

LGL

5. Fachtagung Gentechnik

in Oberschleißheim
am 26. November 2013

Band 8 der Schriftenreihe
Gentechnik für Umwelt und Verbraucherschutz

Für eine bessere Lesbarkeit haben wir bei manchen Personenbezeichnungen auf ein Ausschreiben der weiblichen Form verzichtet. Selbstverständlich sind in diesen Fällen Frauen und Männer gleichermaßen gemeint.

Herausgeber: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen

Telefon: 09131 6808-0
Telefax: 09131 6808-2102
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Internet: www.lgl.bayern.de
Bildnachweis: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Druck: Kaiser Medien GmbH, Nürnberg
Stand: August 2014

Autoren: Alle Manuskripte sind namentlich gekennzeichnet

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

Dr. Sven Pecoraro
Telefon: 09131 6808-5585
E-Mail: sven.pecoraro@lgl.bayern.de
Dr. Ulrich Busch
Telefon: 09131 6808-5234
E-Mail: ulrich.busch@lgl.bayern.de

© Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
alle Rechte vorbehalten

Gedruckt auf Papier aus 100 % Altpapier

ISSN 1866-7767	Druckausgabe
ISSN 1866-7775	Internetausgabe
ISBN 978-3-945332-07-8	Druckausgabe
ISBN 978-3-945332-08-5	Internetausgabe

Diese Druckschrift wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlwerbern oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Druckschrift nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Druckschrift zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden. Bei publizistischer Verwertung – auch von Teilen – wird um Angabe der Quelle und Übersendung eines Belegexemplars gebeten. Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die Broschüre wird kostenlos abgegeben, jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Diese Broschüre wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Für die Inhalte fremder Internetangebote sind wir nicht verantwortlich.



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung.
Unter Tel. 089 122220 oder per E-Mail unter direkt@bayern.de erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	4
<i>Gentechnik</i>	5
1 Weiße Gentechnologie – Von Vitaminen & Aromen zu Industriechemikalien...	5
2 Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA)	17
3 Voraussetzung für die "Ohne Gentechnik"-Kennzeichnung von Lebensmitteln- Der Verband Lebensmittel ohne Gentechnik (VLOG).....	25
<i>Analytik I</i>	31
4 Next Generation Sequencing	31
5 Transkriptionelle Biomarkersignaturen in der Lebensmittelüberwachung	41
6 Gentechnisch veränderte Viren.....	53
<i>Analytik II</i>	70
7 Parallele Quantifizierung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO)	70
8 Anwendungsbeispiel für die digitale PCR: Quantifizierung von Kuhmilchanteilen in Büffel-Mozzarella	77
9 Ligationsabhängige Sondenamplifizierung (LPA).....	82
Nachtrag	90

Vorwort

Sehr geehrte Leserinnen und Leser,



das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) veranstaltete am 26. November 2013 bereits zum fünften Mal die Fachtagung Gentechnik. Diese richtet sich insbesondere an Fachleute aus den Bereichen der Lebensmittelchemie, der Molekularbiologie, der Mikrobiologie, der Tiermedizin, sowie an Mitarbeiter der Gewerbeaufsicht, der Arbeitssicherheit und an Fachpersonal aus Wissenschaft, Behörden und der Praxis.

Der erste Themenblock der Tagung umfasste Vorträge zu allgemeinen Fragen der Gentechnik. Die Möglichkeiten der so genannten Weißen Gentechnik, bei der mittels gentechnisch veränderter Mikroorganismen und Enzyme unter anderem Vitamine, Aromen und Chemieprodukte gewonnen werden können, wurden an zahlreichen Beispielen anschaulich erläutert. Die Erörterung der Bedeutung und Aufgaben der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) im Rahmen der Zulassung und Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen sowie die Voraussetzungen und rechtlichen Bestimmungen für die Kennzeichnung von Lebensmitteln mit dem "ohne Gentechnik"-Logo rundeten den ersten Block ab. Die beiden Themenblöcke zur Analytik behandelten aktuelle Entwicklungen bei Analyseverfahren und deren Anwendungsbereiche. So wurde eine Methode zur parallelen Quantifizierung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) und dessen praktische Anwendung präsentiert, dessen Entwicklung das StMUV über ein Forschungsprojekt am LGL gefördert hatte. Das hochmoderne Verfahren der digitalen PCR, das am LGL derzeit etabliert wird, und die ligationsabhängige Sondenamplifizierung (LPA) als parallelisierter qualitativer Reaktionsansatz in der Analytik von gentechnischen Veränderungen bildeten den Abschluss der sehr gut besuchten Tagung.

Mein besonderer Dank gilt dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz, das uns konsequent bei der Durchführung von wissenschaftlichen Projekten unterstützt und damit die Laboranalytik und Überwachung auf dem Gebiet der Gentechnik fördert.

Ihr

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Zapf', written in a cursive style.

Dr. med. Andreas Zapf

*Präsident des Bayerischen Landesamtes für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit*

Gentechnik

1 Weiße Gentechnologie – Von Vitaminen & Aromen zu Industriechemikalien

Dr.-Ing. Jochen Schmid und Prof. Dr. Volker Sieber

Technische Universität München (TUM), Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe, Wissenschaftszentrum Straubing, Straubing

Die moderne Biotechnologie wird je nach Anwendungsfeld in verschiedene Bereiche unterteilt, die gern mit einer Farbe belegt werden, die das Anwendungsfeld besonders gut illustriert. So spricht man im medizinischen Bereich (z. B. Herstellung von Biopharmazeutika, Diagnostik) von der Roten Biotechnologie in Anlehnung an die Farbe des Blutes und im Bereich der biotechnologischen Pflanzenforschung (z. B. Züchtung von resistenten Sorten) von der Grünen Biotechnologie in Anlehnung an das Blattgrün. Diese Unterteilung findet zum einen aus dem generellen Trend heraus statt, Dinge zu kategorisieren aber auch, um durch die Namensgebung einem bestimmten Feld einen eigenen Wirkungsbereich und damit auch eine größere Bedeutung zu verschaffen. Hier sind zum Beispiel die recht neuen Bereiche der Blauen (marinen) Biotechnologie oder der gelben Biotechnologie (Nutzung von Insekten) zu benennen. Die farbliche Abgrenzung wird jedoch auch bewusst dazu eingesetzt, in der Bevölkerung inhaltlich positiv besetzte Themen von negativen abzugrenzen. So ist vor allem die „Grüne Biotechnologie“ bzw. - wenn es um gentechnische Methoden innerhalb der Grünen Biotechnologie geht die „Grüne Gentechnik“ - seit Jahrzehnten kontrovers diskutiert und in der öffentlichen Meinung eher negativ betrachtet, während Nutzen und Anwendung von gentechnischen Methoden im pharmazeutischen Bereich Dank der offensichtlichen Vorteile kaum in Frage gestellt werden.

Ein im letzten Jahrzehnt besonders dynamisches Feld der Biotechnologie ist die Weiße Biotechnologie. Hierbei geht es in erster Linie um die Anwendung mikrobieller System, d.h. von Mikroorganismen aber auch von Enzymen für die industrielle Produktion von Chemikalien. Die Zuordnung zur Weißen Biotechnologie kann über die Art der Prozesse aber vor allem auch über die verwendeten Rohstoffe und erhaltenen Produkte erfolgen. Abbildung 1.1. gib hier einen Überblick.

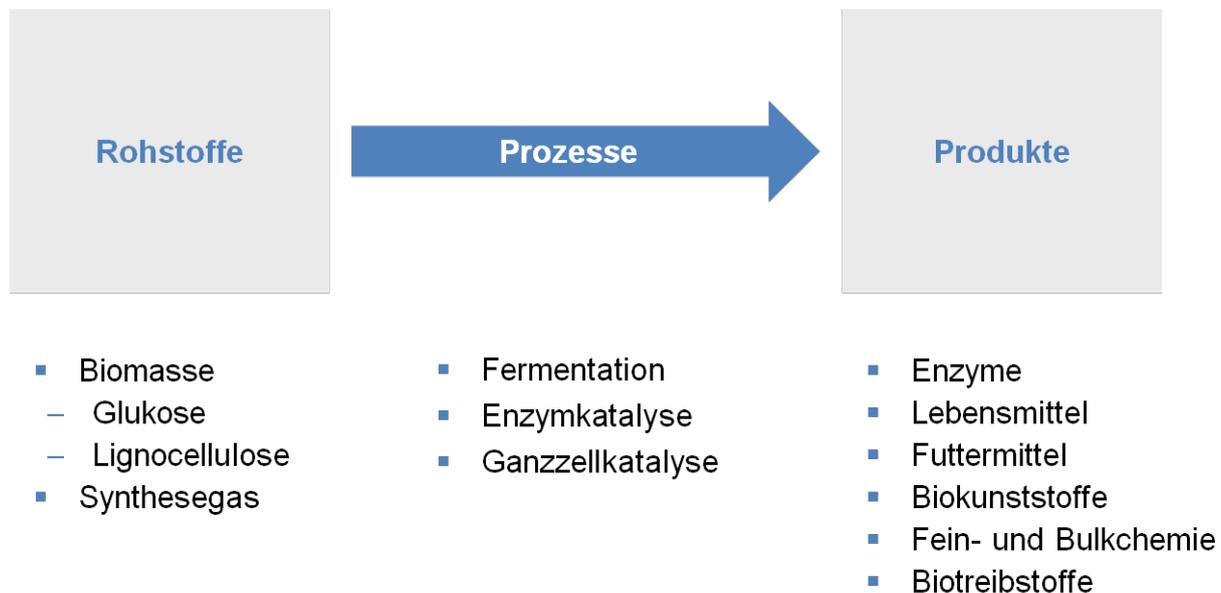


Abbildung 1.1: Charakteristika der Weißen Biotechnologie innerhalb der Rohstoffe, Produkte und Umsetzungsprozesse dafür

Die Nutzung von mikrobiellen Prozessen in der Nahrungsmittelproduktion stellen die ältesten biotechnologischen Prozesse der Menschheit dar. Hefe basiertes Bierbrauen und Weingären sind tausende Jahre alt. Auch die Verwendung von Enzymen wie z. B. zur Käseherstellung hat lange Tradition. Mit einer stärkeren Industrialisierung der Nahrungsmittelproduktion seit ca. 100 Jahren wird dieser Trend immer stärker vorangetrieben. Vor allem im asiatischen Raum sind fermentativ hergestellte Nahrungsmittel wie Sojasauce oder Tempeh nicht mehr wegzudenken. Bereits heute sind viele Produkte mit maßgeschneiderten Enzymcocktails versetzt, welche die gewünschte Textur und Haltbarkeit der Produkte garantieren. Auch im Bereich der Futtermittel werden Enzyme bereits in großem Maßstab eingesetzt. Die mikrobielle Herstellung von Aminosäuren wird bereits seit über 50 Jahren in großem Maßstab realisiert und stellt heute mit den größten Markt biotechnologisch hergestellter Produkte dar.

Den größten Schub verdankt die Weiße Biotechnologie allerdings der Produktion von Chemikalien. Bereits um 1800 herum wurde die mikrobielle Milchsäureherstellung entdeckt und wurde im Verlauf des 19. Jahrhunderts zu einem der wichtigsten Produkte erster „biotechnologischer“ Chemieunternehmen wie z. B. Boehringer Ingelheim. Milchsäure wurde damals hauptsächlich in Gerbereibetrieben eingesetzt. Zitronensäure stellt ebenfalls eines der bedeutenderen biotechnologisch hergestellten

Produkte im Chemiebereich dar. Eine transgene Variante des Schimmelpilzes *Aspergillus niger* wird hier genutzt, um äußerst effizient Zitronensäure herzustellen, die in die unterschiedlichsten Bereiche unseres Alltagslebens Einzug gehalten hat.

Die Biotechnologie ist der Chemie gerade bei der Synthese komplexer Moleküle überlegen, was dazu führt, dass in der Industrie chemische Prozesse durch biotechnologische abgelöst werden. Ein frühes Beispiel für einen solchen Wechsel bietet Vitamin B2. Die traditionelle chemische Syntheseroute für Vitamin B2 umfasst von Glukose ausgehend acht Reaktionsschritte. Mit einer Fermentation des filamentösen Pilzes *Ashbya gossypii* auf Sojaöl konnte die Synthese auf einen Schritt reduziert werden. Die biotechnologische Herstellung ist somit einfacher und bedarf weniger Zwischenschritte und Reagenzien [1]. Diese Umstellung ging mit einer Reduktion des Rohstoffverbrauchs von 60 %, einer Abfallreduzierung von 95 % und einer Verminderung der Produktionskosten um 40 % bei gleichzeitiger Reduzierung der CO₂ Emissionen von 30 % einher. Innerhalb von nur 11 Jahren fiel der Anteil des chemisch hergestellten Vitamin B2 an der Weltproduktion von 95 % (1990) auf nur noch 25 % (2001). Möglich wurde dies vor allem dadurch, dass für die Fermentation nicht mehr Wildtyp-Isolate verwendet werden müssen, sondern dass die Produktivität dieser Stämme durch klassische Mutagenese aber auch gentechnische Optimierung in den letzten Jahren enorm verbessert wurden.

Im letzten Jahrzehnt hat die weiße Biotechnologie einen enormen Schub vor allem durch den Rohstoffwandel in der chemischen Industrie erhalten, der die Rohstoffbasis weg vom Erdöl als Ausgangssubstrat hin zu der Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen führen soll [2]. Dass die Biotechnologie eine wichtige Rolle bei der Verwirklichung des Rohstoffwandels spielen kann, zeigt das Beispiel Acrylsäure. Diese Chemikalie ist ein wichtiges Intermediat z. B. für die Herstellung von Polyacrylaten, die in vielen Bereichen des täglichen Lebens Einsatz finden (Superabsorber in Windeln, Verdicker in Lacken, Flockulierungsmittel in der Abwasserbehandlung, Additiv in der Bauchemie). Historisch wurde Acrylsäure durch chemische Umsetzung von Kohle erhalten, derzeit wird sie aus Erdöl hergestellt. Bei beiden auf fossilen Rohstoffen basierenden Routen sind chemische Katalyse und chemische Prozesse notwendig. Auch auf Basis von Zuckern wie z. B. Saccharose oder Glukose lässt sich Acrylsäure herstellen (Abb. 1.2). Die Zucker können dabei aus Zuckerrüben

oder Stärkepflanzen wie Weizen oder Mais gewonnen werden, zunehmend aber auch aus biogenen „nachwachsenden“ Reststoffen wie Stroh oder Holz. Die Herstellung von chemischen Grundbausteinen auf biotechnologischem Weg zeigt auch den Produktwandel der Weißen Biotechnologie auf. Bis vor wenigen Jahren wurden nur einige wenige Spezialprodukte (Feinchemikalien) biotechnologisch hergestellt. Bereits heute läuft nun schon die Produktion von Grundchemikalien in großem Maßstab. Die Vorteile des geringeren Energiebedarfs und Einsparung an Chemikalien und Lösungsmitteln fördert diese Entwicklung maßgeblich. Zusätzlich ist die Umsetzung von Zuckern aufgrund der vorherrschenden Überfunktionalisierung der natürlichen Kohlehydrate auf chemischem Wege sehr aufwändig und die rentable Herstellung daher auf nur weniger Produkte limitiert. Hier sind optimierte Mikroorganismen und Enzyme überlegen, und werden in der Zukunft zu einem weitaus größeren Produktspektrum führen.

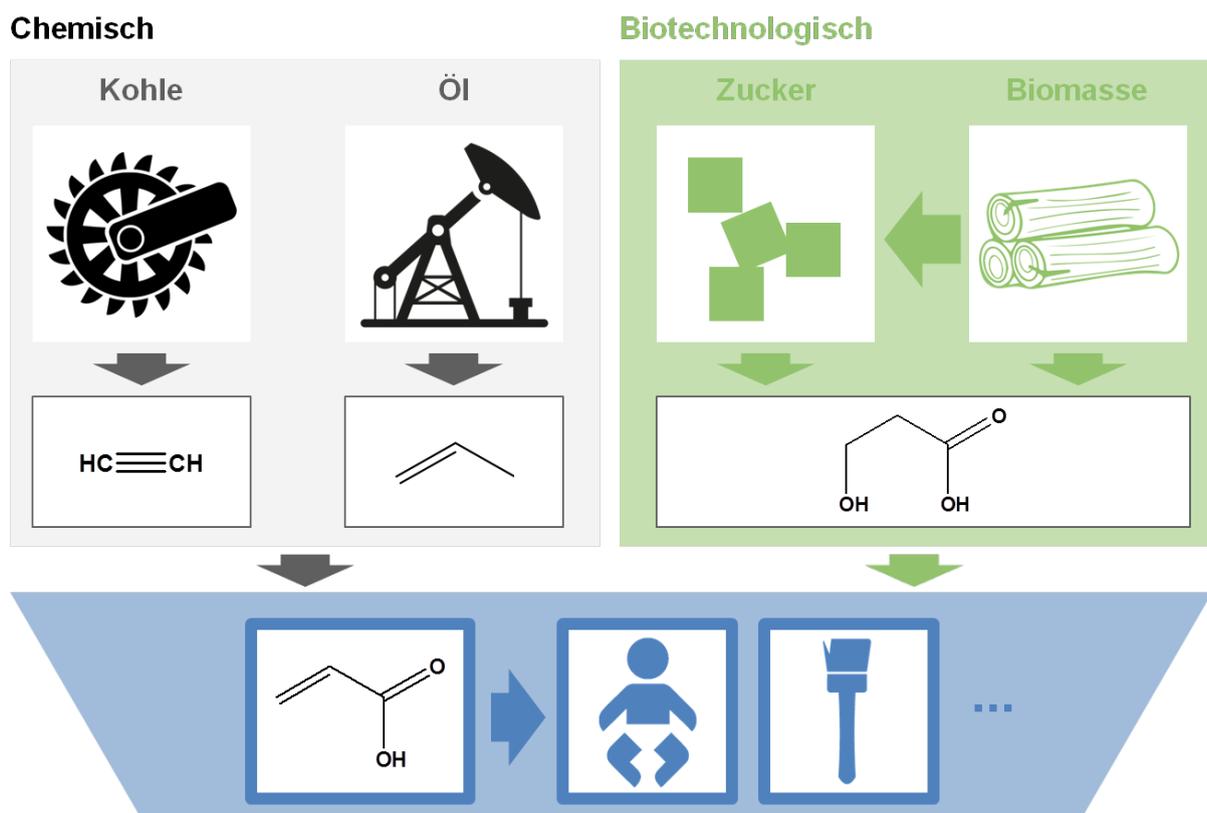


Abbildung 1.2: Erfolgreicher Rohstoffwandel zur Herstellung von Acrylsäure. Die Kohlechemie des frühen 20. Jahrhunderts wurde durch die Erdölchemie abgelöst. Die Weiße Biotechnologie erlaubt nun auch die Herstellung von Acrylsäure aus Zucker bzw. Lignocellulose.

Allerdings liegen die Prozesse und dafür geeigneten Mikroorganismen und Enzyme nicht auf der Straße, sondern es müssen hierfür neue Prozesse etabliert und aufwendig Enzyme wie Mikroorganismen identifiziert werden, die in der Lage sind, effizient die gewünschten Produkte zu synthetisieren. Abbildung 1.3 gibt einen Überblick der unterschiedlichen Entwicklungsstufen eines Prozesses in der Weißen Biotechnologie.

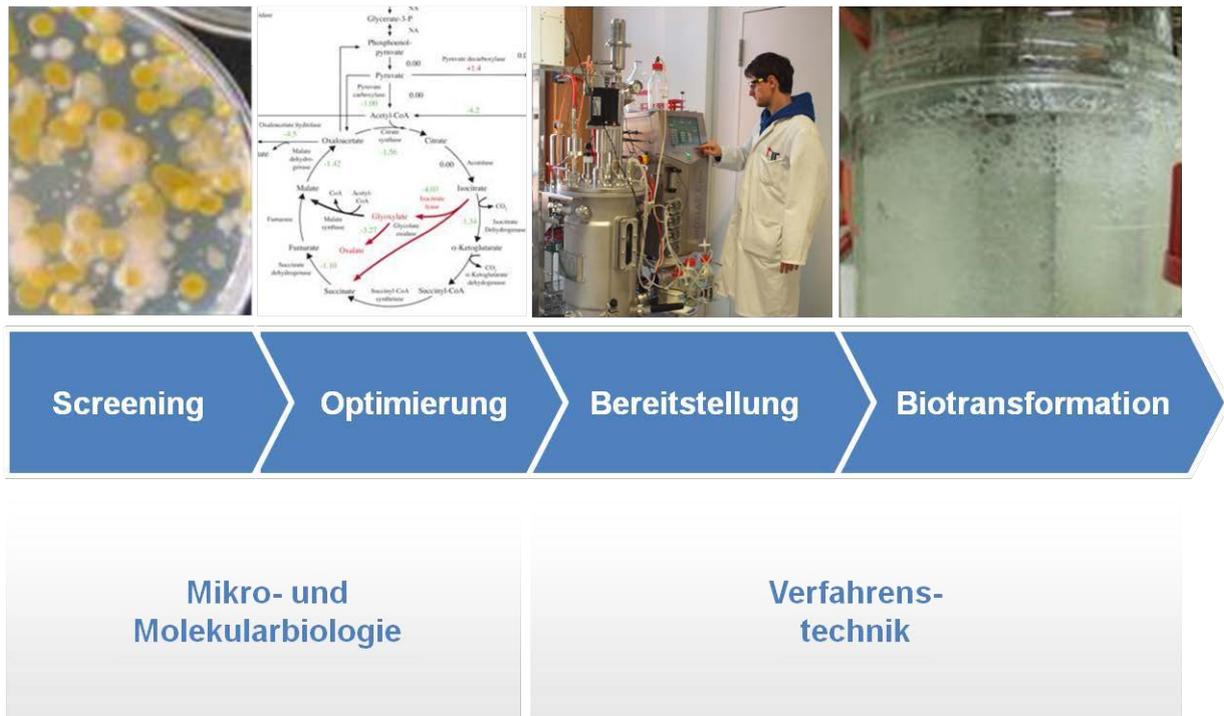


Abbildung 1.3: Vorgehen bei der Prozessentwicklung in der Weißen Biotechnologie. Nach erfolgreicher Identifizierung geeigneter Aktivitäten in Mikroorganismen oder Enzymen ist normalerweise deren Optimierung notwendig, damit sie technischen Prozessen genügen. Anschließend erfolgen die Bereitstellung und die Anwendung in der gewünschten Reaktion.

Die Biotechnologie bietet verschiedene Ansätze zur Identifikation und Optimierung notwendiger Enzyme und Mikroorganismen. Auch heute wird noch ständig nach neuen Stämmen und Enzymen aus verschiedensten Umwelthabitaten gescreent um die Diversität der mikrobiellen Werkzeuge zu erweitern. Hierfür kommen klassische mikrobiologische Arbeiten zum Tragen, aber auch immer verstärkter innovative Hochdurchsatzmethoden und im Falle des Enzymscreenings auch die Sequenzierungsmethoden der Nächsten Generation. Somit lässt sich auch die genetische Information von unter Laborbedingungen nicht kultivierbaren Mikroorganismen entschlüsseln. Anhand dieser sogenannten Metagenomansätze erweitert sich das

Portfolio an neuen Enzymvarianten mit neuen Eigenschaften permanent. Um geeignete Stämme optimal an einen Prozess anzupassen, bedarf es oft mehrerer Optimierungsschritte. Dies können einerseits die Verminderung von Nebenproduktbildung (knock-out Varianten) sein, oder andererseits die Einbringung von Enzymaktivitäten, welche zu neuen Produktionswegen führen. Alternativ können optimierte Enzymvarianten oder Regulationseinheiten eingebracht werden, um die Syntheserouten noch effektiver zu gestalten. Optimierung bezüglich Wachstumsgeschwindigkeit oder Akzeptanz verschiedener Substrate stellt hier auch einen wichtigen Aspekt dar. Die klassischen Methoden der Stammentwicklung basieren auf ungerichteten Veränderungen mittels UV Bestrahlung oder dem Einsatz von erbgutverändernden chemischen Substanzen. Anhand vieler Selektionsrunden werden die geeignetsten Stammvarianten ermittelt und bei Bedarf einer erneuten Mutageneserunde unterworfen. Diese Verfahren der „klassischen Mutagenese“ haben sich in der Stammentwicklung über mehrere Jahrzehnte bewährt (Beispiel Produktion der Aminosäure Valin), allerdings sind sie enorm zeitintensiv und resultieren nicht immer in der gewünschten, optimalen Variante. In der Pflanzenzüchtung sind sie trotzdem auch heute noch Stand der Technik, wenn es darum geht Gentechnik-freie Pflanzen mit verbesserten Eigenschaften zu erhalten.

Die rationale Stammentwicklung mit gentechnischem Eingriff hingegen hat das Potential die Syntheserouten ganz gezielt in die gewünschte Richtung zu verändern und zu regulieren. Diese gezielte Optimierung bedarf allerdings des Wissens über vielfältige Parameter, die in der Zelle vorherrschen. Erst mit Einzug der sogenannten „Omics“ Technologien, die es erlauben, die Gesamtheit bestimmter zellulärer Parameter zu erfassen, kann eine Zelle und die Veränderungen aufgrund rationaler Manipulationen erfasst werden. Einzelne Felder wie die sogenannten Genomics (Sequenzierung aller Gene des gesamten Organismus), Transkriptomics (Sequenzierung der aktiven Gene, zu einem bestimmten Zeitpunkt) oder Proteomics (Erfassung aller Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt) aus einer Population, sind heute in der Lage, Flaschenhälse in Syntheserouten zu identifizieren und zu beschreiben. Es zeigt sich, dass gezielte Veränderungen einzelner Syntheserouten sich oft an ganz anderer Stelle im Stoffwechsel der Zellen auswirken. Dies führte zu der Entwicklung der sogenannten Fluxomics, mittels welcher die Stoffflüsse in den Zellen beschrieben und

berechnet werden können. Mit Hilfe der Metabolomics, bei der alle chemischen Substanzen einer Zelle unter den vorherrschenden Bedingungen erfasst werden, kann die finale Antwort einer Zelle auf eine Veränderung beschrieben werden. Die Daten aus den verschiedenen "Omics" Technologien werden dazu genutzt, um Modelle der Zellen zu erstellen und genaue Vorhersagen auf die Ergebnisse der angedachten Veränderungen zu erhalten (Abb. 1.4) [3].

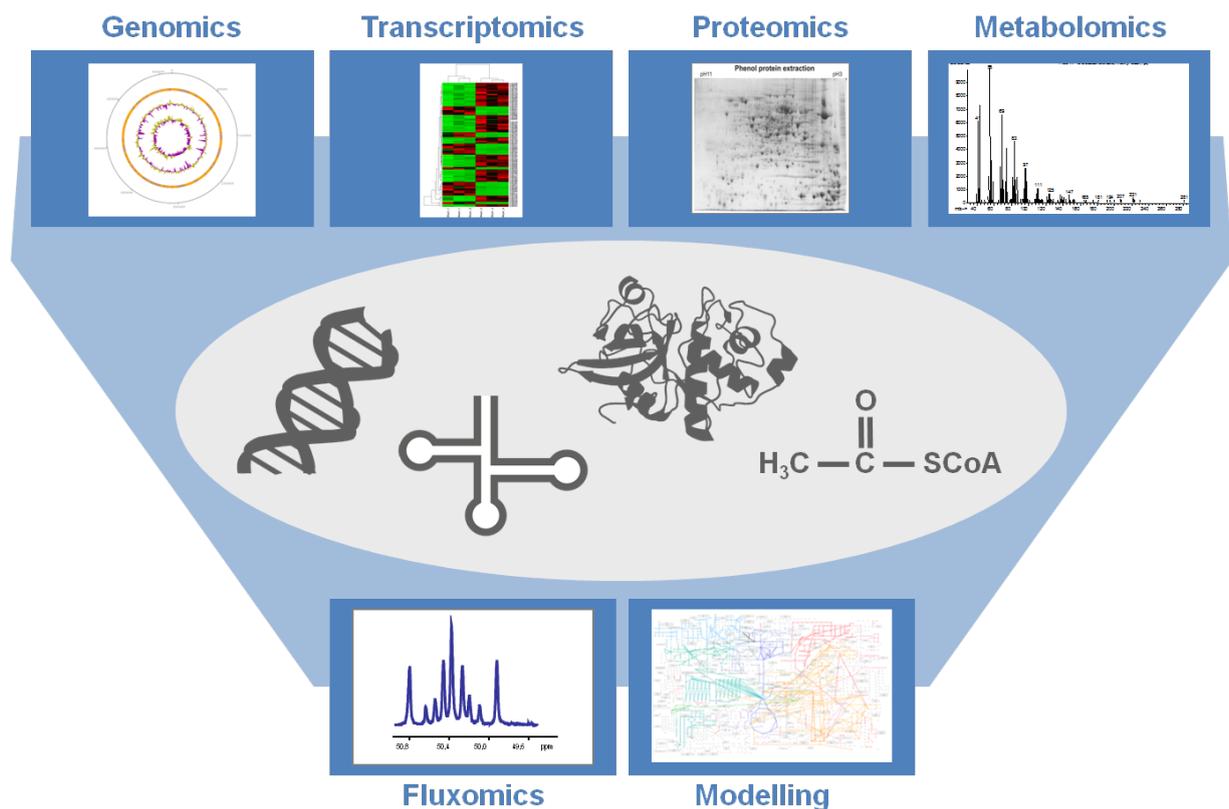


Abbildung 1.4: Ansatz der Systembiologie. Mittels der unterschiedlichen "Omics" Technologien können alle Parameter einer Zelle erfasst und so ein vollständiges Modell von ihr erstellt werden, um so notwendige Verbesserungen vorhersagen zu können.

Mittels Modellierungen können somit Angriffspunkte identifiziert werden, die verändert werden müssen, um die gewünschte Zielgröße zu erhalten. Dieser Ansatz der Weißen Biotechnologie zur Beschreibung einer ganzen Zellpopulation nennt sich Systembiologie und entwickelt sich im Moment weiter, um auch Einzelzellen zu beschreiben um noch exaktere Aussagen über den Zustand der einzelnen Mikroorganismen zu erhalten (*single cell analysis*).

Die rationale Stammentwicklung ist aufgrund dieser neuen Technologien in der Lage, ähnliche und bessere Ergebnisse im Vergleich zur klassischen Stammentwicklung in

viel kürzerer Zeit zu erreichen. So können heute in wenigen Monaten Verbesserungen erreicht werden, die mittels klassischer Entwicklung Jahre oder Jahrzehnte in Anspruch genommen hätten. Zusätzlich sind diese rationalen Manipulationen bezüglich Lokalisierung im Genom und den damit verbundenen Veränderungen bekannt. Die klassische Stammentwicklung hinterlässt dagegen ähnlich der radioaktiven Bestrahlung von Pflanzenpopulationen zur Erreichung schnellerer Züchtungserfolge, unbekannte Größen, welche nur durch komplette Sequenzierungen der Genome identifiziert werden können.

