

Routineanalytik gentechnisch veränderter Pflanzen

Dr. Patrick Gürtler, Dr. Ulrich Busch

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Abteilung Molekularbiologie

Weltweite Situation

Der weltweite Anbau von gentechnisch veränderten (gv) Pflanzen hat seit der Kommerzialisierung 1996 von Jahr zu Jahr zugenommen. Die globale Anbaufläche ist von 1,7 Millionen Hektar (im Jahr 1996) auf über 170 Millionen Hektar (im Jahr 2012) gestiegen (Abbildung 1). Die wichtigsten gv Pflanzen weltweit sind Sojabohne (80,7 Millionen Hektar), Mais (55,1 Millionen Hektar), Baumwolle (24,3 Millionen Hektar) und Raps (9,2 Millionen Hektar).

Kommerzieller Anbau fand 2012 in 28 Ländern statt, davon waren 20 Entwicklungsländer (Abbildung 2). Zu den Ländern mit den größten Anbauflächen zählen die USA (69,5 Millionen Hektar), Brasilien (36,6 Millionen Hektar), Argentinien (23,9 Millionen Hektar), Kanada (11,6 Millionen Hektar) und Indien (10,8 Millionen Hektar).

Diese Zahlen veröffentlicht jährlich der *International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications ISAAA* (James, 2012).

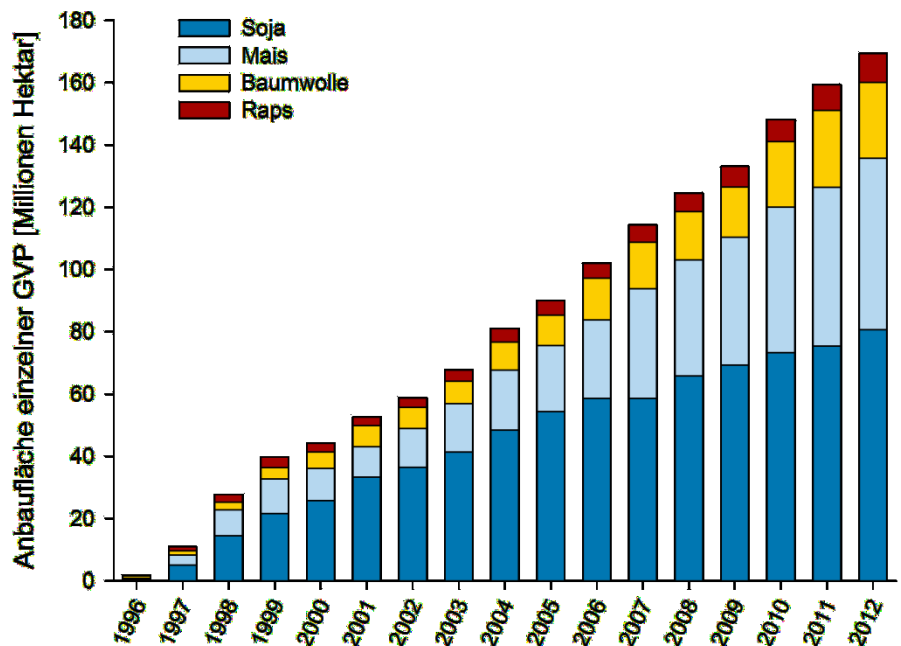


Abb. 1: Globale Anbauflächen der wichtigsten gentechnisch veränderten Pflanzen (Bild: Patrick Gürtler, nach (James, 2012))

Situation in der Europäischen Union

Lediglich fünf Länder der EU haben 2012 gv Pflanzen angebaut: Spanien, Portugal, Slowakei, Rumänien und die Tschechische Republik. Gv Pflanzen, die auf den europäischen Markt gelangen müssen in der EU ein aufwändiges Zulassungsverfahren durchlaufen. Das Inverkehrbringen als Lebens- bzw. Futtermittel und die jeweilige Kennzeichnung ist in der EU durch die Verordnungen 1829/2003 (EC, 2003a) und 1830/2003 (EC, 2003b) geregelt. Produkte, die einen gv-Pflanzen-Anteil von über 0,9 % aufweisen müssen entsprechend gekennzeichnet werden. Produkte, die nicht zugelassene gv Pflanzen enthalten, dürfen nicht auf den europäischen Markt gelangen (Null-Toleranz). Derzeit sind 47 gv Pflanzen in der EU zugelassen (Stand: März 2013).

