



Stellungnahme der ZKBS zum wissenschaftlichen Kenntnisstand zur Wirkung von Bt-Toxinen im Körper von Säugetieren

Derzeit werden weltweit vor allem solche gentechnisch veränderten Nutzpflanzen angebaut, die sich einerseits durch Herbizidtoleranz auszeichnen oder andererseits Proteine, sogenannte Bt-Toxine, exprimieren, die der Pflanze eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Schädlingen vermitteln. In Deutschland wurde der Bt-Mais MON810 als gentechnisch veränderte Pflanze bis zu dessen Anbauverbot 2009 landwirtschaftlich genutzt. Vor dem Hintergrund der Veröffentlichung umstrittener Ergebnisse verschiedener Tierfütterungsstudien fasst die ZKBS in dieser Stellungnahme den derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand zur Wirkungsweise von Bt-Toxinen und zu möglichen Effekten im Körper von Säugetieren, insbesondere zur Wirkung auf Mikroorganismen und die Schleimhaut im Magen-/Darmtrakt, zusammen.

Bt-Toxin

Bacillus thuringiensis (*Bt*) ist ein Gram-positives Bodenbakterium aus der Familie der *Bacillaceae* und als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Abs. 6 i.V.m. Anhang I der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) der Risikogruppe 1 zugeordnet. Während der Sporulation bilden die Bakterien Kristall-ähnliche, parasporale Inklusionen, die unter anderem Proteine enthalten, welche den δ -Endotoxinen zugeordnet sind. Diese werden von den sogenannten *cry*- (*crystalline*) oder *cyt*- (*cytolytic*) Genen kodiert. Die verschiedenen δ -Endotoxine sind toxisch für ein breites Spektrum an Insekten und Nematoden, aber nicht für Mammalia. Sie werden hier zusammenfassend als Cry-Proteine oder Bt-Toxine (aktivierte Cry-Proteine) bezeichnet. Wegen ihrer Wirkungsspezifität wurden Formulierungen sporulierender Bakterien bereits seit der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts als Pflanzenschutzmittel in der Landwirtschaft genutzt (Glare & O'Callaghan, 2000). Die Cry-Proteine zeichnen sich gegenüber vielen chemischen Insektiziden durch einen raschen biologischen Abbau aus (Entwistle *et al.*, 1993; de Maagd *et al.*, 2003). Außerdem weisen die von verschiedenen *Bt*-Stämmen gebildeten Cry-Proteine jeweils einen engen Wirkungsbereich auf, der sich zumeist auf einzelne Ordnungen, Familien oder Artengruppen beschränkt

(van Frankenhuyzen, 2009). Mit der Entwicklung gentechnisch veränderter Pflanzen, die Bt-Toxine bilden, wurden die positiven Eigenschaften von Bt-Toxinen mit Verbesserungen im Pflanzenschutzmanagement (verbesserte Exposition gegenüber den Schädlingen, einfache Anwendung, kein zusätzlicher Arbeitsaufwand) kombiniert (Shelton *et al.*, 2002; James 2009).

Von besonderem Interesse für den Pflanzenschutz sind die Cry-Proteine, die in Bt-Stämmen Plasmid-kodiert sind. Bis heute sind mindestens 335 verschiedene dieser Proteine mit einer spezifischen toxischen Wirkung gegen bestimmte Insektengruppen beschrieben. Entsprechend wurden sie nach Höfte & Whiteley (1989) verschiedenen Unterfamilien zugeordnet. Dabei zeigen Cry1-Proteine eine Wirkung gegen Lepidoptera (Schmetterlinge), Cry2-Proteine gegen Lepidoptera und Diptera (Schmetterlinge und Zweiflügler), Cry3-Proteine gegen Coleoptera (Käfer) und Cry4-Proteine gegen Diptera (Zweiflügler). Crickmore *et al.* (1998) führten später eine neue Nomenklatur ein, die auf Ähnlichkeiten zwischen den Aminosäure-Sequenzen der Cry-Proteine basiert.

