



**Fachtagung
„Gentechnik für Umwelt- und
Verbraucherschutz“
in Oberschleißheim am 13. Oktober 2005**

im Auftrag des Bayerischen Staatsministeriums für
Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz

Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Eggenreuther Weg 43
91058 Erlangen

Telefon: 09131/764-0
Telefax: 09131/764-102

E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Internet: www.lgl.bayern.de

Autorinnen und Autoren des Berichts:

Alle Manuskripte sind namentlich gekennzeichnet

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

Dr. Ulrich Busch
Tel.: 089/31560-234
E-Mail: ulrich.busch@lgl.bayern.de

Stand:

15. Mai 2006

ISBN 3-939652-02-4 (Online Ausgabe bis 31.12.2006)
ISBN 978-3-939652-02-1 (Online Ausgabe ab 01.01.2007)



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.

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 – Angabe der Quelle und Übersendung eines Belegexemplars erbeten. Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die Publikation wird kostenlos abgegeben, jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Diese Druckschrift wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden.

Grußwort zur Eröffnung der Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“

**Staatssekretärin Emilia Müller¹, Bayerisches Staatsministerium
für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz**

¹Seit 29.11.2005 Bayerische Staatsministerin für Bundes- und Europaangelegenheiten

**Sehr geehrter Herr Professor Hingst, liebe Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des LGL,
meine sehr verehrten Damen und Herren,**

ich freue mich sehr, Sie zur Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“ zu begrüßen. Herzlichen Dank an dieser Stelle für die Vorbereitung und für ihr anspruchsvolles, dichtes Programm. Herzlichen Dank den Akteuren für ihre Beiträge und für ihr wissenschaftliches Engagement.

Dass die Veranstaltung gerade hier stattfindet, ist kein Zufall: Das LGL hat sich auf dem Gebiet der Molekularbiologie und Gentechnik einen ausgezeichneten und international beachteten Ruf erworben. Seit vielen Jahren werden Lebens- und Futtermittel auf gentechnisch veränderte Bestandteile untersucht. Im Zuge der Verwaltungsreform haben wir auch das Gentechniklabor des Bayerischen Landesamts für Umwelt, das bisher Saatgut und Proben aus gentechnischen Anlagen untersucht hat, hierher verlagert und integriert.

Damit haben wir in Bayern eine langfristig erfolgreiche und anerkannte Kernkompetenz auf dem Gebiet der molekularen Analytik geschaffen. Dies werden die Beiträge dieser Fachtagung am heutigen Nachmittag zeigen.

Die Bayerische Staatsregierung hat bereits 1997 im Rahmen der „Offensive Zukunft Bayern/Teil II“ den Förderschwerpunkt „Gentechnik und Umweltschutz“ eingerichtet. Ziel ist die Förderung anwendungsorientierter Forschungsvorhaben, die sich mit den Möglichkeiten der Gentechnik zur Verbesserung des Umweltschutzes befassen.

Auf der heutigen Fachtagung werden aktuelle Projekte mit unterschiedlichsten Zielsetzungen vorgestellt. Ich will hier nur einige Beispiele nennen:

- Mit Hilfe der Gentechnik wird die natürliche Pflanzenabwehr gegen Schädlinge erforscht. Ergebnisse können in der Praxis zu verringertem Spritzmitteleinsatz führen.
- Eiweiße sollen in Grünalgen umweltfreundlicher und kostengünstiger produziert werden.
- Blaualgen sollen in die Lage versetzt werden, Schwermetalle zu binden.
- Schadinsekten sollen in der Umwelt schneller erfasst,
- Schutzmaßnahmen für bedrohte Tierarten verbessert und
- Umweltchemikalien besser beurteilt werden.

Sie können sich auf interessante Vorträge freuen.

Ich würde es begrüßen, wenn Ergebnisse aus diesem Forschungsgebiet in die Praxis umgesetzt werden. Ich ermuntere Sie ausdrücklich, einen intensiven Dialog mit Vertretern von Wirtschaft und Unternehmen zu führen. Die Anmeldung eines Patents als Ergebnis einer hier vorgestellten Arbeit macht dabei Mut.

Gestatten Sie mir noch ein paar grundsätzliche Anmerkungen zur Gentechnikpolitik.

In der Europäischen Union, und ich kann sagen, auch hier in Bayern, wurde die Bedeutung der Gentechnik schon frühzeitig erkannt. Erfolgreiche bayerische Politik belegen aktuell über 600 gentechnische Anlagen und rund 150 Biotechnologie-Unternehmen mit bis zu 7.000 Mitarbeitern. Ungefähr 25 % aller deutschen Biotechnologiefirmen liegen damit in Bayern.

Zahlreiche Fördermaßnahmen der Bayerischen Staatsregierung haben zu diesem Erfolg beigetragen:

- die Einrichtung von Innovations- und Gründerzentren,
- die Bereitstellung von Risikokapital,
- der kompetente und pragmatische Verwaltungsvollzug
- und eine Vielzahl von Einzelmaßnahmen im Rahmen der Offensive Zukunft Bayern und der High Tech-Offensive Bayern.

- Inzwischen sind beachtliche Bioregionen in München, Erlangen/Nürnberg, Würzburg und Regensburg entstanden.

Dabei muss man sich die wechselvolle Geschichte der einzelnen Gentechnik-Bereiche in Erinnerung rufen.

Die Rote Gentechnik, also die Anwendung in der Medizin, war vor rund 15 Jahren noch äußerst umstritten. Heute ist das Erforschen schwerer Krankheiten ohne Gentechnik nicht mehr möglich. Die gentechnische Herstellung von Medikamenten in Mikroorganismen ist akzeptiert. Insulin für zuckerkrankte Patienten wird inzwischen weltweit weitgehend gentechnisch hergestellt.

Die Grüne Gentechnik, die Anwendung in Landwirtschaft und Ernährung, wird in Deutschland immer noch heftig diskutiert. Ein Blick auf die Fakten: Weltweit wurden im letzten Jahr über 80 Millionen Hektar gentechnisch veränderte Pflanzen angebaut, mehr als die doppelte Fläche Deutschlands. Die Welternährungsorganisation FAO hat auf die Chancen der Grünen Gentechnik hingewiesen. Es können Ernteerträge erhöht, Spritzmittel eingespart und künftig verbesserte Lebensmittel entwickelt werden. Wir wären schlecht beraten, wenn wir auf diese Chancen von vorne herein – aus ideologischen Gründen – verzichten würden.

Wir dürfen aber auch nicht die Risiken, die mit jeder Technik verbunden sein können, außer Acht lassen. Deshalb hat die Europäische Union die weltweit strengsten Sicherheitsanforderungen und die umfangreichsten Kennzeichnungsvorschriften für Lebens- und Futtermittel eingeführt.

Die Sicherheit für Mensch und Umwelt hat für uns oberste Priorität.

Die Koexistenz aller Landwirtschaftsformen muss garantiert bleiben.

Wenn die Sicherheit gewährleistet ist, muss Wahlfreiheit für Forschung, Industrie, Handel, Landwirtschaft und Verbraucher herrschen. Jeder soll selbst entscheiden, ob er gentechnisch veränderte Produkte kaufen oder verwenden will. Ob sich die Produkte dann durchsetzen, muss letztlich der Markt entscheiden.

Ein aktuelles, hoffnungsvolles Gebiet ist die Weiße Biotechnologie, also die Anwendung biologischer Verfahren in industriellen Prozessen. Sie zeichnen sich durch hohe Nachhaltigkeit aus: Saubere und sichere Verfahren, die Ressourcen sparen. Es gibt

Beispiele, bei denen bis zu 90 Prozent Energie, Rohstoffe, Wasser und Abfälle gespart werden können. Dieser produktionsintegrierte Umweltschutz ist von großem Nutzen. Wir erwarten, dass die Aufwendungen für nachträgliche Sanierungen von Boden, Luft und Wasser deutlich verringert oder sogar unnötig werden. Auch bei der Produktion und Verwertung nachwachsender Rohstoffe kann die weiße Biotechnologie einen Beitrag leisten und neue Einkommensquellen für die Landwirtschaft erschließen. Landwirte produzieren vielleicht künftig im Gewächshaus medizinische Wirkstoffe in gentechnisch veränderten Pflanzen.

Dadurch verschwinden die Grenzen zwischen „roter“, „grüner“ und „weißer“ Biotechnologie. Bayern will diese Zukunftstechnologie nutzen. Mehr als viele andere Länder ist Deutschland auf den Rohstoff „Geist“ angewiesen. Hierin liegen sein Potenzial, seine Entwicklungsfähigkeit und die Grundlage für Erfolg. Wir wollen deshalb auch in schwierigen finanziellen Zeiten weiterhin Projekte im Bereich der Gentechnik fördern und freuen uns über gute Vorschläge aus Ihrer Mitte.

Ich möchte mich zum Schluss noch einmal bei Ihnen, Herr Professor Hingst, und Ihren Mitarbeitern für die Organisation dieser Tagung bedanken und wünsche Ihnen allen einen erfolgreichen Verlauf.

Inhaltsverzeichnis

Grußwort zur Eröffnung der Fachtagung „Gentechnik für Umwelt- und Verbraucherschutz“ Staatssekretärin Emilia Müller, Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz	1
Eröffnung der Fachtagung „Gentechnik für Umwelt und Verbraucherschutz“ Prof. Dr. Volker Hingst, Präsident des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit.....	6
Abwehr und Schädlingsresistenz.....	9
Verbesserte Schädlingsresistenz in Pflanzen durch Aktivierung von Abwehrmechanismen.....	10
Erhöhung der Pathogenresistenz durch Förderung der gewebsspezifischen Versorgung mit Kohlenhydraten	16
Steigerung der natürlichen Abwehrkräfte in Maispflanzen	27
Aufklärung von Abwehrreaktionen ausgewählter Kulturpflanzen	35
Sicherheit, pathogene Schadinsekten, Artenschutz.....	43
Methoden zur Erfassung pathogener Schadinsekten Darstellung der Ausbreitung von Buchdruckerpopulationen (<i>Ips typographus</i> L.) mittels populationsgenetischer Methoden	44
Verhinderung der Ausbreitung gentechnischer Veränderungen transgener Pflanzen durch metabolisch erzeugte männliche Sterilität als biologische Sicherheitsmaßnahme	57
Einsatz molekulargenetischer Methoden zur Verbesserung von Artenschutzmaßnahmen für die Wildkatze.....	67
Umweltchemikalien und Schwermetalle	79
Schwermetallbindung durch Blaualgen	80
Untersuchung der Toxizität von Umweltchemikalien in gentechnisch veränderten Zellen	88
Prinzipien der Stressbewältigung in Nutzhölzern: Mucopolysaccharide als Hilfsmittel für den Erwerb einer Salzstressresistenz in der Pappel.....	98
Ressourcenschonende Proteinproduktion in Grünalgen	107
Qualitätssicherung und Verbraucherschutz.....	115
Das Europäische Netzwerk für GVO Laboratorien - Neue Wege in der EU	116
Neue Strategien zum Nachweis gentechnisch veränderter Lebens- und Futtermittel ..	127
Qualitätssicherung in der GVO-Analytik in bayerischen Untersuchungslaboratorien ...	135
Entwicklung und Validierung molekularbiologischer Nachweissysteme in der Allergenanalytik.....	141

Eröffnung der Fachtagung „Gentechnik für Umwelt und Verbraucherschutz“

Prof. Dr. Volker Hingst, Präsident des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

**Sehr geehrte Frau Staatssekretärin,
sehr geehrte Damen und Herren,**

ich darf Sie herzlich zur Fachtagung „Gentechnik für Umwelt und Verbraucherschutz“ im Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit begrüßen. Ich freue mich, dass das Bayerische Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz die Fachtagung gerade hier veranstaltet.

Die Gentechnik als eine Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhundert spielt eine bedeutende Rolle für die Umwelttechnologie und Lebensmittelsicherheit in Bayern. Einerseits können die Methoden der Gentechnik, die molekularbiologischen Verfahren, für die Erforschung naturwissenschaftlicher Zusammenhänge (z.B. Stressresistenz bei Nutzhölzern), in der Sicherheitsforschung oder direkt in der Nutzpflanze (Erhöhung der Pathogenitätsresistenz) angewendet werden und andererseits sind die molekularbiologischen Methoden für die Analytik im Bereich der Lebensmittelsicherheit, Veterinärdiagnostik (z.B. aviäre Influenza) und Medizin (z.B. Nachweis pathogener Erreger) unerlässlich.

Am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit als zentrale Fachbehörde für die Lebensmittelsicherheit in Bayern wurde bereits 1997 ein molekularbiologisches Labor eingerichtet, welches im Rahmen des vorbeugenden Verbraucherschutzes die Kennzeichnung von gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermitteln überprüft. Im Rahmen der Neustrukturierung der Landesämter wurden dem LGL im August 2005 die Zuständigkeiten für die Analytik von gentechnisch verändertem Saatgut, Monitoring gentechnisch veränderter Pflanzen (Freisetzungen) sowie die Überwachung im Rahmen des Gentechnikgesetzes übertragen. Damit sind in Bayern alle Zuständigkeiten der Analytik gentechnisch veränderter Organismen am LGL gebündelt. Das molekularbiologische Labor ist als Referenzlabor für ganz Bayern für die Entwicklung neuer Nachweismethoden, die Validierung entwickelter Methoden und die Implementierung molekularbiologischer Methoden im Geschäftsbereich zuständig. Am

LGL wurden zahlreiche Forschungsprojekte, die vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz finanziert wurden, durchgeführt. Exemplarisch sollen drei Projekte genannt werden, die auch im Rahmen der Veranstaltung vorgestellt werden: Neue Strategien zum Nachweis gentechnisch veränderter Lebens- und Futtermittel, die Entwicklung und Validierung molekularbiologischer Nachweissysteme in der Allergenanalytik und die Qualitätssicherung in der GVO-Analytik in bayerischen Untersuchungslaboratorien. Das LGL ist im Rahmen der molekularbiologischen Analytik in zahlreichen internationalen und nationalen Arbeitsgruppen vertreten (ENGL, CEN, DIN, § 64 LFGB, ALS) und zählt in Deutschland mit zu den führenden Institutionen der analytischen Überwachungsbehörden.

Ich bin sicher, dass wir durch unser „know how“ erfolgreiche Arbeit auf dem Gebiet der Molekularbiologie und Gentechnik leisten und weiterhin sehr gut mit dem Ministerium zusammenarbeiten werden.

Auf der Fachtagung werden wir vielfältige und interessante Beiträge erleben. Ich wünsche allen Beteiligten viel Erfolg.

.

Abwehr und Schädlingsresistenz

Verbesserte Schädlingsresistenz in Pflanzen durch Aktivierung von Abwehrmechanismen

Ines C. Raacke und Susanne Berger
Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg,
Julius-von Sachs-Platz 2, 97082 Würzburg

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise sind Pflanzen ständig dem Angriff eines breiten Spektrums von Schädlingen ausgesetzt. Dazu zählen Pathogene wie Pilze, Bakterien und Viren ebenso wie Insekten. Allerdings führt nur ein Teil dieser Pathogenkontakte zu einer Erkrankung, da die Pflanzen über präformierte und induzierbare Abwehrmechanismen verfügen. Zu den induzierbaren Abwehrreaktionen zählt die Verstärkung der pflanzlichen Zellwände um damit das Eindringen des Pathogens zu erschweren, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies sowie die Induktion der Expression von Abwehrgenen. Die von diesen Genen kodierten Proteine besitzen entweder selbst toxische oder antimikrobielle Eigenschaften wie Proteinaseinhibitoren, Chitinasen und Defensine oder sind an der Synthese von Stoffen mit antimikrobiellen Eigenschaften wie den Phytoalexinen beteiligt. Zwischen der Erkennung des Pathogens und der Induktion von Abwehrgenen vermitteln Signaltransduktionswege, von denen erst ein Teil der Komponenten bekannt ist. Salizylsäure, Jasmonsäure und 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) sind dabei Signalmoleküle, die eine wichtige Rolle bei der Pathogenantwort spielen (Abb. 1).

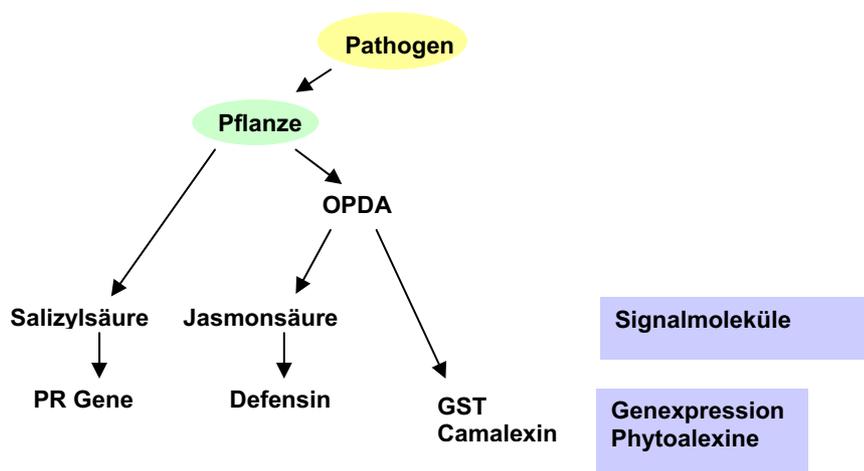


Abb. 1: Signaltransduktionswege bei der induzierten pflanzlichen Abwehr

Die Stärke und Schnelligkeit der pflanzlichen Reaktionen wiederum beeinflusst, ob und in welchem Maße sich der Schädling in der Pflanze vermehren und ausbreiten kann. Eine Aktivierung der pflanzlichen Abwehrreaktionen vor einer möglichen Infektion ist eine

Möglichkeit, die pflanzliche Resistenz zu erhöhen. Allerdings ist ein Verständnis der Mechanismen und der Regulation der pflanzlichen Abwehr grundlegend für eine gezielte Modulation der pflanzlichen Resistenz um unerwünschte Effekte wie z.B. Zwergwuchs zu vermeiden. Ziel des ersten Ansatzes ist es daher, durch die Verwendung von gentechnischen Pflanzen/Mutanten die Mechanismen zu erkennen, die an der durch eine Behandlung mit Hefe ausgelösten erhöhten Resistenz beteiligt sind.

Abwehrreaktionen in Pflanzen lassen sich außer durch den Kontakt mit Pathogenen auch durch nichtpathogene Mikroorganismen oder durch bestimmte, von dem Mikroorganismus oder der Pflanze stammende Verbindungen induzieren. Da Hefe einen potentiellen nicht-toxischen, biologisch-abbaubaren und kostengünstigen Elicitor darstellt, wurde die Fähigkeit von Hefesuspensionen getestet, die Abwehr und Resistenz in Pflanzen zu stimulieren. Als Pflanze wurde für die Untersuchungen die Ackerschmalwand, *Arabidopsis thaliana*, verwendet, da die Verfügbarkeit von Mutanten/gentechnisch veränderten Pflanzen mit Defekten in der Mehrzahl der Signaltransduktions- und Biosynthesewege und die Kenntnis der Sequenz des gesamten Genoms eine Untersuchung der Abwehr- und Resistenzmechanismen ermöglichen. Als Pathogene wurden das Bakterium *Pseudomonas syringae*, Erreger des Bakterienbrandes, und der Grauschimmel *Botrytis cinerea* getestet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von *Arabidopsis* Pflanzen mit einer sterilen Hefesuspension die Symptome einer 5 Tage später erfolgenden Pathogeninfektion deutlich verringert. Das Wachstum des Bakteriums *P. syringae* wurde durch die Hefe-Vorbehandlung um den Faktor 3 verringert (Abb. 2), die Ausbreitung des Schimmelpilzes *B. cinerea* um den Faktor 6 (Abb. 3).

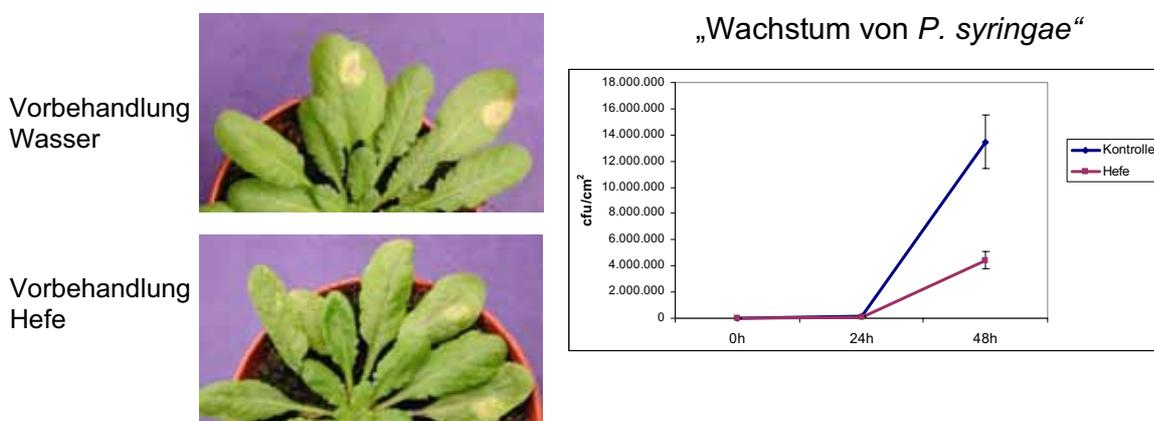


Abb.2 : Symptomentwicklung und Bakterienwachstum in *Arabidopsis* Blättern (Col) nach Behandlung mit *P. syringae* und Vorbehandlung mit 0,3g Hefe/ml bzw. Wasser (Kontrolle)

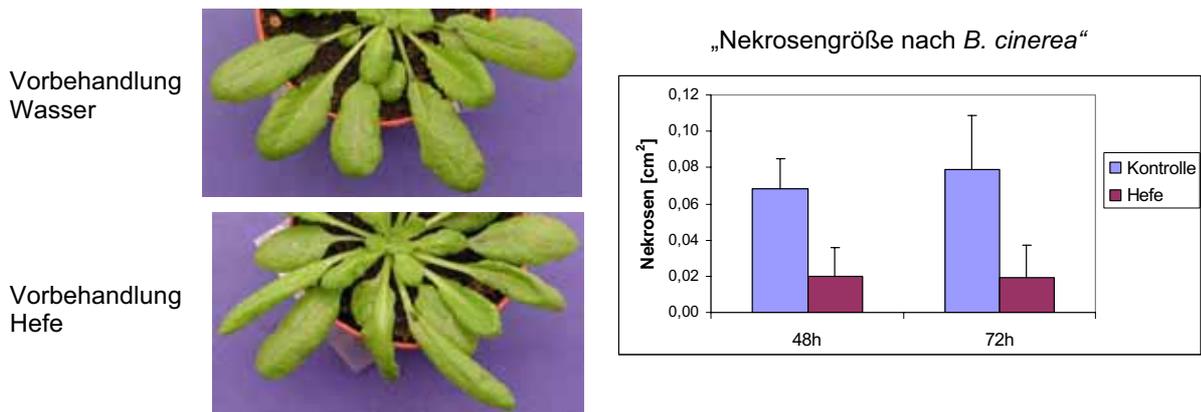


Abb. 3: Symptomentwicklung und Nekrosengröße in *Arabidopsis* Blättern (Col) nach Behandlung mit *B. cinerea* und Vorbehandlung mit 0,3g Hefe/ml bzw. Wasser (Kontrolle)

Um die molekularen Mechanismen dieses Schutzeffektes der Hefe zu identifizieren wurde untersucht, welche Abwehrmechanismen durch Hefe stimuliert werden. Hefe induzierte die Akkumulation des Signalmoleküls Jasmonsäure sowie des Phytoalexins Camalexin und die Expression von Abwehrgenen und Genen des Detoxifizierungssystems. Unter Verwendung von transgenen Pflanzen/Mutanten wurde analysiert, ob Defekte in bestimmten Signaltransduktionswegen bzw. Synthesewegen für Abwehrstoffe die Schutzwirkung verhindern. In Mutanten mit Defekten im Salizylsäureweg (*NahG*, *npr1*) ist durch eine Vorbehandlung mit Hefe keine Verringerung des Wachstums von *P. syringae* möglich (Tab. 1). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass der Salizylsäureweg für die Schutzwirkung gegen *P. syringae* notwendig ist. In Pflanzen mit Defekten in der Camalexinbiosynthese (*cyp79B2/3*) sowie im Jasmonatweg (*jin1*, *opr3*) wurde eine Schutzwirkung ähnlich wie im Wildtyp gegen *P. syringae* detektiert (Tab. 1). Dieses Ergebnis zeigt, dass der Jasmonatweg sowie das Camalexin nicht essentiell für die Schutzwirkung gegen *P. syringae* sind.

Eine Reduktion der Größe der durch *B. cinerea* hervorgerufenen Nekrosen wurde sowohl in den Mutanten mit Defekten im Salizylatweg als auch in Mutanten erreicht, die in der Camalexinbiosynthese oder im Jasmonatweg gestört sind (Tab. 1). Diese Daten zeigen, dass weder Salizylat noch Jasmonat noch Camalexin für den Schutzeffekt der Hefe gegen *B. cinerea* notwendig sind. Dieses Ergebnis war unerwartet, da eine Hemmung des Wachstums von *B. cinerea* durch Camalexin in der Literatur beschrieben wurde und auch vom Jasmonatweg gezeigt wurde, dass er an der Abwehr von nekrotrophen Pilzen beteiligt ist. Daraus lässt sich schließen, dass an der durch Hefe ausgelösten Resistenz andere Wege und Faktoren beteiligt sind.

Mutante	Defekt	Schutzfaktor gegen <i>P. syringae</i>	Schutzfaktor gegen <i>B. cinerea</i>
Col	Keiner, Wildtyp	3	6
<i>NahG</i>	Salizylsäureakkumulation	0	4
<i>npr1</i>	Salizylsäure-Signaltransduktion	0	4
<i>pad3</i>	Camalexinbiosynthese	3	4
<i>cyp</i>	Camalexinbiosynthese	4	7
<i>jin1</i>	Jasmonat-Signaltransduktion	5	11
<i>opr3</i>	Jasmonat-Biosynthese	3	5

Tab. 1: Zusammenfassung der Wirksamkeit der Hefevorbehandlung in verschiedenen Mutanten 48h nach Infektion bei *P. syringae* bzw. 72h nach Infektion mit *B. cinerea*

Weiterhin wurde getestet, ob sich der gleiche Schutzeffekt, der durch Bäckerhefe bewirkt wird, auch durch Brauerei-Althefer hervorrufen lässt. Diese Althefer ist ein recht preiswertes und in größeren Mengen in der Brauerei als Abfall anfallendes Produkt, das sich als ungiftiger und natürlicher Elicitor der pflanzlichen Resistenz eignen würde. Althefer führte zu einer Akkumulation von Camalexin und einer Schutzwirkung gegen *B. cinerea*.

Für eine Anwendung in der Praxis ist es notwendig zu wissen, wie lange diese Schutzwirkung andauert. Deshalb wurde zu verschiedenen Zeiten nach der Hefebehandlung mit *P. syringae* behandelt und das Bakterienwachstum analysiert. Die maximale Schutzwirkung wurde nach 7 Tagen erreicht. Ein Schutzeffekt war auch noch 11 Tage nach Infiltration zu detektieren.

Pathogene haben Strategien entwickelt, um eine wirksame Abwehr der Wirtspflanze zu unterdrücken. Da eine Verhinderung der Abwehr in einer erhöhten Pathogenität resultiert, werden die hierfür verantwortlichen Substanzen auch als Pathogenitätsfaktoren bezeichnet. Ziel des zweiten Ansatzes ist es, durch Ausschalten eines Pathogenitätsfaktors einen gentechnisch veränderten Mikroorganismus zu generieren, der die wirksame Abwehr der Pflanze aktiviert ohne Krankheit hervorzurufen.

Fusarium graminearum ist ein phytopathogener Pilz (Abb. 4), der vor allem Getreide befällt und dort zu der partiellen Taubährigkeit führt. Vor allem durch die Bildung von Mycotoxinen, die für Menschen und Tiere toxisch sind, stellt der Befall mit diesem Pathogen ein großes Problem in der Landwirtschaft dar. Auch Blüten und Schoten der Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* können mit diesem Pilz infiziert werden.



Abb. 4: *F. graminearum*, auf Agarmedium (links) und mit diesem Pilz infizierter Weizen (rechts)

Die vollständige Sequenz des Genoms von *F. graminearum* ist bekannt und eine effiziente Transformation durch gerichtete Mutagenese möglich. Deshalb soll dieser Pilz verwendet werden um einen gentechnisch veränderten Stamm herzustellen, der eine verringerte Pathogenität aufweist.

Jasmonsäure und Linolensäure, die Vorstufe von Jasmonsäure u.a. Oxylipinen, konnten in dem Stamm *F. graminearum* nachgewiesen werden, die Funktion dieser Verbindungen in dem Pilz ist aber noch ungeklärt. Von einem anderen Stamm der Gattung *Fusarium*, *F. oxysporum lycopersici*, wurde nachgewiesen, dass er keine Jasmonsäure enthält. Da diese Substanz nicht ubiquitär in *Fusarium*-Stämmen vorkommt, könnte sie eine Rolle als Pathogenitätsfaktor spielen und eine Wirkung auf die pflanzlichen Signalwege ausüben. Mit Coronatin, einem Oxylipin in dem phytopathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* ist bereits ein Beispiel für eine Jasmonat-ähnliche Verbindung bekannt, dass einen Pathogenitätsfaktor darstellt und auf die pflanzlichen Signalwege wirkt. Das nicht ubiquitäre Vorkommen der Jasmonsäure in der Gattung *Fusarium* zeigt weiterhin, dass die Jasmonsäure generell für die pilzliche Entwicklung dieser Gattung nicht essentiell ist und deshalb sehr wahrscheinlich lebensfähige Jasmonsäure-Mutanten erhalten werden können. Durch Analyse der Sequenz des gesamten Genoms von *F. graminearum* wurden die putativen Jasmonsäure-Biosynthese-Gene identifiziert. Das Genom enthält ein Lipoxygenase-Gen sowie mehrere Gene mit Homologie zu Allenoxidsynthase und OPDA-Reduktase. Durch gerichtete Mutagenese des Lipoxygenase-Gens in *F. graminearum* soll geklärt werden, ob die Jasmonate Pathogenitätsfaktoren dieses Pilzes sind und sich durch

das Ausschalten des Jasmonatweges ein attenuiertes Pathogen generieren lässt. Die Mutagenese des Pilzes soll in Zusammenarbeit mit der Universität Göttingen erfolgen. In der Jasmonatmutante soll analysiert werden, in welchem Umfang dieses Pathogen Abwehrreaktionen in der Pflanze auslöst (Camalexin, Genexpression) und ob sich eine Behandlung der Pflanzen mit diesem attenuierten Stamm eignet, um die Resistenz der Pflanzen gegen pathogene *Fusarium*-Stämme sowie andere Schädlinge zu erhöhen.

Erhöhung der Pathogenresistenz durch Förderung der gewebspezifischen Versorgung mit Kohlenhydraten

Katharina Bonfig und Thomas Roitsch

Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg – Julius-von-Sachs-Platz 2, D-97082 Würzburg, Germany

Zusammenfassung

In Höheren Pflanzen werden in den Blättern Kohlenhydrate produziert, die zu anderen Pflanzenteilen wie Wurzeln und Früchten transportiert und dort als Nährstoffe verbraucht oder gespeichert werden. Im Rahmen von Forschungsarbeiten zu den zugrundeliegenden Mechanismen konnte das Enzym extrazelluläre Invertase als wichtiger Regulator identifiziert werden. Dabei wurde insbesondere auch ein Bezug zur Bereitstellung von Energie bei der Aktivierung von Abwehrreaktionen nach Pathogeninfektion aufgezeigt. Basierend auf diesen Befunden soll mittels eines kausalanalytischen Versuchsansatzes geprüft werden, ob durch spezifische Verbesserung der Kohlenhydratversorgung bei Pathogenbefall eine erhöhte Resistenz gegenüber praxisrelevanten bakteriellen und pilzlichen Schädlingen erzeugt werden kann. Die neuartige Methode der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung soll als nicht-invasive Nachweismethode zur Früherkennung von Pathogeninfektionen etabliert werden, um eine möglichst gezielte, frühzeitige Behandlung einleiten zu können. Durch die Aktivierung von sich ergänzenden, endogenen Mechanismen zur Stärkung der Abwehrbereitschaft in Verbindung mit der Früherkennung von Pathogeninfektionen soll ein Beitrag geleistet werden um auf die Anwendung umweltproblematischer Spritzmittel verzichten zu können oder zumindest deren Einsatz deutlich zu reduzieren.

Einführung

Pflanzen bleibt aufgrund der sessilen Lebensweise nur die Nutzung ihrer enormen metabolischen und biosynthetischen Kapazität, um auf die Vielzahl von bakteriellen und pilzlichen Pathogenen zu reagieren. Einerseits werden zahlreiche direkte Abwehrmechanismen aktiviert wie die Akkumulation von PR-Proteinen, Zellwandveränderungen, Phytoalexinsynthese und Hypersensitive Reaktion. Zusätzlich sind aber auch umfangreiche Einflüsse auf den Primärmetabolismus festzustellen, wobei insbesondere der Kohlenhydratstatus des betroffenen Organs beeinflusst wird (Abb. 1). Verschiedene

Arbeiten zeigen, dass die photosynthetische Genexpression reprimiert wird, was zu einer verminderten Photosyntheseleistung führt. Gleichzeitig werden die Reaktionen des heterotrophen Stoffwechsels zur Verwertung der in der Photosynthese hergestellten Kohlenhydrate induziert, was auch einen Einfluss auf den Langstreckentransport von Assimilaten hat. In Vorarbeiten mit Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass dabei die Induktion einer extrazellulären Invertase eine generelle Stressreaktion zu sein scheint. Dieses zellwandgebundene Enzym spaltet den Transportzucker Saccharose im Apoplasten und trägt über die Phloementladung zur Kohlenhydratverteilung und damit zur Versorgung von photosynthetisch wenig aktiven oder inaktiven (Sink-) Geweben mit Assimilaten bei (siehe auch Abb. 1 in dem Beitrag von Hirsche und Roitsch). Die inverse Regulation von Photosynthese und Sink-Metabolismus weist darauf hin, dass die Pflanze von ihrem normalen Stoffwechsel auf Abwehrstoffwechsel umschaltet. Weiterhin gibt es Hinweise, dass die Reaktionen der Pflanze und die resultierende Resistenz bzw. Krankheitsentwicklung *per se* durch ihren Kohlenhydratstatus, der beispielsweise von den Lichtbedingungen abhängt, moduliert wird. Dies wird durch das lange bekannte Phänomen belegt, dass ein hoher endogener Zuckergehalt mit einer erhöhten Resistenz korreliert („High Sugar Resistance“) und durch den Befund der Induzierbarkeit einer Reihe von PR-Genen durch Zucker. Auf eine Verknüpfung zwischen Zuckerstatus und Pathogenantwort weisen auch Ergebnisse mit transgenen Tabakpflanzen hin, die eine Invertase aus der Hefe überexprimieren und sich durch eine erhöhte PR-Gen-Expression und eine erhöhte Resistenz gegenüber einer Virusinfektion auszeichnen. Außerdem wurde bei bakteriellen Pathogenen beobachtet, dass die Ausbildung von Nekrosen im Licht schneller erfolgt als im Dunkeln.

In dem Projekt soll untersucht werden, ob die natürlichen Abwehrkräfte von Kulturpflanzen durch Verbesserung der Kohlenhydratversorgung gestärkt werden können.

Ergebnisse und Diskussion

Anwendung der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung zur nicht-invasiven Früherkennung einer Pathogeninfektion

Mit Hilfe des grünen Blattfarbstoffes Chlorophyll wird die chemische Energie des Sonnenlichtes in dem Prozess der Photosynthese in chemische Energie umgewandelt. Dabei nimmt die Pflanze anorganisches Kohlendioxid aus der Umgebungsluft auf und wandelt dieses in Zucker und weitere organische Verbindungen um. Nicht die gesamte Energie, die auf ein Chlorophyllmolekül trifft, wird jedoch für die Photosynthese verwendet.

Ein Teil wird als Wärme abgegeben und ein sehr geringer Teil auch in Form von rotem Fluoreszenz-Licht wieder abgestrahlt. Beleuchtet man Pflanzen mit blauem Licht und betrachtet sie durch einen roten Filter, kann man die Fluoreszenz am intakten Blatt sichtbar machen. Das bereits seit einigen Jahren etablierte Verfahren der punktförmigen Messung der Chlorophyllfluoreszenz zur Bestimmung der photosynthetischen Aktivität wird durch Kombination mit einer speziellen CCD-Kamera mit einer räumlichen Auflösung in einem neuartigen Messverfahren kombiniert. Mit Hilfe der Methode der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung kann man am intakten Blatt Änderungen der Photosyntheserate und von endogenen Regulationsvorgängen sichtbar machen. Die Lichtausnutzung der Blätter für chemische Reaktionen und weitere abgeleitete Parameter werden berechnet und in Falschfarben dargestellt (Abb. 1). Somit ist es möglich auch lokal begrenzte Veränderungen der räumlichen Verteilung der photosynthetischen Aktivität und Kapazität hochsensitiv darzustellen. Ein weiterer besonderer Vorteil dieser Methode ist, dass diese nicht-invasiv arbeitet, das analysierte Pflanzenorgan durch die Messung nicht geschädigt wird und der zeitliche Verlauf an demselben Objekt verfolgt werden kann.

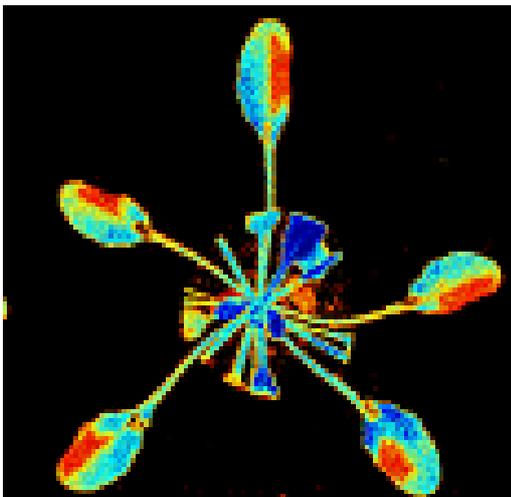


Abb. 1. Anwendung der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung zur räumlichen Darstellung der photosynthetischen Aktivität in Falschfarben. Blatthälften von *Arabidopsis* wurden durch das hemibiotrophe Bakterium *P. syringae* pv. tomato infiziert und die Repression der Photosynthese an der Infektionsstelle durch den Chlorophyllfluoreszenz-Parameter 6f-LC sichtbar gemacht.

Beeinflussung des Kohlenhydratmetabolismus von Tomaten nach Infektion durch *Botrytis cinerea*

Eines der exemplarisch untersuchten Pathosysteme ist die Infektion von Tomate (*Lycopersicon esculentum*), als praxisrelevante Kulturpflanze, durch den nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea*, dem Erreger des weit verbreiteten Grauschimmels, der durch das häufige

Auftreten von Resistenzen gegenüber Fungiziden durch Spritzmittel schwer zu bekämpfen ist.

Der Zeitverlauf der spezifischen Ausprägung von Nekrosen in Abhängigkeit der Infektion wurde phänotypisch analysiert. Dabei wurden insbesondere auch Titrations in Bezug auf die Inokulummenge durchgeführt. Die Analyse der Expression einer Auswahl repräsentativer Markergene der zellulären Abwehr, der Photosynthese und des Sink-Metabolismus erfolgte durch Northern-Blot Analysen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die drei Klassen von Genen koordiniert reguliert werden (Abb. 2). Während Abwehrgene und Sink-spezifische Gene induziert werden, erfolgt eine Repression der photosynthetischen Gene.

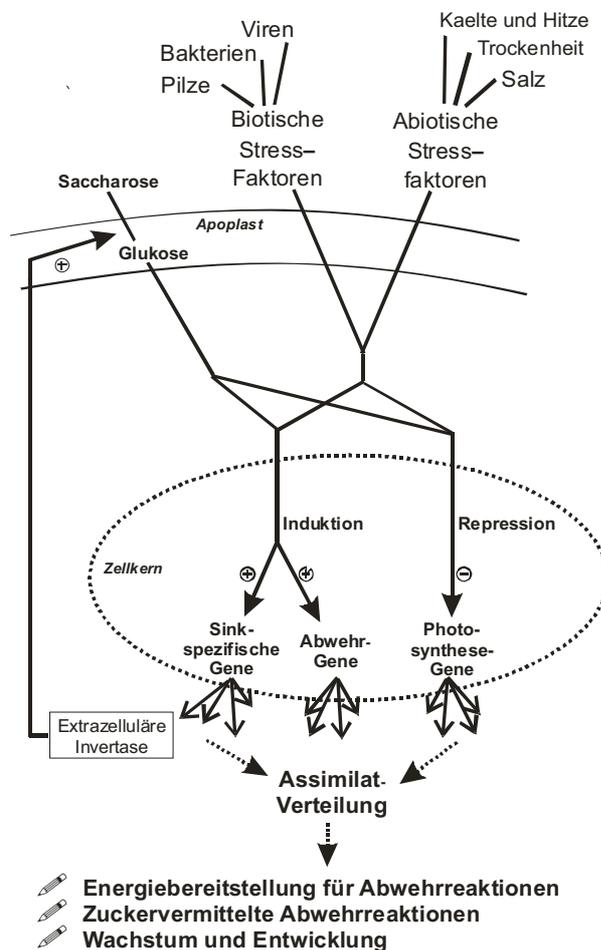


Abb. 2. Modell der ko-ordinierten Regulation von Photosynthese, Sink-Metabolismus und Abwehrreaktionen durch biotischen und abiotischen Stress. Die Invertase besitzt eine Doppelrolle für die Generierung von Hexosen als Substrat für den heterotrophen Metabolismus und als metaboles Signal für die Verstärkung von Pathogensignalen.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch die Infektion der Kohlenhydratstatus der Gewebe beeinflusst wird. Durch die Infektion mit *Botrytis* wurde zum einen die Gesamtmenge an löslichen Zuckern reduziert und zum anderen erhöhte sich das Verhältnis zwischen Hexosen und Saccharose. Dadurch konnte insbesondere die physiologische Wirkung der Induktion der extrazellulären Invertase und die dadurch resultierende vermehrte Hydrolyse der Saccharose über die Beeinflussung des Hexose/Saccharose-Verhältnisses bestätigt werden.

Die Anwendung der Methode der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung ergab, dass durch die Infektion distinkte, lokalisierte Effekte auf den Primärmetabolismus verursacht werden. Die Repression der Photosynthese und die Induktion des Sink-Metabolismus treten nicht gleichförmig um die Infektionsstellen auf. Während, entsprechend den gefundenen Genregulationen, generell eine Reduktion der photosynthetischen Aktivität ausgelöst wird, konnte erstmalig im unmittelbaren Bereich der Infektionsstelle eine Erhöhung der Photosynthese nachgewiesen werden (Abb. 3).

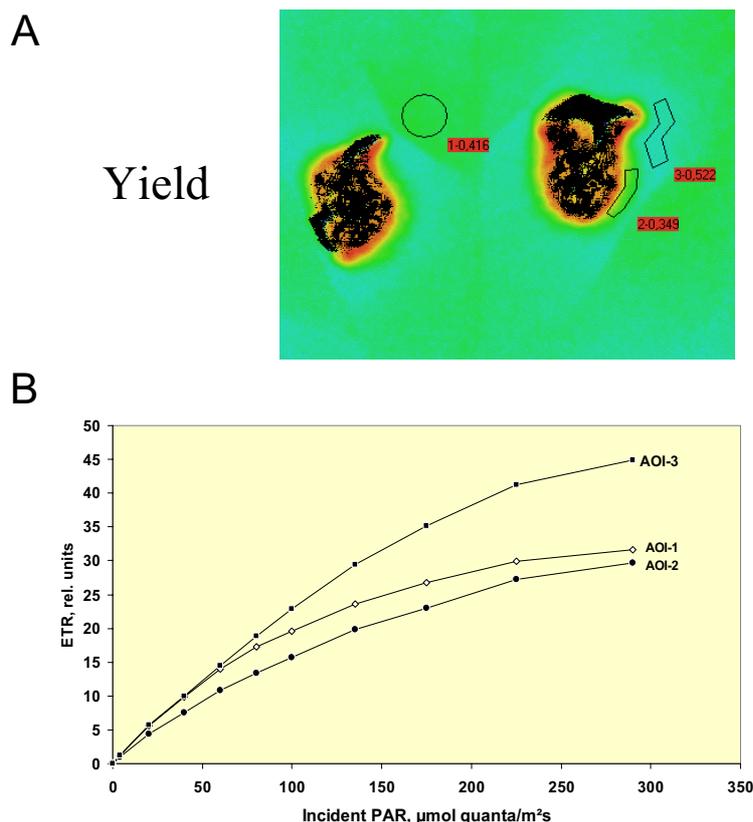


Abb. 3. Infektion eines Tomatenblattes durch den nekrotrophen Pilz *B. cinerea*. Die Anwendung der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung zeigt, dass es im unmittelbaren Bereich der Infektionsstellen zu einer lokalisierten Erhöhung der Photosyntheseaktivität kommt, während in den sich anschließenden Bereichen die Photosynthese reprimiert ist. Dargestellt ist der Fluoreszenz-Parameter der effektiven PSII-Quantenausbeute (A) und die Abhängigkeit des photosynthetischen Elektronentransportes von der eingestrahlten Lichtmenge (B) in ausgewählten Bereichen (AOI-1 bis -3).

Beeinflussung des Kohlenhydratmetabolismus von *Arabidopsis* nach Infektion durch *Pseudomonas syringae*

Eine weitere untersuchte Interaktion ist die Infektion der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durch das hemibiotrophe Bakterium *Pseudomonas syringae*, Verursacher des weit verbreiteten Bakterienbrandes. Dabei wurde vergleichend die kompatible Interaktion unter Ausbreitung des virulenten Stammes DC3000 und die inkompatible Interaktion des avirulenten Stammes DC3000avrRPM1 unter Auslösung einer hypersensitiven Reaktion im pflanzlichen Gewebe untersucht.

