



**Stellungnahme  
der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS)  
zur Sicherheitsbewertung von Antibiotika-Resistenzgenen  
im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen**

## 1. Einleitung

Im März 2008 war die Regierung Dänemarks an die EU-Kommission herangetreten mit der Bitte um Klärung eines Widerspruchs bei der Sicherheitsbewertung von Antibiotika-Resistenzgenen (ARG) in gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP) zwischen den Stellungnahmen der Europäischen Lebensmittelbehörde (European Food Safety Authority, EFSA) (EFSA, 2004 und 2007). Dänemark folgerte aus der EFSA-Stellungnahme zum ARG *nptII* aus dem Jahr 2007, dass das Kriterium der medizinischen Bedeutung der korrespondierenden Antibiotika kein wichtiges Kriterium für die Sicherheitsbewertung von ARG sei. Nach Meinung Dänemarks stehe dieses Ergebnis nicht im Einklang mit der Stellungnahme der EFSA aus dem Jahr 2004.

Diese Anfrage war unter anderem Anlass für die EU-Kommission, die EFSA unter Berücksichtigung ihrer bisherigen Stellungnahmen um eine konsolidierte Stellungnahme für die Sicherheitsbewertung von ARG in GVP zu bitten. Bei der Erstellung dieser Stellungnahme solle die EFSA mit der European Medicines Agency (EMA) und anderen wissenschaftlichen Institutionen mit anerkannter Expertise auf dem Gebiet der Antibiotika-Resistenz zusammenarbeiten. Dabei sollten die Gründe für die Schlussfolgerungen dargelegt werden, so dass diese Stellungnahme eine Grundlage für die im Einzelfall durchzuführende Sicherheitsbewertung von GVP mit ARG bietet.

Mit Bezug zu der Diskussion über ARG als Marker im Genom von GVP im Zeitraum von 2004 bis 2007 zwischen der EFSA, der EMA und der EU-Kommission (EMA, 2007; WHO, 2005; EFSA, 2004) hatte auch die ZKBS 2007 ihre Stellungnahme von 1999 zu diesem Thema überprüft. Sie hatte als Ergebnis die Stellungnahme von 1999 mit der Einteilung der ARG in drei Gruppen bestätigt (ZKBS, 1999 und 2007), die im Wesentlichen der von der EFSA im Jahr 2004 getroffenen Einteilung von ARG in GVP entspricht. Die ZKBS-Stellungnahme zog 1999 folgende Faktoren zur Bewertung heran:

- Wahrscheinlichkeit des HGT von ARG aus GVP auf Bakterien (Eubacteria und Archeobacteria),
- Verbreitung von ARG in der Umwelt,
- Bedeutung von Antibiotika für die Human- und Tiermedizin.

Abhängig von der Verbreitung der ARG und der therapeutischen Bedeutung ihrer korrespondierenden Antibiotika wurden in der Stellungnahme von 1999 die ARG

*nptII*, *hph*, *cm<sup>R</sup>*, *aadA*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *nptIII* und *tetA*

in drei Gruppen eingeteilt. Die Abgrenzung der korrespondierenden Antibiotika erfolgte über die Differenzierung:

- „keine bis geringe therapeutische Bedeutung in der Veterinär- und Humanmedizin“ (Gruppe 1),
- „relevant in Teilbereichen der Veterinär- und Humanmedizin“ (Gruppe 2),



- „von therapeutischer Bedeutung in der Humanmedizin“ (Gruppe 3).

Der von der EU-Kommission an die EFSA erteilte Auftrag betrifft auch die Bewertungskriterien und Fakten, die seitens der ZKBS zur Bewertung von ARG in GVP herangezogen wurden. Als nationales Gremium für Fragen der Sicherheit von Gentechnik ist die ZKBS auch mit Stellungnahmen zur Sicherheitsbewertung von GVP befasst. Deshalb hat die ZKBS unter Beachtung der international geführten Diskussion um die Bedeutung von Antibiotika und unter Berücksichtigung aktueller Forschungsergebnisse eine neue Stellungnahme zur Sicherheitsbewertung von ARG im Genom von GVP erarbeitet. Diese Stellungnahme löst die früher erarbeitete Stellungnahme vom Juli 1999 und die Aktualisierung vom Juni 2007 ab (ZKBS, 1999 und 2007). Aufgrund der unterschiedlichen Bewertung der Bedeutung bestimmter Antibiotika für die Human- und Veterinärmedizin in verschiedenen Regionen der Welt tritt dieser Faktor zurück hinter die Bedeutung der Faktoren

- Wahrscheinlichkeit des HGT von ARG aus GVP auf Bakterien und
- Verbreitung von ARG in der Umwelt.

Die vorliegende Stellungnahme ist auf solche ARG bezogen, die in den letzten Jahren in der EU in Verbindung mit Anträgen zur Genehmigung des Inverkehrbringens von GVP relevant waren. Sie umfasst die Bewertung der ARG *nptII*, *aadA*, *bla<sub>TEM-1</sub>* und *tetA*, weil sie als intakte Gene oder in Form funktionsloser Bruchstücke in GVP enthalten sind.

## **2. Wissenschaftliche Bewertung der Möglichkeit eines horizontalen Gentransfers (HGT) von ARG aus GVP auf Bakterien und der Verbreitung der Resistenzgene in der Umwelt**

Zur Bewertung der Sicherheit von bakteriellen ARG im Genom von GVP bedarf es einer Abschätzung der Wahrscheinlichkeit eines HGT der ARG aus diesen Pflanzen auf Bakterien. Weiter ist der Effekt eines eventuellen Transfers auf die bereits vorhandene Verbreitung von bakteriellen ARG in der Umwelt zu beachten.

Zur Abschätzung eines HGT von Pflanzen auf Bakterien betrachtet der erste Teil dieses Abschnittes die verschiedenen Mechanismen des lateralen Transfers von Genen und trifft eine Einschätzung der Wahrscheinlichkeit eines HGT von GVP auf Bakterien. Diese Wahrscheinlichkeit wird mit der natürlichen Frequenz des HGT zwischen Bakterien verglichen. Die Auswirkungen eines möglichen Transfers von bakteriellen ARG aus dem Genom von GVP auf Bakterien werden im zweiten Teil dieses Abschnittes betrachtet. Dabei wird die Entstehung neuer resistenter Organismen durch den HGT zwischen Bakterien gleicher und verschiedener Arten und durch Mutationen berücksichtigt. Die vorhandene Verbreitung von bakteriellen ARG in Bakterien wird dem putativen HGT von GVP auf Bakterien gegenübergestellt.

### **2.1. Wahrscheinlichkeit eines HGT von GVP auf Bakterien**

Der HGT bei Bakterien kann über verschiedene Mechanismen erfolgen und wird als eine der treibenden Kräfte für die genetische Anpassung dieser Organismen an eine veränderte Umwelt angesehen. HGT hat über evolutionäre Zeiträume hinweg die Struktur der bakteriellen Genome mitgeformt. In der Entwicklungsgeschichte von *Escherichia coli* fanden z.B. während 100 Millionen Jahren etwa 234 HGT-Ereignisse statt, die sich bis heute im Genom erkennen lassen (Lawrence and Ochman, 1998). Daraus folgt, dass dauerhaft nachweisbare HGT-Ereignisse selten sind.

Für die Sicherheitsbewertung von bakteriellen ARG im Genom von GVP und dem potentiellen Risiko eines HGT von Pflanzen auf Bakterien ist der Mechanismus der Transduktion zu ver-



nachlässigen. Es sind keine Viren bekannt, die gleichzeitig Pflanzen und Bakterien als Wirte haben und genetisches Material übertragen könnten. Entsprechendes gilt für den Mechanismus der konjugativen Übertragung von DNA aus Pflanzen auf Bakterien. Es sind keine geeigneten autonom oder passiv mobilisierbaren genetischen Elemente in Pflanzen bekannt, die konjugativ auf Bakterien übertragen werden können.