Ein Beispiel der erfolgreichen Stammoptimierung mittels der Weißen Biotechnologie stellt die neue mikrobielle Syntheseroute der schon oben beschriebenen Acrylsäure dar. Zur Realisierung dieses Syntheseweges musste u.a. eine neue Enzymaktivität in die Mikroorganismen eingebracht werden, um erfolgreich von der Glukose bis zum Endprodukt zu kommen. Das dazu notwendige Enzym, eine Beta Alanin Mutase (siehe Abb. 1.5) ist in der Natur nicht vorhanden. Hier zeigt sich das neben dem Verständnis über die Vorgänge in der Zelle (Systembiologie, „Omics“) und den Technologien zur Optimierung von Stoffwechselwegen (*Genetic* und *Metabolic Engineering*) auch das Enzymengineering maßgeblich für die Realisierung neuer Syntheserouten ist. Ist kein Enzym vorhanden, welches die gewünschte Umsetzung in der Zelle realisieren kann, oder kann dies nicht erfolgreich im Zielorganismus exprimiert werden, „so bringt man dem Enzym die gewünschte Umsetzung bei“.

Anhand sich ständig weiterentwickelnden Mutageneseverfahren für Enzyme lassen sich verschiedenste Charakteristika dieser Biokatalysatoren verändern. Hierzu gehören z. B. die Enzymaktivität, die Substratspezifität, Regulation und Stabilität [4]. Wichtig ist dabei die richtige Kombination aus rationalen Ansätzen und Zufallskomponenten. Anhand computergestützter Vorhersagemodelle lassen sich bereits Berechnungen bezüglich der Auswirkung der durchgeführten Modifikationen am Enzym durchführen. Allerdings sind diese Berechnungen nicht immer exakt und nicht alleinig ausreichend, um die Enzyme zu den gewünschten Eigenschaften zu führen. Ein Beispiel stellt hier die enzymatische Synthese der Feinchemikalie Sitagliptinphosphat dar, die von der Firma Merck entwickelt wurde. Mit rationalem, computergestütztem Enzymengineering konnte ein Enzyme designt werden, dass eine zumindest minimal

messbare Aktivität hatte (Umsatz von 1,4 mg Substrat pro Gramm Enzym pro Tag), was aber für eine Produktion deutlich zu schlecht war.

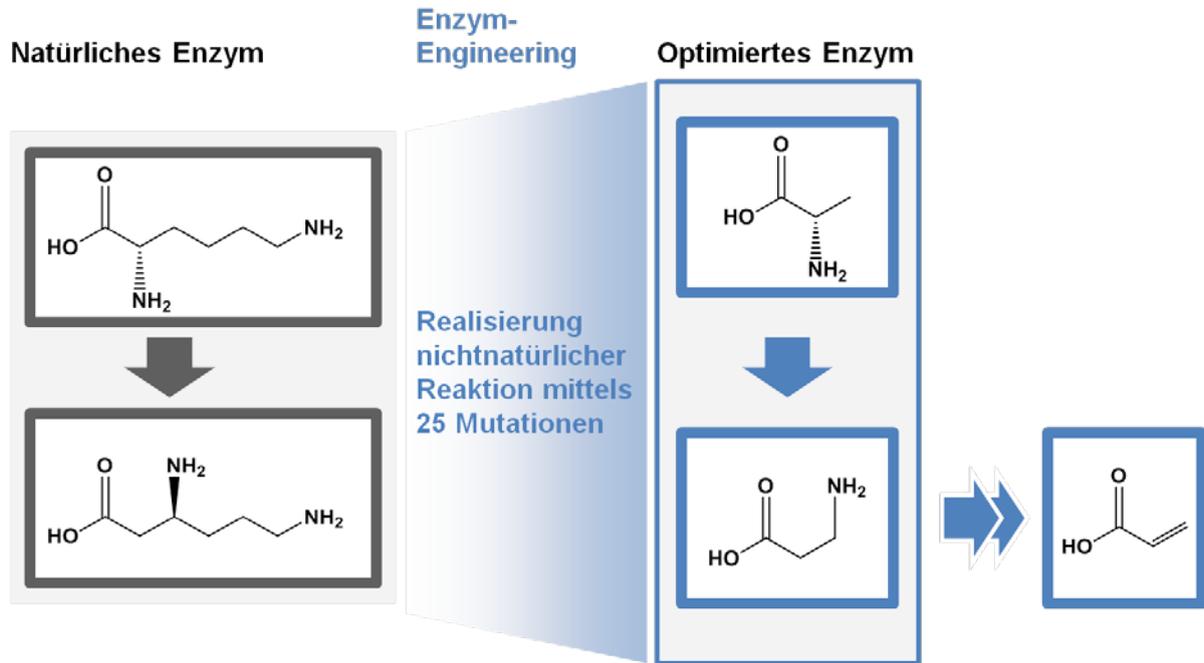


Abbildung 1.5: Strategie bei der Realisierung von nichtnatürlichen Reaktionen mittels Enzymengineering. Durch 25 eingefügten Mutationen konnte eine Umsetzung von alpha-Alanin in beta-Alanin verwirklicht werden, was die Synthese von Acrylsäure ermöglicht.

Nur durch eine anschließende auf das Gen gerichtete Zufallsmutagenese konnten 24 Mutationen identifiziert werden, die zusammen die Aktivität um einen Faktor von 34.000 erhöhten. Diese Mutationen hätten weder rational noch bei der heutigen Rechenkapazität computergestützt vorhergesagt werden können.

Trotz dieser bahnbrechenden Erfolge hinken die biotechnologischen Prozesse den chemischen in ihrer Entwicklungszeit noch hinterher. Beispiele an denen dies deutlich ist z. B. die Herstellung von Sorona, einem Kunststoff-Copolymer, welches aus 1,3-Propandiol und Terephthalsäure hergestellt wird. Die chemische Prozessentwicklung für die Synthese des Propandiolmonomers war hier deutlich schneller zu realisieren, sodass für die Etablierung der Soronafasern zunächst die chemische Syntheseroute verwendet wurde. Mittlerweile stammt das 1,3-Propandiol allerdings aus einem biotechnologischen Fermentationsprozess, basierend auf Maisstärke. Zur Realisierung des Syntheseweges zum 1,3-Propandiol mussten Elemente aus drei verschiedenen Mikroorganismen (Bakterien und Hefe) zusammengebracht werden.

Auch nichtnatürliche, also in der Natur bisher nicht gefundene Stoffe lassen sich biotechnologisch produzieren. Ein Beispiel dafür stellt 1,4-Butandiol dar, das als wichtiges Zwischenprodukt für die Herstellung von Lösungsmitteln oder Kunststoffen verwendet werden kann. Diese Bulkchemikalie hat ein Produktionsvolumen von ca. zwei Mio. Tonnen pro Jahr und wurde bis vor kurzem ausschließlich chemisch hergestellt. Eine biotechnologische Herstellung war nicht möglich, da keine natürliche Syntheseroute in Mikroorganismen dafür bekannt ist. Basierend auf Methoden der Weißen Biotechnologie existieren mittlerweile mehrere Wege um 1,4-Butandiol herzustellen. So ist es gelungen, einen Mikroorganismus soweit zu verändern, dass fermentativ 1,4-Butandiol hergestellt werden kann [5]. Dies wurde durch die Einbringung mehrerer Gene in den Mikroorganismus erreicht, die die nichtnatürlichen Umsetzungen ausgehend von normalen Stoffwechselintermediaten ermöglichen. Weitere erfolgreiche Beispiele der Nutzung nachwachsender Rohstoffe zur Produktion von Grundchemikalien auf biotechnologischem Weg sind z. B. Bernsteinsäure, die bereits in großem Maßstab von mehreren Chemieunternehmen fermentativ hergestellt wird. Hierfür kamen unterschiedliche Ansätze der Weißen Biotechnologie in verschiedenen Mikroorganismen zum tragen. Vor kurzem wurde auch die Herstellung des Kunststoffes PA12 aus Palmkernöl mittels biokatalytischen und fermentativen Prozessen ermöglicht. In diesen Ansätzen spiegelt sich das große Potential der Weißen Biotechnologie aber auch die Konkurrenz zu Nahrungsmitteln wieder. Diese so genannte "Teller oder Tank" Diskussion besteht seit der Einführung von Biokraftstoffen. Sie hat sich noch nicht auf den Bereich der stofflichen Nutzung ausgeweitet, da die für die stoffliche Nutzung verwendeten Mengen deutlich geringer sind und im Vergleich zur Nahrungsmittelproduktion nicht ins Gewicht fallen. Um einer Diskussion vorzubeugen und um die Chemieproduktion nicht in Konkurrenz zum Nahrungsmittelsektor zu setzen, bedarf es neuer Ansätze in der Quelle der verwendeten Biomasse. Hierfür zeigt die sogenannte Lignocellulose-haltige Biomasse das größte Potential. Lignocellulose-haltige Biomasse ist z. B. Holz oder Stroh, welches aus Cellulose, Hemicellulose und einem unterschiedlich hohen Anteil an Lignin aufgebaut ist. Dieser für die Nahrungsmittelherstellung ungeeignete nachwachsende Rohstoff ist allerdings sehr resistent gegenüber den bestehenden Aufschlussmethoden. Für eine effiziente Nutzung muss hier intensiv an geeigneten Methoden geforscht werden, um die darin

enthaltenen Zucker zugänglich für Mikroorganismen und Enzyme zu machen. Besonderes Augenmerk liegt hier auf der Optimierung von Cellulasen, den Enzymen, die analog der Amylasen bei der Stärke, die Glukosemonomere aus der starren Cellulosematrix lösen. Auch hier spielt die Weiße Biotechnologie eine entscheidende Rolle.

Ein neuerer Ansatz der Weißen Biotechnologie stellt die Entwicklung artifizieller Enzymkaskaden dar. Mittels der Verschaltung einzelner Enzyme, wie sie in den Stoffwechselwegen der Mikroorganismen vorkommen, lassen sich komplette Syntheserouten auch außerhalb der Zelle realisieren und verkürzen. Hierdurch erreicht man die Produktion der gewünschten Moleküle ohne störende Nebenprodukte oder Beeinflussungen durch den Zellstoffwechsel. Höchsteffiziente Prozesse nahe an der theoretisch maximalen Umsetzung lassen sich somit erreichen. Zusätzlich können toxische und neue, synthetische Produkte hergestellt werden, welche so mittels lebender Mikroorganismen nicht möglich sind. Die Verwendung optimierter Enzymvarianten erlaubt auch hohe Prozesstemperaturen, um die maximale Aktivität eines Enzyms zu nutzen (analog der Polymerase in der PCR Reaktion). Das erste Mal wurde eine Enzymkaskade 1985 zur Produktion von Ethanol aus Glukose mittels neun aufgereinigten Hefe-eigenen Enzymen eingesetzt. Jüngst wurde eine Enzymkaskade zur Generierung von Wasserstoff aus Stärke beschrieben. Durch die Verwendung Synthesepfad-fremder und evolvierter Enzyme lassen sich auch artifizielle Kaskaden bewerkstelligen. So wurde jüngst eine artifizielle Glykolyse realisiert, die mit nur vier Enzymen und unter Verwendung nur eines Cofaktors Pyruvat aus Glukose produziert [6]. Zum Vergleich besteht die natürliche Glykolyse in Hefe aus zehn Enzymen und benötigt zwei Cofaktoren. Durch die intelligente Verschaltung der Enzyme und dem Einsatz von neuen und optimierten Enzyme lassen sich somit bestehende Stoffwechselwege verkürzen und für technische Prozesse effizienter gestalten. Die Verwendung von promiskuitiven Enzymvarianten (erkennen mehr als ein Substrat) lässt hier sehr verkürzte Routen zu. Zwischenzeitlich existieren aber auch schon artifizielle Syntheserouten, die mittels Kaskadenverschaltung der einzelnen optimierten Biokatalysatoren, die Produktion von 1,4-Butandiol erlauben. Somit lässt sich dieser wichtige chemische Grundbaustein in hohen Konzentrationen herstellen, die für lebende Zellen tödlich wären.

Diese Beispiele sind nur der Anfang einer sich ständig schneller entwickelnden Weißen Biotechnologie, welche auf der Anwendung sich ebenso weiterentwickelnder molekularbiologischen Methoden basiert. Ohne Gentechnik und Methoden des Enzymengineering, sowie des Metabolic Engineerings wären diese Fortschritte nicht realisierbar. Die ständige Verknappung unserer Ressourcen zeigt die Dringlichkeit dieser Ansätze, da nur mittels schnell verfügbarer Technologien ein nachhaltiger Rohstoffwandel realisiert werden kann. Die Weiße Biotechnologie hat und wird auch in Zukunft maßgeblich dazu beitragen.

Literatur

1. Höfer, R., *Sustainable Solutions for Modern Economies*. RSC Publishing: 2009; p 1 - 524.
2. Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A.; Kragl, U., Industrial biotechnology-the future of green chemistry? *Green Chemistry* **2011**, 13 (11), 3007-3047.
3. Roldão, A.; Kim, I.-K.; Nielsen, J., Bridging Omics Technologies with Synthetic Biology in Yeast Industrial Biotechnology. In *Systems Metabolic Engineering*, Wittmann, C.; Lee, S. Y., Eds. Springer Netherlands: 2012; pp 271-327.
4. Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K., Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **2012**, 485 (7397), 185-194.
5. Yim, H.; Haselbeck, R.; Niu, W.; Pujol-Baxley, C.; Burgard, A.; Boldt, J.; Khandurina, J.; Trawick, J. D.; Osterhout, R. E.; Stephen, R.; Estadilla, J.; Teisan, S.; Schreyer, H. B.; Andrae, S.; Yang, T. H.; Lee, S. Y.; Burk, M. J.; Van Dien, S., Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nat Chem Biol* **2011**, 7 (7), 445-452.
6. Guterl, J.-K.; Garbe, D.; Carsten, J.; Steffler, F.; Sommer, B.; Reißer, S.; Philipp, A.; Haack, M.; Rühmann, B.; Koltermann, A.; Kettling, U.; Brück, T.; Sieber, V., Cell-Free Metabolic Engineering: Production of Chemicals by Minimized Reaction Cascades. *ChemSusChem* **2012**, 5 (11), 2165-2172.

2 Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA)

Hermann Broll

Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), Parma/Italien

Die wissenschaftlichen und technischen Fragen im Zusammenhang mit der Lebens- und Futtermittelsicherheit sind in den letzten Jahren immer wichtiger aber auch komplexer geworden, weshalb schon vor zwölf Jahren im Januar 2002 die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) als eine unabhängige europäische Behörde gegründet wurde. Diese hat ihren Sitz in Parma, Italien und arbeitet unabhängig von der Europäischen Kommission, dem Europäischen Parlament und den EU-Mitgliedsstaaten. Die Rechtsgrundlage für ihre Gründung ist die Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates *zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit.*

Die Errichtung einer Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit sollte das damalige System der wissenschaftlichen und technischen Unterstützung in den einzelnen Mitgliedsstaaten der Europäischen Union (EU), das den immer höheren Anforderungen nicht mehr gewachsen war, verstärken. Zudem sollten die individuellen und sich mitunter widersprechenden Bewertungen hinsichtlich der Lebens- und Futtermittelsicherheit in den einzelnen Mitgliedsstaaten durch eine zentrale Europäische Behörde übernommen werden, um effektiver Europäisch-harmonisierte wissenschaftliche Grundlagen zu schaffen wie für die in der EU rechtlich geregelten genetisch veränderte Organismen (GVO).

Geleitet wird die EFSA von einem unabhängigen Verwaltungsrat, dessen ernannte Mitglieder im öffentlichen Interesse handeln und weder eine Regierung, eine Organisation noch einen ökonomischen Sektor oder eine industrielle Branche vertreten. Der Verwaltungsrat besteht aus 15 Mitgliedern; er legt den Haushaltsplan fest und genehmigt das jährliche Arbeitsprogramm. Zudem ist der 15-köpfige Verwaltungsrat dafür verantwortlich, dass die EFSA effektiv arbeitet und erfolgreich mit Partnerorga-

nisationen in und außerhalb der EU kooperiert. Für alle operativen Belange ist der geschäftsführende Direktor zuständig.

Die Aufgabe der EFSA besteht in der Bewertung und Veröffentlichung sämtlicher Risiken, die im Zusammenhang mit der Lebensmittelkette stehen. Aufträge für wissenschaftliche Beurteilung erhält die EFSA

- von der Europäischen Kommission;
- vom Europäischen Parlament;
- von den EU-Mitgliedsstaaten.

Darüber hinaus führt die EFSA auch auf eigene Initiative hin wissenschaftliche Arbeiten durch (sog. „self-tasking“), vor allem im Bereich neu auftretender Risiken, bei denen sich wissenschaftliche Erkenntnisse und Ansätze ständig weiterentwickeln.

Die unabhängigen Empfehlungen der EFSA bilden eine wichtige wissenschaftliche Basis für europäische Rechtsprechung im Bereich Lebensmittel- und Futtermittelsicherheit, Entscheidungen über genehmigungspflichtige Stoffe wie Pestizide oder Lebensmittelzusatzstoffe oder die Entwicklung neuer rechtlicher und politischer Rahmenbedingungen im Bereich der Ernährungsweise.

Die Arbeit der EFSA im Bereich Risikobewertung trägt dazu bei, die Lebensmittelsicherheit in Europa zu verbessern und in der Öffentlichkeit Vertrauen in die Art der Risikobewertung zu schaffen.

Zudem ist die EFSA im Bereich Risikokommunikation verantwortlich für eine Sensibilisierung der Europäischen Bevölkerung bei Fragen der Lebensmittel- und Futtermittelsicherheit und für die Erläuterung und Kommunikation der Schlussfolgerungen aus ihrer wissenschaftlichen Arbeit.

EFSA ist in verschiedenen thematischen Schwerpunkten gegliedert. Das Gremium für genetisch veränderte Organismen (GVO) führt unabhängige wissenschaftliche Beratungen zur Sicherheit von

- GVO wie beispielsweise Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen auf der Grundlage der Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates *über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt*

- genetisch veränderten Lebens- und Futtermitteln auf der Grundlage der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates *über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel*.

Das Gremium bestehend aus international anerkannten Wissenschaftlern aus verschiedenen für die Bewertung wichtigen Disziplinen, führt die Risikobewertungen durch, erstellt wissenschaftliche Gutachten und bietet Beratung für Risikomanager in der Europäischen Kommission und den entsprechenden Institutionen der Mitgliedsstaaten an.

Die Risikobewertung basiert auf der Überprüfung aller zur Verfügung stehenden wissenschaftlichen Informationen und Daten, anhand derer die Sicherheit eines bestimmten GVO bewertet wird. Dies trägt zu einer einheitlichen Grundlage für die europäischen Politik- und Gesetzgebung bei und unterstützt die Risikomanager dabei, Entscheidungen effizient und rechtzeitig zu treffen. Der Großteil der Arbeit des Gremiums erfolgt im Rahmen von Zulassungsanträgen zum Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermitteln bzw. zum Anbau, da alle genetisch veränderten Lebensmittel und Futtermittel durch die EFSA bewertet werden müssen, bevor eine Zulassung in der EU erfolgen kann. Das Gremium arbeitet unabhängig, offen und transparent und bietet dadurch aktuelle wissenschaftliche Beratung auf höchstem Niveau, um Verordnungen, Richtlinien und Entscheidungen im Lebensmittelsektor der Risikomanager zu unterstützen. Einer der entscheidenden Eckpfeiler für die Akzeptanz der wissenschaftlichen Beratung stellt die Unabhängigkeit der Wissenschaftler von wirtschaftlichen Interessen dar; diese Unabhängigkeit muss jährlich von den Experten dokumentiert werden. In regelmäßig stattfindenden Plenarsitzungen bespricht das GVO-Gremium die laufenden Anträge und nimmt die endgültigen wissenschaftlichen Gutachten bzgl. der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von genetisch veränderten Lebens- und Futtermitteln an. Jedes Gutachten ist das Ergebnis eines Entscheidungsfindungsprozesses, bei dem jedes Gremiumsmitglied gleiches Mitspracherecht hat.

2.1 Risikobewertung im Zusammenhang mit Zulassungsanträgen für genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel

Damit genetisch veränderte Organismen bzw. die daraus hergestellten Lebensmittel oder Futtermittel in der EU zugelassen werden können, muss ein Unternehmen einen Antrag auf Marktzulassung auf der Grundlage der europäischen Rechtsvorschriften stellen. In Übereinstimmung mit den Rechtsvorschriften der EU führt das GVO-Gremium der EFSA eine unabhängige wissenschaftliche Risikobewertung durch, um die Sicherheit der GVO bzw. der daraus hergestellten Lebensmittel oder Futtermittel zu bewerten. Die unabhängige wissenschaftliche Beratung durch das GVO-Gremium dient der Europäischen Kommission und den Mitgliedsstaaten als wichtiges Hilfsmittel bei der Entscheidungsfindung über die Marktzulassung (Abb. 2.1).

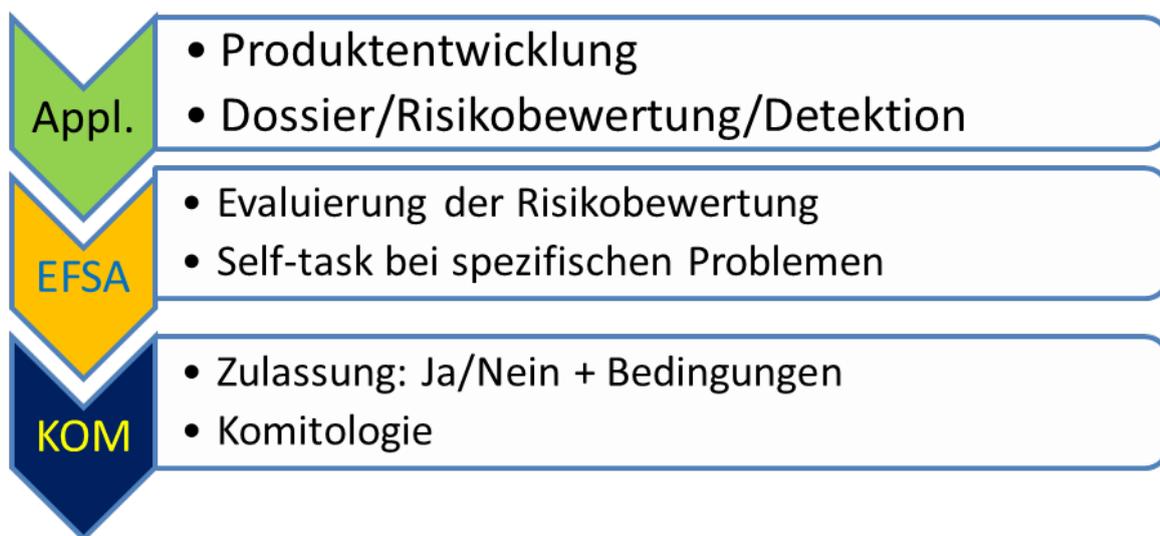


Abbildung 2.1 Arbeitsabläufe für die Sicherheitsbewertung und Zulassung von Anträgen von genetisch veränderten Lebens- und Futtermitteln gemäß Verordnung (EG) Nr. 1829/2003.

2.2 Erarbeiten von Leitliniendokumenten

Im Rahmen seiner Aktivitäten erarbeitet und veröffentlicht das GVO-Gremium Leitliniendokumente („*Guidance Documents*“), um seinen Ansatz zur Risikobewertung zu erläutern und die Transparenz der eigenen Arbeit sicherzustellen. Darüber hinaus dienen diese Leitfäden den Unternehmen als Basis zur Erstellung der Anträge. Beispiele für Leitfäden, die durch das GVO-Gremium erarbeitet wurden und die als

Grundlage für ihre Risikobewertung dienen beziehen sich auf die Umweltverträglichkeit (EFSA, 2010a), die Bestimmung eines allergenen Potentials (EFSA, 2010b) und der übergreifenden Leitlinie zur Risikobewertung von Lebens- und Futtermitteln (EFSA, 2011).

Zudem antwortet das GVO-Gremium auf *Ad-hoc*-Anfragen zu Themen, bei denen die Risikomanager vornehmlich aus der Europäischen Kommission wissenschaftlichen Rat benötigen. Beispielsweise hat das Gremium wissenschaftlichen Rat zur Sicherheit von nicht zugelassenen GVO in der EU und zu den „Schutzklauseln“ (entsprechende Artikel in der Europäischen Gesetzgebung, die es Mitgliedsstaaten erlauben, eine Zulassung vorübergehend aufzuheben) angeboten, auf die sich einzelne EU-Mitgliedsstaaten berufen können, um die Vermarktung bestimmter, auf EU-Ebene zugelassener GVO vorübergehend in den betreffenden Staaten zu verbieten. Neue wissenschaftliche Erkenntnisse, die von den Mitgliedsstaaten als „Schutzklausel“ vorgebracht werden, sind von dem GVO-Gremium zu bewerten und werden als Stellungnahme der Europäischen Kommission zugeleitet.

Das GVO-Gremium identifiziert aber auch selbstständig wissenschaftliche Probleme, die in Verbindung mit der Risikobewertung für GVO stehen und die besondere Aufmerksamkeit erfordern. Als Ergebnis wurde beispielsweise ein wissenschaftlicher Bericht zur Nutzung von Tierfütterungsversuchen bei der Risikobewertung für GVO herausgegeben (EFSA; 2008).

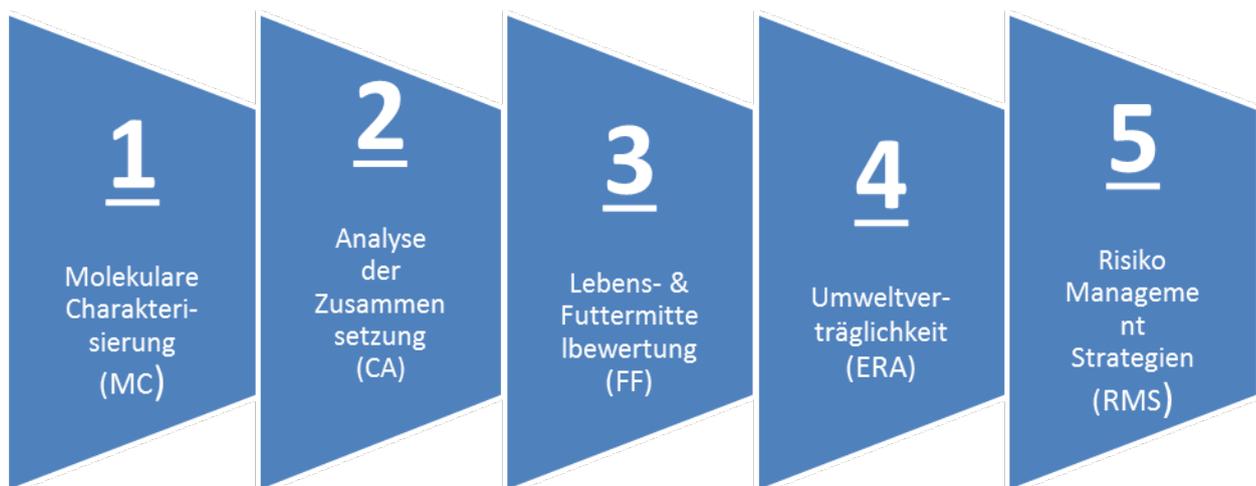


Abbildung 2.2: Schritte der Sicherheitsbewertung genetisch veränderter Lebensmittel und Futtermittel.

Das Referat GVO der EFSA leistet für alle oben aufgeführten Tätigkeiten administrative und wissenschaftliche Unterstützung bei der Arbeit des GVO-Gremiums. Das Referat erstellt gegebenenfalls auch wissenschaftliche Arbeiten für die EFSA, zum Beispiel um dringende Anfragen um wissenschaftliche Beratung zu beantworten.

Gemäß Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 kann eine Zulassung nur dann erteilt werden, wenn die genetisch veränderten Lebens- und Futtermittel keine nachteiligen Auswirkungen auf die Gesundheit von Mensch, Tier oder die Umwelt haben und den Verbraucher oder Anwender nicht irreführen. Außerdem dürfen sich die Produkte von vergleichbaren Erzeugnissen, die sie ersetzen sollen, nicht so unterscheiden, dass ihr normaler Verzehr Ernährungsmängel für Mensch oder Tier mit sich brächte. Futtermittel dürfen die spezifischen Merkmale der aus den mit ihnen gefütterten Tieren gewonnenen Erzeugnisse nicht so beeinträchtigen, dass sie den Verbraucher schädigen oder irreführen.

Die Sicherheitsbewertung des genetisch veränderten Lebens- und Futtermittel basiert auf dem Vergleich des verwendeten GVO mit dem in der Regel konventionellen Ausgangsorganismus, zumindest aber mit einem genetisch vergleichbaren nicht veränderten Organismus mit einer sogenannten ‚*history of safe use*‘. Dabei wird davon ausgegangen, dass der vergleichbare konventionelle Organismus seit Generationen als Lebensmittel verwendet wird, ohne dass gesundheitliche Beeinträchtigung beim normalen Verzehr auftreten. Somit gilt dieser konventionelle Organismus als gemeinhin sicher und kann als Basislinie für die Bestimmung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit des GVO herangezogen werden. Beispielweise wissen Konsumenten, dass Kartoffeln vor dem Verzehr gekocht werden müssen, damit die vorhandenen gesundheitlich schädlichen Alkaloide durch die Erhitzung zerstört werden. Findet diese Behandlung statt, sind konventionell erzeugte Kartoffeln seit Jahrhunderten als unbedenklich anzusehen. Für gentechnisch veränderte Kartoffeln fehlt dagegen diese Erfahrung, daher benötigen diese eine umfangreiche Risikobewertung, bevor eine Markteinführung erfolgen kann.

Abbildung 2.2 zeigt die verschiedenen Schritte der Risikobewertung von GVOs.

Dazu gehört die Charakterisierung der genetischen Modifikation und der daraus resultierenden neuen Proteine sowie eine vergleichende Analyse der für den jeweiligen Organismus relevanten nutritiven, anti-nutritiven sowie endogenen toxischen oder

allergenen Inhaltsstoffe. Dadurch kann überprüft werden, ob durch die genetische Veränderung unbeabsichtigte Veränderungen ausgelöst wurden. Werden Unterschiede festgestellt, wird in Abhängigkeit von deren Art und Umfang entschieden, welche weitergehenden Untersuchungen gegebenenfalls notwendig sind, um zu belegen, dass die aus GVO hergestellten Produkte ebenso sicher sind wie vergleichbare konventionelle Erzeugnisse.