Der Zeitverlauf der spezifischen Ausprägung von Nekrosen in Abhängigkeit der verschiedenen Pathogene wurde phänotypisch analysiert. Zur Bestimmung des bakteriellen Wachstums in der Pflanze wurden die Bakterien reisoliert und quantitative Bestimmungen durchgeführt. Parallel dazu werden Versuche zur Transformation von *Pseudomonas* mit dem nicht-invasiv nachweisbaren Markergen GFP (Grün-Fluoreszierendes-Protein) und dessen Detektion durchgeführt. Die Analyse der Expression von einer noch größeren Auswahl repräsentativer Markergene der zellulären Abwehr, der Photosynthese und des Sink-Metabolismus erfolgte durch Northern-Blot Analysen. Dabei konnte gezeigt werden, dass im Falle der virulenten Interaktion wiederum die oben genannten drei Klassen von Genen koordiniert reguliert werden. Während Abwehr- und Sink Gene induziert werden, erfolgt eine Repression der photosynthetischen Gene (Abb. 1). Im Gegensatz dazu wurde durch den avirulenten Stamm die Expression des untersuchten photosynthetischen Gens nicht beeinflusst.

Neben der generellen Aktivierung von direkten Abwehrreaktionen war stets auch eine Induktion der Expression von bestimmten Isogenen der extrazellulären Invertase, als einer zentralen Komponente der Versorgung mit Kohlenhydraten festzustellen. Durch Anwendung der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung konnte die Infektion sensitiv und nicht-invasiv nachgewiesen werden. Insbesondere die Infektion durch den avirulenten Bakterienstamm von *Pseudomonas* kann bereits vor Ausprägung phänotypischer Nekrosen nachgewiesen werden, wodurch eine Früherkennung der Infektion möglich wird (Abb. 4).

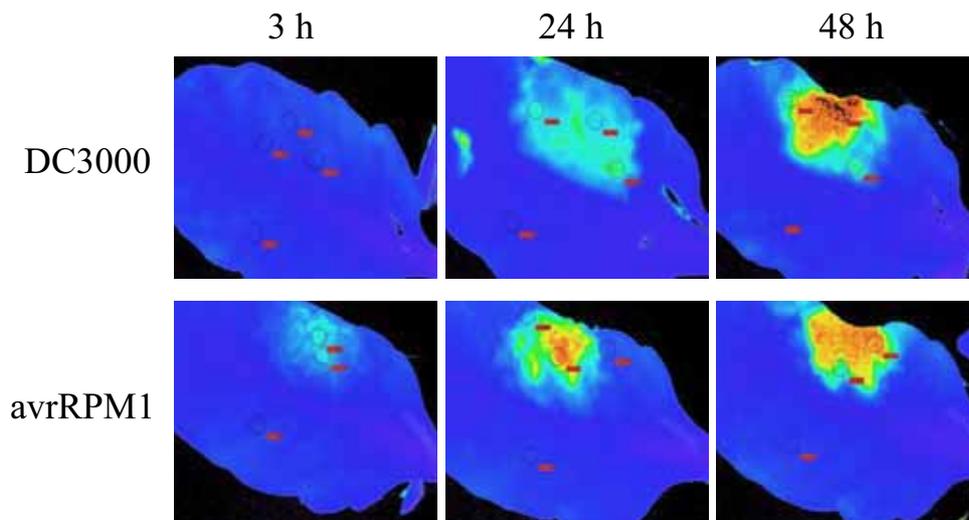


Abb. 4. Infektion von *Arabidopsis*-Blättern durch das hemibiotrophe Bakterium *P. syringae* pv. *tomato*. Der differentielle Effekt auf die photosynthetische Aktivität durch einen virulenten (DC3000) und avirulenten (DC3000avrRPM1) Stamm kann durch den Chlorophyllfluoreszenz-Parameter Fv/Fm sichtbar gemacht werden.

Untersuchung von *Arabidopsis* Mutanten in denen einzelne Invertasegene mutiert sind

Arabidopsis besitzt sechs verschiedene Gene, die für Zellwand-Invertasen kodieren. Im Rahmen einer Zusammenarbeit standen insgesamt 7 Knock-Out-Mutanten von fünf der Invertase-Gene, zusammen mit den entsprechenden Kontrollstämmen zur Verfügung. Die Mutanten wurden in Bezug auf die Sensitivität gegenüber den beiden Pathogenen *B. cinerea* und *P. syringae* untersucht. Dies wurde ergänzt durch Analyse der Expression der Pathogen-regulierten Invertasen. Bei den sehr umfangreichen Versuchen ergab sich jedoch, dass in keiner der untersuchten Mutanten ein deutlicher Effekt in Bezug auf die untersuchten Parameter nachzuweisen war. Es ist davon auszugehen, dass eine Kompensation des jeweiligen Defekts durch ein anderes Mitglied der Invertase-Familie erfolgt, was sehr häufig bei Genfamilien beobachtet werden kann.

Durch Hemmung der pflanzlichen Invertaseaktivität wird die Pathogensensitivität erhöht

Die dargestellte Charakterisierung der zwei verwendeten Pathosysteme weist auf einen Zusammenhang zwischen der Infektion durch verschiedene Pathogene und der extrazellulären Invertaseaktivität hin. Um die Bedeutung der extrazellulären Invertase für die pflanzlichen Abwehrreaktionen zu untersuchen, wurde ein pharmakologischer Versuchsansatz gewählt. In Vorversuchen wurde getestet, ob der bislang nur in der Humanmedizin eingesetzte chemische Glycosidase-Inhibitor Acarbose zur Hemmung pflanzlicher Invertasen eingesetzt werden kann. Dabei ergab sich, dass die Invertaseaktivität von *Arabidopsis* sehr effizient unter den experimentellen Bedingungen einer bakteriellen Infektion durch Infiltration in Blätter gehemmt werden kann. Infektionsversuche sowohl mit dem virulenten als auch mit dem avirulenten Stamm von *P. syringae* zeigten, dass durch Hemmung der Invertaseaktivität in den infizierten Blättern die Sensitivität gegenüber der bakteriellen Infektion erhöht wird (Abb. 5). Damit kann erstmals ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Invertaseaktivität und der Pathogensensitivität aufgezeigt werden, was einen vielversprechenden Ansatzpunkt für weiterführende Experimente mit transgenen Pflanzen zur Modulation der Pathogenantwort darstellt.

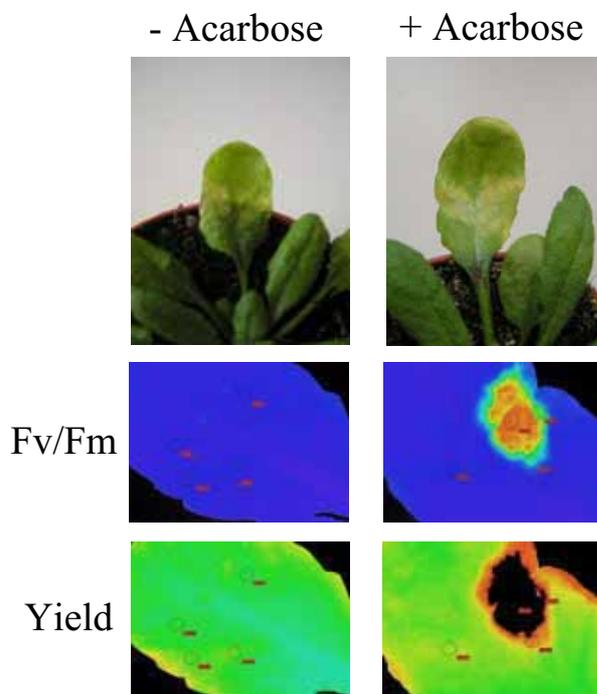


Abb. 5. Durch die Hemmung der Invertaseaktivität in *Arabidopsis*-Blättern wird die Sensitivität gegenüber einer Infektion durch *P. syringae* erhöht. Blätter von *A. thaliana* wurden mit *P. syringae* DC3000 unter gleichzeitiger Co-Infiltration des Glycosidasehemmstoffes Acarbose infiziert. Darstellung des Chlorophyllfluoreszenz-Parameters Fv/Fm.

Pathogen-abhängige Modulation der Invertaseaktivität in transgenen Pflanzen

Um die erhaltenen Daten zur Bedeutung der extrazellulären Invertase für die pflanzliche Abwehr in funktionellen Ansätzen für eine praktische Anwendung zu überprüfen, werden transgene *Arabidopsis* Pflanzen hergestellt, deren Invertaseaktivität in Abhängigkeit einer Pathogeninfektion verändert wird. Zur Erhöhung der Invertaseaktivität steht aus bisherigen Arbeiten die bereits gut charakterisierte und funktionell in Pflanzen exprimierte Invertase Cin1 zur Verfügung. Zur Verminderung der Invertaseaktivität sollen sowohl die Methode der Antisense-Hemmung mit sogenannten RNA-Interferenz-Konstrukten und die Expression eines Invertase-Inhibitors verwendet werden. RNAi ist eine sehr effiziente Methode um posttranskriptionell die Synthese von spezifischen Proteinen zu verringern. Der Invertase-Inhibitor hat den Vorteil, dass ein breites Spektrum an Invertase-Isoenzymen posttranslational gehemmt wird. Dies ist insbesondere in dem vorliegenden Fall von besonderer Bedeutung, da die Experimente mit den Invertase-Mutanten darauf hinweisen, dass die Mutation eines Invertase-Gens durch andere Invertase-Gene kompensiert werden kann. Da nicht vorhersagbar ist, welcher der beiden experimentellen Ansätze für die Untersuchungen besser geeignet sein wird, sollen diese vergleichend eingesetzt werden.

Wegen der Bedeutung der extrazellulären Invertase für Wachstum und Entwicklung würde eine generelle Modulation schwerwiegende Auswirkungen haben. Deshalb wurden spezifische Promotoren eingesetzt, die eine Modulation der Aktivität erst nach einer Pathogeninfektion sicherstellen sollten. Es wurden Konstrukte mit drei verschiedenen synthetischen Promotoren hergestellt, die am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln entwickelt wurden und als Stress-induzierbar beschrieben sind. Zur spezifischen Verminderung der Invertaseaktivität in Abhängigkeit einer Pathogeninfektion wurden mit diesen regulierbaren Promotoren Konstrukte mit einem Invertase-Inhibitor aus *A. thaliana* hergestellt und dann in binäre Vektoren für eine *Agrobacterium*-vermittelte Pflanzentransformation umkloniert. Nach Verifizierung der Klone wurde *A. thaliana* durch die Methode des Floral Dip transformiert und transgene Pflanzen selektioniert. Bei der Selektion der erhaltenen Samen der transformierten Pflanzen ergab sich, dass sich zunächst ein typischer Prozentsatz der Sämlinge resistent verhielt, die dann aber in der Entwicklung arretierten und abstarben. Nachdem dieses Phänomen sich auch bei einer Reihe von Wiederholungen zeigte, liegt die Vermutung nahe, dass die verwendeten Promotoren nicht so spezifisch wie in der Literatur beschrieben reguliert und exprimiert sind. Vielmehr deuteten die Befunde an, dass die verwendeten synthetischen Promotoren

nicht nur durch Stresssignale wie eine Pathogeninfektion induziert werden, sondern vielmehr auch während der frühen Keimlingsentwicklung aktiv sind und diesen Entwicklungsschritt durch Induktion der Invertaseinhibitoren hemmen. Letztere Schlussfolgerung konnte dann auch experimentell durch die Analyse von Reportergermlinien bestätigt werden. Es wird nun der Einsatz alternativer Promotoren für die Herstellung der entsprechenden Genkonstrukte getestet.

Ausblick

Durch pilzliche und bakterielle Pathogene werden weltweit große Ernteverluste verursacht, die derzeit im Wesentlichen nur durch den Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln gemindert werden können. Der Umsatz an Pflanzenschutzmitteln beträgt weltweit 29 Milliarden US-\$ und die eingesetzte Menge an Insektiziden und Fungiziden übersteigt 16.000 t. Trotz des Einsatzes dieser großen Mengen an Pflanzenschutzmitteln werden bei manchen Spezies wie Kartoffel und Reis mehr als 30% der Ernte durch Krankheiten und tierische Schädlinge vernichtet. Zudem wird davon ausgegangen, dass durch Pflanzenschutzmittelvergiftungen 2 Millionen Menschen erkranken und 40.000 davon sterben.

Die durchgeführten Arbeiten zeigen auf, dass der Kohlenhydratmetabolismus ein möglicher Ansatzpunkt zur Steigerung der pflanzeigenen Abwehrkräfte ist. Die Bedeutung der extrazellulären Invertase, als Schlüsselenzym bei der Versorgung mit Kohlenhydraten über den Apoplasten, wurde bei einem Pathosystem durch einen kausalanalytischen Versuchsansatz nachgewiesen: die Infektion von *A. thaliana* durch *P. syringae* wird durch Modulation der Invertaseaktivität beeinflusst.

Die Arbeiten wurden zunächst an dem genetisch sehr gut charakterisierten pflanzlichen Modellsystem *Arabidopsis thaliana* und Tomate als praxisrelevante Kulturspezies durchgeführt. Es ist zu erwarten, dass sich insbesondere die mit Tomaten erzielten Ergebnisse unmittelbar auf die verwandte, ebenfalls zu den Nachtschattengewächsen gehörige und in Bayern landwirtschaftlich sehr wichtige Kartoffel übertragen lassen. Zudem soll untersucht werden, inwieweit die erhaltenen Ergebnisse auf Mais als Modell für eine in Bayern relevante, einkeimblättrige Kulturpflanze übertragen werden können.

Das Verfahren der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung soll für eine Frühdiagnose von Infektionen auch unter Feldbedingungen adaptiert werden. Weiterhin soll untersucht werden, ob verschiedene Erreger die Fluoreszenz der Blätter jeweils spezifisch verändern

und sich so unterscheiden lassen. Dies könnte für die Praxis von Bedeutung sein: Rechtzeitig erkannte Infektionen bei Nutzpflanzen würden sich gezielt behandeln lassen, bevor die Krankheit fortschreitet, auf benachbarte Pflanzen übergreift und zu größeren Schäden führt.

Es ist zu erwarten, dass durch die Aktivierung von sich ergänzenden, endogenen Mechanismen zur Stärkung der Abwehrbereitschaft in Verbindung mit der Früherkennung von Pathogeninfektionen ein Beitrag geleistet werden kann, um auf die Anwendung umweltproblematischer, Boden und Trinkwasser belastender Pflanzenschutzmittel verzichten zu können oder zumindest deren Einsatz deutlich zu reduzieren.

Danksagung

Dieses Projekt wird im Rahmen des Förderschwerpunktes Gentechnik vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz finanziell gefördert. Für die kompetente Unterstützung bei der Bearbeitung des Projektes gilt der Dank den folgenden Mitarbeitern des Arbeitskreises: Susanne Berger, Andrea Gabler, Christine Hampp, Andreas Hauser, Sigrid Lux, Martina Papadopoulos und Sabrina Böhm. Wichtig für den Fortschritt des Projektes waren auch die konstruktiven Zusammenarbeiten mit Ladislav Nedbal, Nove Hradý (Tschechische Republik), Ulrich Schreiber, Würzburg und Steve Smith, Edinburgh (Grossbritannien).

Steigerung der natürlichen Abwehrkräfte in Maispflanzen

Regina Stefanek und Alfons Gierl
Lehrstuhl für Genetik, Technische Universität München, Am Hochanger 8,
85350 Freising

Eine charakteristische Eigenschaft von Pflanzen ist die Biosynthese von so genannten Sekundärmetaboliten. Primärmetaboliten stellen den Grundbestand des pflanzlichen Stoffwechsels und werden von allen Pflanzen gebildet. Sie sind essentiell für die Entwicklung und das Überleben der Pflanzen, im Gegensatz dazu kann die einzelne Pflanze den Verlust eines sekundären Metaboliten tolerieren. Es hat sich aber gezeigt, dass diese „sekundären“ Metaboliten innerhalb des Ökosystems ebenfalls von essentieller Bedeutung sind, weil sie wichtige Schutzfunktionen haben. Auf Sekundärmetaboliten basiert z. B. das gezielte Anlocken von Nutzinsekten durch Duft und Farbe, über ihre starke aber unterschiedliche Reaktivität bilden sie aber auch ein vielfältiges Arsenal in der chemischen Verteidigungsstrategie der Pflanzen. Im Pflanzenreich findet man rund 200.000 verschiedene Sekundäre Pflanzenstoffe. Oft werden Sekundärmetaboliten Spezies-spezifisch ausgeprägt, so dass eng verwandte Pflanzenfamilien ähnliche sekundäre Inhaltsstoffe aufweisen. Eine charakteristische Sekundärmetaboliten-Klasse der Gräser sind die Benzoxazinone mit den Hauptvertretern DIMBOA und DIBOA (2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-on, 2,4-Dihydroxy-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-on, Abb.1). Sporadisch finden sich DIBOA und DIMBOA aber auch bei einzelnen Vertretern in wenigen Familien der phylogenetisch weit entfernten dikotyledonen Pflanzen (Ranunculaceae: *Consolida orientalis*, orientalischer Rittersporn, Acanthaceae: *Aphelandra squarrosa*, Glanzkölbchen, Lamiaceae: *Lamium galabdolon*, Goldnessel; Abb. 2). Derzeit wird von uns untersucht, ob die Benzoxazinon-Biosynthese in den Gräsern und den dikotylen Pflanzen eine gemeinsame Wurzel haben oder unabhängig voneinander entstanden sind.

Die Bedeutung der Benzoxazinone DIMBOA und DIBOA als natürliche von den Gräsern gebildete Insektizide und Pestizide wurde in den 70er Jahren erkannt. Benzoxazinoide werden in der Pflanze als D-Glucoside gespeichert.

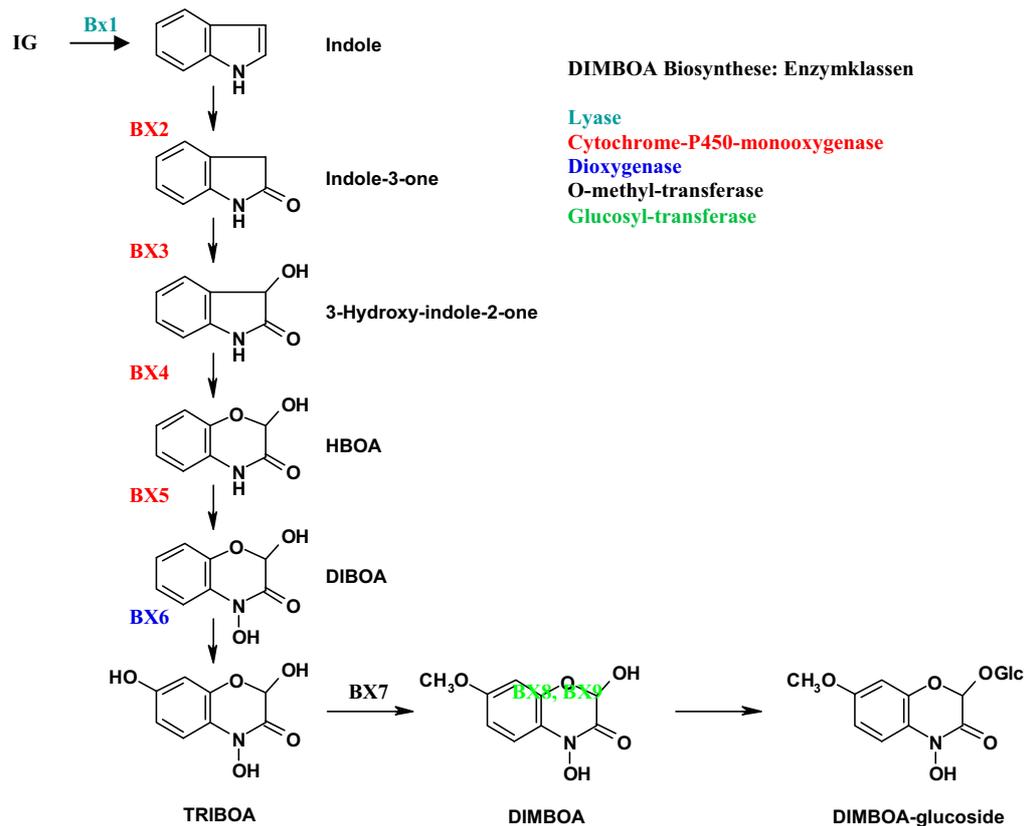


Abbildung 1: Biosyntheseweg der Benzoxazinoide in Mais. Die Gene *Bx1-Bx9* codieren die Enzyme, die ausgehend von Indol-3-Glycerinphosphat schrittweise die Synthese von DIMBOA-Glucosid katalysieren. Die Enzyme gehören fünf verschiedenen Klassen an.

Aktive Glucosidasen führen bei Verletzung des Gewebes zur Freisetzung des toxischen Aglucons. Benzoxazinoide sind ausgezeichnet durch ein Stickstoff-Atom im zyklischen Halbacetalring (s. Abb.1). Aus chemischer Sicht liegt hier der Ausgangspunkt von Instabilität, die chemische Reaktivität zur Folge hat. Diese ist notwendig für die Funktion in einem generellen oder „non-host“ Abwehrmechanismus. Man findet diese Sekundärmetaboliten bei den Nutzpflanzen Mais, Weizen und Roggen im Keimling und der jungen Pflanze. Wichtig ist insbesondere die Vermittlung einer pflanzeigenen, bisher ungebrochenen Resistenz der jungen Pflanze gegen den Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*). Dieser Befund hat dazu geführt, dass Hochleistungssorten von Mais mit einem hohen Gehalt von DIMBOA gezüchtet wurden. Neben der insektiziden und pestiziden Wirkung der Benzoxazinone haben sie auch allelopathisches Potential: sie werden über die Wurzel abgegeben und hemmen die Keimung umliegender Samen. Dieser Keimhemmung entgehen nur spezialisierte Unkräuter (Sicker et al., 2000).

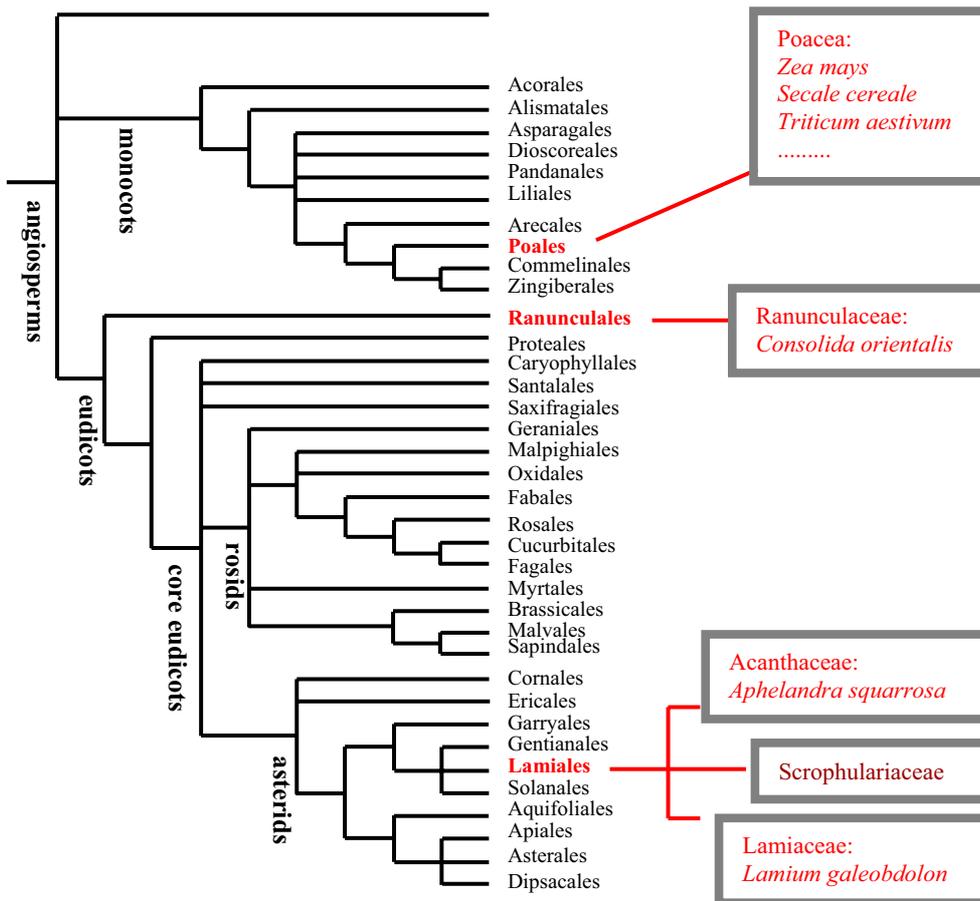


Abbildung 2: Verbreitung der Benzoxazinoide im Pflanzenreich.

Die Biosynthese der Benzoxazinone in *Zea mays* und *Hordeum lechleri* wurde in unserer Arbeitsgruppe aufgeklärt (Frey et al., 1997, Frey et al., 2002, Grün et al., 2005; Abb. 1). Am Anfang des Biosyntheseweges wird ein Abzweig vom Primärmetabolismus geöffnet. Dies geschieht durch ein Enzym (BX1), das mit hoher Effizienz Indol synthetisiert (Kulik et al., 2005). Der Ursprung des *Bx1*-Gens kann eindeutig auf ein Gen des Primärmetabolismus zurückgeführt werden, seine DNA- und Proteinsequenz weisen *Bx1* als einen Abkömmling der Alpha-Untereinheit der Tryptophansynthase (*TSA*) aus (Abb.3).

Dieses Gen der Aminosäurebiosynthese wurde im Laufe der Evolution dupliziert und modifiziert. BX1 setzt das Substrat Indol-3-glycerinphosphat zu Indol um.

Das von BX1 gebildete Indol wird durch modifizierende Enzyme, BX2-Bx9 in DIMBOA-Glucosid überführt.

Ein weiteres Maisgen, das induzierbare Gen *Igl*, stellt eine durch Duplikation und Modifikation von *TSA* entstandene Funktion dar (Abb. 3; Frey et al., 2000). Auch IGL katalysiert mit großer Effizienz die Bildung von Indol. IGL wird erst gebildet, wenn Fraß von Raupen an der Maispflanze vorliegt. Ein Inhaltsstoff des Raupenspeichels wird von der Pflanze erkannt und führt zur Aktivierung von Genen, u. a. von *Igl*, die die Synthese verschiedener flüchtiger Substanzen vermitteln. In diesem Fall werden die Sekundärmetaboliten als Duftstoffe zum Anlocken von Schlupfwespen benutzt. Die Schlupfwespen schädigen durch ihre Eiablage in die Raupen. Es liegt also eine Interaktion zwischen drei Lebensformen vor, der Pflanze, dem Pflanzenfresser und dem Schädling des Pflanzenfressers (Tritrophe Interaktion).

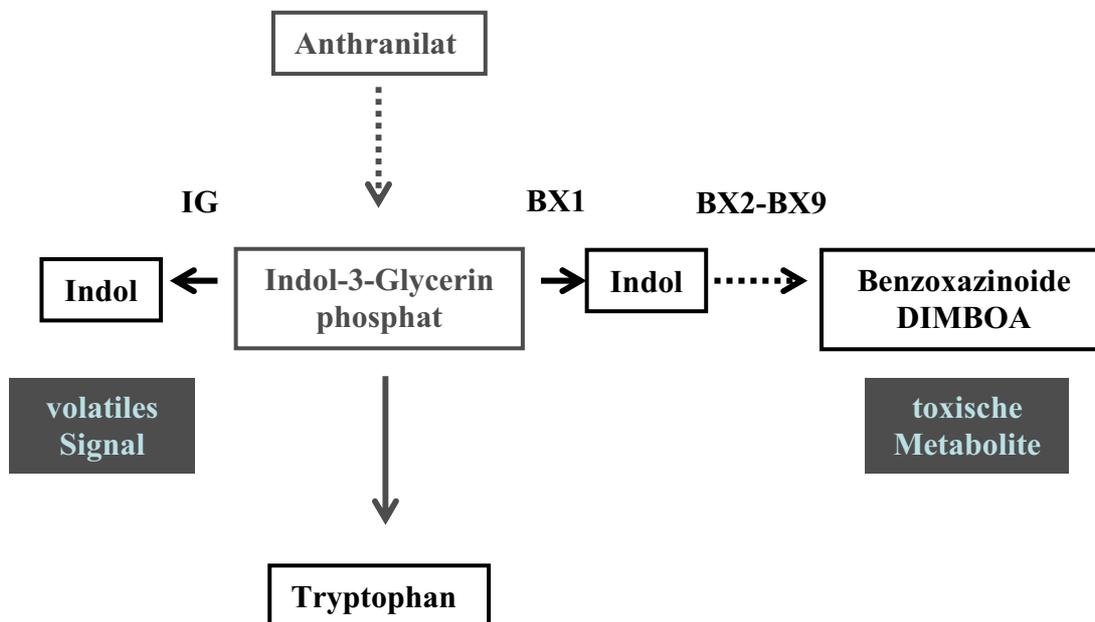


Abbildung 3: Mechanismus der Indolbildung und anschließende Biosynthesewege in Mais

Das Beispiel der Maisgene *Bx1* und *Igl* zeigt, dass die Bedeutung eines Gens für die Pflanze nicht allein in der Enzymfunktion begründet ist, sondern auch durch das Expressionsmuster bestimmt wird: *BX1* und *IGL* katalysieren dieselben Reaktionen (Abb. 3), *IGL* wird nur nach Befall durch Raupen gebildet, *BX1* ist entwicklungspezifisch aktiv im Keimling und in der jungen Pflanze (Abb.4), wo das Enzym den Ausgangsstoff für die Biosynthese des Insektizids und Pestizids DIMBOA liefert. In diesem zweiten Fall ist notwendig, dass die modifizierenden Enzyme, die Cytochrom-P450-Enzyme *BX2-BX5*, die

Dioxygenase BX6, die O-Methyltransferase BX7 und die Glucosyltransferasen BX8 und BX9 gleichzeitig gebildet werden. Diese Gene, die ganz unterschiedliche Typen von Enzymen codieren, müssen also gemeinsam reguliert werden.

Gene bestehen aus zwei funktionellen Einheiten: der codierenden Region, die in eine RNA umgeschrieben wird und der stromaufwärts davon gelegenen Kontrollregion (Promotor), die für eine „stimmige“ Expression der Gene sorgt. In der Promotorregion finden sich Sequenzmotive (*cis*-Elemente), die von regulatorischen Proteinen (Transkriptionsfaktoren) erkannt werden und an die diese binden. Die Bindung der Transkriptionsfaktoren kann die Expression des Gens fördern (Aktivator) oder vermindern (Repressor) (Abb.4). Unterschiedliche Gewebe und Entwicklungsstadien können einen unterschiedlichen Bestand dieser *trans*-Faktoren der Genregulation haben, dies führt zum spezifischen Expressionsmuster. Im Falle der DIMBOA-Biosynthese wird so z. B. die Expression der Gene *Bx1-Bx7* auf die Jugendstadien der Pflanze beschränkt. In der Folge lässt die pflanzeigene Schädlings- und Pathogenabwehr in der älteren Pflanze nach. Im Gegensatz dazu werden bei den Vertretern dikotyler Pflanzen, die diesen Stoffwechselweg ausprägen (*Aphelandra squarrosa*, *Consolida orientalis* und *Lamium galeobdolon*) Benzoxazinone auch in der adulten Pflanze in hohen Mengen gefunden (Schullehner und Gierl unveröffentlicht). Prinzipiell ist also die Benzoxazinon-Biosynthese für eine Pflanze in allen Entwicklungsstadien möglich. Eine Handhabe, den im Maiskeimling gegebenen endogenen Schutz durch DIMBOA auszudehnen, scheint daher durch Eingriff in die Regulation der *Bx*-Gene gegeben. Das Ziel dabei ist die Verlängerung der Expressionszeit der *Bx*-Gene. Bei der Durchführung dieses Ansatzes ergeben sich zwei Probleme: zum einen die Identifizierung der regulatorischen *cis*-Elemente und nachfolgend der an sie bindenden *trans*-Faktoren und zum anderen die Expression der Transfaktoren zum gewünschten Zeitpunkt in der Pflanze.

Die klassische Vorgehensweise zur Identifizierung von *cis*-Elementen im Promotor besteht in der Analyse von Reporter-Gen-Konstrukten (Abb. 4). Der stromaufwärts der untersuchten Gene gelegenen DNA-Bereich wird mit einer leicht zu identifizierenden Funktion verbunden. Standardmäßig wird hierzu das β -Glucuronidase Gen eingesetzt, das eine Farbreaktion vermittelt. Unterschiedliche Deletionsderivate des putativen Promotorbereiches werden in der transgenen Pflanze auf ihre Fähigkeit, eine Expression des Reportergens zu vermitteln, untersucht. Zunächst wird ein DNA-Bereich, der alle

notwendigen *cis*-Elemente enthält, mit dem Reporter gen fusioniert. Die Expression des *Gus*-Gens in diesem Ausgangskonstrukt entspricht dem des endogenen Gens, im speziellen Fall dem Muster der *Bx*-Gene.

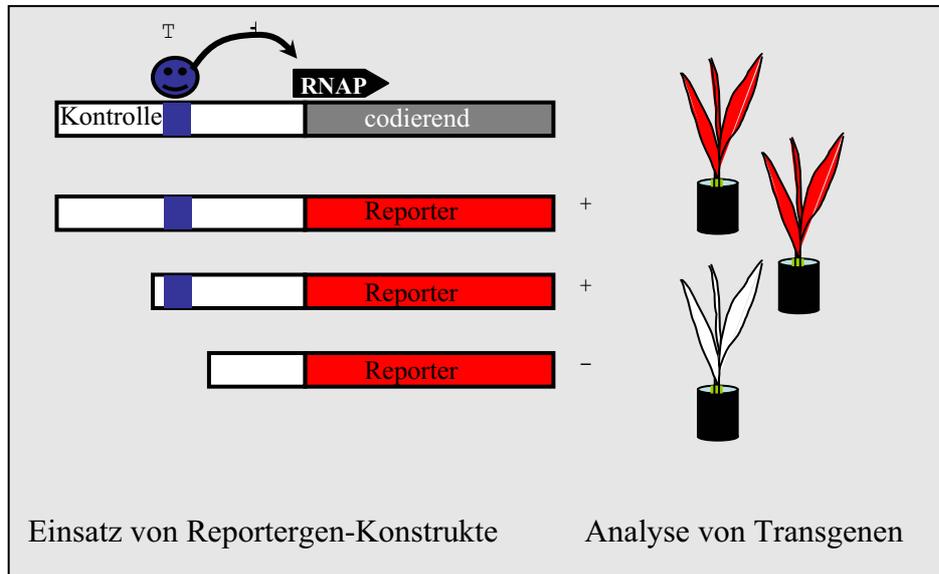


Abbildung 4: Das Prinzip der Reporter-Gen-Analyse. Die Promotorregion (weißer Balken) des untersuchten Gens wird mit dem Reporter gen (roter Balken) verbunden. Mit diesem Genkonstrukt werden transgene Pflanzen erzeugt. Die Promotorregion wird schrittweise verkürzt und die Deletionskonstrukte werden ebenfalls in transgenen Pflanzen analysiert. Ist die Bindestelle (blaue Box) eines Transkriptionsfaktors (TF) von der Deletion betroffen, ändert sich das Expressionsmuster des Reportergens in der transgenen Pflanze. RNAP: RNA-Polymerase

Bei den Deletionskonstrukten werden systematisch einzelne Bereiche des Promotors ausgelassen und die Konsequenz des Fehlens dieser Sequenz auf das Expressionsmuster analysiert. Wurden *cis*-Elemente deletiert, zeigt sich dies in veränderter *Gus*-Gen-Expression und damit ist die Bindestelle eines Transkriptionsfaktors identifiziert. Mit dieser Erkennungssequenz als Angel kann nun der Transkriptionsfaktor isoliert werden. Handelt es sich um einen generellen aktivierenden Transkriptionsfaktor, wird, wo und wann immer dieser in einer Zelle vorliegt, das durch ihn regulierte Gen oder die gemeinsam von diesem Transkriptionsfaktor regulierten Gene, ausgeprägt. Ein solcher genereller Transkriptionsfaktor, der alle Gene eines Biosyntheseweges reguliert, liegt z. B. mit dem Gen *C1* von Mais vor, das die Biosynthese von Anthocyanen reguliert.

Grundvoraussetzung für die Identifizierung von *cis*-Elementen der Genregulation mit Hilfe von Reporter-Gen-Konstrukten ist, dass diese im „homologen“ System untersucht werden können. Im Fall der *Bx*-Gene von Mais muss die Untersuchung also auch in Mais erfolgen,

denn nur in dieser Pflanze liegen die stimmigen Transkriptionsfaktoren vor. Transgene Maispflanzen, die die Reporter-gen-Konstrukte enthalten, müssen also erzeugt werden. Dies ist bei Mais wie bei allen monokotylen Pflanzen ein schwieriges und durch die Generationszeit von 6 Monaten langwieriges Verfahren. Ausgangspunkt sind unreife Embryonen, die präpariert und in Zellkultur genommen werden (Abb. 5). In der Zellkultur werden sie mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Einzelne transformierte Zellen werden in der Zellkultur selektiert und dazu angeregt, sich über verschiedene Stufen in somatische Embryonen zu differenzieren. Die Embryonen wachsen in der Kultur zu intakten Pflanzen heran. Die Untersuchung der ersten transgenen Pflanzen hat bereits Hinweise auf ein mögliches *cis*-Element im Promotor der *Bx*-Gene gegeben, das derzeit weiter untersucht wird.

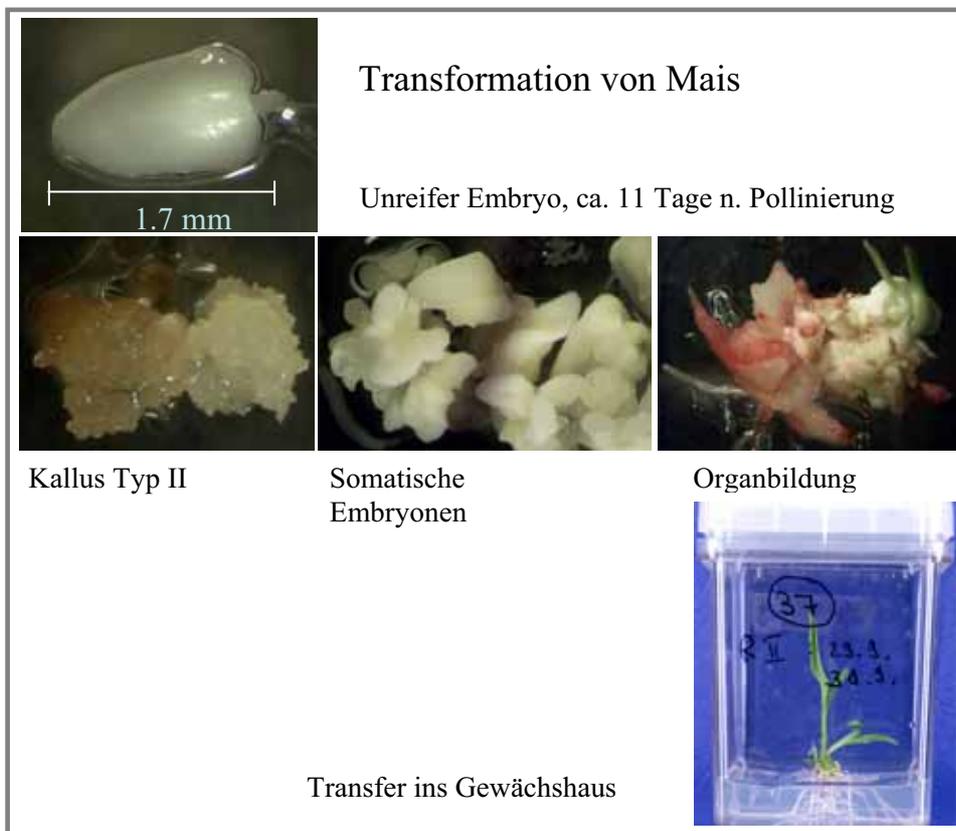


Abbildung 5: Erzeugung transgener Maispflanzen. Ausgangsmaterial sind unreife Embryonen, die aus dem Maiskorn präpariert und mit *Agrobacterium tumefaciens* inkubiert werden. Danach wird unterselektiven Bedingungen die Bildung von Kallus angeregt. Kallus vom Typ II bildet somatische Embryonen aus denen sich Maispflanzen bilden.

Die Identifizierung von *cis*-Elementen stellt - wegen der notwendigen technisch schwierigen und in jeder Hinsicht aufwändigen Erzeugung transgener Maispflanzen - die große Hürde in der Analyse dar. Dagegen kann bei der anschließenden Isolierung der

Transkriptionsfaktoren auf Standardtechniken der Molekularbiologie zurückgegriffen werden. Wiederum in der transgenen Pflanze muss ein „Proof of Concept“ erfolgen: es muss untersucht werden, ob die Überexpression des Transkriptionsfaktors auch zur Überexpression der *Bx*-Gene führt, der Transkriptionsfaktor also ein „Master-Gen“ des Stoffwechselwegs darstellt. In diesem Fall kann in zwei Richtungen weitergearbeitet werden, um die endogene Resistenz der Pflanze zu steigern: Ein geeigneter Promotor kann zur Expression des Master-Gens und damit zur Steuerung des ganzen Stoffwechselweges eingesetzt werden. Dies könnte ein durch Verwundung induzierbarer Promotor sein. Die zweite Möglichkeit besteht in der Unterstützung der konventionellen Züchtung dadurch, dass das Mastergen molekular im Züchtungsvorgang verfolgt werden kann (Molekulare Kartierung). Für alle Getreide die Benzoxazinone synthetisieren wurde gezeigt, dass die Enzym-codierenden Gene einen gemeinsamen Ursprung haben und dass ihr Expressionsmuster weitgehend identisch ist. Es ist daher sehr wahrscheinlich dass auch eine Übereinstimmung in den regulatorischen Elementen vorliegt und die in Mais erzielten Ergebnisse auch auf Weizen und Roggen übertragbar und anwendbar sind.

Literatur

Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grun, S., Winklmaier, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R.B., Briggs, S.P., Simcox, K., Gierl, A. 1997. Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 277, 696-699.

Frey, M., Stettner, C., Pare, P. W., Schmelz, E. A., Tumlinson, J. H., Gierl, A. 2000. An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14801-14806.

Frey, M., Huber, K., Park, W. J., Sicker, D., Lindberg, P., Meeley, R.B., Simmons, C.R., Yalpani, N., Gierl, A. 2002. A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase is integrated in DIMBOA-biosynthesis. *Phytochemistry* 62, 371-376.

Grün, S., Frey, M., Gierl, A. 2005. Evolution of the indole alkaloid biosynthesis in the genus *Hordeum*: distribution of gramine and DIBOA and isolation of the benzoxazinoid biosynthesis genes from *Hordeum lechleri*. *Phytochemistry* 66, 1264-72

Kulik V, Hartmann E, Weyand M, Frey M, Gierl A, Nicks D, Dunn MF, Schlichting I. 2005. On the structural basis of the catalytic mechanism and the regulation of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium* and BX1 from maize, two evolutionarily related enzymes. *J Mol Biol* 352, 608-20

Sicker, D., Frey, M., Schulz, M., Gierl, A., 2000. Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. *Int Rev Cytol* 198, 319-346.

Aufklärung von Abwehrreaktionen ausgewählter Kulturpflanzen

T. Fischer, B. Deiml, I. Puhl, J. Pfeiffer, S. Rühmann, T. Strissel,
D. Treutter, G. Forkmann
Lehrstuhl für Zierpflanzenbau und Gartenbauliche Pflanzenzüchtung und
Fachgebiet Obstbau der Technischen Universität München,
Wissenschaftszentrum Weihenstephan

Biochemische und molekulare Mechanismen der Induktion von Abwehrreaktionen sollten an ausgewählten Kulturpflanzen aufgeklärt und ihre Anwendung für den Pflanzenschutz geprüft werden. Es wird damit ein mittelfristiges Ziel verfolgt, solche Pflanzenschutzverfahren zu optimieren, die auf der Stärkung von Pflanzenabwehrkräften beruhen.

Vielfach beruht die Resistenz von Pflanzen auf Sekundärstoffen, wobei Phenylpropanoide und Flavonoide bei vielen Kulturpflanzen eine große Rolle spielen. Es wurde deshalb versucht, die Induktion der Resistenz durch vorübergehende Beeinflussung des Sekundärstoffwechsels herbeizuführen. Wichtiges Kriterium für die Auswahl der Pflanzen war deren Fähigkeit zur Bildung der relevanten Phenylpropanoide und Flavonoide.

Ins Auge gefasst wurde die Abwehr folgender Krankheiten: Feuerbrand und Schorf an Apfel und Birne, Grauschimmel an Weinrebe und Erdbeere, Sternrußtau an Rosen und Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel. Von den entsprechenden Pathogenen konnte aufgrund von eigenen Vorarbeiten bzw. von Literaturhinweisen auf eine Sensitivität gegenüber phenolischen Verbindungen geschlossen werden

Es wurden umfangreiche Einzel- und Kombinations-Behandlungen der zu untersuchenden Nutzpflanzen Erdbeere, Wein, Apfel, Birne, Kartoffel und Rose mit Prohexadion-Ca[®], mit den Pflanzenstärkungsmitteln Myco-Sin[®] und Milsana[®] sowie mit am FG Obstbau isolierten epiphytischen Hefen (*Aureobasidium pullulans*) durchgeführt. Vielversprechend sind Pilotuntersuchungen zur induzierenden Wirkung weiterer, bislang wenig beachteter Pflanzenstärkungsmittel mit Cytokinin als Wirkstoff.