Am ehesten kann der Prozess der natürlichen Transformation von Bakterien eine Möglichkeit der Übertragung von DNA aus Pflanzen auf Bakterien sein. Transformation ist die Aufnahme freier DNA und deren stabile Integration in Bakterienzellen. Für einen solchen Vorgang wären folgende Schritte erforderlich:

1. Entlassung von DNA aus GVP-Zellen in die Umgebung (z.B. Boden, Wasser, Verdauungstrakt);
2. Anwesenheit von Bakterien, die im DNA-aufnahmefähigen Zustand (Kompetenz) sind;
3. Kontakt von intakter Pflanzen-DNA mit den Zellen und Aufnahme in die Zellen;
4. Integration der Pflanzen-DNA in das Genom der Zellen durch Rekombination oder Etablierung der DNA als autonom replizierendes Plasmid;
5. Überdauerung der Zellen, Vermehrung und Expression der integrierten DNA.

Die Transformation von Bakterien mit DNA aus GVP oder anderer DNA mit bakteriellem ARG wurde in zahlreichen Studien experimentell untersucht. Übereinstimmend wurde berichtet, dass ein HGT von bakteriellen ARG aus DNA-Sequenzen, wie sie in GVP vorliegen, auf Bakterien möglich ist, wenn homologe DNA-Regionen zum Antibiotika-Resistenzgen schon in den Bakterien vorhanden waren (de Vries and Wackernagel, 1998; de Vries *et al.*, 2001; de Vries *et al.*, 2003; Gebhard and Smalla, 1998; Iwaki and Arakawa, 2006; Kay *et al.*, 2002; Meier and Wackernagel, 2003; Nielsen *et al.*, 2000; Tepfer *et al.*, 2003). Die homologe Region ermöglichte die Integration der übertragenen bakteriellen ARG durch homologe Rekombination. In all diesen Studien konnte bei Abwesenheit der homologen Region im Bakteriengenom kein Transfer nachgewiesen werden. Dabei lag die Detektionsgrenze bei maximal  $10^{-11}$  (Transformationsereignisse pro Bakterienzelle).

Kürzlich wurde erstmalig der HGT eines bakteriellen ARG in Abwesenheit einer homologen Sequenz in den Bakterien mit einer Häufigkeit von  $7 \times 10^{-13}$  beobachtet. Sie war damit  $10^{10}$ -fach niedriger als in Gegenwart einer homologen Sequenz (Hülter and Wackernagel, 2008). Diese Häufigkeit wurde in einem optimierten Laborexperiment erhalten, bei dem eine maximal kompetente Reinkultur von Bakterien mit einer konzentrierten Lösung aus DNA-Abschnitten, die alle das Resistenzgen enthielten, behandelt wurde. Diese sehr geringe Häufigkeit aus dem optimierten Laborexperiment würde sich bei der Übertragung eines bakteriellen ARG aus GVP und unter natürlichen Bedingungen noch weiter verringern, weil

- a) die Konzentration des Resistenzgens allein schon durch die übrige Pflanzen-DNA (Genom und Plastom) sehr stark (ca.  $10^6$ -fach) verringert wird,
- b) nur von ca. 1 % aller heute identifizierten Bakterien bekannt ist, dass sie in bestimmten Wachstumsphasen transformierbar sind (de Vries *et al.*, 2004) und
- c) die Transformation unter natürlichen Bedingungen (z.B. im Boden) mit viel geringerer Effizienz abläuft als im optimierten *in vitro*-Experiment.

Mehrere Ursachen führen sehr wahrscheinlich zu weiteren Erniedrigungen der Transformationschance. Dazu zählen die relativ kurzen Halbwertszeiten von freier DNA in Böden (ca. 9 bis 28 h; Blum *et al.*, 1997; Recorbet *et al.*, 1993; Romanowski *et al.*, 1992; Romanowski *et al.*,



1993; Wackernagel, 2006; Widmer *et al.*, 1997), in Gewässern (ca. 1 min bis wenige Stunden; Fibi *et al.*, 1991; Lorenz and Wackernagel, 1994; Paul *et al.*, 1989; Phillips *et al.*, 1989) und im Verdauungstrakt (wenige Sekunden bis einige Stunden; (Einspanier *et al.*, 2001; Hohlweg *et al.*, 2001; Klotz *et al.*, 2002; Mercer *et al.*, 2001; Schubbert *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 2006; van den Eede *et al.*, 2004) wegen der in all diesen Habitaten anwesenden DNA abbauenden Enzyme (DNasen). Auch die Prozessierung von Nahrungsmitteln aus Pflanzen führt zur Degradierung von DNA (van den Eede *et al.*, 2004). Außerdem sind die ARG in GVP meist mit pflanzlichen Regulationssequenzen (Promotoren) ausgestattet, die eine Expression der Gene in Bakterien oft verhindern oder stark abschwächen (Lewin *et al.*, 1998; Jacob *et al.*, 2002).

Unter Berücksichtigung aller dieser Fakten ergibt sich eine Erniedrigung der unter optimierten Bedingungen gefundenen Transformationsfrequenz von  $7 \times 10^{-13}$  auf extrem geringe Werte (ca.  $10^{-20}$  oder niedriger) für den putativen Transfer eines bakteriellen ARG von GVP auf Bakterien. Demnach ist dieser theoretisch mögliche Transfer durch Transformation von Bakterien gegenüber der natürlichen Übertragung von bakteriellen ARG zwischen Bakterien in der Umwelt, z.B. durch Konjugation, mit Häufigkeiten von  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$  (Dröge *et al.*, 1998), um den Faktor von etwa tausend Milliarden ( $10^{12}$ ) niedriger.

Für einen HGT von Pflanzen auf Bakterien wurden keine Hinweise bei Untersuchungen von Bodenbakterien aus Anbauflächen von GVP erhalten (Badosa *et al.*, 2004; Demanèche *et al.*, 2008; Gebhard and Smalla, 1999). Ebenso ließ sich, außer Konjugation, kein anderer HGT im Verdauungstrakt von Tieren nachweisen (van den Eede *et al.*, 2004; Licht *et al.*, 2002; Alper *et al.*, 2003). Lediglich die experimentelle Transformation von *Streptococcus gordonii* mit Plasmid-DNA in der menschlichen Mundhöhle wurde berichtet (Mercer *et al.*, 2001).

## 2.2. Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen in der Umwelt

Trotz der äußerst geringen Wahrscheinlichkeit eines HGT von GVP auf Bakterien wird die Möglichkeit dieses Ereignisses in der Sicherheitsbewertung nicht ignoriert. Sie wird gegen die bereits vorhandene Verbreitung von Resistenzen gegen das entsprechende Antibiotikum abgewogen.

Viele Antibiotika sind natürliche Produkte des Sekundärmetabolismus von Mikroorganismen. Im Falle der Sensibilität gegen das eigene Antibiotikum müssen sich diese Mikroorganismen gegen einen potenziellen Selbstmord durch ihre eigenen Antibiotika schützen, z.B. mit Hilfe von Resistenzgenen oder chromosomalen Mutationen. Unabhängig von den Antibiotika-Produzenten haben sich auch bei anderen Mikroorganismen Antibiotika-Resistenzen als evolutive Antwort auf das natürliche Auftreten von Antibiotika gebildet. Als Konsequenz gibt es für jedes natürliche Antibiotikum Resistenzen in der Natur, die in den meisten Fällen auf chromosomalen Mutationen oder auf den durch mobile genetische Elemente übertragenen Resistenzgenen beruhen (Aminov and Mackie, 2007; Courvalin, 2008). Seit der Entdeckung der Übertragung von Resistenzdeterminanten durch konjugative Plasmide und Transposons wird die Konjugation zwischen Bakterien als der entscheidende Verbreitungsmechanismus von bakteriellen ARG angesehen (Watanabe, 1963; Courvalin, 2008).

Untersuchungen bestätigen, dass in Umwelthabitaten, wie Boden oder Wasser, ARG in Bakterien mit relativ großer Häufigkeit vorkommen, selbst wenn die jeweiligen Antibiotika dort nicht vom Menschen eingesetzt wurden (Seveno *et al.*, 2002; Leff *et al.*, 1993). Die folgende Aufzählung ist eine exemplarische Zusammenstellung solcher Untersuchungen:

- Ampicillin-Resistenzgene (z.B. *bla*<sub>TEM</sub>) wurden in 87,7 % von 576 Ampicillin-resistenten Isolaten aus landwirtschaftlich genutzten Böden gefunden; die Häufigkeit von Ampicillin-resistenten Bakterien in den getesteten landwirtschaftlich genutzten Böden aus Frankreich



betrug 0,4 % - 8 %. In den hier untersuchten Böden, die nicht landwirtschaftlich genutzt wurden, war die Ampicillin-Resistenz sogar höher (Demanèche *et al.*, 2008).