Amtliche Überwachungsbehörden wie das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit sind für die Kontrolle der Kennzeichnung und die Untersuchung

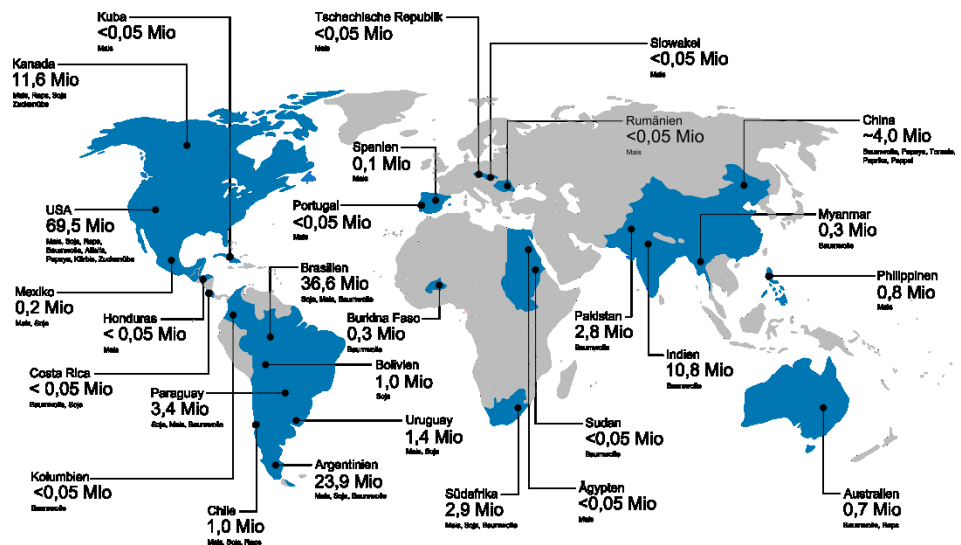


Abb. 2: Weltkarte der Länder, die gentechnisch veränderte Pflanzen anbauen (Bild: Patrick Gürtler, nach (James, 2012))

von Proben auf gentechnische Veränderung verantwortlich (www.lgl.bayern.de).

Nachweis gentechnisch veränderter Pflanzen

Der Nachweis eines GVO (gentechnisch veränderter Organismus) kann molekularbiologisch auf zwei Ebenen erfolgen. Eine Ebene ist dabei der Nachweis eines Proteins, das die gv Pflanze durch die gentechnische Veränderung produzieren kann. Die Proteindetektion erfolgt dabei meist durch den Einsatz eines enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Der ELISA ist ein Antikörperbasiertes Detektionsverfahren, bei dem spezifische Antikörper (Fängerantikörper) am Boden eines Gefäßes gebunden sind. Wird nun die Probe, bei der die Proteine nach Extraktion in einem Puffer vorliegen, in dieses Gefäß gegeben, binden die nachzuweisenden Proteine an die gebundenen Antikörper. Die restliche Probenflüssigkeit wird entfernt. Anschließend wird ein weiterer Antikörper (Detektionsantikörper) hinzugegeben, der ebenfalls spezifisch für das nachzuweisende Protein ist. An diesen Antikörper ist ein Enzym gebunden. Wird nun ein farbloses Substrat zugegeben, so setzt das Enzym das farblose Substrat in ein farbiges Produkt um. Dieser Farbumschlag kann gemessen werden, wobei die Intensität des Farbumschlags proportional zur Proteinmenge in der Probe ist. Der ELISA ermöglicht also auch eine quantitative Detektion (Abbildung 3).