Grundlegende Erkenntnisse (Molekularbiologie, Gentechnik):

Basierend auf GenBank-Sequenzinformationen wurden die Apfel Anthocyanidinreductase und Leucoanthocyanidinreductasen kloniert, heterolog exprimiert und werden zur Analyse der Biosynthese der Resistenzfaktoren Epicatechin, Catechin und Proanthocyanidine benutzt.

Transgene Kartoffellinien mit dem Apfel-DFR/FNR-Gen zeigen die entsprechende Enzymaktivität, sie bilden die Grundlage für eine Resistenz-Strategie über 3-Deoxyflavonoide, wie für den Apfel und die Birne publiziert.

Es gelang der Nachweis der Transkriptionsaktivierung der Stilbensynthese von Weingewebekulturen durch Hefepräparate auf Ebene der Genexpression, Enzymaktivität und des Stilbengehaltes. Damit sind ein Wirkungsmechanismus und der Wirkungsnachweis eines Pflanzenstärkungsmittels (Myco-Sin[®]) auf molekularer Ebene geklärt. Zudem wurden die Gene der Wein Anthocyanidinreductase und Leucoanthocyanidinreductasen nach GenBank-Sequenzinformationen kloniert, heterolog exprimiert und in ihrer Funktion bestätigt.

Mit der Klonierung der vollständigen cDNA der Flavonolsynthese, der Leucoanthocyanidinreductase (LAR) sowie der Anthocyanidinreduktase (ANR) liegen drei neue cDNA-Klone von polyphenolbildenden Enzymen der Erdbeere vor. Flavonolsynthese (FLS) und Leucoanthocyanidinreductase wurden bereits heterolog exprimiert und in ihrer Funktion bestätigt.

Die Aktivität der LAR in Erdbeeren zeigt einen unerwarteten Anstieg in reifen Früchten während die Konzentrationen der Produkte Catechin und Proanthocyanidin mit zunehmender Fruchtreife abnehmen. Durch Prohexadion-Ca-Behandlung kann die Aktivität dieses Enzyms zusätzlich gesteigert werden. Die biologische Funktion dieser späten, erhöhten LAR-Aktivität ist noch unklar.

Umwelteinflüsse auf den abwehrrelevanten Flavonoidstoffwechsel

Die Beeinflussung des Flavonoidstoffwechsels durch Umweltfaktoren konnte am Beispiel der Stickstoffversorgung von Apfelbäumen erstmals demonstriert werden. Die bei exzessiver Stickstoffdüngung abgeschwächte Induzierbarkeit und höhere

Schorfanfälligkeit lässt sich insbesondere auf eine geringere Aktivität des Schlüsselenzyms Phenylalanin-Ammonium-Lyase zurückführen.

Die Untersuchungen zum Stickstoffeinfluss zeigten, dass eine Beeinflussung der Flavonoid-Biosynthese auf mehreren Ebenen möglich ist, nämlich auf der Stufe des Substratangebots, der Regulierung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel und auch auf Ebene der Enzymaktivitäten.

Die Induktion der Flavonoid-Biosynthese ist durch die Stickstoffversorgung ebenfalls maßgeblich beeinflusst. So zeigten sich in der luxuriösen Stickstoffstufe N3 bereits geringere konstitutive Enzymaktivitäten; zusätzlich war bei diesen Bäumen auch das Induktionspotential der Flavonoid-Biosynthese deutlich schwächer.

Wirkung von Pflanzenstärkungsmitteln und Bioregulatoren

Die durch Prohexadion-Ca vermittelte Hemmung der Flavanon 3-hydroxylase konnte bei allen untersuchten Kulturpflanzen gefunden werden, die weiteren Auswirkungen auf den Flavonoidstoffwechsel waren dagegen unterschiedlich.

Beim Apfel wurde zusätzlich eine gesteigerte Expression des Gens für Phenylalanin-Ammonium-Lyase nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca gefunden (Abb. 1).

Nach Behandlung mit MycoSin zeigten insbesondere die Schlüsselenzyme PAL (Phenylpropanoid-Stoffwechsel) und CHS/CHI (Flavonoid-Stoffwechsel) teilweise sehr deutliche Induktionen, die auch zur Akkumulation von Phenylpropanoiden beitragen.

Die Polyphenolbiosynthese der Birne ist der des Apfels recht ähnlich, insbesondere was die Auswirkungen einer Behandlung mit Prohexadion-Ca betrifft. Mycosin-Applikationen führten zu einer Abnahme der Konzentrationen der Gesamtphenole.

Auch die Rose bildet die Resistenz-vermittelnden 3-Deoxyflavonoide nach Prohexadion-Ca[®]-Behandlung. Das Pflanzenstärkungsmittel Milsana[®] bewirkt eher eine Abnahme der Flavonoid-Konzentration.

Die Behandlung von Kartoffel-Blättern mit dem Wachstumsregulator Accel führte zu einer Akkumulation von Quercetin-Derivaten. Der induzierende Effekt cytokininhaltiger Pflanzenstärkungsmittel bietet eine zusätzliche Möglichkeit der Stimulation der Flavonoidbiosynthese über die Kartoffel hinaus auch bei den anderen untersuchten Pflanzen.

Auch bei Blättern der Rebe entfaltet Prohexadion-Ca seine typische Wirkung auf den Flavonoidmetabolismus, was sich einerseits in der Reduktion der Flavonolkonzentration und andererseits in der Akkumulation der Flavanone (Eriodictyol 7-glucosid, Pentahydroxyflavanon-glucosid, Pentahydroxyflavanon) zeigt (Abb. 2). Nicht vorhersehbar war aber die deutliche Anreicherung von Catechin. Dieses ist insofern unerwartet, als die Hemmung des Enzyms FHT gerade auch die Biosynthese der Flavan-3-ole (Catechin, Proanthocyanidine) unterbinden sollte. Möglicherweise liegt als zusätzlicher Effekt der Behandlung eine allgemeine Stimulation der Phenylpropanoid- und Flavonoidbiosynthese vor (vgl. Genexpressionsstudie beim Apfel). Zudem werden mit der FLS und ANS konkurrierende Biosynthesen gehemmt. Im Gegensatz zu Erdbeere, Apfel und Birne reichern sich in Blättern der Rebe zusätzlich die Flavanone Pentahydroxyflavanon und Pentahydroxyflavanon-glucosid an. In den behandelten Beeren war die Flavanon-Anreicherung deutlich, dagegen konnte bisher kein Luteoliflavan gefunden werden. Trotzdem wurde ein tendenziell reduzierter *Botrytis*-Befall beobachtet. Die für Apfel und Birne postulierte Beteiligung der 3-Deoxyflavanole an der Abwehr von Feuerbrand und Schorf scheint demnach bei den Weinbeeren nicht zuzutreffen. Unter Umständen sind in Beeren die akkumulierenden Flavanone oder Catechine für die *Botrytis*-Abwehr verantwortlich.

Bezüglich der Genexpression konnte mit den optimierten qPCR-Methoden bei den mit Prohexadion-Ca, Mycosin, Milsana und Kombinationen hiervon behandelten Blättern deutliche Effekte festgestellt werden. Sowohl bei 'Regent' als auch bei 'Müller-Thurgau' wurde die Expression der Stilbensynthase durch Prohexadion-Ca stark stimuliert. Bei der Kombination von Prohexadion-Ca mit Pflanzenstärkungsmitteln ist dieser Effekt sogar noch stärker. Die anderen untersuchten Gene *pal*, *chs* und *anr*, sowie die Kontrollgene *gapdh* und *tubulin* dagegen blieben unverändert.

Bei Kalluskulturen von *Vitis vinifera* konnte durch Behandlung mit Hefepräparaten eine deutliche Induktion des Phenylpropanoidstoffwechsels festgestellt werden, die sich in Form einer signifikanten Akkumulation der Stilben-Phytoalexine zeigte. In den Blättern waren grundsätzlich keine Stilbene nachzuweisen. Neben den Hefebehandlungen stimulierten zumindest bei der Sorte 'Regent' auch Mycosin und das Cytokininpräparat Accel die Flavonoidbiosynthese. Infektionsversuche mit *Botrytis* zeigten, dass die *Aureobasidium*-Hefe die Symptomentwicklung der Kalli deutlich verzögern kann. Die Analyse der Inhaltsstoffe ergab in Kalluskulturen eine deutliche Erhöhung der Stilben-

Phytoalexine durch die Behandlungen mit *Aureobasidium*-Hefe, durch Mycosin und durch den Hefebestandteil des Mycosins.

Relevanz in Bezug auf praktische Pflanzenschutzmaßnahmen

Der für Apfel und Birne bereits bekannte Einsatz von Prohexadion-Ca gegen Feuerbrand und Schorf konnte bestätigt und durch den Effekt auf den Flavonoidstoffwechsel untermauert werden. Die Vermutung, dass sich die in der Praxis auftretenden wechselnden Wirkungsgrade auf umweltbeeinflusste Leistungsfähigkeit des Sekundärstoffwechsels zurückführen lassen, konnte bestätigt werden.

Bei der Erdbeere zeigten die Studien der Entwicklungsstadien der Blüten und Früchte, dass zum Zeitpunkt der Infektion durch *Botrytis cinerea* in den jungen Blüten noch keine Phenylpropanoid- und Flavonoidbiosynthese erfolgt. Die in den Experimenten getesteten Induktoren, die offenbar nur bereits aktivierte Stoffwechselwege stimulieren können, waren deshalb wirkungslos im Sinn eines Schutzes der Pflanze vor dem Grauschimmel.

Die Biosynthese der Flavanole (Abb. 3) setzte bei sich wölbendem Blütenboden ein und erreichte ein Maximum in kleinen grünen Früchten. Die Konzentrationen der Flavanole nahmen dann bis zum Ausbruch der Grauschimmel-Krankheit bei reifen Früchten ab. Die Strategie, die Resistenz der Erdbeere gegen *Botrytis cinerea* durch Erhöhung der Flavanol-Konzentration in reifen Früchten zu erreichen (auf dem Weg der Züchtung, Gentechnik oder Kulturmaßnahmen), erscheint also nicht ausreichend. In dieser Hinsicht zielführend wäre vermutlich, jungen Blüten/Früchten die Biosynthese von Catechin „beizubringen“ und so frühzeitige Infektionen der jungen Blüten zu verhindern. Das wäre mit der klonierten Erdbeer-LAR unter Kontrolle eines Blüten-Promotors möglich. Die Einführung eines entsprechenden Regulatorgens, das die Flavonoid-Biosynthese entwicklungsabhängig steuert, wäre ein anderer denkbarer Lösungsansatz.

Bei der Weinrebe konnte in einem Experiment nach Behandlung mit Prohexadion-Ca ein verringerter Befall der Beeren mit dem Grauschimmel beobachtet werden. Der Effekt des Bioregulators auf den Gibberellin-Haushalt macht jedoch seinen Einsatz in der Praxis aufgrund der negativen Auswirkungen auf Ertrag und Traubenstruktur fraglich.

Während Prohexadion-Ca an spezifischen Stellen der Flavonoidbiosynthese eingreift, wurde versucht, mit dem Pflanzenstärkungsmittel MycoSin und dem Phytohormonpräparat Accel, den Sekundärstoffwechsel allgemein und unspezifisch zu stimulieren. Das konnte zwar in einigen Experimenten bestätigt werden, dennoch ist die Zuverlässigkeit und der Wirkungsgrad für eine praktische Anwendung im Erwerbsobstbau gegenwärtig zu unsicher.

Mit dem molekularbiologisch, enzymologisch und analytisch aufgeklärten Wirkungsmechanismus des Hefebestandteiles des Pflanzenstärkungsmittels Myco-Sin[®] sowie mit eigenen epiphytischen Hefeisolaten wird der verstärkte Einsatz untoxischer Pflanzenschutzmittel vorangetrieben. Für die Hersteller Hefe-basierender Pflanzenstärkungsmittel besteht nun zudem die Möglichkeit zur Produktneu- oder weiterentwicklung mit wirksameren Hefebestandteilen. Darüber hinaus bestehen nun mit der Klonierung der neuen Wein- und Erdbeergene neue Analyse- und Züchtungsmöglichkeiten mit gentechnologischen Ansätzen.

Danksagung:

Die Autoren danken dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz für die finanzielle Unterstützung (Nr. 76c-8793-2003/10)

Abb. 1: Prohexadion-Ca-Effekte auf die Flavonoidbiosynthese des Apfels

- X Enzyminhibition
- neue Biosynthesen
- veränderte Genexpression

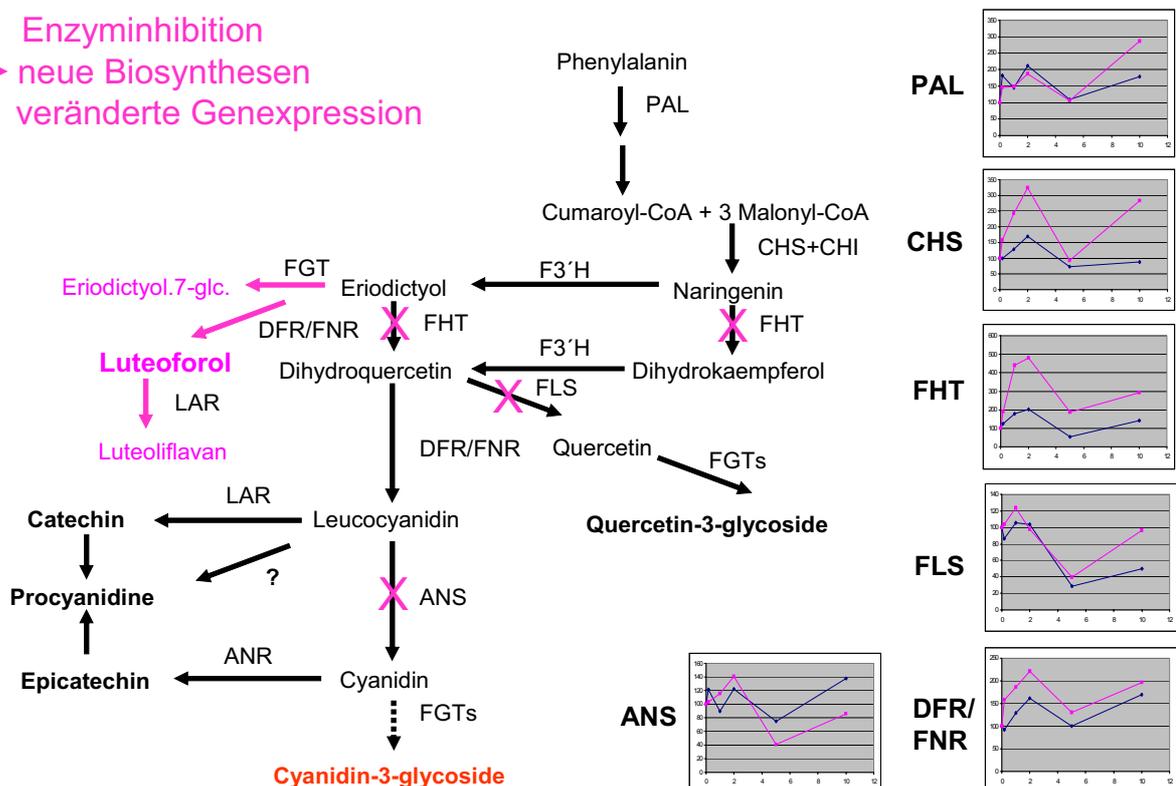


Abb. 2: Flavonoidbiosynthese der Weinrebe

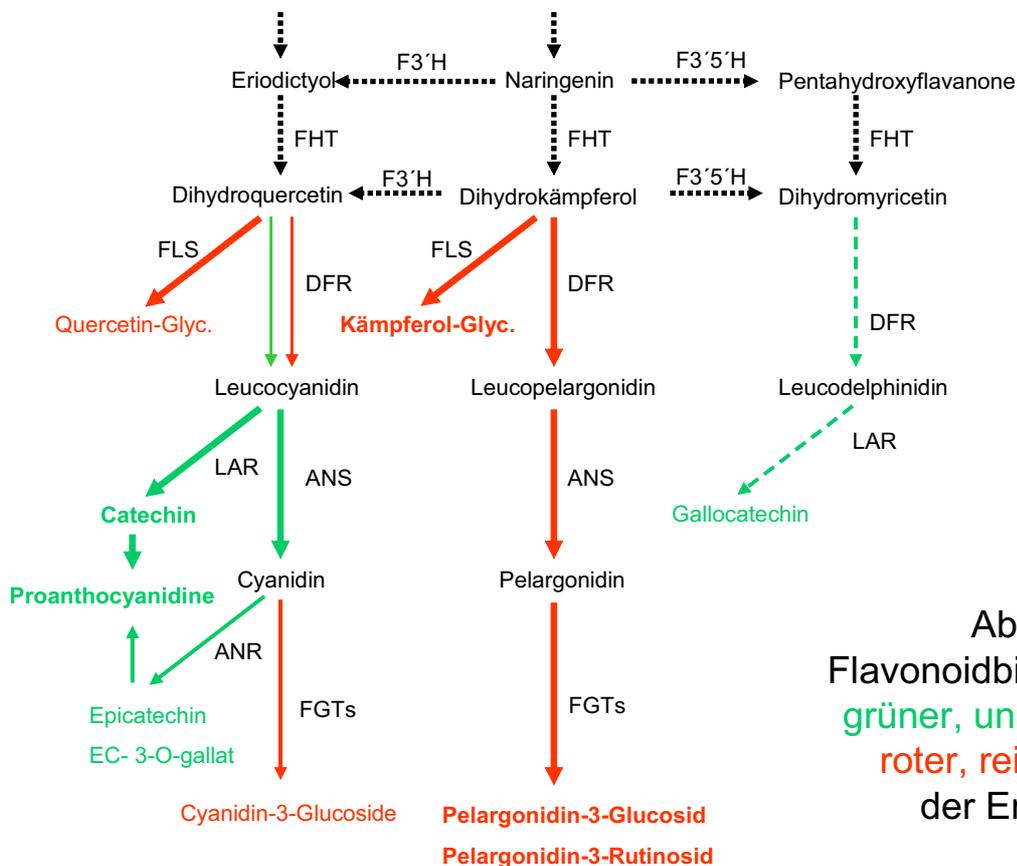
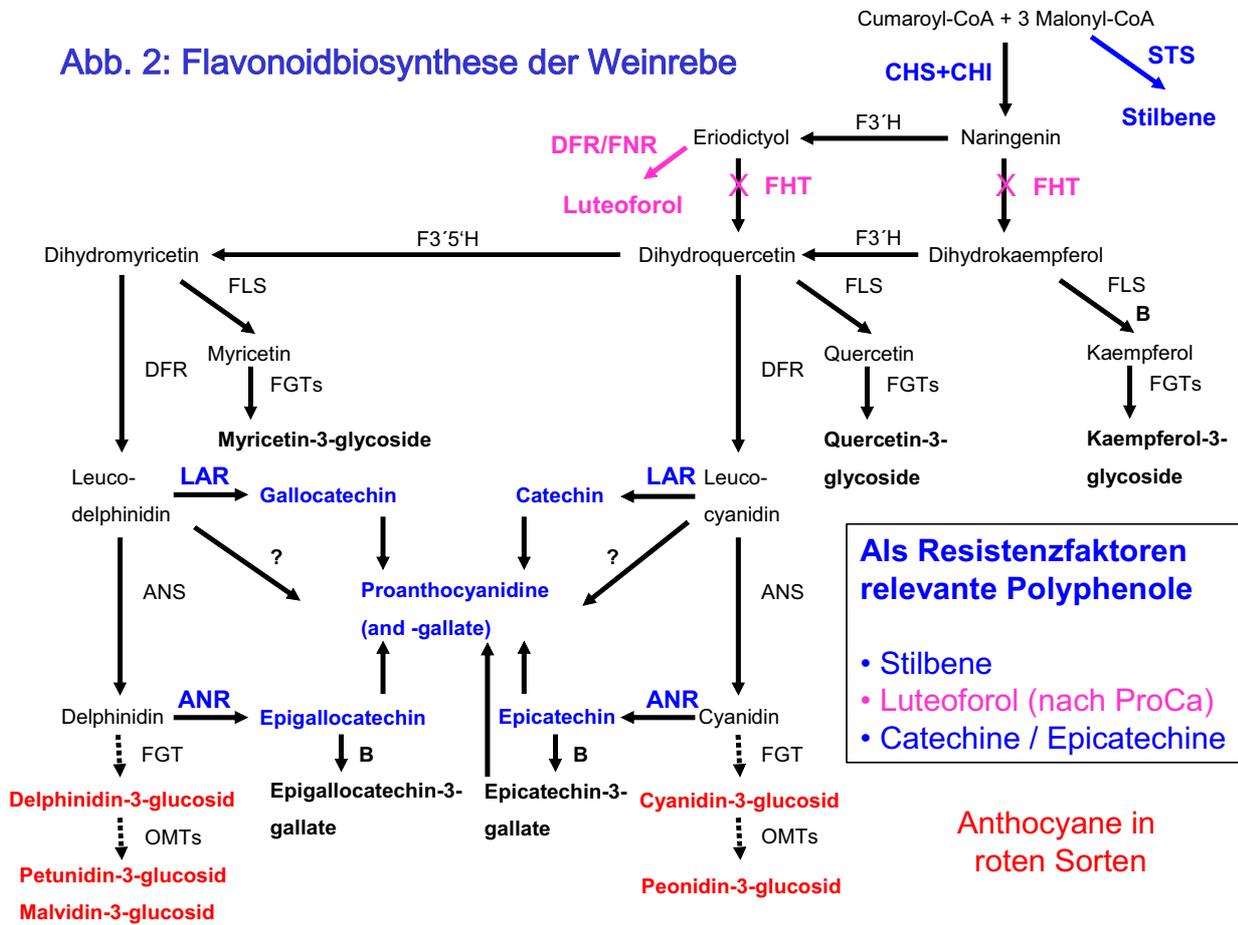


Abb. 3:
Flavonoidbiosynthese in
grüner, unreifer Frucht
roter, reifer Frucht
der Erdbeere

Sicherheit, pathogene Schadinsekten, Artenschutz

Methoden zur Erfassung pathogener Schadinsekten Darstellung der Ausbreitung von Buchdruckerpopulationen (*Ips typographus* L.) mittels populationsgenetischer Methoden

B. Stoeckle¹, A. Gruppe² und R. Kühn¹

Technische Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan

¹Fachgebiet für Wildbiologie und Wildtiermanagement

²Lehrstuhl für Tierökologie

Einleitung

Vor allem die Sturmereignisse „Wiebke“, „Vivian“ und „Lothar“ führten in den letzten Jahren zu Massenvermehrungen des Buchdruckers (*Ips typographus* L.). Eine effektive Bekämpfung bei Massenvermehrungen dieses Borkenkäfers ist gegenwärtig nur durch den Einschlag und den Abtransport bereits befallener Bäume möglich. Die direkte Bekämpfung des Buchdruckers mit Lockstofffallen ist aufgrund der geringen Fangquote von 3-10 % der Fangeinrichtungen (WERMELINGER 2004) derzeit nur eingeschränkt durchführbar.

Zielsetzung und Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von Methoden zur Darstellung der genetischen Struktur von Borkenkäferpopulationen (*Ips typographus*), die Darstellung der Kolonisierungsprozesse bei massenhaftem Auftreten dieses Schadinsekts sowie die Erfassung der Faktoren, die zu diesen Strukturen führen.

Die Betrachtung und das Verständnis dieser Faktoren tragen dazu bei, die Ausbreitung von Käferpopulationen abzuschätzen und Bekämpfungsmaßnahmen zu optimieren.

Es wurden folgende Teilziele verfolgt:

Etablierung einer Extraktionsmethode zur gleichzeitigen molekular-genetischen, biochemischen und gaschromatographischen Analyse eines Individuums

Etablierung nicht selektiver genetischer Marker auf DNA-Ebene
(Mikrosatelliten)

Etablierung selektiver genetischer Marker auf DNA- und Isoenzym-Ebene

Darstellung der genetischen Strukturen von Käferpopulationen

Charakterisierung des Dispersionsverlaufs und der darauf folgenden Kolonisierung neuer Habitats an frontartig verlaufenden Befallslinien

Verifizierung der Funktion von Aggregationspheromonen (cis- und trans-Verbenol) im genetischen Strukturierungsprozess von Borkenkäfer-populationen

Probennahmekonzept und Probennahme

Zur Erfassung des Dispersionsablaufs und zur Darstellung der genetischen Struktur von Borkenkäferpopulationen, sowie zur Verifizierung der These, dass die Kolonisierung von Habitats durch den Buchdrucker mittels Windverdriftung erfolgt, wurde im Rahmen dieses Projektes ein Probennahmekonzept entwickelt. Dieses beinhaltet sowohl die Probennahme in Käferlöchern als auch den Fang und die Entnahme von Käfern aus Bäumen an einer frontartig verlaufenden Befallslinie.

Während des Spätsommers 2003 wurden in zwei Gebieten aus verschiedenen „Käferlöchern“ Borkenkäfer entnommen. Kurz vor Beginn der Käferschwärmphase 2004 wurden in östlicher (Hauptwindrichtung) und nordöstlicher Richtung zu den Probennahmeflächen des Jahres 2003 acht Insektenfallen (Fensterfallen) aufgestellt (Abb. 1). Die Fangeinrichtungen wurden am östlichen Rand der 2003 entstandenen, von Süd nach Nord verlaufenden Befallsfront in zwei Reihen mit je vier Fallen aufgebaut. Zwischen April und Juli 2004 wurden die Fallen regelmäßig fängisch gestellt und entleert. Während der schwärmaktiven Phase 2004 etablierte sich eine neue Befallsfront, die sich Anfang Juli innerhalb der ersten und zweiten Fallenreihe befand und in etwa parallel zu den beiden Reihen verlief (Abb. 1). Zur genetischen Erfassung der entstandenen Populationsstrukturen in der Befallsfront, sowie innerhalb von Brutsystemen wurden aus 44 Bäumen innerhalb der neuen Befallsfront Borkenkäfer entnommen. Zur Charakterisierung der ersten Jungkäfergeneration (F1) wurden die Fallen der ersten Fallenreihe Ende Juli 2005 östlich der zweiten Fallenreihe aufgestellt und zwischen Juli und September regelmäßig fängisch gestellt und entleert (Abb. 1).

Die Probennahme fand im östlichen Teil des Nationalparks Bayerischer Wald statt. Die Gesamtprobenzahl betrug ca. 4000.

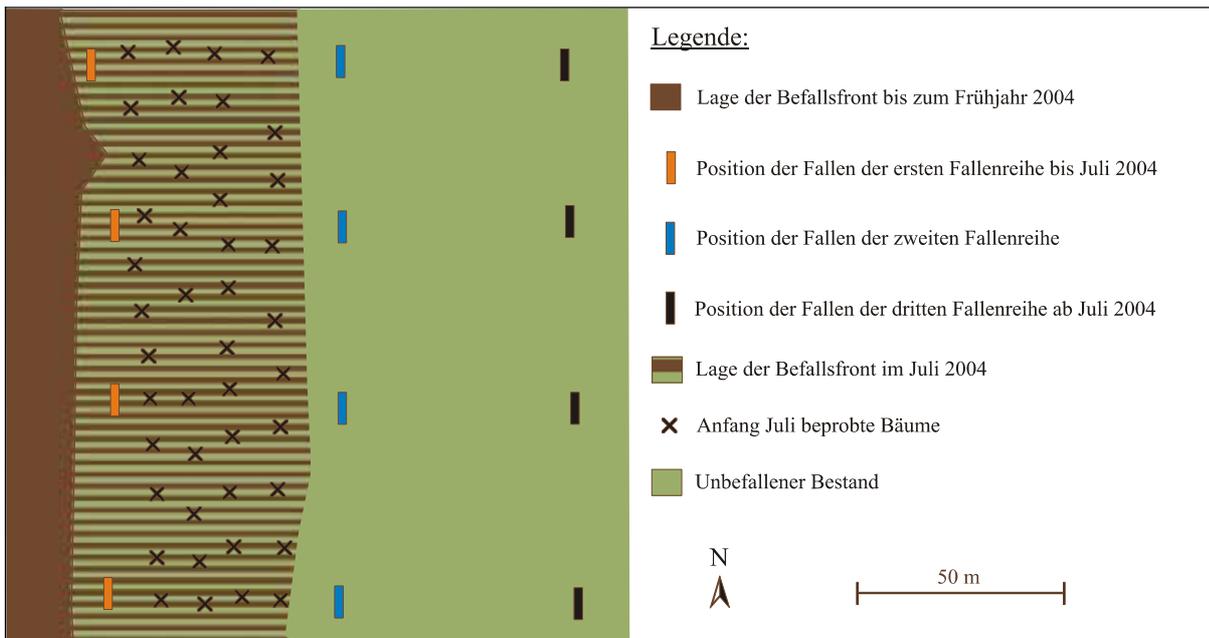


Abb. 1: Lage der aufgestellten Insektenfallen und der im Juli 2004 beprobten Bäume im Fanggebiet, sowie die Entwicklung der Befallsfront im Jahr 2004

Ergebnisse und Diskussion

DNA,- Allozym- und Verbenol-Extraktion

Um Borkenkäfer sowohl genetisch zu untersuchen als auch deren Pheromonbukett zu analysieren, wurde im Rahmen dieses Projektes eine Methode entwickelt, um beide Analysen an einem Individuum vornehmen zu können. Für die Verbenolextraktion wurde jedem einzelnen Insekt das Abdomen unter dem Binokular entfernt und im Ultraschallbad extrahiert. Die anschließende Identifizierung von cis-Verbenol und trans-Verbenol erfolgt durch Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie. Die DNA-Präparation aus den verbleibenden Käferresten wird nach einer modifizierten Methode von HOGAN et al. (1986) durchgeführt. Die Probenvorbereitung für die Enzymanalyse erfolgt nach LIEPOLD (2003).

Mikrosatellitengenotypisierung:

Im Rahmen dieser Studie wurden sieben polymorphe Mikrosatellitensysteme für *Ips typographus* etabliert (Tab. 1).

Tab. 1: Etablierte Mikrosatelliten-Systeme für *Ips typographus*, Primersequenzen, Annealingtemperaturen, Allellängen und die Heterozygotiegrade (H_e , H_o) der Loci

System	Primersequenz forward	Primersequenz reverse	H_e	H_o	Annealing (°C)	Länge (bp)
ITG48	AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	AGCTGGGAATATAACCAAAGG	0,81	0,78	55	189-217
ITG84	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG	GTTAACGAGTGTCTAGTTGGCTGTG	0,79	0,69	55	248-276
ITGAA3F10	AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCA	GGACCAGATCGTAAAAGGCATAG	0,46	0,31	50	146-154
ITGAA4C3	CTGCAGTTCTGCATATGTGG	ACACGGAAGCGATCTAAACG	0,28	0,33	53	137-155
ITGAA5D8	AAATGACCTCTCAATGGAAGCTTG	GAATTCTGGCACTTAATAGGATTCA	0,85	0,84	52	124-148
ITGT434	AGAGCCACTTGTACACCCCAAAG	GATGCAGTCTCCACTTGATTCAAA	0,65	0,45	55	194-200
ITGT1B6	GTCACAGGTGGCAATCTATC	TGTTTTAAGCCACCCAATTATTG	0,54	0,40	51	214-238

Um erste Erkenntnisse über die Dispersionsprozesse und die genetische Struktur von Borkenkäferpopulationen zu gewinnen, wurden unter Verwendung aller sieben Marker-Systeme 650 Borkenkäfer genotypisiert. Genetisch analysiert wurden sowohl die Proben zweier Käferlöcher (2003 Nord und 2003 Süd) als auch sämtliche im Frühjahr 2004 in der ersten Fallenreihe gefangenen Borkenkäfer (Abb. 2). Anfang Juli 2004 etablierte sich hinter der ersten Fallenreihe eine neue Befallsfront. Um die entstandene Populationsstruktur genetisch zu charakterisieren, wurden die Individuen aus 29 Brutsystemen von zehn beprobten Bäumen dieser Befallslinie typisiert (Abb. 2).

Genetische Populationsstruktur:

Zur Darstellung der genetischen Populationsstruktur der bisher analysierten Borkenkäfer wurden alle untersuchten Borkenkäfer entsprechend ihres Probennahme- bzw. Fangortes zu „Populationen“ zusammengefasst. Anhand dieser Gruppierung wurde ein *UPGMA* - Dendrogram (Unweighted Pair Group Methode Average; SOKAL und SNEATH 1963) konstruiert und über bootstrapping abgesichert (Abb. 3). Hierfür wurde die Software *DISPAN* (OTA 1993) verwendet.

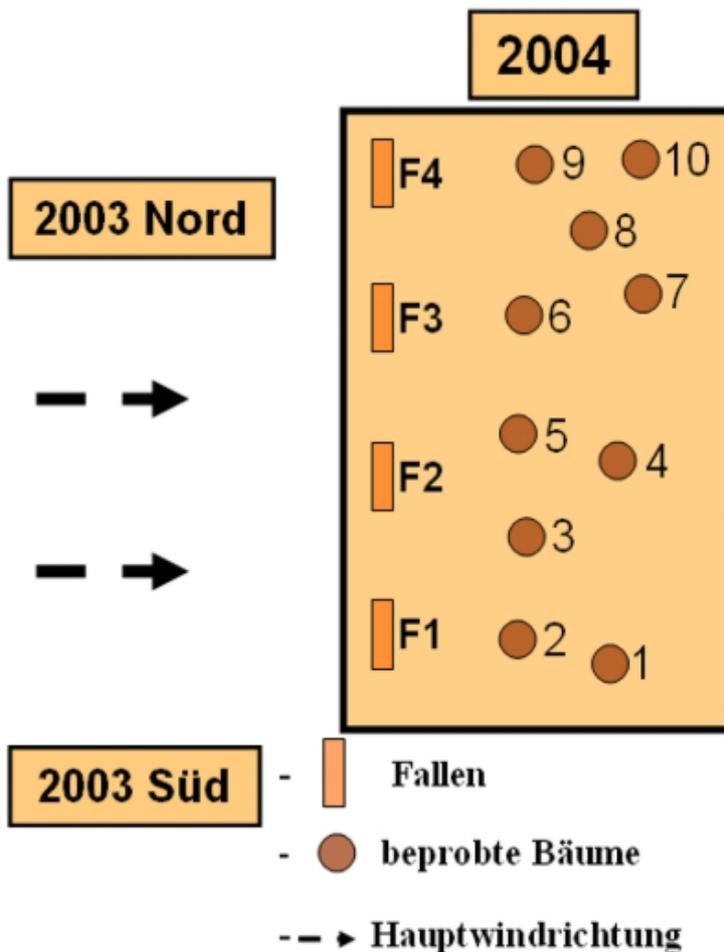


Abb. 2: Schematische Darstellung der Herkunft bereits genotypisierter Proben: Die Tiere stammen sowohl von zwei im Jahr 2003 beprobten Käferlöchern (2003 Süd und 2003 Nord) als auch von den vier im darauffolgenden Jahr aufgestellten Fallen der ersten Fallenreihe (F1 bis F4), sowie von 10 Bäumen (1 bis 10), die sich unmittelbar hinter diesen Fallen befinden.

In Abb. 3 wird die genetische Differenzierung zwischen der Population 2003 Süd und allen übrigen Individuen deutlich. Die Population 2003 Nord, die sich entgegen der Hauptwindrichtung zur ersten Fallenreihe befindet, weist trotz der geographischen Entfernung (ca. 1,3 km) eine geringere genetische Distanz zu den Individuen des Probennahmejahres 2004 (Baum1 bis Baum10 und Falle1 bis Falle4) auf. Das *UPGMA* – Dendrogram zeigt ferner eine geringe genetische Differenzierung der Fallen, welche sich eng zueinander gruppieren, jedoch eine ausgeprägte Differenzierung zwischen den Fallen und den Bäumen. Zwischen den Bäumen besteht eine kleinräumige genetische Strukturierung. Durch die geringe genetische Distanz der Population 2003 Nord zu den in den Fallen gefangenen Käfern und den aus Bäumen gewonnenen Tieren ist eine großräumige Strukturierung durch Windverdriftung anzunehmen, da sich diese Population entgegen der Hauptwindrichtung zu dem Probennahmegebiet des Vorjahres befindet. Bei Betrachtung der kleinräumigen genetischen Struktur innerhalb und zwischen den Fallen

und Bäumen ist jedoch keine Korrelation zwischen der Hauptwindrichtung und der Struktur erkennbar.

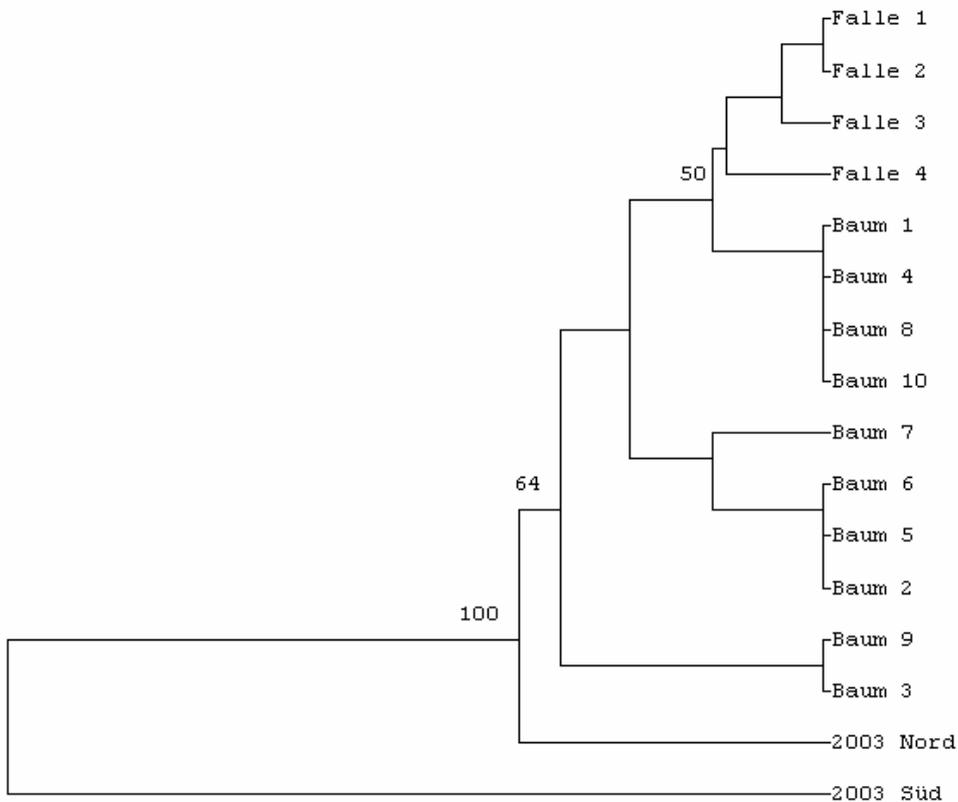


Abb. 3: UPGMA – Dendrogram, basierend auf den D_{ST} -Distanzen von Nei (1972); Die Zahlen an den Knoten zeigen die Bootstrapwerte > 50 an.

Anhand der ermittelten Allelfrequenzen aller genotypisierten Individuen wurde ein *Assignment*-Test mit dem Programm GENECLASS (CORNUET et al. 1999) durchgeführt. Das Ergebnis des Tests zeigte, dass 72% der Genotypen der Fallenfänge des Jahres 2004 der Population 2003 Nord zugeordnet werden können (Abb. 4). Somit bestand hauptsächlich Genfluss von der Population 2003 Nord zu dem im vorigen Jahr untersuchten Befallsgebiet. Dies bestätigt die Resultate des UPGMA – Dendrograms, und es kann von einer großräumigen genetischen Substrukturierung durch Windverdriftung ausgegangen werden.

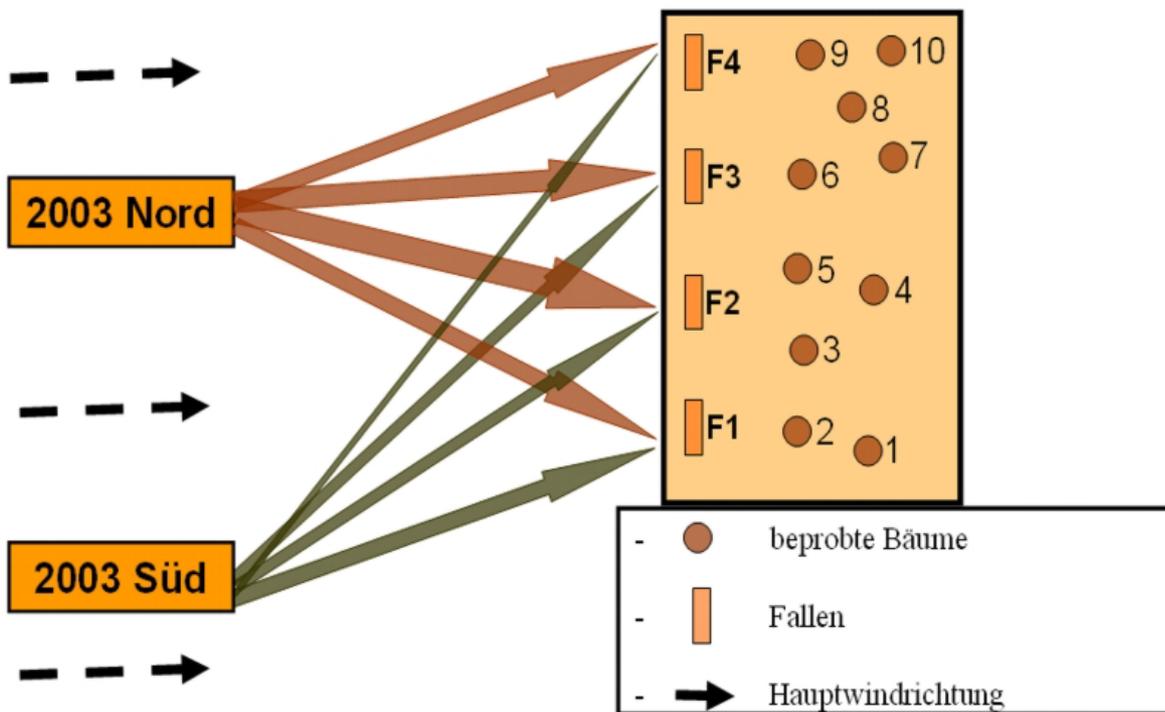


Abb. 4: Abbildung 4 stellt schematisch das prozentuale Ausmaß von Genfluss zwischen den Populationen 2003 Nord (oben), 2003 Süd (unten) und den Fallen F1 bis F4 dar.

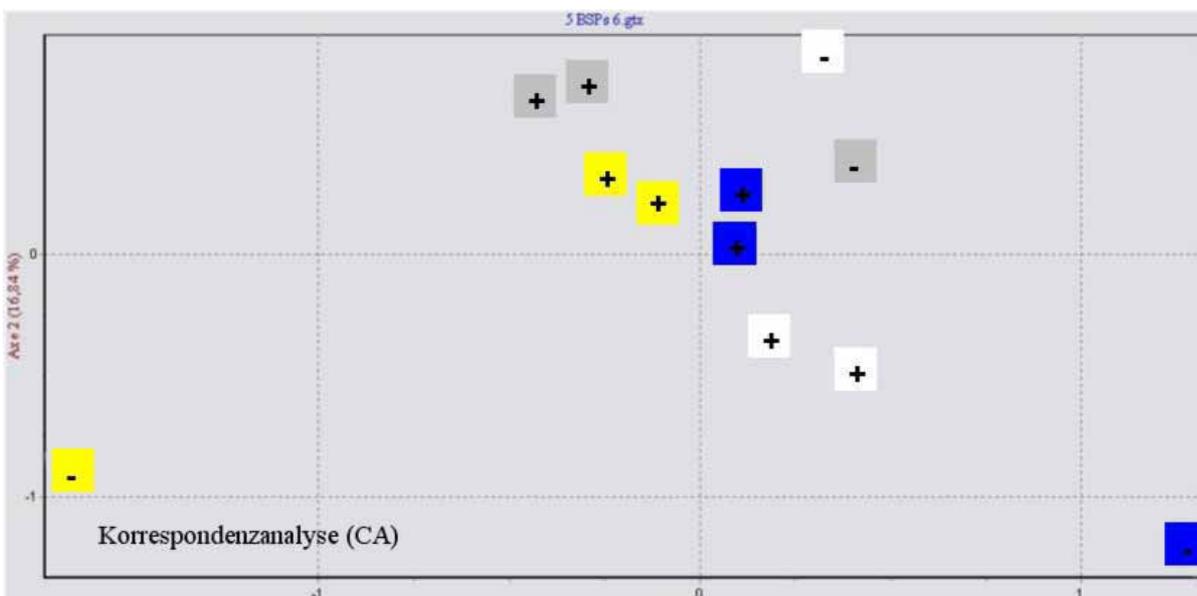


Abb. 5: Darstellung der genetischen Struktur der beprobten Bäume am Beispiel von vier Brutsystemen (grau, blau, weiß, gelb). Weibliche Individuen sind mit einem +, männliche Käfer mit einem - gekennzeichnet. Weibliche Borkenkäfer mit ähnlicher genetischer Ausstattung gruppieren sich eng zueinander.

Um die genetischen Strukturen innerhalb und zwischen den Bäumen der Befallsfront aufzuzeigen wurde unter Verwendung des Computerprogramms GENETIX 4.05.2 (BELKHIR et al. 1996–2001) eine Korrespondenzanalyse (CA) durchgeführt. Die Ergebnisse belegen eine kleinräumige genetische Strukturierung, da die weiblichen Individuen innerhalb eines Brutsystems einen ähnlichen Genotyp aufweisen (Abb. 5).