- Das Kanamycin-Resistenzgen *nptII* lag in 12,6 % von 355 Isolaten aus Wasser, Böden, Mist oder Abwasser in Deutschland vor (Smalla *et al.*, 1993).
- Tetrazyklin-Resistenzgene (z.B. *tetL*, *tetT* und *tetW*) wurden in Bakterien aus landwirtschaftlich genutzten Böden aus der Schweiz, Deutschland und den USA sowie aus nicht genutzten Böden aus den USA gefunden (Ghosh and LaPara, 2007; Schmitt *et al.*, 2006).
- Streptomycin-Resistenzgene [z.B. *aph* (3"), *aph* (6)-1d, *aph* (6)-1c, *ant* (3") und *ant* (6)] wurden in Organismen aus zahlreichen Proben aus Böden oder Wasser unterschiedlicher europäischer Herkunft gefunden; vier der beobachteten Gene waren in 58 % der untersuchten Habitate vertreten (van Overbeek *et al.*, 2002).
- Streptomycin/Spectinomycin-Resistenzgene (*aadA*) fanden sich in Bakterienisolaten aus Sedimenten der sibirischen Permafrostregionen (Mindlin *et al.*, 2008; Petrova *et al.*, 2008).

Laborexperimente zeigen, dass Gülle und Mist den HGT auf Bodenbakterien generell ansteigen lassen (Götz and Smalla, 1997; Smalla *et al.*, 2000). In der Landwirtschaft gelangen über die Düngung von Feldern mit Gülle und Mist aus der Viehhaltung nicht nur Antibiotika in die Böden, sondern auch Bakterien mit ARG und den entsprechenden mobilen genetischen Elementen (Witte, 2000; Boxall *et al.*, 2004; Binh *et al.*, 2008; Ghosh and LaPara, 2007; Heuer and Smalla, 2007; Smalla *et al.*, 2000).

Auch pathogene Bakterien zeigten häufig schon vor dem Einsatz von Antibiotika in der Medizin Resistenzen gegen Antibiotika. So waren 2 % von 433 Enterobacteriaceae, die zwischen 1917 und 1954 isoliert wurden, resistent gegen Tetrazyklin (Hughes and Datta, 1983).

Die mittlerweile weltweite Verbreitung von bakteriellen Antibiotika-Resistenzen in pathogenen und kommensalen Bakterien, wahrscheinlich als eine Folge der Anwendung von Antibiotika in der Medizin, ist sehr gut belegt:

- Von 49 multiresistenten *Acinetobacter baumannii*-Isolaten aus verschiedenen europäischen Krankenhäusern enthielten 75 % *tetA* oder *tetB* (Huys *et al.*, 2005).
- In 105 multiresistenten klinischen Isolaten von *Escherichia coli* O111 aus Deutschland, USA, Australien und anderen Ländern enthielten die identifizierten Integrons neben anderen bakteriellen Antibiotika-Resistenzgenen auch *tetA* (86 %), *bla<sub>TEM</sub>* (94 %) und *aadA1*-ähnliche Gene (66 %) (Guerra *et al.*, 2006).
- Von 135 Antibiotika-resistenten *Salmonella enterica*-Isolaten aus klinischen und anderen Proben in Brasilien besaßen 56 Integrons mit verschiedenen bakteriellen ARG; von den Isolaten besaßen 18,5 % *tetA*, 59,3 % *bla<sub>TEM</sub>* und 32,6 % *aadA* (Peirano *et al.*, 2005).

Diese Aufzählung lässt sich durch eine Reihe von weiteren Studien fortsetzen (z.B. Bartoloni *et al.*, 2006; Pallecchi *et al.*, 2008; Brenciani *et al.*, 2004; Cabrera *et al.*, 2004; Zolezzi *et al.*, 2007). In Deutschland und anderen europäischen Ländern werden Antibiotika-Resistenzen in einer Anzahl von pathogenen Bakterien durch Antibiotika- und Resistenz-Überwachungsprogramme erfasst und zeigen ebenfalls eine weite Verbreitung und hohe Abundanz von Antibiotika-Resistenzen (GERMAP, 2008; Ferech *et al.*, 2006; Danish Zoonosis Institute and Danish Veterinary Institute, 2001; EARSS, 2006).

Die globale Verbreitung von ARG in Bakterien, die von Tieren aus der Viehzucht oder Fleisch isoliert wurden, ist ebenfalls gut dokumentiert.



- Von 30 *Salmonella*-Isolaten aus Schweinen in China (2001-2003) trugen 93 % wenigstens ein ARG (Ma *et al.*, 2007).
- Von 123 *Salmonella*-Isolaten aus Hühnern, Schweinen und Puten in der tschechischen Republik waren 83 % resistent gegen Streptomycin, 83 % gegen Ampicillin, 55 % gegen Chloramphenicol, 74 % gegen Tetrazyklin und 4 % gegen Kanamycin (Havlickova *et al.*, 2008).
- Von 317 *Escherichia coli*-Isolaten, die in Deutschland in den Jahren 1999-2001 aus Rindern, Schweinen und Geflügel erhalten wurden, waren 40 % resistent gegen Antibiotika, wobei die Resistenzen gegen Sulfmethoxazol, Tetrazyklin oder Streptomycin (28 %-30 %) und Ampicillin oder Spectinomycin (15 %-19 %) am stärksten vertreten waren (Guerra *et al.*, 2003).
- Von 133 Salmonellen, die von Fleisch aus dem Einzelhandel in den USA und China isoliert wurden, waren 55 % resistent gegen ein Antibiotikum und 23 % multiresistent (Chen *et al.*, 2004).

In den hier beispielhaft aufgeführten Untersuchungen wurden ARG wie *sat1*, *tetA*, *tetB*, *nptI*, *nptII*, *bla<sub>PSE-1</sub>*, *bla<sub>TEM-1</sub>* oder *aadA* gefunden. Einige dieser ARG waren in Integrons organisiert, weshalb die Stämme mit Integrons multiple Resistenzen gegen Antibiotika zeigten.

Die Untersuchung von Stichproben von probiotischen und als Starterkulturen in der Lebensmittelindustrie verwendeten Bakterien der Gattungen *Lactobacillus*, *Weissella* und *Bifidobacterium* afrikanischer und europäischer Herkunft zeigte, dass in diesen Bakterien ARG wie *nptII*, *nptIII*, *aadA*, *aadE*, *tetS* oder *gyrA* weit verbreitet sind (Ouoba *et al.*, 2008).

Die ubiquitäre Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen in den beiden Hauptreservoirs Tier und Mensch und ihre damit verbundene globale Verbreitung durch Massentourismus, industrielle Viehhaltung und internationale Warenströme, ist durch eine Reihe weiterer Untersuchungen belegt (Miko *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2006; Peirano *et al.*, 2005; Travis *et al.*, 2006; Heuer *et al.*, 2002; Levy and Marshall, 2004; Molla *et al.*, 2007). Dabei wird der durch den Einsatz von Antibiotika aufgebaute Selektionsdruck als eine der wichtigen Triebfedern zur Ausbreitung von ARG auf mobilen genetischen Elementen gesehen.

Der HGT eines der bakteriellen ARG *nptII*, *aadA*, *bla<sub>TEM-1</sub>* und *tetA* aus GVP auf Bakterien in einem Habitat stellt dann keinen speziellen Selektionsvorteil mehr dar, wenn die Resistenz in dem Habitat bereits verbreitet ist, z.B. in Form von ARG oder chromosomalen Mutationen. In diesem Fall gelangt das Gen lediglich zurück in seinen natürlichen, global verbreiteten Genpool (Bennett, 2008). Ein mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit eventuell stattfindender HGT von Pflanzen auf Bakterien in der Umwelt oder dem Intestinaltrakt von Mensch und Tier kann die Resistenzsituation gegen die betroffenen Antibiotika nicht in einer Weise verändern, dass ein Risiko für Menschen, Tiere, Pflanzen oder die Umwelt zu befürchten wäre.