Der Antragsteller auf Zulassung eines gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermittel muss für die Bearbeitung seines Antrages alle wissenschaftliche Informationen, Studienergebnisse oder Klarstellungen in Form eines Dossiers bei der EFSA einreichen. Die EFSA bewertet die durchgeführten Studien, deren Ergebnisse und die vom Antragsteller aus diesen Studien abgeleiteten Schlüsse. Bei allen Anträgen werden die folgenden Aspekte in Betracht gezogen:

- Molekulare Charakterisierung des gentechnisch veränderten Erzeugnisses und die Eigenschaften des Spender- und Empfängerorganismus;
- Zusammensetzung, der Nährwert und die agronomischen Eigenschaften des gentechnisch veränderten Erzeugnisses;
- Potenzielle Toxizität und Allergenität des gentechnisch veränderten Erzeugnisses;
- Mögliche Auswirkungen auf die Umwelt bei einer absichtlichen bzw. unbeabsichtigten Freisetzung des gentechnisch veränderten Erzeugnisses unter Beachtung seines vorgesehenen Verwendungszwecks (Einfuhr, Verarbeitung oder Anbau).

Bis Ende 2013 sind insgesamt 120 Anträge auf Zulassung, entweder zur Einfuhr als gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermittel und/oder zum Anbau in der EU gestellt worden. Auch wenn die Bearbeitungszeit gemäß Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 nur sechs Monate betragen darf, dauert der gesamte Prozess der Risikobewertung in den meisten Fällen deutlich länger, zum Teil mehr als zwei Jahre. In aller Regel stellt nicht die Dauer der Bewertung dafür die Ursache dar, sondern nicht bereitgestellte Dokumentationen oder fehlende Studien, die vom Antragsteller nachgeholt und der EFSA zur Verfügung gestellt werden müssen. Während dieser Zeit, in der keine Risikobewertung durchgeführt werden kann, wird die Frist unterbrochen

und erst wieder neu gestartet, wenn die Unterlagen vom Antragsteller nachgereicht wurden.

Wenn ein Antragsteller ein zugelassenes gentechnisch verändertes Lebens- oder Futtermittel zehn Jahre nach Erteilung der Zulassung weiterhin auf dem Markt vertreiben möchte, muss der GVO entsprechend der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 erneut von der EFSA bewertet werden, bevor eine Entscheidung bezüglich der Zulassungsverlängerung von den Mitgliedstaaten getroffen werden kann. In der Vergangenheit erhielt die EFSA für eine Reihe von GVO (u.a. Mais-, Baumwoll- und Sojabohnensorten) Verlängerungsanträge, von denen einige bereits durch das GVO-Gremium der EFSA bewertet wurden.

Die hier vorgestellten Abläufe sichern einen höchst möglichen Schutz vor Lebensmittelrisiken inklusive der Sicherheit von gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermitteln bevor solche Produkte in der Europäischen Union durch die Europäischen Mitgliedsstaaten beziehungsweise der EU Kommission zugelassen werden.

2.3 Literatur

EFSA, 2008. Safety and Nutritional Assessment of GM Plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. *Food and Chemical Toxicology* 46, S2–S70.

EFSA, 2010a. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 8(11), 1879.

EFSA, 2010b. Scientific Opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed. *EFSA Journal*, 8, 1700.

EFSA, 2011. EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *EFSA Journal*, 9, 2150.

3 Voraussetzung für die "Ohne Gentechnik"- Kennzeichnung von Lebensmitteln - Der Verband Lebensmittel ohne Gentechnik (VLOG)

Alexander Hissting

Verband Lebensmittel ohne Gentechnik e.V. (VLOG), Berlin

Der VLOG ist eine Interessensvertretung für die gentechnikfrei wirtschaftende Lebensmittelindustrie sowie der vor- und nachgelagerten Bereiche.

Der Verband Lebensmittel ohne Gentechnik e.V. repräsentiert Lebensmittelhersteller und -händler sowie die vor- und nachgelagerten Bereiche der Lebensmittelproduktion. Er wurde im März 2010 gegründet. Er setzt sich für eine Lebensmittelerzeugung ohne Gentechnik ein, betreibt Verbraucheraufklärung und vergibt für entsprechend hergestellte Lebensmittel Lizenzen für das einheitliche Siegel „Ohne Gentechnik“. Dieses ist im Besitz der Bundesregierung vertreten durch den Bundesminister für Landwirtschaft und Ernährung.

Der Verband vertritt zurzeit (Stand April 2014) 190 Mitglieder und Lizenznehmer mit einem Gesamt-Jahresumsatz von 68 Mrd. Euro. Eine Übersicht der Lizenznehmer und Mitglieder befindet sich auf der VLOG-Homepage unter www.ohnegentechnik.org/mitglieder.

3.1 Gesetzliche Grundlagen

Entgegen der Kennzeichnung gentechnisch veränderter Lebens- und Futtermittel, die in einer EU Verordnung geregelt ist, sind die Kriterien für eine "Ohne Gentechnik"-Kennzeichnung von Lebensmitteln national festgeschrieben. Das Gesetz mit dem sperrigen Namen „Gesetz zur Durchführung der Verordnungen der Europäischen Gemeinschaft auf dem Gebiet der Gentechnik und über die Kennzeichnung ohne Anwendung gentechnischer Verfahren hergestellter Lebensmittel (EG-Gentechnik-Durchführungsgesetz), kurz EGGenTDurchfG, regelt die Voraussetzungen (§ 3a) und die zu erbringenden Nachweise (§ 3b) für "Ohne Gentechnik" gekennzeichnete Lebensmittel.

3.1.1 Allgemeine Vorschriften

Das EGGenTDurchfG legt fest, dass für die Bewerbung und Inverkehrbringung von Lebensmitteln, die „ohne die Anwendung gentechnischer Verfahren“ hergestellt wurden, nur der Begriff "Ohne Gentechnik" genutzt werden darf. Attribute wie „gentechnikfrei“ oder „gentechnisch unverändert“ sind für diese Zwecke nicht gestattet.

Nur solche Lebensmittel dürfen "Ohne Gentechnik" gekennzeichnet sein, die kein gentechnisch veränderter Organismus (GVO) sind, solche enthalten sowie aus oder durch GVO hergestellt wurden. Diese Regelung gilt auch für alle eingesetzten Lebensmittelzutaten und Verarbeitungshilfsstoffe. Im Klartext bedeuten die Bestimmungen, dass – wen wundert es – eine gentechnisch veränderte Tomate nicht mit der "Ohne Gentechnik"-Kennzeichnung versehen werden kann, weil sie ein GVO ist. Aber auch das Tomatenmark, hergestellt aus einer gentechnisch veränderten Tomate, darf nicht entsprechen ausgelobt werden. Auch das ist eigentlich selbstverständlich. Interessanter wird es bei dem Ausschluss der Herstellung „durch GVO“. Das EGGenTDurchfG beruft sich in der Definition dieses Begriffes auf die EU-Bio-Verordnung (Artikel 2 Buchstabe v der Verordnung (EG) Nr. 834/2007). Dort wird folgende Definition gegeben: *„unter Verwendung eines GVO als letztem lebenden Organismus im Produktionsverfahren gewonnen,...“*. Auf unser Tomaten-Beispiel übertragen hieße das z. B., dass die Ascorbinsäure im Tomatenmark nicht durch gentechnisch veränderte Mikroorganismen hergestellt sein darf. Das Nährsubstrat des Mikroorganismuses ist jedoch außerhalb des Betrachtungshorizonts.

Wichtig ist, dass das Gesetz keine Schwellenwerte für eine Toleranz von Verschleppungen von GVO in Lebensmitteln vorsieht. In der Begründung zum EGGenTDurchfG wird aber deutlich, dass Verschleppungen unter der Bestimmungsgrenze von in der Regel 0,1 Prozent toleriert werden.

3.1.2 Kennzeichnung tierischer Lebensmittel

Im Fall von Lebensmitteln tierischer Herkunft müssen zusätzliche Kriterien für eine "Ohne Gentechnik"-Kennzeichnung erfüllt werden. Milch, Eier, Fleisch und daraus hergestellte Lebensmittel dürfen nur dann gekennzeichnet werden, wenn die Tiere mit Futtermittel gefüttert wurden, das nach der VO (EG) Nr. 1829/2003 und 1830/2003 nicht als gentechnisch verändert gekennzeichnet ist. Futtermittel ist nach

diesen Verordnungen dann als gentechnisch verändert zu kennzeichnen, wenn die Komponenten aus GVO hergestellt wurden. Verschleppungen einzelner Zutaten unter dem Schwellenwert von 0,9 Prozent führen nicht zu einer Kennzeichnung, sofern sie technisch unvermeidbar oder zufällig zu Stande gekommen sind. Zutaten, die „durch GVO“ hergestellt wurden, müssen im Futtermittel nicht gekennzeichnet werden. Das heißt, dass z. B. einzelne Aminosäuren, die durch gentechnisch veränderte Mikroorganismen hergestellt wurden, auch in Futtermitteln für die Erzeugung von "Ohne Gentechnik"-Lebensmitteln eingesetzt werden dürfen.

Die Zeiträume innerhalb derer eine Verfütterung von gentechnisch verändertem Futtermittel vor der Gewinnung des "Ohne Gentechnik"-Lebensmittels unzulässig ist, sind im Anhang des EGGenTDurchfG aufgeführt (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Die Zeiträume innerhalb derer eine Verfütterung von gentechnisch verändertem Futtermittel vor der Gewinnung des "Ohne Gentechnik"-Lebensmittels unzulässig ist.

Tierart	Zeitraum
Equiden und Rinder für Fleisch	12 Monate und mind. $\frac{3}{4}$ des Lebens
Kleine Wiederkäuer	6 Monate
Schweine	4 Monate
Milchproduzierende Tiere	3 Monate
Geflügel für Fleischerzeugung	10 Wochen
Geflügel für Eierzeugung	6 Wochen

3.1.3 Änderungen am EGGenTDurchfG

Es wird immer wieder diskutiert, ob die Anforderungen im Bereich der Futtermittel streng genug sind. Grundsätzlich ist es wichtig, bei der Festsetzung der Kriterien eine Balance zu finden zwischen den hohen Erwartungen der Verbraucher an eine gentechnikfreie Lebensmittelherstellung und der Möglichkeit, die Anforderungen in der Praxis umsetzen zu können. Dieser Aufgabe ist der Gesetzgeber 2008 mit der Schaffung des EGGenTDurchfG gerecht geworden. Es war die richtige Entschei-

derung, die Definition der Gentechnikfreiheit von Futtermitteln an die seit 2004 in Kraft getretenen VO (EG) Nr. 1829/2003 und 1831/2003 zu knüpfen. Die Bereitstellung einer zusätzlichen Futtermittelqualität mit getrennter Verarbeitung, Logistik und Lagerung wäre nicht realistisch gewesen.

Änderungen an den Fütterungsfristen sind nach den Erfahrungen von sechs Jahren EGGenTDurchfG hingegen denkbar. So ist z. B. nicht plausibel, dass es eine einheitliche Zeitspanne für Mastgeflügel gibt, obwohl einzelne Geflügelarten in der Landwirtschaft eine sehr unterschiedliche Lebenserwartung haben. Während ein Hähnchen in der Regel nach 4-5 Wochen geschlachtet, also ab dem Schlüpfen gentechnikfrei gefüttert wird, muss ein männlicher Truthahn mit der Fütterungsfrist von 10 Wochen nur die Hälfte seines Lebens entsprechend gefüttert werden. Der VLOG tritt für eine gentechnikfreie Fütterung von Mastgeflügel generell ab dem Schlüpfen ein und hofft, dass die Bundesregierung in dieser Legislaturperiode eine Anpassung des EGGenTDurchfG ermöglicht.

3.2 Staatliches "Ohne Gentechnik"-Siegel

Der Gesetzgeber hat zwar 2008 klare Regeln für die "Ohne Gentechnik"-Kennzeichnung geschaffen, jedoch nicht festgelegt wie die Auslobung aussehen soll. Erst 2009 hat die damalige Bundeslandwirtschaftsministerin Ilse Aigner ein einheitliches Siegel für "Ohne Gentechnik"-Lebensmittel vorgestellt. Die Nutzung ist allerdings freiwillig. Aus diesem Grund finden sich heute etwa 10-15 verschiedene "Ohne Gentechnik"-Siegel am Markt, denen allen die gleichen gesetzlichen Regeln zu Grunde liegen – ein Unding aus Sicht der Transparenz gegenüber dem Verbraucher. Der VLOG versucht Marktteilnehmer davon zu überzeugen, das einheitliche Siegel zu nutzen.

3.3 VLOG-"Ohne Gentechnik"-Standard

Das EGGenTDurchfG regelt zwar die Voraussetzungen für eine "Ohne Gentechnik"-Kennzeichnung, erläutert aber nicht wie die Vorgaben in die Praxis umzusetzen sind, bzw. wie sie durch Eigenkontrollen oder Prüfinstitute verifiziert werden sollen. Mehrere Prüfinstitute haben in Folge dessen eigene Standards geschaffen und Nutzern der "Ohne Gentechnik"-Kennzeichnung ihre Dienste angeboten. Diesen externen und

unabhängigen Kontrollen haben sich Lebensmittelhersteller freiwillig unterzogen, um ihren Kunden ein höheres Maß an Sicherheit garantieren zu können.

Alle uns bekannten Prüfinstitute haben hierbei gute Arbeit geleistet, und die Standards waren alle geeignet, die Einhaltung der Kriterien des EGGenTDurchfG zu kontrollieren. Aber die Standards haben sich im Detail auch alle voneinander unterschieden. Es bestand die Gefahr, dass sich, den üblichen Marktgesetzen folgend, Standards durchsetzen, die für den Auftraggeber am kostengünstigsten sind – aber kein ausreichendes Maß an Sicherheit gewährleisten. Der VLOG hat sich daher entschlossen, unterstützt von den Prüfinstituten, einen einheitlichen Standard zu schaffen. In einer zweiten Phase waren Repräsentanten aller Stufen der Produktionskette eingeladen, an der Ausgestaltung mit zu arbeiten. Ende März 2013 konnte die erste Version des VLOG-"Ohne Gentechnik"-Standards veröffentlicht werden. Derzeit liegt die zweite Fassung vor und Ende 2014 wird voraussichtlich eine neue Version erscheinen. Die jährlichen Änderungen am Standard werden durch den VLOG-Vorstand beschlossen. Ein Standard-Beirat, in dem VLOG-Mitglieder aller Stufen der Herstellungskette vertreten sind, berät den Vorstand. Der einheitliche Standard ist eine Unterstützung von Landwirten und Lebensmittelproduzenten, um ein Eigenkontrollsystem aufzubauen und regelt wie "Ohne Gentechnik"-Kontrollen von Prüfinstituten ablaufen sollen. Der Standard kann in der jeweils gültigen Fassung auf der Homepage des VLOG kostenlos eingesehen und heruntergeladen werden: www.ohnegentechnik.org/standard

3.3.1 Neue Lizenzverträge

Am 1.1.2014 hat der VLOG neue Lizenzverträge über die Nutzung des „Ohne Gentechnik“-Logos eingeführt. Alle Lizenzvergaben zur Nutzung des "Ohne Gentechnik"-Siegels erfolgen nur noch auf Grundlage der neuen Verträge. Bisherige Lizenznehmer müssen diese im Laufe von 2014 unterzeichnen. Darin werden u.a. verschiedene Risikoklassen für Verunreinigungen mit gentechnisch veränderten Organismen festgelegt. Ab einer bestimmten, definierten Komplexität des Herstellungsprozesses und Größe des Unternehmens ist eine externe Kontrolle nach VLOG-Standard vorgeschrieben, die die Einhaltung der Kriterien im EGGenTDurchfG belegt. Die neuen Lizenzverträge stärken somit Sicherheit und Transparenz für Unternehmen und Verbraucher.

3.4 Fazit

Das EGGenTDurchfG steckt einen klaren Rechtsrahmen für die "Ohne Gentechnik"-Kennzeichnung von Lebensmitteln ab. Mit dem einheitlichen "Ohne Gentechnik"-Siegel steht Lebensmittelproduzenten und -händlern ein verlässliches Qualitätssiegel mit wachsendem Bekanntheitsgrad zur Verfügung.

Analytik I

4 Next Generation Sequencing

Dr. Peter Hübert

Landeslabor Schleswig-Holstein, Neumünster

4.1 Einleitung

Next Generation Sequencing (NGS) ist eine Methode, die sich anschickt, Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren aller Art ernsthaft Konkurrenz zu machen. Ihre größte Stärke besteht darin, große Mengen an Nukleotid-Sequenzen in sehr kurzer Zeit generieren zu können. Dabei sinken die Kosten pro sequenziertem Nukleotid stetig. So war die Sequenzierung des menschlichen Genoms vor der Einführung von NGS noch ein jahrelanges Projekt vieler Labore weltweit, dessen Kosten nur schwer abzuschätzen waren. Mittlerweile wird die Sequenzierung eines Humangenoms als Maßstab für Kosten und Geschwindigkeit mit weniger als einem Arbeitstag und weniger als 1000 € pro Genom als kurzfristig realisierbares Ziel angestrebt. Auch wenn NGS im humanmedizinischen Bereich die weitaus größte Rolle spielt, gibt es doch vielfältige, dringend notwendige und zugleich wirtschaftlich interessante Bereiche, in die NGS bereits jetzt vordringt. Dazu gehören auch die gentechnischen Überwachungsaufgaben. In dieser Präsentation soll ein Überblick über die aktuellen NGS-Methoden gegeben werden sowie Strategien zur Anwendung, beispielshalber bei der Unterscheidung von „stacked events“ gegenüber von Mischungen der einzelnen "events" gegeben werden.

4.2 Methodenüberblick

Der Begriff „Next Generation Sequencing“ rührt daher, dass es bereits mehrere Generationen von Sequenzierverfahren gibt. Als Vertreter der ersten Generation sind die beiden Methoden nach Maxam & Gilbert und nach Sanger am geläufigsten. Aus letzterer, die sich am stärksten durchsetzte, ging die zweite Generation der Sequen-

zierverfahren hervor. Es wurde in beiden Methoden das Kettenabbruch-Prinzip mittels Inkorporation von Dideoxynukleotiden eingesetzt. Für die erste Generation kamen radioaktiv markierte Phosphatgruppen zum Einsatz, um die bei der Kettenabbruch-Reaktion entstandenen Moleküle in einer Gelelektrophorese sichtbar zu machen. Die zweite Generation ersetzte die radioaktive Markierung durch vier verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe, die an das jeweilige Dideoxynukleotid ddATP, ddCTP, ddGTP, beziehungsweise ddTTP gekoppelt sind. Daraus ergaben sich mehrere Vorteile: Verzicht auf radioaktive Materialien, gleichzeitiger Einsatz aller vier Markierungen in einem Reaktionsansatz, Detektion mittels Kapillarelektrophorese und ein höherer Automatisierungsgrad. Als Nachteil galt die geringere Signalstärke der Farbstoffe gegenüber der radioaktiven Markierung. Dieser Nachteil wurde durch einen PCR-ähnlichen Amplifizierungsschritt während der Sequenzierungsreaktion kompensiert. Erst mit dieser „zweiten Sequenziergeneration“ konnte das Projekt realisiert werden, das gesamte Humangenom zu sequenzieren. Die dritte Generation sollte dann diesen PCR-Schritt eliminieren, indem eine Einzelmolekül-Sequenzierung entwickelt werden sollte.

Auf dem Weg dorthin wurden jedoch verschiedene Verfahren entwickelt, die immer noch auf der PCR-Reaktion zur Signalverstärkung beruhen, aber vom Kettenabbruchverfahren abgekommen sind. Diese Verfahren werden nun unter dem Begriff NGS zusammengefasst. Im Zuge der Entwicklung fand auch eine Miniaturisierung der Verfahren statt, so dass jetzt nicht mehr homogene DNA-Moleküle sequenziert werden, sondern Mischungen vieler verschiedener Fragmente, die entweder aus einem kompletten Genom oder aus Mischungen von Genomen herrühren. Beispielhaft wird ein Verfahren und die Weiterentwicklung dessen dargestellt, das ohne Markierung der Nukleotide auskommt.

4.2.1 Pyro-Sequenzierung (454)

Das Verfahren ist benannt nach dem Molekül, das in der Reaktion nachgewiesen wird, dem Pyrophosphat. Es entsteht nach dem Einbau eines Nukleotides in der Sequenzierreaktion durch Abspaltung der zwei Phosphate des Nukleotid-Triphosphates. Dieses Pyrophosphat kann über eine Luziferin-Luziferase-Reaktion als Lichtemission sichtbar gemacht werden (Abb. 4.1).

The principle of Pyrosequencing™

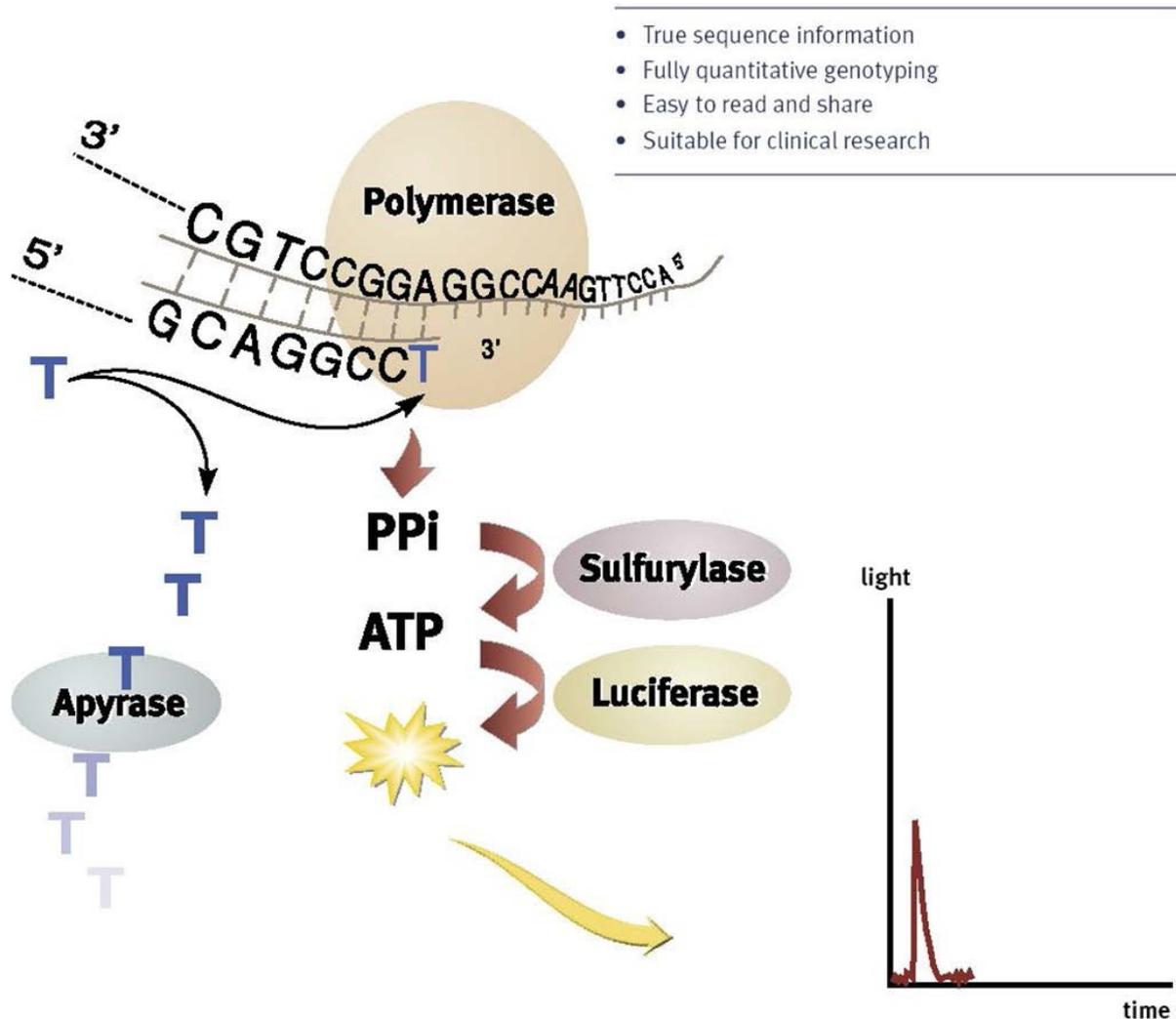


Abbildung 4.1: Prinzip der Pyrosequenzierung (Quelle: www.454.com, Fa. Roche)

4.2.2 Ion Torrent Sequenzierung

Zusätzlich zum Pyrophosphat in oben beschriebenem Verfahren wird auch ein Proton frei gesetzt, so dass anstatt der Luziferin-Reaktion auch eine Messung der Ladungsänderung durchgeführt werden kann. Dies hat den Vorteil, dass dafür auf eine Messtechnik zurückgegriffen wird, die aus der Computerchip-Herstellung bekannt ist. Sie ist daher in der Produktion wesentlich kostengünstiger und noch einfacher miniaturisierbar als das Pyrophosphat-Verfahren. Der Entwickler des Pyrosequencing-

Verfahrens der Firma 454 hat die weiterentwickelte Methode unter dem Namen "Ion Torrent" auf den Markt gebracht (Abb. 4.2).

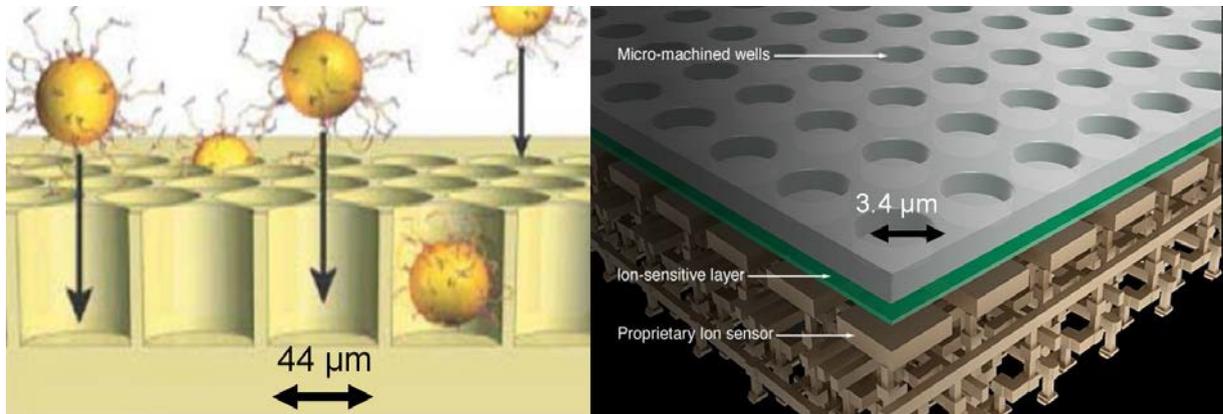


Abbildung 4.2: Gegenüberstellung der Dimensionen der Systeme von 454 und Ion Torrent. Die Volumina sind dadurch zwar um den Faktor 10 geringer, beim Vergleich mit Verfahren der 3. Generation, also denen, die Einzelmoleküle detektieren können, sind sie noch um bis zu drei Größenordnungen entfernt. (Quellen: www.454.com und www.iontorrent.com)

4.2.3 Single Molecule Realtime Sequencing

Das bereits am Markt befindliche System der dritten Generation von Pacific Biosystems arbeitet mit Zeptoliter-, also 10^{-21} Liter Volumina (Abb. 4.3).

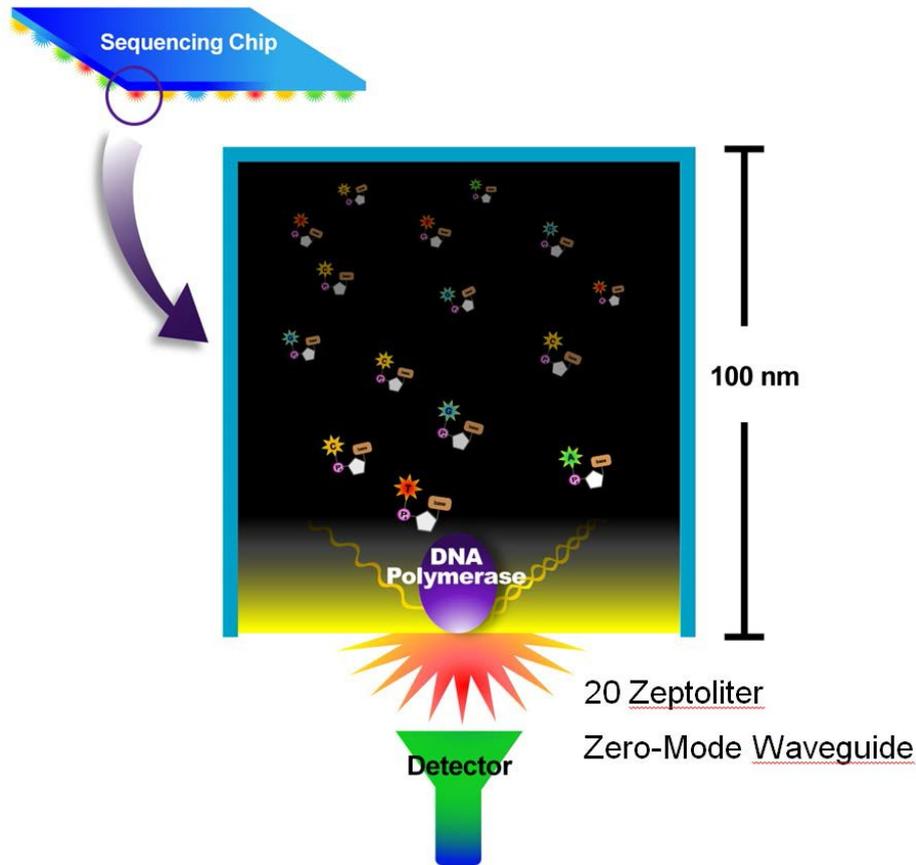


Abbildung 4.3: Single Molecule Real Time Sequencing (Pacific Biosciences)
(Quelle: www.pacificbiosciences.com)

4.3 System-Vergleich

Allerdings spielt neben dem Volumen auch die Dichte der Messzellen pro Messeinheit eine große Rolle. Hier sind die beiden anderen, nicht weiter beschriebenen, jedoch sehr weit verbreiteten NGS-Verfahren SOLiD (ABI, jetzt Thermo Fisher, www.AppliedBiosystems.com) und Solexa (Illumina, www.illumina.com) deutlich im Vorteil (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Durchsatzvergleich der hier vorgestellten Methoden in Gigabasen (Gb)

NGS

- 454: 50 Gb (Pyrosequencing)
- Illumina: 200 Gb (dye labeled nucleotides)
- SOLiD: 300 Gb (dye labeled oligo ligation)

3. Generation

- Pacific Biosciences: ~ 500 Mb (SMRT)
- Oxford Nanopore: ~ 50 Kb per nanopore

Das System von Oxford Nanopore ist noch in der Entwicklung, soll jedoch an dieser Stelle als Ausblick vorgestellt werden, denn hier zeigt sich deutlich, wie die zukünftige Sequenziertechnik weiter miniaturisiert wird, mit dem Ziel, schneller und kostengünstiger zu werden (Abb. 4.4). Die Kosten pro Megabasen (Mb) sind bereits bei allen modernen Systemen auf unter 0,1 \$ gesunken, wobei das Nanopore-System Kosten um oder unter 0,01 \$/Mb anstrebt.