In einer Reihe von Untersuchungen wurde bereits nachgewiesen, dass die Verhältnisse der Aggregationspheromone trans-Verbenol und cis-Verbenol, die von männlichen Individuen gebildet werden und dazu dienen, weibliche Tiere anzulocken, dem Verhältnis der zwei bicyclischen Monoterpene (+)- α -Pinen und (-)- α -Pinen des Wirtsbaumes entsprechen und beträchtlich variieren können (BIRGERSSON et al. 1984, BIRGERSSON et al. 1988 & KLIMETZEK & FRANKE 1980). Aufgrund der Resultate der CA kann davon ausgegangen werden, dass eine Korrelation zwischen dem spezifischen Pheromonbukett männlicher Individuen und der genetischen Ausstattung der dadurch angelockten Weibchen besteht, da weibliche Borkenkäfer innerhalb eines Brutsystems eine ähnliche genetische Ausstattung aufweisen (Abb. 5).

Selektive Marker auf DNA - Ebene

Um die Pheromon induzierte genetische Strukturierung innerhalb einer Befallslinie noch deutlicher darstellen zu können, wird zusätzlich ein selektiver Marker auf DNA - Ebene etabliert. Hierfür wurde das Acetylcholinesterase (AChE) codierende Gen gewählt. AChE terminiert Nervenimpulse durch die Spaltung des Neurotransmitters Acetylcholin im synaptischen Spalt und spielt somit eine tragende Rolle in der Nervenreizleitung bei Insekten (SMALLMAN 1969). Bei *Drosophila melanogaster* wurde bereits nachgewiesen, dass spezifische Mutationen auf dem AChE-Gen zu einer erhöhten AChE-Produktion führen (MENOZZI et. al 2004). Demzufolge haben bestimmte Punktmutationen direkten Einfluss auf die Reizleitung. Ziel dieser Untersuchung ist die Etablierung eines Markers, um den Zusammenhang zwischen dem spezifischen Pheromonbukett männlicher Individuen und bestimmter Punktmutationen auf dem AChE-Gen der dadurch angelockten Weibchen darzustellen.

Um die bisher bei *Ips typographus* unbekannt Sequenz des AChE-Gens zu amplifizieren wurden die Sequenzen dieses Gens von *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* und *Mus musculus* verglichen und dabei konservierte Regionen identifiziert. In diese konservierten Regionen wurden zwei unterschiedliche Primerpaare gelegt, die verschieden lange Fragmente des gleichen AChE-Genssequenzabschnitts einschließen. Diese Fragmente des Genssequenzabschnitts wurden anschließend sowohl mit genomischer DNA als auch mit cDNA bei *Ips typographus* amplifiziert und sequenziert. Da die Amplifikate beider Fragmente konforme Sequenzabschnitte aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um einen Abschnitt der AChE codierenden Region bei *Ips typographus* handelt.

Um festzustellen, inwieweit Mutationen beim Buchdrucker vorliegen, wurden in einer Vorstudie die Amplifikate von zehn Individuen mittels RFLP verdaut (Abb. 6). Zur Überprüfung, ob es sich bei den Mutationen um nicht-synonyme Substitutionen oder synonyme Substitutionen handelt, werden im Rahmen dieses Projektes alle detektierten Haplotypen sequenziert. Das letztendliche Ziel ist die Anwendung der AFLP Methode nach VOS et al. (1995), um alle nicht-synonyme Substitutionen (ESTs) zu ermitteln.

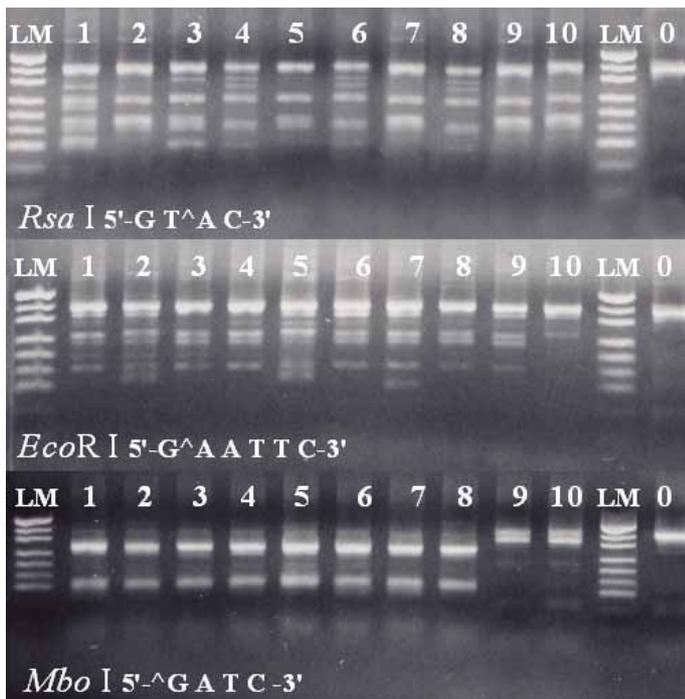


Abb. 6: Mit den Restriktionsenzymen Rsa I, EcoR I und Mbo I verdaute (Spur 1 bis 10) und unverdaute (Spur 0) Amplifikate der Acetylcholinesterase codierenden Region; Unterschiede im Banden-muster zeigen Punktmutationen des AChE-Genfragments

Allozyme:

Sieben der informativsten Enzymmarker bei *Ips typographus* wurden für diese Untersuchung verwendet (Tab. 2).

Tab. 2: Ausgewählte Enzymmarker und die dafür verwendeten Puffersysteme, sowie die Laufbedingungen dieser Systeme.

Puffersystem	Enzymsysteme (Kürzel; EC-Code)	Laufbedingungen		
		Zeit [h]	I [mA]	U [V]
Lithiumhydroxid ph 8,3 (LiOH)	Aspartam-Amino-Transferase (AAT; EC 2.6.1.1)	6,0	70	250
Lithiumhydroxid ph 8,3 (LiOH)	Hexokinase (HK; EC 2.7.1.1)	6,0	70	250
Lithiumhydroxid ph 8,3 (LiOH)	Aconitase Hydratase (ACON ; EC EC 3.1.1.2)	6,0	70	250
Tris-Borat-EDTA Ph 8,0 (TBE)	Esterase (EST-D ; EC 3.1.1.1)	5,5	70	250
Tris-Citrat ph 7,0 (TC 7,0)	Glucose-6-phosphat Isomerase (GPI ; EC 5.3.1.9)	6,0	200	250
Tris-Citrat ph 7,0 (TC 7,0)	Isocitrat-Dehydrogenase (IDH; EC 1.1.1.42)	6,5	200	250
Tris-Borat-EDTA Ph 8,0 (TBE)	Phospho-Gluco-Mutase (PGM; EC 5.4.2.2)	6,0	200	250

Darüber hinaus wurde die Allozym-Elektrophorese für die Geschlechtsbestimmung von Borkenkäfern etabliert. Eine Unterscheidung von männlichen und weiblichen Individuen mit den klassischen Verfahren, wie beispielsweise der Genitalpräparation unter dem Binokular, ist mit erheblichem Aufwand verbunden, und somit sehr zeitintensiv. In einer Vorstudie wurde das Geschlecht von 40 Tieren sowohl mikroskopisch als auch mit dem geschlechtsspezifischen Enzymmarker Hexokinase-A elektrophoretisch bestimmt. Männliche Individuen können anhand eines zusätzlichen Alleles an diesem Genort erkannt werden (Abb.: 7). Die Auswertung aller übrigen Allozyme befindet sich derzeit in Bearbeitung. Die Etablierung der Systeme, sowie die Auswertung der Elektrophorese-Gele erfolgt in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Tierökologie (TUM).

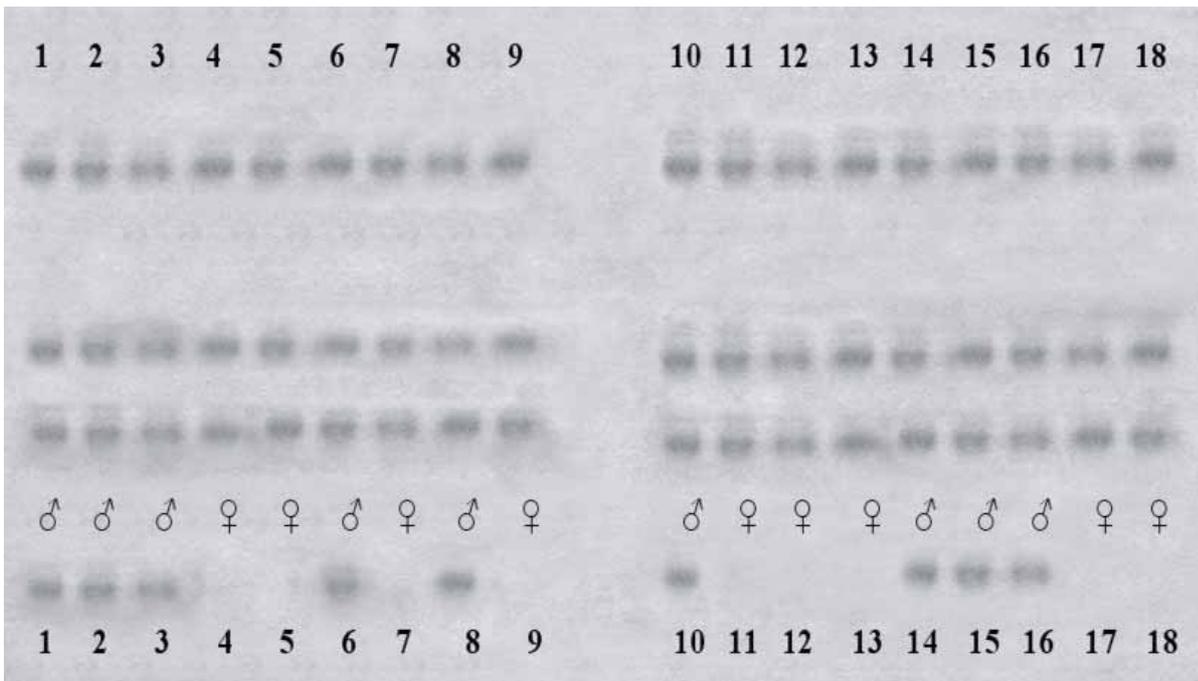


Abb. 7: Elektrophorese Gel mit dem Bandenmuster des Allozyms Hexokinase-A am Beispiel von neun weiblichen und neun männlichen Individuen; Männliche Tiere können durch ein zusätzliches Allel (unterste Banden) von weiblichen Tieren unterschieden werden.

Zurzeit wird ein weiterer Marker etabliert, der es ermöglicht, über die DNA männliche und weibliche Borkenkäfer voneinander zu unterscheiden. Der Einsatz dieses Markersystems hat den Vorteil, dass bei zukünftigen Populationsstudien sowohl die Erhebung genetischer Parameter als auch Geschlechtsbestimmungen molekulargenetisch durchgeführt werden können, und somit auf die Allozym-Elektrophorese verzichtet werden kann.

Gaschromatographie:

Die gaschromatographische (GC) Identifizierung und Bestimmung der Verhältnisse von cis – und trans – Verbenol wurde mit begasten Tieren nach BOHLANDER (1996) etabliert. Da bei natürlichen Populationen zum Teil sehr geringe Pheromonkonzentrationen in den männlichen Tieren zu erwarten sind, wird im Rahmen dieser Untersuchung eine verfeinerte Analyseverfahren durch Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie entwickelt. Dies erfolgt in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Gemüsebau (TUM).

Ausblick

Die Ergebnisse der molekulargenetischen Analysen belegen eine kleinräumige genetische Strukturierung innerhalb einer Befallsfront, da die weiblichen Borkenkäfer eines Brutsystems einen ähnlichen Genotyp aufweisen. Dies liefert starke Hinweise auf eine Korrelation zwischen dem spezifischen Pheromonbukett männlicher Individuen und der genetischen Ausstattung der dadurch angelockten Weibchen. Um die Verbenol induzierte Strukturierung der Populationen deutlicher darzustellen, wird ein selektiver Marker auf DNA-Ebene entwickelt. Des Weiteren wird durch die Kopplung von Massenspektrometrie und Gaschromatographie (GC/MS) eine Methode etabliert, um die Verhältnisse von cis- und trans-Verbenol in den Abdomen der männlichen Tiere festzustellen.

Anhand der Korrelationen zwischen weiblichem Genotyp und dem Verbenolbukett der Männchen setzt sich die Fortführung dieser Studie das Ziel, mittels molekulargenetischer Methoden eine markergestützte Käferbekämpfung zu etablieren. Die Zusammensetzung des Lockstoffbuketts wird somit auf Individuengruppen mit ähnlicher genetischer Ausstattung abgestimmt und hierdurch die Effektivität von Pheromonfallen, die derzeit eine Fangquote von nur 3 bis 10% aufweisen (WERMELINGER 2004), verbessert. Die zusätzlichen Erkenntnisse der jeweiligen Dispersionsstrukturen ermöglichen eine optimale Positionierung der populationsspezifischen Pheromonfallen.

Literatur

- BELKHIR K, BORSA P, CHIKHI L, RAUFASTE N, & BONHOMME F 1996–2001. GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la genetique des populations. Laboratoire Genome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Montpellier, France: Universite´ de Montpellier II
- BIRGERSSON G & BERGSTROM G 1989. Volatiles released from individual spruce bark beetle entrance holes quantitative variations during the first week of attack. *Journal of Chemical Ecology* **15**: 2465-2484
- BIRGERSSON G, SCHLYTER F, LÖFQVIST J & BERGSTRÖM G 1984. Quantitative variation of pheromone components in the spruce bark beetle *Ips typographus* from different attack phases. *Journal of Chemical Ecology* **10**: 1029-55
- BIRGERSSON G, SCHLYTER F, BERGSTROM G & LOFQVIST J 1988. Individual variation in aggregation pheromone content of the bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology* **14**: 1737-1762
- BOHLANDER F 1996. Zum energetischen Status des Buchdruckers *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). Dissertation an der Forstwissenschaftlichen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München
- BYERS JA 1995a. Host tree chemistry affecting colonization in bark beetles, in R.T. Cardé & W.J. Bell (eds.). *Chemical Ecology of Insects 2*. Chapman & Hall, New York, pp. 154-213
- CORNUET J-M, PIRY S, LUIKART G, ESTOUP A & SOLIGNAC M 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* **153**: 1989–2000
- HOGAN B L M, CONSTANTINI F & LACEY E 1986. *Manipulating the mouse embryo*. Cold spring harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York
- KLIMETZEK D & FRANCKE W 1980. Relationship between the enantiomeric composition of alpha-pinene in host trees and the production of verbenols in *Ips* species. *Experientia* **36**:1343-1345
- LIEPOLD K 2003. Vergleichende Untersuchungen zur faunistischen und genetischen Diversität von Käferzönosen in genutzten und ungenutzten Bergmischwäldern des Bayrischen Waldes. Dissertation an der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt (Technischen Universität München)
- LWF 2001. Borkenkäfer Spezial; Wissenswertes über Borkenkäfer. LWF aktuell Nr. 33
- MENOZZI P, SHI M A, LOUGARRE A, TANG ZH, FOURNIER D 2004. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evol Biol.* **4**: 1-7
- NEI M 1987. *Molecular evolution genetics*. Columbia university press. New York
- OTA T 1993. *Dispan: Genetic distance and phylogenetic analysis*. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. <http://www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/Programs.html>
- SCHLYTER F, BIRGERSSON G, BYERS JA, LÖSFQVIST J & BERGSTRISM G 1987. Field response of the spruce bark beetle, *Ips typographus*, to aggregation pheromone candidates. *Journal of Chemical Ecology*, **13**: 701-716
- SMALLMAN B N 1969. The Cholinergic System in insect development. *Annu. Rev. Entomol.* **14**: 387-408
- SOKAL R & SNEATH, P H A 1963. *Principles of numerical taxonomy*. W. H. Freeman & Co., San Francisco
- VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, RIJANS M, VAN DER LEE T, HORNES M, FRIJTERS A, POT J, PELEMAN J, KUIPER M and ZABEAU M 1995. A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acid Res.* **23**: 4407–4414
- WERMELINGER B 2004. Ecology & management of the spruce bark beetle *Ips typographus* – a review of recent research. *For. Ecol. Manage.* **202**: 67-82

Verhinderung der Ausbreitung gentechnischer Veränderungen transgener Pflanzen durch metabolisch erzeugte männliche Sterilität als biologische Sicherheitsmaßnahme

Jörg Hirsche und Thomas Roitsch
Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg,
Julius-von-Sachs-Platz 2, D-97082 Würzburg, Germany

Zusammenfassung

Im Rahmen des Forschungsschwerpunktes zur Regulation der Kohlenhydratverteilung in Pflanzen konnte gezeigt werden, dass das Enzym extrazelluläre Invertase essentiell für die Pollenreifung ist. Der entsprechende Promotor wurde isoliert und verwendet um mittels Antisense-Technologie die Enzymaktivität in Tabak und Tomate gewebsspezifisch zu reduzieren. Dabei zeigte sich, dass die Pollenentwicklung arretiert wird, während keinerlei weitere Auswirkungen festzustellen sind. Diese Methode ist somit in ihrem Eingriff subtil aber gleichzeitig hocheffizient in der Wirkung um ausbreitungsunfähige, männlich sterile Pflanzen herzustellen. Im Rahmen des Projektes soll geklärt werden, ob diese Methode als biologische Sicherheitsmaßnahme etabliert werden kann. um eine Kreuzbefruchtung der zunehmenden Anzahl von transgenen Kulturpflanzen mit Pflanzen der gleichen Art oder verwandten Wildarten zu verhindern. Modellhaft wird der zugrunde liegende Mechanismus an dem pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) charakterisiert. Für den Praxiseinsatz wird geprüft, ob die Methode bei Raps, mit einer sehr hohen Auskreuzungswahrscheinlichkeit sowohl innerhalb der Kulturart als auch auf Wildformen, bei Weizen als Beispiel einer einkeimblättrigen Pflanze und bei Apfelbäumen als biologische Sicherheitsmassnahme angewendet werden kann.

Einführung

Seit den letzten 10 Jahren ist die Menge der angebauten gentechnisch veränderten (GV-) Pflanzen sprunghaft angestiegen. Während sich in Deutschland derzeit der Anbau transgener Pflanzen noch auf wissenschaftliche Freisetzungsversuche beschränkt, findet in zahlreichen anderen Ländern bereits eine intensive kommerzielle Bewirtschaftung landwirtschaftlicher Flächen mit GV-Pflanzen statt. Im Jahr 2004 wurde eine Gesamtfläche von 81 Mio. ha mit transgenen Pflanzen bebaut – eine Fläche, die mehr als das Doppelte der gesamten Landfläche der BRD entspricht. Vielen der GV-Pflanzen wurden neben einer

gesteigerten Schädlingsresistenz (z. B. Bt-Mais) vor allem Resistenzen gegen verschiedene Herbizide vermittelt. In Zukunft werden auch Pflanzen angebaut werden, die in ihrem Öl- oder Stärkegehalt für verschiedene Anforderungen optimiert wurden. Neben einer Veränderung der Pigmentierung wird auch eine Anpassung des Vitamingehaltes näher erforscht. Derzeit wird an einer neuen Generation von GV-Pflanzen gearbeitet, die gegenüber Schädlingen und Krankheiten unempfindlich oder an bestimmte Klimabedingungen besser angepasst sind als herkömmliche Sorten. Wenn solche Eigenschaften auf Wildpflanzen übertragen würden, könnten diese gegenüber anderen Pflanzen einen Vorteil erlangen. Da sich diese durch eine erhöhte Fitness auszeichnen, überstünden sie Krankheiten besser als ihre Nachbarpflanzen oder könnten längere Zeit Trockenperioden überleben. Die möglichen Folgen wären, dass sich die Pflanzen mit den neuen Eigenschaften schneller vermehren und ausbreiten könnten. Die ursprüngliche Zusammensetzung der Pflanzengemeinschaft könnte sich verändern, was auch die Tierwelt betreffen kann. Neben bereits angebauten krautigen Pflanzen werden in wenigen Jahren gentechnisch veränderte Bäume einer kommerziellen Nutzung, beispielsweise in der Holzwirtschaft aber auch zum Schadstoffabbau zur Verfügung stehen, deren Einsatz bevorzugt im Plantagenanbau stattfinden wird. Weiterhin wird an der Herstellung GV-Pflanzen gearbeitet, die hochwirksame Arzneimittel produzieren („PhytoPharming“). Wenn sie tatsächlich einmal auf einem Feld stehen sollten muss sichergestellt sein, dass diese Pflanzen nur dort wachsen. Das Wirkstoff-Gen darf auf keinen Fall auf andere Kultur- der Wildpflanzen übertragen werden.

Ein unkontrolliertes Ausbreiten der vermittelten Fremdgene aus den transgenen Pflanzen wäre theoretisch durch Horizontalen Gentransfer möglich, der Übertragung von DNA auf ungeschlechtlichem Weg. Bisher konnte dies bei Pflanzen aber noch nicht nachgewiesen werden. Allerdings besteht bei transgenen Pflanzen das grundsätzliche Problem des Vertikalen Gentransfers. Hierbei wird genetische Information über den Weg der geschlechtlichen Fortpflanzung auf Pflanzen der gleichen Art oder auf verwandte Wildarten übertragen. Die Wahrscheinlichkeit einer Auskreuzung des Transgens aus den gentechnisch veränderten Pflanzen muss für jede Pflanzenart individuell ermittelt werden. Raps (*Brassica napus*) kann sehr leicht innerhalb der Kulturart, als auch auf zahlreiche verwandte Wildarten auskreuzen und besitzt somit ein sehr hohes Auskreuzungsrisiko. Bei Apfel (*Malus domestica*) ist dieses Risiko reduziert, da zwischen den verschiedenen Apfelsorten häufig keine Fremdbestäubung möglich ist. Mais (*Zea mays*) kann sehr leicht innerhalb der Kulturart auskreuzen, da aber in Europa verwandte Wildarten fehlen, ist ein

Auskreuzen in andere Arten ausgeschlossen. Bei Weizen (*Triticum aestivum*) als Selbstbestäuber ist ein Kreuzen mit anderen Weizensorten weitgehend minimiert.

Mehrere Strategien scheinen geeignet, die Fremdgene einer GV-Pflanze an einer unkontrollierten Ausbreitung zu hindern. Hauptsächlich können sich Fremdgene einer GV-Pflanze über deren Pollen in artgleiche Kulturpflanzen oder nahe verwandte Wildpflanzen verbreiten. Pollen werden von den meisten Pflanzen in großen Mengen gebildet und je nach Wetterlage bis zu mehreren Kilometern vom Wind oder von Insekten vom Feld weggetragen. Daher setzen die beiden zurzeit wichtigsten Strategien am Pollen an: (A) Die Pollenbildung der transgenen Pflanzen auf dem Feld wird entweder vollkommen unterbunden. (B) Der Pollen der transgenen Pflanzen darf keine Fremdgene enthalten. Letztere Strategie beinhaltet aber noch große Limitierungen in Bezug auf eine generelle Anwendung.

Bei Höheren Pflanzen werden in den Blättern durch den Prozess der Photosynthese Zucker produziert, die zu anderen Pflanzenteilen, wie Wurzeln, Blüten und Früchten, transportiert und dort als Nährstoffe verbraucht oder - nicht zuletzt auch zu unserem Nutzen - gespeichert werden. Der einleitende Schritt bei der Versorgung von symplastisch isolierten Verbrauchsorganen und schnell wachsenden Geweben mit Kohlenhydraten ist die Hydrolyse des Transportzuckers Saccharose durch eine zellwandgebundene, extrazelluläre Invertase (Abb. 1).

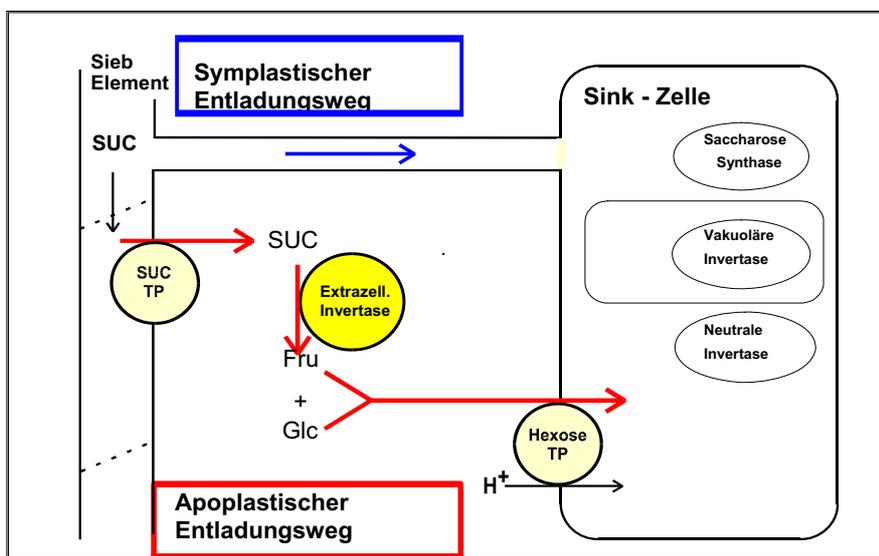


Abb. 1. Versorgung von Sink-Geweben mit Kohlenhydraten. Bei symplastisch isolierten Geweben wird die Saccharose in den Apoplasten entlassen und dort durch eine zellwandgebundene Invertase unter Entstehung von Hexosen hydrolysiert. Die Glucose und Fructose werden dann durch Hexosetransporter in die Sink-Zelle transportiert.

Im Rahmen des Forschungsschwerpunktes zur Regulation der Kohlenhydratverteilung in Pflanzen konnte gezeigt werden, dass das Enzym extrazelluläre Invertase essentiell für die Pollenreifung ist. In den Antheren entwickeln sich die Microsporen symplastisch isoliert von den anderen Geweben. Sie müssen Saccharose über die Zellwand aufnehmen, um z. B. Stärke bilden und speichern zu können. Während der Entwicklungsphase der Antheren exprimiert das Tapetum, eine Zellschicht die der Versorgung der heranwachsenden Pollenkörner dient, eine extrazelluläre Invertase. Diese spaltet die Saccharose im Apoplasten – die Microsporen können die entstandenen Hexosen aufnehmen. Während der Reifungsphase wird das Tapetum degradiert. Die Pollenkörner exprimieren nun selbst diese extrazelluläre Invertase, um weiterhin Kohlenhydrate verwerten zu können. Der entsprechende Invertase-Promotor wurde isoliert und verwendet um mittels Antisense-Technologie die Enzymaktivität in Tabak und Tomate gewebspezifisch zu reduzieren. Wird diese extrazelluläre Invertaseaktivität in den Antheren verringert, kommt es zu einer Arretierung der Pollenentwicklung. Im Vergleich zu den Wildtyp-Pollen weisen diese unreifen Pollen eine verminderte Stabilität auf, die Stärkeeinlagerung ist stark reduziert und sie sind unfähig Pollenschläuche auszubilden (Abb. 2).

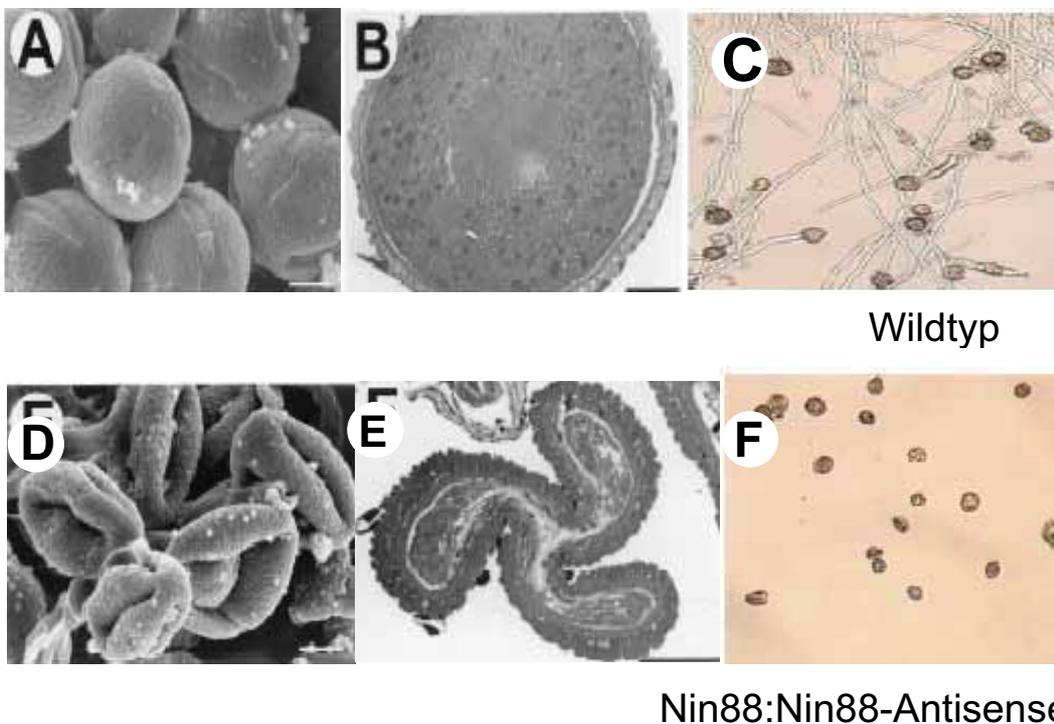


Abb. 2. Die extrazelluläre Hydrolyse des Transportzuckers Saccharose durch eine zellwandgebundene Invertase ist essentiell für die Pollenentwicklung. Durch Antisense-Hemmung der Invertase Nin88 in Tabak entstehen deformierte, labile, unreife Pollen (D+E), die nicht in der Lage sind Pollenschläuche auszubilden (F).

Diese unreifen Pollen sind somit unfähig eine Befruchtung durchzuführen – die Pflanzen sind männlich steril. Trotz der dramatischen Störung der Pollenentwicklung sind jedoch keinerlei weitere Auswirkungen auf den Phänotyp der Pflanzen festzustellen. Die Methode der metabolischen Beeinflussung der Pollenentwicklung durch gewebsspezifische Hemmung eines Enzyms aus dem Zuckerstoffwechsel ist somit in ihrem Eingriff subtil aber gleichzeitig hocheffizient in der Wirkung, um ausbreitungsunfähige männlich sterile Pflanzen herzustellen. Aufgrund der Konservierung des Mechanismus der Pollenentwicklung bei Höheren Pflanzen ist zu erwarten, dass damit eine neuartige Methode zur Verfügung steht die universell geeignet ist, um-, männlich sterile Pflanzen als ausbreitungsunfähige Sicherheitslinien zu erzeugen.

Ziel dieses Projekts soll es sein, mit Hilfe eines sehr subtilen aber wirkungsvollen Eingriffs in die Pollenentwicklung männlich sterile Pflanzen als biologische Sicherheitsmaßnahme zu erzeugen. An dem pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) soll der Mechanismus der metabolisch erzeugten männlichen Sterilität charakterisiert werden. Für den Praxiseinsatz soll modellhaft geprüft werden, ob die Methode bei Raps, bei Weizen und bei Apfelbäumen als biologische Sicherheitsmassnahme angewendet werden kann.

Ergebnisse und Diskussion

Zur gewebsspezifischen Verminderung der Invertaseaktivität sollen sowohl die Methode der Antisense-Hemmung mit so genannten RNAi-Konstrukten und die Expression eines Invertase-Inhibitors verwendet werden. RNAi ist eine sehr effiziente Methode um posttranskriptionell die Synthese von spezifischen Proteinen zu verringern. Der Invertase-Inhibitor hat den Vorteil, dass ein breites Spektrum an Invertase-Isoenzymen gehemmt wird. Da nicht vorhersagbar ist, welcher der beiden experimentellen Ansätze für die Untersuchungen besser geeignet sein wird, sollen beide experimentellen Ansätze vergleichend eingesetzt werden.

In den Pflanzen, in denen die Früchte nicht das Ernteprodukt sind (z.B. Salat oder Karotten), können die männlich sterilen Pflanzen mit jeder beliebigen Bestäuberlinie gekreuzt werden. Im Gegensatz dazu wird für Pflanzen, in denen die Früchte geerntet werden (z.B. Reis, Mais oder Tomate) eine Restorer-Linie benötigt, um die männliche Fertilität wieder herzustellen. Eine solche Restorer-Linie könnte aus Pflanzen bestehen,

die eine nur entfernt verwandte Invertase, beispielsweise aus Hefe oder Bakterien, exprimieren, die der Antisense-Repression durch die Pflanzeninvertase oder der Invertase-Inhibitor Funktion nicht unterliegen. Dieser experimentelle Ansatz soll modellhaft bei *Arabidopsis* angewendet werden.

Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*)

Aufgrund der genauen Charakterisierung, der kompletten Sequenzierung des Genoms sowie der kurzen Generationszeiten ist die Ackerschmalwand als pflanzliches Modellsystem etabliert und wurde deshalb ausgewählt, um die Methode der metabolischen Erzeugung männlich steriler Pflanzen weiter zu charakterisieren und zu optimieren.

Bei *Arabidopsis* sind neben zwei vakuolären Invertasen vier extrazelluläre Invertasen bekannt. Bei genauer Analyse der Expressionsprofile zeigte sich, dass AtcwINV2 (At3g52600) in den Blüten, und vor allem in den Antheren exprimiert wird. Die Reduzierung der Invertaseaktivität in den Antheren soll über zwei unterschiedliche Ansätze erfolgen: Unter Einsatz der Antisense-Technologie soll die Aktivität der AtcwINV2 spezifisch reduziert werden. Durch Insertion des AtcwINV2-Gens in Antisense-Orientierung in das Genom entsteht in den Antheren, neben der mRNA, auch Antisense-RNA. Diese hybridisiert mit der natürlich vorhandenen mRNA. Es erfolgt keine Translation in die Proteinsequenz; die Aktivität der AtcwINV2 wird stark herabgesetzt. Zur unspezifischen Reduzierung der Invertaseaktivität wird die gewebespezifische Expression eines Invertase-Inhibitors in den Antheren eingesetzt. Der Invertase-Inhibitor ist ein kleines Protein, das mit der Saccharose um den Platz im aktiven Zentrum der Invertase konkurriert. Durch diese kompetitive Hemmung wird die Aktivität aller im Gewebe vorhandener extrazellulärer Invertasen verringert. Somit werden auch andere Invertasen erfasst, die noch zu einem geringen Prozentsatz in den Antheren exprimiert werden. Die zeitliche und gewebespezifische Expression der angeführten Gene soll über den Promotor der AtcwINV2 sichergestellt werden. Um die Aktivität des klonierten Promotors überprüfen zu können, wurden Konstrukte mit dem Reportergen β -Glucuronidase (GUS) hergestellt. Anhand von in-situ Färbemethoden kann nachgewiesen werden, in welchen Geweben der Promotor aktiv ist.

Alle erzeugten Konstrukte wurden in den *Arabidopsis*-Wildtyp Col-0 transformiert. Die erhaltenen Samen wurden ausgesät und die Keimlinge durch die vermittelte Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin selektiert. Die Konstrukte wurden mittels PCR in den

erhaltenen Pflanzen nachgewiesen. Um für nachfolgende Experimente ausreichend Pflanzenmaterial zur Verfügung zu haben, wurden die transgenen Pflanzen vermehrt.

In weiterführenden Untersuchungen soll mit Hilfe der erzeugten Reporterlinien die Gewebespezifität des eingesetzten *AthcwINV2*-Promotors überprüft werden. Dabei soll untersucht werden, ob dieser Promotor noch in anderen Geweben, z. B. weiblichen Blütenteilen, aktiv ist und vor allem ab welcher Entwicklungsstufe der Antheren die *AthcwINV2* exprimiert wird. Die erzeugten Antisense- und Invertase-Inhibitorpflanzen sollen hinsichtlich Veränderungen der Antheren- und Pollenentwicklung, des Pollenschlauchwachstums und der allgemeinen männlichen Fertilität untersucht werden. Mit Aktivitätsmessungen der Invertase in Antheren, Pollen und Pollenschläuchen der transgenen Linien soll der Einfluss von Antisense-Technologie bzw. Invertase-Inhibitoren auf die Invertaseaktivität genau bestimmt werden.

Ein weiteres Ziel ist die Herstellung von Restorer-Linien, transgener Pflanzen, in denen die Fertilität durch eine weitere gentechnische Veränderung wiederhergestellt wurde. Dazu soll eine Hefe-Invertase unter Kontrolle des Antheren-spezifischen *A. thaliana* Invertase-Promotors exprimiert werden, da diese nicht durch das Antisense-Konstrukt zur Reduktion der *AthcwINV2* beeinflusst werden sollte. Die erhaltenen Linien sollen dann mit den unter Verwendung der Antisense-Technik hergestellten Linien gekreuzt und in Bezug auf eine Wiederherstellung der Fertilität untersucht werden.

Raps (*Brassica napus*)

Mit einer Anbaufläche von 1,3 Mio. ha (2005) zählt Raps zu den wichtigsten Kulturpflanzen in Deutschland. Da bereits zahlreiche transgene Rapssorten auf dem Markt sind soll untersucht werden, ob sich durch eine Beeinflussung der Invertaseaktivität in den Raps-Antheren männlich sterile Pflanzen erzeugen lassen.

Aus genomischer Raps-DNA, sowie aus Antheren-RNA, wurde mittels degenerierter Primer die gesamte Invertasenfamilie kloniert. Neben 4 vakuolären Invertasen konnten 7 extrazelluläre Invertasen identifiziert werden. Die Expression dieser Invertasen in verschiedenen Geweben wurde mittels Northern-Analysen aufgeklärt. Dabei konnte die extrazelluläre Invertase Bin69 als spezifisch in den Blüten bzw. Antheren exprimiert identifiziert werden.

Mittels verschiedener PCR-Techniken, wie RACE und Inverser PCR, soll der Bin69-Promotor kloniert werden. Unter Verwendung dieses Promotors sollen Konstrukte zur gewebespezifischen Expression von Invertase-Inhibitoren, sowie Bin69-Antisense und des

Reportergens GUS hergestellt werden. Der *Agrobacterien*-vermittelte Gentransfer soll an Raps-Hypokotylen erfolgen. Die erhaltenen transgenen Pflanzen sollen hinsichtlich Veränderungen der männlichen Fertilität genauer untersucht werden. Die Funktionalität des Promotors soll mit Hilfe der erzeugten Reporterpflanzen überprüft werden.

Weizen (*Triticum aestivum*)

Als wichtige Kulturpflanze aus der Gruppe der monokotylen Pflanzen soll am Beispiel des Weizens experimentell ermittelt werden, ob auch bei dieser Pflanzengruppe durch eine Verringerung der extrazellulären Invertaseaktivität in den Antheren männlich sterile Pflanzen erzeugt werden können.

Aus Literaturdaten ist bereits bekannt, dass die extrazelluläre Invertase Ivr1 an der Trockenstress-induzierten männlichen Sterilität beteiligt ist. Um alle vorhandenen Invertasen hinsichtlich ihres Expressionsprofils untersuchen zu können, wurde aus genomischer DNA, mittels degenerierter Primer, die gesamte Familie der extrazellulären Invertasen kloniert. Aus den erhaltenen 7 unterschiedlichen Invertasen konnte durch Northern-Analysen Ivr1 als spezifisch in den Antheren exprimiert identifiziert werden.

Wie bei Raps soll auch bei Weizen der Promotor der antherenspezifischen Invertase Ivr1 mittels RACE-Technik und Inverser PCR kloniert und für die Erzeugung von Konstrukten zur Transformation der Weizenpflanzen verwendet werden. Auch hier sollen GUS-Reporterkonstrukte, sowie Ivr1-Antisense und Invertase-Inhibitor-Konstrukte hergestellt werden. Aufgrund der sehr schwierigen Transformation von Weizen soll die Produktion transgener Pflanzen im Rahmen einer Zusammenarbeit erfolgen. Die erhaltenen Weizenpflanzen sollen hinsichtlich ihrer männlichen Fertilität untersucht und charakterisiert werden.

Apfelbäume (*Malus domestica*)

Als Vertreter der holzigen Pflanzen soll am Beispiel des Apfels geklärt werden, ob sich durch eine Verringerung der Invertaseaktivität in den Antheren auch bei Bäumen und Sträuchern männlich sterile Pflanzen erzeugen lassen.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Obstbau der Bundesanstalt für Züchtungsforschung in Dresden-Pillnitz wurden transgene Apfelpflanzen (Abb. 3) erzeugt. Dazu wurden Konstrukte verwendet, die bereits erfolgreich bei anderen Arten eingesetzt werden konnten. Diese beinhalten die antherenspezifische Invertase aus Tabak (Nin88) in Antisense-Orientierung unter der Kontrolle des Nin88-Promotors. Um die Funktionalität

des Promotors in Apfel zu überprüfen wurden Reporterlinien erzeugt (Nin88::GUS). Die dreijährigen Bäume stehen mittlerweile kurz vor der ersten Blüte; diese wird für das Frühjahr 2006 erwartet.



Abb. 3. Transgene Apfelbäume, die an der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ) in Dresden-Pillnitz mit einem Konstrukt zur Antisense-Hemmung der Antheren-spezifischen Invertase transformiert wurden. Das Foto wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Henryk Flachowsky zur Verfügung gestellt.

Mit dem Vorhandensein von Blüten kann anhand der Reporterlinien untersucht werden, ob der eingesetzte Nin88-Promotor aus Tabak in Apfel funktionsfähig ist. Dabei soll im Besonderen überprüft werden, ob die zeitliche und gewebespezifische Aktivität in den Antheren/Pollen gewährleistet ist.

Die Pflanzen mit Nin88-Antisense sollen auf Veränderungen der Antheren- und Pollenbildung untersucht werden. Messungen der Invertaseaktivität sollen zeigen, ob mit Hilfe dieses Konstruktes eine Veränderung der Invertaseaktivität im Gewebe erzielt werden konnte.

Ausblick

Transgene Pflanzen erlangen eine zunehmende Bedeutung in der Landwirtschaft und es ist in den kommenden Jahren ein weiterer Anstieg im Einsatz gentechnisch modifizierter Pflanzen zu erwarten. Schätzungen gehen davon aus, dass bis zum Jahr 2015 bereits in 30 Ländern transgene Pflanzen auf einer Fläche von mindestens 150 Mio. ha angebaut werden. Neben den nord- und südamerikanischen Ländern sowie China ist zu erwarten, dass auch in Europa und Deutschland in Zukunft mehr gentechnisch veränderte Pflanzen angebaut werden.

Der Anbau GV-Pflanzen betrifft aktuell vor allem verschiedene Kultursorten, aber in der Entwicklung sind auch gentechnisch veränderte Bäume sowie Pflanzen für die Produktion pharmazeutisch relevanter Produkte. Gerade für letztere ist die Gefahr einer Auskreuzung der gentechnischen Änderung besonders hoch, weshalb ein ausreichender Schutz vor einer unkontrollierten Verbreitung von Transgenen sichergestellt sein muss. Dafür erscheint die über Gewebs-spezifische Reduktion von Invertaseaktivität erzeugte männlichen Sterilität als geeignetes Verfahren, dessen Anwendung bei verschiedenen Spezies getestet wird.

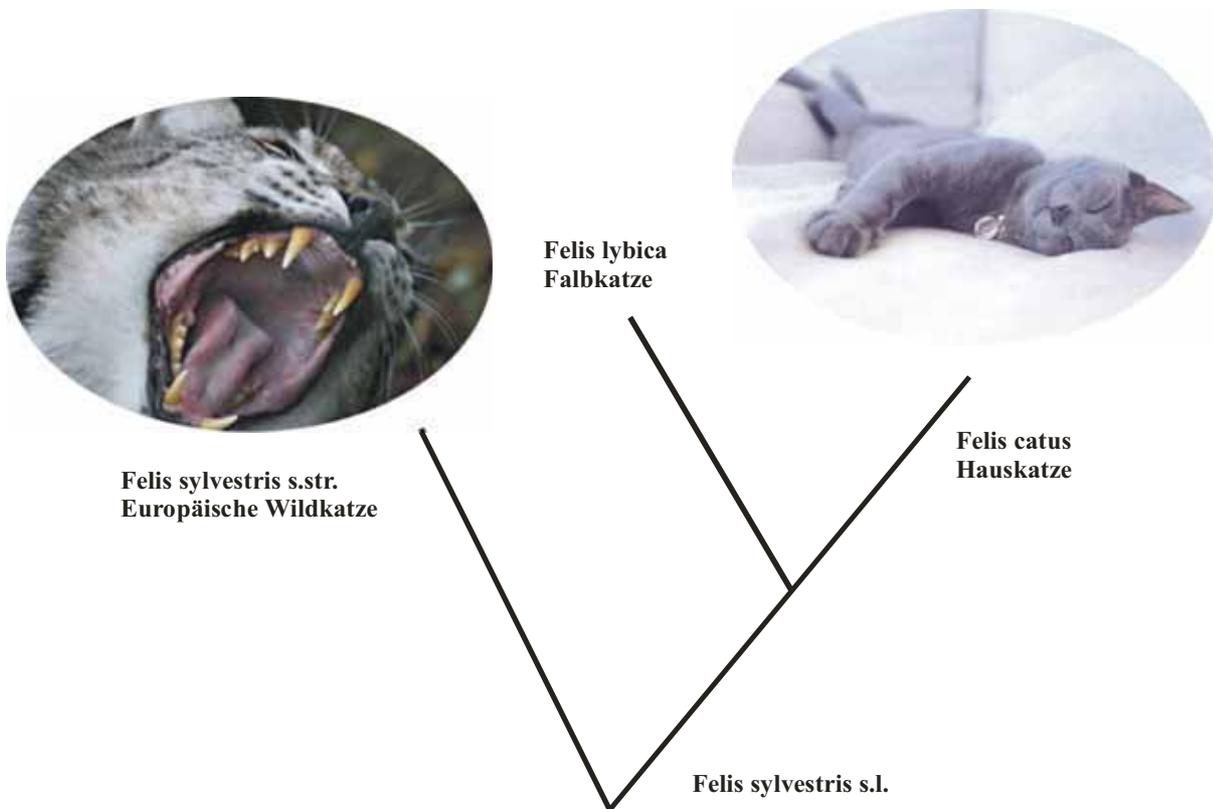
Auch für die sehr kontrovers geführte Gentechnikdiskussion und die breite Ablehnung insbesondere von gentechnisch veränderten Pflanzen wäre die Verfügbarkeit von effizienten biologischen Sicherheitsmaßnahmen von besonderer Bedeutung. Der Einsatz von Gentechnik zur Verhinderung der Ausbreitung gentechnischer Änderungen sollte daher auch zur Akzeptanz der neuen und zukunftsweisenden Technologien beitragen.