### 3. Schlussfolgerungen aus der wissenschaftlichen Überprüfung

Die wissenschaftliche Sicherheitsbewertung für die bakteriellen ARG *nptII*, *aadA*, *bla<sub>TEM-1</sub>* und *tetA* in GVP zeigt, dass die Verwendung dieser Gene keine schädlichen Auswirkungen auf die Gesundheit von Menschen, Tieren, Pflanzen und Umwelt erwarten lässt. Außer den in der Stellungnahme aufgeführten Daten zur gegenwärtigen Verbreitung dieser vier Gene sind im Anhang zu dieser Stellungnahme weitere Angaben als allgemeine Information zu diesen ARG und den korrespondierenden Antibiotika zu finden.

In Laborexperimenten unter artifiziellen Bedingungen konnte ein HGT von bakteriellen Sequenzen, wie sie in GVP vorliegen, auf Bakterien durch Transformation provoziert werden, wenn auch nur mit der sehr niedrigen Frequenz von ca.  $10^{-13}$ . Diese durch die optimierten Laborbe-



dingungen forcierte Transformationsfrequenz liegt  $10^5 - 10^{12}$  mal niedriger als der natürlich stattfindende relativ häufige HGT durch Konjugation zwischen Bakterien in der Umwelt ( $10^{-1}-10^{-8}$ ). In der Natur wurde ein HGT von bakteriellen ARG aus GVP auf Bakterien nicht nachgewiesen. Die hier durchgeführte Wahrscheinlichkeitsabschätzung eines solchen HGT geht für dieses Ereignis von einer Häufigkeit von weniger als  $10^{-20}$  aus. Diese äußerst geringe Frequenz ist mit den gegenwärtig zur Verfügung stehenden Techniken experimentell nicht überprüfbar und stellt eine Abschätzung für das eventuelle Auftreten eines solchen Ereignisses dar. Die evtl. zu erwartende, geringe Transferchance ( $<10^{-20}$ ) muss ebenfalls mit der weitaus höheren Chance für einen HGT durch Konjugation in der Umwelt ( $10^{-1}-10^{-8}$ ) verglichen werden (mindestens  $10^{12} - 10^{19}$  mal niedriger). Die Sicherheitsbewertung von bakteriellen ARG in GVP geht gleichwohl von einem möglichen Vorkommen eines HGT der Resistenzgene aus den Pflanzen auf Bakterien aus und wertet die sich ergebenden Konsequenzen vor dem Hintergrund der bereits vorliegenden allgemeinen Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen und der Verbreitung von einzelnen bakteriellen ARG, wie *bla*<sub>TEM-1</sub>, *nptII*, *aadA* und *tetA*.

Die wissenschaftliche Literatur zeigt, dass Antibiotika-Resistenzen mit dem Auftreten von Antibiotika in der Natur vorkommen. Antibiotika und Antibiotika-Resistenzen spielen eine wichtige Rolle im Wettstreit von Mikroorganismen um Habitate und Nährstoffe. Das Entstehen von resistenten Mikroorganismen wird hauptsächlich durch zufällig auftretende Mutationen und die häufiger auftretende Übertragung von mobilen genetischen Elementen (z.B. konjugativen Plasmiden oder Transposons) mit ARG verursacht. Selektionsdruck durch Antibiotika kann die Anreicherung von mobilen genetischen Elementen mit ARG in Mikroorganismen-Gemeinschaften verstärken. Durch den intensiven Einsatz von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin als auch in der Landwirtschaft wurde die globale Verbreitung von Resistenzen gegen alle genutzten Antibiotika und z.T. auch gegen nicht eingesetzte Antibiotika in den letzten 60 Jahren gefördert. Eine sehr große Zahl von Untersuchungen belegt die Existenz eines weltweiten Genpools von bakteriellen ARG, darunter auch die hier näher betrachteten Gene *bla*<sub>TEM-1</sub>, *nptII*, *aadA* und *tetA*. Der mögliche HGT solcher ARG aus GVP auf Bakterien hat aufgrund seiner Seltenheit und angesichts der globalen Verbreitung und großen Häufigkeit von Resistenzdeterminanten gegen Antibiotika keine erkennbare Erhöhung der Gesamthäufigkeit zur Folge. Dadurch ergibt sich auch keine nachteilige Auswirkung auf die Bekämpfung von pathogenen Bakterien mit Hilfe von Antibiotika und das Gleichgewicht zwischen sensiblen und resistenten Mikroorganismen in ihren Habitaten.

Die 1999 von der ZKBS vorgenommene Einteilung der ARG in Gruppen war unabhängig von einem möglichen HGT der Resistenzgene und allein der therapeutischen Bedeutung des jeweiligen Antibiotikums entsprechend erfolgt. Die weltweit unterschiedlichen und sich ändernden Regimes zur Therapie von Infektionen mit Antibiotika lassen eine allgemeingültige Einteilung von Antibiotika in Gruppen entsprechend ihrer Bedeutung und damit eine Gruppierung ihrer Resistenzgene nicht mehr als sinnvoll erscheinen. ARG in GVP werden von der ZKBS zukünftig in einheitlicher Weise (ohne die Berücksichtigung der 1999 aufgestellten Gruppen) in die Sicherheitsbewertung dieser Pflanzen einbezogen. Gleichzeitig ist in die jetzt vorgenommene Sicherheitsbewertung des HGT von ARG aus GVP auf Bakterien der neue wissenschaftliche Erkenntnisgewinn eingeflossen. Dies hat zu der Schlussfolgerung geführt, dass solche HGT-Ereignisse, falls sie stattfinden, in ihrem Gewicht vernachlässigbar sind gegenüber den natürlichen Prozessen ihrer Übertragung und Neuentstehung und der natürlichen Präsenz dieser Resistenzgene in der globalen Mikroorganismen-Gesellschaft.



## Literatur:

- Alpert, C. A., Mater, D. D., Muller, M. C., Ouriet, M. F., Duval-Iflah, Y., and Corthier, G. (2003) Worst-case scenarios for horizontal gene transfer from *Lactococcus lactis* carrying heterologous genes to *Enterococcus faecalis* in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Environ. Biosafety Res.* **2**: 173-180.
- Aminov, R. I., and Mackie, R. I. (2007) Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **271**: 147-161.
- Badosa, E., Moreno, C., and Montesinos, E. (2004) Lack of detection of ampicillin resistance gene transfer from Bt176 transgenic corn to culturable bacteria under field conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 169-178.
- Bartoloni, A., Pallecchi, L., Benedetti, M., Fernandez, C., Vallejos, Y., Guzman, E. *et al.* (2006) Multidrug-resistant commensal *Escherichia coli* in children, Peru and Bolivia. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 907-913.
- Bennett, P. M. (2008) Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* **153 Suppl 1**: S347-S357.
- Berg, D. E., Davies, J., Allet, B., and Rochaix, J. D. (1975) Transposition of R factor genes to bacteriophage lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**: 3628-3632.
- Binh, C. T., Heuer, H., Kaupenjohann, M., and Smalla, K. (2008) Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. *FEMS Microbiol. Ecol.* **66**: 25-37.
- Bliziotis, I. A., Samonis, G., Vardakas, K. Z., Chrysanthopoulou, S., and Falagas, M. E. (2005) Effect of Aminoglycoside and beta-Lactam Combination Therapy versus beta-Lactam Monotherapy on the Emergence of Antimicrobial Resistance: A Meta-analysis of Randomized, Controlled Trials. *Clin. Infect. Dis.* **41**: 149-158.
- Blum, S. A. E., Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1997) Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils. *System Appl. Microbiol.* **20**: 513-521.
- Boxall, A. B., Fogg, L. A., Blackwell, P. A., Kay, P., Pemberton, E. J., and Croxford, A. (2004) Veterinary medicines in the environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **180**: 1-91.
- Brenciani, A., Ojo, K. K., Monchetti, A., Menzo, S., Roberts, M. C., Valardo, P. E., and Giovanetti, E. (2004) Distribution and molecular analysis of *mef(A)*-containing elements in tetracycline-susceptible and -resistant *Streptococcus pyogenes* clinical isolates with efflux-mediated erythromycin resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**: 991-998.
- Bryan, L. E. (1984) Antimicrobial drug resistance. Academic Press, pp. 191-240.
- Bunnag, D., Karbwang, J., Na-Bangchang, K., Thanavibul, A., Chittamas, S., and Harinasuta, T. (1996) Quinine-tetracycline for multidrug resistant falciparum malaria. *Southeast A. J. Trop. Med. Pub. Health*: 15-18.
- Bush, K., Jacoby, G. A., and Medeiros, A. A. (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39**: 1211-1233.
- Cabrera, R., Ruiz, J., Marco, F., Oliveira, I., Arroyo, M., Aladuena, A. *et al.* (2004) Mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* Clinical isolates causing traveler's diarrhea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 3934-3939.
- Chaidemenos, G. C. (2001) Tetracycline and niacinamide in the treatment of blistering skin diseases. *Clin. Dermatol.* **19**: 781-785.
- Chen, S., Zhao, S., White, D. G., Schroeder, C. M., Lu, R., Yang, H. *et al.* (2004) Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1-7.