Abbildung 4.4: Ausblick auf die Weiterentwicklung der Sequenziertechnik (Oxford Nanopore), (Quelle: www.nanoporetech.com)

Erstaunlich sind vor allem die Leselängen von bis zu 50.000 Basen pro Nanopore. Dadurch könnten sich die nachfolgenden Strategien zur Analyse und der Auswertung der Daten wesentlich vereinfachen. Denn auch bei immer einfacher zu bedienenden Sequenziergeräten bleibt die Bewältigung der immensen Datenmengen die größte Herausforderung.

4.4 Datenanalyse

Für die Analyse der Daten steht eine stetig zunehmende Zahl an Programmen zur Verfügung, die jedoch zum Teil auf den speziellen Bedingungen der verschiedenen Sequenzierstrategien, insbesondere der häufig verwendeten SOLiD beziehungsweise Illumina spezifischen Verfahren beruhen. Eine Auswahl ist in Tabelle 4.2 beispielhaft zusammengestellt.

Tabelle 4.2: Beispiele von integrierten Tools zur Zusammenstellung von Sequenzdaten und Nachweis von Unterschieden (Varshney et al. 2009).

- Alpheus™ (<http://alpheus.ncgr.org/>):
web-based cyber infrastructure platform for pipelining, visualization and analysis of gigabase-scale NGS data and internet-accessible software for variant discovery and isoform identification.
- MAQ (<http://maq.sourceforge.net/>):
program for mapping and assembly of short reads. It can also report SNPs and indels using a simple assembly visualizer (Maqview).
- NextGENe™ (<http://www.softgenetics.com/NextGENe.html>):
software to analyze NGS data for de novo assembly, SNP and indel detection and transcriptome analysis.
- SeqMan genome analyzer (<http://www.dnastar.com/products/SMGA.php>):
software with capacity to align NGS and Sanger data and detect SNPs; also facilitates visualization.
- CLCbio Genomics Workbench (<http://www.clcbio.com>):
tool for de novo and reference assembly of Sanger and NGS sequence data, SNP detection and browsing.
- PanGEA (<http://www.kofler.or.at/Bioinformatics/PanGEA/index.html>):
tool to map NGS data to whole genomes, with SNP detection and display capabilities.

4.4.1 Analysestrategie

Bei der Analyse werden unterschiedliche Wege besprochen. Stammen die Daten aus einem einzigen Organismus, so können daraus Gesamtgenom-Zusammenstellungen vorgenommen werden (Claros *et al.* 2012). Gibt es bereits Referenzgenome des be-

troffenen Organismus, kann mittel Re-Sequenzierung auf Übereinstimmungen oder Veränderungen im Genom geschlossen werden. Diese Strategie ist zum Beispiel sinnvoll, wenn ein Organismus auf Vorliegen bisher nicht bekannter gentechnischer Veränderungen geprüft werden soll und keinerlei Informationen über die Herstellung des GVO vorliegen (Wahler *et al.* 2013).

Liegt eine Mischung aus verschiedenen Organismen vor, wie es üblicherweise in Lebens- oder Futtermitteln der Fall ist, dann ist eher eine „Metagenom-Analyse“ zielführend. Hier wird das gesamte Datenaufkommen gegen vorhandene Datenbanken assembliert, um möglichst viele der in der Probe vorliegenden Organismen eindeutig zuordnen zu können. In bestimmten Konstellationen ist sogar eine quantitative Aussage möglich (Whitall *et al.* 2010).

4.4.2 Stacked Events

Ein Sonderfall betrifft die Frage nach dem Nachweis von „stacked events“. Das Problem betrifft die Unterscheidung von gekreuzten Event-Linien von Mischungen der Original-Events. Da sich die für den Nachweis der Events spezifischen Insertionsstellen der Konstrukte in das Genom durch den Kreuzungsvorgang nicht ändern, können die eventspezifischen PCR-Systeme, die für die Zulassung der Events bereit gestellt wurden, schon prinzipbedingt nicht für eine Differenzierung verwendet werden.

Eine Möglichkeit besteht darin, die Methodik, die auch die Züchter zur Differenzierung während der Auslese der reinerbigen Züchtungen einsetzen, für die Analyse der stacked events zu verwenden. Hier kommt wiederum NGS ins Spiel, denn in der klassischen Zuchtauslese hat das Verfahren in den letzten Jahren die anderen molekularbiologischen Methoden verdrängt (Abb. 4.5).

Anhand charakteristischer Muster, die durch die Rekombination während der Züchtung neuer reinerbiger Linien entstehen, können Nachkommen mit den Elternlinien verglichen werden. So ist es mittel „Nested Association Mapping“ möglich, an Hand von etwa tausend verschiedener, kurzer Sequenzabfolgen auf ca. 5000 mögliche Nachkommenslinien prüfen zu können. Aber auch hier sind noch tiefgreifende bioinformatische Vorarbeiten zu leisten.

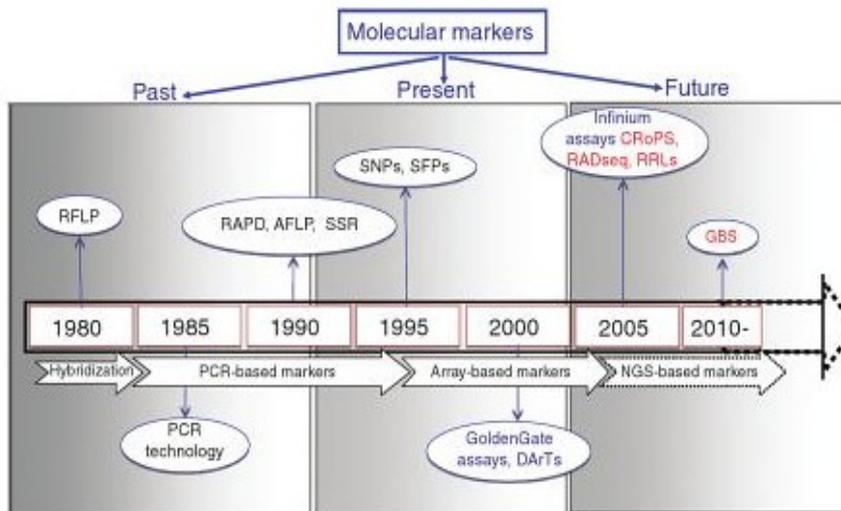


Figure 10.1 Paradigm shift in marker discovery: from hybridization-based RFLPs to NGS-based high-throughput markers. Markers have been classified into past, present, and future molecular markers. Markers highlighted with blue color are micro-array-based markers, while as those highlighted with red color are NGS-based markers.

Abbildung 4.5: Einsatz von NGS in der Züchtung (Marker Assisted Breeding, aus Henry, R. J. *Molecular Markers in Plants*. Wiley, 2012)

4.5 Zusammenfassung

Next Generation Sequencing, oder kurz NGS abgekürzt, steht bereit, seinen Platz als Ergänzung oder Ersatz für andere molekularbiologische Verfahren, insbesondere für die PCR einzunehmen. Die technischen Neuerungen sind in den letzten zehn Jahren enorm gewachsen. Für den Routineeinsatz stehen jedoch noch nicht die passenden Analysesoftwaressysteme bereit. Ohne fundiertes Wissen von Bioinformatikern ist zurzeit noch kein alltagstaugliches System für ein Routinediagnostik-Labor auf dem Markt. Es ist jedoch damit zu rechnen, dass nicht nur in der Humanmedizin, dort insbesondere in der Krebs-Diagnostik, die Entwicklung zu Routineauswertungen weiter fortschreitet. Insbesondere die Entwicklungen, die sich im Bereich der Marker unterstützten Züchtung gezeigt haben, lassen es als vielversprechend erscheinen, Lösungen für offene Fragen bei der Überwachung gentechnischer Organismen zu finden.

4.6 Literatur

Claros, M. G. et al. Why Assembling Plant Genome Sequences Is So Challenging. *Biology* 1, 439–459 (2012).

Henry, Robert J. Molecular Markers in Plants. John Wiley & Sons, (2012).

Kovalic, D. et al. The Use of Next Generation Sequencing and Junction Sequence Analysis Bioinformatics to Achieve Molecular Characterization of Crops Improved Through Modern Biotechnology. *The Plant Genome* 5, 149–163 (2012).

Varshney, R. K. et al. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology* 27, 522–530 (2009).

Wahler, D. et al. Next-Generation Sequencing as a Tool for Detailed Molecular Characterisation of Genomic Insertions and Flanking Regions in Genetically Modified Plants: a Pilot Study Using a Rice Event Unauthorised in the EU. *Food Anal. Methods* 1-10 (2013)

Whittall, J.B. et al. Finding a (pine) needle in a haystack: chloroplast genome sequence divergence in rare and widespread pines. *Molecular Ecology* 19, 100-114 (2010).

5 Transkriptionelle Biomarkersignaturen in der Lebensmittelüberwachung

**MSc. Biol. Melanie Spornraft, Dr. Irmgard Riedmaier und Prof. Dr. Michael W. Pfaffl
Technische Universität München (TUM), Lehrstuhl für Physiologie, Freising-Weihenstephan**

5.1 Einleitung: Biomarker in der Dopingkontrolle

Es ist längst bekannt, dass eine gesunde Ernährung die Basis für ein gesundes Leben darstellt. Die Erforschung des Zusammenhangs zwischen Ernährung und dem Gesundheitsstatus, sowie des Einflusses der Nahrung auf die Entwicklung von Krankheiten ist für die Wissenschaft und für die Lebensmittelindustrie von zentraler Bedeutung. In Anbetracht jüngster Lebensmittelskandale ist es das Ziel Lebensmittelprodukte herzustellen, die zum einen sicher sind und die Gesundheit nicht gefährden und zum anderen sogar dazu beitragen können, Krankheiten zu vermeiden. Dabei ist es wichtig, Lebensmittelinhaltsstoffe und deren zugrundeliegende Wirkungen, sowie die involvierten metabolischen Prozesse im Körper genau zu erforschen.

Notwendig ist dabei nicht nur die gesunden Inhaltsstoffe und deren Wirkungen zu untersuchen, sondern auch die Auswirkungen von gesundheitsschädlichen Substanzen und Lebensmittelkontaminationen genauestens zu erforschen. In der Fleischproduktion werden in vielen Ländern hormonelle Wachstums- und Leistungsförderer angewendet. Diese führen zu höheren Schlachtgewichten und verkürzten Mastzeiten der Tiere. Aus Verbraucherschutzgründen ist es in der Europäischen Union seit 1988 verboten wachstumsfördernde Substanzen in der Tiermast einzusetzen, um den Verbraucher vor potentiellen Nebenwirkungen zu schützen. Die ökonomischen Anreize sind dennoch gegeben, weswegen die Einhaltung dieses Verbotes durch zertifizierte Kontrollsysteme streng überwacht wird. Allerdings gibt es Mittel und Wege die Kontrollen der Test-Labore zu hintergehen. Beispielsweise können den lebensmittel liefernden Tieren verschiedene wachstumsfördernde Substanzen verabreicht werden, die zu einem Hormoncocktail vermischt wurden. Die Einzelkomponenten können dann nicht mehr mit klassischen Nachweismethoden identifiziert und

Quantifiziert werden, da sie jeweils unter der Nachweisgrenze liegen, aber in Kombination dennoch anabol wirken. Des Weiteren gibt es keine standardisierten Detektionsmethoden für neuentwickelte Substanzen, deren chemische Strukturen und Eigenschaften noch unbekannt sind. Die Kontrollanalysen sind demnach bisher substanzspezifisch. Um neue Wege in der Kontrolle des verbotenen Einsatzes von Wachstumsförderern zu beschreiten, wird ein Nachweissystem benötigt, das unabhängig der verwendeten anabolen Substanzen einen Missbrauch verlässlich detektiert. Eine Alternative zu den substanzspezifischen Nachweisen ist die Untersuchung der physiologischen Veränderungen eines Organismus nach der Gabe von anabolen Agentien auf molekularer Ebene. Das Ziel ist nicht länger der direkte Nachweis von anabolen Substanzen im Körper, sondern das Erfassen der zellulären Reaktionen auf diese Substanzen. Diese exogenen Einflüsse verursachen eine Modifikation auf der Genexpressions-Ebene und zeigen dadurch physiologische Effekte. Eine neue Herangehensweise bei der Suche nach alternativen Nachweisverfahren ist das Screening eines Individuums auf die physiologische Antwort auf Transkriptomenebene. Bei der Suche nach Biomarkern geht es folglich darum, molekulare Signaturen zu finden, die eine spezifische biologische Charakteristik oder eine messbare Veränderung des Organismus beschreiben, was mit einem bestimmten physiologischen Zustand oder einem Krankheitsstatus korreliert werden kann [1]. Transkriptionelle Biomarker können für den Nachweis von veränderten Genexpressionen und somit als Indikatoren für Krankheiten oder physiologische Veränderungen verwendet werden.

5.2 Omik-Technologien ermöglichen die Erforschung von Genexpressionsveränderungen

Für die Identifizierung solcher molekularen Biomarkersignaturen gibt es verschiedene molekulare Ebenen. Es bietet sich die Möglichkeit der Untersuchung der genomischen DNA, die als Träger der Erbinformation die Basis für die Protein-Biosynthese darstellt (Genom-Level = Gen**omik**). Die Erforschung der Modulation der DNA-Transkription als Folge eines äußeren Einflusses ist eine Ansatzebene (Transkriptom-Level = Transkript**omik** und Epigenetik-Level = Epigen**omik**), die resultierende Proteinzusammensetzung im Körper eine Weitere (Proteom-Level = Prote**omik**). Auch bei der Regulation der Protein-Biosynthese gelten verschiedene RNA Tran-

skripte als Mediatoren (Transkriptomik). Diese sind zum einen Messenger RNAs (mRNA), die als Matrizen für die Proteinbiosynthese dienen und zum anderen nicht-proteinkodierende RNAs, z. B. microRNAs, die wiederum regulatorisch auf mRNAs wirken. Des Weiteren können Metaboliten als biochemische Produkte im Stoffwechsel als Biomarker verwendet werden (Metabolom-Level = Metabol**omik**). Die verschiedensten Methoden und Techniken zur ganzheitlichen Analyse dieser Ebenen werden als „**omik**“-**Technologien** zusammengefasst. Fortschritte in der Molekularbiologie und Biotechnologie führen zu neuen Erkenntnissen in der Grundlagenforschung und zu einem besseren Verständnis wie sich Lebensmittel auf die Gesundheit auswirken. Dies erlaubt auch neuartige Möglichkeiten in der Lebensmittelkontrolle und Lebensmittelsicherheit. Die fundamentale Hypothese die dabei der Transkriptomik und den „omik“-Technologien zugrunde liegt ist, dass Genexpressionsveränderungen, hervorgerufen durch chemische Gefahrenstoffe mit möglichen gesundheitlichen Effekten, entdeckt werden können [2]. Diese Veränderungen können als Biomarkermuster festgehalten werden.

5.3 Die Anwendbarkeit von Biomarkern in der Lebensmittelsicherheit hat sich bereits bestätigt

Nahrungsmittelliefernde Tiere mit wachstumsfördernden Substanzen zu behandeln ist in der Europäischen Union illegal. Unerlaubt behandelte Tiere erreichen schneller die Mastreife und durch einen gesteigerten Muskelaufbau werden beispielsweise bei Mastbullen höhere Schlachtgewichte erzielt. Sowohl für das Tier als auch für den Fleischkonsumenten ergeben sich gesundheitsschädliche Folgen [3], dennoch locken hier die finanziellen Vorteile für die Landwirte und die lebensmittelverarbeitenden Industrien. In Ländern wie den USA, Australien, Neuseeland, Mexiko, Kanada, Japan oder Südafrika ist der Einsatz von Wachstumsförderern in der Tiermast erlaubt. Dabei werden den Tieren Hormonpräparate hinter dem Ohr eingesetzt, die dann kontinuierlich die wirksamen Substanzen freisetzen. Die Tiere zeigen daraufhin einen vermehrten Muskelaufbau bei gleichzeitigem Fettabbau. Diese exogene Stimulation führt zu einer Veränderung der Physiologie der Tiere, die auf molekularer Ebene durch Genexpressionsveränderungen nachweisbar ist. Im folgenden Abschnitt

wird gezeigt, dass Forschungen auf dem Gebiet der Biomarkersuche zur Detektion von illegalen Behandlungen bereits zu Erfolgen geführt haben.

Auf mRNA Ebene konnten bereits Biomarkermuster zum Anabolikamissbrauch detektiert werden. In einem Tierversuch wurden Vaginalabstriche von Rindern untersucht, die mit einem Steroidhormonpräparat aus Trenbolonacetat und Östradiol behandelt wurden. Außerdem wurde in dieser Studie auch Blut analysiert, um unterschiedlich exprimierte Gene zu finden. Sowohl in den Abstrichen als auch im Blut konnten Kandidatengene gefunden werden, die nach einer Hormongabe anders reguliert waren als die entsprechende unbehandelte Kontrollgruppe an Tieren. Basierend auf den Daten der mRNA-Expressionsunterschiede lassen sich mit Hilfe von biostatistischen Methoden behandelte von nicht-behandelten Tieren unterscheiden [4], [5]. Neben den mRNAs bieten sich auch die microRNAs (miRNAs) als potenzielle Kandidaten zur quantitativen Analyse bei der Suche nach Biomarkern an. Bei den miRNAs handelt es sich um kurze, nicht-kodierende aber hoch-konservierte RNA-Moleküle (18 bis 23 Nukleotide), die auf die Wirkungsweisen der mRNA Einfluss nehmen und so stark auf der post-transkriptionellen Ebene die Genregulation beeinflussen. Da miRNAs sehr stabile Biomoleküle sind und ihre Anwendbarkeit als Biomarker für Krankheiten wie beispielsweise Krebs schon demonstriert wurde [6], halten sie auch Einzug in das Forschungsgebiet der Lebensmittelsicherheit. Die Expression von verschiedenen miRNAs wurde in bovinen Lebern untersucht, nachdem den Rindern die wachstumsfördernden Substanzen Trenbolonacetat und Östrogen verabreicht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Hormongabe sieben miRNAs starke Hoch- oder Herunter-Regulationen aufwiesen. Auf Grund von diesem ermittelten spezifischen Profil der Biomarker können behandelte Tiere von Unbehandelten unterschieden werden [7], [5].

5.4 Neue Wege auf der Suche nach Biomarkern

Neben der Analyse von mRNA und miRNA Spezies in Geweben bietet sich auch die Identifizierung von transkriptionellen Biomarkern in Körperflüssigkeiten an. Das Screening von Urin, Speichel, Milch oder Plasma erlaubt eine relativ einfache Entnahme von Proben am Tier. Durch den nicht- bzw. minimal-invasiven Eingriff können Proben schnell und schmerzfrei gewonnen werden, was einen Vorteil bietet gegen-

über den invasiven Probenahmen mit lokalen Anästhesien bei Biopsien. Im Gegensatz zu den Probenahmen am Schlachthof wird somit auch eine Beprobung des lebendigen Tieres möglich. In der Forschung wurde die Anwendbarkeit von Biomarkern in Körperflüssigkeiten mehrfach demonstriert [8], [9]. Ein Hauptaugenmerk liegt aktuell auf der Klasse der **small RNAs**. Die small RNAs sind im Vergleich zu den RNAs sehr stabil hinsichtlich Temperaturschwankungen und gegenüber RNase-Verdau, weswegen die experimentelle Handhabung im Labor deutlich vereinfacht ist. Aus den genannten Gründen ist die Analyse der small RNAs eine mögliche Goldmine für die Identifizierung von neuen Biomarkern und ein modernes und aktuelles Forschungsgebiet. Die Untersuchung und das Verständnis der post-transkriptionellen Modifikationen die durch die small RNAs verursacht werden, versprechen neuartige Einblicke in die Mechanismen der Zellbiologie und Genetik. Neben den miRNAs zählen auch piRNAs (piwi-interacting RNAs), snRNAs (small nuclear RNAs) und snoRNAs (small nucleolar RNAs) zu der Klasse der nicht-kodierenden aber dennoch regulatorisch-wirksamen small RNAs. Neben den mRNAs und miRNAs können ebenso die small RNAs zum Finden von weiteren transkriptionellen Biomarkersignaturen beitragen. Bei der Suche nach Plasma-Biomarkern wurden bisher dennoch hauptsächlich miRNAs untersucht. Die Standardmethoden sind dabei Mikroarray-Analysen oder RT-qPCR Messungen [10], [11] (vgl. Kapitel *Verschiedene Methoden eignen sich zur Analyse des Transkriptoms*). Die Analyse von freien, zirkulierenden RNAs im Plasma mittels Next-Generation Sequencing (NGS) kann auch in Zukunft in der Lebensmittelsicherheit Anwendungen finden. Wegen der einfachen Verfügbarkeit von Plasma eignet sich diese Matrix für die Identifizierung von Biomarkern. Neben den mRNA und miRNA Biomarkern in Leberproben, können künftig zusätzliche zirkulierende small RNA Marker mit in die Biomarkersignatur aufgenommen werden (Abbildung 5.1). Ein weiterer Fokus in der Forschung liegt aktuell auf einer bestimmten Plasmakomponente, den Exosomen. Dabei handelt es sich um 30 bis 90 nm große membranumhüllte Mikrovesikel, die von Zellen gebildet und über Exozytose an die Umgebung abgegeben werden. Exosomen beinhalten ein ganz bestimmtes RNA-Profil, dessen Erforschung ebenfalls zur Identifizierung neuer, spezifischer Biomarker führen kann. Für die Analyse der komplexen Zusammensetzung der zirkulierenden RNAs im Plasma als auch für die Exosomen-RNA-Profile werden die Transkripte mit

Hilfe von NGS sequenziert. Dies ermöglicht die Einbeziehung aller Transkripte einer Probe für die Erstellung von Biomarker-Clustern zur besseren Separierung von unterschiedlich behandelten Probenpools (vgl. Kapitel 5.6 *Biostatistische Methoden helfen bei der Erkennung der Biomarker-Muster*).

Die Welt der zu erforschenden RNA Spezies zeigt sich somit mannigfaltig und vielversprechend. Dabei stellt sich nun die Frage nach dem „Wie“? Wie werden die verschiedenen RNAs analysiert? Die verschiedenen molekularbiologischen Methoden zur Analyse des Transkriptoms sollen im folgenden Kapitel dargestellt werden.

5.5 Verschiedene Methoden eignen sich zur Analyse des Transkriptoms

Prinzipiell wird zwischen spezifischen, zielgerichteten („targeted“) und nicht-spezifischen („untargeted“) Methoden unterschieden. Zu den targeted Methoden, bei denen einzelne, bereits im Vorfeld des Experiments bekannte RNAs untersucht werden sollen, zählt die **quantitative real-time reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion** (RT-qPCR). Die gewünschten Ziel-Gene werden im Voraus durch Literaturrecherche bestimmt. Die RT-qPCR ist ein zweistufiger Prozess: Zuerst wird die extrahierte RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und dann folgt nicht nur die spezifische Amplifizierung der DNA-Fragmente wie in der herkömmlichen PCR, sondern auch die Quantifizierung des gewünschten Zielgenes. Nach jedem Amplifikationszyklus interkalieren Fluoreszenzfarbstoffe mit den neugebildeten DNA-Doppelsträngen und intensivieren die Fluoreszenzsignale. Durch die Messung dieser Signale nach jedem PCR Zyklus und durch die anschließende Prozessierung der gewonnenen Daten mittels mathematischer Algorithmen wird es ermöglicht, die DNA-Vervielfältigung zu verfolgen und die ursprüngliche Ausgangsmenge an DNA in der Probe zu quantifizieren [12]. Für eine stärkere Transparenz von Versuchen, eine Vereinheitlichung von guten Laborpraktiken und für eine Sicherstellung der Wiederholbarkeit ist es bei qPCR-Experimenten und -Publikationen ratsam die **MIQE** Guidelines (**m**inimum **i**nformation for publication of **q**uantitative **r**eal-time **P**CR **e**xperiments) zu befolgen [13].

Bei den untargeted Methoden ist das Ziel ein globales Screening der Probe hinsichtlich des ganzheitlichen RNA Spektrums einer Probe zu einem distinkten Zeitpunkt.

Dabei können aus einer einzigen Probe eine Vielzahl unterschiedlich exprimierter RNAs aufgedeckt werden. Zu diesen Hochdurchsatzmethoden gehören zum einen die Mikroarray Technologie und das Next-Generation Sequencing (NGS), genauer gesagt die RNA Sequenzierung (RNA-Seq) für Transkriptomanalysen.

Bei den **Mikroarrays** werden verschiedene spezifische DNA-Fragmente („Probes“) auf einer Glasoberfläche immobilisiert. Durch die reverse Transkription werden die RNAs in eine cDNA Bibliothek umgeschrieben und gleichzeitig ein Fluoreszenzfarbmarker an die cDNA hybridisiert. Im Folgenden binden die DNA-Fragmente durch komplementäre Basenpaarung an die entsprechenden Probes. Ein Laser regt die hybridisierten Fragmente energetisch an und die emittierten Signale werden aufgezeichnet. Die Intensität des Fluoreszenzsignals repräsentiert dabei die Menge an gebundener DNA. Das große Potenzial dieser Methode liegt in der Möglichkeit der gleichzeitigen Messung vieler tausend Transkripte begründet. Die ganze Analyse erfolgt auf einem Chip, weswegen die Mikroarray Analysen auch DNA Chip Analysen genannt werden. Dennoch müssen die gewünschten zu analysierenden RNA-Sequenzen bereits bekannt sein und wegen der geringen Sensitivität ist der Nachweis von wenig abundanten RNAs schwierig.

Die Sequenziermethode der neuen Generation (Next-Generation Sequencing, NGS) ermöglicht dem Wissenschaftler dagegen einen komplett detaillierten und gesamtheitlichen „Blick“ in seine Probe, wie ein Schnappschuss, der von der DNA- bzw. RNA-Zusammensetzung zu einem bestimmten Zeitpunkt gemacht wurde. Beim RNA-Seq werden alle darin enthaltenen Transkripte in einem holistischen Bild festgehalten. Dafür wird aus den extrahierten RNAs eine cDNA Bibliothek erstellt, wobei bestimmte Adaptoren an die RNA-Fragmente hybridisiert werden. Diese Adaptoren ermöglichen eine Bindung der DNA-Bibliothek an einen Oligonukleotid-Rasen auf der sogenannten Flow Cell. Jedes einzelne RNA Molekül wird so in die Analyse integriert. Sequenzierungsgeräte wie beispielsweise die HiSeq oder MiSeq Instrumente von Illumina (Kalifornien, USA) bestimmen dann im Hochdurchsatz die präzise Abfolge der Nukleotide (Sequencing-by-Synthesis). Dieser Nukleotid-Code wird dann mit Datenbanken aus Referenzgenomen verglichen, um die Sequenzen bestimmten DNAs oder RNAs zuordnen zu können. Für dieses sogenannte Mapping und für die statistischen Auswertungen bei der Suche nach signifikanten Unterschieden in der

Regulierung der Gene müssen mathematische Algorithmen und verschiedene Softwares zur Hilfe genommen werden. Hinsichtlich der steigenden Durchsatzleistung und dem steigenden Daten-Output, der immer kürzeren Datengenerierungszeit und verbesserten Datenqualität, bei gleichzeitig immer weiter sinkenden Preisen, verkürzten Probenvorbereitungszeiten und Sequenzierungsdauern, wird das NGS als zukünftige State-of-the-Art Technologie angesehen.

5.6 Biostatistische Methoden helfen bei der Erkennung der Biomarker-Muster

Die Suche nach Biomarkern und die Auswertung der Genexpressionsdaten erfordert biostatistische Methoden, um bestimmte Muster in der Vielfalt und Komplexität der molekularen Daten zu visualisieren. Das Protein humanes Choriongonadotropin (hCG) ist beispielsweise ein einzelner Biomarker, der eine Ja-/Nein-Aussage zulässt. Bei Anwesenheit bestätigt es eine Schwangerschaft, während es bei Abwesenheit eine Schwangerschaft ausschließt. Aufgrund der komplexen Wirkungsweise von Anabolika auf verschiedene Organe ist es unwahrscheinlich einen einzigen Biomarker zu finden. Im Gegensatz dazu ist zu erwarten, dass sich eine Reihe an veränderten Genen zu einem Biomarker-Muster zusammensetzen. Wie oben beschrieben ist das Ziel bei der Identifizierung von Biomarkern, Gruppen zu unterscheiden basierend auf Genexpressionsdaten. Weist ein gesundes Tier ein anderes Muster in seinem RNA Profil auf als die verglichene Gruppe mit kranken Tieren? Gibt es Unterschiede zwischen einer Kontrollgruppe aus unbehandelten Tieren im Vergleich mit Tieren, die beispielsweise mit Wachstumsförderern behandelt wurden? Diese Unterschiede zwischen Gruppen in komplexen Datensätzen zu detektieren bedarf multivarianter Statistikverfahren, wie zum Beispiel die **hierarchische Clusteranalyse** (HCA) und die **Hauptkomponentenanalyse** (principal components analysis, PCA) (Abb. 5.1). Bei der HCA werden biologische Daten, die gemeinsame Eigenschaften (z. B. ähnliche Genexpressionsprofile) teilen, in Cluster gruppiert. Je ähnlicher sich dabei die analysierten Proben sind, desto näher liegen die Cluster beieinander. Dabei entsteht ein Dendrogramm, das basierend auf Distanzen bzw. Ähnlichkeiten eine Unterscheidung von Gruppen zulässt. Eine weitere Methode zur Gruppierung von Expressionsdaten ist die PCA. Der mathematische Algorithmus strukturiert und vereinfacht dabei hoch-

komplexe multidimensionale Datensätze, indem statistische Variablen durch eine möglichst geringe Anzahl aussagekräftiger Hauptkomponenten reduziert werden. Es entsteht eine zwei- oder dreidimensionale Graphik, bei der jedes Individuum oder jede Probe durch einen Datenpunkt dargestellt wird. Grenzen sich die Datenpunkte der Individuen einer Gruppe von denen der zu vergleichenden Gruppe ab, kann der Unterschied der Genexpression zwischen beiden Kohorten mittels PCA visualisiert werden.