Danksagung

Dieses Projekt wird im Rahmen des Förderschwerpunktes Gentechnik vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz finanziell gefördert. Für die kompetente Unterstützung bei der Bearbeitung des Projektes gilt der Dank den folgenden Mitarbeitern des Arbeitskreises: Thomas Engelke, Christine Hampf und Christian Pabel. Wichtig für den Fortschritt des Projektes waren auch die konstruktiven Zusammenarbeiten mit Henryk Flachowsky und Viola Handke, Dresden-Pillnitz.

Einsatz molekulargenetischer Methoden zur Verbesserung von Artenschutzmaßnahmen für die Wildkatze

Uta-Regina Böhle, Harald Kleisinger
Bayerisches Landesamt für Umwelt, Augsburg



Einleitung

Nachdem die Wildkatze (*Felis silvestris*) seit Anfang des vorigen Jahrhunderts in Bayern als ausgestorben galt (Piechocki1990), begann der ‚Bund Naturschutz in Bayern‘ (BN) im Jahr 1984 Wildkatzen in verschiedenen Gebieten Bayerns wieder anzusiedeln. Insgesamt kamen bis zum Jahr 2004 442 Tiere zur Auswilderung, der überwiegende Teil (327) davon im Spessart (K. Frobel, mündl. Mitteilung). Eine Kontrolle über den Erfolg der Auswilderungsaktionen gestaltet sich sehr schwierig. Die aktuelle Populationsgröße in Bayern ist unbekannt. Die Verlässlichkeit berichteter Sichtungen und die genetische Differenzierung zwischen Populationen ist unklar. Die Unterscheidung zwischen Haus- und Wildkatzen allein aufgrund morphologischer Kriterien ist nicht immer möglich. Es sollte ein genetisches Markersystem entwickelt werden, mit dem Haus- und Wildkatzen eindeutig unterschieden, Blendlinge¹ identifiziert und Wildkatzenpopulationen genetisch charakterisiert werden können. Mit dem System könnten z. B. Totfunde richtig zugeordnet und Wildkatzen vor der Auswilderung auf ‚Reinrassigkeit‘ überprüft werden.

Methoden

Für die genetischen Untersuchungen standen ca. 150 Proben von Wildkatzen, z. B. von Tieren aus dem Auswilderungsprogramm, von dazu verwandten Tieren, von Totfunden (vor allem Verkehrsofper) und aus historischen Präparaten, zur Verfügung.

Daneben wurden jeweils mehr als 100 Lockstock- und Hauskatzenproben untersucht.

Mitochondriale DNA (mtDNA)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden Sequenzunterschiede in der mitochondrialen DNA (mtDNA) bestimmt (Abb. 1, 2)

¹ Als Blendlinge werden i.d.R. Mischlinge von Unterarten, Rassen usw. derselben Art bezeichnet. Je nach taxonomischer Einschätzung werden Haus- und Wildkatzen mitunter auch als Unterarten der Art *Felis silvestris* s.l. geführt.

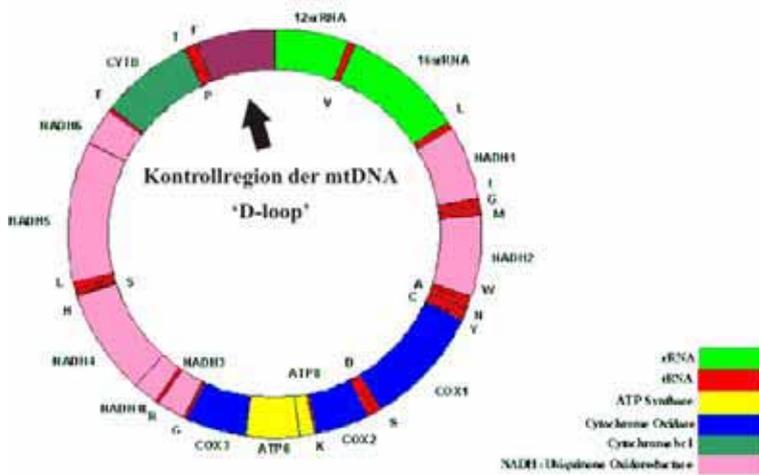


Abb.1: Schema der mtDNA in Wirbeltieren. Der überwiegende Teil der mtDNA kodiert (für rRNAs, tRNAs, ATP-Synthetase sowie verschiedene Einheiten der Atmungskette). Die Kontrollregion der mtDNA ist der längere von zwei nicht kodierenden Abschnitten der mtDNA.

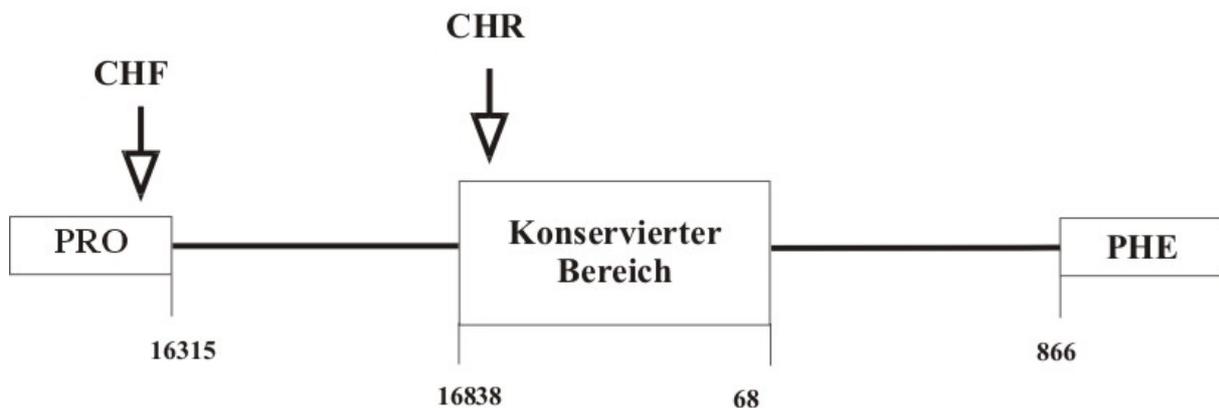


Abb.2: Schema der Kontrollregion der mtDNA in *Felis catus*. MtDNA ist in Wirbeltieren ca. 17 000 Basen lang, der Startpunkt ,0' liegt per definitionem im Kontrollbereich. Die Kontrollregion liegt bei *Felis catus* zwischen Pos. 16315 und 866, in der Mitte besitzt die an sich hypervariable Kontrollregion einen konservierten Bereich. Die Primer ,CHF' und ,CHR' liegen im tRNA-Gen für Prolin bzw. im konservierten Bereich und amplifizieren ein PCR-Produkt von ca. 700bp Länge. PRO: tRNA-Prolin. PHE: tRNA-Phenylalanin

Durch Sequenzierung von mtDNA können mütterliche Linien, d.h. Mütter und deren Nachkommen (auch in zweiter, dritter usw. Generation) verfolgt werden. Sofern die Stamm-Mütter des Zuchtprogramms bekannt sind und von diesem Material vorliegt, ist es möglich, eventuelle Nachkommen in freier Wildbahn zu identifizieren. Eine mütterliche Linie stirbt nur dann aus, wenn die weiblichen Nachkommen einer Stamm-Mutter ohne weiblichen Nachwuchs bleiben.

Mikrosatelliten

Untersucht wurden auch hochvariable Mikrosatelliten der Kern-DNA, die codominant, d.h. von beiden Elternteilen zu gleichen Teilen vererbt werden. Im Gegensatz zu mtDNA-Markern können durch Mikrosatelliten Zuchtlinien nicht direkt verfolgt werden. Aufgrund der Allel-Muster von Tieren, oder anders ausgedrückt durch die Häufigkeitsverteilung von Allelen, kann auf deren mehr oder weniger enge Verwandtschaft geschlossen werden.

Von den über 300 in *Felis catus* bekannten Mikrosatelliten (Menotti-Raymond, 1999; 2003) wurden 11 ausgewählt (Tab. 1). Das hauptsächliche Auswahlkriterium ist die Variabilität der Marker in der Hauskatze; eine hohe Variabilität in dieser Art ist ein Hinweis auf eine ebenfalls hohe Variabilität in der nahe verwandten Wildkatze. Als Maß für die Variabilität eines Mikrosatelliten wird unter anderem die beobachtete Heterozygotie H_e herangezogen, d.h. der Anteil der Tiere, in denen zwei verschiedene Allele gefunden werden (Bsp.: wenn $H_e=0.9$, sind 90% der untersuchten Tiere an diesem Locus heterozygot).

In einem PCR-Ansatz wurden bis zu sechs Mikrosatelliten-Loci simultan amplifiziert.

Zur Auswertung der Daten wurden Programme für molekularsystematische und populationsgenetische Studien von verschiedenen Forschungsinstitutionen verwendet, die im Internet kostenlos zur Verfügung stehen. Für die Erstellung von Stammbäumen aus mtDNA-Sequenzen wurde im Projekt vorwiegend das Programm ‚MEGA2‘ (Kumar et al. 2001) verwendet. Es führt Parsimonie-, Distanz- und Wahrscheinlichkeitsmethoden für molekulare Daten aus. Populationsgenetische Standardparameter (Alleldiversität, Allelfrequenzen, Inzuchtkoeffizient u.a.m.) können z.B. mit den Programmen ARLEQUIN v2.02b (Schneider et al. 2002), FSTAT v2.9.1. (Goudet 1995) und GENEPOP v3.4 (Raymond & Rousset 1995) berechnet werden.

Probenmaterial

Die Probensammlung für die Kernfragestellung des Projekts im Bereich des Forstamts Rothenbuch (Spessart) erfolgte im Rahmen dreier Werkverträge im Herbst 2003 bzw. Frühjahr (Ranzzeit) und Herbst 2004. Die Lockstöcke wurden mit zwei Duftstoffen (Baldrian & Katzenminze) beködert, wodurch Wildkatzen angeregt werden sollten, sich an den Lockstöcken zu reiben und damit Haare zu hinterlassen. In den drei Sammelzeiträumen konnten 83 Haarproben gesammelt werden.

Der BN stellte Blut, Haare und Speichelproben von 12 Tieren zur Verfügung. Aus Zoos stammten 29 Vergleichsproben. Vom Senckenbergmuseum in Frankfurt wurden weitere 17 Proben überlassen.

43 Proben von Wildkatzen aus dem Solling und Harz (überlassen vom Niedersächsischen Landesamt für Ökologie) sowie 30 Proben aus der Eifel gewährleisteten den Vergleich der bayerischen Wildkatzenpopulation mit denen aus anderen wichtigen Verbreitungsgebieten in Deutschland.

Bei 12 Totfunden aus verschiedenen Gebieten wurde die Artzugehörigkeit bestimmt.

Weitere 33 Lockstockproben wurden von ehrenamtlichen Helfern des B.U.N.D. in Thüringen im Hainich und Thüringer Wald gesammelt. Diese Proben sind von besonderer Bedeutung, da sie die genetische ‚Basislinie‘ der dortigen Populationen bilden werden.

Ergebnisse

Sequenz-Analyse der mtDNA

Die Distanz-Analyse der D-loop Sequenzen ergibt einen Stammbaum mit fünf robusten Ästen (Abb. 3). In jeweils zwei davon gruppieren die Katzen, deren Artzugehörigkeit aufgrund der Morphologie bekannt war, eindeutig getrennt in Haus- und Wildkatzen'clustern'. Haus- und Wildkatzen sind also in mütterlicher Linie eindeutig genetisch unterscheidbar.

Von den Lockstockproben, die sicher von Wildkatzen stammen, weisen einige den Haplotypus eines Zuchttieres aus Thale auf. Diese Wildkatzen des Spessart könnten also auf die Auswilderung zurückgehen. Ein Totfund aus der Region (J038) könnte aufgrund des Haplotypus auf Schweizer Zuchttiere zurückzuführen sein.

Der überraschendste Befund nach Sequenzierung der ersten Lockstockproben war, dass der überwiegende Teil der gesammelten Proben offensichtlich von Hauskatzen stammt. Auf dem fünften Ast der Distanzanalyse finden sich Haplotypen von Lockstockproben, die keiner der beiden Arten zugeordnet werden konnte. Es könnte sich hierbei um eine autochthone (Wild-?)Katzenpopulation des Spessart handeln.

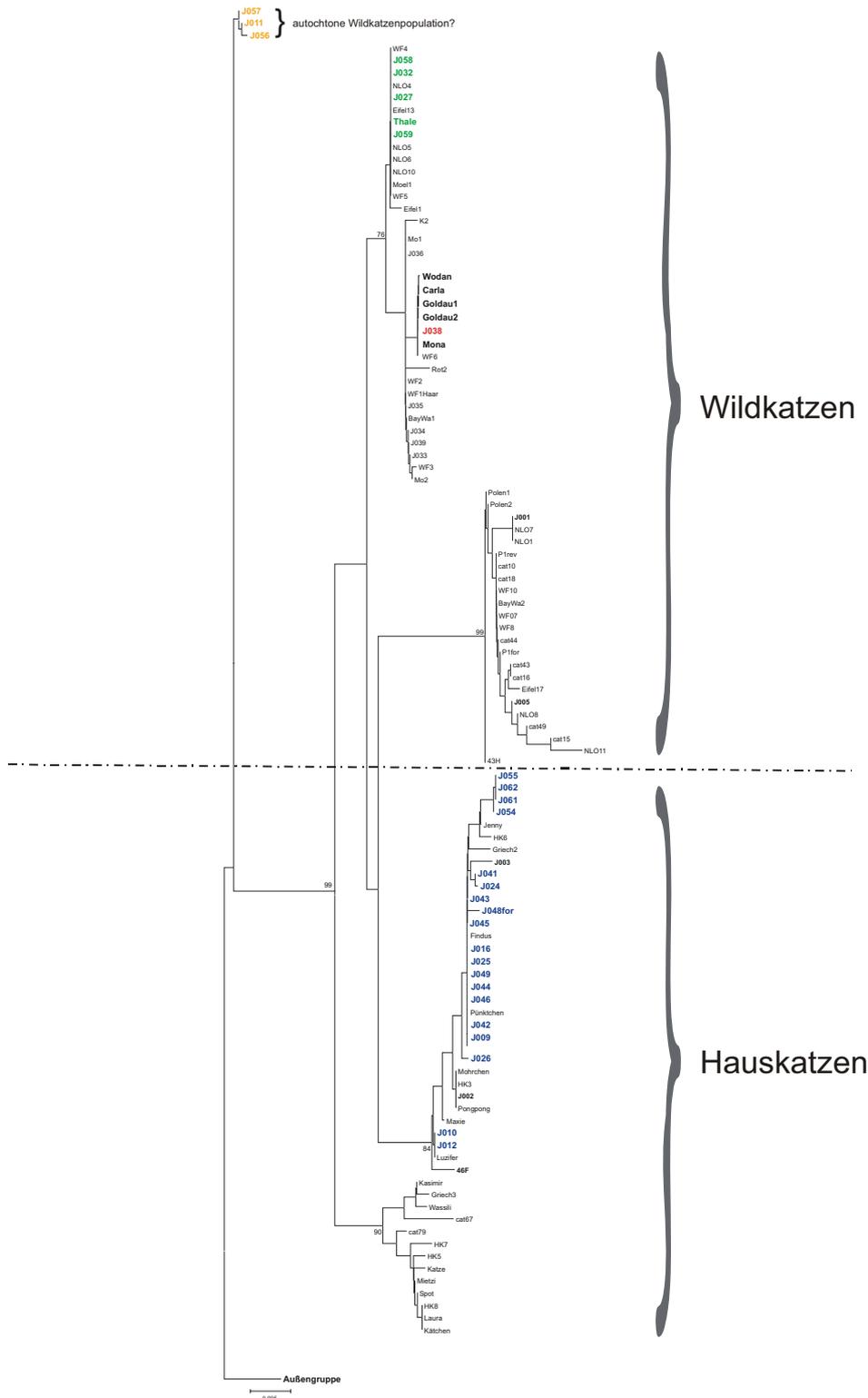


Abb.3: mtDNA/D-loop-Stammbaum (NeighbourJoining) der Haplotypen von Haus- und Wildkatzen. Die Analyse erfolgte mit dem Programm Mega v2.1 (Kumar et al. 1994)

Grün: Lockstockproben, die denselben Haplotypus wie die Auswilderungslinie aus Thale aufweisen.

Blau: Lockstockproben, die Hauskatzen zugeordnet werden können.

Gelb: Haplotypen, die auf eine autochthone Wildkatzenpopulation hindeuten.

Die Artzugehörigkeit von J002 & J003 sowie 46F war fraglich; sie gruppieren bei den Hauskatzen. Bei J001 und J005 handelt es sich in mütterlicher Linie um Wildkatzen2.

² Bei diesen Tieren handelt es sich um Totfunde aus Hessen, Thüringen und der Eifel.

Mikrosatelliten

Haus- und Wildkatzen weisen ein Heterozygoten-Defizit auf (H_o -Werte kleiner als H_e -Werte, positive F_{IS} -Werte). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Oliveria (2005) an Portugiesischen Haus- und Wildkatzen überein. Die Reduktion der Heterozygotie geht in der Regel auf nichtzufällige Paarung zurück. Hauskatzen sind also nicht so panmiktisch, wie gemeinhin angenommen. So besitzen z.B. nur die Hauskatzen aus dem Untersuchungsgebiet Rothenbuch (Lockstockproben) das Allel der Länge 127 in FCA8 (Tab. 1).

In den Wildkatzen überrascht der positive Inzuchtkoeffizient noch weniger, da ein Teil der untersuchten Tiere aus dem Auswilderungsprogramm stammt.

Die positiven F_{ST} -bzw. R_{ST} -Werte zeigen, dass beide Arten genetisch differenziert sind. Es findet also kaum genetischer Austausch (Hybridisierung) zwischen Haus- und Wildkatze statt³.

Zwei der Mikrosatelliten wurden bisher aus den folgenden Analysen ausgenommen. FCA 96 weist mehr ‚Stotterbanden‘ als normal auf, was die Auswertung deutlich erschwert⁴. Hier kam es bei der Auswertung sehr wahrscheinlich zu Fehlinterpretationen. Darauf deuten u.a. die ungewöhnlich hohen H_o –Werte hin.

In den Fränkischen Hassbergen gibt es seit einiger Zeit Sichtbefunde von Wildkatzen. Der sichere Nachweis steht aber noch aus. Ein wildfarbener Totfund aus den Hassbergen wurde daher zur Identifikation an das LfU geschickt und hier während der Berichterstellung sequenziert. Es handelte sich allerdings um eine Hauskatze.

³ F_{ST} und R_{ST} sind Werte für nicht-zufällige Reproduktion zwischen den Populationen. Wären sie null, würden sich die Populationen (hier: Haus- und Wildkatzen) vollständig genetisch austauschen. Beiden Werten liegen unterschiedliche Evolutionsmodelle von Mikrosatelliten zugrunde. Es werden immer beide Werte angegeben, da die Evolution von Mikrosatelliten nicht eindeutig geklärt ist.

⁴ Andere Autoren, die diesen Mikrosatelliten verwenden, machten ebenfalls die Beobachtung ungewöhnlich vieler Stotterbanden. Sie erwähnen es aber in der Regel nicht in den Publikationen (Oliveira & Hille, persönl. Kommunikation).

Locus	Art	Allelgröße (bp)	Allele/ Art	Allele/ Locus	„eigene“ Allele	H _o	H _e ⁵
FCA8	F.catus	117-145	13	14	3	0.727	0.875
	F. silvestris	117-145	11		1	0.800	0.865
FCA31	F.catus	217-237	10	11	3	0.667	0.823
	F. silvestris	217-239	8		1	0.778	0.724
FCA35	F.catus	135-164	9	13	2	0.425	0.616
	F. silvestris	135-164	11		4	0.619	0.846
FCA45	F.catus	140-160	15	17	4	0.818	0.867
	F. silvestris	142-160	13		2	0.721	0.853
FCA96	F.catus	173-220	8	18	3	0.872	0.644
	F. silvestris	183-232	15		10	1.000	0.904
FCA105	F.catus	174-202	11	11	2	0.822	0.825
	F. silvestris	186-202	9		0	0.833	0.854
F115	F.catus	176-245	37	44	13	n.b.	
	F. silvestris	194 ⁶ -249	31		7		
FCA123	F.catus	132-144	7	8	1	0.759	0.819
	F. silvestris	132-146	7		1	0.700	0.827
FCA124	F.catus	113-129	8	10	1	0.622	0.711
	F. silvestris	109-127	9		2	0.773	0.801
FCA126	F.catus	124-140	9	10	3	0.809	0.792
	F. silvestris	104-138	7		1	0.614	0.683
FCA223	F.catus	193-231	14	15	8	0.727	0.786
	F. silvestris	193-231	7		1	0.550	0.731
F.catus:	F _{IS} :	0.109	F _{ST} = 0.085		R _{ST} = 0.193		
F. silvestris :		0.151					

Tab.1: Werte der Mikrosatelliten für die 85 Individuen, deren vollständiger Datensatz im Berichtszeitraum ausgewertet wurde. F_{IS}-, F_{ST}- und R_{ST}-Werte ohne FCA96 & F115. F_{IS}-Werte berechnet mit GENETIX, F_{ST}- und R_{ST}-Werte mit GENEPOP; Berechnungen nach Weir & Cockerham (1984).

⁵ H_o = beobachtete Heterozygotie, d.h. der Anteil von Tieren, der tatsächlich heterozygot ist; H_e = erwartete Heterozygotie, d.h. Prozentsatz von Heterozygoten, der bei einer gegebenen Anzahl von unterschiedlichen Allelen zu erwarten ist. Die Werte für beobachtete und erwartete Heterozygotie sollten idealerweise in etwa gleich sein. Die Werte wurden berechnet mit dem Programm Genetix v4.05.2 (Belkhir et al.).

n.b.: nicht bearbeitet. Mit der Bearbeitung des zwölften Mikrosatelliten FCA 148 wurde erst kürzlich begonnen; die Rohdaten für diesen sind noch nicht ausgewertet.

⁶ ‚Polen3‘ besitzt als einziges untersuchtes Tier ein Allel der Länge 186 bp. Es wurde hier nicht aufgeführt, da es sich bei diesem Tier offensichtlich um einen Blendling handelt und daher nicht klar ist, ob das Allel ein Hauskatzen- oder Wildkatzen-Allel ist.

Eine Möglichkeit, die genetische Differenzierung von Haus- und Wildkatze grafisch darzustellen und damit gleichzeitig mögliche Hybride zu identifizieren, ist die Prinzipielle Faktorenanalyse, eine Adaptation der Prinzipiellen Komponentenanalyse („principal component analysis“, PCA). Durch PCA werden Strukturen und Unterschiede in multidimensionalen Daten (hier: unterschiedlich lange Mikrosatelliten-Allele) entdeckt⁷ (Abb. 4)

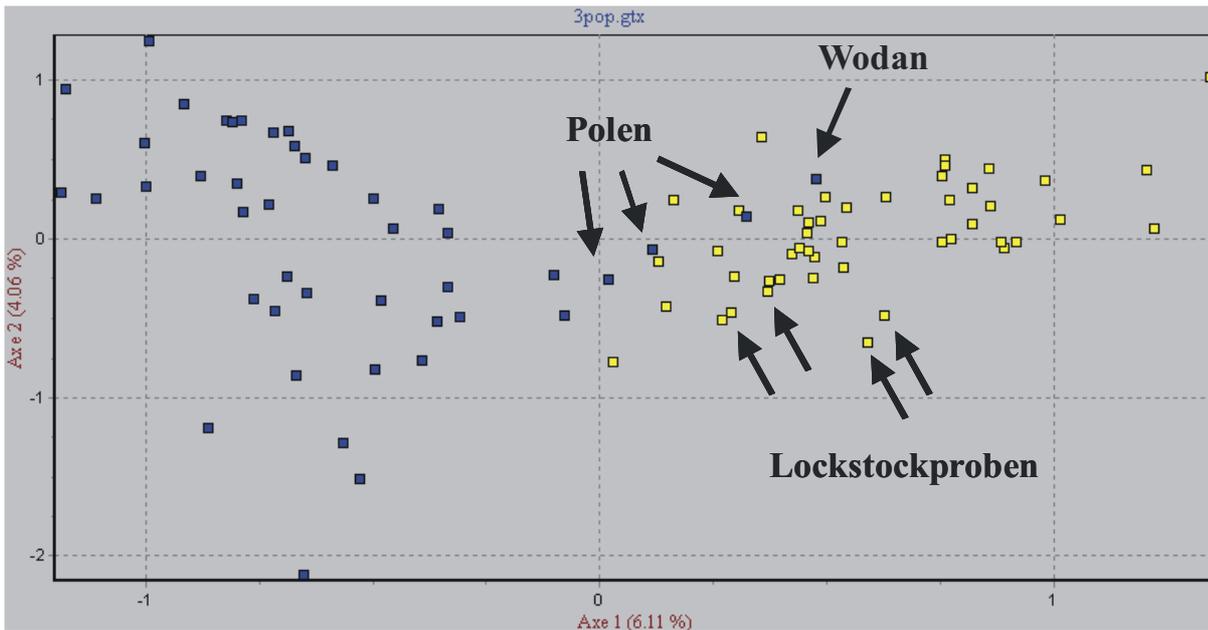


Abb.4: Prinzipielle Faktorenanalyse der Mikrosatelliten, erstellt mit Genetix v4.05.2 (Belkhir et al.). blau: Wildkatzen; gelb: Hauskatzen. Der Hauptfaktor (i.e. größter genetischer Unterschied) liegt zwischen den beiden Arten. Vier der nach morphologischen Kriterien als Wildkatzen eingestuft Tiere liegen im Übergangsbereich zu den Hauskatzen. Die Lockstockproben, die beim NeighborJoining der mtDNA bei den Hauskatzen gruppierten, clustern hier ebenfalls als Hauskatzen.

Die einzigen drei osteuropäischen Wildkatzenproben (Verkehrsofopfer) liegen im Übergangsbereich zu den Hauskatzen, sind also offensichtlich Blendlinge. Die Lockstockproben, die nach NeighborJoining-Analyse der mtDNA zu den Hauskatzen gruppierten, liegen hier ebenfalls im Bereich der Hauskatzen.

Bei der vierten Wildkatze, die (am weitesten) im Bereich der Hauskatzen liegt, handelt es sich um Wodan, einem Zuchtkater des Auswilderungsprogramms aus einem Schweizer Zoo. Bei Wodan handelt es sich offensichtlich um einen Blending.

⁷ Dies geschieht mit Hilfe von Matrix-Berechnung. Der Eigenvektor mit dem größten Eigenwert ist die ‚prinzipielle Komponente‘.

Die Mikrosatelliten wurden noch mit einem wahrscheinlichkeits-theoretischen Programm (STRUCTURE; Pritchard et al. 2000) analysiert. Das Programm bietet verschiedene Optionen, genetischen Austausch zwischen Populationen (z.B. zwischen Haus- und Wildkatzen oder zwischen Subpopulationen innerhalb der Wildkatzen) ‚zuzulassen‘. Es ermöglicht außerdem, die Daten zunächst ohne zusätzliche Information (vermeintliche Artzugehörigkeit) so zu berechnen, dass die Allele im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) sind⁸. Das Programm berechnet dann die wahrscheinlichste Anzahl von ‚Clustern‘.

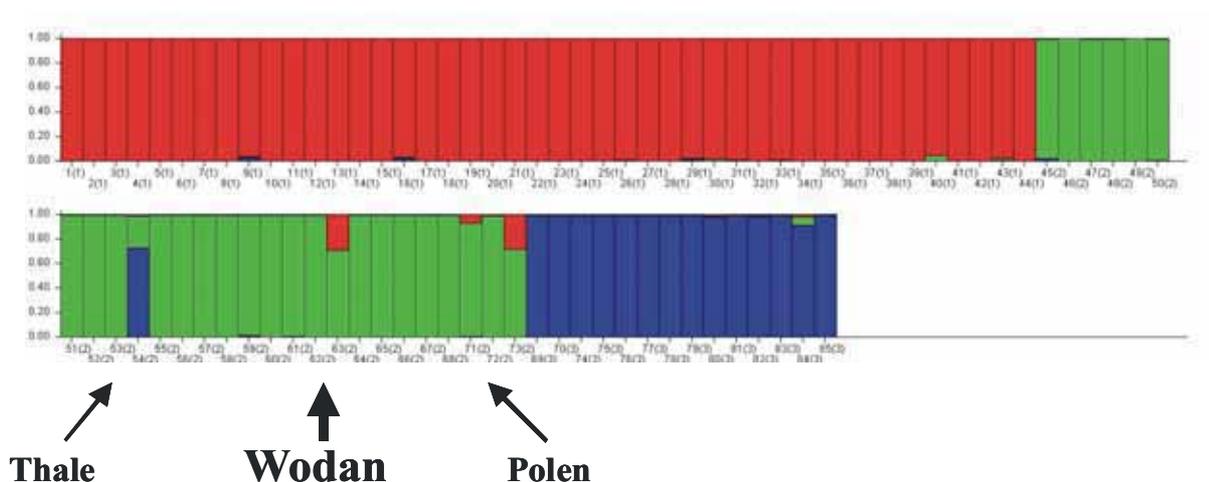


Abb.5: Berechnung der wahrscheinlichsten Anzahl von Clustern in STRUCTURE. Rot: Hauskatzen; blau: Wildkatzen (Eifel); grün: Wildkatzen (alle übrigen)

Structure erkennt in den vorliegenden Daten drei Cluster (Abb. 5). Eines sind die Hauskatzen, die kaum Anteile der anderen Genome enthalten. Bei den Wildkatzen erkennt das Programm zwei Cluster, die offensichtlich nur ausnahmsweisen genetischen Austausch untereinander oder mit den Hauskatzen haben. Die STRUCTURE-Analyse bestätigt den Blending-Status der drei polnischen Katzen und des Zuchtkaters Wodan. Dieser Status bleibt grundsätzlich (mit unterschiedlichen Anteilen des Hauskatzen-Genoms) unter allen angenommenen Modellen⁹ bestehen.

‚Thale‘ ist eine Zuchtkatze aus dem Wildpark Hexentanzplatz, deren ursprüngliche Herkunft uns nicht bekannt ist. Sie ist die einzige Wildkatze, bei der (sehr wahrscheinlich durch Kreuzung im Zoo) die beiden Wildkatzen Genome zum Austausch kamen.

⁸ Bei der Berechnung der F_{IS} -Werte in GENETIX und GENEPOP (nicht dargestellt) war für manche Loci eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht festgestellt worden. Dies sprach bereits für eine genetische Substrukturierung innerhalb der Wildkatzen.

⁹ z.B. admixture/no admixture, use prior population information

Diskussion

Drei Szenarien können diskutiert werden:

Die bisher untersuchten und Hauskatzen zugeordneten Haarproben stammen von reinen Hauskatzen

Angesichts der bei den Hauskatzen beobachteten Variabilität scheint diese Annahme eher unwahrscheinlich zu sein, da sich die Haplotypen der untersuchten Katzen stark ähneln. Weiterhin ist die geografische Distanz zwischen den einzelnen Probenorten beträchtlich, so dass es nahezu ausgeschlossen erscheint, dass es sich um die gleichen Individuen handelt. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass sich neben einzelnen Wildkatzen (Auswilderungstiere) aus wenigen Hauskatzen eine eigenständige Katzenpopulation etabliert hat. Daher sollten auch die Umgebung und die vermuteten Wanderungswege überprüft werden, um Anhaltspunkte über den Verbleib der ausgewilderten Katzen zu gewinnen.

Die bisher untersuchten Haarproben entstammen einer Hybridpopulation von Wild- und Hauskatzen

In den vergangenen Jahren könnte sich durch Verpaarung etablierter Hauskatzen und ausgewilderter Wildkatzen eine Population ausgebildet haben, welche die genetischen Eigenschaften beider Katzenarten aufweist. Diese Tiere könnten sich in einer funktionierenden Populationsstruktur etabliert haben, welche die natürlichen Ressourcen (Nahrung, Habitat) ausnutzt und es neu hinzu gekommenen Katzen schwer bis unmöglich macht, sich ebenfalls dort anzusiedeln.

Die Haarproben entstammen einer autochthonen Wildkatzenpopulation

Wegen der geografischen Lage des Forstamtes in einem Winkel zweier kreuzender Autobahnen ist eine Inselsituation mit daraus resultierendem fehlenden genetischen Austausch mit anderen Populationen durchaus möglich. Eine endgültige Klärung steht noch aus.

Zusammenfassung

- Mit molekularbiologischen Methoden sind Haus- und Wildkatzen unterscheidbar.
- Wildkatzenpopulationen können genetisch charakterisiert werden.

- Es konnten Nachkommen bzw. der Haplotypus von ausgewilderten Tieren nachgewiesen werden.
- Hoher Anteil von Hauskatzen im Spessart könnte eine Gefahr des Wildkatzenbestands darstellen.
- In künftigen Auswilderungsprogrammen sollte die aktuelle Situation vor Ort berücksichtigt werden und genaue Daten zu Zeit, Ort und genetischer Ausstattung erhoben und archiviert werden.
- Tiere sollten vor der Aussetzung auf 'Reinrassigkeit' geprüft sein.

Literatur

Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J., Chikhi, L., Raufaste, N. & F. Bonhomme (1996-2004): Genetix 4.03, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UMR 500, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Goudet, J. (1995): FStat, a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86:485-486.

Kumar, S., Tamura, K. & M. Nei (1994): Mega: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.* 10:189-191

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. & M. Nei (2001): *MEGA2*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, *Bioinformatics* 17:1244-1245.

Menotti-Raymond, M., David, V.A., Lyons, L.A., Schaffer, A.A., Tomlin, J.F., Hutton, M.K. & S.J. O'Brien (1999): A Genetic Linkage Map of Microsatellites in the Domestic Cat (*Felis catus*). *Genomics* 57:9-23.

Menotti-Raymond, M., David, V.A., Agarwala, R., Schaffer, A.A., Stephens, R., O'Brien, S.J. & W.J. Murphy (2003): Radiation hybrid mapping of 304 novel microsatellites in the domestic cat genome. *Cytogenetic and Genome Research* 102:272-276.

Oliveira, R. (2005) : Analysis of hybridisation between wild and domestic cat in Portugal: implications for conservation. Diplomarbeit Universität Porto.

Piechocki, Rudolf (1990),: Die Wildkatze. Brehm, Wittenberg. S. 232 S.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Rosenberg, N.A. & P. Donnelly (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.

Raymond M. & F. Rousset (1995): Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86:248-249.

Schneider, S., Rössli, D. & L. Excoffier (2002): Arlequin: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Weir, B.S., & C.C. Cockerham (1984): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Allgemeinen Umweltfonds durch das Bayerische Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz gefördert.

Umweltchemikalien und Schwermetalle

Schwermetallbindung durch Blaualgen

**Stefan Knauss, Dominik Doyscher, Monika Ratzinger, Iris Maldener
AG Maldener, Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie, Universität
Regensburg**

Einleitung

Die Lösung der Wasserfrage ist eine zentrale Herausforderung des 21. Jahrhunderts. Unterstrichen wird die Bedeutung der Wasserfrage durch die Ausrufung des Jahres 2003 zum "International Year of Freshwater" durch die Vereinten Nationen. Damit soll sowohl die Einlösung des Millenniums-Zieles in Bezug auf Trinkwasser (Halbierung des Anteils der Menschen ohne Zugang zu sicherem Trinkwasser bis 2015, z. Zt. rund 1,1 Mrd. Menschen weltweit), unterstützt werden als auch die Erreichung des auf dem Nachhaltigkeitsgipfel im September 2002 in Johannesburg vereinbarten Zieles in Bezug auf Abwasser (Halbierung des Anteil der Menschen ohne adäquaten Zugang zur Abwasserentsorgung, z. Zt. ca. 2,4 Mrd. weltweit).

Im Wasserentwicklungsbericht der Vereinten Nationen (2003) werden Schwermetalle gleich zu Beginn als einer der Hauptverunreinigungsformen genannt.

Schwermetalle sind Metalle hoher Dichte, die aufgrund ihrer hohen Reaktivität bereits in sehr niedrigen Konzentrationen (μM bis mM) toxisch wirken. Die hohe Reaktivität macht einige Schwermetalle (z.B. Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) aber auch zu zentralen Bestandteilen wichtiger Enzyme; diese sind daher essentiell. Andere (z.B. Cd^{2+} , Hg^{2+}) sind nicht essentiell und entfalten ihre Toxizität teilweise gerade dadurch, dass sie essentielle Schwermetalle aus Enzymen verdrängen. Die Konzentration aller Schwermetalle in den Zellen muss also streng kontrolliert werden, um die Ordnung innerhalb der Zellen aufrecht zu erhalten.

Das Beispiel Cadmium zeigt anschaulich die Belastung des Wassers durch Schwermetalle. Cadmium wird bei der Erzverhüttung, in Legierungen, bei der Herstellung von Farben und Batterien, im Korrosionsschutz und in der Reaktortechnik verwendet. Die EU hat für oberirdische Binnengewässer als Qualitätsziel $5 \mu\text{g/l}$ festgelegt (Richtlinie 83/513/EWG), doch konnten auch schon bei geringeren Konzentrationen Schädigungen festgestellt werden ($0,7 \mu\text{g Cd}^{2+} / \text{l}$ bei *Daphnia magna*; Eisler, R. 1985). Das eigentliche Problem stellt aber die Nichtabbaubarkeit und die daraus resultierende Anreicherung des

Cadmiums in den Sedimenten und in der Nahrungskette dar. Am schrecklichsten wurde dies in Japan durch das epidemische Auftreten der Itai-Itai Krankheit deutlich, unter der die Bevölkerung entlang dem Jinzu zu leiden hatte (Berglund *et al.*, 2000). Das Wasser des Jinzu wurde durch Minen, in denen Silber, Zink, Blei und Kupfer gewonnen wird, stark mit Cadmium belastet. Der Reis, der auf Feldern geerntet wurde, die durch den Jinzu bewässert wurden, zeigte eine starke Cadmiumanreicherung. Die Menschen, die von diesem Reis lebten und auch ihr Trinkwasser teilweise aus dem Jinzu bezogen, hatten unter sehr schmerzhaftem Knochenschwund und Nierenfehlfunktionen zu leiden.

Konventionelle Technologien der Schwermetallentfernung

Konventionelle Technologien der Schwermetallentfernung, wie chemische Fällung, Ionenaustausch oder elektrochemische Verfahren, sind vor allem im unteren Konzentrationsbereich häufig weder effektiv noch ökonomisch (Wilde und Beneman, 1993). Membrantrennverfahren, wie Elektrodialyse oder Umkehrosmose, sind zwar auch bei geringen Konzentrationen anwendbar, aber sehr teuer. Die Adsorptionsverfahren werden nur noch vereinzelt angewandt, da eine Regeneration des Adsorbens oft nur bedingt möglich ist. Die wichtigsten Adsorbentien stellen Aktivkohle, Aluminiumstäube, keramische und pflanzliche Materialien (Cellulose, Xanthate) dar (Klimmek, 2003). In vergleichenden Analysen zur Biosorption von Schwermetallen konnten Cyanobakterien die größten Mengen binden (Klimmek *et al.*, 2001). Bei der Verwendung toten, homogenisierten Cyanobakterienmaterials, wie dies in der genannten Studie geschah, stellt sich aber das Problem der Entsorgung kontaminierter Biomasse. Es besteht also ein hoher Bedarf an kostengünstigen, schnellen und leicht handhabbaren Verfahren, Schwermetalle aus Industrieabwässern zu entfernen.

Das Projekt „Schwermetallbindung durch Blaualgen“

Im Projekt „Schwermetallbindung an Blaualgen“ sollen nun die Möglichkeiten der Nutzung von transgenen Blaualgen (Cyanobakterien) zur Reinigung schwermetallbelasteter Abwässer untersucht werden. In lebenden Zellen werden Schwermetalle zur Entgiftung bzw. zur Aufrechterhaltung der Schwermetallhomöostase mit Hilfe von Cystein-reichen Proteinen (i. e. S. Metallothioneine und Phytochelatine) gebunden. Die Präsentation solcher Proteine an der Oberfläche von Bakterien sollte es erlauben aus Abwässern Schwermetalle reversibel zu binden, so dass eine getrennte Entsorgung bzw. ein Recycling von Schwermetall und Biomasse möglich wird. Eine Exposition eigentlich

löslicher Metallothioneine bzw. Phytochelatine an der Zelloberfläche kann durch die Fusion mit einem Transmembranprotein, einem so genannten Ankerprotein, erreicht werden (Lee *et al.*, 2003).

Generell sollte die Verwendung photosynthetisch aktiver Bakterien kostengünstiger gegenüber der Verwendung von heterotrophen Bakterien sein, da hierbei keine teuren Medien zur Ernährung nötig sind. Cyanobakterien sind gut genetisch charakterisiert. Einige Genome sind bereits vollständig sequenziert, und Methoden der gentechnischen Manipulation sind beschrieben.

Zudem werden Mikroalgen bereits in der Abwassertechnik verwendet. Sie können als positiver Nebeneffekt Phosphat und Stickstoffverbindungen aufnehmen und damit Biomasse aufbauen, die beispielsweise in einem Bioreaktor weiter verwendet werden kann.

Gentechnisch erzeugte Cyanobakterienmutanten

Im vorliegenden Projekt sollen nun Blaualgen, wie die stickstofffixierende *Anabaena* PCC 7120 oder die einzellige *Synechococcus* PCC 7942, durch das Einbringen von gentechnisch hergestellten Konstrukten dazu befähigt werden Schwermetalle an ihrer Oberfläche zu binden. Diese transgenen Blaualgen sollen auf ihre Eignung zur Dekontaminierung von schwermetallbelasteten Abwässern untersucht werden. Weiter sollen Verfahren zur kostengünstigen Wiedergewinnung und Wiederverwertung des Rohstoffes Schwermetall und der Biomasse entwickelt werden.

Als Ankerprotein wurde für *Anabaena* PCC 7120 das *Outer Membrane* Protein Alr0834 gewählt, welches für ein typisches bakterielles Porin, ein β -Fass, kodiert. In *E. coli* wurden solche β -Fässer bereits erfolgreich in ganz ähnlichen, so genannten „Sandwich-Fusionen“ als Ankerproteine verwendet (Sousa *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999). Eine *alr0834*-Disruptionsmutante zeigte, dass *alr0834* kein essentielles Gen ist; allerdings konnte ein etwas langsames Wachstum beobachtet werden. Die Stickstofffixierung in einer solchen „knock-out“-Mutante ist nicht beeinträchtigt.

Mit dem Porin Alr0834 sollte nun sowohl ein Metallothionein als auch ein Phytochelatin in der äußeren Membran verankert werden. Metallothioneine sind wie Phytochelatine kleine Cystein-reiche Proteine, die der Schwermetallhomöostase bzw. der Entgiftung in der Zelle dienen. Der Hauptunterschied zwischen den beiden besteht in ihrer Synthese. Während Metallothioneine wie andere Proteine auch im Genom kodiert sind und am Ribosom synthetisiert werden, wird Phytochelatin durch ein spezielles Enzym - die Phytochelatinsynthase - aus Glutathion synthetisiert. Dabei werden die einzelnen Bausteine

nicht wie am Ribosom über eine α -Carboxylgruppe verknüpft sondern über die γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure. Es konnte aber gezeigt werden, dass diese ungewöhnliche Art der Verknüpfung keinen Einfluss auf die Metallbindefähigkeit hat (Bae and Mehra, 1997).

So wurde ein synthetisches Gen mit 20 Wiederholungen von alternierender für Glutaminsäure bzw. Cystein kodierender Triplets, hergestellt, und in eine Region des Ankerproteins eingebracht, die für eine nach außen zeigende Schleife kodierende sollte. Als Metallothionein wurde *smtA* aus *Synechococcus* PCC 7942 kloniert und in dieselbe Region eingefügt (Abbildung 1 A).