- Chopra, I., Hawkey, P. M., and Hinton, M. (1992) Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* **29**: 245-277.
- Chopra, I., and Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 232-260.
- Courvalin, P. (2008) Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* **264**: 4-16.
- Danish Zoonosis Institute, and Danish Veterinary Institute (2001) Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Copenhagen.
- Davies, J. E. (1991) Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes. In *Antibiotics in laboratory medicine*. Lorian, V. (ed). Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 691-713.
- Davis, J. E., and Smith, D. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annu. Rev. Microbiol.* (32), 469-518. 2008.
- Demanèche, S., Sanguin, H., Poté, J., Navarro, E., Bernillon, D., Mavingui, P. *et al.* (2008) Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**: 3957-3962.
- DePaola, A., Flynn, P. A., McPhearson, R. M., and Levy, S. B. (1988) Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline- and oxytetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1861-1863.
- deVries J., Heine, M., Harms, K., and Wackernagel, W. (2003) Spread of recombinant DNA by roots and pollen of transgenic potato plants, identified by highly specific biomonitoring using natural transformation of an *Acinetobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4455-4462.
- deVries J., Herzfeld, T., and Wackernagel, W. (2004) Transfer of plasmid DNA from tobacco to the soil bacterium *Acinetobacter* sp. by natural transformation. *Mol. Microbiol.* **53**: 323-334.
- deVries J., Meier, P., and Wackernagel, W. (2001) The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**: 211-215.
- deVries J., and Wackernagel, W. (1998) Detection of *npfII* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Mol Gen Genet* **257**: 606-613.
- Dröge, M., Pühler, A., and Selbitschka, W. (1998) Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. *J. Biotechnol.* **64**: 75-90.
- Dupont, H., Carbon, C., and Carlet, J. (2000) Monotherapy with a broad-spectrum beta-lactam is as effective as its combination with an aminoglycoside in treatment of severe generalized peritonitis: a multicenter randomized controlled trial. The Severe Generalized Peritonitis Study Group. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2028-2033.
- EARSS (2006) European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report 2005. Bilthoven.
- Einspanier, R., Klotz, A., Kraft, J., Aulrich, M., Poser, R., Schwägele, F. *et al.* The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. *Europ. Food Res. Technol.* 121, 129-134. 2001.
- European Food Safety Authority (2004) Opinion of the scientific panel on genetically modified organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants (question N° EFSA-Q2003-109). *The EFSA Journal* **48**: 1-18.
- European Food Safety Authority (12-4-2007) Statement of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the safe use of the *npfII* antibiotic resistance marker gene in genetically modified plants. 1-7.
- European Medicines Agency (2007) Presence of the antibiotic resistance marker gene *npfII* in GM plants for food and feed uses. 1-6.



- Ferech, M., Coenen, S., Malhotra-Kumar, S., Dvorakova, K., Hendrickx, E., Suetens, C., and Goossens, H. (2006) European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 401-407.
- Fibi, M. R., Bröker, M., Schulz, R., Johannsen, R., and Zettlmeissl, G. (1991) Inactivation of recombinant plasmid DNA from a human erythropoietin-producing mouse cell line grown on a large scale. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 622-630.
- Gebhard, F., and Smalla, K. (1998) Transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 by Transgenic Sugar Beet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1550-1554.
- Gebhard, F., and Smalla, K. (1999) Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**: 261-272.
- Georgetown University Center for Food and Nutrition Policy (1999) Antibiotic use in animals: food safety and risk assessment. Washington, D.C., Georgetown University. Conference Proceeding
- GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch: Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin (2008) Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.; Infektiologie Freiburg, pp 1-149.
- Ghosh, S., and LaPara, T. M. (2007) The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *ISME J* **1**: 191-203.
- Götz, A., and Smalla, K. (1997) Manure Enhances Plasmid Mobilization and Survival of *Pseudomonas putida* Introduced into Field Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1980-1986.
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Helmuth, R., Guth, B. E., and Beutin, L. (2006) Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* O111 isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**: 1210-1214.
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S., and Helmuth, R. (2003) Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**: 489-492.
- Havlickova, H., Hradecka, H., Bernardyova, I., and Rychlik, I. Distribution of integrons and SGI1 among antibiotic resistant *Salmonella enterica* isolates of animal origin. *Vet. Microbiol.* In Press, Accepted Manuscript.
- Heuer, H., Krogerrecklenfort, E., Wellington, E. M. H., Egan, S., van Elsas, J. D., van Overbeek, L. *et al.* (2002) Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**: 289-302.
- Heuer, H., and Smalla, K. (2007) Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ. Microbiol.* **9**: 657-666.
- Hillen, W., and Berens, C. (1994) Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 345-369.
- Ho, J. L., and Barza, M. (1987) Role of aminoglycoside antibiotics in the treatment of intra-abdominal infection. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **31**: 485-491.
- Hohlweg, U., and Doerfler, W. (2001) On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Mol. Genet. Genomics* **265**: 225-233.
- Hughes, V. M., and Datta, N. (1983) Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature* **302**: 725-726.
- Hülter, N., and Wackernagel, W. (2008) Double illegitimate recombination events integrate DNA segments through two different mechanisms during natural transformation of *Acinetobacter baylyi*. *Mol. Microbiol.* **67**: 984-995.



- Huys, G., Cnockaert, M., Vaneechoutte, M., Woodford, N., Nemeč, A., Dijkshoorn, L., and Swings, J. (2005) Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Res. Microbiol.* **156**: 348-355.
- Institute of Medicine, D.o.H.P.a.D.P. (1998) A Report of a study: Human health risks with the subtherapeutic use of penicillin or tetracyclines in animal feed. Washington, D.C., National Academy Press.
- Iwaki, M., and Arakawa, Y. (2006) Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 with DNA from commercially available genetically modified potato and papaya. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**: 215-221.
- Kay, E., Vogel, T. M., Bertolla, F., Nalin, R., and Simonet, P. (2002) In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (Transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3345-3351.
- Klotz, A., Mayer, J., and Einspanier, R. (2002) Degradation and possible carry over of feed DNA monitored in pigs and poultry. *Eur. Food Res. Technol. (Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.)* **214**: 271-275.
- Kresken, M., Hafner, D., and von Rosenstiel, N. (1999) Zeitliche Entwicklung der Antibiotikaresistenz bei klinisch wichtigen Bakterienspezies in Mitteleuropa. *Bundesgesundheitsblatt* **1**: 17-25.
- Lawrence, J. G., and Ochman, H. (1998) Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**: 9413-9417.
- Leff, L. G., Dana, J. R., McArthur, J. V., and Shimkets, L. J. (1993) Detection of Tn5-like sequences in kanamycin-resistant stream bacteria and environmental DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 417-421.
- Levy, S. B. (1984) Resistance to the tetracyclines. In Antimicrobial drug resistance. Bryan, L. E. (ed). Orlando, Florida: Academic Press, pp. 191-240.
- Levy, S. B. (1992) The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle New York: Plenum Press.
- Levy, S. B., and Marshall, B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **10**: S122-S129.
- Licht, T. R., Laugesen, D., Jensen, L. B., and Jacobsen, B. L. (2002) Transfer of the pheromone-inducible plasmid pCF10 among *Enterococcus faecalis* microorganisms colonizing the intestine of mini-pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 187-193.
- Livermore, D. M. (1995)  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 557-584.
- Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* **58**: 563-602.
- Ma, M., Wang, H., Yu, Y., Zhang, D., and Liu, S. (2007) Detection of antimicrobial resistance genes of pathogenic *Salmonella* from swine with DNA microarray. *J. Vet. Diagn. Invest.* **19**: 161-167.
- Meier, P., and Wackernagel, W. (2003) Monitoring the spread of recombinant DNA from field plots with transgenic sugar beet plants by PCR and natural transformation of *Pseudomonas stutzeri*. *Transgenic Res.* **12**: 293-304.
- Mercer, D. K., Scott, K. P., Melville, C. M., Glover, L. A., and Flint, H. J. (2001) Transformation of an oral bacterium via chromosomal integration of free DNA in the presence of human saliva. *FEMS Microbiol. Lett.* **200**: 163-167.
- Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., and Helmuth, R. (2005) Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**: 1025-1033.
- Mindlin, S. Z., Soina, V. S., Ptrova, M. A., and Gorlenko, Z. (2008) [Isolation of antibiotic resistance bacterial strains from East Siberia permafrost sediments]. *Genetika* **44**: 36-44.