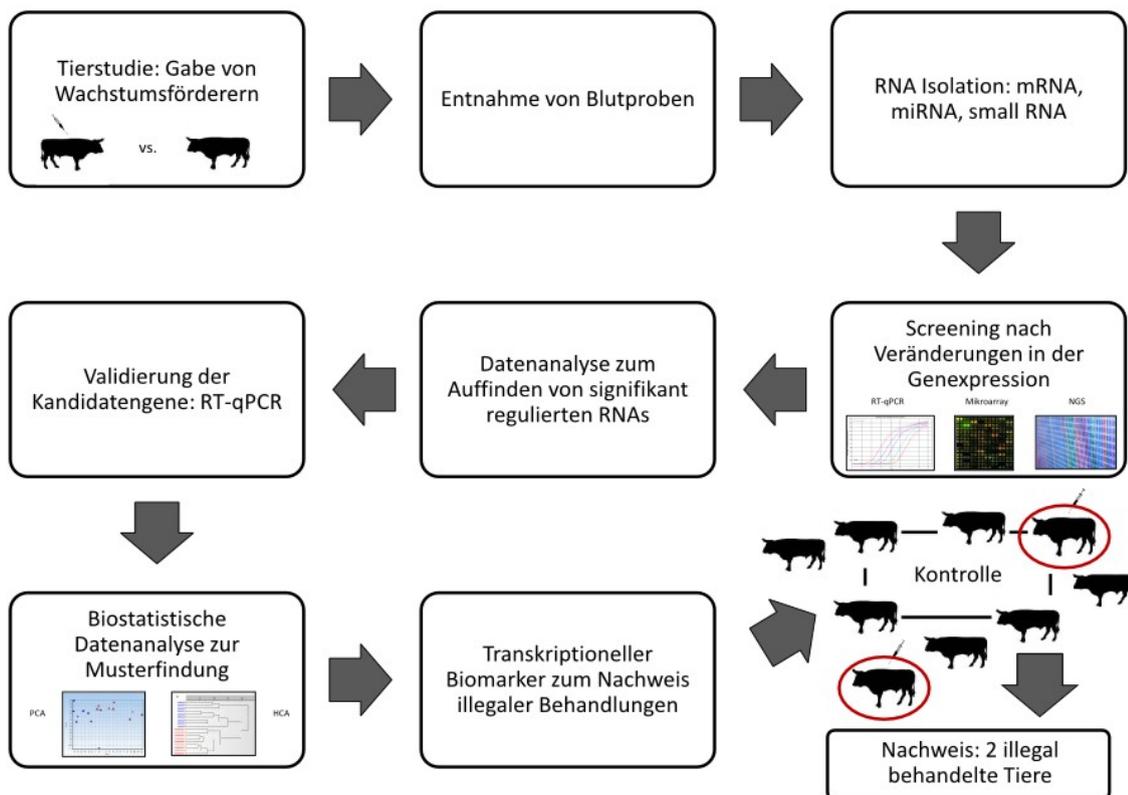


Abbildung 5.1: Übersicht über den Arbeitsablauf bei der Identifikation von transkriptionellen Biomarkern. Mastrinder werden in einer Tierstudie mit Wachstumsförderern behandelt oder bleiben unbehandelt als Kontrollgruppe. Anschließend wird die RNA aus Blutproben extrahiert und das Transkriptom auf Veränderungen in der Genexpression untersucht. Dazu eignen sich verschiedene molekularbiologische Analysemethoden: RT-qPCR, Mikroarrays und NGS. Eine Berechnung der signifikant unterschiedlich regulierten RNAs führt zur Identifikation von potentiellen Kandidatengenen, die zu einem Biomarker-Muster zusammengefasst werden können. Die Kandidatengene werden einzeln mit der RT-qPCR analysiert und verifiziert. Biostatistische Verfahren zur Darstellung von Gruppenzugehörigkeiten wie beispielsweise die PCA oder die HCA ermöglichen die Unterscheidung von unbehandelten und behandelten Tieren aufgrund der differentiellen Genexpression in der Kontrollgruppe im Vergleich mit der behandelten Gruppe. Wird das Biomarker-Muster, das typisch für behandelte Tiere ist, in einem zu kontrollierenden Tier wiedergefunden, kann eine illegale Anwendung von Wachstumsförderern detektiert werden.

5.7 Beispiele aus der Praxis

Abschließend sollen zwei Beispiele belegen, dass die Kontamination von Fleisch durch Anabolika trotz Verbot auch in Deutschland eine ernstzunehmende Gefährdung darstellt.

Bei der FIFA U-17 Fußballweltmeisterschaft im Jahr 2011 konnte Clenbuterol im Urin von 19 aus 24 getesteten Mannschaften nachgewiesen werden. Das Arzneimittel Clenbuterol wird als Bronchodilator bei der Behandlung von Asthma verwendet und wirkt bei Einnahme einer anabolen Dosis wachstumsfördernd auf Muskeln. Der verbotene Gebrauch von Clenbuterol in der Tiermast ist in Mexico, dem Gastgeberland der WM, durchaus bekannt. Clenbuterol konnte im Rahmen dieser Studie ebenfalls in Fleischproben aus den Speisen für die Sportler in den Mannschaftshotels nachgewiesen werden [14]. Es stellt sich nun die Frage, ob der positive Clenbuterolnachweis im Doping der Fußballer oder im Verzehr von kontaminierten Fleisch begründet liegt. Nachweismethoden, die die Substanz direkt nachweisen, kommen hier an eine Aussagegrenze. Ein Screening der Transkriptome der Sportler auf Genexpressionsveränderungen durch länger andauernde Clenbuterol-Einnahme vor dem Wettkampf könnte Klarheit schaffen und die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Testergebnissen verringern.

Auch in China gibt es das Problem der Kontaminierung von Lebensmittel mit dem in der Tiermast offiziell verbotenen Anabolikum Clenbuterol. Deutsche Sportler wurden 2010 nach Wettkämpfen in China auf Clenbuterolrückstände im Urin getestet und alle Proben enthielten in geringen Mengen Clenbuterol (pg/ml) [15]. Außerdem wurden zufällig gewählte, freiwillige Testpersonen nach Ankunft von ihrer Chinareise auf Clenbuterolkontaminationen untersucht. In 22 von 28 Fällen (entspricht 79 %) wurde Clenbuterol nachgewiesen [15]. Eine Belastung von Lebensmitteln basierend auf dem Einsatz von illegalen Medikamenten und Hormonen bei fleischproduzierenden Tieren und die einhergehende Gefährdung der Gesundheit des Verbrauchers ist demnach *de facto* gegeben. Diese Beispiele zeigen deutlich die weitreichenden Folgen einer Behandlung der Tiere mit verbotenen Substanzen und Medikamenten. Zum einen ist das Wachstums-Doping der Tiere ein Thema für sich hinsichtlich des Verbraucherschutzes, aber zum anderen reichen die Folgen bis zum Gebiet der Anti-Doping-Kontrollen im Leistungssport. Schiedsgerichte in Wettkampfsportarten wie

dem Radsport sind vor die Problematik gestellt, zu beurteilen ob nun der Sportler absichtlich gedopt wurde oder ob der positive Doping-Test eine Folge des Verzehrs von kontaminiertem Fleisch ist. Das Thema Anabolikamissbrauch ist ein ernstzunehmendes Thema in der Tiermast sowie im Sport. Aus Verbraucherschutzgründen sowie aus Fairnessgründen ist es essentiell eine Nachweismethode zu entwickeln, die das Doping sicher nachweisen kann.

5.8 Transkriptionelle Biomarkersignaturen eignen sich in der Detektion illegaler Praktiken

Wir sehen, dass die Lebensmittelüberwachung in einem Zeitalter angekommen ist, das neueste technische Errungenschaften und wissenschaftliche Erkenntnisse nutzt, um den Verbrauchern sichere Lebensmittel gewährleisten zu können und dabei versucht den Missbrauchsversuchen einen Schritt voraus zu sein. In diesem Artikel wurde aufgezeigt, dass der vorgestellte Forschungsansatz der transkriptionellen Biomarkersignaturen genutzt werden kann, um gesundheitsgefährdende Praktiken in der Tiermast aufzudecken und so Lebensmittel sicherer zu machen.

5.9 Literatur

- [1] M.W. Pfaffl, *Methods* 59 (2013) 1–2.
- [2] K. Lancova, R. Dip, J.-P. Antignac, B. Le Bizec, C.T. Elliott, H. Naegeli, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30 (2011) 181–191.
- [3] S.H. Swan, F. Liu, J.W. Overstreet, C. Brazil, N.E. Skakkebaek, *Hum. Reprod* 22 (2007) 1497–1502.
- [4] I. Riedmaier, M. Reiter, A. Tichopad, M.W. Pfaffl, H.H.D. Meyer, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 119 (2011) 86–94.
- [5] I. Riedmaier, A. Tichopad, M. Reiter, M.W. Pfaffl, H.H.D. Meyer, *Anal. Chim. Acta* 638 (2009) 106–113.
- [6] J. Lu, G. Getz, E.A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B.L. Ebert, R.H. Mak, A.A. Ferrando, J.R. Downing, T. Jacks, H.R. Horvitz, T.R. Golub, *Nature* 435 (2005) 834–838.

- [7] C. Becker, I. Riedmaier, M. Reiter, A. Tichopad, M.W. Pfaffl, H.H.D. Meyer, *Analyst* 136 (2011) 1204–1209.
- [8] P.S. Mitchell, R.K. Parkin, E.M. Kroh, B.R. Fritz, S.K. Wyman, E.L. Pogossova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K.C. O'Briant, A. Allen, D.W. Lin, N. Urban, C.W. Drescher, B.S. Knudsen, D.L. Stirewalt, R. Gentleman, R.L. Vessella, P.S. Nelson, D.B. Martin, M. Tewari, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105 (2008) 10513–10518.
- [9] J.M. Lorenzen, F. Martino, T. Thum, *Curr. Med. Chem* 20 (2013) 3623–3628.
- [10] E.M. Kroh, R.K. Parkin, P.S. Mitchell, M. Tewari, *Methods* 50 (2010) 298–301.
- [11] Y. D'Alessandra, P. Devanna, F. Limana, S. Straino, A. Di Carlo, P.G. Brambilla, M. Rubino, M.C. Carena, L. Spazzafumo, M. de Simone, B. Micheli, P. Biglioli, F. Achilli, F. Martelli, S. Maggiolini, G. Marenzi, G. Pompilio, M.C. Capogrossi, *European Heart Journal* 31 (2010) 2765–2773.
- [12] M. Kubista, J.M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömbom, A. Ståhlberg, N. Zoric, *Mol. Aspects Med* 27 (2006) 95–125.
- [13] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, *Clin. Chem* 55 (2009) 611–622.
- [14] M. Thevis, L. Geyer, H. Geyer, S. Guddat, J. Dvorak, A. Butch, S.S. Sterk, W. Schänzer, *Drug Test Anal* 5 (2013) 372–376.
- [15] S. Guddat, G. Fußhöller, H. Geyer, A. Thomas, H. Braun, N. Haenelt, A. Schwenke, C. Klose, M. Thevis, W. Schänzer, *Drug Test Anal* 4 (2012) 534–538.

6 Gentechnisch veränderte Viren

Dr. Thorsten Stellberger, Dr. Melanie Pavlovic und PD Dr. Armin Baiker
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL),
Oberschleißheim

6.1 Baltimore-Klassifikation und Virusfamilien

Viren sind infektiöse Einheiten mit Durchmessern von etwa 16 nm (Circoviren) bis 1000 nm (Pandoraviren). Sie haben sich während der Evolution entwickelt und an bestimmte Organismen angepasst. Die Viruspartikel (Virionen) bestehen aus einer Proteinschicht, jeweils einer Art von Nukleinsäure (DNA oder RNA) und sind bei einigen Virustypen von einer Hüllmembran umgeben. Die virale Nukleinsäure bzw. das virale Genom kann einzel- oder doppelsträngig vorliegen, linear, ringförmig oder segmentiert sein. Die Proteinschicht wird als Kapsid bezeichnet. Das Nukleinsäure verpackende Kapsid weist in der Regel eine helikale oder eine ikosaedrische Symmetrie auf; es können jedoch auch komplexe Strukturen auftreten (Modrow et al., 2010).

Das Baltimore-Klassifikationssystem unterteilt Viren nach der Replikationsstrategie ihrer Genome in sieben Klassen. Klasse I: Doppelstrang DNA, Klasse II: Einzelstrang DNA, Klasse III: Doppelstrang RNA, Klasse IV: Einzelstrang (+) RNA, Klasse V: Einzelstrang (-) RNA, Klasse VI: Einzelstrang (+) RNA mit Doppelstrang DNA-Intermediat sowie Klasse VII: Doppelstrang DNA mit RNA-Intermediat. Plus (+) bzw. Minus (-) beziehen sich dabei auf die Polarität der viralen RNA. Das Genom der Plusstrang RNA-Viren besitzt die Polarität einer „messenger RNA“ (mRNA) und kann unter Verwendung der zellulären Translationsmaschinerie direkt in Proteine übersetzt werden. Im Gegensatz dazu hat das Genom der Negativstrang RNA-Viren nicht die Polarität einer mRNA und kann somit nicht direkt in Proteine übersetzt werden. Hierfür bedarf es zuerst der Umschreibung des Negativstrangs in einen Plusstrang mit Hilfe der viralen „RNA-abhängigen RNA-Polymerase“. Die Baltimore-Klassifikation wird heute zunehmend ungebräuchlich und ist nahezu durch die Taxonomie des ICTV (siehe unten) verdrängt. Trotzdem hilft dieses Klassifikationssystem dabei, sich

einen ersten systematischen Überblick über die verschiedenen Virusfamilien zu verschaffen.

Die offizielle taxonomische Einteilung von Viren in Ordnungen (Endung: *-virales*), Familien (Endung: *-viridae*), Unterfamilien (Endung: *-virinae*) und Gattungen (Endung: *-virus*) erfolgt durch das „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (ICTV). Wichtige Kriterien sind unter anderem die Genomstruktur, die Symmetrie des Kapsids, das Vorhandensein einer Hüllmembran, die Anordnung der Gene innerhalb des Genoms, die Replikationsstrategie der viralen Genome sowie die Virusgröße (Abb. 6.1).

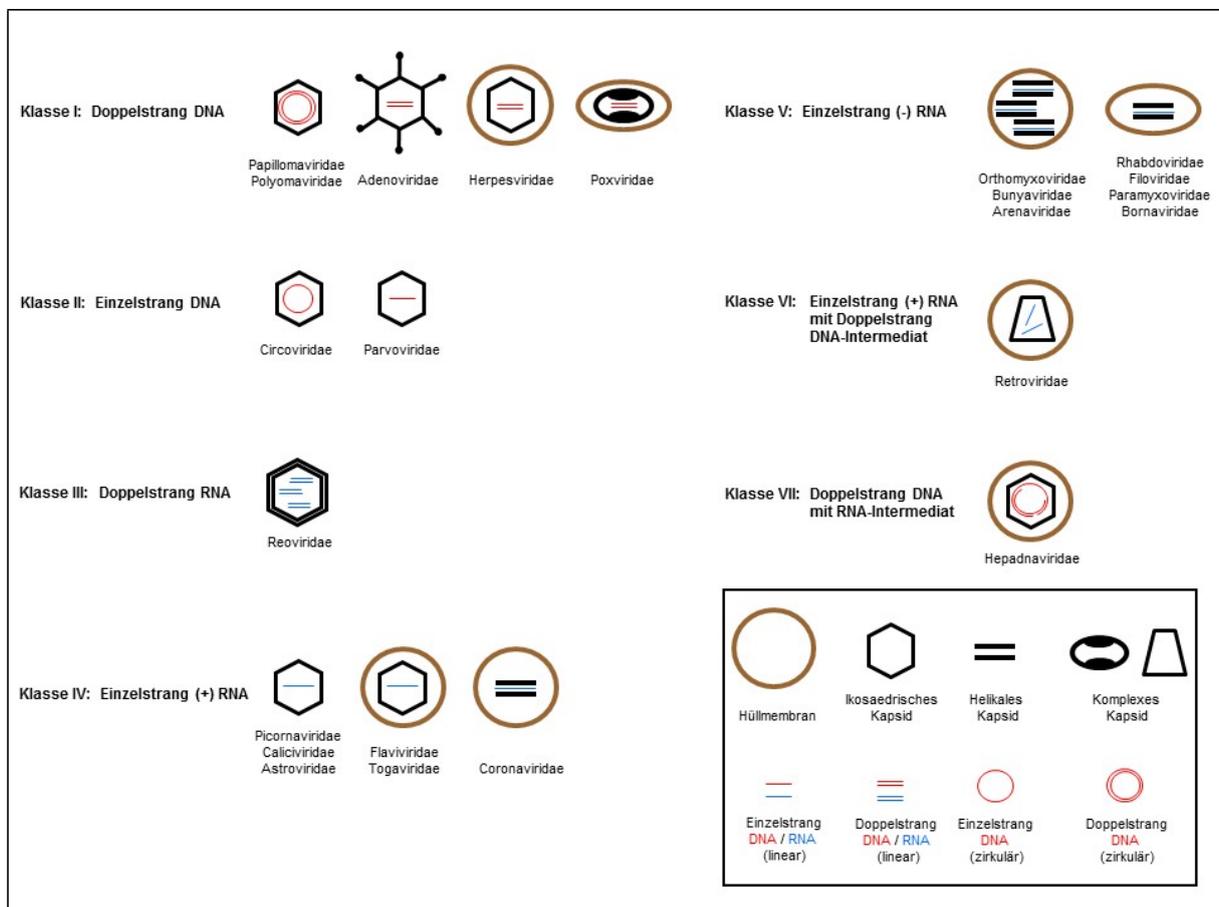


Abbildung 6.1: Baltimore-Klassifikation und Virusfamilien. Das Baltimore-Klassifikationssystem unterteilt Viren nach der Replikationsstrategie ihrer Genome in sieben Klassen. Die offizielle taxonomische Einteilung von Viren in Familien (Endung: *-viridae*) erfolgt durch das „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (ICTV). Abkürzungen: (+) Plusstrang; (-) Negativstrang.

6.2 Das Simian Virus 40 (SV40)

6.2.1 SV40 als Modellorganismus

Das Simian Virus 40 (SV40) wurde im Jahre 1960 als Verunreinigung in Zellkulturen von Affennieren entdeckt. Nach seiner Entdeckung entwickelte sich das SV40 zum wichtigen Modellorganismus für die Untersuchung der Molekularbiologie eukaryoter Zellen. So wurden an SV40 erstmals entdeckt:

- Die Nukleosomenstruktur des Chromatins
- Die Existenz alternativer RNA-Spleißvorgänge
- Die Existenz *cis*-regulatorisch wirkender DNA-Elemente (Enhancer)

Weiterhin diente das SV40 Genom ("Minichromosom") lange Zeit als Modellsystem zum Studium der DNA-Replikation in eukaryoten Zellen.

6.2.2 SV40 und die Gentechnik

Die Forschung an SV40 ist eng mit der Entstehungsgeschichte der Gentechnik verbunden. So war ein Genomfragment dieses Virus Bestandteil der 1972 im Labor des Biochemikers Paul Berg hergestellten, ersten rekombinanten DNA (Jackson et al., 1972). Diese erste rekombinante DNA bestand, vereinfacht ausgedrückt, aus zwei DNA-Molekülen, welche zuvor mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten und anschließend erneut mit Ligase zusammengefügt wurden. Ein Teilstück entstammte dabei aus dem Genom von SV40, das zweite aus einem wenig charakterisierten *E. coli* Plasmid (Abb. 6.2). Der erste gentechnisch veränderte Organismus (GVO) wurde 1973 hergestellt (Cohen et al., 1973). Hierfür wurden letztlich zwei natürlich vorkommende Plasmide mit unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* linearisiert und danach mit Ligase zusammengefügt. Das neue Plasmid wurde in *E. coli* übertragen und die gentechnisch veränderten Bakterien anschließend durch Selektion mit beiden Antibiotika isoliert (Abb. 6.2). An der Herstellung des ersten GVO im Jahre 1973 waren somit keine Elemente des SV40 beteiligt. Jedoch löste insbesondere die Absichtserklärung eines Forschers, die gesamte genetische Information von SV40 entsprechend in ein Plasmid einbauen und in *E. coli* vermehren zu wollen, noch im selben Jahr eine öffentliche Diskussion über die Si-

cherheit in der Gentechnik aus, die letztendlich zur Gentechnikgesetzgebung führte (Goerlich et al., 2012).

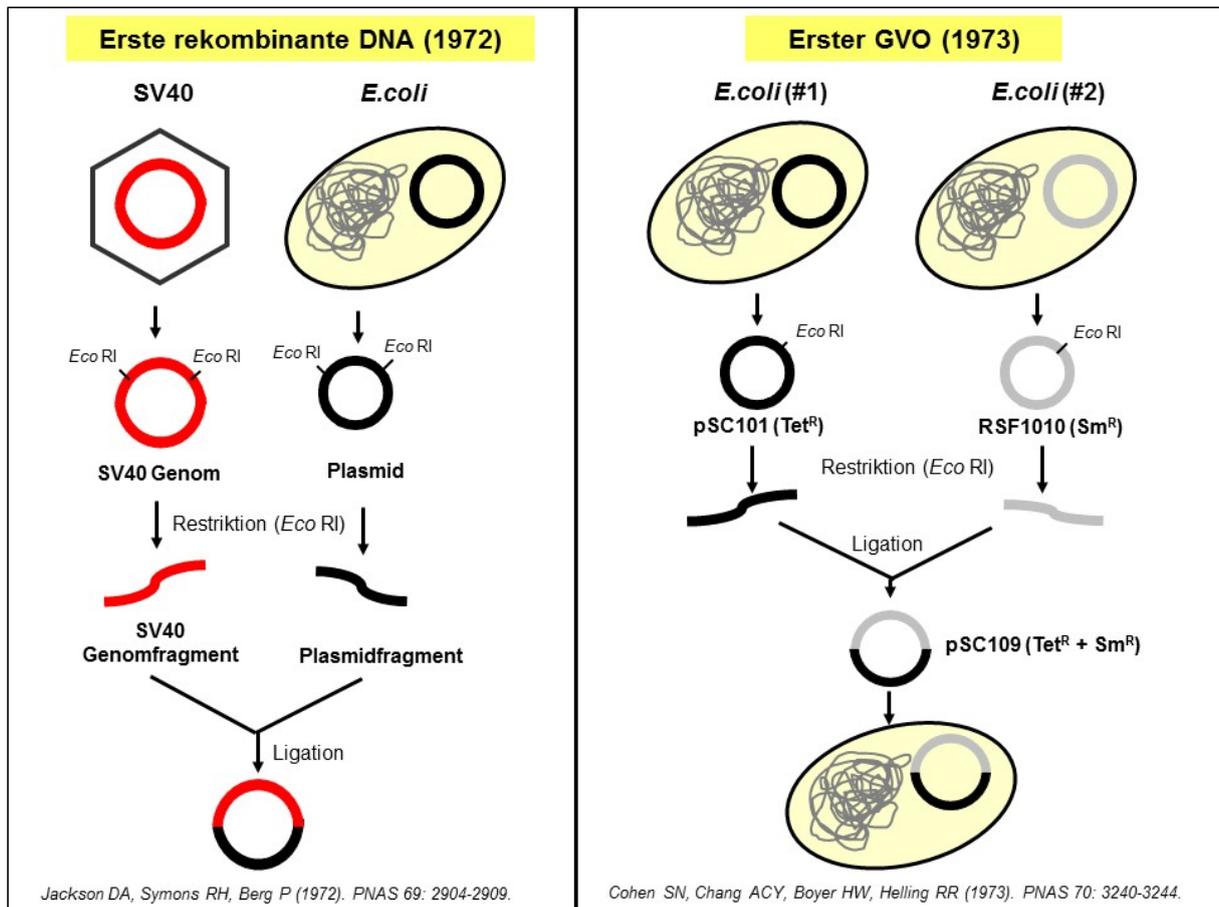


Abbildung 6.2: Erste rekombinante DNA und erster GVO. Zur Herstellung der rekombinanten DNA (linke Spalte) wurde das Genom des SV40 isoliert, mit *EcoRI* geschnitten und anschließend mit einem gleich behandelten, aus einem *E. coli* Stamm isolierten Plasmid zusammengefügt. Zur Herstellung des ersten GVO wurden die beiden natürlich in *E. coli* vorkommenden Resistenzplasmide pSC101 und RSF100 mit *EcoRI* linearisiert und anschließend ligiert. Das resultierende Plasmid pSC109 wurde dann in *E. coli* transformiert. Die gentechnisch veränderten *E. coli* Bakterien konnten durch Doppelselektion mit den Antibiotika Tetrazyklin und Streptomycin isoliert werden. Abkürzungen: Sm^R: Streptomycinresistenzgen, SV40: Simian-Virus 40, Tet^R: Tetrazyklinresistenzgen.

Das erste gentechnisch veränderte Virus, ein rekombinantes SV40, wurde 1976 hergestellt (Goff und Berg, 1976). Dafür wurde das Genom von SV40 isoliert und mit Restriktionsenzymen fragmentiert. Das große Fragment des SV40-Genoms wurde anschließend im Reagenzglas (*in vitro*) mit einem Stück DNA des λ Phagen zusammengefügt. Dem trunkierten SV40-Genomfragment fehlten dabei jedoch einige für die Replikation des SV40 erforderlichen Gene. Zur Herstellung des gentechnisch veränderten SV40 wurde die resultierende rekombinante DNA (d.h. das trunkierte

SV40-Genomfragment mit der inserierten λ -DNA) in CV1 Affennierenzellen transfiziert. Die transfizierten CV1-Zellen wurden danach mit einem Helfervirus infiziert und bei 41 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur konnte das temperatursensitive Helfervirus nicht mehr replizieren, wohl aber den Replikationsdefekt des gentechnisch veränderten SV40 komplementieren. Die so behandelten Affennierenzellen setzten das erste gentechnisch veränderte Virus frei (Abb. 6.3).

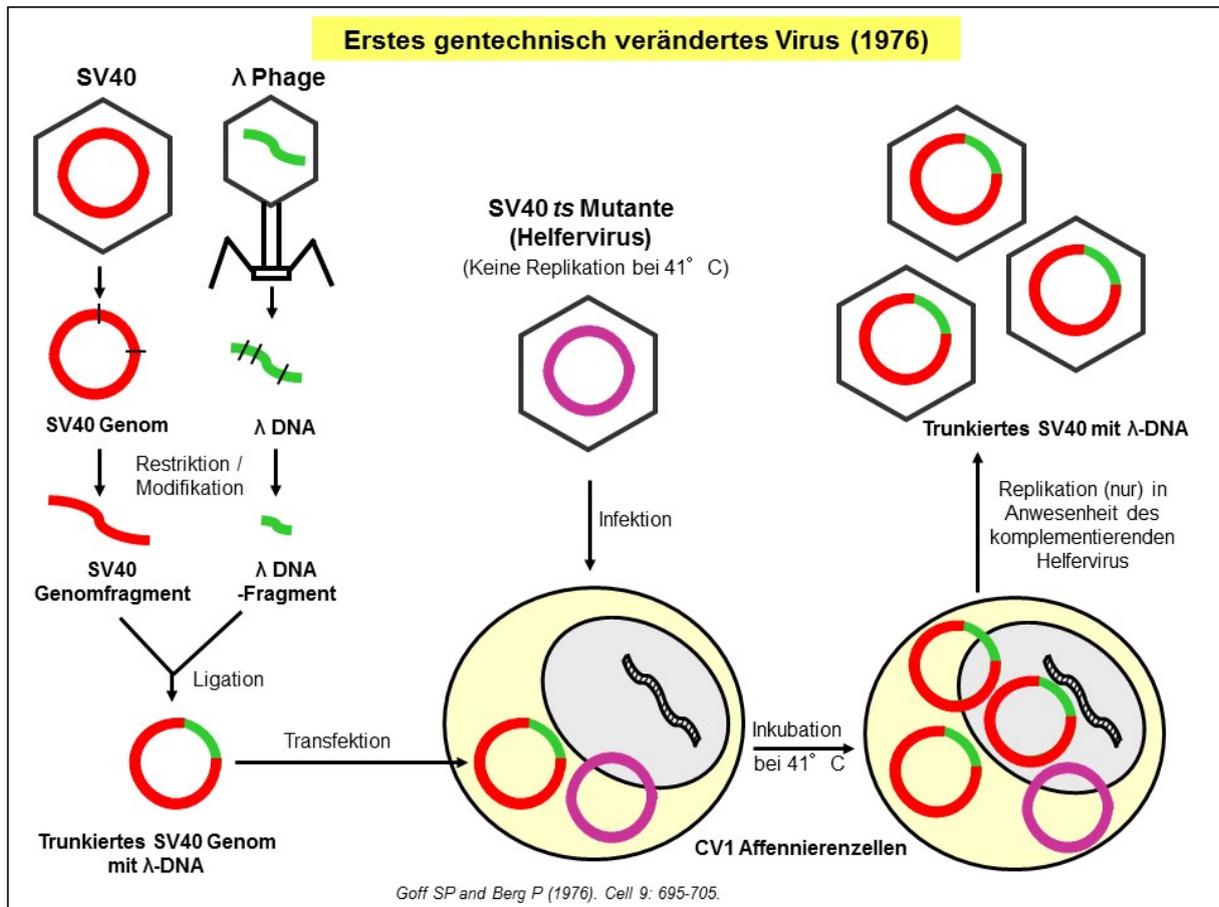


Abbildung 6.3: Erstes gentechnisch verändertes Virus. Das Genom von SV40 wurde isoliert und mit Restriktionsenzymen fragmentiert. Ein Fragment des SV40-Genoms wurde anschließend mit einem Stück DNA des λ Phagen zusammengefügt. Zur Herstellung des gentechnisch veränderten SV40 wurde die resultierende rekombinante DNA in CV1 Affennierenzellen transfiziert. Die transfizierten CV1-Zellen wurden danach mit einem komplementierenden, temperatursensitiven Helfervirus infiziert und bei 41 °C inkubiert. Abkürzungen: λ : Lambda (Phage); ts: temperatursensitiv.

Die Herstellung gentechnisch veränderter SV40 nach derzeitigem Stand von Wissenschaft und Technik ist beispielhaft in Abbildung 6.4 dargestellt. Das infektiöse SV40-Gesamtgenom wird in einem ersten Arbeitsschritt aus dem Wildtypvirus isoliert, linearisiert und in einen Plasmidvektor eingefügt; das resultierende SV40-

Gesamtgenom-Plasmid wird in *E. coli* K12-Stämmen kloniert und vermehrt. Gentechnische Veränderungen können ggf. auf Ebene des SV40-Gesamtgenom-Plasmids durchgeführt werden. In einem zweiten Arbeitsschritt wird das infektiöse SV40-Gesamtgenom aus dem Plasmidvektor herausgeschnitten, (re-)ligiert und danach in permissive Affennierenzellen, wie z. B. CV1-Zellen, transfiziert. Die transfizierten Affennierenzellen produzieren das (ggf. gentechnisch veränderte) SV40.