In der sporulierenden Bakterienzelle liegen die Cry-Proteine als kristalline Protoxine in Inklusionen vor. Nach Aufnahme durch die Insekten wird das Protoxin im Darm der Insekten gelöst (pH-Verschiebung) und proteolytisch aktiviert. Die proteolytische Aktivierung erfolgt durch die Abtrennung des C-terminalen Abschnittes und führt zum toxischen Protein. Das so aktivierte Toxin bindet dann an spezifische Rezeptoren, die an der apikalen Seite der Mikrovilli der Epithelzellen im Mitteldarm von Insekten lokalisiert sind. Für den nachfolgenden Schritt, der Insertion des Toxins in die Zellmembran mit Bildung von Membranporen, werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Zum einen wird die Bindung von Monomeren an die Rezeptoren als ausreichend erachtet, um eine Porenbildung in der Zellmembran zu verursachen. Zum anderen wird eine lokale Anreicherung des aktivierten Toxins bzw. die Oligomerisierung der Monomere als Voraussetzung angesehen, um die Porenbildung zu initiieren (Piggott & Ellar, 2007; Bravo *et al.*, 2004). Als Folge der Porenbildung (Gazit *et al.*, 1998; Soberton *et al.*, 2010) erhöht sich die Permeabilität für anorganische Ionen, Aminosäuren und Zucker, was letztendlich in einer Osmolyse der Epithelzellen resultiert. Die Darmfunktion wird dadurch zerstört und das befallene Insekt stirbt. In Ergänzung zu diesem Mechanismus wird außerdem eine Signalweiterleitung nach der Rezeptoraktivierung durch die Bindung des Toxins postuliert, die im Zelltod (Oncose) resultiert und ebenfalls zur Zerstörung der Darmfunktion führt (Zhang *et al.*, 2006; Vachon *et al.*, 2012).

Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Cry-Proteinfamilien weisen geringe Übereinstimmungen auf. Innerhalb der Cry-Proteinfamilien hat die Röntgenstruktur-Kristallographie aber homologe Strukturen nachgewiesen. Bisher wurde die Struktur von sieben aktivierten Cry-Proteinen verschiedener Klassen aufgeklärt (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995; Galitsky *et al.*, 2001; Morse *et al.*, 2001; Boonserm *et al.*, 2005, 2006). Danach bestehen die ca. 60

kDa großen Proteine aus drei Domänen. Der aus einem Bündel von alpha-Helices bestehenden Domäne I wird eine Rolle bei der Membraninsertion und Porenbildung zugeschrieben (Schnepf *et al.*, 1998). Bei den Domänen II und III handelt es sich um zwei verschiedene β -Faltblatt-Strukturen, die an den/die jeweiligen Rezeptor(en) binden (Pigott & Ellar, 2007). Die Wirtsspezifität eines Cry-Proteins wird in einem ersten Schritt dadurch bedingt, dass die pH-abhängige Solubilisierung und die proteolytische Aktivierung im Darm des jeweiligen Insekts tatsächlich erfolgt. Im zweiten Schritt ist die Bindungsfähigkeit des Bt-Toxins an spezifische Rezeptoren als Voraussetzung für die toxische Wirkung entscheidend.

Bei der Entwicklung landwirtschaftlich genutzter gv-Pflanzen finden Cry-Proteine mit einer Spezifität gegen Schmetterlinge (Lepidoptera) und Käfer (Coleoptera) Anwendung (http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm). In das Pflanzengenom werden dabei jeweils ein oder mehrere Nukleinsäureabschnitte eingebracht, welche jeweils für die bereits aktivierten Formen der Cry-Proteine kodieren. Dabei kann es sich auch um zusammengesetzte Proteine handeln, die aus verschiedenen Domänen verschiedener Bt-Toxine bestehen (synthetische Bt-Toxine). Die Expression steht unter pflanzenspezifischer Kontrolle, so dass von der gv-Pflanze das Toxin exprimiert werden kann und gelöst im Cytosol vorliegt. Eine pH-abhängige Solubilisierung und ein proteolytischer Verdau sind für die Funktionsfähigkeit des gebildeten Toxins nicht mehr erforderlich. Entscheidend für die toxische Wirkung ist die Bindung an einen spezifischen, funktionellen Rezeptor.