- Molla, B., Miko, A., Pries, K., Hildebrandt, G., Kleer, J., Schroeter, A., and Helmuth, R. (2007) Class 1 integrons and resistance gene cassettes among multidrug resistant *Salmonella* serovars isolated from slaughter animals and foods of animal origin in Ethiopia. *Acta Tropica* **103**: 142-149.
- Nielsen, K. M., Elsas, J. D., Smalla, K., and van Elsas, J. D. (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413(pFG4 DELTA *nptII*) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1237-1242.
- Ouoba, L. I. I., Lei, V., and Jensen, L. B. (2008) Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Intern. J. Food Microbiol.* **121**: 217-224.
- Pallecchi, L., Bartoloni, A., Paradisi, F., and Rossolini, G. M. (2008) Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **6**: 725-732.
- Paul, J. H., Jeffrey, W. H., David, A. W., Deflaun, M. F., and Cazares, L. H. (1989) Turnover of Extracellular DNA in Eutrophic and Oligotrophic Freshwater Environments of Southwest Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1823-1828.
- Peirano, G., Agerso, Y., Aarestrup, F. M., and dos Prazeres, R. D. (2005) Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. from Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**: 301-305.
- Petrova, M. A., Gorlenko, Z., Soina, V. S., and Mindlin, S. Z. (2008) [Association of the *strA-strB* genes with plasmids and transposons in the present-day bacteria and in bacterial strains from permafrost]. *Genetika* **44**: 1281-1286.
- Phillips, S. J., Dalgarn, D. S., and Young, S. K. (1989) Recombinant DNA in wastewater: pBR322 degradation kinetics. *J. Water Pollut. Control Fed.* (61), 1588-1595.
- Postle, K., Nguyen, T. T., and Bertrand, K. P. (1984) Nucleotide sequence of the repressor gene of the TN10 tetracycline resistance determinant. *Nucleic Acids Res.* **12**: 4849-4863.
- Pradines, B., Spiegel, A., Rogier, C., Tall, A., Mosnier, J., Fusai, T. et al. (2000) Antibiotics for prophylaxis of *Plasmodium falciparum* infections: in vitro activity of doxycycline against Senegalese isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**: 82-85.
- Ramaswamy, S., and Musser, J. M. (1998) Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber. Lung. Dis.* **79**: 3-29.
- Recorbet, G., Picard, C., Normand, P., and Simonet, P. (1993) Kinetics of the persistence of chromosomal DNA from genetically engineered *Escherichia coli* introduced into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4289-4294.
- Romanowski, G., Lorenz, M. G., Saylor, G., and Wackernagel, W. (1992) Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3012-3019.
- Romanowski, G., Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1993) Plasmid DNA in a groundwater aquifer microcosm-adsorption, DNAase resistance and natural genetic-transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Ecol.* **2**: 171-181.
- Sanders, C. C., and Sanders, W. E. (1992)  $\beta$ -Lactam resistance in Gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact. *Microb. Ecol.* **15**: 824-839.
- Schmitt, H., Stoob, K., Hamscher, G., Smit, E., and Seinen, W. (2006) Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: microcosm and field studies. *Microb. Ecol.* **51**: 267-276.
- Scholz, H., Vogel, F., und Expertenkommission der PEG (2004) PEG-Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Kindern. *Chemotherapie Journal* **3**: 115-133.
- Schubbert, R., Lettmann, C., and Doerfler, W. (1994) Ingested foreign (phage m13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 495-504.



- Schwarz, E., and Regev-Yochay, G. (1999) Primaquine as prophylaxis for malaria for nonimmune travelers: a comparison with mefloquine and doxycycline. *Clin. Infect. Dis.* **29**: 1502-1506.
- Seveno, N. A., Kallifidas, D., Smalla, K., van Elsas, J. D., Collard, J.-M., Karagouni, A. D., and Wellington, E. M. H. (2002) Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. *Rev. Med. Microbiol.* **13**: 15-27.
- Sharma, R., Damgaard, D., Alexander, T. W., Dugan, M. E., Aalhus, J. L., Stanford, K., and McAllister, T. A. (2006) Detection of transgenic and endogenous plant DNA in digesta and tissues of sheep and pigs fed Roundup Ready canola meal. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 1699-1709.
- Smalla, K., Heuer, H., Gotz, A., Niemeyer, D., Krogerrecklenfort, E., and Tietze, E. (2000) Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4854-4862.
- Smalla, K., van Overbeek, L. S., Pukall, R., and van Elsas, J. D. (1993) Prevalence of *nptII* and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**: 47-58.
- Smith, H. L., and Rajan, T. V. (2000) Tetracycline inhibits development of the infective-stage larvae of filarial nematodes in vitro. *Exp. Parasitol.* **95**: 265-270.
- Stille, W., Brodt, R. H., Groll, A. H., and Just-Nübling, G. (2006) Aminoglykoside. In *Antibiotika-Therapie*. Stuttgart: Schattauer, pp. 145-158.
- Tauch, A., Pühler, A., Kalinowski, J., and Thierbach, G. (2000) TetZ, a new tetracycline resistance determinant discovered in gram-positive bacteria, shows high homology to gram-negative regulated efflux systems. *Plasmid* **44**: 285-291.
- Tepfer, D., Garcia-Gonzales, R., Mansouri, H., Seruga, M., Message, B., Leach, F., and Perica, M.C. (2003) Homology-dependent DNA transfer from plants to a soil bacterium under laboratory conditions: implications in evolution and horizontal gene transfer. *Transgenic Res.* **12**: 425-437.
- Tomalsky, M. E., and Crosa, J. H. (1987) Tn1331, a novel multiresistant transposon encoding resistance to amikacin and ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 1955-1960.
- Travis, R. M., Gyles, C. L., Reid-Smith, R., Poppe, C., McEwen, S. A., Friendship, R. *et al.* (2006) Chloramphenicol and kanamycin resistance among porcine *Escherichia coli* in Ontario. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**: 173-177.
- Trieu-Cuot, P., Arthur, M., and Courvalin, P. (1987) Origin, evolution and dissemination of antibiotic resistance genes. *Microbiol. Sci.* **4**: 263-266.
- van den Eede, G., Aarts, H., Buhk, H. J., Corthier, G., Flint, H. J., Hammes, W. *et al.* (2004) The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food Chem. Toxicol.* **42**: 1127-1156.
- van Overbeek, L. S., Wellington, E. M. H., Egan, S., Smalla, K., Heuer, H., Collard, J. M. *et al.* (2002) Prevalence of streptomycin-resistance genes in bacterial populations in European habitats. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**: 277-288.
- Vogel, F., Bodmann, K. F., und Expertenkommission der PEG (2004) PEG-Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen. *Chemotherapie Journal* **2**: 46-105.
- Wackernagel, W. (2006) The various sources and the fate of nucleic acids in soil. In *Soil Biology - Nucleic Acids and Proteins in Soil*. Nannipieri P., and Smalla K. (eds). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 117-139.
- Watanabe, T. (1963) Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* **42**: 277-288.
- Widmer, F., Seidler, R. J., Donegan, K. K., and Reed, G. L. Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field. *Mol. Ecol.* **7**, 1-7. 1997.