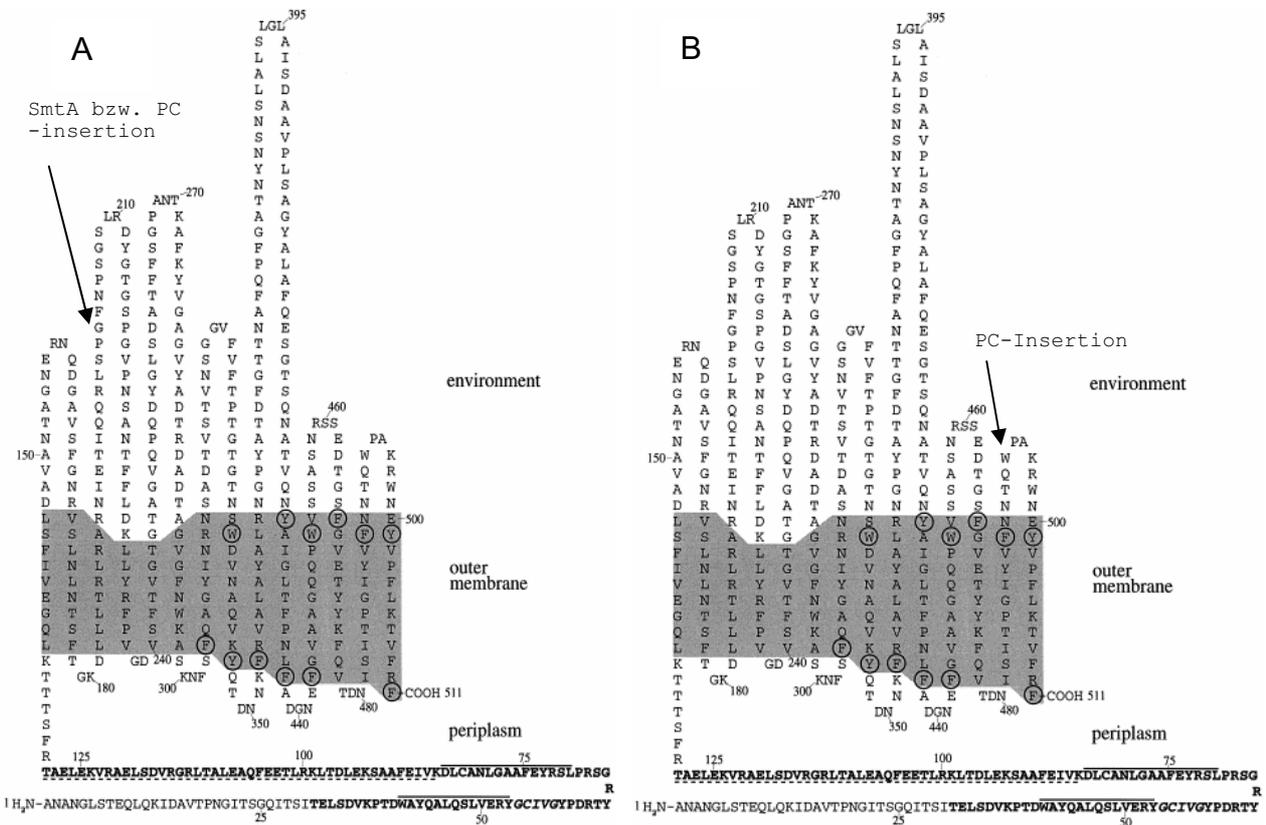


Abbildung 1: Insertionsstellen der Schwermetallbindeproteingene im Poringen; A für *Anabaena* PCC 7120; B, für *Synechococcus* PCC 7942. (nach Hansel *et al.* 1998). Smt A: *Synechococcus* PCC 7942 Metallothionein A; PC: synthetisches Phytochelatingen

Weiter wurden Konstrukte hergestellt, die die Fusionen unter die Kontrolle eines in Cyanobakterien starken Promotors, des *psbA*-Promotors, stellt.

Alle Konstrukte wurden in Vektoren eingebracht, die für die Konjugation mit *Anabaena* PCC 7120 geeignet sind. Zunächst wurde mit Hilfe einer Antibiotikaresistenz auf Klone selektiert, die durch eine einzelne homologe Rekombination, den Vektor ins Genom integriert hatten. Von diesen ausgehend wurde auf Klone selektiert, die in einer zweiten homologen Rekombination die Vektorsequenz wieder verloren hatten. Dabei kann

entweder der Genotyp des Wildtyps wiederhergestellt werden, oder aber das Wildtypallel wird durch das eingebrachte Konstrukt ersetzt. Solche Klone wurden durch PCR-Analysen identifiziert (Abbildung 2).

Im Falle von *Synechococcus* PCC 7942 diente SomA als Ankerprotein, welches dem Porin Alr0834 aus *Anabaena* PCC 7120 sehr ähnlich ist. Auch hier wurde das synthetische Phytochelatingen in eine Region eingebracht, die für eine nach außen weisende Schleife kodieren sollte (Abbildung 1 B).

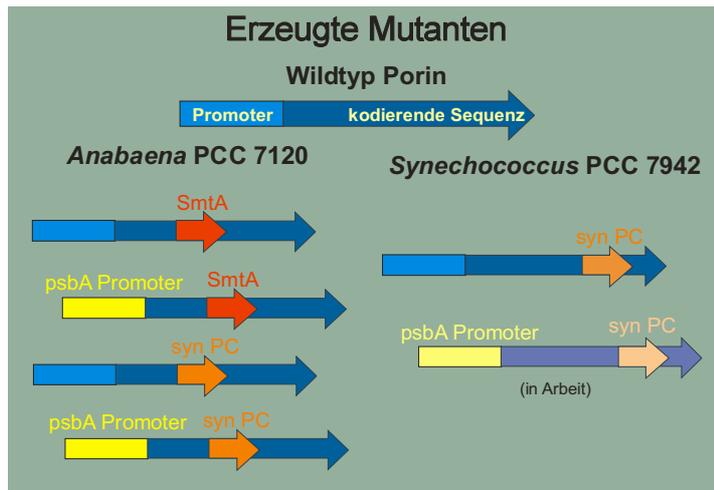


Abbildung 2: Erzeugte *Anabaena* PCC 7120 bzw. *Synechococcus* PCC 7942 Mutanten, deren Wildtypporine jeweils durch die dargestellten Konstrukte ersetzt wurden. smt A: *Synechococcus* PCC 7942 Metallothionein A; syn PC: synthetisches Phytochelatingen.

Bestimmung der Bioakkumulation

Für die Bestimmung der Metallbindefähigkeit der Mutanten wurden exakt bestimmte Mengen an logarithmisch wachsenden Zellen in eingestellten Lösungen von $\text{CdCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ bzw. $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2$ resuspendiert und bei 30°C und 100 rpm inkubiert. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert, und die Überstände in einem ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrophotometer) gemessen. Die pelletierten Zellen wurden gewaschen und in 5 mM EDTA für 15 min inkubiert um die an Oberfläche gebundenen Metallionen wieder abzulösen. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert, und die erhaltenen Überstände schließlich im ICP-AES gemessen. Zunächst mussten allerdings noch für die Inkubationen geeignete Puffer gefunden werden, in denen die Metalle nicht ausfallen, und in denen die Cyanobakterien gut leben können.

Erste Messungen der Mutanten, die das synthetische Phytochelatingen tragen, zeigten tatsächlich eine Steigerung der Metallakkumulation um etwa 100 % (Abbildung 3).

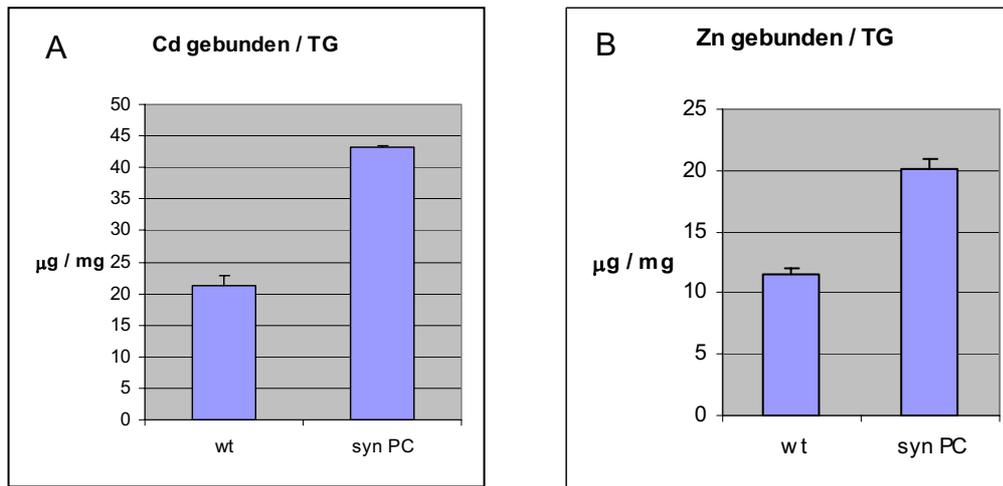


Abbildung 3: Bindung durch *Anabaena* PCC 7120, die ein synthetisches Phytochelatin im Porin *alr0834* präsentieren soll. Gemessen wurde die im Überstand verbliebene Metallkonzentration; dargestellt ist die daraus berechnete gebundene Metallmenge in µg pro eingesetzter Cyanobakterienmenge in mg Trockengewicht; die Inkubationszeit betrug 24 h. A, Inkubation mit 130 µM CdCl₂; B, Inkubation mit 130 µM Zn(SO₄)₂.

Auch die an der Oberfläche gebundene Menge, welche mit EDTA wieder abgelöst werden konnte, war um etwa denselben Faktor gesteigert (Abbildung 4).

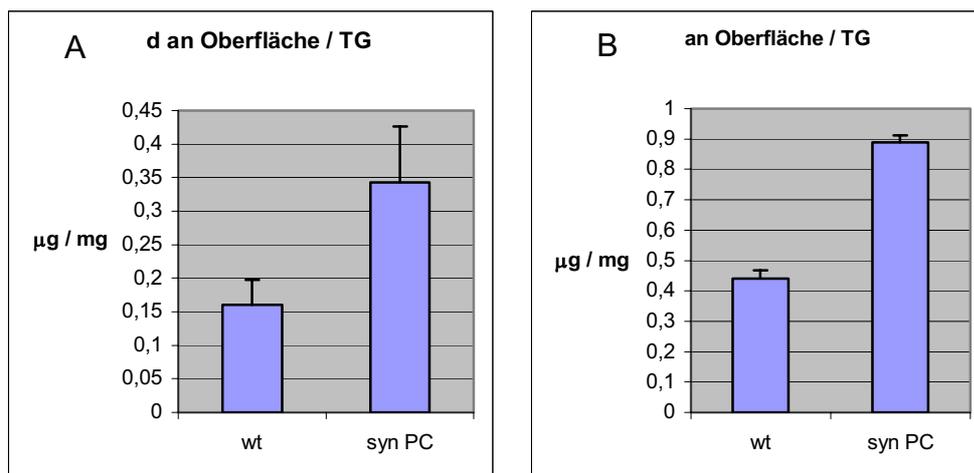


Abbildung 4: An der Oberfläche gebundenes Cadmium (welches mit EDTA abgelöst wurde) auf die eingesetzte Biomasse bezogen, nach 24 h Inkubation. A, *Anabaena* PCC 7120 in 20 µM CdCl₂ inkubiert; B, *Synechococcus* PCC 7942 in 100 µM CdCl₂ inkubiert.

Ein Vergleich unterschiedlicher Inkubationszeiten zeigte, dass bei längerer Inkubation die Bindung der Mutanten besser wird (Abbildung 5), was damit zusammenhängen könnte, dass nicht von Metallionen gebundene –SH-Gruppen leicht oxidiert werden (Sousa *et al.*, 1998), also eventuell nur die Metallbindepoteine, die in Gegenwart von Metallionen exprimiert werden, auch funktionell sind und zur gemessenen Metallbindung beitragen können. Die gemessene Bindung nach kurzer Inkubation könnte, neben der wohl geringen

Menge an neu synthetisiertem Protein darauf zurück zu führen sein, dass Metallionen, die im Wachstumsmedium vorhanden waren, verdrängt wurden.

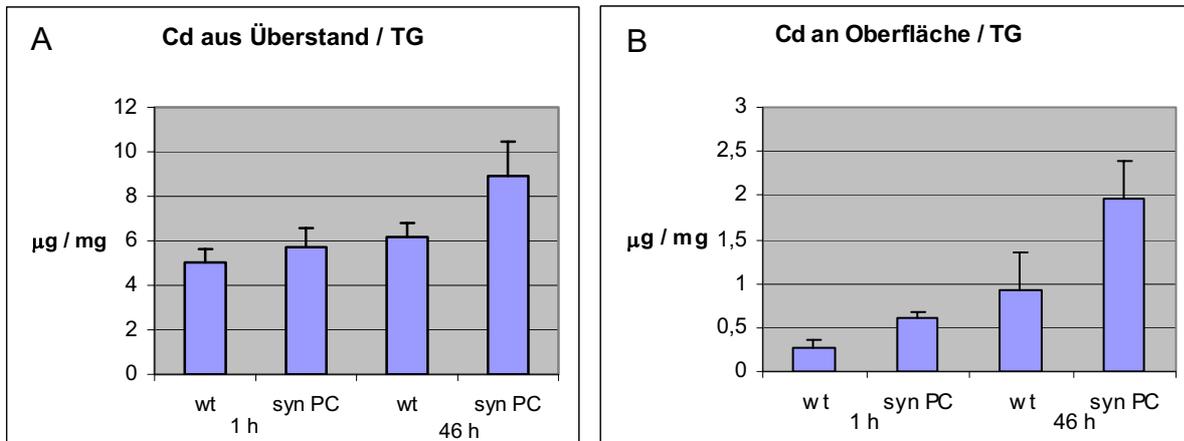


Abbildung 5: *Synechococcus* PCC 7942 in 100 μM CdCl_2 inkubiert für die angegebene Zeit. A, Cadmium aus Überstand gebunden; B, Cadmium wieder von der Oberfläche abgelöst.

Ob die Differenz zwischen der erhöhten Gesamtbindung und der erhöhten Oberflächenbindung tatsächlich mit einer erhöhten Metallaufnahme zusammenhängt, oder ob sie darauf hindeutet, dass bei der EDTA-Ablösung nur ein Teil von der Oberfläche abgewaschen wird, bleibt noch zu klären.

Weitere Teilprojekte

Daneben soll in Expressionsstudien untersucht werden wie stark die Fusionsproteine in *Anabaena* bzw. *Synechococcus* exprimiert werden.

Mutanten, die zusätzlich einen STREP-tag im Ankerprotein integriert haben, sollen dazu dienen in Immunmarkierungen lebender Zellen nach zu prüfen, ob die ausgewählte Schleife in Porin Alr0834, in dem das Metallothionein bzw. das synthetische Phytochelatin präsentiert werden soll, tatsächlich nach außen zeigt.

In Zusammenarbeit mit Rent-a-Scientist und ATZ-Evus sollen kostengünstige Verfahren zur Trennung von Metallpräzipitate und Cyanobakterien entwickelt werden. In Zusammenarbeit mit Schmack-Biogas soll schließlich die Biomasse auf Rückstände untersucht und die Verwertung in Biogasfermentern getestet werden

Danksagung

Wir danken dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz für die finanzielle Förderung des Projektes. Dr. H. Huber (Mikrobiologie, Universität Regensburg) ermöglichte die Metallkonzentrationsmessungen am ICP-AES seines Institutes.

Literatur

Bae, W. and Mehra, R. K. (1997): Metal-Binding Characteristics of a Phytochelatin Analog (Glu-Cys)₂Gly. *J Inorg Biochem.* **68**: 201-210

Berglund, M., Akesson, A., Bjellerup, P. and Vahter, M. (2000): Metal-bone interactions. *Toxicol Lett.* **112-113**: 219-25.

Eisler, R. (1985): Cadmium Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. *U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report* **85** (1.2).

Hansel, A., Pattus, F., Jürgens, U. J. and Tadros, M. H. (1998): Cloning and characterization of the genes coding for two porins in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* PC 6301. *Biochim Biophys Acta* **1399**: 31-39.

Klimmek, S. (2003): Charakterisierung der Biosorption von Schwermetallen an Algen. *Dissertation, Technische Universität Berlin, Prozesswissenschaften.*

Klimmek, S., Stan, H. J., Wilke, A., Bunke, G. and Buchholz, R. (2001): Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae. *Environ Sci Technol.* **35**: 4283-8.

Lee, S. Y., Choi, J. H. and Xu, Z. (2003): Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol.* **21**: 45-52.

Sousa, C., Kotrba, P., Ruml, T., Cebolla, A. and De Lorenzo, V. (1998): Metalloadsorption by *Escherichia coli* cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB. *J Bacteriol.* **180**: 2280-4.

Wilde, E. W. and Benemann, J. R. (1993): Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnol Adv.* **11**: 781-812.

Xu, Z. and Lee, S. Y. (1999): Display of polyhistidine peptides on the *Escherichia coli* cell surface by using outer membrane protein C as an anchoring motif. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 5142-7.

Untersuchung der Toxizität von Umweltchemikalien in gentechnisch veränderten Zellen

Katharina Fuchs und Elmar Richter

Walther Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Goethestrasse 33, 80336 München

Einleitung

Die Bedeutung von humanen fremdstoffmetabolisierenden Enzymen für die Toxizität von Umweltchemikalien aus der Reihe der aromatischen Amine und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK), alleine oder in verschiedenen Kombinationen, ist noch weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von humanen Enzymen, Cytochrom P450 (hCYP) und N-Acetyltransferase 2 (hNAT2) in parentalen (ohne CYP Aktivität) und gentechnisch veränderten V79 Chinesischen Hamsterzellen, die hCYP1A1, hCYP1B1, hCYP1A2 und/oder hNAT2) stabil exprimieren, untersucht. Die Zellen wurden von Prof. Döhmer (GenPharmTox, Martinsried) zur Verfügung gestellt. Zum Einsatz kamen die kanzerogenen aromatischen Amine 4-Aminobiphenyl (4-ABP) und *o*-Toluidin (*o*-Tol), das nicht kanzerogene *m*-Toluidin (*m*-Tol), die kanzerogenen PAK Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P) und Dibenzo[*a*,*l*]pyren (DB[*a*,*l*]P) und das nicht kanzerogene Pyren (Abb. 1).

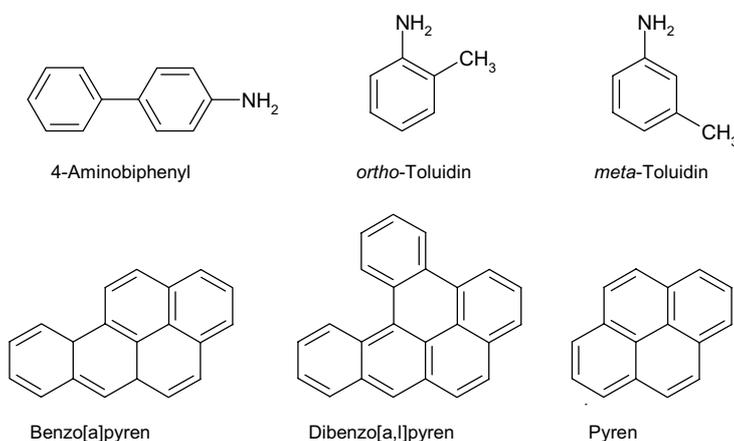


Abb. 1: Prüfsubstanzen

Die Cytotoxizität wurde mit dem MTT Assay bestimmt, die Genotoxizität anhand der im Comet Assay nachweisbaren DNA-Schäden. Für die Mutagenitätsuntersuchung wurde der

HPRT-Test eingesetzt. Mit Hilfe des ^{32}P -Postlabelings wurden DNA-Addukte nach Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen analysiert.

Material und Methoden

Zellkultur

V79MZ-Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in 75 cm² Gewebekulturflaschen in DMEM-Kulturmedium (Dulbecco's MEM) mit 2 mM L-Glutamin, 10% FCS (fötales Kälberserum), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert („Komplettmedium“). Zur Selektion wurden pro ml Komplettmedium entweder Geneticin[®] oder Hygromycin B zugegeben.

MTT Assay

Der MTT Assay wurde mit Modifikationen nach Luch *et al.* [1] durchgeführt. 250 Zellen/well wurden in 0,1 ml Medium in 96-well Mikrotiterplatten 72 h mit der jeweiligen Testsubstanz inkubiert. Danach wurde 1,0 mg/ml MTT [3(4,5-dimehylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazolium bromid] zugegeben und 1 h inkubiert. Die entstandenen Formazankristalle wurden in 0,1 ml DMSO gelöst. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch gemessen. Die Ergebnisse wurden zu den Negativkontrollen prozentual in Beziehung gesetzt und der EC₅₀-Wert ermittelt.

Alkalischer Comet Assay (Einzelzell-Mikrogelelektrophorese)

Der Comet Assay ist eine mikrogelelektrophoretische Technik, die es ermöglicht, DNA-Schäden wie Einzel- und Doppelstrangbrüche einzelner Zellen zu untersuchen. Der Comet Assay wurde nach Tice *et al.* [2] mit methodischen Modifikationen durchgeführt.

V79MZ-Zellen wurden bis zu 72 h mit den Fremdstoffen bei 37 °C inkubiert und anschließend in Agarose aufgenommen, auf einen bereits mit Agarose beschichteten Objektträger gegeben und einem alkalischen Puffer ausgesetzt. Durch die alkalische Hydrolyse trennen sich einerseits die DNA-Doppelstränge, andererseits werden alkalisensitive DNA-Veränderungen, wie z.B. AP-Stellen, in Strangbrüche umgewandelt. In der folgenden Elektrophorese wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente schneller zur Anode und bilden als Maß für DNA-Schäden einen Kometenschweif (comet tail) aus, der nach Färbung mit Ethidiumbromid im Fluoreszenzmikroskop an jeweils 50 Zellen/Objektträger vermessen wurde. Als Maß für die DNA Schädigung (bzw. DNA-Migration) wurde der sog. Olive tail moment (OTM = Länge des Kometenschweifes x

prozentualer DNA-Anteil im Schweif) verwendet, der als $MW \pm SE$ der 50 Zellen angegeben wird.

HPRT Assay

Dieser Test dient zum Nachweis von Mutationen im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen und wurde nach Mahadevan *et al.* [3] durchgeführt. Der HPRT-Test dient zum Nachweis möglicher Mutagene und Kanzerogene in Säugetierzellen. Die Mutagenese des HPRT-Gens kann verfolgt werden, indem die Zellen einem 6-Thioguanin-haltigen Medium ausgesetzt werden. Es überleben nur solche Zellen, die aufgrund einer Mutation (HPRT-*neg*) das Thioguanin nicht in die chromosomale DNA einbauen können. Die Zahl der Kolonien ist ein Maß für das mutagene Potenzial eines Fremdstoffes und seiner Metaboliten.

³²P-Postlabeling zum Nachweis von DNA-Addukten

Das ³²P-Postlabeling stellt eine allgemeine Methode zum Nachweis von Fremdstoffen dar, die kovalent an Basen der DNA gebunden sind. Sie ist die zur Zeit empfindlichste Methode, mit der bei Verwendung von 10 µg DNA der Nachweis von 1 bis 10 Addukten in 10¹⁰ normalen Nukleotiden gelingt [4]. Der ³²P-Postlabeling Assay wurde mit Butanol-Extraktion zur Anreicherung nach Gupta und Earley [5] durchgeführt. Dazu wurden Aliquots der DNA enzymatisch zu Nukleosid-3'-Phosphaten verdaut, angereichert und schließlich durch T4-Polynukleotid-Kinase mit [γ -³²P]-ATP radioaktiv markiert. Die anschließende dünnschichtchromatografische Trennung der Addukte erfolgte auf PEI-Cellulose unter Standardbedingungen.

Ergebnisse

Cytotoxizität

Keines der in V79MZ-Zellen exprimierten humanen Cytochrome beeinflusst die Toxizität der aromatischen Amine. Dagegen ist für die Toxizität von B[a]P (hCYP1A1) und DB[a,l]P (hCYP1A1 und hCYP1B1) der Metabolismus durch Humanenzyme entscheidend verantwortlich (Abb. 2).

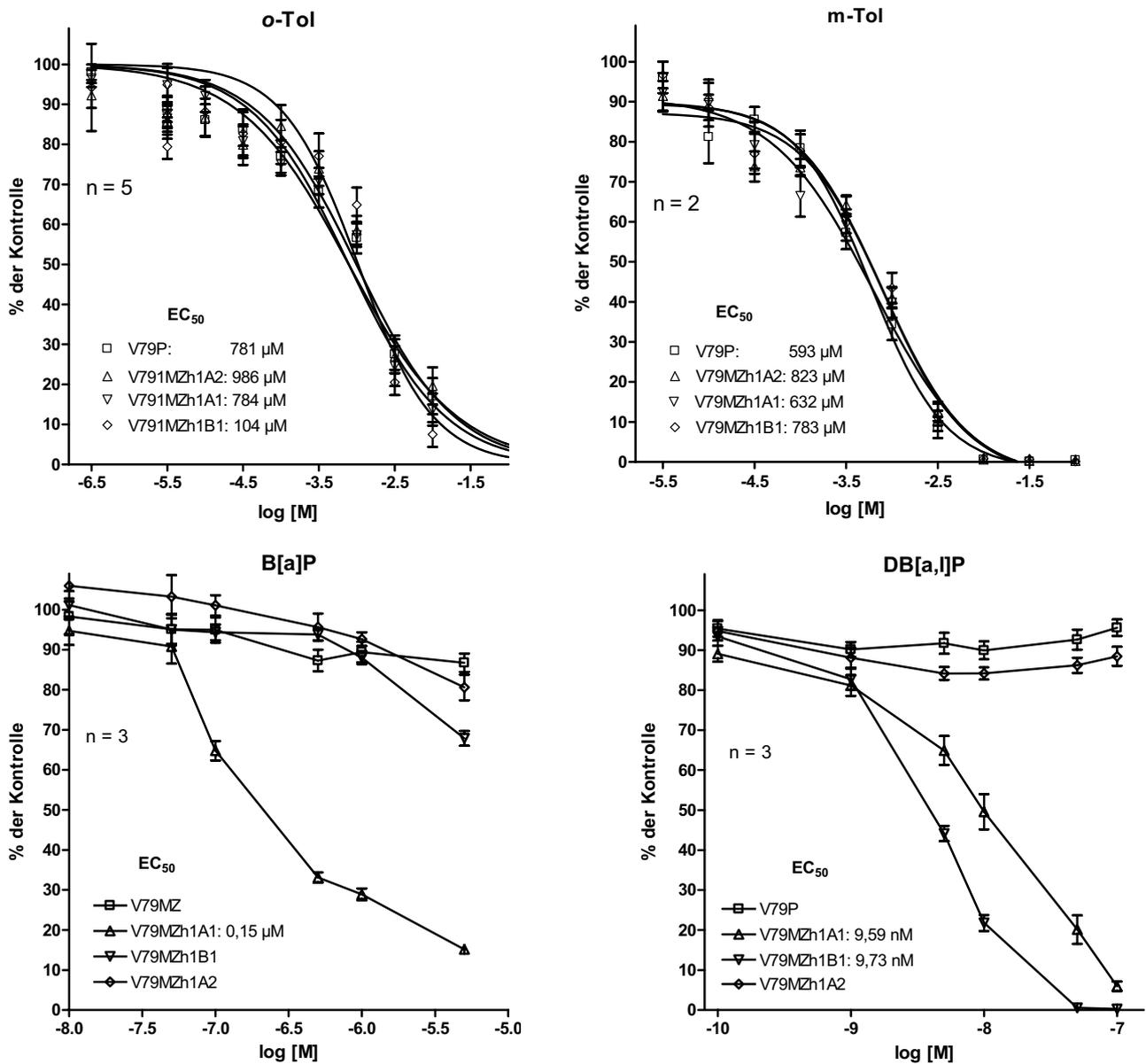


Abb. 2: Cytotoxizität von *o*- und *m*-Toluidin, Benzo[a]pyren und Dibenzo[a,l]pyren bestimmt mit dem MTT Assay

Genotoxizität von *o*-Toluidin

Bei extrem hohen Konzentrationen (5 bis 16 mM) bestätigt sich die von Hartmann *et al.* [6] gezeigte konzentrationsabhängige Genotoxizität. hCYP1B1 exprimierende Zellen reagieren hier etwas empfindlicher (Abb. 3). Auch zwischen 0,1 und 2 mM *o*-Tol gibt es eine dosisabhängige Steigerung der Genotoxizität durch humanes 1A1 und 1A2. Die Wirkung von hCYP1A2 wird durch Koexpression mit hNAT2*4 aufgehoben.

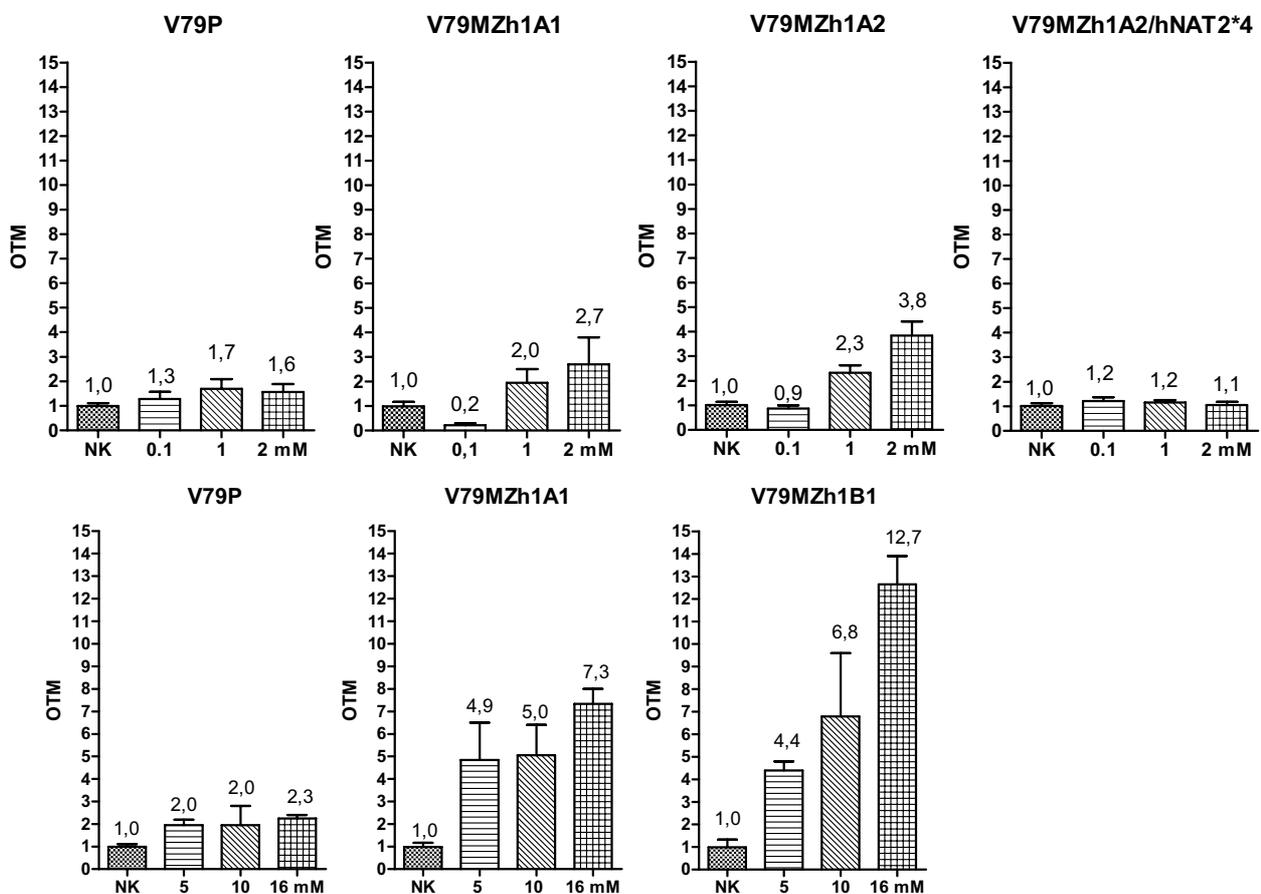


Abb. 3: Genotoxizität von *o*-Toluidin nach 72 h Inkubation im Comet Assay

Genotoxizität und Mutagenität von PAK

Auch im Comet- und HPRT-Assay (Abb. 4 und 5) zeigt sich die entscheidende Rolle des Metabolismus durch hCYP1A1 und hCYP1B1 für die Wirkung von DB[a,l]P.

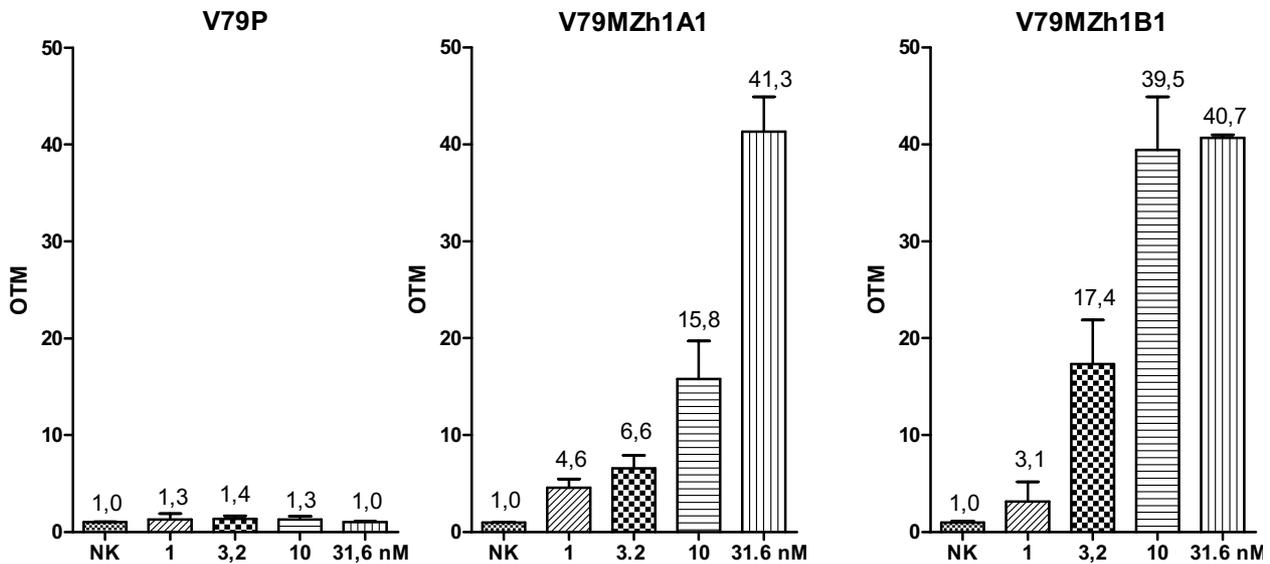


Abb. 4: Genotoxizität von Dibenzo[a,l]pyren nach 72 h Inkubation im Comet Assay

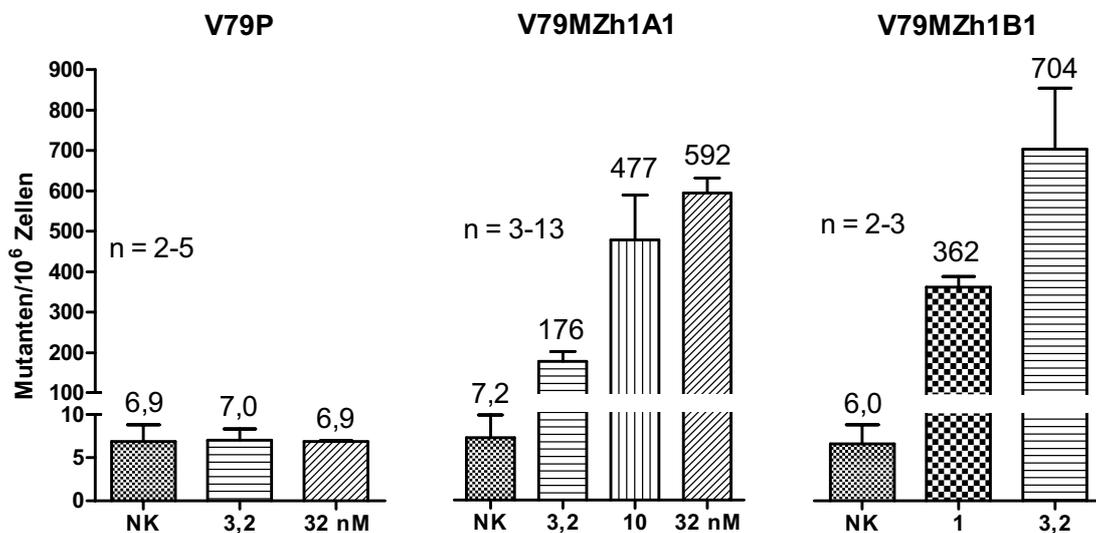


Abb. 5: Mutagenität von Dibenzo[a,l]pyren nach 72 h Inkubation im HPRT Assay

Wechselwirkungen

Das nicht kanzerogene *m*-Toluidin schwächt den genotoxischen Effekt des kanzerogenen *o*-Toluidins nur bei einer 1:1 (je 1 mM) Kombination deutlich ab. Bei 10fachem Überschuss von *m*-Toluidin ist dagegen kein Kombinationseffekt erkennbar (Abb. 6).

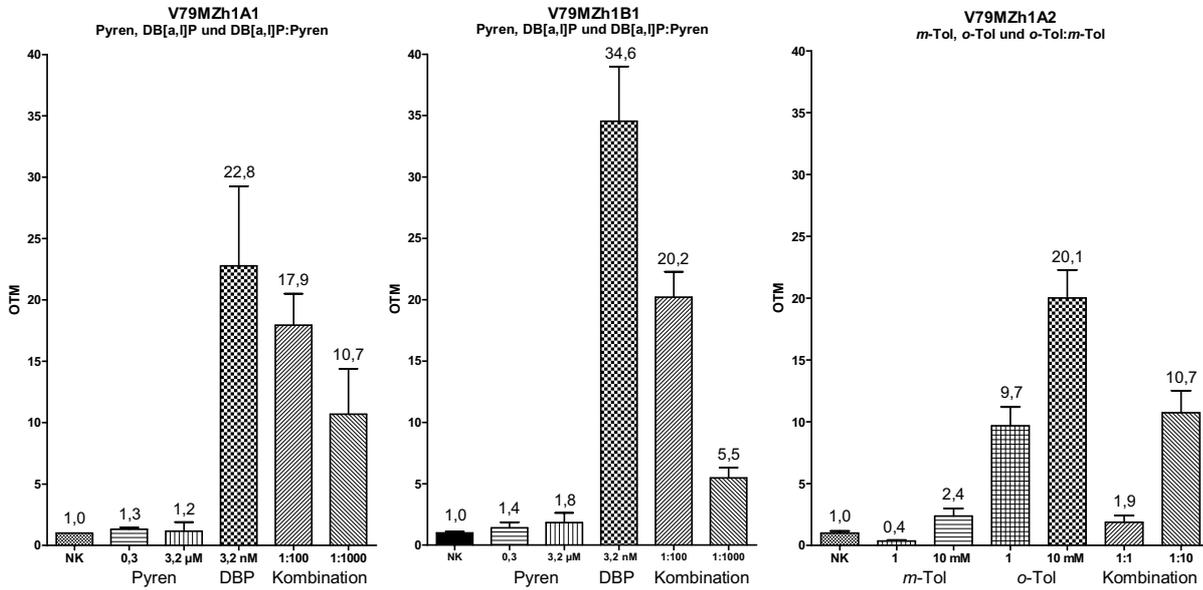


Abb. 6: Genotoxizität von DB[a,l]P und Pyren (Links und Mitte) und von *o*- und *m*-Toluidin (Rechts), jeweils alleine oder in Kombination, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation

Das in der Umwelt wesentlich stärker präsente nicht kanzerogene Pyren schwächt die Genotoxizität des starken Kanzerogens DB[a,l]P deutlich ab (Abb. 6). Die Genotoxizität von DB[a,l]P wird auch durch 4-ABP stark reduziert und durch *o*-Toluidin vollständig aufgehoben (Abb. 7).

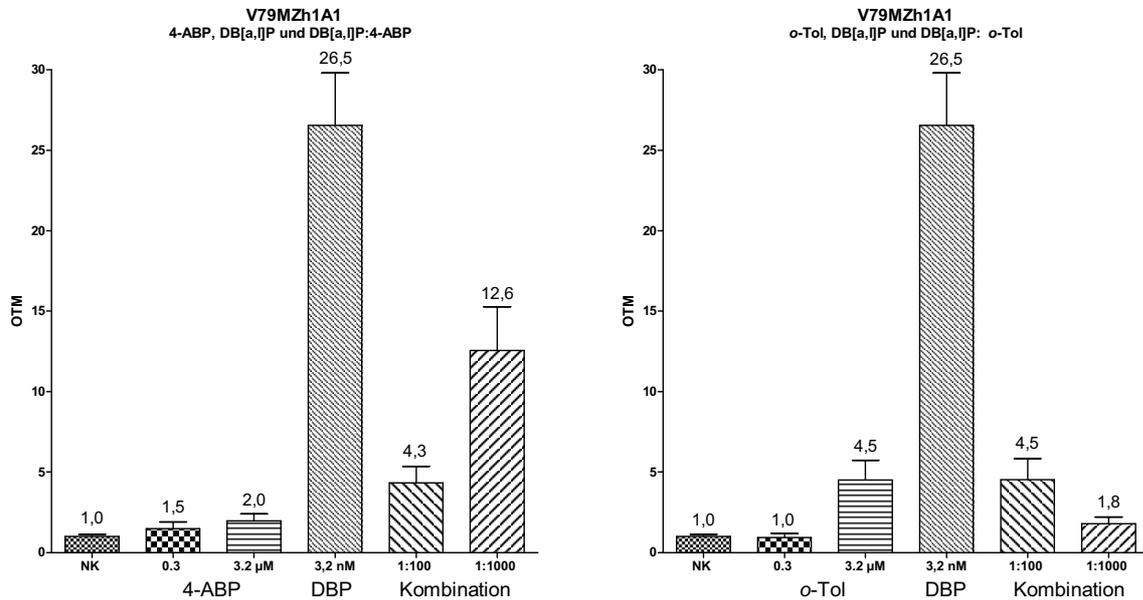


Abb. 7: Genotoxizität von DB[a,l]P und 4-ABP (links bzw. *o*-Tol (rechts) alleine und in Kombination, bestimmt mit dem Comet Assay nach 72 h Inkubation

Auch das mutagene Potenzial von DB[a,l]P wird in der V79MZh1A1-exprimierenden Zelllinie durch 4-ABP deutlich verringert (Abb. 8).

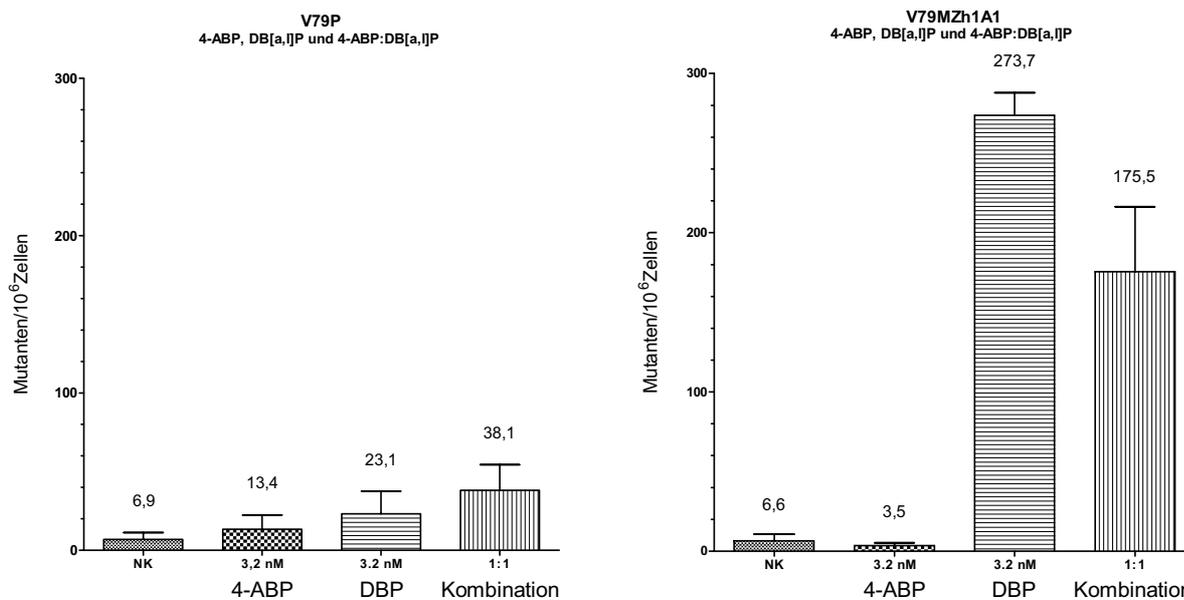


Abb. 8: Mutagenität von DB[a,l]P und 4-ABP alleine und in Kombination, bestimmt in V79P und V79MZh1A1-Zellen mit dem HPRT Assay nach 72 h Inkubation

Bestimmung von DNA-Addukten durch ³²P-Postlabeling

Das nicht kanzerogene *m*-Toluidin erzeugt in V79MZ-Zellen DNA-Addukte, die innerhalb einer diagonalen radioaktiven Zone auf den DC-Platten erkennbar ist (Abb. 9). Die Intensität nimmt in der Reihenfolge hCYP1A2/hNAT2*4 > hCYP1A1 > hCYP1B1 > hCYP1A2 ab. Vorläufige Ergebnisse mit anderen aromatischen Aminen ergaben keine Abhängigkeit von der Expression humaner Enzyme in den V79MZ-Zellen auf die insgesamt schwache DNA-Adduktbildung.