Die Spezifität der Interaktion zwischen Bt-Toxin und Rezeptor ist mithilfe diverser Methoden gezeigt worden (*site directed mutagenesis*, Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie, Kompetitions-Bindungs-Studien mithilfe von Peptiden oder Antikörperfragmenten einschließlich Biacore-Studien und Interaktionsstudien zwischen Proteinfragmenten). Es wurden Interaktionen der Cry-Proteine mit verschiedenen membrangebundenen Komponenten beobachtet, wie z.B. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Aminopeptidase N (APN), alkalische Phosphatasen und Glykolipide. Zur toxischen Wirkung der Bt-Toxine führten jedoch nur die Wechselwirkungen mit Cadherin-ähnlichen Membranproteinen (Nagamatsu *et al.*, 1999). Bei diesen handelt es sich um Rezeptorstrukturen, die in dieser Konformation nur in der Membran von Zellen des Insektendarms zu finden sind (Lecuit *et al.*, 2007; Midboe *et al.*, 2003). Erst die ektopische Expression der Rezeptorproteine von Insekten in Säugerzellen machte diese empfindlich gegen das Bt-Toxin (Tsuda *et al.*, 2003).

Mögliche Wirkung des Bt-Toxins auf Mikroorganismen

Eine mit der Toxizität für Insekten vergleichbare Toxizität für Prokaryoten ist nicht zu erwarten. Prokaryote Zellen unterscheiden sich im Aufbau von eukaryoten, insbesondere tierischen Zellen. So ist im Gegensatz zur tierischen Zelle die bakterielle Zytoplasmamembran

mit den darin integrierten Proteinen von einer komplexen Zellwand umgeben. Diese ist aus diversen Schichten des Peptidoglycans Murein zusammengesetzt und durchlässig für niedermolekulare Substanzen und Salze. Gram-negative Bakterien sind zudem noch von einer zusätzlichen äußeren Membran umgeben. Auch hier sind Membranproteine eingelagert, die vorwiegend dem Stofftransport dienen. Es gibt keine Hinweise auf Cadherin-ähnliche Proteine mit einer Bindestelle für Bt-Toxine in der Zytoplasma- oder in der äußeren Membran von Bakterien.

In vitro und *in situ* Studien belegen, dass das von der gv-Pflanze exprimierte Bt-Toxin über die Wurzeln der Pflanze in den umgebenden Boden gelangen kann. Dort kann das wasserlösliche Protein an Oberflächen-aktive Partikel im Boden binden (Saxena & Stotzky 2000) und im Gegensatz zur Bodenflüssigkeit über einen längeren Zeitraum (bis zu 180 Tage) nachweisbar bleiben (Saxena and Stotzky 2001a). Die Diversität und Aktivität von Bakteriengemeinschaften im Boden ist in der Pflanzen-Rhizosphäre am höchsten. Um einen möglichen Effekt des Bt-Toxins auf Bakteriengemeinschaften zu untersuchen, wurden die o. g. Bereiche für Studien herangezogen. Mithilfe der Taxon-spezifischen quantitativen PCR (Ferrer *et al.*, 2005), *fingerprinting* und *pyrosequencing* (Dohrmann *et al.*, 2013) wurden vielfältige Untersuchungen zur Menge und Diversität von Bodenbakterien beim Anbau verschiedener *cry*-Gen tragender gv-Pflanzen in geografisch verschiedenen Regionen durchgeführt. Es wurden keine Hinweise auf einen Effekt des Bt-Toxins gefunden (Singh *et al.*, 2013; Barriuso *et al.*, 2012; Devare *et al.*, 2007; Baumgarte & Tebbe, 2005, Miethling-Graff *et al.*, 2010; Dohrmann *et al.*, 2013, Oliveira *et al.*, 2008). Auch wenn in Einzelfällen geringe Unterschiede in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften zwischen gv-Pflanze und Kontrollpflanze feststellbar waren, kann dies auch auf andere Faktoren wie beispielsweise Witterungsbedingungen und Wachstumsstadium der individuellen Pflanze, insbesondere die jeweilige Ausbildung der Rhizosphäre, zurückgeführt werden. Darüber hinaus beeinflussen die von der jeweiligen Pflanze über die Rhizosphäre abgegebenen Metabolite ebenfalls die Bakteriengemeinschaften. So unterscheidet sich nicht nur die Bakterienvielfalt in der Rhizosphäre einzelner Pflanzen (Buee *et al.*, 2009), sondern auch in verschiedenen Bereichen der Rhizosphäre einer einzelnen Pflanze (Watt *et al.*, 2006).