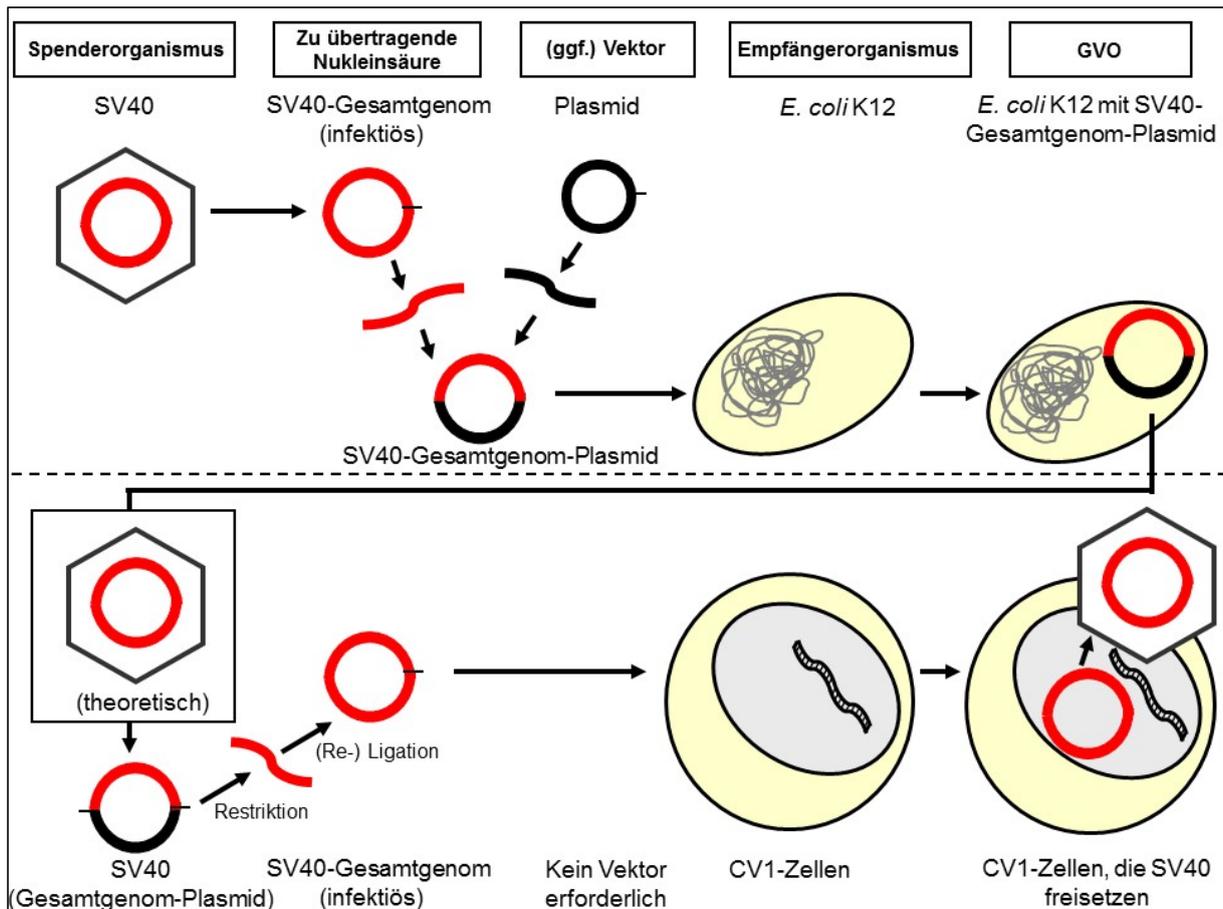


Abbildung 6.4: Herstellung gentechnisch veränderter SV40 nach derzeitigem Stand von Wissenschaft und Technik. Oben: Das infektiöse SV40-Gesamtgenom wird aus dem Wildtyp SV40 isoliert, linearisiert und in ein Plasmid eingefügt. Das resultierende SV40-Gesamtgenom-Plasmid wird in *E. coli* K12-Stämmen kloniert und vermehrt. Unten: Das infektiöse SV40-Gesamtgenom wird aus dem Plasmidvektor herausgeschnitten, (re-)ligiert und danach in permissive CV1-Zellen transfiziert. Die transfizierten CV1-Zellen setzen SV40 frei.

In Anbetracht der rasant voranschreitenden technischen Entwicklungen im Bereich der Gensynthese (i. e. die *de novo* Synthese von Nukleinsäuresequenzen in Abwesenheit einer natürlichen Matrize) sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass bei zukünftigen gentechnischen Arbeiten das Vorliegen eines Spenderorganismus nicht

mehr zwingend erforderlich ist, sofern dessen Genomsequenz vollständig bekannt ist. So erfolgte die erste vollständig chemische Synthese eines Virus bereits im Jahr 2002 (Cello et al., 2002).

6.3 Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten mit Viren

Unter gentechnischen Arbeiten im Sinne des Gentechnikgesetz (GenTG) versteht man die Erzeugung von GVO, die Vermehrung, Lagerung, Zerstörung oder Entsorgung sowie den innerbetrieblichen Transport von GVO sowie deren Verwendung in anderer Weise. Nach ihrem Gefährdungspotenzial werden gentechnische Arbeiten in vier Sicherheitsstufen eingeteilt:

- Sicherheitsstufe 1 (S1): kein Risiko...
- Sicherheitsstufe 2 (S2): geringes Risiko...
- Sicherheitsstufe 3 (S3): mäßiges Risiko...
- Sicherheitsstufe 4 (S4): hohes Risiko...

...für die menschliche Gesundheit und / oder die Umwelt.

Gemäß § 4 der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) erfolgt die Risikobewertung und die Zuordnung gentechnischer Arbeiten zu den Sicherheitsstufen unter Berücksichtigung der Risikobewertung der Organismen und der vorgesehenen biologischen Sicherheitsmaßnahmen auf der Grundlage der Gesamtbewertung folgender Punkte:

1. Feststellung aller für die Sicherheit bedeutsamen Eigenschaften
 - a. des Empfänger- oder Ausgangsorganismus
 - b. des inserierten genetischen Materials (aus dem Spenderorganismus)
 - c. des Vektors (soweit verwendet)
 - d. des Spenderorganismus (sofern dieser während des Vorgangs verwendet wird)
 - e. des aus der Tätigkeit hervorgehenden GVO
2. Merkmale der Tätigkeit
3. Schwere und Wahrscheinlichkeit einer Gefährdung für die in § 1 Nr. 1 GenTG genannten Rechtsgüter.

Die Risikobewertung von Organismen bei gentechnischen Arbeiten beinhaltet dabei verschiedene Aspekte, insbesondere die Risikobewertung von Spender- und Emp-

fängerorganismus, die Betrachtung der zu übertragenden Nukleinsäure, gegebenenfalls die Betrachtung des Vektors (bzw. des Vektor-Empfänger-Systems), die Risikobewertung des GVO sowie das Einbeziehen anerkannter biologischer Sicherheitsmaßnahmen bei Vektoren und Empfängerorganismen.

Diese Aspekte seien kurz anhand des in Abbildung 6.4 dargestellten Beispiels der Herstellung gentechnisch veränderter SV40 verdeutlicht. Wie bereits erwähnt, werden zu diesem Zweck zwei gentechnische Arbeiten durchgeführt bzw. zwei GVO erzeugt. Beim ersten GVO handelt es sich um einen SV40-Gesamtom-Plasmid tragenden *E. coli* K12 und beim zweiten GVO um SV40 freisetzende CV1-Zellen. Spenderorganismus ist bei beiden gentechnischen Arbeiten das SV40, wobei dieses im Falle der zweiten gentechnischen Arbeit nicht direkt verwendet wird. Die zu übertragende Nukleinsäure ist in beiden Fällen das (infektiöse) SV40-Gesamtom. Im Falle der ersten gentechnischen Arbeit wird ein (Plasmid-) Vektor verwendet; im Falle der zweiten gentechnischen Arbeit ist kein Vektor erforderlich. Empfängerorganismus ist im Falle der ersten gentechnischen Arbeit *E. coli* K12 und im Falle der zweiten gentechnischen Arbeit die Affennierenzelllinie CV1.

Als Hilfsmittel für die Risikobewertung von Spender- und Empfängerorganismen stehen dem Anwender verschiedene Datenbanken des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) zur Verfügung. So nennt die „Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten“ (Organismenliste) bereits risikobewertete Mikroorganismen. SV40 wird in dieser Liste der Risikogruppe 2 zugeordnet, *E. coli* K12 der Risikogruppe 1. Die „Zelllinienliste“ (Zelllinien-Datenbank) enthält Informationen darüber, ob eine bestimmte Zelllinie, die als Spender- oder Empfängerorganismus bei gentechnischen Arbeiten verwendet wird, bereits risikobewertet wurde. Die Affennierenzelllinie CV1 wird in der Zelllinienliste der Risikogruppe 1 zugeordnet. Das „Register der *Escherichia-coli*-Empfängerstämmen für gentechnische Arbeiten“ beinhaltet Informationen über häufig als Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten verwendete *E. coli*-Stämme. In diesem Register werden *E. coli* K12-Stämme der Risikogruppe 1 zugeordnet und als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme gemäß Anhang II GenTSV anerkannt. Ein weiteres wichtiges Hilfsmittel für die Risikobewertung von Organismen stellen die allgemeinen Stellungnahmen der Zentralen Kommission für die Biologische Sicher-

heit (ZKBS) dar. Diese werden auf der Internetseite des BVL unter der Rubrik „Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit“ veröffentlicht. Im Hinblick auf das konkrete Beispiel der Herstellung gentechnisch veränderter SV40 sei an dieser Stelle auf die „Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentechnische Arbeiten mit SV40 als Spenderorganismus“ (Az.: 6790-10-34) vom August 1995 verwiesen. In dieser Stellungnahme werden die beiden dargestellten GVO der Risikogruppe 2 sowie die entsprechenden gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 (S2) zugeordnet.

6.4 Beweggründe für die Herstellung gentechnisch veränderter Viren

6.4.1 Virologische Grundlagenforschung mittels „reverser Genetik“

Der Begriff der „reversen Genetik“ ist dem Begriff der Vorwärtsgenetik gegenübergestellt. Bei der Vorwärtsgenetik oder klassischen Genetik werden Organismen mit auffälligen Merkmalen bzw. Eigenschaften auf deren zugrunde liegenden genetischen Ursachen untersucht („vom Phänotyp zum Genotyp“).

Im Gegensatz dazu, werden bei der reversen Genetik Genomabschnitte, in der Regel Gene, eines Organismus mit Hilfe gentechnischer Verfahren gezielt verändert. Die Untersuchung der Merkmale bzw. Eigenschaften der generierten Mutanten ermöglicht danach Rückschlüsse auf die Funktion der entsprechenden Gene bzw. Genprodukte („vom Genotyp zum Phänotyp“).

Die Entwicklung von gentechnischen (reverse Genetik-) Verfahren zur gezielten Herstellung von Virusmutanten hat die Grundlagenforschung im Bereich der molekularen Virologie revolutioniert. Die Anwendung der reversen Genetik bei Viren trägt wesentlich dazu bei, zu verstehen, wie diese auf molekularer Ebene „funktionieren“. Dieses Verständnis ist eine wichtige Grundlage für die Entwicklung neuer antiviraler Medikamente und Impfstoffe (Palese et al., 1996).

6.4.2 Virale Vektoren als Werkzeug für den Gentransfer

Gemäß Definition im GenTG ist ein Vektor „ein biologischer Träger, der Nukleinsäure-Segmente in eine neue Zelle einführt“.

Prinzipiell kann jedes Virus gentechnisch so verändert werden, dass es als Vektor für einen Gentransfer genutzt werden kann. Die zu übertragenden Nukleinsäure-Segmente (Transgene) werden dafür mit Hilfe der reversen Genetik in das virale Genom eingebaut. Alle viralen Vektoren besitzen noch die Eigenschaft des entsprechenden Ausgangsvirus, ihr Genom effizient in Zielzellen einzuführen. In diesen kommt es dann zur Bildung des gewünschten Transgenprodukts (i. d. R. Proteins). Virale Vektoren werden als Werkzeuge für den Gentransfer in Zellen konstruiert. Im Vordergrund des Interesses steht daher zumeist nicht die Erforschung des Ausgangsvirus, sondern das Transgen bzw. Transgenprodukts. Unterscheidungsmerkmale viraler Vektorsysteme sind dabei u. a. die Verpackungskapazität (maximale Größe des Transgens), die Fähigkeit zur Integration ins Wirtschromosom, die Fähigkeit zu einer eigenständigen Replikation, die Immunogenität sowie die Anwendungsgebiete (z. B. Grundlagenforschung, Gentherapie, Vakzinierung, Onkolyse). Einige häufig verwendete virale Vektoren sowie deren zugrunde liegenden Ausgangsvektoren werden im Nachfolgenden kurz skizziert (Abb. 6.5):

Retrovirale Vektoren sind von Retroviren abgeleitet. Die Familie der *Retroviridae* ist u. a. dadurch gekennzeichnet, dass sie ihr RNA-Genom mit Hilfe des Enzyms „reverse Transkriptase“ (RT) in eine DNA umschreiben, welche dann obligat in das Wirtszellgenom integriert wird. Die integrierte retrovirale DNA wird dabei als Provirus bezeichnet. Retrovirale Vektoren besitzen i. d. R. veränderte Oberflächenproteine. Diese werden eingeführt, um den Zielzelltropismus des retroviralen Vektors zu erweitern; man spricht auch von Pseudotypisierung. Retrovirale Vektoren besitzen eine Verpackungskapazität zwischen sieben und zehn Kilobasen (RNA). Wie beim Ausgangsvirus wird ihr RNA-Genom in eine DNA umgeschrieben und proviral in das Zielzellgenom integriert. Die retroviralen Vektoren sind *per se* replikationsdefekt. Die stabil integrierten Proviren werden jedoch bei den Zellteilungen auf die Tochterzellen weitergegeben. Retrovirale Vektoren besitzen eine geringe Immunität; ihre Anwendungsgebiete liegen insbesondere in der Grundlagenforschung (z. B. im Bereich der Herstellung stabil transduzierter Zelllinien) sowie in der Gentherapie (Yi et al., 2011). AAV-basierte Vektoren sind von dem Adeno-assoziierten Virus (AAV) abgeleitet, welches zur Familie der *Parvoviridae* gehört. AAV besitzt die Besonderheit, dass es für seine Replikation die Anwesenheit eines Helfervirus (z. B. Adenovirus) benötigt.

AAV-basierte Vektoren besitzen eine Verpackungskapazität von etwa 4,7 Kilobasen (DNA). Sie besitzen keine eigenständige Replikationsfähigkeit und integrieren nicht (bzw. nur selten) in das Genom der Zielzelle. AAV-basierte Vektoren besitzen eine geringe Immunität; ihr Anwendungsgebiet liegt insbesondere in der Gentherapie (Büning et al., 2008).

Adenovirale Vektoren sind von Adenoviren abgeleitet. Es gibt verschiedene Generationen adenoviraler Vektoren. Die „erste Generation“ adenoviraler Vektoren besitzt dabei eine Verpackungskapazität von bis zu 8,2 Kilobasenpaaren (DNA), wohingegen die sogenannten „Helfer-abhängigen“ adenoviralen Vektoren eine Verpackungskapazität von bis zu 36 Kilobasenpaaren (DNA) besitzen. Adenovirale Vektoren besitzen i. d. R. keine eigenständige Replikationsfähigkeit (Ausnahme: „onkolytische Adenoviren“) und integrieren nicht ins Genom der Zielzelle. Die Immunogenität der adenoviralen Vektoren ist hoch (erste Generation) bzw. mittel (Helfer-abhängige). Ihre Anwendungsgebiete liegen insbesondere in der Gentherapie, der Vakzinierung sowie der Onkolyse (Thomas et al., 2003).

Vacciniavirus- bzw. MVA-basierte Vektoren sind vom Vacciniavirus bzw. dem „Modifizierten Vacciniavirus Ankara“ (MVA) abgeleitet. Beide Ausgangsviren gehören zur Familie der *Poxviridae* (Pockenviren). Vacciniavirus- bzw. MVA-basierte Vektoren besitzen eine Verpackungskapazität zwischen 25 und 50 Kilobasenpaaren (DNA). Sie integrieren nicht in das Genom der Zielzelle. Im Gegensatz zu MVA-basierten Vektoren besitzen Vacciniavirus-basierte Vektoren noch die Fähigkeit zur Replikation in menschlichen Zellen. Die Immunität dieser viralen Vektoren ist hoch. Ihre Anwendungsgebiete liegen insbesondere in der Vakzinierung sowie der Onkolyse (Veradi et al., 2012).

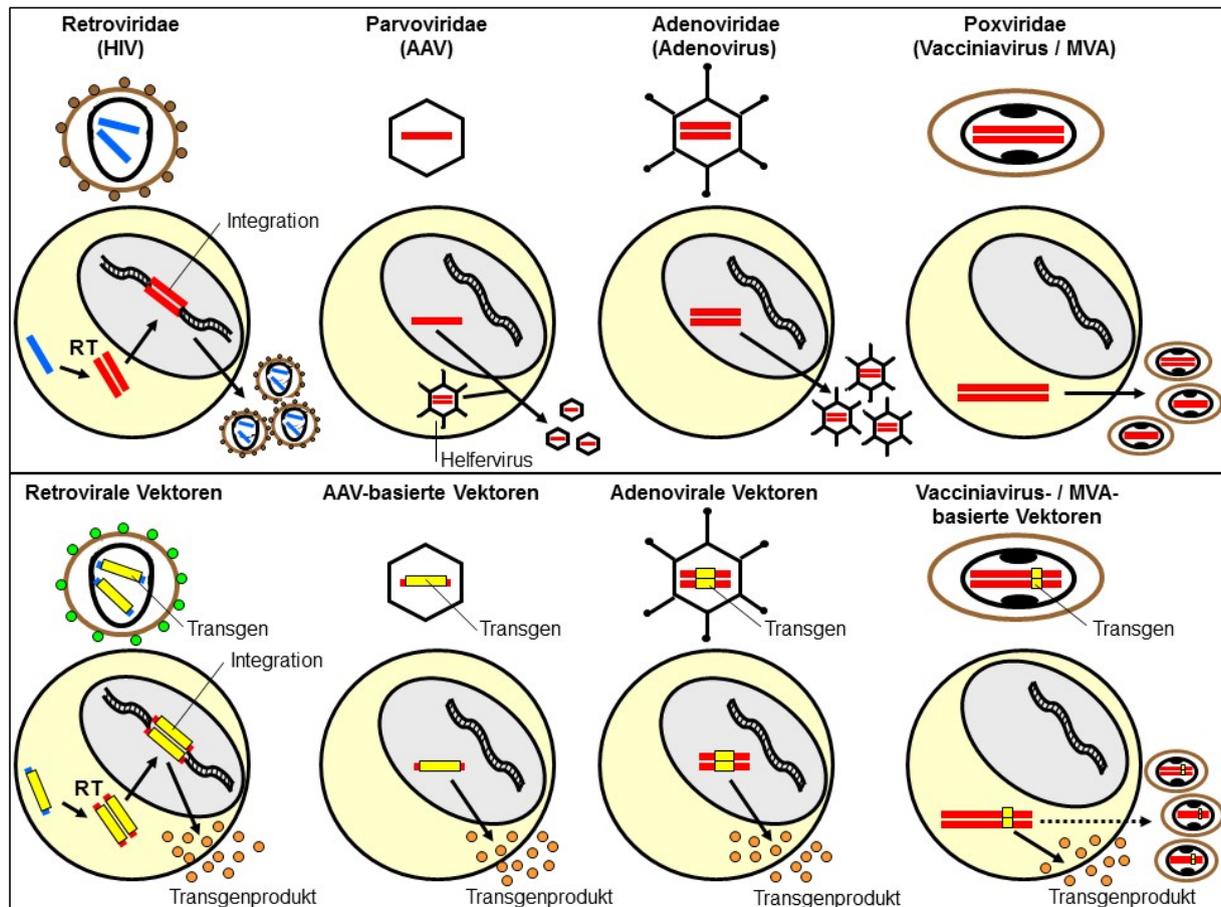


Abbildung 6.5: Viren und davon abgeleitete virale Vektoren. Prinzipiell kann jedes Virus (obere Teilabildung) gentechnisch so verändert werden, dass es als Vektor für einen Gentransfer (untere Teilabildung) genutzt werden kann. Die zu übertragenden Transgene (gelbe Linien) werden dafür mit Hilfe der reversen Genetik in das virale Genom (rote bzw. blaue Linien) eingebaut. Alle viralen Vektoren besitzen noch die Eigenschaft des entsprechenden Ausgangsvirus, ihr Genom effizient in Zielzellen einzuführen. In diesen kommt es dann zur Bildung des gewünschten Transgenprodukts, i. d. R. Proteins (orangene Punkte). Retrovirale Vektoren sind von Retroviren abgeleitet. Die Familie der Retroviridae ist dadurch gekennzeichnet, dass sie ihr RNA-Genom (blaue Linien) mit Hilfe der reversen Transkriptase in eine DNA (rote Linien) umschreiben, welche dann in das Wirtszellgenom integriert wird. Auch retrovirale Vektoren schreiben ihr RNA-Genom in eine DNA um und integrieren diese stabil in das Zielzellgenom. AAV-basierte Vektoren sind von dem Adeno-assoziierten Virus (AAV) abgeleitet. AAV benötigt für seine Replikation die Anwesenheit eines Helfervirus. AAV-basierte Vektoren integrieren nicht (bzw. nur selten) in das Genom der Zielzelle. Adenovirale Vektoren sind von Adenoviren abgeleitet. Sie integrieren nicht ins Genom der Zielzelle. Vacciniavirus- bzw. MVA-basierte Vektoren sind vom Vacciniavirus bzw. dem „Modifizierten Vacciniavirus Ankara“ abgeleitet. Sie integrieren nicht in das Genom der Zielzelle. Im Gegensatz zu MVA-basierten Vektoren besitzen Vacciniavirus-basierte Vektoren noch die Fähigkeit zur Replikation in menschlichen Zellen. Abkürzungen: AAV: Adeno-assoziiertes Virus; HIV: Humanes Immundefizienzvirus; MVA: Modifiziertes Vacciniavirus Ankara; RT: reverse Transkriptase.

6.5 Alipogene Tiparvovec (Glybera®)

Aus aktuellem Anlass soll in diesem Beitrag kurz auf das erste, von der EU-Kommission im Jahre 2012 zugelassene Gentherapiemedikament der westlichen Welt eingegangen werden (Flemming, 2012; Melchiorri et al., 2013). Es handelt sich hierbei um Alipogene Tiparvovec (eingetragener Handelsname: Glybera®) der Firma uniQure, einem Medikament zur Behandlung der Lipoproteinlipase-Defizienz (LPLD) (<http://www.uniquire.com/products/glybera/>, Version vom 21.11.2013). Bei der LPLD handelt es sich um eine seltene Fettstoffwechselerkrankung. Betroffen ist hiervon insbesondere der exogene Fettabbauweg.

Beim exogenen Fettabbauweg werden Nahrungslipide vom Darm in die Leber transportiert. Der Prozess sieht dabei im Einzelnen wie folgt aus (Abb. 6.6): Die Zellen der Dünndarmwand synthetisieren durch Übertragung freier Fettsäuren auf Monoglyceride (erneut) Triglyzeride. Aus den synthetisierten Triglyzeriden werden zusammen mit Cholesterinestern, Phospholipiden sowie Apolipoproteinen sogenannte Chylomikronen gebildet. Diese werden in die Lymphe abgegeben und gelangen über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf. Die Lipoproteinlipase (LPL) ist an der Oberfläche der Endothelzellen der Blutkapillaren im Muskel- bzw. Fettgewebe lokalisiert. Die Aktivität der LPL vermindert den Triglyzeridgehalt der Chylomikronen durch Spaltung der Triglyzeride in freie Fettsäuren und Monoglyceride. Die Spaltprodukte werden in das Muskel- bzw. Fettgewebe aufgenommen und können dort zur Energiegewinnung herangezogen werden. Die im Triglyzeridgehalt reduzierten Chylomikronen (Chylomikronen-Remnants) werden in die Leber aufgenommen und dort abgebaut (Klinke et al., 2009; Ory, 2007).

Die Ursache der Lipoproteinlipase-Defizienz (LPLD) ist ein Defekt im Lipoproteinlipase-Gen (Rahalkar et al., 2009). Die Inzidenz der LPLD ist sehr niedrig (~1 pro 1.000.000). Die betroffenen Patienten weisen extrem erhöhte Triglyzeridspiegel im Blut auf. Die Krankheit äußert sich durch Fettablagerungen in der Haut, Leber- und Milzvergrößerungen sowie Bauchschmerzen. LPLD-Patienten besitzen weiterhin ein stark erhöhtes Risiko an einer Pankreatitis zu erkranken. Die bisherige Therapie stellt insbesondere die Einhaltung einer extrem fettarmen Diät dar (Abb. 6.7).

Bei Glybera® handelt es sich um einen AAV-basierten Vektor, der als Transgen das Gen für die humane Lipoproteinlipase (LPL) trägt (Burnett und Hooper, 2009). Gly-

bera[®] wird durch eine einmalige Reihe von kleinen intramuskulären Injektionen in die Beine verabreicht. Der AAV-basierte Vektor wird nach der Applikation von Muskelzellen aufgenommen, welche im Anschluss die LPL produzieren. Die Markteinführung von Glybera[®] soll im zweiten Halbjahr 2013 erfolgen (Abb. 6.7).

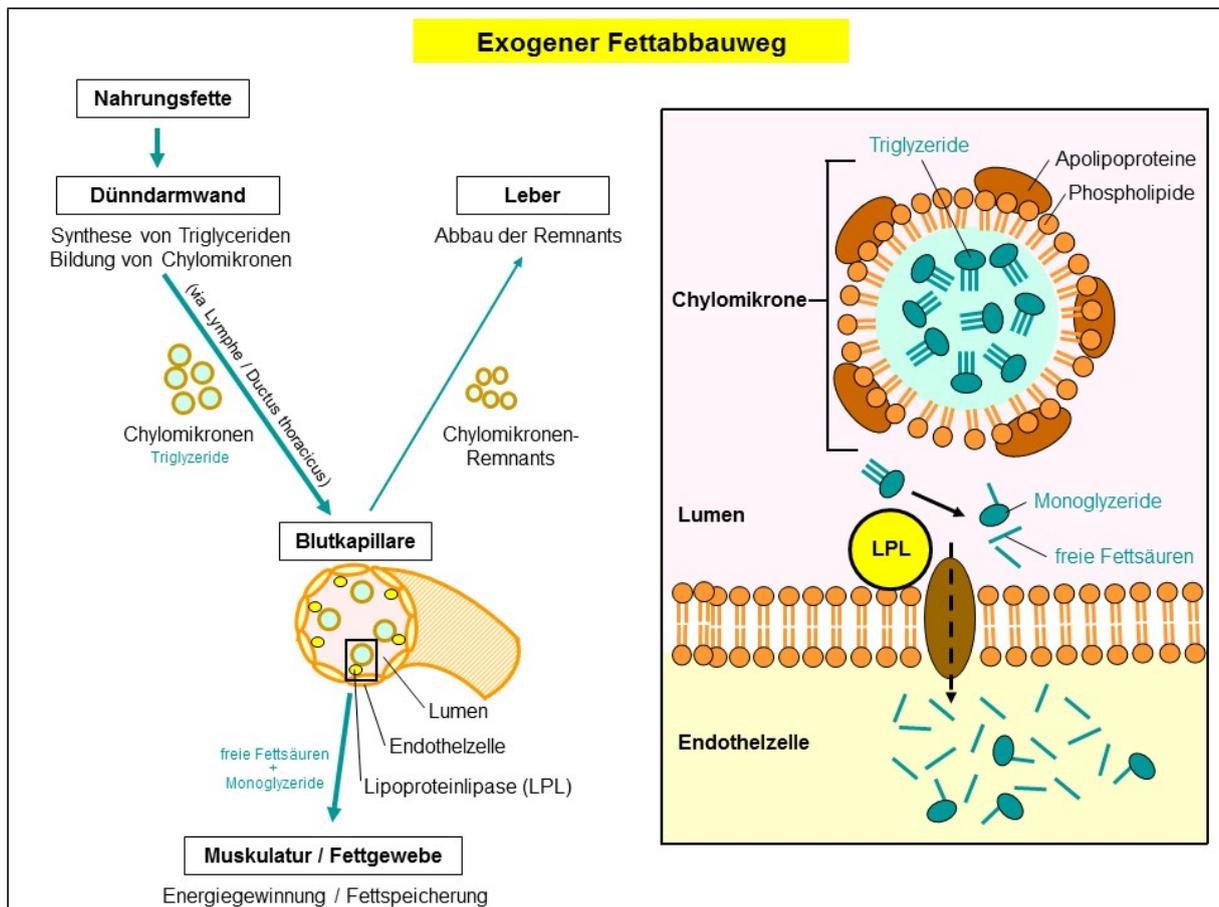


Abbildung 6.6: Der exogene Fettabbaueweg. Die Zellen der Dünndarmwand synthetisieren Triglyceride. Aus diesen werden zusammen mit Cholesterinestern, Phospholipiden sowie Apolipoproteinen Chylomikronen gebildet. Diese werden in die Lymphe abgegeben und gelangen über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf. Die Lipoproteinlipase (LPL) ist an der Oberfläche der Endothelzellen der Blutkapillaren im Muskel- bzw. Fettgewebe lokalisiert. Die Aktivität der LPL vermindert den Triglyceridgehalt der Chylomikronen durch Spaltung der Triglyceride in freie Fettsäuren und Monoglyceride. Die Spaltprodukte werden in das Muskel- bzw. Fettgewebe aufgenommen und können dort zur Energiegewinnung herangezogen werden. Die Chylomikronen-Remnants werden in die Leber aufgenommen und dort abgebaut. Abkürzungen: LPL: Lipoproteinlipase.