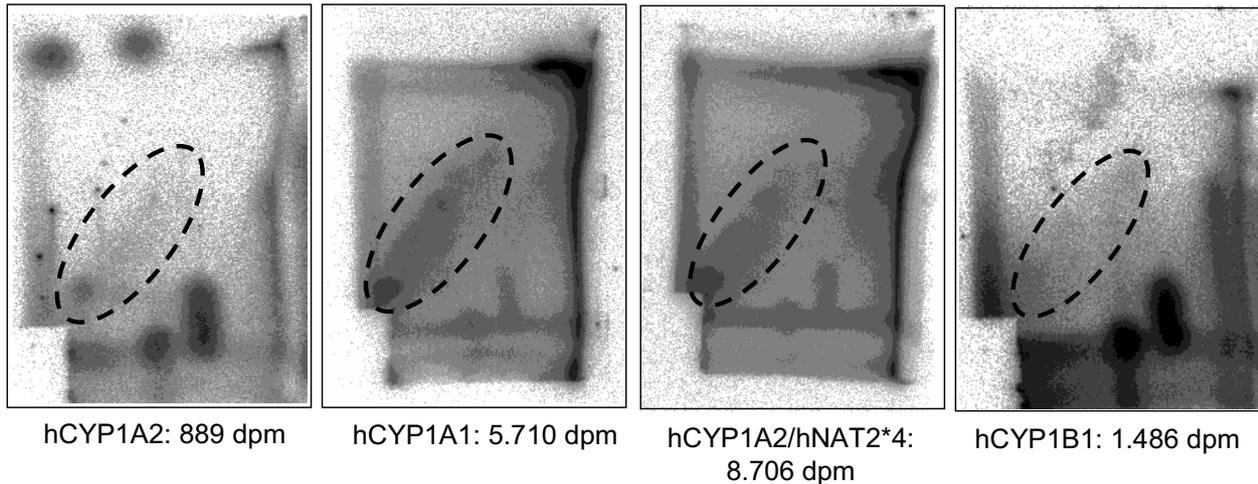
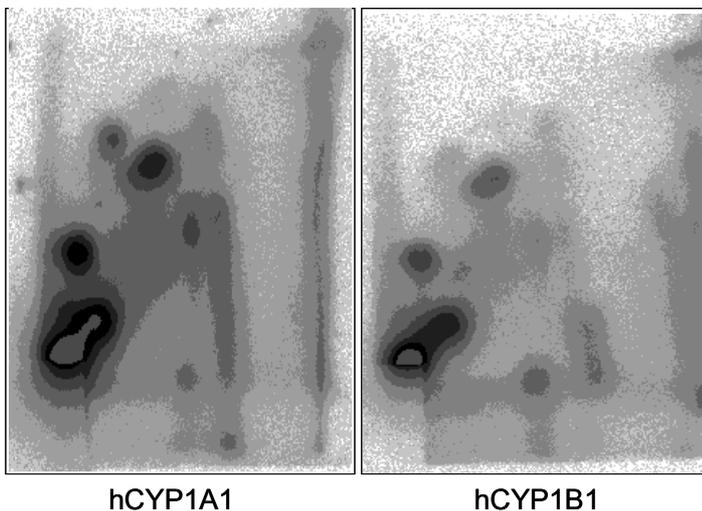


Abb. 9: ³²P-DC-Chromatogramme der DNA von Zellen nach 72 h Inkubation mit 1 mM *m*-Toluidin



Die hohe genotoxische und mutagene Potenz von DB[a,l]P in hCYP1A1- und hCYP1B1-exprimierenden Zellen zeigt sich auch anhand der Bildung zahlreicher DNA-Addukten, die auf den DC-Platten deutlich erkennbar sind (Abb. 10). Dies bestätigt Ergebnisse von Mahadevan *et al.* [3,7] und eröffnet die Möglichkeit, Interaktionen im niedrigen umweltrelevanten Konzentrationsbereich durchzuführen.

Abb. 10: ³²P-DC-Chromatogramme der DNA von Zellen nach 72 h Inkubation mit 76 nM DB[a,l]P

Zusammenfassung und Ausblick

- Durch gleichzeitige Einwirkung mehrerer Fremdstoffe kam es zu **antagonistischen** aber auch zu **unabhängigen** und sogar **synergistischen** Effekten. Sichere Vorhersagen zur Toxizität und Kanzerogenität von umweltrelevanten Gemischen von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und aromatischen Aminen lassen sich aus diesen ersten Ergebnissen nicht ableiten.
- Die Döhmer'sche Zellbatterie erwies sich für die Untersuchung der Rolle von Human-enzymen aus der CYP-Reihe in der metabolischen Aktivierung von PAK als hervorragend geeignet. Hier zeichnet sich eine überwiegend antagonistische Wirkung von nicht kanz-rogenen PAK auf die genotoxische Wirkung der bekannten Kanzerogene Benzo[a]pyren und Dibenzo[a,l]pyren ab.
- Das kanzerogene Potenzial aromatischer Amine wurde - wie in vielen anderen Testverfahren - auch mit den Humanenzyme exprimierenden V79 Zellen nur unbefriedigend erfasst. Es bedarf weiterer Untersuchungen unter Einbeziehung anderer humaner Enzyme und/ oder anderer Testverfahren zur Charakterisierung dieser umweltrelevanten Substanzklasse.

Literatur

- 1 Luch A Schober W Soballa VJ Raab G Greim H Jacob J Doehmer J Seidel A (1999) Metabolic activation of dibenzo[a,l]pyrene by human cytochrome P450 1A1 and P450 1B1 expressed in V79 Chinese hamster cells. *Chem Res Toxicol* 12:353-364
- 2 Tice RR Agurell E Anderson D Burlinson B Hartmann A Kobayashi H Miyamae Y Rojas E Ryu JC Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221
- 3 Mahadevan B Dashwood W-M Luch A Pecaj A Doehmer J Seidel A Pereira C Baird WM (2003) Mutations induced by (-)-anti-11R,12S-dihydrodiol 13S,14R-epoxide of dibenzo[a,l]pyrene in the coding region of the hypoxanthine phospho-ribosyltransferase (*Hprt*) gene in Chinese hamster V79 cells. *Environ Mol Mutagen* 41:131-139
- 4 Beach AC Gupta RC (1992) Human biomonitoring and the ³²P-postlabeling assay. *Carcinogenesis* 13:1053-1074
- 5 Gupta RC Earley K (1988) ³²P-adduct assay: comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedures. *Carcinogenesis* 9:1687-1693
- 6 Hartmann A Kiskinis E Fjällman A Suter W (2001) Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. *Mutat Res* 497:199-212
- 7 Mahadevan B Marston CP Dashwood W-M Li Y Pereira C Baird WM (2005) Effect of a standardized complex mixture derived from coal tar on the metabolic activation of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human cells in culture. *Chem Res Toxicol*. 18:224-231

Prinzipien der Stressbewältigung in Nutzhölzern: Mucopolysaccharide als Hilfsmittel für den Erwerb einer Salzstressresistenz in der Pappel

H. Schneider¹, P. Ache², M. Westhoff¹, M. Teuber³, R. Hedrich², U. Zimmermann¹

¹Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität, Biozentrum, Am Hubland, 97074 Würzburg;

²Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie & Biophysik der Universität, Julius-von-Sachs-Platz 2, 97082 Würzburg;

³Institut für Meteorologie und Klimaforschung - Atmosphärische Umweltforschung (IMK-IFU), Kreuzeckbahnstr. 19, 82467 Garmisch-Partenkirchen

Zusammenfassung

Die Erzeugung eines erhöhten Stressresistenz-Potenzials bei der Pappel mit dem Ziel, diese Gehölzart beispielsweise für den Einsatz in Rekultivierungsprogrammen zu optimieren, setzt zunächst fundierte Kenntnisse ihrer generellen stressinduzierten Reaktionsmuster und Selbstschutzmechanismen voraus. Pappeln weisen im Herbst schleimartige Mucopolysaccharide im Holzgewebe auf, die auch in salztoleranten tropischen Baumarten in hohen Konzentrationen gefunden werden können. Mit Hilfe geeigneter analytischer Methoden sollte untersucht werden, ob diese Polyzuckerverbindungen in der Pappel eine stressprotektive Wirkung aufweisen und ob sie gezielt als Stressschutzsubstanz akkumuliert werden können. Unsere Untersuchungen ergaben, dass die Pappel offensichtlich unabhängig von der verwendeten Art oder Varietät in der Lage ist, Mucopolysaccharid zu synthetisieren und zu akkumulieren. Durch die Anwendung einer neuartigen Alcianblau-basierten „Pellet“-Methode konnte infolge einer Applikation von mildem Salz- und Trockenstress tatsächlich eine „gezielt initiierte“ Akkumulation von Mucopolysacchariden nachgewiesen werden. Diese Substanzen spielen offensichtlich auch in der Pappel eine essentielle Rolle bei der Stabilisierung des Wasserhaushaltes in Stresssituationen. Die Ausarbeitung erfolgreicher Strategien für die zukünftige Erzeugung eines stressresistenteren Genotyps der Pappel sollte somit eine gezielte Förderung der Mucopolysaccharidsynthese und -akkumulation beinhalten.

Einleitung

Weltweit sind unsere landwirtschaftlichen Flächen heute von massiver Versalzung als Folgen unsachgemäßer Bewässerung und Überdüngung bedroht. Langfristig resultiert dieses gravierende Fehlmanagement in einer irreversiblen Qualitätsminderung des Bodens. Dieses Problem ist in ariden Zonen besonders stark ausgeprägt, greift aber bereits auch auf Flächen in unseren Breiten über. Zur Bekämpfung der Ursachen wird die Entwicklung verbesserter Bewässerungs- und Düngungstechniken massiv vorangetrieben. Darüber hinaus wird für die betroffenen Flächen eine Rekultivierung unter Verwendung stressresistenter Pflanzen angestrebt, die bereits ausgeprägte Schädigungen eindämmen bzw. nach Möglichkeit sogar revidieren soll. Mehrjährige, kommerziell nutzbare Gehölze, die Salz akkumulieren und somit neben einem Schutz vor Erosion auch die Möglichkeit einer sukzessiven Entsalzung des Bodens bieten, wären besonders attraktive Kandidaten für diese Maßnahmen. In unseren Breiten angebaute Gehölzarten wie die Pappel zeigen hierfür allerdings natürlicherweise keine ausreichende Stresstoleranz. Sie müssten zunächst „konditioniert“ werden, um für den Einsatz in solchen Rekultivierungsprogrammen genutzt werden zu können. Ziel dieser Studie war es daher, die natürlichen Stressabwehrreaktionen der Pappel näher zu charakterisieren, um sie als Basis für entsprechende Konditionierungsstrategien nutzen zu können.

Dem Projekt lag die Idee zugrunde, dass Schleimsubstanzen (so genannte Mucopolysaccharide), die sehr häufig im Holz hoher tropischer, salztoleranter Baumarten vorkommen und im Herbst auch in einheimischen Gehölzen wie der Weide und der Pappel gefunden werden (Zimmermann *et al.* 1994, 2002a,b, 2004), wichtige Stressprotektiva darstellen, mit deren Hilfe der Wasserhaushalt der Pflanze koordiniert wird. Aufgrund ihrer hygroskopischen Eigenschaften konnte für diese Stoffe vermutet werden, dass ihre Akkumulation im lebenden Gewebe und in den Wasserleitungsbahnen (im Xylem) lokale Wasserkonzentrationen stabilisieren und Wasserbewegungen dirigieren könnte (Zimmermann *et al.* 2004). Das Hilfsmittel Mucopolysaccharid könnte von den Gehölzen eingesetzt werden, um sehr hohe Saugspannungen und damit ein erhöhtes Risiko für Gasembolien im Xylem zu vermeiden. Im Gegensatz zu anatomischen Veränderungen wie einer stressbedingten Reduktion der Xylemdurchmesser oder der Gefäßdichte (Sun & Lin 1997) eröffnet der Einsatz der Polyzucker die Möglichkeit einer zeitlich variablen Kanalisierung und Dosierung der Wasserflüsse (Plumb & Bridgman 1972; Zimmermann *et al.* 2002a,b, 2004) bei vollständiger Reversibilität jeglicher Modifikation der Transporteigenschaften der Pflanze. Auf der Basis dieser Überlegungen sollte im Rahmen dieser

Studie überprüft werden, ob durch die Applikation von abiotischem Stress Pappeln gezielt zur vermehrten Produktion von Mucopolysaccharid angeregt werden können und ob dadurch eine wirkungsvolle Stressprotektion erreicht werden kann.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Um eine Allgemeingültigkeit der Fähigkeit von Pappeln zur Produktion von Mucopolysaccharid überprüfen zu können, wurde Pflanzenmaterial der Pappelsorten *Populus balsamifera*, *P. x canescens* und *P. nigra* verwendet. Während es sich bei *P. balsamifera* und *P. nigra* um ca. 15 m bzw. ca. 35 m hohe Freilandexemplare handelte, war das Material von *P. x canescens* unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus kultiviert worden und wies maximale Höhen von etwa 1 m auf.

Für die Überprüfung der oben aufgestellten Hypothese wurden zwei Chargen des Genotyps *P. x canescens* verwendet, die jeweils ausschließlich mit Nitrat bzw. Ammonium als Stickstoffquelle ernährt worden waren. Beide Pflanzenchargen wurden im Rahmen eines Großversuchs der DFG-Pappelforschergruppe Deutschland über einen Zeitraum von zwei Wochen hinweg einem Salzstress von 75 mM NaCl ausgesetzt. Signifikante Änderungen der Wachstumsraten konnten für die salzbehandelten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen während dieser Behandlung nicht festgestellt werden. Vor Beginn der Stressapplikation sowie nach 14tägigem Salzstress wurden etwa 1-2 cm lange Sprossabschnitte der unterschiedlich behandelten Pflanzen geerntet und bis zur Analyse am Lehrstuhl für Biotechnologie bei -80°C gelagert. In einem separaten Experiment wurde ein Exemplar von *P. x canescens* während der Applikation eines dreiwöchigen milden Trockenstresses unter kontrollierten Laborbedingungen bezüglich seiner stressbedingten Reaktionsmuster beobachtet. Aus dieser Pflanze wurden vor Beginn und nach Ablauf des Stressregimes jeweils etwa 2 cm lange Sprosssegmente geerntet und sofort für die weitere Analyse verwendet.

Nachweis von Mucopolysaccharid im Xylemsaft der Pappelproben

Der spezifische Nachweis von Mucopolysacchariden erfolgte mit Hilfe des Farbstoffes Alcianblau 8GX (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), der mit dem Zuckerpolymer ein charakteristisches blaues Präzipitat bildet (Romeis 1989). Eine gewebespezifische Lokalisierung dieser Substanz wurde durch Färbung mikroskopischer Schnitte erreicht, die mit Hilfe

teflonbeschichteter Rasierklingen freihändig hergestellt wurden. Im Fall der Sprossabschnitte aus dem Salzstress-Großversuch wurden die mikroskopischen Schnitte mit Hilfe geeister Instrumente von den tiefgefrorenen Proben angefertigt. Für eine reproduzierbare Färbung wurden alle Schnitte für 5 Minuten in eine 0,5%ige wässrige Alcianblau-Lösung (pH 2,5) eingebracht und anschließend mit Hilfe von 3%iger Essigsäure differenziert (Romeis 1989).

Zusätzlich zum histochemischen Nachweis von Mucopolysaccharid wurde ein quantitativer Nachweis dieser Substanz in Xylemsaftproben geführt, die im Falle der Freilandpflanzen mit Hilfe einer modifizierten Technik vom Typ der Kompressions-Dekompressionsmethode nach Schill et al. (1996) gewonnen wurden. Aus den sehr kleinen Sprosssegmenten der Gewächshauspflanzen wurde der Xylemsaft nach dem Entrinden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 5000 x g extrahiert. Für den jeweiligen Nachweis von Mucopolysaccharid in den Xylemsaftproben wurde eine neuartige „Pellet-Methode“ etabliert, bei der nach Mischung von Xylemsaft mit dem gleichen Volumen der Färbelösung und anschließender Zentrifugation (5 Minuten bei 5000 x g) die Ausmaße des entstandenen Mucopolysaccharid-Alcianblau-Pellets verglichen wurden. Kontrollversuche zeigten, dass sich bei Anwendung dieser Methode für dieselbe Xylemsaft-Charge wiederholt etwa gleich große Präzipitat-Pellets ergaben (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse und Diskussion

Unter Verwendung der oben beschriebenen Alcianblau-basierten Methoden konnte für alle in dieser Studie verwendeten Pappelsorten eindeutig Mucopolysaccharid im Xylemgewebe nachgewiesen werden. Typische Beispiele für entsprechende histochemische Nachweise sind in den Abbildungen 1A und 1B für je eine Probe aus dem Astholz von *P. balsamifera* und aus dem Sprossholz von *P. x canescens* gezeigt.

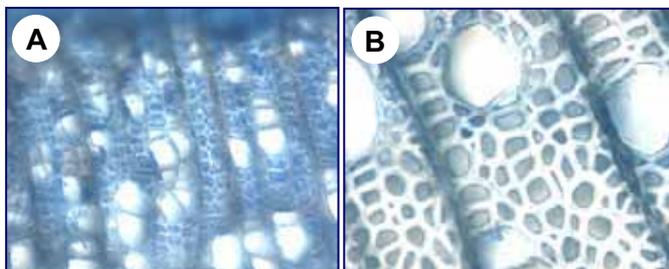


Abb. 1: Typische mikroskopische Aufnahmen zum Nachweis von Mucopolysaccharid in Gewebeschnitten des wasserleitenden Holzbereiches aus Astmaterial von *Populus balsamifera* (A) und Sprossmaterial von *P. x canescens* (B). Die Polyzucker wurden spezifisch durch eine wässrige 0,5% Lösung von Alcianblau 8GX bei pH 2,5 angefärbt.

Obwohl die unterschiedliche Intensität der Blaufärbung beider Schnitte auf höhere Konzentrationen an Mucopolysaccharid in der Freilandpappel (Abb. 1A) im Vergleich zu

der im Gewächshaus kultivierten Pflanze (Abb. 1B) hindeutet, kann man qualitativ eine gute Übereinstimmung bezüglich der gewebespezifischen Verteilung der Polyzucker in den Abbildungen erkennen. In beiden Fällen sind die blau gefärbten Mucopolysaccharid-Alcianblau-Präzipitate überwiegend in den Markstrahlparenchymzellen sowie in Form von Auflagerungen auf den Innenwänden der Tracheiden und Tracheen lokalisiert.

Vergleichbare Verteilungsmuster wurden auch für Proben der Pappelart *P. nigra* gewonnen. Darüber hinaus ließ sich mit der neu etablierten „Pellet“-Methode für jeden der untersuchten Pappeltypen ein deutlich erkennbares Mucopolysaccharid-Alcianblau-Präzipitat im extrahierten Xylemsaft nachweisen (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde bestätigen, dass Pappeln offensichtlich generell über die nötigen molekularbiologischen Grundvoraussetzungen für eine Synthese und gewebespezifische Anreicherung von Mucopolysaccharid verfügen. Eine effiziente Maßnahme für eine gezielt initiierte Akkumulation dieser Substanz zum Zweck der Erhöhung einer Stressresistenz könnte somit unabhängig vom Genotyp bzw. der Varietät erfolgreich angewendet werden.

Abbildung 2 zeigt typische mikroskopische Aufnahmen zu den Auswirkungen einer zweiwöchigen Applikation von mildem Salzstress (75 mM NaCl) auf das Mucopolysaccharidvorkommen von *P. x canescens*. Man erkennt deutlich, dass unabhängig vom N-Ernährungstyp in den mikroskopischen Schnitten der Kontrollen (Abb. 2A,C) vergleichbare gewebespezifische Alcianblau-Mucopolysaccharid-Niederschläge in Form von zellulären Einschlüssen und kontinuierlichen Filmen auf den Innenwänden der Tracheiden und Tracheen gefunden wurden. Unterschiede in der Menge oder Verteilung dieser Substanzen konnten anhand der spezifisch gefärbten Gewebeschnitte nach zweiwöchiger Salzbehandlung für keine der N-Ernährungsformen festgestellt werden (Abb. 2B,D).

Anwendung der „Pellet“-Methode lieferte dagegen einen klaren Hinweis darauf, dass infolge des milden Salzstress tatsächlich größere Mengen an Mucopolysaccharid im Xylemsaft der behandelten Pflanzen existierten als in den entsprechenden Kontrollen. Dieser Befund wurde unabhängig von der N-Ernährungsform erarbeitet. Typische Beispiele sind in Abb. 2E-H gezeigt.

Die Tatsache, dass die aus den untersuchten Proben extrahierten Xylemsaftmengen etwa vergleichbar waren, bewies, dass die erhöhten Mucopolysaccharidvorkommen in den salzbehandelten Pflanzen nicht aufgrund einer Aufkonzentrierung im Xylemsaft infolge von stressbedingtem Wasserverlust entstanden waren. Vielmehr waren diese Substanzen offensichtlich als Antwort auf den applizierten Stress neu synthetisiert und aufakkumuliert worden.

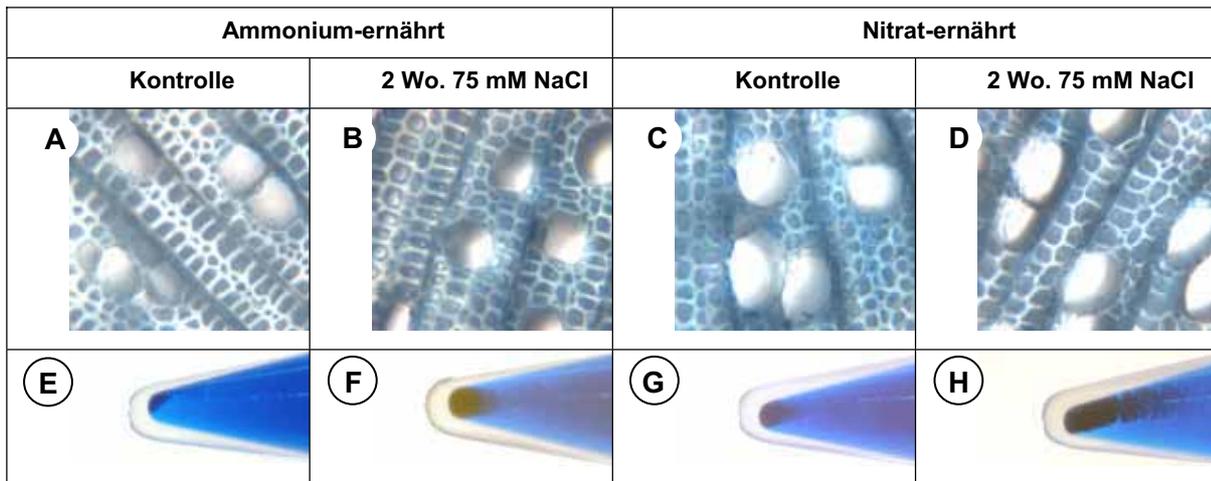


Abb. 2: Nachweis von Mucopolysaccharid als blau gefärbtes Präzipitat in Gewebeschnitten (A-D) und im Xylemsaft (E-H) von ammoniumernährten und nitraternährten Exemplaren der Pappelinie *Populus x canescens*. Die Untersuchungen wurden an Sprossproben durchgeführt, die nach zweiwöchiger Kultivierungsphase ohne (A,C,E,G) und mit einem milden Salzstress von 75 mM (B,D,F,H) geerntet worden waren. Bilder A-D wurden bei identischer Vergrößerung (20fach) aufgenommen. Das Pflanzenmaterial stammte aus einem Großversuch der DFG-Pappel-Forschergruppe, das uns für diese Versuche freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

Insgesamt konnten mit der neu etablierten „Pellet“-Methode unter 20 untersuchten Xylemsaftproben aus dem beschriebenen Salzstress-Großversuch mit einer 80%igen Trefferquote diejenigen Proben identifiziert werden, die aus salzbehandelten Pflanzen stammten. Somit konnte der experimentelle Beweis erbracht werden, dass die in dieser Studie verwendeten Pappeln durch die Applikation eines milden Salzstressess gezielt zur vermehrten Produktion von Mucopolysaccharid angeregt werden konnten, wobei ihre Wachstumsrate und ihr Wassergehalt gleichzeitig unbeeinflusst blieben.

Auch die Applikation von mildem Trockenstress über einen Zeitraum von drei Wochen bewirkte tendenziell eine Erhöhung der Mucopolysaccharidvorkommen im Xylemsaft von *P. x canescens*, wobei die Unterschiede zwischen dem unbehandelten und dem stressbehandelten Material allerdings weniger deutlich ausfielen als im Fall der Salzstressexperimente. Die entsprechenden Ergebnisse der „Pellet“-Methode sind in Abbildung 3 gezeigt. Ebenso wie für die Salzstressbehandlung blieben auch im Fall der Trockenstressbehandlung die aus dem Sprossmaterial extrahierten Saftmengen etwa vergleichbar.

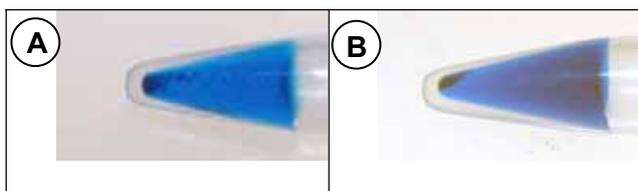


Abb. 3: Semiquantitativer Vergleich des Vorkommens von Mucopolysaccharid in extrahiertem Xylemsaft der Pappelvarietät *P. x canescens* mit Hilfe von Alcianblau vor (A) und nach Applikation eines dreiwöchigen milden Trockenstressregimes (B) unter kontrollierten Laborbedingungen.

Schlussfolgerungen und Perspektiven

Die Ergebnisse der vorgestellten Studie zeigen, dass auch die Mucopolysaccharide der Pappel wie die Polyzucker der bisher von uns untersuchten Exoten gezielt als Stressprotektiva gebildet und akkumuliert werden. Die maßgebliche Rolle dieser Substanz im Zusammenhang mit einem effizienten Schutz vor Stress ist offensichtlich die Stabilisierung des Wasserhaushaltes der gestressten Pflanze. Diese Erkenntnis konnte durch den Einsatz einer neuartigen Alcianblau-basierten „Pellet“-Methode gewonnen werden, die im Gegensatz zu den bisher eingesetzten histochemischen Verfahren erstmals semiquantitative Aussagen zum Vorkommen von Mucopolysacchariden zuließ. Die Methode erwies sich als robust gegenüber Unterschieden im verwendeten Pflanzenmaterial, aber auch gegenüber Änderungen in der Stickstoffernährung der Pflanzen. Sie könnte somit zu einem universellen Nachweisverfahren von Mucopolysacchariden als Stressindikatoren ausgebaut werden.

Die Tatsache, dass sowohl nach Applikation von Salzstress als auch nach Applikation von Trockenstress erhöhte Mucopolysaccharidvorkommen gefunden wurden, unterstützt unsere Hypothese, dass eine Erhöhung der Xylemspannung, die in transpirierenden Pflanzen infolge von Salz- und Trockenstress üblicherweise auftritt (Schneider *et al.* 1997a,b, 2006), als Auslöser für die Anregung zur Synthese und Akkumulation der Polyzucker in der Pappel fungieren könnte. Auch der unabhängig von dieser Studie erarbeitete Befund, dass der Xylemsaft sehr hoch gewachsener Exemplare von *P. nigra* tendenziell in den apikalen Bereichen mehr Mucopolysaccharid enthielt als in weiter basal lokalisierten Proben (Zimmermann *et al.*, Manuskript in Vorbereitung), deutet ebenfalls auf die Richtigkeit dieser Hypothese hin. Eine experimentelle Überprüfung dieser Vermutung kann mit Hilfe der minimal-invasiven Xylemdrucksondentechnik (Balling & Zimmermann 1990) durchgeführt werden, mit der Xylemspannungen direkt in einzelnen Xylemelementen der intakten Pappel bestimmt werden können, sofern die Technik für die Messungen am stark verholzten Pflanzenspross angepasst wird (Schneider *et al.*, unveröffentlicht).

Unsere Studie hat gezeigt, dass insbesondere die Applikation eines milden Salzstress in der Pappel gezielt eine Akkumulation der Mucopolysaccharide bewirkt. Unabhängige Untersuchungen zu den Veränderungen der Ionenverteilung in der Pappel infolge der Applikation von Salzstress haben darüber hinaus ergeben, dass eine deutliche Akkumulation von Natrium gegenüber der ungestressten Kontrollsituation sowohl in der Wurzel als auch im Holz des Sprosses erfolgt (Ache *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Somit verfügt die Pappel über ideale Voraussetzungen für den Einsatz im Rahmen von

Rekultivierungsmaßnahmen auf versalzten landwirtschaftlichen Nutzflächen. Auf der Basis dieser Erkenntnisse können nun geeignete Verfahren unter Verwendung von milden abiotischen Stressregimes, wie oben dargestellt, erarbeitet werden, die reproduzierbar Pappeln erzeugen, die universell widerstandsfähiger als das bisher verwendete Pflanzenmaterial sind. Es kann erwartet werden, dass der Einsatz derartig konditionierter Pappeln für Rekultivierungsprogramme insbesondere den üblicherweise auftretenden immensen Ausfall an Pflanzenmaterial direkt nach der Aussaat reduzieren wird. In dieser frühen Adaptationsphase, in der zunächst neue Wurzelbiomasse gebildet werden muss, ist die Pappel heute noch besonders anfällig gegenüber suboptimalen Kultivierungsbedingungen und könnte durch geeignete Verfahren zur Akkumulation von Mucopolysaccharid deutlich in ihrer Widerstandskraft gestärkt werden.

Danksagung

Wir danken der DFG-Pappelforschergruppe Deutschland für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials für die Salzstress-Studie. K. Schwuchow und S. Nieft danken wir herzlich für ihre exzellente technische Assistenz bei den mikroskopischen Untersuchungen. Die vorgestellten Arbeiten wurden mit finanzieller Unterstützung des Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz durchgeführt.

Literatur

Balling A, Zimmermann U (1990) Comparative measurements of the xylem pressure of *Nicotiana* plants by means of the pressure bomb and pressure probe. *Planta* **182**, 325-338.

Plumb RC, Bridgman WB (1972) Ascent of sap in trees. *Science* **176**, 1129-1131.

Romeis (1989) *Mikroskopische Technik*, 17. Aufl., Urban & Schwarzenberg.

Schneider H, Wegner LH, Haase A, Zimmermann U (2006) Long-distance water transport under controlled transpirational conditions: minimal-invasive investigations by means of pressure probes and NMR imaging. In: *The Apoplast: Compartment of Transport, Storage and Reaction* (Hrsg. B. Sattelmacher), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, im Druck.

Schneider H, Wistuba N, Miller B, Geßner P, Thürmer F, Melcher P, Meinzer F, Zimmermann U (1997a) Diurnal variation in the radial reflection coefficient of intact maize roots determined with the xylem pressure probe. *Journal of Experimental Botany* **48**, 2045-2053.

Schneider H, Zhu JJ, Zimmermann U (1997b) Xylem and cell turgor pressure measurements in intact roots of glycophytes: transpiration induces a change in the radial and cellular reflection coefficients. *Plant, Cell and Environment* **20**, 221-229.

Sun Q, Lin P (1997) Wood structure of *Aegiceras corniculatum* and its ecological adaptations to salinities. *Hydrobiologia* **352**, 61-66.

Zimmermann U, Schneider H, Wegner LH, Haase A (2004) Water ascent in tall trees: does evolution of land plants rely on a highly metastable state? *New Phytologist* **162**, 575-615.

Zimmermann U, Schneider H, Wegner LH, Wagner H-J, Szimtenings M, Haase A, Bentrup F-W (2002a) What are the driving forces for water lifting in the xylem conduit? *Physiologia Plantarum* **114**, 327-335.

Zimmermann U, Wagner HJ, Heidecker M, Mimietz S, Schneider H, Szimtenings M, Haase A, Mitlöhner R, Kruck W, Hoffmann R, König W (2002b) Implications of mucilage on pressure bomb measurements and water lifting in trees rooting in high-salinity water. *Trees* **16**, 100-111.

Zimmermann U, Zhu JJ, Meinzer F, Goldstein G, Schneider H, Zimmermann G, Benkert R, Thürmer F, Melcher P, Webb D, Haase A (1994) High molecular weight organic compounds in the xylem sap of mangroves: Implications for long-distance water transport. *Botanica Acta* **107**, 218-229.

Ressourcenschonende Proteinproduktion in Grünalgen

Christoph Griesbeck
Universität Regensburg
Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB), Biopark I
Josef-Engert-Str. 9, 93053 Regensburg

Zusammenfassung

Pharmazeutisch und biotechnologisch relevante Proteine wie therapeutische Antikörper, Hormone oder Enzyme werden in immer größerem Maße für unterschiedliche Anwendungen benötigt. Aufgrund des stetig wachsenden Bedarfs werden neben den konventionellen Produktionssystemen zukünftig auch weitere Systeme benötigt. Ein neuartiges Produktionssystem basiert auf der Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Im Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB) an der Universität Regensburg wird seit 2002 die notwendige Methodik etabliert und optimiert. Die Vorteile gegenüber bestehenden Systemen liegen einerseits in der biologischen Sicherheit der Algen, die keinerlei pathogene oder toxische Eigenschaften besitzen und in geschlossenen Systemen kultiviert werden können. Andererseits kann die Produktion aufgrund des photosynthetischen Wachstums auch sehr ressourcenschonend und kostengünstig durchgeführt werden. Somit könnte es für verschiedene Anwendungen das System der Wahl sein.

Biopharmazeutika

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Pharmazeutika entwickelt, die auf rekombinanten Proteinen basieren und unter dem Begriff Biopharmazeutika zusammengefasst werden. Hierbei handelt es sich um therapeutische und diagnostische Antikörper, Impfstoffe, Hormone und Enzyme. Seit dem rekombinant hergestellten Insulin, dem ersten zugelassenen Biopharmazeutikum, das 1982 von Genentech und Eli Lilly als „Humulin“ auf den Markt gebracht wurde (Johnson, 1983), sind weltweit mehr als 100 weitere Biopharmazeutika zugelassen worden (Walsh, 2003). Ca. 500 weitere Produkte befinden sich in klinischen Testphasen, so dass in den nächsten Jahren mit einer großen Anzahl weiterer Biopharmazeutika zu rechnen ist (Walsh, 2004; <http://www.phrma.org>). Der weltweite Markt wird im Augenblick auf ca. 30 Milliarden Dollar pro Jahr geschätzt (Robinson, 2002), wobei bereits ca. ein Fünftel davon auf den Bereich der rekombinanten Antikörper entfällt, einen sehr schnell wachsenden Sektor innerhalb der Biopharmazeutika

(Werner, 2004). Während für die meisten Biopharmazeutika ausreichende Produktionskapazitäten bestehen, werden aber in einigen Bereichen Engpässe befürchtet. Besonders im Bereich der therapeutischen Antikörper werden sehr hohe Dosen über einen langen Zeitraum verabreicht. Für manche Antikörper wird deshalb ein Bedarf an hochreinem Protein im Tonnenmaßstab pro Jahr prognostiziert (Garber, 2001), so dass mit den bisher hauptsächlich dafür verwendeten Säugerzellkulturen keine ausreichenden Mengen produziert werden können (Werner, 2004). Darüberhinaus sind angesichts dieser großen benötigten Mengen an Protein die Produktionskosten mit den bestehenden Systemen sehr hoch, weshalb die entsprechenden Firmen kostengünstigere Produktionsverfahren benötigen.

Konventionelle Systeme

Viele der auf dem Markt befindlichen Biopharmazeutika werden mit bakteriellen Systemen produziert. Diese sind jedoch nicht für alle Proteine geeignet. Die begrenzte Nutzbarkeit beruht darauf, dass Bakterien keine Maschinerie für Sekundärmodifikationen, wie etwa die Verknüpfung von Proteinen mit Zuckerresten, besitzen. Diese Modifikationen sind aber für die Funktion und Verträglichkeit komplexer menschlicher Proteine (z.B. Antikörper) wichtig, vor allem, wenn es sich dabei um Proteine handelt, die aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind. Ferner werden die synthetisierten rekombinanten Proteine häufig in inaktiver Form in den Bakterien gespeichert, so dass eine arbeits- und kostenintensive Aktivierung erforderlich ist, um die funktionell wirksame Proteinform zu erhalten. Außerdem muss gewährleistet werden, dass die Proteine frei von Verunreinigungen mit bakteriellen Toxinen sind.

Sehr häufig werden auch tierische Zellkulturen wie Hamsterzellen zur Proteinproduktion herangezogen. Ein großer Vorteil dieser Systeme besteht in der weitgehend korrekten Modifizierung und Faltung humaner Proteinmoleküle, so dass die produzierten Fremdproteine weitgehend identisch mit denen natürlicher Herkunft sind. Ein Problem besteht jedoch generell darin, dass eine Verunreinigung mit Pathogenen wie Viren nicht mit Sicherheit auszuschließen ist. Außerdem sind die Produktionskosten aufgrund der aufwändigen Medien und Fermentationsmethoden sehr hoch. Eine noch im Forschungsstadium befindliche Alternative bietet der Einsatz transgener Tiere, die die Gewinnung des gewünschten Proteins aus dem Blut oder der Milch ermöglichen. Im Labormaßstab konnten mit Hilfe transgener Schafe, Ziegen, Rinder und Schweine bislang

bereits mehr als 50 verschiedene Proteine gewonnen werden. Während die Produktion im Großmaßstab hier sehr preiswert sein könnte, ist die Zeitspanne von der Transformation bis zum Protein sehr lang. Außerdem ist der Einsatz transgener Tiere zumindest in Deutschland ethisch umstritten.

Seit den achtziger Jahren wird versucht, pflanzliche Systeme für die Proteinsynthese zu nutzen. Inzwischen ist es gelungen, in transgener Pflanzen menschliches Wachstumshormon, Interferone, menschliches Serumalbumin und komplexe Antikörper zu produzieren. Bisher ist noch kein in Pflanzen hergestelltes Protein als Medikament zugelassen, aber einige befinden sich bereits in späten Phasen der klinischen Studien. Als Eukaryonten sind Pflanzen zur Synthese komplexer humaner Proteine und zu posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung befähigt, allerdings weichen die Zuckerstrukturen von in Pflanzen produzierten Proteinen teilweise von denen humaner Proteine ab, was sich in mangelnder Funktionalität oder Immunogenität der Proteine äußern kann. Die Isolierung der gewünschten Proteine ist meist aufwändig, allerdings kann beispielsweise im Fall von essbaren Vakzinen diese Aufreinigung auch unterbleiben. Die landwirtschaftliche Kultivierung transgener Pflanzen macht die Produktion konkurrenzlos preiswert, allerdings ist die Freisetzung transgener Pflanzen, die Pharmazeutika enthalten, problematisch, außerdem ist hierbei auch die Einhaltung der für die Pharmazeutika-Produktion notwendigen GMP-Bedingungen (current Good Manufacturing Practice) schwierig. Darüberhinaus ist bei den meisten Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen der Zeitraum von der Transformation bis zur Produktisolierung sehr lang.

Proteinexpression in Mikroalgen

Mikroalgen sind in allen Gewässern weit verbreitet und tragen ungefähr die Hälfte der globalen Photosyntheseleistung bei. Natürlich vorkommende Algen werden seit vielen Jahren als Nahrungsmittel, Nahrungsmittelzusatz und Kosmetika verwendet. Große Produktionsanlagen stehen u.a. auf Hawaii, in Israel, Australien, Indonesien und Kuba zur Verfügung, in denen jährlich bis zu 100 t Algen-Biomasse pro Hektar produziert werden. Ein neuartiges Produktionssystem für pharmazeutisch und biotechnologisch wichtige Proteine basiert auf der eukaryontischen Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii*, die in Abbildung 1 dargestellt ist.

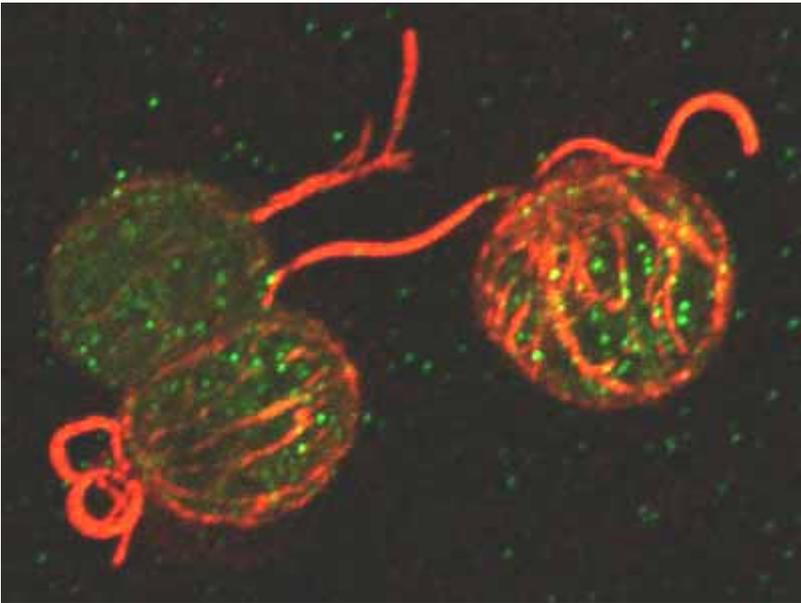


Abb. 1: Fluoreszenzaufnahme von *Chlamydomonas reinhardtii*-Zellen (Aufnahme von W. Mages).

Diese einzellige Grünalge dient seit vielen Jahren als Modellorganismus für verschiedene zellbiologische und biophysikalische Fragestellungen. Aufgründessen ist bereits eine Vielzahl von relevanten molekularbiologischen Methoden etabliert (Fuhrmann, 2002). Ein großer Teil davon wurde an der Universität Regensburg entwickelt, darunter die Resistenzmarker für Paromomycin (Sizova et al., 2001), Hygromycin (Berthold et al., 2002) und Chloramphenicol (M. Fuhrmann und P. Hegemann, unveröffentlicht), die Reportergene GFP (Fuhrmann et al., 1999) und Luciferase (Fuhrmann et al., 2004; M. Heitzer et al., unveröffentlicht), die Expression von synthetischen Transgenen (Fuhrmann et al., 1999), die Antisense-Technik zur Ausschaltung von Genprodukten (Ebnet et al., 1999; Fuhrmann et al., 2001) sowie die gezielte Integration von DNA in das Genom (Zorin et al., 2005). Das Genom der Alge wurde inzwischen sequenziert und ist in einer vorläufigen Version bereits im Internet recherchierbar (<http://genome.jgi-psf.org/chlre2/chlre2.home.html>). Darüberhinaus ist für Expressionsstudien ein cDNA-Microarray mit mehr als 3000 Genen erhältlich (Im et al., 2003; Shrager et al., 2003). Aufgrund der breiten verfügbaren Methodik wurde 2001 an der Universität Regensburg mit der systematischen Etablierung des Expressionssystems *Chlamydomonas* begonnen, ab 2002 im neu gegründeten Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB).

Zur Expression eines Transgens wird zuerst das entsprechende Gen neu synthetisiert, um die Verwendung der in *Chlamydomonas* häufig genutzten Codons sicherzustellen.

Vorbereitete optimierte Expressionsvektoren erlauben anschließend eine rasche Klonierung des Expressionskonstrukts, wobei je nach Bedarf Sequenzen für den Export des Proteins ins Medium, für die Zielsteuerung des Proteins in bestimmte Organelle, für die Präsentation an der Zelloberfläche oder für die Affinitätsaufreinigung angefügt werden können. Als Marker können zelleigene Gene verwendet werden, mit denen Stoffwechseldefekte der verwendeten Mutantenstämme behoben werden. Auf diese Weise kann die Verwendung von Antibiotika-Resistenzgenen vermieden werden. Vor der Transformation des Zellkerngenoms werden die Vektoranteile des Konstrukts entfernt, um keine bakterienspezifischen Vektor-Sequenzen in die Algen einzubringen. Die transformierten Algen (Abb. 2) können nach wenigen Wochen im Kleinmaßstab auf Expression des entsprechenden Fremdproteins getestet werden, für die relevanten Stämme ist die Konservierung als Cryokultur möglich.

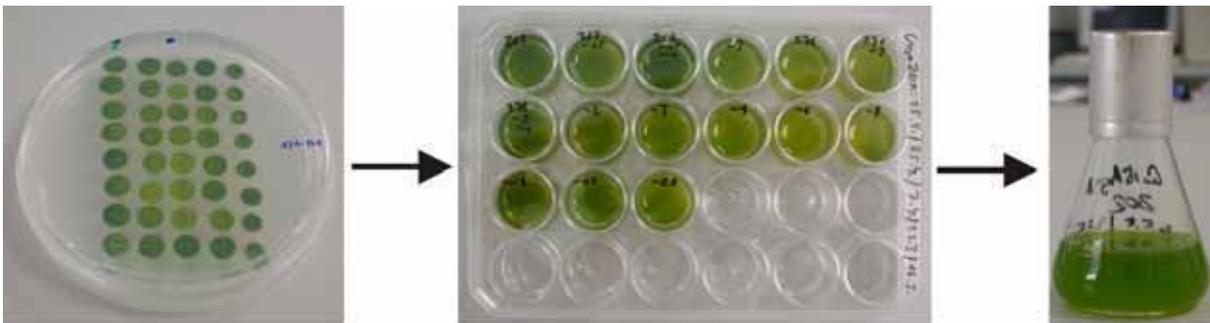


Abb. 2: *Chlamydomonas reinhardtii*-Klone nach der Transformation. Nach der Selektion auf Agarplatten (links) erfolgt die Kultivierung als Flüssigkulturen im Kleinstmaßstab (Mitte) zur Untersuchung der Expression des gewünschten Proteins. Geeignete Klone wachsen anschließend im 25-50 ml-Maßstab (rechts), um testweise das exprimierte Protein untersuchen zu können.

Die verwendeten zellwanddefekten Stämme ermöglichen den Export der exprimierten Proteine in das umgebende Medium, was die anschließende Produktaufreinigung erheblich vereinfacht. Für die Kultivierung und Aufarbeitung im Großmaßstab stehen verschiedene Fermentersysteme zur Verfügung. Die effizientesten Systeme erlauben für die verwendeten Stämme Zelldichten von bis zu 8 g Trockenmasse pro Liter bei einer Vermehrungsrate von bis zu Faktor 10 pro Tag (C. Walter, persönliche Mitteilung). Da aufgrund des photosynthetischen Wachstums der Algen das Medium lediglich aus Wasser und einigen Mineralsalzen besteht, kann die Fermentation bei Raumtemperatur sehr kostengünstig und ressourcenschonend durchgeführt werden. Neben künstlicher Beleuchtung ist auch Tageslicht ausreichend, bei Zusatz von Acetat im Medium ist Wachstum sogar im Dunkeln möglich. Neben einigen erfolgreich exprimierten

Modellproteinen wurden am KFB in Regensburg in Kooperation mit verschiedenen Industriepartnern auch erstmals industriell relevante Proteine exprimiert, die sich im Augenblick in der Testphase befinden.