Mögliche Wirkung des Bt-Toxins im Magen-Darm-Trakt von Säugern

Das Verdauungssystem der Insekten ist im Vergleich zu Säugetieren einfach aufgebaut und wird in drei funktionelle Abschnitte gegliedert, die entsprechend ihrer Lage als Vorder-, Mittel- und Enddarm bezeichnet werden. Der Mitteldarm ist der Ort der Aktivierung und Bindung des Bt-Toxins und der damit einhergehenden Toxizität. Er ist mit einem Drüsenepithel ausgekleidet, welches Enzyme produziert, die zur Verdauung notwendig sind. Der Mitteldarm

ist mit den von Cadherin-ähnlichen Rezeptoren besetzten Mikrovilli ausgestattet und weist einen neutralen bis alkalischen pH-Wert auf.

Das Verdauungssystem der Säuger unterscheidet sich grundsätzlich von dem der Insekten. Bei Säugern gelangt die Nahrung nach der Aufnahme über die Speiseröhre erst in einen Magen. In Säugetieren, die mit einem einfachen Magen-Darm-Trakt ausgestattet sind, werden Proteinbestandteile der Nahrung im Magen durch Einwirkung von Pepsin und Salzsäure ($\text{pH} < 2$) denaturiert und proteolytisch degradiert, bevor sie in den Darmtrakt weitergeleitet werden. Ruminante Säuger (Wiederkäuer) zeichnen sich durch zusätzlich vorgeschaltete Kompartimente des Magens, insbesondere des Rumens (Pansen) aus. In diesen Kompartimenten wird die pflanzliche Nahrung mithilfe von Mikroorganismen vorfermentiert. Auch Bt-Toxine, einschließlich synthetischer Bt-Toxine, unterliegen diesen Prozessen. So wurde der Abbau von in Mais enthaltenen Bt-Toxinen im Gastrointestinaltrakt von ruminanten und auch omnivoren Säugern (Allesfresser) in diversen Studien gezeigt (Paul *et al.*, 2010; Chowdhury *et al.*, 2003; Einspanier *et al.*, 2004; Lutz *et al.*, 2005; EFSA-Report, 2008; Walsh *et al.*, 2012b; EFSA-Opinion, 2008).

- Effekte auf die Schleimhaut

Obwohl die mit der Nahrung aufgenommenen Bt-Toxine einer Denaturierung und Degradierung im Magen von Säugern unterliegen, wurden *in vitro*-Experimente in Zellkultursystemen durchgeführt, um etwaige Effekte der Bt-Toxine auf die Zellen der Darmschleimhaut (Mukosa) zu untersuchen. Die in der Darmschleimhaut überwiegenden Epithelzellen (Enterozyten bzw. Saumzellen) weisen eine Polarisierung auf und besitzen Mikrovilli zur Oberflächenvergrößerung. Neben den Epithelzellen ist die Geweboberfläche von weiteren Zellen wie Immun- oder endokrinen Zellen durchsetzt. Zudem sind sie von einer Glykokalyx (Zuckerummantelung) umgeben, die sie vor einer Selbstverdauung schützt. Die Anzahl der Studien, in denen Effekte von Bt-Toxinen auf eine funktionelle Darmschleimhaut *in vitro* getestet wurden, ist gering, da die Etablierung eines solchen Zellkultursystems sehr aufwendig ist (Cencič & Langerholc, 2010). Shimada *et al.* (2006) generierten aus den Epithelzellen des Dünndarms von Rind und Schwein Membranvesikel und testeten die Bindungsaffinität von Bt-Toxinen an die jeweilige Zellmembran sowie die mögliche Toxizität. Selbst in den Fällen, in denen ein geringer Anteil der Bt-Toxine unabhängig von einem Cadherin-ähnlichen Rezeptor an die Membranen band, konnte eine Veränderung der Membran und eine damit verbundene toxische Wirkung nicht beobachtet werden. Vazquez-Pedron *et al.* (2000) konnten mithilfe immunologischer Methoden sechs verschiedene Cry1Ac-bindende Proteine in Dünndarm-Präparationen von Mäusen nachweisen. Diese nehmen jedoch keine Rezeptorfunktion wahr. Die Interaktion mit den Cry-Proteinen induzierte zwar eine zeitweise Erhöhung der Membranspannung; eine erhöhte Permeabilität der Membran, die mit einer Gewebeerstörung