Für eine schnelle Detektion wurden so-

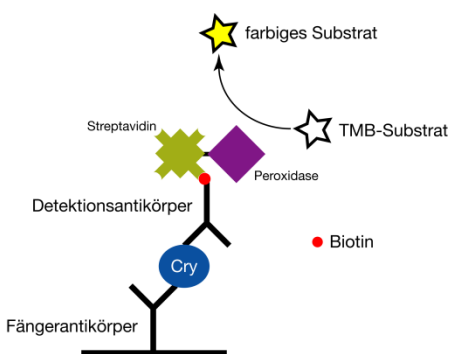


Abb. 3: Aufbau eines Sandwich-ELISA zur Detektion von Proteinen (hier am Beispiel des Cry-Proteins des Bt-Mais MON810; Bild: Patrick Gürtler; (Guertler et al., 2009))

genannte Dip-Sticks entwickelt. Dabei werden die Antikörper-Protein-Bindung und die Farbreaktion auf einem Teststreifen durchgeführt. Dieser Teststreifen wird in eine Lösung gehalten und nach einer bestimmten Zeit ausgewertet. Bei einer positiven Probe sind Banden auf dem Teststreifen sichtbar, bei negativen Proben fehlt eine der Banden. Eine Quantifizierung ist hier nicht möglich

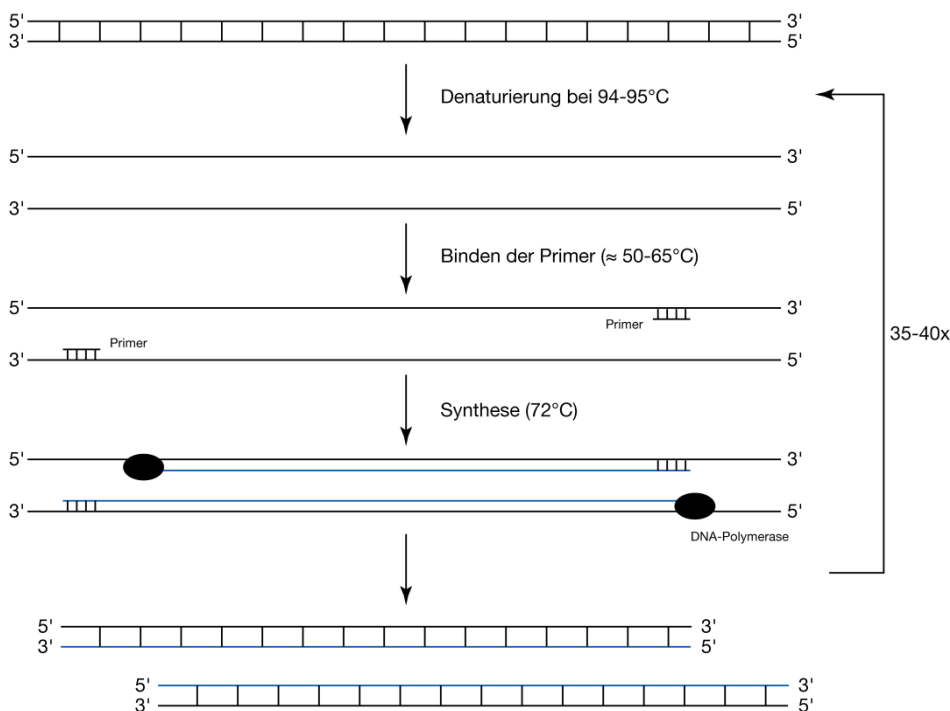


Abb. 4: Schematische Darstellung des Ablaufs einer PCR-Reaktion

und auch die Sensitivität ist deutlich geringer als bei einem gut validierten ELISA. Allerdings lassen sich diese Dip-Sticks vor Ort ohne Labor nutzen.

Für eine Proteindetektion mittels ELISA müsste jedes Protein, das durch die gentechnische Veränderung produziert wird, als Referenzmaterial vorliegen und für jedes dieser Proteine müsste ein eigener ELISA entwickelt werden. Zertifiziertes Referenzmaterial auf Proteinebene ist allerdings nicht vorhanden. Außerdem produzieren einige verschiedene gv Pflanzen das gleiche Protein, so dass zwar das Protein selbst detektiert werden könnte, aber eine genaue Identifizierung der einzelnen gv Pflanze ist dennoch nicht möglich.

