a detoxifying enzyme. *EMBO J* 6:2513–2518
16. Brukhin V, Clapham D, Elfstrand M, von Arnold S (2000) Basta tolerance as a selectable and screening marker for transgenic plants of Norway spruce. *Plant Cell Reports* 19:899–903
17. Shah DM, Horsch RB, Klee HJ et al. (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233:478–481
18. Haughn GW, Smith J, Mazur B, Somerville C (1988) Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. *Mol Gen Genet* 211:266–271
19. Stalker DM, McBride KE, Maljy LD (1988) Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. *Science* 242:419–423
20. Joersbo M, Okkels FT (1996) A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Reports* 16:219–221
21. Joersbo M, Petersen SG, Okkels FT (1999) Parameters interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet. *Physiol Plant* 105:109–115
22. Negrotto D, Jolley M, Beer S, Wenck AR, Hansen G (2000) The use of phosphomannose isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports* 19:798–803
23. Lucca P, Ye X, Potrykus I (2001) Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Mol Breeding* 7:43–49

24. Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Petersen SG, Brundstedt J, Okkels FT (1998) Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol Breed* 4:111–117
25. Haldrup A, Petersen SG, Okkels FT (1998) The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfugenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent. *Plant Mol Biol* 37:287–296
26. Haldrup A, Petersen SG, Okkels FT (1998) Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry. *Plant Cell Rep* 18:76–81
27. Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M (1997) Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2117–2121
28. Kunkel T, Niu Q-W, Chan Y-S, Chua N-H (1999) Inducible isopentenyl transferase as a high efficiency marker for plant transformation. *Nat Biotechnol* 17:916–919
29. Goldworthy A, Street HE (1965) The carbohydrate nutrition of tomato roots. VIII The mechanism of the inhibition by D-mannose of the respiration of excised roots. *Ann Bot* 29:45–58
30. Shen-Hwa C-S, Lewis DH, Waltor DA (1975) Stimulation of photosynthetic starch formation by sequestration of cytoplasmic orthophosphate. *New Phytol* 74:383–392
31. Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma H (1999) Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing. *Plant Cell Reports* 18:941–947
32. Gleave AP, Mitra DS, Mudge SR, Morris BAM (1999) Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of *cre* recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol Biol* 40:223–235
33. Perera RJ, Linard CG, Signer ER (1993) Cytosine deaminase as a negative selective marker for *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 23:793–799
34. Dale EC, Ow DW (1991) Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10558–10562
35. Russell SH, Hoopes JL, Odell JT (1992) Directed excision of a transgene from the plant genome. *Mol Gen Genet* 234:49–59
36. Kilby NJ, Davies GJ, Snaith MR (1995) FLP recombinase in transgenic plants: constitutive activity in stable transformed tobacco and generation of marked cell clones in *Arabidopsis*. *Plant J* 8:637–652
37. Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E, Ebinuma A (2000) A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. *Plant J* 5:461–469
38. Onouchi H, Yokoi K, Machida C et al. (1991) Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucl Acids Res* 19:6373–6378
39. Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformation free from selection markers. *Plant J* 10:165–174
40. Lu HJ, Zhong XR, Gong ZX, Upadhyaya NM (2001) Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right-border (DRB) binary vectors. *Aust J Plant Physiol* 28:241–248
41. ACNFP (1994) Report on the use of antibiotic resistance markers in genetically modified food organisms. Advisory Committee on Novel Foods and Processes. Department of Health and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London
42. Flavell RB, Dart E, Fuchs RL, Fraley RT (1992) Selectable marker genes: safe for plants? *Bio/Technology* 10:141–144

Gerda Blechner

### Chronischer Schmerz und andere Mentalität

S. Roderer Verlag, Regensburg 2001, 190 S., DM 48,- (ISBN 3-89783-216-X)

Das vorliegende Buch ist das Ergebnis einer 30-jährigen Therapieerfahrung mit Migranten. Die Autorin zeigt auf, wie Migranten aus unterschiedlichen Kulturkreisen, in diesem Fall Italiener und Türken, mit Schmerz umgehen.

Das Buch ist in vier Teile und eine Schlussbetrachtung unterteilt. Das erste Kapitel beschäftigt sich ausführlich mit Sprache und Schmerz. Es wird der Frage nach der Verknüpfung von Sprache und Schmerz nachgegangen, und es wird der Einfluss unterschiedlicher Kulturen auf die Einstellung zum Schmerz und auf seinen verbalen Ausdruck beschrieben. Kapitel zwei befasst sich mit der derzeitigen Situation im Einwanderungsland Deutschland. Im dritten Kapitel wird auf die einzelnen Schmerzlokalisationen näher eingegangen, das vierte Kapitel beschreibt detailliert die Wirkfaktoren bei psychologischer Schmerztherapie. Ein ausführliches Literaturverzeichnis ermöglicht es auch dem nicht so stark mit der Materie vertrauten Leser, sich rasch einen Überblick über die zum Thema vorhandene Literatur zu verschaffen.

Das Buch dokumentiert nicht nur, wie vielschichtig, komplex und kompliziert die gesamte Materie ist, sondern versucht auch Lösungsansätze zum besseren Verständnis der „anderen Mentalität“ zu vermitteln. Allerdings ist das Buch keine leichte Kost, als Nachschlagewerk für den niedergelassenen Arzt scheint es nicht geeignet. Es muss, um richtig verstanden zu werden, von Anfang bis Ende aufmerksam gelesen werden. Auch die Abbildungen erschließen sich meist nur aus dem Kontext. Aufgrund der geringen betrachteten Fallzahlen ist das Buch für epidemiologische Zwecke eher ungeeignet.

U. Ellert (Berlin)