einhergeht, konnte nicht gezeigt werden. Bondzio *et al.* (2013) nutzten u. a. die neuere Technologie der sog. *real-time cell analysis*, um die Reaktion von intestinalen Zellen des Schweins auf eine Exposition gegenüber dem Bt-Toxin über einen längeren Zeitraum *in vitro* zu analysieren. Eine Verringerung der Lebensfähigkeit der Zellen wurde trotz hoher Konzentrationen der eingesetzten Bt-Toxine nicht beobachtet.

Im Rumen von Rindern können noch einige Stunden nach der Nahrungsaufnahme sowohl fragmentierte als auch vollständige Bt-Toxine nachgewiesen werden (Wiedemann *et al.*, 2006). *In vitro* Experimente mit Kulturen isolierter Rumenepithelzellen vom Schaf zeigten jedoch keinen Effekt auf die Vitalität der Zellen durch Zugabe von Bt-Toxinen in physiologischen Konzentrationen (Bondzio *et al.*, 2008). Bei Gabe von unphysiologisch hohen Konzentrationen wurde eine spontane Insertion von Bt-Toxinen in die Membran der Epithelzellen beobachtet. Diese hatte jedoch keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen (Stumpff *et al.*, 2007).

- Effekte auf Mikrobiome

Säugetiere werden von einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt, welche zum größten Teil aus Bakterien bestehen (Mikrobiome). Neben Haut, Nasen- und Rachenraum gehört der Gastrointestinaltrakt zu den am dichtesten von Mikroorganismen besiedelten Kompartimenten. Der Diversität der Bakterien im Darm wird eine immer größer werdende Aufmerksamkeit zuteil, insbesondere im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Gesundheit des Menschen. Ende 2007 wurde vom amerikanischen *National Institute of Health* (NIH) das *Human Microbiome Project* (HMP) zur Sequenzierung aller Genome der Mikroorganismen, die den Menschen besiedeln, ins Leben gerufen. Innerhalb von fünf Jahren wurden von dem aus 80 Forschungsgruppen bestehenden Konsortium insgesamt 5177 taxonomische Bakterien-Profile von 242 Probanden meist westlicher Gesellschaften generiert (HMP-Konsortium 2012 a, b). Dabei wurde deutlich, dass die Zusammensetzung eines Mikrobioms von verschiedenen Parametern wie pH-Wert, Feuchtigkeit, Sauerstoffgehalt, Wirtsfaktoren wie genetische Disposition, Immunologie, Ernährungszustand, Alter, ethnische Herkunft, aber auch von Interaktionen der Bakterien untereinander beeinflusst wird. Mikrobiome zeichnen sich durch ihre Spezies-individuellen und sogar Intraspezies-individuellen Unterschiede aus. In diesem Zusammenhang kann dem Schwein eine Modellfunktion zukommen, denn ihm wird physiologische Nähe zum Menschen hinsichtlich des Verdauungssystems und assoziierter Prozesse zugeschrieben. Es ist ebenfalls ein omnivorer Säuger und dem Menschen in Größe/Gewicht und Nahrungsbedarf vergleichbar. Auch das intestinale mikrobielle Ökosystem zeigt Ähnlichkeiten zu dem des Menschen (Heinritz *et al.*, 2013). Insofern könnten Studien am Schwein auch für Prognosen von Wirkungen beim Menschen herangezogen werden.