Aus diesen Gründen erfolgt der Nachweis von GVO in der Routineanalytik auf DNA-Ebene. Im ersten Schritt muss die DNA aus dem Probenmaterial extrahiert werden. Dazu werden die Zellen, in denen sich die DNA befindet, über Detergenzien und Enzyme aufgebrochen und die DNA freigesetzt. Diese wird anschließend aufgereinigt und zur weiteren Analyse verwendet. Die DNA-Isolation kann über ein aufwändiges manuelles Extraktionsverfahren oder kommerziell erhältliche Kits erfolgen. Mittlerweile steht auch ein automatisiertes DNA-Extraktionsverfahren unter Verwendung des Maxwell Extraktionsautomaten zur Verfügung (Guertler et al., 2013).

Nach der DNA-Extraktion folgt die Vervielfältigung der DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR). Die PCR ist die Methode der

Wahl zum Nachweis von GVO. Dabei werden die DNA-Doppelstränge durch Erhitzen in Einzelstränge getrennt. Anschließend werden kleine DNA-Fragmente, sogenannte Primer, zugegeben, die an den zu detektierenden DNA-Abschnitt binden. Diese Primer dienen als Startstelle für ein Enzym, die DNA-Polymerase, welches ausgehen vom Primer den komplementären Strang vervollständigt (Abbildung 4). Dieser Ablauf wird 35-40 Mal wiederholt, so dass theoretisch aus einem DNA-Molekül 2^{35-40} Moleküle entstehen.

Eine Weiterentwicklung der PCR stellt die quantitative real-time PCR dar (qPCR), mit der quantitative Aussagen über die DNA-Menge gemacht werden können. Der generelle Ablauf der qPCR entspricht dem der konventionellen PCR wie oben beschrieben. Die Quantifizierung erfolgt über die Messung von Fluoreszenz. Dies wird hauptsächlich auf zwei Arten erreicht:

Variante 1: Zur PCR-Reaktion wird ein interkalierender Farbstoff zugegeben. Dieser lagert sich ausschließlich in doppelsträngige DNA-Moleküle ein. Wird dieser Farbstoff nun energetisch angeregt, fluoresziert er. Je mehr doppelsträngige DNA vorliegt, umso stärker ist auch das Fluoreszenzsignal (Abbildung 5). Der Nachteil dieser Variante ist, dass sich der interkalierende Farbstoff in jede doppelsträngige DNA einlagert und dann ein Fluoreszenzsignal abgibt. D.h. die Fluoreszenzintensität wird durch Signale aufgrund von Primerdimeren und ungewünschten PCR-Nebenprodukten stark beeinflusst.

Variante 2: Zusätzlich zu den Primer wird eine sequenzspezifische Hybridisierungs-sonde gegeben. Diese bindet an die DNA zwischen den beiden Primern und ist am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff und am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff markiert. Wird der Reporterfarbstoff energetisch angeregt, wird die Energie aufgrund der räumlichen Nähe auf den Quencher übertragen. Dadurch wird verhindert, dass der Reporter fluoresziert. Wird bei der qPCR-Reaktion der Strang, an dem die Sonde gebunden hat, durch die DNA-Polymerase vervollständigt, wird die Sonde abgebaut. Dadurch verliert der Reporter die räumliche Nähe des Quenchers und es findet kein Energietransfer mehr statt. Der Reporter kann nun nach Anregung fluoreszieren. Je mehr DNA vervielfältigt wird, umso mehr Sonden werden abgebaut und umso stärker ist dann auch das Fluoreszenzsignal (Abbildung 6). Dieses Verfahren findet Anwendung innerhalb der amtlichen Lebensmittelüberwachung.

Für die Quantifizierung des GVO-Gehalts einer Probe werden sowohl ein Fragment eines pflanzenspezifischen Referenzgens, wie auch ein gv Pflanzen-spezifisches Fragment gemessen und die Ergebnisse der gemessenen Kopien Anzahl ins Verhältnis gesetzt. Dadurch ergibt sich ein Prozentwert, der den GVO-Gehalt einer Probe wiedergibt.