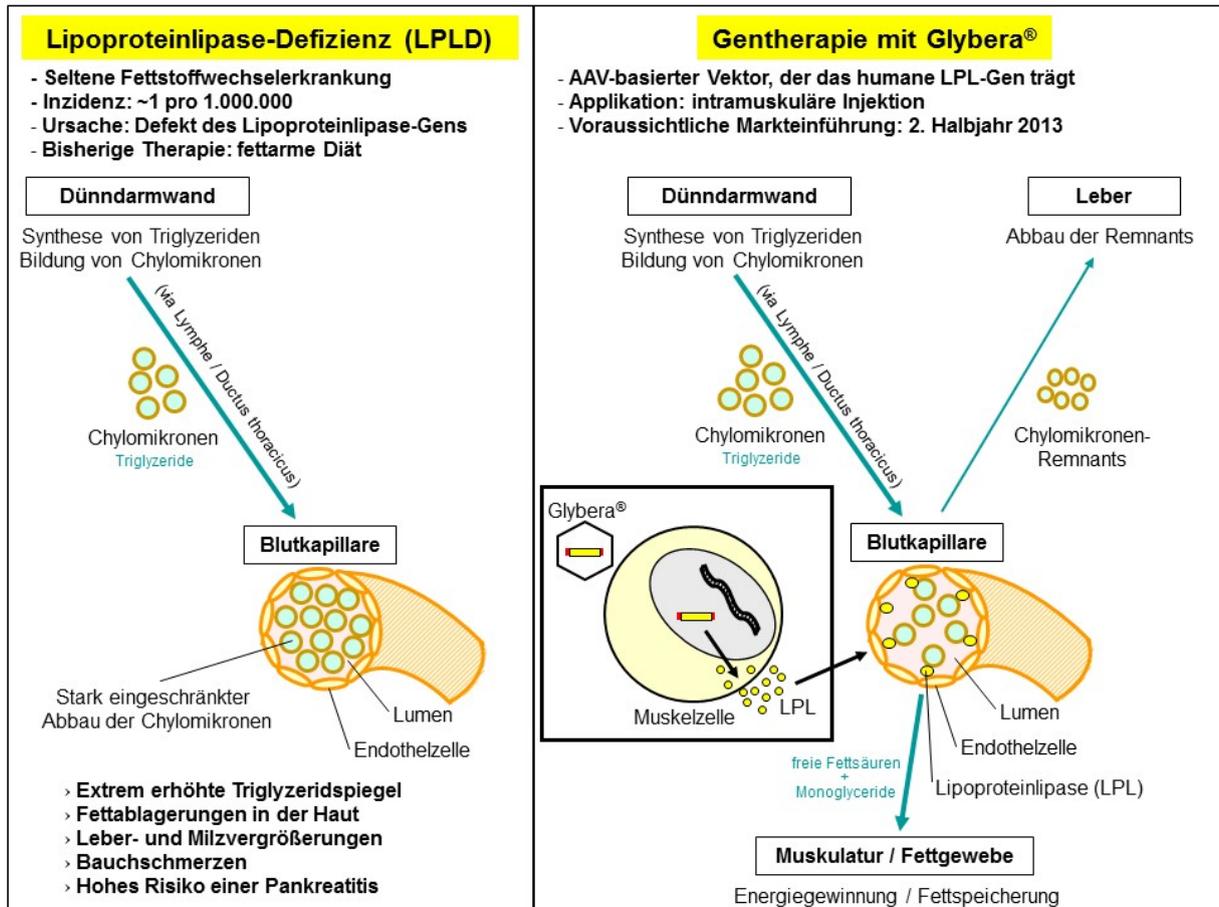


Abbildung 6.7: Lipoproteinlipase-Defizienz (LPLD) und Gentherapie mit Glybera. Linke Spalte: Die Ursache der Lipoproteinlipase-Defizienz (LPLD) ist ein Defekt im Lipoproteinlipase-Gen. Die Inzidenz der LPLD ist sehr niedrig (~1 pro 1.000.000). Die betroffenen Patienten weisen extrem erhöhte Triglyzeridspiegel im Blut auf. Die Krankheit äußert sich durch Fettablagerungen in der Haut, Leber- und Milzvergrößerungen sowie Bauchschmerzen. Die Patienten besitzen ein stark erhöhtes Risiko an einer Pankreatitis zu erkranken. Rechte Spalte: Bei Glybera® handelt es sich um einen AAV-basierten Vektor, der das humane LPL-Gen trägt. Glybera® wird durch intramuskuläre Injektion appliziert. Nach der Applikation wird der AAV-basierte Vektor von Muskelzellen aufgenommen, welche im Anschluss die LPL produzieren. Abkürzungen: AAV: Adeno-assoziiertes Virus; LPL: Lipoproteinlipase; LPLD Lipoproteinlipase-Defizienz.

6.6 Literatur

Burnett, J.R., Hooper, A.J. (2009). Alipogene tiparvovec, an adeno-associated virus encoding the Ser(447)X variant of the human lipoprotein lipase gene for the treatment of patients with lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Mol Ther* 11, 681-691.

Büning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadt-Humme, S. Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med* 10, 717-733.

- Cello, J., Paul, A.V., Wimmer, E. (2002). Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science* 297, 1016-1018.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W., Helling, R.R. (1973). Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 3240-3244.
- Flemming, A. (2012). Regulatory watch: pioneering gene therapy on brink of approval. *Nat Rev Drug Discovery* 11, 664.
- Goerlich, O., Baiker, A., Busch, U. (2012). 20 Jahre analytische Gentechnik in Bayern. In: Band 6 der Schriftenreihe Gentechnik für Umwelt und Verbraucherschutz - 4. Fachtagung Gentechnik. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen. ISBN: 1866-7775.
- Goff S.P., Berg, P. (1976). Construction of Hybrid Viruses Containing SV40 and λ Phage DNA Segments and Their Propagation in Cultured Monkey Cells. *Cell* 9, 695-705.
- Jackson, D.A., Symons, R.H., Berg, P. (1972). Biochemical Method for Inserting NEW Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 2904-2909.
- Klinke, R., Pape, H.-P., Kurtz, A., Silbernagl S. (6. Auflage 2009). *Physiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Melchiorri, D., Pani, L., Gasparini, P., Cossu, G., Ancans, J., Borg, J.J., Draï, C., Fiedor, P., Flory, E., Hudson, I., Leufkens, H.G., Müller-Berghaus, J., Narayanan, G., Neugebauer, B., Pokrotnieks, J., Robert, J.L., Salmonson, T., Schneider, C.K. (2013). Regulatory evaluation of Glybera in Europe – two committees, one mission. *Nat Rev Drug Discov* 12, 719.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Schätzl, H. (3. Auflage 2010). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Ory, D.S. (2007). Chylomicrons and Lipoprotein Lipase at the Endothelial Surface: Bound and GAG-ed?. *Cell Metabolism* 5, 229-231.

Palese, P., Zheng, H., Engelhardt, O.G., Pleschka, S., Garcia-Sastre, A. (1996). Negative-strand RNA viruses: Genetic engineering and applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11354-11358.

Rahalkar, A.R., Giffen, F., Har, B., Ho, J., Morrison, K.M., Hill, J., Wang, J., Hegele, R.A., Joy, T. (2009). Novel LPL mutations associated with lipoprotein lipase deficiency: two case reports and a literature review. *Can J Physiol Pharmacol* 87, 151-160.

Thomas C.E., Ehrhardt, A., Kay, M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4, 346-358.

Veradi, P.H., Titong, A., Hagen, C.J. (2012). A vaccinia virus renaissance: new vaccine and immunotherapeutic uses after smallpox eradication. *Hum Vaccin Immunother* 8, 961-970.

Yi, Y., Noh, M.J., Lee, K.H. (2011). Current advances in retroviral gene therapy. *Curr Gene Ther* 11, 218-228.

Analytik II

7 Parallele Quantifizierung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO)

Dr. Lars Gerdes, Dr. Ulrich Busch und Dr. Sven Pecoraro

**Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL),
Oberschleißheim**

Der weltweite Anbau von gentechnisch veränderten Nutzpflanzen — insbesondere von Mais-, Soja-, Raps- und Baumwolllinien — hat über die letzten Jahre kontinuierlich zugenommen [1]. Importe von Lebens- und Futtermitteln sowie Rohstoffen — vor allem aus Nicht-EU-Ländern — stellten in diesem Zusammenhang eine wesentliche Quelle von gentechnisch verändertem Material dar. Dies hat in der amtlichen Überwachung zu einer wachsenden Zahl an Analysen geführt, bei denen mehrere verschiedene gentechnisch veränderte Organismen (GVO) gleichzeitig in einer Probe vorliegen, wie dies beispielsweise Untersuchungsergebnisse bei importierter Schokoware verdeutlichen [2]. In einem konkreten Fall waren in zahlreichen nicht gekennzeichneten Produkten bis zu zehn verschiedene gentechnisch veränderte Mais- und Sojalinien qualitativ nachweisbar [3]. Um die notwendige Quantifizierung von mehreren GVO in solchen Proben effizient und ressourcenschonend bezüglich Zeitaufwand und Kosten vornehmen zu können, wurde ein flexibles, miniaturisiertes Untersuchungsformat für die parallele Quantifizierung einer Probe auf viele GVO in einem Arbeitsgang entwickelt.

GVO werden heute vorwiegend anhand von charakteristischen DNA-Sequenzen mittels Real-time-PCR (qPCR) nachgewiesen. Diese Methode hat sich bewährt, da sie robust, spezifisch und sensitiv ist. Der Gehalt an GVO wird aus der Menge an entsprechender Fremd-DNA in einer Probe ermittelt. Die transgenen DNA-Kopien des GVO (sogenanntes Transgen) werden zu pflanzenartspezifischen DNA-Kopien (sogenanntes Referenzgen) ins Verhältnis gesetzt, um den Anteil an GVO für die jeweilige Pflanzenart bzw. Zutat zu erhalten. Konkret werden dazu aus bekannten Mengen an DNA-Kopien Standardkurven erstellt und die unbekanntes Kopienzahlen in der

Probe mittels Linearregression berechnet. Die qPCR findet in kleinen Kunststoff-Reaktionsgefäßen statt, die z. B. in einer acht mal zwölf Reihen von Kavitäten umfassenden 96-Well-Mikrotiter-Platte zusammengefasst sein können (Abb. 7.1A, B). Neben den Reaktionen für Standardkurven und Proben müssen auf diesen Platten auch Reaktionen für Positiv- und Negativkontrollen untergebracht werden; die Reaktionen werden in Replikaten eingesetzt, um Fehler im Ansatz erkennen und/oder ausgleichen zu können (Abb. 7.1C).

In der Routine-Analytik kommen in den letzten Jahren vermehrt Proben vor, in denen gleich mehrere verschiedene GVO qualitativ nachgewiesen werden können. Die anschließende quantitative Analytik findet bislang sequentiell statt, d. h. ein GVO nach dem anderen wird nacheinander gemessen, bis alle befundrelevanten Daten vorliegen. Mit dem vorgestellten Projekt sollte diese Vorgehensweise rationalisiert werden, sodass mehrere GVO parallel quantifiziert werden können, um den Zeit- und Personalaufwand für solche Proben zu verringern.

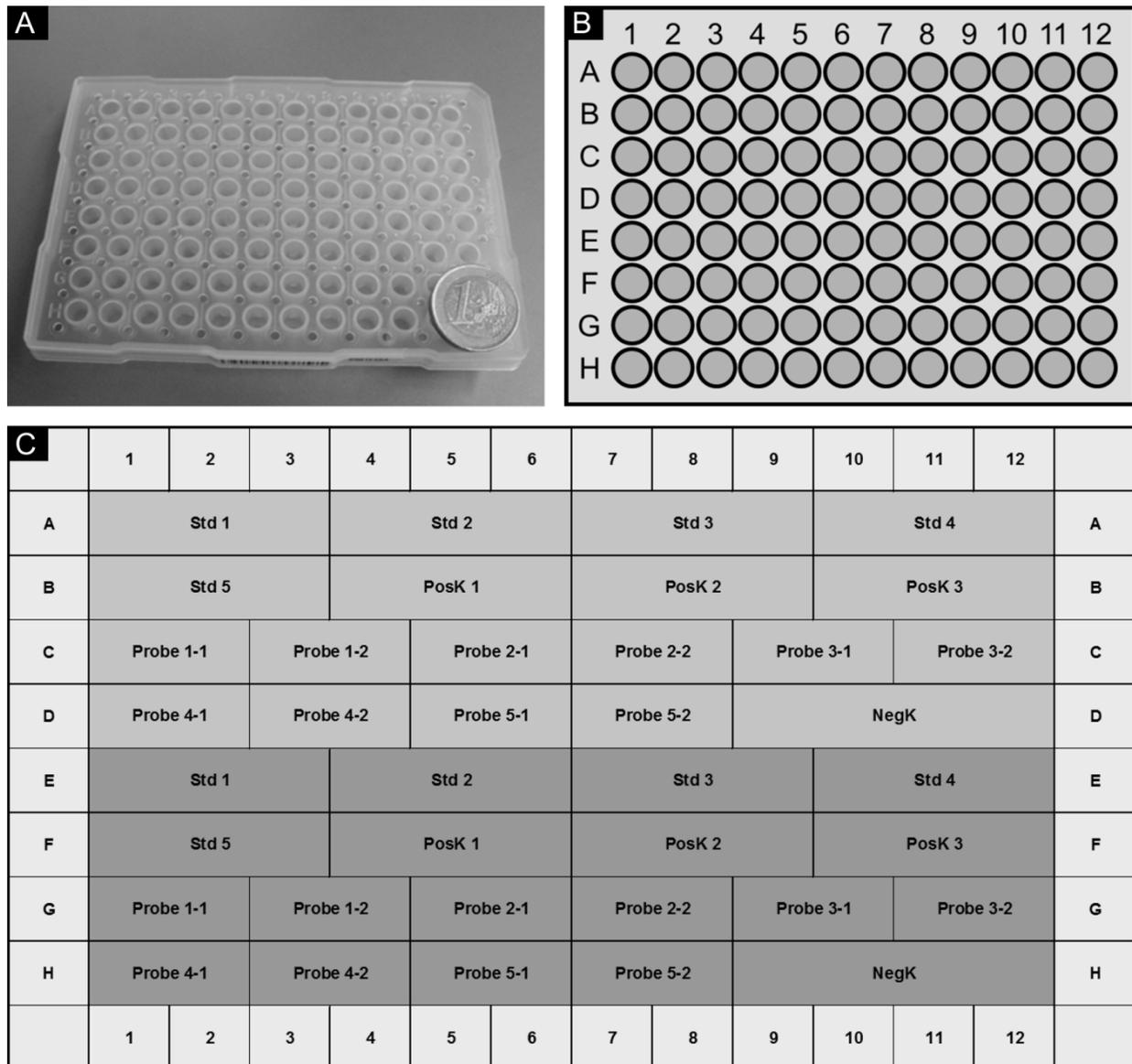


Abbildung 7.1: 96-Well-Mikrotiter-Platten

A Foto einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit 1-€-Münze als Größenmaßstab. **B** Schema einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit den acht Zeilen und zwölf Spalten. **C** Schematische Darstellung der Reaktionen für die standardmäßige Quantifizierung eines GVO in einer 96-Well-Platte. Referenzgen-Reaktionen in der oberen, Transgen-Reaktionen in der unteren Hälfte. Standardkurven-Punkte (Std), Positiv- (PosK) und Negativ-Kontrollen (NegK).

Die zusätzlich benötigten Reaktionen für weitere Standardkurven, Positiv- und Negativkontrollen sind so zahlreich, dass sie sich nicht mehr in den standardmäßig eingesetzten 96-Well-Mikrotiterplatten unterbringen lassen (vgl. Abb. 7.1C). Der Umstieg auf ein 384-Well-Format (Abb. 7.2A, B) erforderte eine Miniaturisierung der Reaktionsansätze. Diese 384-Well-Technik wurde zunächst im Labor eingeführt. Dafür mussten Reaktionsvolumina und -zusammensetzung angepasst, Pipettierroboter,

qPCR-Gerät und Auswertungs-Vorlagen entsprechend eingestellt und getestet werden.

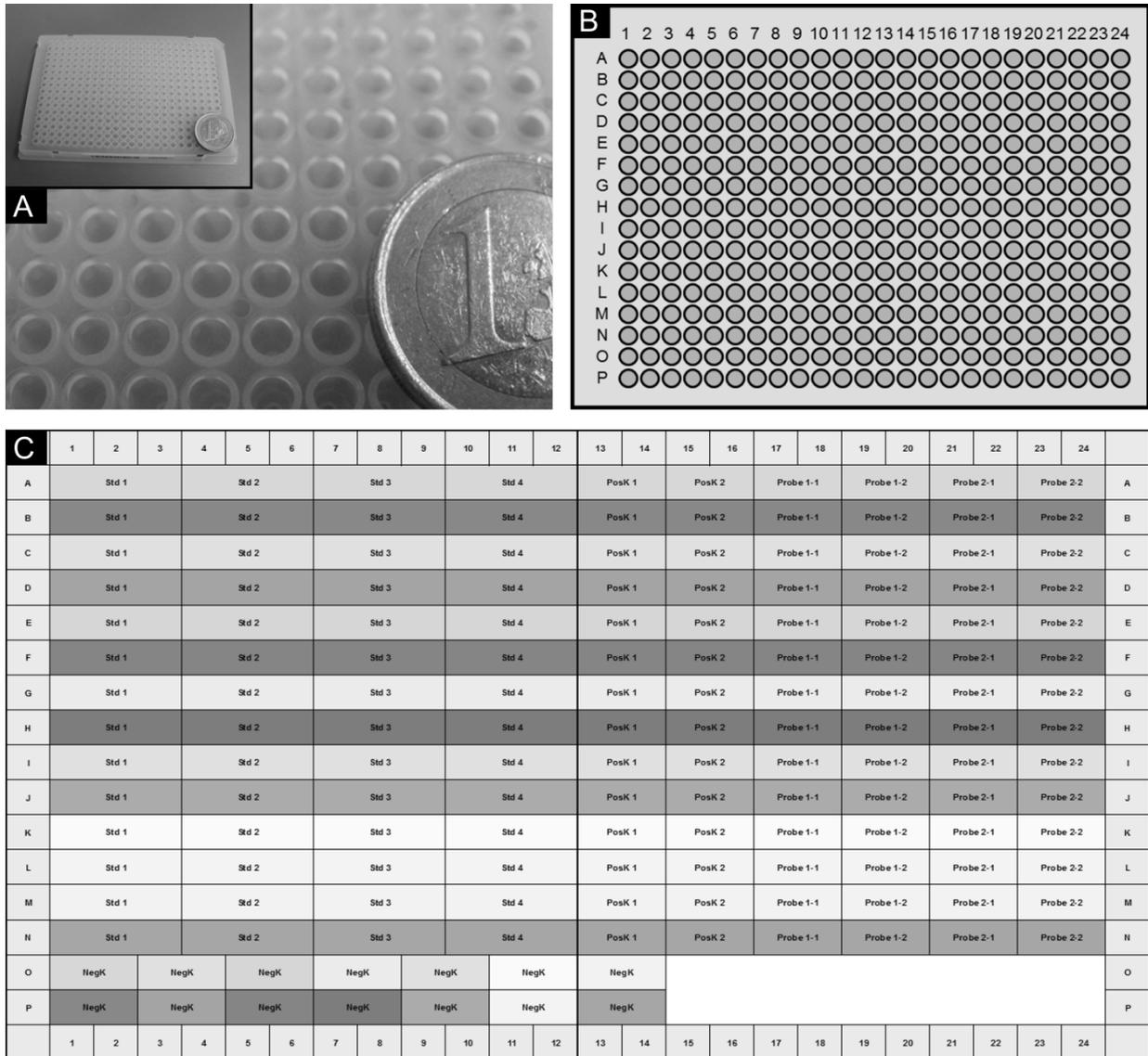


Abbildung 7.2: Layout parallele Quantifizierung

A Fotos einer 384-Well-Mikrotiterplatte mit 1-Euro-Münze als Größenmaßstab. Die Abmessungen der Standfläche entsprechen denen einer 96-Well-Platte (vgl. Abb. 1A), die einzelnen Wells sind entsprechend kleiner. **B** Schema einer 384-Well-Mikrotiterplatte mit den 16 Zeilen und 24 Spalten. **C** Schematische Darstellung der Reaktionen für die entwickelte parallele Quantifizierung von bis zu sieben GVO. Pro Reihe wird ein Nachweissystem eingesetzt, in ungeraden Reihen für die Referenzgene, in geraden für die Transgene. Die Standardkurven für Referenzgenen und Transgenen bestehen aus vier Punkten in Triplikaten. Zwei Positivkontrollen (PosK) in Duplikaten werden mitgemessen. Zwei Proben à zwei Isolate können in Duplikaten gemessen werden oder alternativ eine Probe à zwei Isolate in Quadruplikaten. Negativkontrollen (NegK) werden in Duplikaten angesetzt; sie befinden sich immer in den untersten beiden Reihen (O, P) und rücken nicht bei weniger als sieben Nachweisen nach oben auf.

Herausgekommen ist ein Analysesystem, mit dem parallele Quantifizierungen von bis zu sieben GVO in einem einzigen Untersuchungsgang möglich sind (Abb. 7.2C). Bei herkömmlichen Standarduntersuchungen kann jeweils nur der Gehalt an einer GVO-Linie quantifiziert werden (vgl. Abb. 7.1C). Das entwickelte Nachweissystem kann je nach Bedarf für die parallele Quantifizierung von ein bis sieben GVO vorbereitet werden; je nach Bedarf werden die Zeilen mit den entsprechenden Reaktionen bestückt oder leer gelassen (Abb. 7.2C). Die Zeilen sind modular austauschbar, da sich vergleichbare Reaktionen immer in denselben Spalten befinden, was die anschließende semi-automatische Auswertung mit Excel vereinfacht und fehlerhaften Bezügen vorbeugt.

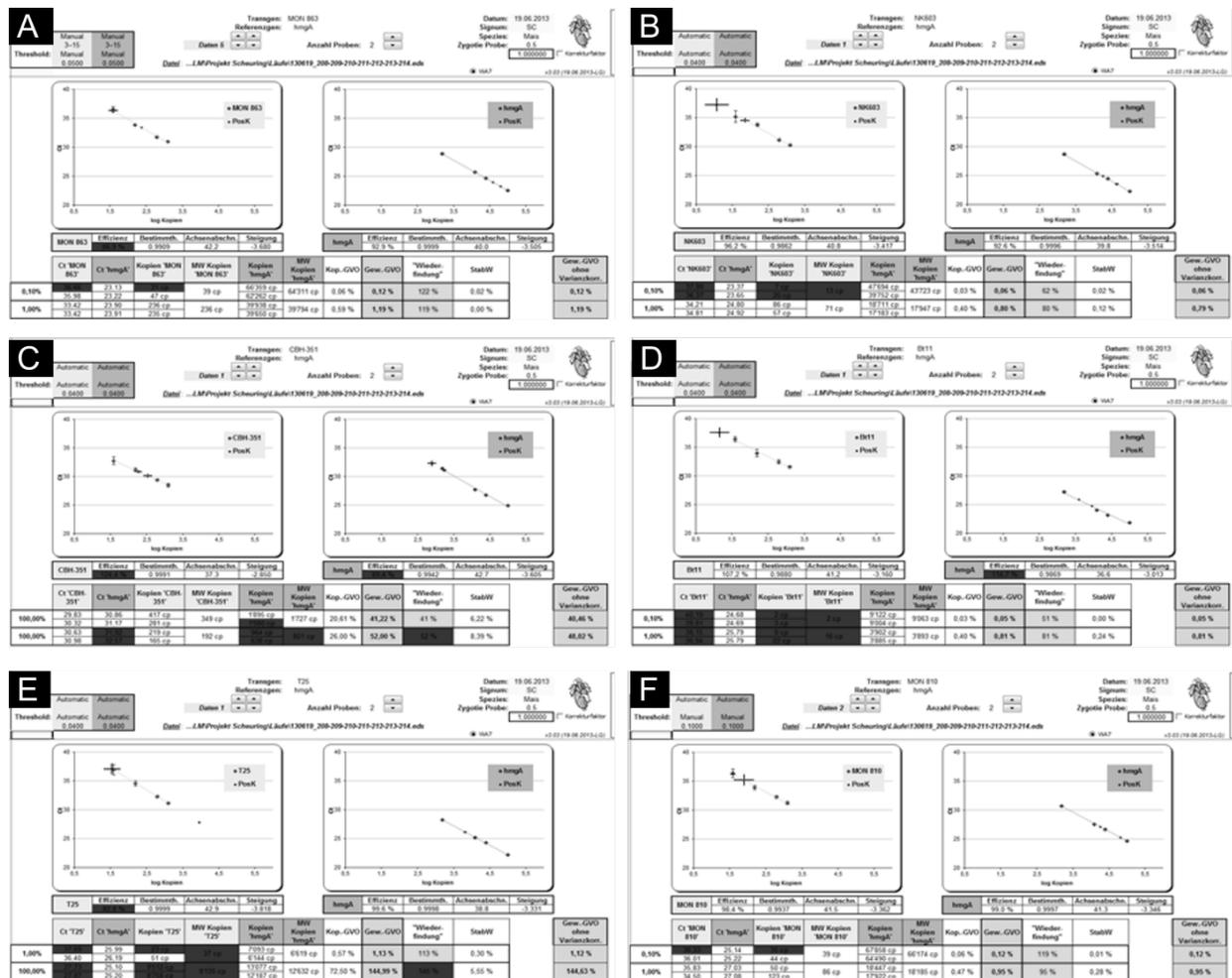


Abbildung 7.3: Testlauf Mais

Einsatz des entwickelten parallelisierten Quantifizierungssystems. Die Abbildungen zeigen zusammenfassend Bildschirmfotos aus der erstellten Excel-Auswertungsvorlage für die parallele Quantifizierung. Positivkontrollen für die sechs GVO-Mais-Linien MON 863 (A), NK603 (B), CBH-351 (C), Bt11 (D), T25 (E) und MON 810 (F) wurden in einem Gerätelauf parallel quantifiziert.

Die prinzipielle Einsatzfähigkeit wurde durch Testläufe demonstriert. So konnte Referenzmaterial für sechs verschiedene GVO-Maislinien parallel in einem Analysegang vermessen werden (Abb. 7.3). Ein entsprechender Test umfasste die parallele Quantifizierung von fünf GVO-Soja-Linien (Daten nicht abgebildet). Eine Routineprobe weißes Maismehl aus den Lagerbeständen des LGL wurde erfolgreich auf die beiden enthaltenen GVO-Maislinien parallel quantifiziert (Abb. 7.4).

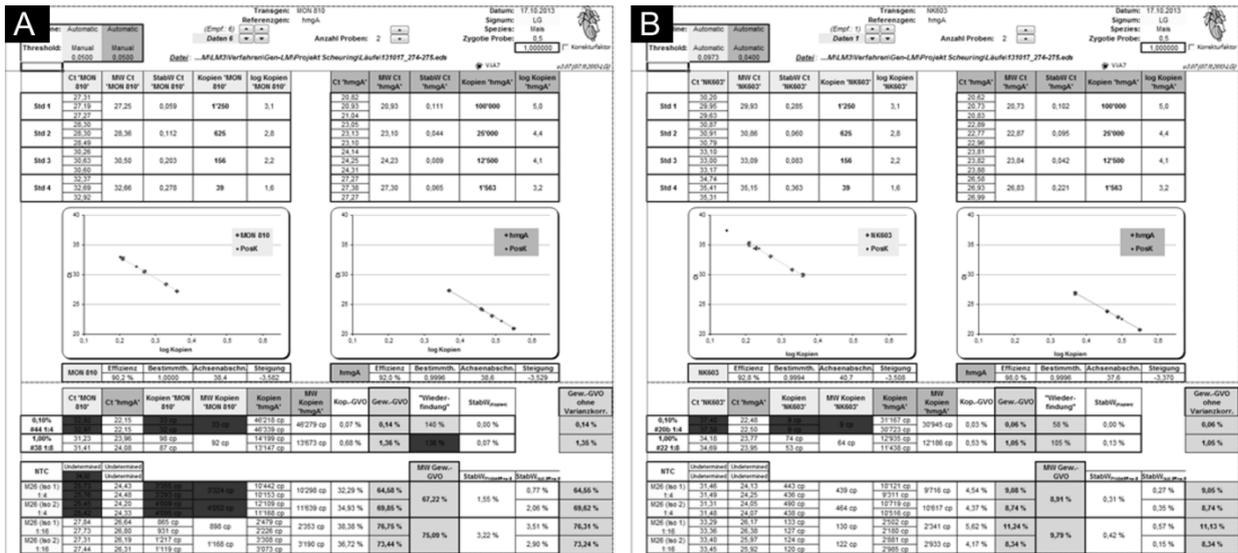


Abbildung 7.4: Routine-Probe Einsatz des entwickelten parallelisierten Quantifizierungssystems mit einer Routineprobe. Die Abbildungen zeigen zusammenfassend Bildschirmfotos aus der erstellten Excel-Auswertungsvorlage für die parallele Quantifizierung. In einer Probe weißes Maismehl wurden parallel die beiden GVO-Maislinien MON 810 (A) und NK603 (B) quantifiziert.

Das entwickelte parallele Quantifizierungssystem soll zukünftig in die Routine-Analytik eingebunden werden. Ziel ist die standardmäßige Bearbeitung von entsprechenden Routineproben, die mehrere verschiedene GVO enthalten. Nach der Generierung von ausreichend Daten ist die Publikation in einer internationalen Fachzeitschrift angestrebt.

Das vorgestellte parallele Quantifizierungssystem wurde in einem vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) finanzierten Forschungsprojekt am LGL in Oberschleißheim entwickelt [4]. Für exzellente technische Unterstützung danken wir insbesondere Sandra Scheuring und Verena Steigauf sowie Claudia Bujotzek, Krimhilde Posthoff, Melina Mehmedovic, Roswitha Dorfner und Ulrike Mulats.

Literatur

1. James, C., *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012*. ISAAA Brief, 2013. **44**.
2. Pecoraro, S., M. Butzenlechner, and U. Busch, *Süß, aber gentechnisch - Untersuchung von Süßwaren aus den USA*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 2011. **2011**(Juni):254-259.
3. Gerdes, L., U. Busch, and S. Pecoraro, *Parallelised real-time PCR for identification of maize GMO events*. European Food Research Technology, 2012. **234**(2):315-322.
4. Gerdes, L. and S. Pecoraro, *Parallele Quantifizierung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in Lebens- und Futtermitteln – Entwicklung und Etablierung eines miniaturisierten Hochdurchsatz-Analysesystems*, in [1208 / 547 62 / 99 / 11-17 (Vorhabens-ID: 60664)]. 2013, LGL.

8 Anwendungsbeispiel für die digitale PCR: Quantifizierung von Kuhmilchanteilen in Büffel-Mozzarella

Dr. Hermann Rüggeberg

Impetus GmbH & Co. Bioscience KG, Bremerhaven

8.1 Zusammenfassung

Der Einsatz der digitalen PCR (dPCR) ermöglicht nicht nur das Aufspüren von Kuhmilchanteilen in Büffel-Mozzarella per DNA-Nachweis, sondern auch eine genaue quantitative Aussage über deren Menge.

In dem vorgestellten Praxistest werden die quantitativen Aussagen bei der Analyse von mitochondrialen und nuklearen DNA-Markern zur Analyse von Kuhmilchanteilen in Büffel-Mozzarella mittels dPCR erörtert.