- Witte, W. (2000) Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *Int. J. Antimicrob. Agents* **14**: 321-325.
- World Health Organisation (18-2-2005) Critically important antibacterial agents for human medicine for risk management strategies of non-human use.1-15.
- Yildirim, I., Aytac, S., Ceyhan, M., Cetin, M., Tuncer, M., Cengiz, A. B. *et al.* (2008) Piperacillin/tazobactam plus amikacin versus carbapenem monotherapy as empirical treatment of febrile neutropenia in childhood hematological malignancies. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **25**: 291-299.
- Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (1999) Bekanntmachung des Robert-Koch-Institutes - Stellungnahme der ZKBS zur Biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen. *Bundesgesundheitsblatt.* 975-978.
- Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (2007) Ergänzende Stellungnahme der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) zur biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen vom 5. Juni 2007 (BVL 52/2007/4). *Bundesanzeiger.* 6827-6829.
- Zolezzi, P. C., Cepero, P. G., Ruiz, J., Laplana, L. M., Calvo, C. R., and Gomez-Lus, R. (2007) Molecular epidemiology of macrolide and tetracycline resistances in commensal *Gemella* sp. isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 1487-1490.



## Anhang: Informationen zu einzelnen ARG und den korrespondierenden Antibiotika

### A1. Aminoglykoside

Aminoglykoside haben einen begrenzten Wert in der antimikrobiellen Therapie der Humanmedizin. In der GERMAP-Studie 2008 wird festgestellt, dass in Krankenhäusern wenig Aminoglykoside verwendet werden. Unter den für gesetzlich Versicherte ambulant verschriebenen Antibiotika tauchen Aminoglykoside gar nicht auf (GERMAP, 2008). Im European Surveillance of Antimicrobial Consumption-Report werden die Aminoglykoside in der kleinen Gruppe „Others“ zusammen mit anderen Antibiotika aufgeführt (Ferech *et al.*, 2006).

Die geringe Bedeutung in der Humanmedizin liegt zum einen in der Applikationsform – außer auf dem parenteralen Weg können sie nur topisch (insbes. Haut, Auge, Darmlumen) bzw. nach Verneblung in den Atemwegen wirkend verabreicht werden (Stille *et al.*, 2006). Zudem werden sie bei allen parenteralen Anwendungen nur in Kombination mit anderen Antibiotika eingesetzt, nie als Monotherapie (Vogel *et al.*, 2004; Scholz *et al.*, 2004). Heute lassen sich gleich wirksame Kombinationstherapien in praktisch allen Fällen auch mit anderen Wirkstoffklassen durchführen (Ho and Barza, 1987; Dupont *et al.*, 2000; Yildirim *et al.*, 2008; Bliziotis *et al.*, 2005).

Bei der topischen Monotherapie mit Aminoglykosiden spielen für die laufende Therapie Resistenzentwicklungen oder bereits vorhandene Resistenzen keine Rolle, weil lokal mit sehr hohen Antibiotikumskonzentrationen gearbeitet werden kann, die weit über den für Patienten verträglichen Gewebespiegeln liegen.

Zum anderen wirken Aminoglykoside Dosis-abhängig Oto- und Nephro-toxisch sowie lähmend auf die neuro-muskuläre Endplatte (z.B. Amikacin) (Stille *et al.*, 2006). Allein wegen dieser Nebenwirkungen sind sie vielen moderneren Antibiotika unterlegen.

Kanamycin wird als potentiell Reserveantibiotikum bei Infektionen mit multiresistenten *M. tuberculosis* gesehen. Allerdings ist es neben Amikacin oder Capreomycin nur eines von mehreren möglichen Reserveantibiotika. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die Kanamycinresistenz bei *M. tuberculosis* meist chromosomal durch Punktmutationen im 16S rRNA-Gen bedingt ist. Diese Bakterien sind nicht natürlich kompetent, weshalb die Verfügbarkeit des *nptII*-Gens in der Umgebung für die Resistenzentwicklung bedeutungslos ist. Auch von anderen intrazellulären Pathogenen (z.B. Mycobakterien, Chlamydien, *Rickettsia*, *Coxiella* und *Ehrlichia*) ist nicht bekannt, dass sie unter natürlichen Bedingungen DNA austauschen (Courvalin, 2008).

Streptomycin und Spectinomycin werden nur begrenzt in der Humanmedizin zur Behandlung von Tuberkulose (Streptomycin), der Gonorrhoe (Spectinomycin), bei Tularämie oder Brucellose bzw. in Kombination mit  $\beta$ -Laktamantibiotika zur Therapie von durch Enterokokken verursachter Endokarditis eingesetzt.

#### A1.1. Das *nptII*-Gen

Das *nptII*-Gen stammt von dem Transposon Tn5 aus *Escherichia coli* K12 (Berg *et al.*, 1975) und kodiert für eine Neomycin-Phosphotransferase. Die Neomycin-Phosphotransferase ist eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs II (APH(3')II), welche die ATP-abhängige Phosphorylierung der 3'-Hydroxyl-Gruppe des Aminohexose-Rings bestimmter Aminoglycosid-Antibiotika katalysiert und sie damit inaktiviert. Das Enzym zeichnet sich durch eine hohe Substratspezifität aus (Nap *et al.*, 1992). Zu den Substraten der APH(3')II-Enzyme zählen die Anti-



biotika Kanamycin, Neomycin, Geneticin, Butirosin, Gentamicin A und B sowie Paromomycin. Die in der Humanmedizin therapeutisch bedeutsamen Amikacin, Gentamicin (vorwiegend C<sub>1</sub>, C<sub>1α</sub> und C<sub>2</sub>) und sonstige Aminoglycoside und Aminocyclitole gehören nicht zum Substratspektrum der APH(3')-II-Enzyme (Davies, 1991; Stille *et al.*, 2006; Trieu-Cuot *et al.*, 1987).

### A1.2. Das *aadA* [Strep<sup>R</sup>/Spec<sup>R</sup>]-Gen

Das *aadA*-Gen [*ant*(3′)-Ia; Strep<sup>R</sup>/Spec<sup>R</sup>] stammt aus dem Plasmid R538-1 von *Escherichia coli* und kodiert für eine Streptomycin-Adenyltransferase (Davis and Smith, 2008; Sanders and Sanders, 1992). Tomalsky and Crosa (1987) wiesen das *aadA*-Gen auch auf dem Multiresistenz-Transposon Tn1331 in *Klebsiella pneumoniae* nach. Die Streptomycin-Adenyltransferase modifiziert die 3′-OH Position des Streptomycin-N-methyl-L-glucosamin-Rings bzw. eine 9-OH Position des Spectinomycins.

## A2. β-Laktame

Die β-Laktam-Antibiotika weisen alle in ihrer Strukturformel einen Laktam-Ring auf. Sie gehen auf das Penicillin zurück, das aus der Kultur des Schimmelpilzes *Penicillium notatum* isoliert wurde. Sie wirken bakterizid, indem sie die Peptidoglykansynthese bei der Zellteilung hemmen. Unterschiede in der Wirksamkeit begründen sich vor allem auf unterschiedliche Affinität und Penetrationsfähigkeit. β-Laktam-Antibiotika werden heutzutage überwiegend halbsynthetisch erzeugt.

Sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin bilden sie mit den Tetrazyklinen die am häufigsten und am vielfältigsten angewandte Gruppe. Beim Menschen ist die Verwendung von Ampicillin zur Behandlung von Atemwegsinfektionen weit verbreitet. Bei Infektionen, z.B. mit Enterokokken oder mit *Listeria monocytogenes*, wird Ampicillin weiterhin als Mittel der Wahl betrachtet. In der Veterinärmedizin werden Ampicillin gegen Mastitis bei Rindern und Amoxycillin gegen bakterielle Atemwegsinfektionen und Infektionen des Urogenitaltraktes bei Rindern, Schweinen und Schafen eingesetzt. Amoxycillin wird auch zur Bekämpfung von bakteriellen Erregern in Hunden und Katzen angewendet.

Viele ursprünglich empfindliche Krankheitserreger haben eine Resistenz gegen β-Laktam-Antibiotika entwickelt. Der Gebrauch von Ampicillin ist heute nur dann angezeigt, wenn zuvor die Ampicillin-Sensitivität im Test nachgewiesen wurde.