Um spezifische Nachweisverfahren zu entwickeln, müssen Informationen über die jeweilige DNA-Sequenz der gv Pflanze bekannt sein und geeignetes Referenz- bzw. Vergleichsmaterial zur Verfügung stehen. Für gv Pflanzen, die in der EU zugelassen sind, ist dies in der Regel der Fall. Bei neuentwickelten und in der EU nicht gelassenen gv Pflanzen fehlen meistens diese Informationen und entsprechendes Referenzmaterial.

In der Lebensmittelüberwachung wird daher eine Nachweiskaskade (Abbildung 7) verwendet. Zuerst wird relativ unspezifisch auf eine gentechnische Veränderung hin untersucht. Dazu werden Genabschnitte detektiert, die sehr häufig in gv Pflanzen eingebaut werden. Dazu zählen z.B. der 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) oder der nos-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens*. Dieses Vorgehen wird als Screening bezeichnet. Allerdings kann mittels Screening nicht auf eine bestimmte gv Pflanze geschlossen werden, da diese Genabschnitte in vielen gv Pflanzen vorkommen. Es dient zur generellen Detektion einer gentechnischen Veränderung. Spezifischer ist dann ein Konstrukt-spezifischer Nachweis. Dabei werden Kombinationen aus Genabschnitten (= Konstrukte) nachgewiesen.

Doch die Kombination aus zwei Genabschnitten kann bei verschiedenen gv Pflanzen vorkommen, so dass dieser Nachweis zwar spezifischer als ein Screening ist, aber eine eindeutige Identifizierung der gv

Pflanze der Konstrukt-spezifische Nachweis nur bei sehr seltenen Konstrukten zulässt. Bei der Herstellung von gv Pflanzen integriert die transgene DNA an einer beliebigen Stelle ins Genom der Pflanze. Das ist für die jewei-

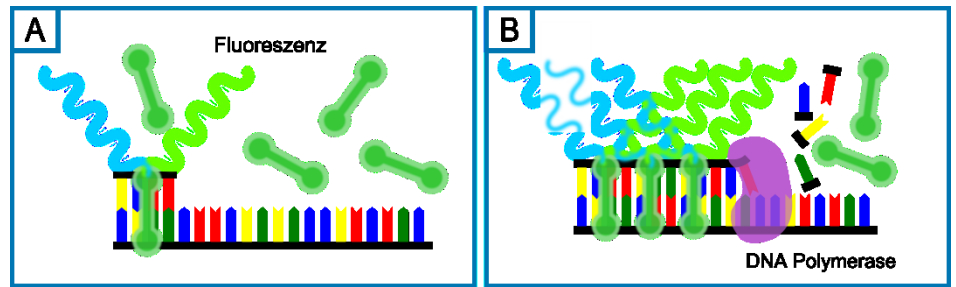


Abb. 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise des interkalierenden Farbstoffs SYBR Green im Verlauf der qPCR-Reaktion (Bild: Patrick Gürtler); A) SYBR Green lagert sich in die kleine Furche des DNA-Doppelstrangs ein. Dies erfolgt unspezifisch. B) je mehr Doppelstränge entstehen, desto mehr SYBR Green lagert sich in die Doppelstränge ein und umso stärker ist das Fluoreszenzsignal.