Von einer toxischen Wirkung von Bt-Toxinen auf die Mikrobiome von omnivoren oder ruminanten Säugern durch die Aufnahme Bt-Toxin-haltiger Nahrung ist nicht auszugehen. Wie oben schon dargelegt, ist der Magen-Darm-Trakt der Omnivoren so ausgestattet, dass die Nahrung erst einer weitgehenden Denaturierung und Proteolyse im sauren Magenmilieu unterliegt, bevor die verdaute Nahrung in den Darm weitergegeben wird. Ein ausgedehnter Kontakt zwischen intaktem Bt-Toxin und dem Mikrobiom ist deshalb nicht zu erwarten. Bei ruminanten Säugern erfolgt der Kontakt der Bt-Toxin-haltigen Nahrung mit mikrobiellen Gemeinschaften bereits im Rumen, also vor der Denaturierung im sauren Milieu. Dennoch ist nicht von einer Toxizität für das Mikrobiom auszugehen, da die in den Insektenepithelzellen vorhandenen Bt-Toxin-spezifischen Rezeptorstrukturen in Bakterienmembranen nicht nachgewiesen werden konnten (s. o.).

Diese Annahmen wurden in einer Reihe von Fütterungsstudien mit omnivoren als auch ruminanten Säugern belegt. In keiner dieser Studien konnte ein signifikanter Einfluss auf die Bakteriengesellschaften des Darmes durch die Aufnahme Bt-Toxin-haltiger Nahrung beobachtet werden (Einspanier *et al.*, 2004; Wiedemann *et al.*, 2007; Trabalza-Marinucci *et al.*, 2008; Buzoianu *et al.*, 2012a; Buzoianu *et al.*, 2012b; Yuan *et al.*, 2013).

Fazit:

Nach Ansicht der ZKBS existiert ein breites, fundiertes Wissen über die Wirkung von Cry-Proteinen auf verschiedene Tiergruppen. Sehr spezifische Details des Wirkmechanismus der Bt-Toxine werden zurzeit zwar noch diskutiert und näher untersucht, aber das Prinzip des Wirkmechanismus an sich und die Wirtsspezifität stehen nicht in Frage. Aufgrund der Kenntnisse zum Wirkmechanismus und des Fehlens der Bt-Toxin-Rezeptoren im Säugetierdarm ist eine Wirkung von Bt-Toxinen auf Säugetiere nicht zu erwarten. Dies wird zusätzlich durch zahlreiche Fütterungsstudien untermauert. Eine große Zahl von Studien über die Wirkung von Bt-Toxinen auf Bakteriengesellschaften im Verdauungstrakt von Säugetieren konnte keinen Einfluss auf deren Zusammensetzung nachweisen.

Literatur:

- Barriuso J, Valverde JR, Mellado RP (2012). Effect of Cry1Ab protein on rhizobacterial communities of Bt-maize over a four-year cultivation period. *PLoS One* 7(4):e35481.
- Baumgarte S, Tebbe CC (2005). Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Mol Ecol* 14(8):2539-51.
- Bondzio A, Stumpff F, Schön J, Martens H, Einspanier R (2008). Impact of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab on rumen epithelial cells (REC) - a new *in vitro* model for safety assessment of recombinant food compounds. *Food and Chem Toxicol* 46(6):1976-84.
- Bondzio A, Lodemann U, Weise C, Einspanier R (2013). Cry1Ab treatment has no effects on viability of cultured porcine intestinal cells, but triggers Hsp70 expression. *PLoS One* 8(7):e67079.
- Boonserm P, Davis P, Ellar DJ, Li J (2005). Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J Mol Biol* 348(2):363-82.
- Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat C, Lescar J. (2006). Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J Bacteriol* 188(9):3391-401.
- Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS, Soberón M (2004). Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta*.1667(1):38-46.
- Buée M, De Boer W, Martin F, van Overbeek L, Jurkevitch E (2009). The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil* 321:189–212.
- Buzoianu SG, Walsh MC, Rea MC, O'Sullivan O, Cotter PD, et al. (2012a). High throughput sequence-based analysis of the intestinal microbiota of weanling pigs fed genetically modified Bt MON810 maize for 31 days. *Appl Environ Microbiol* 78(12):4217-24.
- Buzoianu SG, Walsh MC, Rea MC, O'Sullivan O, Crispie F, Cotter PD, Ross RP, Gardiner GE, Lawlor PG (2012b). The effect of feeding Bt MON810 maize to pigs for 110 days on intestinal microbiota. *PLoS One* 7(5):e33668.
- Cencic A, Langerholc T (2010). Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology--a review. *Int J Food Microbiol*. 141 Suppl 1:S4-14.
- Chowdhury EH, Shimada N, Murata H, Mikami O, Sultana P, Miyazaki S, Yoshioka M, Yamanaka N, Hirai N, Nakajima Y (2003). Detection of Cry1Ab protein in gastrointestinal contents but not visceral organs of genetically modified Bt11-fed calves. *Vet Hum Toxicol* 45(2):72-5.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 807-13
- De Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet* 37:409-33.
- Devare M, Londono RLM, Thies JE, (2007). Neither transgenic Bt maize (MON863) nor tefluthrin insecticide adversely affect soil microbial activity or biomass: A 3-year field analysis. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 2038–2047.
- Dohrmann AB, Küting M, Jünemann S, Jaenicke S, Schlüter A, Tebbe CC (2013). Importance of rare taxa for bacterial diversity in the rhizosphere of Bt- and conventional maize varieties. *ISME J* 7(1):37-49.
- EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials (2008). Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. *Food Chem Toxicol* 46:S2–S70.
- EFSA Scientific Opinion (2008) Application (Reference EFSA-GMO-NL-2007-37) for the placing on the market of the insect-resistant genetically modified maize MON89034, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto - Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms *The EFSA Journal* 909, 1-30.