### A2.1. Das *bla*<sub>TEM-1</sub>-Gen

Das *bla*<sub>TEM-1</sub>-Gen kodiert für die weit verbreitete TEM-1-β-Laktamase (Sanders and Sanders, 1992). Dieses Gen wurde zusammen mit dem Transposon Tn3 (von dem Plasmid R7268) aus einem bakteriellen Isolat von dem Patienten Thomas Edison Murphy (TEM) isoliert. Im molekularbiologischen Sprachgebrauch wird es als *amp<sup>r</sup>* oder *bla*<sub>TEM-1</sub> bezeichnet und liegt auf einer Reihe von Klonierungsvektoren vor (pBR322-Derivate, pUC-Serie etc.). Das Substratspektrum des TEM-1-Enzyms umfasst hauptsächlich Ampicillin, Penicillin G und Amoxycillin. Neuere Cephalosporine zeigen nur eine sehr geringe Empfindlichkeit gegen die *bla*<sub>TEM-1</sub>-β-Laktamase. Zudem ist das Enzym durch β-Laktamase-Hemmer wie Clavulansäure oder Tazobactam inhibierbar. Jedoch kann bei *E. coli* eine hohe Expression von *bla*<sub>TEM-1</sub> Resistenz gegen Amoxicillin/Tazobactam und gegen andere Kombinationen von β-Laktam-Antibiotika mit β-Laktamase-Inhibitoren hervorrufen (Sanders and Sanders, 1992). Mutationen des *bla*-Gens (z.B. TEM-30 bis TEM-41) können weiterhin dazu führen, dass die veränderten Enzyme nur schwach durch

Clavulansäure inhibierbar sind. Im Klassifizierungsschema von Bush *et al.* (1995) wurden solche Varianten als eigene Unterklasse 2br eingeführt.

Anfang dieses Jahrhunderts besaßen 35% der klinischen *E. coli*-Isolate eine Ampicillinresistenz (Kresken *et al.*, 1999). Diese war zu etwa 90% durch den  $\beta$ -Laktamasetyp TEM-1 bedingt (Livermore, 1995), der ebenfalls bei anderen Enterobakterien-Spezies sowie bei *Haemophilus* und bei *Neisseria gonorrhoeae* nachgewiesen wurde.

Es ist anzunehmen, dass fast jeder Mensch, auch ohne  $\beta$ -Laktam-Antibiotika exponiert zu sein, im Intestinaltrakt *E. coli*-Zellen beherbergt, die das *bla*<sub>TEM-1</sub>-Gen besitzen.

### A3. Tetrazykline

Tetrazykline gehören zu den preiswertesten verfügbaren Antibiotika heutzutage. Das macht sie besonders attraktiv für die Anwendung in Entwicklungsländern mit begrenzten Gesundheitsbudgets. Aber auch in Deutschland und anderen europäischen Ländern gehören sie neben den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu den am häufigsten eingesetzten Antibiotika in der Human und Veterinärmedizin (GERMAP, 2008; Ferech *et al.*, 2006).

Natürlicheweise synthetisieren Streptomyceten Tetrazykline als biogene Sekundärmetabolite über einen Polyketid-Weg. Als tetrazyklische Stoffwechselprodukte blockieren sie die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die Akzeptorstellen der 30S-Untereinheit der Ribosomen und somit die Verlängerung der Peptidkette (Chopra *et al.*, 1992). Ihre vergleichsweise geringe Toxizität für den Menschen kann durch ihre selektive Interaktion mit bakteriellen Ribosomen, nicht aber mit eukaryontischen Ribosomen erklärt werden.

Seit Anfang der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts sind Tetrazykline beim Menschen häufig zur Vorbeugung und Behandlung von allgemeinen Infektionen, besonders bei Atemwegserkrankungen, verschrieben worden. Sie wurden bevorzugt zur Therapie von Pneumonien durch *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia psittaci* eingesetzt (Chopra and Roberts, 2001). Mittlerweile werden oft Makrolide und neuere Quinolone für die Bekämpfung von Infektionen mit Mycoplasmen und Chlamydien bevorzugt. Aufgrund der Entdeckung, dass Tetrazykline zur Prophylaxe und Therapie von Malaria verwendet werden können, hat sich ihre Anwendungsbandbreite in der letzten Dekade vergrößert. Besonders zur Behandlung von Mefloquine-resistenten *Plasmodium falciparum* ist Doxycyclin das Mittel der Wahl (Bunnag *et al.*, 1996; Pradines *et al.*, 2000; Schwarz and Regev-Yochay, 1999). Zusätzlich werden Tetrazykline eingesetzt, um Infektionen mit *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Leishmania major*, *Trichomonas vaginalis* und *Toxoplasma gondii* zu behandeln. Seit kurzem ist bekannt, dass eine Tetrazyklin-Therapie von mit Nematoden-infizierten Tieren die Anzahl der erwachsenen Würmer und Microfilarien reduziert, was nahe legt, dass diese Gruppe von Antibiotika auch von Vorteil bei der Behandlung von Menschen sein könnten, die mit Nematoden infiziert sind (Smith and Rajan, 2000). Weil davon auszugehen ist, dass immer mehr Protozoen resistent gegen die herkömmlichen antiparasitären Medikamente werden, könnten Tetrazykline in den kommenden Jahren stärker zur Behandlung dieser Erkrankungen genutzt werden.

Tetrazykline haben eine Reihe weiterer Effekte, die ihr Einsatzgebiet beeinflussen. Sie wirken z.B. entzündungshemmend und immunsupprimierend, hemmen Lipase und Collagenase-Aktivitäten und fördern die Wundheilung. Diese Eigenschaften machen Tetrazykline auch für die Behandlung einer Vielzahl von nicht infektiösen Zuständen wie Akne oder Rosazea attraktiv (Chaidemenos, 2001; Ramaswamy and Musser, 1998).



In der Viehzucht werden Tetracykline vor allem in den USA in subtherapeutischen Konzentrationen als Wachstumsförderer eingesetzt (Georgetown University Center for Food and Nutrition Policy, 1999). In Europa ist die Verwendung von Tetracyklinen als Wachstumsförderer verboten. Auch in Aquakulturen von Lachs, Hummer und Wels werden Tetracykline zur Kontrolle von Infektionen angewandt (DePaola *et al.*, 1988; Institute of Medicine, 1998).

Neben der Verwendung in der Tier- und Humanmedizin dienen Tetracykline in der Landwirtschaft zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen (z.B. *Erwinia amylovora* oder *Xanthomonas campestris*) bei Nutzpflanzen auf Obst- und Palmenplantagen (Levy, 1992).

### A3.1. Das *tetA*-Gen

Das *tetA*-Gen stammt vom dem Transposon Tn10, welches aus *Escherichia coli* und verschiedenen Enterobakterien stammt, und kodiert für ein Membranprotein, das die Ausschleusung von Tetracyklinen bewirkt (Bryan, 1984; Postle *et al.*, 1984). Die Ausschleusung von Tetracyklin in Form eines Tetracyklin-Kationen-Komplexes erfolgt im Austausch gegen ein Proton.

TetA bildet zusammen mit den Proteinen TetB, TetC, TetD, TetE, TetG, TetH, TetI, TetJ, TetZ und Tet30 die erste von sechs Tetracyklin-Transportproteingruppen. Die Einteilung in die Gruppen erfolgt aufgrund der Aminosäureidentität und der Struktur. Die Tetracyklin-Resistenzgene der Gruppe 1 haben 41-78% Aminosäureidentität und besitzen 12 membrandurchspannende  $\alpha$ -Helices und eine lange zentrale, nicht konservierte Schleife zwischen den Helices 6 und 7.

Alle Proteine dieser Gruppe kommen nur in Gram-negativen Bakterien vor, bis auf TetZ, welches auch in Gram-positiven Bakterien gefunden wurde (Tauch *et al.*, 2000). Die Tetracyklin-Resistenzdeterminanten in Gram-negativen Bakterien bestehen immer aus Gruppen von zwei Genen. Das eine Gen kodiert für den Antiporter und das andere für ein Repressorprotein. Beide Gene werden durch Tetracyklin reguliert. In Abwesenheit des Antibiotikums ist die Expression beider Gene durch die Bindung des Repressors an die überlappende Promotor/Operator-Region der entgegengesetzt orientierten Gene blockiert. Erst durch Interaktion eines Tetracyklin-Mg<sup>2+</sup>-Komplexes mit dem Repressorprotein wird die Expression beider Gene aktiviert (Hillen and Berens, 1994; Levy, 1984).