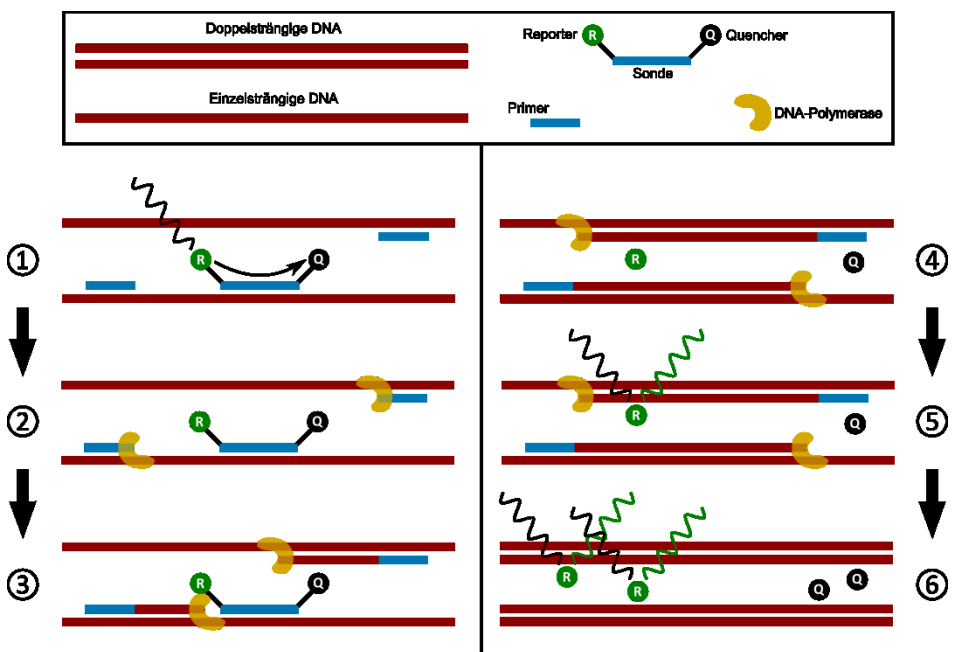


Abb. 6: Schematische Darstellung des Ablaufs einer sondenbasierten qPCR-Reaktion (Bild: Patrick Gürtler). Schritt 1: Primer und Sonde binden spezifisch an den nachzuweisenden DNA-Abschnitt. Wird der Reporter energetisch angeregt, wird die aufgenommene Energie an den Quencher weitergegeben und das Fluoreszenzsignal des Reporters unterdrückt. Schritt 2: die Polymerase startet an den Primern die Synthese des komplementären Strangs. Schritt 3: erreicht die Polymerase die Sonde, so wird diese abgebaut. Schritt 4: durch den Abbau der Sonde verlieren Reporter und Quencher ihre räumliche Nähe. Schritt 5: wird der Reporter nun energetisch angeregt, kann die Energie als Fluoreszenzsignal abgegeben werden. Schritt 6: je mehr DNA vervielfältigt wird, umso stärker ist das Fluoreszenzsignal.

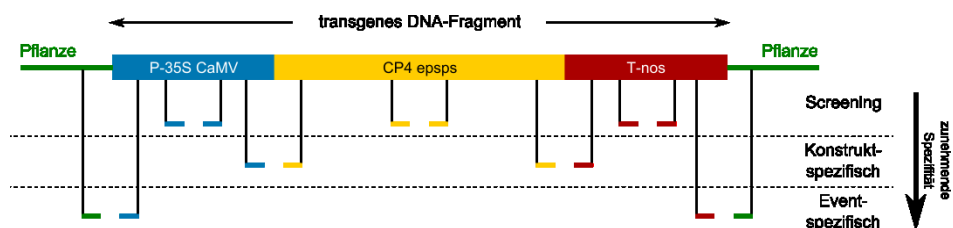


Abb. 7: Nachweiskaskade der GVO-Analytik

lige gv Pflanze spezifisch. Dessen bedient man sich bei einem Event-spezifischen Nachweis. Dabei wird der Übergang vom Pflanzengenom in die transgene DNA nachgewiesen. Dieser Integrationsort ist für jede gv Pflanze spezifisch und lässt daher eine eindeutige Identifizierung zu. Bei neueren Herstellungsmethoden ist es möglich, die transgene DNA an einer vordefinierten Stelle im Pflanzengenom integrieren zu lassen. Dadurch ist der Integrationsort bekannt, was die Entwicklung eines Event-spezifischen Nachweises erleichtert. Eine am LGL entwickelte Datenbank „GMOfinder“ erlaubt die vereinfachte Auswertung (Gerdes et al., 2012).