8.2 Analyse genetischer Marker mithilfe digitaler PCR

Bei der dPCR handelt es sich um eine Weiterentwicklung bzw. die dritte Generation der Polymerase-Ketten-Reaktion. Die digitale PCR erlaubt nicht nur eine Amplifikation definierter DNA-Abschnitte, sondern gleichzeitig quantitative Messungen, deren Präzision die herkömmlicher PCR-Verfahren deutlich übertrifft. Der Unterschied zu konventionellen RealTime-PCR-Verfahren (qPCR) liegt in der absoluten Messung der DNA-Menge sowie im Ansatzkonzept. Während bei der qPCR die Analyse-Reaktion für die meisten Anwendungsfälle im Lebensmittelbereich in einem Volumen von 25 μ L durchgeführt wird, wird bei der dPCR ein Reaktions-Volumen von 20 μ l in bis zu 20.000 Tröpfchen/Droplets partitioniert in denen die DNA-Vervielfältigungsreaktion der RealTime-PCR separat voneinander verlaufen. Technisch funktioniert dies, indem der Reaktionsansatz unterteilt und per Emulsionsverfahren mit dem sogenannten Droplet-Generator in Öltröpfchen eingeschlossen wird, in denen die Amplifikationsreaktion jeweils separat erfolgen. Durch die Miniaturisierung im Nanoliter-Bereich wird die Methode hochsensitiv, so dass bereits kleinste Unregelmäßigkeiten

oder Variationen auf der Ebene der DNA erfasst werden können. Das Prinzip ist nachfolgend grafisch dargestellt.

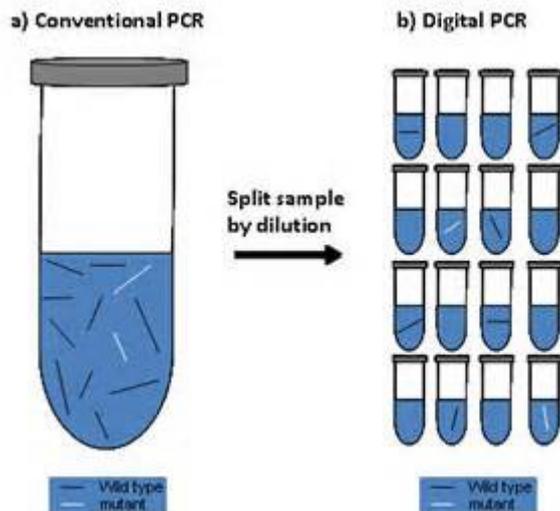


Abbildung 8.1: Vergleich des Ansatzkonzeptes zwischen konventioneller PCR und dPCR (Quelle: www.nmschembio.org.uk)

Die Probenpartitionierung und das parallele Ablaufen mehrerer PCR-Reaktionen sind die Gründe, dass mit Hilfe der dPCR eine absolute Quantifizierung möglich ist. Tritt in einer der Partitionen das gesuchte Merkmal (z. B. SNP) auf, wird von dieser Partition das Signal „positiv“ gesendet, tritt das Merkmal nicht auf, ist das Signal „negativ“. Mithilfe einer Poisson-Verteilung wird aus positiven und negativen Merkmalen der quantitative Anteil des gesuchten Merkmals berechnet.

Auf diese Weise können mit der dPCR Merkmale in geringsten Anteilen an der Probe identifiziert werden, die in einer konventionellen PCR-Reaktion im überwiegenden Signal der negativen Probe nicht wahrgenommen würden.

Diese Methode eignet sich damit hervorragend, genetische Variationen zu erfassen.

8.3 Praxistest "Büffelmozzarella"

Oftmals enthalten die auf dem Markt angebotenen Büffelmozzarella-Produkte nicht nur die Tierart Büffel, sondern Kuhmilchanteile. Im hier vorgestellten Praxistest wurden drei verschiedene Büffel-Mozzarella-Produkte willkürlich im Supermarkt gekauft und zunächst mit konventioneller qualitativer RealTime-PCR auf die Tierarten Kuh

und Büffel untersucht. Zwei Produkte enthielten ausschließlich Büffel, in einem wurde zusätzlich auch die Tierart Kuh nachgewiesen.

Die letztere Probe wurde weitergehend mit dPCR quantitativ untersucht. Hierbei wurden parallel mitochondriale und nukleäre Nachweissysteme eingesetzt und verglichen.

Die RealTime-PCR Nachweissysteme sind in Tabelle 8.1 und 8.2 aufgelistet.

Tabelle 8.1: Primer und Sonden zum Nachweis mitochondrialer Cytochrom b DNA-Sequenzen aus Rind und Büffel

DNA-Target/Length	Primer	5´- 3´Sequence	Label/ Modification
mtDNA cyt b 105 bp	BovcytB-f	AAT ACA CTA CAC ATC CgA CAC AAC AA	-/-
	BovcytB-r	gCT CCg TTT gCg TgT ATg TAT C	-/-
	COW-MGB	CTCTgTTACCCATATCTg	FAM-MGB
	BUFF-MGB	CCTCCgTCg CCC ACA	VIC-MGB

Tabelle 8.2: Primer und Sonden zum Nachweis nukleärer Lactoferrin DNA-Sequenzen aus Rind und Büffel

DNA-Target/Length	Primer	5´- 3´Sequence	Label/ Modification
ncDNA Lactoferrin 106 bp Büffel 105 bp Rind	buffCowLac-f	CAG ggA AAC TgC ggA ggA ggT	-/-
	CowLac-r	CTC CTC Agg TCC CAC ggC A	-/-
	BuffLac-r	CTC ggg TCC CAx CCg Cg	-/-
	CowLac-TM	CCA CAC gAC CCT ggT gTA CCg CgC	6FAM-TQ2
	BuffLac-TM	CAC ACg ACC CTC gCg CgC CgT	HEX-TQ2

8.4 Ergebnisse

In Tabelle 8.3 sind die dPCR-Ergebnisse aufgeführt.

Mit den mitochondrialen Nachweissystemen sind etwa 10-fach höhere Kopienzahlen nachweisbar als mit den nukleären Systemen.

Mit beiden Systemen lässt sich der Anteil der Tierart Kuh auf ca. 1 % Anteil quantitativ bestimmen.

Tabelle 8.3: dPCR-Messergebnisse

8.5 Fazit

Die dPCR ermöglicht den sensitiven quantitativen Nachweis auch geringer Bestandteile von Tierarten in Mischprodukten.

Mit dem hier vorgestellten Praxistest wird in erster Näherung eine neue Möglichkeit der quantitativen Analyse aufgezeigt.

Da für den Praxistest Marktproben verwendet wurden, kann nicht von einer Standardisierung der untersuchten Proben ausgegangen werden.

Die Leistungsfähigkeit der vorgestellten Methode sollte möglichst zeitnah in einem Ringversuch unter Beweis gestellt werden.

8.6 Literatur

1. G. Cottenet et al. 2011; j. Dairy Sci. 94: 3787-3793; Simultaneous detection of cow and buffalo species in milk from China, India, and Pakistan using multiplex real-time PCR

9 Ligationsabhängige Sondenamplifizierung (LPA)

Dr. Patrick Gürtler, Dr. Ottmar Goerlich und Dr. Ulrich Busch

**Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL),
Oberschleißheim**

9.1 Einleitung

Seit der Kommerzialisierung gentechnisch veränderter (gv) Pflanzen im Jahr 1996 ist eine jährliche Intensivierung des globalen Anbaus zu beobachten. Mittlerweile werden weltweit in 30 Ländern auf über 170 Millionen Hektar gv Pflanzen angebaut. Vor allem in den Entwicklungs- und Schwellenländern hat der Anbau in den letzten 10 Jahren rasant zugenommen. Die wichtigsten gv Pflanzenspezies sind Sojabohne, Mais, Baumwolle und Raps [1].

Die Europäische Union (EU) spielt beim Anbau von gv Pflanzen derzeit eine untergeordnete Rolle. Lediglich zwei gv Pflanzenlinien wurden bisher für den Anbau in der EU zugelassen: gv Mais MON810 und die gv Kartoffel Amflora. Allerdings ist der Anbau von MON810 in einigen Ländern, darunter Deutschland, Frankreich und Österreich aufgrund nationaler Anbauverbote untersagt. Zudem wurde die Anbauzulassung für Amflora am 13.12.2013 vom Gericht der Europäischen Union [EuG] aufgrund von Verfahrensfehlern für nichtig erklärt. In der EU benötigen gv Pflanzen eine Zulassung für den Anbau bzw. die Verwendung als Lebens- und Futtermittel. Nicht zugelassene gv Pflanzen dürfen nicht auf den Markt gelangen („Nulltoleranz“). Produkte, die gv Pflanzen über einem Anteil von 0,9 % enthalten müssen gekennzeichnet werden, sofern das Vorhandensein nicht zufällig oder technisch unvermeidbar ist [2-4].

Der stetig steigende Anbau von gv Pflanzen führt zu einem ebenfalls steigenden Untersuchungsaufwand für die amtliche Lebensmittel-, Futtermittel- und Saatgutüberwachung. Derzeit werden gv Pflanzen über die quantitative real-time PCR (qPCR) nachgewiesen [5-7]. Die qPCR ist auch als Multiplex-Nachweismethode anwendbar, jedoch nur bis zu einem gewissen Grad des Multiplexings [8-10]. Dies ist u.a. bedingt durch die Verwendung unterschiedlicher Primerpaare, die auch verschiedene PCR-

Effizienzen zur Folge haben können, und die Anzahl der detektierbaren fluorogenen Sonden.

Eine auf der PCR basierende Methode ist die ligationsabhängige Sondenamplifikation (LPA). Diese Methode ermöglicht einen hohen Multiplex-Grad [11] und wurde im Bereich der medizinischen Diagnostik entwickelt, wo sie auch häufig Anwendung findet [12, 13]. Der Anwendungsbereich wurde jedoch in den letzten Jahren auch auf den Lebensmittelbereich erweitert. So konnten Luber *et al.* [14] eine Unterscheidung von Marzipan und Persipan über die Detektion von Aprikosen-DNA mittels LPA durchführen. Ehlert *et al.* [15] und Moreano *et al.* [16] wendeten erstmals die LPA für die Detektion von gv Pflanzen an. Dies beschränkte sich jedoch auf zwei gv Pflanzenlinien und wenige wichtige Genelemente, die häufig in gv Pflanzen eingebracht wurden.

Daher war es das Ziel dieses Projekts, das Nachweisspektrum der LPA für gv Pflanzenlinien und häufig eingebrachte Genelemente deutlich zu erweitern und den Versuchsablauf zu optimieren.

9.2 Ligationsabhängige Sondenamplifikation (LPA)

Die LPA basiert auf der Bindung zweier Sonden an die Ziel-DNA. Diese Sonden bestehen aus einer Hybridisierungssequenz, über die die Bindung an die DNA erfolgt, eine Stuffer-Sequenz, welche die Länge der Sonde definiert, und einer universellen Primerbindestelle, die bei jedem Sondenpaar gleich ist. Die beiden Sonden binden nebeneinander an die Ziel-DNA und werden durch das Enzym Ligase miteinander verknüpft. Anschließend binden FAM-markierte Primer an die universellen Primerbindestellen der Sonden und es folgt eine PCR-Reaktion mit 40 Zyklen. Sondenpaare werden so erstellt, dass jedes Sondenpaar eine spezifische Gesamtfragmentlänge hat. Dadurch entstehen bei der Verwendung von mehreren Sondenpaaren in einer Reaktion Amplicons mit unterschiedlicher Fragmentlänge. Diese Amplicons können dann über eine Kapillarelektrophorese oder ein hochauflösendes Gel aufgetrennt werden. Der Ablauf der LPA ist in Abbildung 9.1 schematisch dargestellt.

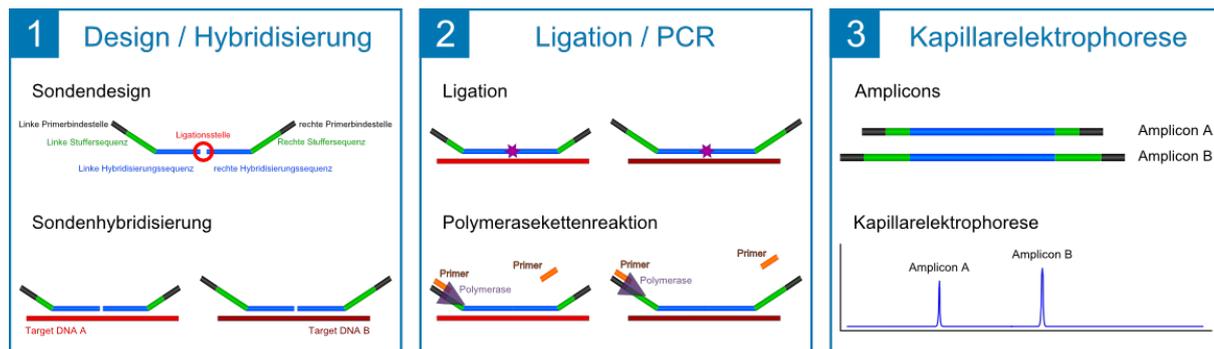


Abbildung 9.1: Schematische Darstellung des Ablaufs einer LPA-Reaktion – 1) die linke und rechte Sonde bindet an die Ziel-DNA und wird 2) ligiert. Anschließend binden universelle Primer an die Bindestelle der Sonde und die DNA-Polymerase amplifiziert den zweiten DNA-Strang. 3) Nach 40 PCR-Zyklen entstehen Amplicons mit unterschiedlicher Länge, die über eine Kapillarelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und dadurch unterschieden werden können.

9.3 Module zur Detektion von gv Pflanzen

Für die Detektion der derzeit häufigsten gv Pflanzen wurden Sonden erstellt und zu Modulen kombiniert. Diese Module sind in Tabelle 10.1 aufgeführt. Zusätzlich wurden Sonden für die Detektion folgender pflanzenspezifischer Referenzgene entwickelt: *zSSIIb1* (Mais), *cruA* (Raps), *lectin* (Soja), *PLD* (Reis) und *UGPase* (Kartoffel). Um ein schnelles Screening von Proben zu ermöglichen wurde neben den Event-spezifischen Modulen ein Screening-Modul erstellt. Darin sind Sonden zur Detektion der am häufigsten in gv Pflanzen eingebrachten Genelemente enthalten.

Tabelle 9.1: Module für die Detektion der derzeit häufigsten gentechnisch veränderten Pflanzen

Mais I	Mais II	Raps	Soja	Reis	Kartoffel	Screening
GA21						<i>CP4 epsps</i>
Bt11						<i>pat</i>
Bt176		GT73	MON87701			<i>cry3Bb1</i>
MON810	MIR604	MS8	A2704-12	Bt63		<i>P-35S</i>
NK603	MON88017	GS 40/90	GTS 40-3-2	KMD1	EH 92-527	<i>cry1Ab</i>
MON863	MON89034	RF3	MON89788	Kefeng 6		<i>bar</i>
TC1507		T45	A5547-127			<i>P-ubi</i>
DAS59122			MON87769			<i>cry1Ac P-</i>
T25						<i>nos T-</i>
DP98140						<i>nos nptII</i>

Die Sonden wurden zunächst einzeln mit Referenzmaterial auf Spezifität getestet, bevor sie zu einem Sonden-Mix kombiniert wurden. Unspezifische Sonden wurden neu erstellt bzw. nicht in den Sonden-Mix mit aufgenommen. Für das Raps- und das Kartoffel-Modul wurden über Verdünnungsreihen auch Nachweisgrenzen bestimmt.

9.4 Ergebnisse

Über das Mais-Modul I ist eine Detektion der wichtigsten gv Maislinien möglich. Dieses Modul enthält elf Sondenpaare zur Detektion von zehn Maisevents und einem Mais-spezifischen Referenzgen (Abb. 9.2A). Sonden, über die neuere gv Mais-Events detektiert werden können, wurden zum Mais-Modul II kombiniert. Dieses Modul ist noch in der Entwicklung und wird erweitert, sobald Sequenzinformationen und Referenzmaterial für neu entwickelte Maislinien zur Verfügung stehen. Das Soja-Modul (Abb. 9.2B) ermöglicht die Detektion von fünf gv Soja-Events. Allerdings ist auch dieses Modul noch in der Entwicklung. Für das Reis-Modul (Abb. 9.2C) konnten Sonden für die Detektion von drei gv-Reisevents erstellt werden, wohingegen das Screening-Modul (Abb. 9.2D) aus Sonden für 11 häufig in gv-Pflanzen eingebrachte Genelemente besteht. Die Sonden für *cry1Ab* und *bar* wiesen jedoch keine ausreichende Spezifität auf und müssen daher neu erstellt werden.

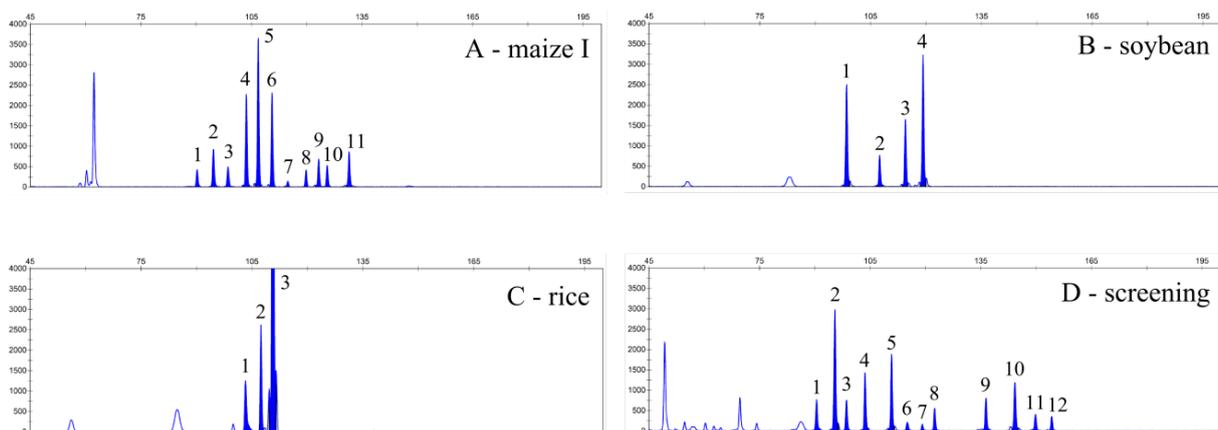


Abbildung 9.2: Elektropherogramm der verschiedenen MLPA-Module. A) Mais-Modul I: 1-GA21, 2-Bt176, 3-Bt11, 4-zSSIIb1, 5-MON810, 6-NK603, 7-MON863, 8-TC1507, 9-DAS59122, 10-T25, 11-DP98140. B) Soja-Modul: 1-*lectin*, 2-A2704-12, 3-GTS40-3-2, 4-MON89788; MON87701 und A5547-127 fehlen aufgrund schlechter Verfügbarkeit von Referenzmaterial. C) Reis-Modul: 1-Bt63, 2-KMD1, 3-*PLD*, DNA von Kefeng 6 fehlt im DNA-Mix, daher kein Peak. D) Screening-Modul: 1-*CP4 epsps*, 2-*cruA*, 3-*lectin*, 4-zSSIIb1, 5-*UGPase*, 6-*pat*, 7-*cry3Bb1*, 8-*P-35S*, 9-*P-ubi*, 10-*T-nos*, 11-*P-nos*, 12-*nptII*. Sonden für *cry1Ab* und *bar* sind nicht spezifisch, daher wurden sie nicht in diesen Mix integriert. Ke-

feng 6-DNA war im DNA-Mix nicht vorhanden, daher fehlen die Peaks für das Reis-Referenzgen *PDL* und das Genelement *cry1Ac*. Diese Sonden funktionieren allerdings und sind auch spezifisch.

Das Raps-Modul erlaubt die Detektion von fünf gv-Raps-Events (Abb. 9.3). Die Nachweisgrenzen lagen bei 50 Kopien für GT73 und RF3, 25 Kopien für MS8 und GS40/90 und zehn Kopien für T45.

Ein großer Nachteil der MLPA ist die lange Hybridisierungszeit von ungefähr 16 h. Um dem zu begegnen wurden Ergebnisse des Raps-Moduls nach 16 h (Abb. 9.3A) und nach 3 h (Abb. 9.3B) Hybridisierung verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Verkürzung der Hybridisierungsdauer keinen Einfluss auf die mit diesem Modul erhaltenen Ergebnisse hat.

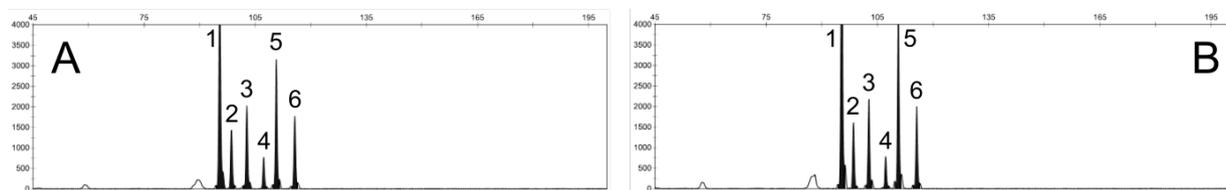


Abbildung 9.3: Elektropherogramme des Raps-Moduls nach A) 16 h Hybridisierung und B) 3 h Hybridisierung. 1-cruA, 2-GT73, 3-MS8, 4-GS40/90, 5-RF3, 6-T45

Allerdings war dies mit dem Mais-Modul I, das eine im Vergleich zum Raps-Modul größere Anzahl an Sonden enthält, nicht reproduzierbar. Folglich scheint die Anzahl der Sonden ein essentieller Faktor für die notwendige Dauer der Hybridisierung zu sein. Mit den anderen Modulen wurde eine Zeitverkürzung bislang noch nicht getestet.

9.5 Diskussion

Die MLPA ist eine sehr flexible molekularbiologische Detektionsmethode, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur konventionellen PCR einfach zu erlernen und durchzuführen ist. Die hohe Flexibilität dieser Methode beruht auf der Verwendung eines einzigen universellen Primerpaares. Dies ermöglicht das Hinzufügen bzw. Entfernen von Sonden aus einem bestehenden System, ohne gravierende Auswirkungen auf das Detektionssystem. Die Verwendung eines einzigen Primerpaares reduziert außerdem die Wahrscheinlichkeit der Produktion von Nebenprodukten und das Auftreten von PCR-Inhibitionen. Es führt außerdem zu einer ähnlichen oder gar identischen

PCR-Effizienz für alle Sonden. Dies ist ein essentieller Unterschied zur Multiplex-PCR oder Multiplex-qPCR, bei denen stets verschiedene Primer- und Sondenpaare in einer Reaktion zu unterschiedlichen PCR-Effizienzen führen.

Die Entwicklung von MLPA Sonden ist deutlich aufwendiger als bei der Etablierung von qPCR Systemen, da an diese Sonden strengere Anforderungen gestellt werden, die jedoch für die Funktionalität der MLPA essentiell sind. Einige Sequenzabschnitte sind für die Entwicklung von MLPA-Assays aufgrund ihrer AT-reichen Regionen und der daraus resultierenden niedrigen Schmelztemperatur der bindenden Sonden ungeeignet (z. B. LY038 Mais). Hier ist es nicht möglich, die Vorgaben für das Sonden-design einzuhalten (GC-Gehalt ca. 50 %, Schmelztemperatur > 70 °C, Länge der Sonden >21 Basen). Repetitive Sequenzabschnitte führen oftmals zu Sekundärstrukturen wie Loops und Hairpins, die eine Hybridisierung der Sonden an die Ziel-DNA verhindern. Zusätzlich wird das Sondendesign durch das Fehlen von Sequenzinformationen für bestimmte Genelemente bzw. für bestimmte event-spezifischen Übergänge vom Pflanzengenom zum Transgen erschwert. Die in den öffentlichen Datenbanken aufgeführten Sequenzinformationen unterscheiden sich oftmals deutlich voneinander (z. B. beim *epsps*- oder beim *cry1Ab*-Gen) oder von experimentell erhobenen Daten. Zum Teil fehlt auch Referenzmaterial, um Sequenzinformationen zu bestätigen bzw. um Assays testen und etablieren zu können.

Die Validierungsdaten des Raps- und Kartoffel-Moduls weisen auf eine vergleichbare Sensitivität der MLPA im Vergleich zur real-time PCR hin. In der MLPA können PCR-Produkte nur entstehen, wenn beide Sonden in direkter Nachbarschaft gebunden und im Anschluss miteinander verknüpft wurden. Dies trägt zur Spezifität der MLPA bei und verhindert die Produktion von unerwünschten Nebenprodukten. Die Anwendbarkeit dieser Methode in der Routineanalytik konnte anhand von Raps-, Honig- und Senfproben gezeigt werden. [17]

Die Kombination der MLPA mit einer automatisierten DNA-Extraktion führt zu einem effektiven und schnellen Workflow beim Nachweis von GVP. Die Auswertung eines Screenings kann dabei auch mit dem am LGL entwickelten *GMOfinder* [18] oder der *GMOseek*-Datenbank [19] kombiniert werden, was eine effektive Analytik von gv Pflanzen ermöglicht.

9.6 Literatur

1. James, C., *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012*. ISAAA Brief, 2012. **No. 44**: p. ISAAA: Ithaca, NY.
2. *Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC*. Official Journal of the European Union, 2001. **L 106/1**.
3. *Regulation (EC) No 1829/2003 on genetically modified food and feed*. Official Journal of the European Union, 2003. **L 268/1**.
4. *Regulation (EC) No 1831/2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms*. Official Journal of the European Union, 2003. **L 268/24**.
5. Guertler, P., et al., *Development of an event-specific detection method for genetically modified rice Kefeng 6 by quantitative real-time PCR*. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2012. **7**: p. 63-70.
6. Guertler, P., et al., *Sensitive and highly specific quantitative real-time PCR and ELISA for recording a potential transfer of novel DNA and Cry1Ab protein from feed into bovine milk*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **393**(6-7): p. 1629-38.
7. Waiblinger, H.-U., et al., *Validation and collaborative study of a P35S and T-nos duplex real-time PCR screening method to detect genetically modified organisms in food products*. European Food Research and Technology, 2008. **226**(5): p. 1221-1228.
8. Demeke, T. and I. Ratnayaka, *Multiplex qualitative PCR assay for identification of genetically modified canola events and real-time event-specific PCR assay for quantification of the GT73 canola event*. Food Control, 2008. **19**(9): p. 893-897.
9. Dörries, H.-H., et al., *Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs)*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **396**(6): p. 2043-2054.
10. Xu, J., et al., *Event-Specific Detection of Seven Genetically Modified Soybean and Maizes Using Multiplex-PCR Coupled with Oligonucleotide Microarray*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(14): p. 5575-5579.

11. Schouten, J.P., et al., *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*. Nucleic Acids Research, 2002. **30**(12): p. e57.
12. Coutton, C., et al., *Development of a multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for quantification of the OCRL1 gene*. Clinical Biochemistry, 2010. **43**(6): p. 609-614.
13. Kozlowski, P., A.J. Jasinska, and D.J. Kwiatkowski, *New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification*. Electrophoresis, 2008. **29**(23): p. 4627-36.
14. Lubber, F., et al., *Apricot DNA as an Indicator for Persipan: Detection and Quantitation in Marzipan Using Ligation-Dependent Probe Amplification*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(23): p. 5853-5858.
15. Ehlert, A., et al., *Development of a modular system for detection of genetically modified organisms in food based on ligation-dependent probe amplification*. European Food Research and Technology, 2008. **227**(3): p. 805-812.
16. Moreano, F., et al., *Ligation-dependent probe amplification for the simultaneous event-specific detection and relative quantification of DNA from two genetically modified organisms*. European Food Research and Technology, 2006. **222**(5): p. 479-485-485.
17. Guertler, P., et al., *Simultaneous detection of five genetically modified rapeseed events by multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013: p. submitted.
18. Gerdes, L., U. Busch, and S. Pecoraro, *GMOfinder - A GMO Screening Database*. Food Analytical Methods, 2012. **5**(6): p. 1368-1376.
19. Block, A., et al., *The GMOseek matrix: a decision support tool for optimizing the detection of genetically modified plants*. BMC Bioinformatics, 2013. **14**(1): p. 256.

Nachtrag

Neue Züchtungsformen – Abgrenzung zur Gentechnik

Dr. Joachim Bollmann

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Bonn

Dieser Beitrag lag bei Drucklegung noch nicht vor.

Bisher sind in dieser Schriftenreihen folgende Bände erschienen:

- Band 1 Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“ in Oberschleißheim am 13. Oktober 2005 (2006)
- Band 2 Fachtagung Gentechnik in Oberschleißheim am 25. Oktober 2007 (2008)
- Band 3 3. Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“
Fortbildungsveranstaltung in Oberschleißheim am 02. Dezember 2009 (2010)
- Band 4 Überwachung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln, Futtermitteln und Saatgut in Bayern
(2. Auflage, inhaltlich unveränderter Nachdruck im Juli 2011 der 1. Auflage vom April 2011)
- Band 5 Nachweis von nicht zugelassenen gentechnisch-veränderten Organismen (GVO);
Weltweite Ermittlung, Importanalyse und Entwicklung von Nachweis-Methoden (2011)
- Band 6 4. Fachtagung in Oberschleißheim am 30. November 2011 (2012)
- Band 7 Gentechnische Arbeiten in gentechnischen Anlagen (2013)

sowie der vorliegende Band

- Band 9 5. Fachtagung Gentechnik in Oberschleißheim am 26. November 2013 (2014)

**Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)**

Telefon: 09131 6808-0
Telefax: 09131 6808-2102
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Internet: www.lgl.bayern.de

91058 **Erlangen**
Eggenreuther Weg 43

85764 **Oberschleißheim**
Veterinärstraße 2

80538 **München**
Pfarrstraße 3

97082 **Würzburg**
Luitpoldstraße 1

91126 **Schwabach**
Rathausgasse 4

90441 **Nürnberg**
Schweinauer Hauptstraße 80

Bisher sind in dieser Schriftenreihen folgende Bände erschienen:

- Band 1 Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“ in Oberschleißheim am 13. Oktober 2005 (2006)
- Band 2 Fachtagung Gentechnik in Oberschleißheim am 25. Oktober 2007 (2008)
- Band 3 3. Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“
Fortbildungsveranstaltung in Oberschleißheim am 02. Dezember 2009 (2010)
- Band 4 Überwachung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln, Futtermitteln und Saatgut in Bayern
(2. Auflage, inhaltlich unveränderter Nachdruck im Juli 2011 der 1. Auflage vom April 2011)
- Band 5 Nachweis von nicht zugelassenen gentechnisch-veränderten Organismen (GVO);
Weltweite Ermittlung, Importanalyse und Entwicklung von Nachweis-Methoden (2011)
- Band 6 4. Fachtagung in Oberschleißheim am 30. November 2011 (2012)
- Band 7 Gentechnische Arbeiten in gentechnischen Anlagen (2013)

sowie der vorliegende Band

- Band 9 5. Fachtagung Gentechnik in Oberschleißheim am 26. November 2013 (2014)

**Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)**

Telefon: 09131 6808-0
Telefax: 09131 6808-2102
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Internet: www.lgl.bayern.de

91058 Erlangen
Eggenreuther Weg 43

85764 Oberschleißheim
Veterinärstraße 2

80538 München
Pfarrstraße 3

97082 Würzburg
Luitpoldstraße 1

91126 Schwabach
Rathausgasse 4

90441 Nürnberg
Schweinauer Hauptstraße 80