- Einspanier R, Lutz B, Rief S, Berezina O, Zverlov V, Schwarz W, Mayer J (2004). Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize. *Eur Food Res Technol* 218:173–269.
- Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs S (1993). *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. *John Wiley & Sons Ltd, Chichester, U.K*
- Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, Jackson RB (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol.* 71(7):4117-20.
- Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft JR, Pangborn W, English L. (2001). Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 8):1101-9.
- Gazit E, La Rocca P, Sansom MS, Shai Y (1998). The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *PNAS* 95(21):12289-94.
- Glare TR & O'Callaghan M (2000). "*Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety". *John Wiley & Sons Ltd, Chichester, U.K.*
- Grochulski P, Masson L, Borisova S, Pusztai-Carey M, Schwartz JL, Brousseau R, Cygler M (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J Mol Biol* 254(3):447-64.
- Heinritz SN, Mosenthin R, Weiss E (2013). Use of pigs as a potential model for research into dietary modulation of the human gut microbiota. *Nutr Res Rev* 26(2):191-209.
- Höfte H, Whiteley HR (1989). Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53, 242-255.
- Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486(7402):207-14.
- Human Microbiome Project Consortium (2012). A framework for human microbiome research. *Nature* 486(7402):215-21.
- James C (2009). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. ISAAA Brief No. 41. ISAAA: Ithaca, NY. 978-1-892456-48-6.
- Lecuit T, Lenne PF (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(8):633-44.
- Li JD, Carroll J, Ellar DJ (1991). Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353(6347):815-21.
- Lutz B, Wiedemann S, Einspanier R, Mayer J, Albrecht C (2005). Degradation of Cry1Ab Protein from Genetically Modified Maize in the Bovine Gastrointestinal Tract. *J Agric Food Chem* 53:1453-1456
- Midboe EG, Candas M, Bulla LA Jr (2003). Expression of a midgut-specific cadherin BT-R1 during the development of *Manduca sexta* larva. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 135(1):125-37.
- Miethling-Graff R, Dockhorn S, Tebbe CC (2010). Release of the recombinant Cry3Bb1 protein of Bt maize MON88017 into field soil and detection of effects on the diversity of rhizosphere bacteria. *Eur J Soil Biol* 46: 41–48.
- Morse RJ, Yamamoto T, Stroud RM (2001). Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* 9(5):409-17.
- Nagamatsu Y, Koike T, Sasaki K, Yoshimoto A, Furukawa Y (1999). The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. *FEBS Lett* 460(2):385-90.
- Oliveira AP, Pampulha ME, Bennett JP (2008). A two-year field study with transgenic *Bacillus thuringiensis* maize: Effects on soil microorganisms. *Sci Total Environ* 405 (1-3): 351-357.
- Paul V, Guertler P, Wiedemann S, Meyer HH (2010). Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize (MON810) in relation to total dietary feed proteins in dairy cow digestion. *Transgenic Res* 19(4):683-9.
- Pigott CR, Ellar DJ (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(2):255-81.