Herausforderungen für die GVO-Analytik

Die Entwicklung neuer gv Pflanzen ist in Entwicklungs- und Schwellenländern in den letzten Jahren enorm forciert worden. Besonders in asiatischen Ländern wird sehr viel in die Entwicklung neuer gv Pflanzen investiert. Obwohl diese neuen Pflanzensorten meist für den eigenen Markt produziert werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese in Form von Lebensmittelprodukten auf den Europäischen Markt gelangen. Für einen eindeutigen Nachweis sind aber entsprechende Nachweismethoden notwendig, die aufgrund fehlender Sequenzinformation und geeignetem Referenzmaterial oftmals nicht etabliert werden können.

Im Jahr 2004 wurden durch regelmäßige Kontrollen des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit gv Papaya auf dem Markt entdeckt (Busch et al., 2004). Vermehrt wurden auch gv Reissorten auf dem Markt gefunden (Babekova et al., 2009; Mäde et al., 2006). Diese Fälle zeigen, dass trotz strikter Regelungen und Kontrollen Produkte in die EU importiert werden, die nicht zugelassene gv Pflanzen enthalten.

In den letzten Jahren haben die Entwicklung und der Anbau von sogenannten Stacked Events deutlich zugenommen. Stacked

Events sind durch Kreuzung von zwei oder mehr gv Pflanzen hergestellte gv Pflanzen, die nun die neuen Eigenschaften beider Ausgangspflanzen haben. Stacked Events brauchen wie jede andere gv Pflanze eine Zulassung vor dem Inverkehrbringen. Der Nachweis stellt für die GVO Analytik eine besondere Herausforderung dar, da man in einem Lebensmittel nicht unterscheiden kann, ob es sich gegebenenfalls um ein Stacked Event handelt, oder ob eine Mischung der Ausgangsevents vorliegt. Daher wird am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit ein Projekt durchgeführt, dass sich mit Nachweisstrategien für Stacked Events beschäftigt.

Eine große Bedeutung in der Analytik hat auch die Matrix, aus der die DNA isoliert werden muss, also die Zusammensetzung des Produkts. Viele Produktbestandteile wie Fett oder Kohlenhydrate behindern die DNA-Extraktion. Viele Produkte enthalten auch Stoffe, die in der PCR-Reaktion inhibierend wirken. Folglich ist es unerlässlich, effektive, zeitsparende und ergiebige DNA-Extraktionsmethoden zu etablieren. Durch die Entwicklung von Multiplex-Methoden, bei denen mehrere gv Pflanzen in einer PCR-Reaktion detektiert werden, wird zusätzlich versucht, der jährlich steigenden Zahl an gv Pflanzen weltweit zu begegnen.

Literatur

Babekova, R., T. Funk, S. Pecoraro, K.-H. Engel, and U. Busch. 2009. Development of an event-specific Real-time PCR detection method for the transgenic Bt rice line KMD1. *Eur Food Res Technol* 228: 707-716.

Busch, U., S. Pecoraro, K. Posthoff, and S. Estendorfer-Rinner. 2004. Erster Nachweis einer gentechnisch veränderten Papaya in Europa - Beanstandung eines in der EU nicht zugelassenen gentechnisch veränderten Organismus. *Deut Lebensm-Rundsch* 100: 377-380.

EC. 2003a. Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Union* L 268/1.

EC. 2003b. Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. *Official Journal of the European Union* L 268/24.

Gerdes, L., U. Busch, and S. Pecoraro. 2012. GMOfinder - A GMO Screening Database. *Food Analytical Methods* 5: 1368-1376.

Guertler, P. et al. 2013. Development of a CTAB buffer-based automated gDNA extraction method for the surveillance of GMO in seed. *Eur Food Res Technol*: 1-8; DOI 10.1007/s00217-00013-01916-y.

Guertler, P., V. Paul, C. Albrecht, and H. H. Meyer. 2009. 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. *Anal Bioanal Chem* 393: 1629-1638.

James, C. 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief No. 44: ISAAA: Ithaca, NY.

Mäde, D., C. Degner, and L. Grohmann. 2006. Detection of genetically modified rice: a construct-specific real-time PCR method based on DNA sequences from transgenic Bt rice. *Eur Food Res Technol* 224: 271-278-278