- Saxena D, Stotzky G (2000). Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn *in vitro* and *in situ*. *FEMS Microbiol Ecol* 33(1):35-39.
- Saxena D, Stotzky G (2001). Bt toxin uptake from soil by plants. *Nat Biotechnol* 19(3):199
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(3):775-806.
- Shelton AM, Zhao JZ, Roush RT (2002). Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of bt transgenic plants. *Annu Rev Entomol* 47:845-81.
- Shimada N, Miyamoto K, Kanda K, Murata H (2006). *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1ab toxin does not affect the membrane integrity of the mammalian intestinal epithelial cells: An *in vitro* study. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 42(1-2):45-9.
- Singh AK, Rai GK, Singh M, Dubey SK (2013). Bacterial community structure in the rhizosphere of a Cry1Ac Bt-brinjal crop and comparison to its non-transgenic counterpart in the tropical soil. *Microb Ecol* 66(4):927-39.
- Soberón M, Pardo L, Muñóz-Garay C, Sánchez J, Gómez I, Porta H, Bravo A (2010). Pore formation by Cry toxins. *Adv Exp Med Biol* 677:127-42.
- Stumpff F, Bondzio A, Einspanier R, Martens H (2007). Effects of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab on membrane currents of isolated cells of the ruminal epithelium. *J Membr Biol* 219(1-3):37-47.
- Trabalza-Marinucci M, Brandi G, Rondini C, Avellini L, Giammarini C, Costarelli S, Acuti G, Orlandi C, Filippini G, Chiaradia E, Malatesta M, Crotti S, Antonini C, Amagliani G, Manuali E, Mastrogiacono AR, Moscati L, Haouet MN, Gaiti A, Magnani M (2008). A three-year longitudinal study on the effects of a diet containing genetically modified Bt176 maize on the health status and performance of sheep. *Livestock Science* 113: 178-190.
- Tsuda Y, Nakatani F, Hashimoto K, Ikawa S, Matsuura C, Fukada T, Sugimoto K, Himeno M (2003). Cytotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins on mammalian cells transfected with cadherin-like Cry receptor gene of *Bombyx mori* (silkworm). *Biochem J* 369(Pt 3):697-703.
- Vachon V, Laprade R, Schwartz JL (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *J Invertebr Pathol* 111(1):1-12.
- van Frankenhuyzen K (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol* 101(1):1-16.
- Vazquez-Padron RI, Gonzales-Cabrera J, Garcia.Tovar C, Neri-Bazan, L, Lopez-Revilla R, Hernandez M, Moreno-Fierro L, de la Riva GA (2000). Cry1Ac Protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 Binds to Surface Proteins in the Mouse Small Intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 271:54-58.
- Walsh MC, Buzoianu SG, Rea MC, O'Donovan O, Gelencsér E, Ujhelyi G, Ross RP, Gardiner GE, Lawlor PG (2012). Effects of feeding Bt MON810 maize to pigs for 110 days on peripheral immune response and digestive fate of the cry1Ab gene and truncated Bt toxin. *PLoS One* 7(5):e36141.
- Watt M, Hugenholz P, White R, Vinall K (2006). Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Environ Microbiol* 8: 871–884.
- Wiedemann S, Lutz B, Kurtz H, Schwarz FJ, Albrecht C (2006). *In situ* studies on the time-dependent degradation of recombinant corn DNA and protein in the bovine rumen. *J Anim Sci* 84(1):135-44.
- Wiedemann S, Gürtler P, Albrecht C (2007). Effect of feeding cows genetically modified maize on the bacterial community in the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol* 73(24):8012-7.
- Yuan Y, Xu W, He X, Liu H, Cao S, Qi X, Huang K, Luo Y (2013). Effects of genetically modified T2A-1 rice on the GI health of rats after 90-day supplement. *Sci Rep* 3:1962.
- Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA Jr (2006). A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *PNAS* 103(26):9897-902.