Die Leistungsfähigkeit des Systems wurde auch von anderen Arbeitsgruppen durch die Expression verschiedener Antikörper und Vakzine demonstriert. Neben einem anti-Kokain-Antikörper-Fab-Fragment (Ton et al., 2002) wurde auch ein funktioneller Einketten-Antikörper gegen ein Herpes-Virus-Protein im Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii* exprimiert (Mayfield et al., 2003). Als essbares Vakzin wurde ein Fusionsprotein exprimiert, das aus einem Protein des Maul- und Klauenseuche-Virus und einer Cholera-Toxin-Untereinheit besteht (Sun et al., 2003). Die immunogene Wirkung wurde hierbei noch nicht gezeigt. Ebenfalls als essbarer Impfstoff für den Veterinärbereich wurden von der Firma Phycotransgenics L.L.C. (Bloomington, Indiana, USA; <http://www.phycotransgenics.com>) antigene Peptide exprimiert. In immunisierten Fischen, denen in einem Aquarium für kurze Zeit die transgenen Algen oral appliziert wurden, konnten anschließend Antikörper gegen die entsprechende Krankheit nachgewiesen werden (Patentanmeldungen WO002001098335A2 und WO002001098335A3 vom 20.6.2001). Die Firma Mera Pharmaceuticals Inc. (Kailua-Kona, Hawaii, USA; <http://www.merapharma.com>) plant bereits die Kultivierung verschiedener transgener *Chlamydomonas*-Stämme in ihren Anlagen auf Hawaii.

Da das *Chlamydomonas*-System eine Reihe von Vorteilen u.a. in den Bereichen biologische Sicherheit und Ressourcenschonung aufweist, könnte es für bestimmte Anwendungen zum System der Wahl werden. Im Gegensatz zu tierischen Zellkulturen ist eine Kontamination mit Pathogenen wie Viren oder Prionen ausgeschlossen, so dass weder der Produktionsvorgang noch letztlich die Patienten gefährdet werden können. Auch Endotoxine, die bei der Produktion rekombinanter Proteine in Bakterien aufwändig entfernt werden müssen, kommen nicht in den Algen vor, was die Aufreinigung des Produkts vereinfacht. Daneben kann die Alge auch für die Herstellung essbarer Impfstoffe eingesetzt werden. Als eukaryontische Organismen sind sie anders als bakterielle Systeme auch zur Synthese komplexer Proteine und zu posttranslationalen Modifikationen fähig, die Glykosylierungsmuster entsprechen in etwa denen von höheren Pflanzen. Die Fähigkeit der Mikroalgen zu photosynthetischem Wachstum ermöglicht eine ressourcenschonende und kostengünstige Kultivierung auch im Großmaßstab, da die Medien nur Mineralsalze enthalten und künstliche Beleuchtung nicht notwendig ist, wobei die Algen bei Zusatz von Acetat aber auch im Dunkeln wachsen können. Die Kultivierung

in Fermentern erlaubt außerdem eine Produktion unter cGMP-Bedingungen (current Good Manufacturing Practice, erforderlich für pharmazeutische Produkte). Im Gegensatz zu transgenen Pflanzen besteht auch keine Freisetzungproblematik. Im Falle einer ungewollten Freisetzung gibt es darüber hinaus bei den verwendeten Laborstämmen aufgrund von Stoffwechsel- und Zellwanddefekten kein Verbreitungsrisiko, wobei der Zellwanddefekt zusätzlich die Sekretion des Produkts in das umgebende Medium und damit eine erleichterte Produktisolierung erlaubt. Zur Selektion kann die Verwendung von Antibiotika-Resistenzgenen vermieden werden. Die kurze Generationszeit der Einzeller schließlich erlaubt nicht nur eine rasche Produktion mit Wachstumsraten von Faktor 10 pro Tag, sondern ermöglicht auch eine kurze Zeitspanne der Produktentwicklung von nur wenigen Wochen von der Transformation der Zellen bis zum Produkt im Testmaßstab. Gerade für Produkte, die kostengünstig in großen Mengen produziert werden müssen wie z.B. rekombinante Antikörper oder Produkte für den Veterinärbereich, könnte die Produktion im *Chlamydomonas*-System somit eine lohnenswerte Alternative darstellen. Auch für die Herstellung essbarer Impfstoffe ist die Alge geeignet.

Danksagung

Wir danken dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz und dem Bayerischen Staatsministerium für Wirtschaft, Infrastruktur, Verkehr und Technologie für die finanzielle Förderung des Projektes.

Literatur

Berthold P., Schmitt R. und Mages W. (2002) An engineered *Streptomyces hygroscopicus aph 7* Gene mediates Dominant Resistance against Hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist* **153**, 401-412

Ebnet E., Fischer M., Deininger W. und Hegemann P. (1999) Volvoxrhodopsin, a light-regulated sensory photoreceptor of the spheroidal green alga *Volvox carteri*. *Plant Cell* **11**, 1473-84

Fuhrmann M. (2002) Expanding the Molecular Toolkit for *Chlamydomonas reinhardtii* - from History to new Frontiers. *Protist* **153**, 357-364

Fuhrmann M., Hausherr A., Ferbitz L., Schodl T., Heitzer M. und Hegemann P. (2004) Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol* **55**, 869-81

Fuhrmann M., Oertel W. und Hegemann P. (1999) A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **19**, 353-61

- Fuhrmann M., Stahlberg A., Govorunova E., Rank S. und Hegemann P. (2001) The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *J. Cell Sci.* **114**, 3857-3863
- Garber K. (2001) Biotech industry faces new bottleneck. *Nature Biotechnology* **19**, 184-185
- Im C. S., Zhang Z., Shrager J., Chang C. W. und Grossman A. (2003) Analysis of light and CO₂ regulation in *Chlamydomonas reinhardtii* using genome-wide approaches. *Photosyn. Res.* **75**, 111-125
- Johnson I. S. (1983) Human insulin from recombinant DNA technology. *Science* **219**, 632-7
- Mayfield S. P., Franklin S. E. und Lerner R. A. (2003) Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 438-42
- Robinson K. (2002) An industry comes of age. *Biopharm. Int.* **15**, 20-4
- Shrager J., Hauser C., Chang C. W., Harris E. H., Davies J., McDermott J., Tamse R., Zhang Z. und Grossman A. R. (2003) *Chlamydomonas reinhardtii* Genome Project. A Guide to the Generation and Use of the cDNA Information. *Plant Physiol* **131**, 401-8
- Sizova I., Fuhrmann M. und Hegemann P. (2001) A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* **277**, 221-229
- Sun M., Qian K., Su N., Chang H., Liu J. und Chen G. (2003) Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnol Lett* **25**, 1087-92
- Ton G., Ni K., Mayfield S. und Cohen A. (2002) Construction of the anti-cocaine Fab genes for expression in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *FASEB Journal* **16**, A542
- Walsh G. (2003) Biopharmaceutical benchmarks-2003. *Nat Biotechnol* **21**, 865-70
- Walsh G. (2004) Second-generation biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm* **58**, 185-96
- Werner R. G. (2004) Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals. *J Biotechnol* **113**, 171-82
- Zorin B., Hegemann P. und Sizova I. (2005) Nuclear-gene targeting by using single-stranded DNA avoids illegitimate DNA integration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **4**, 1264-72

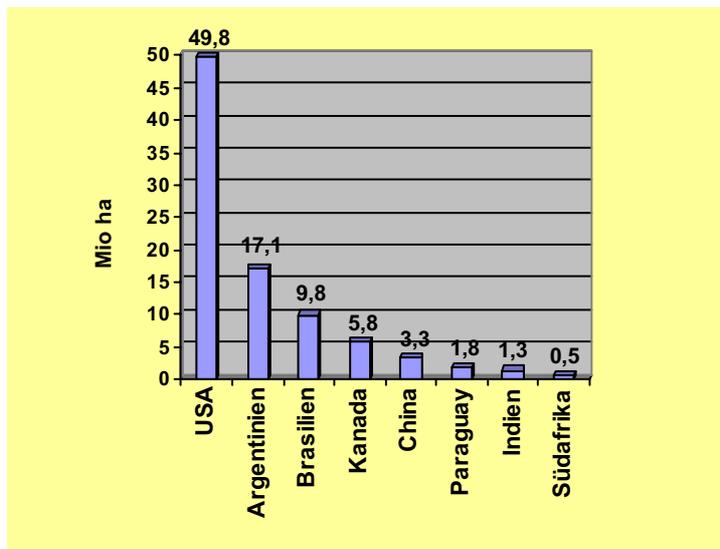
Qualitätssicherung und Verbraucherschutz

Das Europäische Netzwerk für GVO Laboratorien - Neue Wege in der EU

Sven Pecoraro
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
85764 Oberschleißheim

Einführung

2005 wurde die globale Anbaufläche von genetisch veränderten Kulturpflanzen (GVP) auf über 90 Mio. Hektar geschätzt. Die vier bedeutendsten angebauten Pflanzensorten waren dabei Sojabohnen, Mais, Raps und Baumwolle. Verglichen mit den Anfängen des kommerziellen Anbaus von GVP 1996 mit einer geschätzten Fläche von 1,7 Mio. Hektar, stellt diese Fläche eine Zunahme um das mehr als 47-fache dar. Diese Fläche wurde 2004 von geschätzten 8,5 Mio. Landwirten in 21 Ländern bewirtschaftet. Allerdings entfielen 99 % der Anbaufläche auf lediglich 8 Länder (Abbildung 1).



Quelle: ISAAA, 2005

Abbildung 1: Anbauflächen von gentechnisch veränderten Kulturpflanzen 2004 in Millionen Hektar in verschiedenen Ländern

Der Anteil an angebauten gentechnisch veränderter Kulturpflanzen am Gesamtanbau der jeweiligen Pflanzenart war 2005 (geschätzt) bei 58 % für Sojabohnen, 23 % für Mais, 11 % für Baumwolle und 6 % für Raps.

Zwischen 1998 und 2003 gab es in Europa ein *de facto* Moratorium für die Zulassung von GVO. Dieses wurde durch die Auffassung einiger EU Mitgliedstaaten ausgelöst, die die

rechtlichen Rahmenbedingungen, wie beispielsweise die Novel Food Verordnung, hinsichtlich der Zulassung, Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit von GVO als nicht ausreichend ansahen. Die Kennzeichnung von Lebens- und Futtermitteln im Kontext der Transparenz in einem globalisierten Markt spielte in den Auseinandersetzungen eine wesentliche Rolle. Seit 2003 und 2004 sind eine Reihe verschiedener Verordnungen in Kraft, die die Zulassung, Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit von GVO neu regeln (Tabelle 1).

Tabelle 1: EU Verordnungen zu gentechnisch veränderten Organismen und daraus hergestellten Produkten

Verordnung (EG) Nr.	Regelungsinhalte
1829/2003: Verordnung des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. September 2003 <u>über genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel</u>	Zulassungsverfahren Kennzeichnung, Schwellenwert Gründung des CRL und ENGL
1830/2003: Verordnung des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. September 2003 über die <u>Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung</u> von genetisch veränderten Organismen und über die Rückverfolgbarkeit von aus gentechnisch veränderten Organismen hergestellten Lebensmitteln und Futtermitteln	System zur Rückverfolgbarkeit von GVO und daraus hergestellten Produkten auf allen Stufen des Inverkehrbringens Dokumentation von Handelsgeschäften zwischen Wirtschaftsbeteiligten mit GVO: Wer bezieht/liefert welchen GVO oder Produkte daraus von wem/an wen
65/2004: Verordnung der Kommission vom 14. Januar 2004 über ein System für die Entwicklung und Zuweisung <u>spezifischer Erkennungsmarker</u> für genetisch veränderte Organismen	System eines alphanumerischen neunstelligen Codes zur eindeutigen Bezeichnung eines GVO
641/2004: Verordnung der Kommission vom 6. April 2004 mit <u>Durchführungsbestimmungen</u> zur Verordnung (EG) Nr. <u>1829/2003</u> des Europäischen Parlamentes und des Rates hinsichtlich des Antrags auf Zulassung neuer gentechnisch veränderter Lebensmittel und Futtermittel, der Meldung bestehender Erzeugnisse und des zufälligen oder technisch unvermeidbaren Vorhandenseins genetisch veränderten Materials, zu dem die Risikobewertung befürwortend ausgefallen ist	Anforderungen an Anträge auf Zulassung eines GVO Meldung bereits existierender/zugelassener Erzeugnisse Übergangsmaßnahmen für sicherheitsbewertete aber nicht zugelassene GVO Detaillierte Anforderungen an die Validierung von eingereichten Nachweisverfahren Anforderungen an Referenzmaterial

Diese Verordnungen ersetzen und erweitern den Geltungsbereich früherer europäischer Gesetzgebungen auf diesem Gebiet. Der Schwellenwert bei dem für zufällige oder technisch unvermeidbare Beimengungen von GVO eine Kennzeichnung unterbleiben kann wurde von 1,0 % auf 0,9 % (pro Zutat) gesenkt. Dieser Schwellenwert ist nicht als pauschaler Toleranzwert für GVO in Produkten anzusehen, sondern als ein Schwellenwert, bis zu dem eine Kennzeichnung unterbleiben kann, vorausgesetzt der Inverkehrbringer kann den zuständigen Behörden im Rahmen einer Einzelfallprüfung plausibel darlegen, dass er geeignete Schritte unternommen hat, derartige Beimengungen zu verhindern. Oberhalb von 0,9 % besteht ohne Ausnahme Kennzeichnungspflicht.

Die korrekte Kennzeichnung wird von der amtlichen Lebens- und Futtermittelüberwachung jedes Mitgliedstaates kontrolliert. In beauftragten Laboratorien werden Lebens- und Futtermittel mittels molekularbiologischer Methoden auf das Vorhandensein von GV Material untersucht und falls ein derartiger qualitativer Analysebefund erstellt wurde, wird der relative GVO Gehalt in der Probe bestimmt. Die bisher eingesetzten Untersuchungsmethoden sind alle DNA basierende so genannte Real-Time PCR Verfahren. Bei dieser Methode wird in einer biochemischen Reaktion der gesamte DNA-Gehalt einer Zutat (z.B. Sojabohne) und in einer zweiten Reaktion der gesamte DNA-Gehalt eines GVO derselben Art (z.B. Roundup Ready Soja) bestimmt. Das Ergebnis einer solchen Untersuchung ist ein in Prozent angegebener relativer GVO Anteil einer Zutat.

In der Vergangenheit wurden Methoden zum Nachweis und zur Quantifizierung von GVO von verschiedenen nationalen und internationalen Arbeitsgruppen wie die Deutsche § 64 LFGB Arbeitsgruppe (LFGB: Lebens- und Futtermittelgesetzbuch, früher: § 35 LMBG, Lebensmittel und Bedarfsgegenständegesetz), Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN), Europäisches Komitee für Normung (CEN), International Organisation for Standardization (ISO), entwickelt, um GVO-Untersuchungen im Rahmen der amtlichen Überwachung durchführen zu können. Zertifizierte Referenzmaterialien (CRM) waren nur für eine begrenzte Zahl an GVO erhältlich.

Nach Maßgabe der neuen Verordnung (EU) Nr. 1829/2003 muss ein Antragsteller eines GVO eine prävalidierte und für den betreffenden GVO spezifische Nachweismethode im Zulassungsverfahren einreichen, die bestimmten Mindestanforderungen genügt. Zudem muss er Kontroll- und Referenzmaterial verfügbar machen. Beides zusammen ermöglicht der offiziellen Überwachung einfacher über Methoden und Referenzmaterialien zu verfügen und erspart zeitraubende Entwicklungsarbeit für Analysemethoden.

EU Antrag auf die Zulassung eines GVO

In Abbildung 2 sind die wesentlichen Schritte des Europäischen Zulassungsverfahrens nach Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel dargestellt.

Antrag auf Zulassung eines GVO nach VO (EG) Nr. 1829/2003

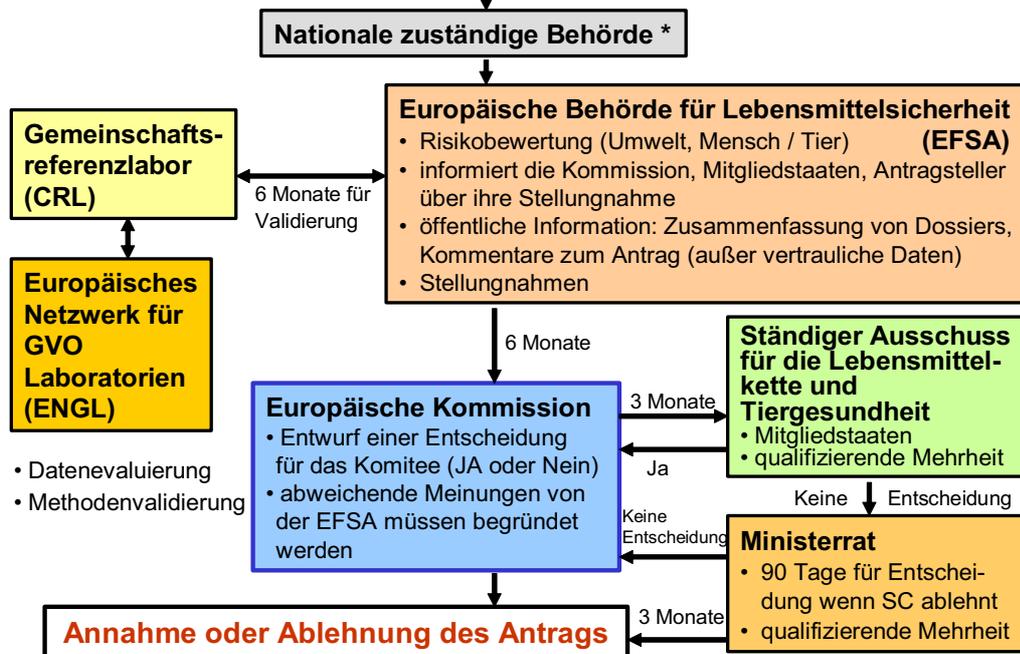


Abbildung 2: Europäisches Zulassungsverfahren nach Verordnung (EG) Nr. 1829/2003

Der Antrag wird an die zuständige Behörde des betreffenden Mitgliedstaates gesandt, die dessen Erhalt dem Antragsteller innerhalb von 14 Tagen bestätigt. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority, EFSA) wird unverzüglich informiert und die Antragsunterlagen und alle weiteren Unterlagen zur Verfügung gestellt. Die EFSA ihrerseits informiert die Kommission, die anderen Mitgliedsstaaten, die nationalen Behörden, den Antragsteller und die Öffentlichkeit über den Eingang des Antrags. Der Antrag muss unter anderem eine Methode zur Probenahme, zum Nachweis und zur Identifizierung des Transformationsereignisses erhalten. Zudem muss Referenzmaterial bereitgestellt werden. Die Nachweismethode und das Referenzmaterial werden an das Gemeinschaftsreferenzlabor (CRL) weitergeleitet, das die eingereichten Unterlagen prüft. Das CRL führt zusammen mit dem Europäischen Netzwerk für GVO Laboratorien (ENGL) Validierungsstudien mit den eingereichten Methoden durch (siehe unten). In einem abschließenden Evaluierungsreport für die EFSA

wird beurteilt, ob die Methode für den beabsichtigten Zweck geeignet ist. Die EFSA ist für die Risikobewertung zuständig und veröffentlicht zudem eine Zusammenfassung der erhaltenen Dossiers (ohne vertraulichen Daten). Innerhalb von sechs Monaten gibt die EFSA eine Stellungnahme an die Kommission ab. Auf Basis dieser Stellungnahme verfasst die Kommission innerhalb von drei Monaten einen Entwurf über eine Entscheidung und legt diesen dem Ständigen Ausschuss über die Lebensmittelkette und die Tiergesundheit (StALuT) vor. Eine abweichende Haltung zur Position der EFSA muss die Kommission begründen. Wenn der Ständige Ausschuss die Entscheidung der Kommission mit qualifizierter Mehrheit bestätigt, übernimmt die Kommission die Entscheidung. Falls eine solche Mehrheit nicht zu Stande kommt wird der Entwurf dem Rat der Europäischen Union (Ministerrat) zur Entscheidung übersandt. Falls der Ministerrat nicht innerhalb von drei Monaten mit qualifizierter Mehrheit abstimmt wird das Verfahren an die Kommission zurückgeleitet, die dann abschließend eine Entscheidung fällt.

Während des Zulassungsprozesses wird die Öffentlichkeit informiert und hat über das Internet Zugang zu Informationen (<http://gmoinfo.jrc.it>: Zusammenfassung des Zulassungsantrags, Stellungnahmen; <http://efsa.eu.int/> : Stellungnahmen der EFSA).

Das Europäische Netzwerk für GVO Laboratorien

Das Europäische Netzwerk für GVO Laboratorien (ENGL) wurde am 4. Dezember 2002 auf Grundlage der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel gegründet. Gegenwärtig (12/2005) sind 72 Laboratorien aus 25 EU Mitgliedsstaaten plus Norwegen offiziell registrierte ENGL Mitglieder. Alle Laboratorien und Delegierten werden von den zuständigen nationalen Behörden benannt, wobei alle Laboratorien mit der amtlichen Überwachung bzw. Analytik von gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermitteln sowie Saatgut beauftragt sind. Den Vorsitz des ENGL führt die Gemeinsame Forschungsstelle der Kommission (Joint Research Centre, JRC) in Ispra/Italien vertreten durch dessen Biotechnology and GMO Unit des Institutes for Health and Consumer Protection.

Die Arbeit des ENGL wird von einem Steuerungskomitee (SC) unterstützt, das Entscheidungen des ENGL koordiniert. Jedes Land stellt einen Delegierten in diesem Komitee. Die Laboratorien des ENGL sind vertraglich durch ein Consortium Agreement

verbunden, welches das ENGL formal definiert und dessen Aufgaben und Ziele beschreibt.

Die Hauptaufgaben und Aktivitäten des ENGL sind:

- Bildung eines wissenschaftlichen und technischen EU Netzwerkes im Zusammenhang mit EU Regularien auf dem Gebiet der Gentechnik.
- Unterstützung des Prozesses der Standardisierung und Harmonisierung von Methoden zur Probenahme, Nachweis, Identifikation und Quantifizierung von gentechnisch veränderten Organismen and daraus abgeleiteten Produkten inklusive Saatgut, Getreide, Lebensmittel, Futtermittel sowie Umweltproben
- Unterstützung des Gemeinschaftsreferenzlabors (CRL) in seinen Aktivitäten; insbesondere die Durchführung von Validierungsstudien im Zusammenhang mit dem GVO Zulassungsverfahren
- Festlegung von Mindestanforderungen für Nachweismethoden, die der Antragsteller für einen GVO vorlegt
- Technologie- und Informationsaustausch zwischen den ENGL Mitgliedern
- Methodenentwicklung für die qualitative und quantitative GVO Analytik
- Initiierung von Forschungsprojekten
- Etablierung von Arbeitsgruppen zu verschiedenen Themen: Probenahme, Schwellenwert, Validierung, Referenzmaterial

Wie bereits erwähnt muss nach Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 ein Antragsteller unter anderem dem Antrag eine Nachweismethode beifügen und Kontroll- bzw. Referenzmaterial verfügbar machen. In Übereinstimmung mit dieser Verordnung hat das ENGL das Mandat zur Festlegung von Mindestanforderungen für eine solche Methode, welche über das Internet zugänglich (<http://gmo-crl.jrc.it/guidancedocs.htm>) sind. Nach Erhalt der Methode von der EFSA und nach wissenschaftlicher Evaluierung der vorgelegten Daten wird die Methode in einem Ringversuch vom CRL und dem ENGL in einem mehrstufigen Verfahren validiert. Anschließend wird eine Entscheidung gefällt, ob die Methode für den beabsichtigten Zweck als geeignet angesehen wird.

Die bisher validierten Methoden sind Event-spezifische Real-Time PCR Verfahren. Die Validierungsberichte und die Nachweismethoden werden von CRL veröffentlicht (<http://gmo-crl.jrc.it>).

Für Deutschland sind fünf Delegierte im ENGL benannt:

- Hans-Jörg Buhk, BVL, Berlin, hans-joerg.buhk@bvl.bund.de
- Hermann Broll, BfR, Berlin, h.broll@bfr.bund.de (SC)
- Norbert Hess, BWG, Hamburg, norbert.hess@bug.hamburg.de
- Sven Pecoraro, LGL, Oberschleißheim, sven.pecoraro@lgl.bayern.de
- Klaus Pietsch, CVUA, Freiburg, klaus.pietsch@cvuaf.bwl.de

Methodenvalidierung

Auf der Basis Verordnung (EG) Nr. 1829/2003, Anhang I testen und validieren das CRL und das ENGL das Nachweisverfahren, das vom Antragsteller vorgeschlagen wird, unter Verwendung der mitgelieferten Kontrollproben.

Der Validierungsprozess besteht aus fünf Schritten:

Schritt 1: Erhalt der Dokumente und Materialien, die der Antragsteller eingereicht hat

Schritt 2: Wissenschaftliche Evaluation der Unterlagen und der Daten

Schritt 3: Experimenteller Test der eingereichten Methode und der Proben im CRL

Schritt 4: Validierungsstudie mit einem Netzwerk aus Laboratorien

Schritt 5: Mitteilung an die EFSA

Schritt 1: Nachdem alle relevanten Unterlagen für die Antragstellung über die EFSA eingegangen sind, beginnt die sechsmonatige Frist für den Validierungsprozess (siehe Abbildung 2)

Schritt 2: Dieser Schritt umfasst die wissenschaftliche Evaluation der Daten zu der Methode selbst, sowie die der mitgelieferten Proben. Diese theoretische Verifikation zielt darauf ab zu entscheiden, ob die Methode grundsätzlich den vom ENGL festgelegten Richtlinien (<http://gmo-crl.jrc.it/guidancedocs.htm>) entspricht. Wenn diese Kriterien nicht erfüllt sind, wird der Validierungsprozess ausgesetzt, das bedeutet, dass die sechsmonatige Frist zur Validierung der Methode(n) unterbrochen wird.

Wenn der Antragsteller geltend macht, dass die Methode bereits validiert worden ist, erfolgt eine Prüfung der Unterlagen daraufhin, ob die betreffende Studie nach anerkannten

internationalen Standards erfolgt ist. Zusätzlich wird die Methode vom CRL experimentell auf Eignung mit den Proben getestet, die der Antragsteller eingereicht hat.

Aufgrund des modularen Aufbaus der Methodvalidierung kann eine Methode in verschiedene Teile gegliedert werden, wie etwa die Probenahme, die DNA-Isolation und das PCR Verfahren. Wenn eine DNA Extraktionsmethode bereits als validiert verfügbar ist, muss dieser Teilbereich nicht eigens nochmals validiert werden, vorausgesetzt der Antragsteller kann die Eignung dieser Methode für den bestimmten Zweck (hier Matrix) darlegen.

Schritt 3: Vor einem Ringversuch führt das CRL experimentelle Vorversuche mit der erhaltenen Methode und dem dazugehörigen Probenmaterial durch. Dabei muss die Methode bereits die Mindestanforderungen erfüllen, die vom ENGL festgelegt und veröffentlicht wurden (<http://gmo-crl.jrc.it/guidancedocs.htm>).

Wenn eine Methode diese Kriterien in den Vorversuchen nicht erfüllt, wird dieses (experimentelle) Ergebnis durch ein anderes Labor aus dem ENGL nochmals überprüft.

Nach dem 3. Schritt der Validierung sind grundsätzlich drei verschiedene Situationen denkbar.

1. Eine Validierungsstudie wird durchgeführt, wenn die Ergebnisse aus den Vorversuchen befriedigend sind und die Methode nicht bereits validiert wurde.
2. Eine Validierungsstudie wird nicht durchgeführt, wenn die Methode bereits nach internationalen Standards validiert wurde.
3. Die Methode wird zurückgewiesen, wenn ihre Leistungscharakteristik als nicht akzeptabel beurteilt wird.

Schritt 4: Der Ringversuch wird mit mindestens zwölf erfahrenen Europäischen Laboratorien durchgeführt, die die erforderlichen Qualitätskriterien wie z.B. die Akkreditierung nach EN ISO/IEC 17025 erfüllen. Gegenwärtig sind die Teilnehmer alle Mitglieder im ENGL.

Schritt 5: Die erhaltenen Ergebnisse werden mit den festgelegten Mindestanforderungen an die Methode verglichen und bewertet. Es gibt drei verschiedene Berichterstattungsdokumente, die vom CRL dazu verfasst werden.

1. Der offizielle Bericht: Darin werden die Ergebnisse zur Verwendung im offiziellen Zulassungsverfahren zusammengefasst.
2. Der zusammengefasste Bericht: Auf der Internetseite des CRL wird eine kurze Zusammenfassung mit dem Ergebnis der Evaluierung veröffentlicht.

3. Der wissenschaftliche Bericht: In einem wissenschaftlich abgefassten Bericht werden die Ergebnisse der Validierungsstudie und die Methode selbst veröffentlicht. Dieser Bericht wird nach Abschluss der Validierungsstudie an alle Mitglieder des ENGL verschickt und nach Beendigung des Zulassungsverfahrens auch auf der Internetseite des CRL veröffentlicht.

Referenzmaterialien

Ein wesentlicher Aspekt der GVO Analyse ist die Verfügbarkeit von Referenzmaterial (CRM). Die quantitative GVO Analyse wird üblicherweise mittels Real-Time PCR durchgeführt. Diese Methode erfordert zur Durchführung, wie jede andere (bio)chemische Analyse, Referenzmaterialien mit definierten Gehalten des Analyten. Der Analyt in der PCR ist DNA. Bisher werden die meisten kommerziell erhältlichen CRM für die GVO Analyse aus getrocknetem gemahlenem Pflanzenmaterial hergestellt, das definierte Mengen, d.h. Gewichtsanteilen an gentechnisch verändertem Pflanzenmaterial enthält. Die Mengenangaben werden in Gewichtsprozent angegeben. Nachdem jedoch der Analyt DNA ist und analytisch nicht Gewichtsprozente, sondern DNA Kopienzahlverhältnisse bestimmt werden und unter Berücksichtigung der Europäischen Empfehlung (Empfehlung der Kommission vom 4. Oktober 2004) sollte CRM künftig hinsichtlich prozentualen GVO Gehalten in DNA Kopienverhältnissen von Transgenen zu Referenzgenen bezogen auf das haploide Genom zertifiziert werden.

Wie bereits erwähnt muss nach Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 ein Antragsteller eine Nachweismethode sowie Kontroll- bzw. Referenzmaterial bereitstellen. Diese neue Regelung bedeutet für die Analytik im Rahmen der offiziellen Lebens- und Futtermittelüberwachung eine Erleichterung, da dadurch die schnelle Verfügbarkeit einer Nachweismethode für neu zugelassenen GVO in der EU sichergestellt wird.

Dennoch bedeutet die schnelle Verfügbarkeit von Referenzmaterial nicht notwendigerweise, dass gleichzeitig auch zertifiziertes Referenzmaterial verfügbar ist. Die Produktion von CRM, wie dies z.B. vom Institut of Reference Material and Measurements (IRMM, Geel, Belgien) durchgeführt wird, kann sehr zeitaufwendig sein. Dieses CRM ist üblicherweise aus pflanzlichem Material. Dabei müssen unter anderem Untersuchungen zur Stabilität des Analyten im CRM durchgeführt werden, was bis zu zwei Jahren oder länger dauern kann. Das bedeutet, dass es unwahrscheinlich ist, dass für jeden neu zugelassenen GVO am Tage der Zulassung solches Referenzmaterial zur Verfügung steht.

Eine mögliche Lösung für diese Situation stellt die Verwendung von Plasmiden als Referenzmaterial dar. Solche Plasmide (zirkuläre DNA) enthalten typische Sequenzen des gentechnisch veränderten Organismus, als auch der unmodifizierten Pflanze.

Durch das ENGL wird deshalb eine Plasmidsammlung aufgebaut, die gegenwärtig 57 Plasmide für die GVO Analytik umfasst. Diese Sammlung wird allen ENGL Mitgliedern im Rahmen der amtlichen Überwachung von Lebensmitteln, Futtermitteln und Saatgut spätestens 2006 zugänglich sein.

Das Gemeinschaftsreferenzlabor

Das Gemeinschaftsreferenzlabor (Community Reference Laboratory, CRL) wurde auf Grundlage der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 gegründet. Das CRL befindet sich in der Gemeinsamen Forschungsstelle der Kommission, dem Joint Research Centre (JRC) in Ispra, Italien unter der Verantwortlichkeit der Biotechnology and GMO Unit des Institutes for Health and Consumer Protection. Das CRL und seine Aufgaben und Pflichten sind im Anhang der genannten Verordnung beschrieben.

„Das Gemeinschaftsreferenzlabor ist insbesondere verantwortlich für:

- den Empfang, die Aufbereitung und Pflege der entsprechenden positiven und negativen Kontrollproben und ihre Verteilung an die nationalen Referenzlaboratorien
- die Untersuchung und Validierung der Verfahren zum Nachweis, einschließlich der Probenahme und der Identifizierung des Transformationsereignisses sowie gegebenenfalls des Nachweises und der Identifizierung des Transformationsereignisses in dem Lebensmittel oder Futtermittel
- die Evaluierung der Daten, die der Antragsteller für die Zulassung zum Inverkehrbringen des Lebensmittels oder des Futtermittels zum Zweck der Untersuchung und Validierung der Verfahren zur Probenahme und zum Nachweis vorgelegt hat
- die Vorlage vollständiger Evaluierungsberichte bei der Behörde“ [EFSA]

Zudem ist das CRL an der Beilegung von Streitigkeiten beteiligt, die sich zwischen Mitgliedstaaten hinsichtlich von Ergebnissen aus den genannten Aufgaben ergeben.

Literatur

ISAAA: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications [http://www.isaaa.org/kc/CBTNews/press_release/briefs32/ESummary/Executive%20Summary%20\(English\).pdf](http://www.isaaa.org/kc/CBTNews/press_release/briefs32/ESummary/Executive%20Summary%20(English).pdf)

VO (EG) Nr. 1829/2003: Amtsblatt der Europäischen Union L 268/1 vom 18.10.2003

VO (EG) Nr. 1830/2003: Amtsblatt der Europäischen Union L 268/24 vom 18.10.2003

VO (EG) Nr. 65/2004: Amtsblatt der Europäischen Union L 10/5 vom 16.01.2004

VO (EG) Nr. 641/2004: Amtsblatt der Europäischen Union L 102/14 vom 07.04.2004

Empfehlung der Kommission: Amtsblatt der Europäischen Union L 348/18 vom 24.11.2004

Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA): <http://www.efsa.eu.int>

Community Reference Laboratory (CRL): <http://gmo-crl.jrc.it>

European Network of GMO Laboratories (ENGL): <http://engl.jrc.it>

Joint Research Centre (JRC): <http://www.jrc.cec.eu.int>

Mindestanforderungen an Nachweismethoden: <http://gmo-crl.jrc.it/guidancedocs.htm>

EN ISO/IEC 17025: Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien

Neue Strategien zum Nachweis gentechnisch veränderter Lebens- und Futtermittel

Francisco X. Moreano, Ulrich Busch
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
85764 Oberschleißheim

Die Verwendung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) und daraus abgeleiteten Produkten für die Herstellung von Lebens- und Futtermitteln wird seit April 2004 durch die Verordnungen (EG) Nr. 1829/2003 und (EG) Nr. 1830/2003 reguliert. Dieser legislative Rahmen harmonisiert auf europäischer Ebene die Prozesse für die Risikobewertung und die Zulassung von gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermitteln und definiert Bestimmungen für ihre Rückverfolgbarkeit, Kennzeichnung und ihr post-marketing Monitoring.

Die Gesetzgebung sieht vor, dass alle Produkte, die aus GVO bestehen, diese enthalten oder daraus hergestellt wurden, für den Verbraucher als solche kenntlich gemacht werden müssen. Die Kennzeichnung erfolgt unabhängig von der Nachweisbarkeit von rekombinantem Material (DNA und/oder Proteine) in den Endprodukten und stützt sich auf Datenerhebungen im Rahmen des Rückverfolgbarkeitssystems. Von dieser weit reichenden Kennzeichnungspflicht ausgenommen sind lediglich Lebens- und Futtermittel, die zufällige oder technisch unvermeidbare Spuren an gentechnisch verändertem Material aufweisen. Der Kennzeichnungsschwellenwert beträgt 0,9 % (bezogen auf die einzelne Zutat) für in Europa zugelassene GVO und 0,5 % für nicht zugelassene, jedoch von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) als sicher bewertete GVO. Für nicht sicherheitsbewertete GVO gilt dagegen eine analytische Nulltoleranz, d.h. diese Organismen sind in Europa nicht verkehrsfähig.

Zur Kontrolle der Kennzeichnungsbestimmungen ist die amtliche Lebensmittelüberwachung auf die Durchführung einer qualitativen bzw. quantitativen GVO-Analytik angewiesen. Die Etablierung von geeigneten molekularbiologischen Analyseverfahren ermöglicht die zuverlässige Detektion, Identifizierung und Quantifizierung von gentechnisch veränderten Zutaten in der gesamten Lebens- und Futtermittelkette. Die Basis der Analytik bilden sowohl Daten über die

molekularbiologische Charakterisierung der GVO als auch entsprechende Event-spezifische Nachweisverfahren, welche im Rahmen des Zulassungsprozesses eines jeden gentechnisch veränderten Organismus von dem Antragsteller zur Verfügung gestellt werden müssen. Die Methoden werden in internationalen Ringversuchen vom Referenzlaboratorium der Kommission (CRL) in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Netzwerk von GVO Laboratorien (ENGL) validiert und anschließend veröffentlicht. Referenzmaterialien, die als Standards in der GVO-Analytik verwendet werden können, werden vom IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgien) entwickelt und vermarktet.

Herausforderungen für die GVO-Analytik

Die Durchführung der Routineanalytik im Lebens- und Futtermittelbereich wird, trotz des ausführlichen Regelwerkes, durch eine Reihe von Hindernissen erschwert. Zu diesen zählt in erster Linie die weltweit stetig steigende Anzahl an gentechnisch veränderten Organismen (Transformationsereignisse), von denen nur ein Bruchteil für die Produktion von Lebens- und Futtermitteln in Europa auch tatsächlich zugelassen werden. Die amtliche Lebens- und Futtermittelüberwachung beschäftigt sich aus diesem Grund intensiv mit der Kontrolle von nicht zugelassenen GVO.

Es ist jedoch sehr arbeitsintensiv, auf Fälle einer unbeabsichtigten Einfuhr von in Europa nicht zugelassenen GVO zu reagieren, wenn keine Zugriffsmöglichkeiten auf Daten einer molekularbiologischen Charakterisierung bestehen. Ein Beispiel dazu stellte in diesem Jahr die unbeabsichtigte Einfuhr von Saatgut und Derivaten der nicht zugelassenen gentechnisch veränderten Maislinie (Bt10) dar [1]. Eine weitere Schwierigkeit entsteht bei der Analyse von prozessierten bzw. zusammengesetzten Lebens- und Futtermitteln, welche eine Reihe von Zutaten aus unterschiedlichen GVO beinhalten können. Bei diesen Fällen ist es nicht zielführend, wenn Routineuntersuchungen unter Anwendung von hochspezifischen Nachweismethoden eingeleitet werden, denn diese erlauben lediglich die Erfassung einer bestimmten Anzahl meist zugelassener GVO. Eine bewährte analytische Strategie für die Untersuchung solcher Fälle besteht in der Anwendung von qualitativen Screeningverfahren, die den Nachweis von in transgenen Linien oft vorkommenden regulatorischen Sequenzen ermöglichen. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit der Erfassung eines breiten Spektrums von zugelassenen und/oder nicht zugelassenen GVO-Linien erhöht. Die Anwendung dieser Verfahren kann dennoch, aufgrund der Natur der nachgewiesenen Sequenzen (natürlich vorkommende genetische Elemente, z.B. CaMV

35S-Promotor), zu falsch-positiven Untersuchungsergebnissen führen. Aus diesem Grund müssen positive Ergebnisse anhand Event-spezifischer Nachweisverfahren bestätigt werden.

Das größte Hindernis für GVO-Laboratorien stellt allerdings die limitierte Verfügbarkeit von zertifizierten Referenzstandards für die qualitative und quantitative Analytik dar. Das IRMM bietet Referenzstandards für eine begrenzte Anzahl von zugelassenen GVO an; für nicht zugelassene GVO sind keine Referenzmaterialien verfügbar. Dieser Mangel an Referenzstandards erschwert auf der einen Seite die Qualitätssicherung von Untersuchungsergebnissen und verhindert auf der anderen Seite die Durchführung einer quantitativen Analytik.

Neue analytische Strategien

Die Entwicklung von analytischen Strategien für den Nachweis gentechnisch veränderter Organismen stützt sich auf ein duales Konzept mit dem Ziel, eine qualitative und quantitative Erfassung eines breiten Spektrums an GVO in Lebens- und Futtermitteln zu ermöglichen. Das Konzept basiert auf (a) dem Design von real-time PCR Systemen in Kombination mit entsprechenden synthetischen Standards für das quantitative Screening von GVO, und (b) dem Einsatz einer ligationsabhängigen PCR für den simultanen Nachweis und die Quantifizierung mehrerer rekombinanten DNA-Sequenzen in einem einzelnen Reaktionsansatz.

Das erste Projekt wurde am Beispiel von transgenem Raps erarbeitet, da sowohl die Vielfalt an gentechnisch veränderten Linien als auch der Mangel an zertifizierten Referenzstandards ein besonderes Problem für die GVO-Analytik darstellen. Vor diesem Hintergrund wurden multiplex real-time PCR Systeme für das quantitative Screening Herbizid-toleranter Rapslinien (LibertyLink™ und SeedLink™) entwickelt und validiert.

Die Herstellung der Quantifizierungsstandards (Abbildung 1) erfolgte in Anlehnung an ein neuartiges Verfahren, welches die Verknüpfung von GVO-spezifischen und Taxon-spezifischen Targetsequenzen zu einem Hybridmolekül ermöglicht [2].

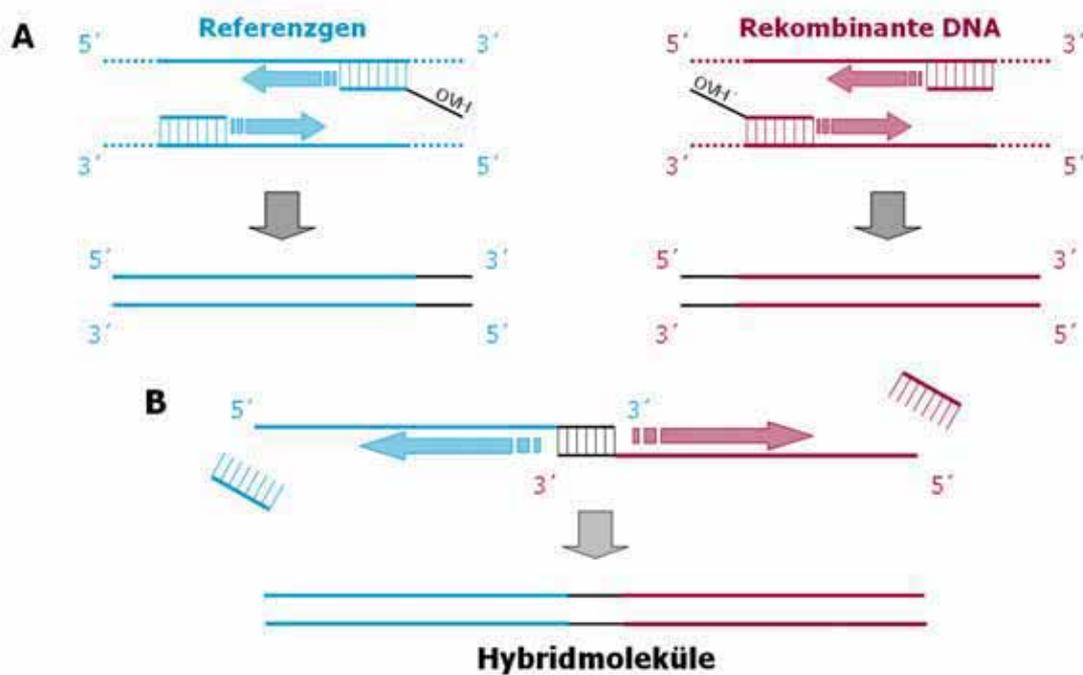


Abb. 1: Herstellung von Hybridmolekülen. Die Synthese von DNA-Standards erfolgt in zwei Schritten. In einer ersten Reaktion (A) werden die GVO-spezifischen und Taxon-spezifischen Targetsequenzen in separaten Ansätzen unter Anwendung von speziellen Primern amplifiziert. Die Primer verfügen über Überhangsequenzen (OVH und OVH'), welche komplementär zueinander sind. In einer zweiten Reaktion (B) werden die erzeugten Amplicons vermischt und einer zweiten Amplifizierung unterzogen. Dabei fungieren die OVH-Sequenzen als initiale Primer für die Generierung und Vervielfältigung von Hybridmolekülen.

Es wurden zwei Hybridmoleküle synthetisiert. Diese verfügen jeweils sowohl über eine Targetsequenz für Konstrukt-spezifische Übergangsregionen der Herbizid-resistenten Rapslinien (LibertyLink™ bzw. SeedLink™) als auch über eine Targetsequenz für das Raps-spezifische Acetyl-CoA Carboxylase (*BnACCg8*-) Gen. Die Benutzung solcher Moleküle als Referenzstandards erlaubt die relative Quantifizierung rekombinanter DNA im Verhältnis zu einem Taxon-spezifischen Referenzgen, bezogen auf haploide Genome.

Die Anwendbarkeit dieses Systems für das quantitative Screening rekombinanter DNA wurde anhand von Mischungen aus DNA transgener und konventioneller Rapslinien demonstriert. Die Erstellung von Kalibriergeraden anhand unterschiedlicher Verdünnungen der DNA-Standards ergab analoge Ergebnisse für Reaktionen in Simplex- und Duplexformate. Die Ergebnisse der Validierung der quantitativen Screeningsysteme sind in Tabellen 1 und 2 aufgelistet.

Erwarteter GVO-Anteil [%]	1. Versuchsreihe*			2. Versuchsreihe*		
	GVO	Rel. GVO	RSD	GVO	Rel. GVO	RSD
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
1,8	1,9	106,7	9,7	1,8	98,1	4,3
0,9	0,9	99,7	11,1	0,8	90,2	13,1
0,09	0,06	68,8	11,0	0,06	62,8	11,3
0,045	n.q.			n.q.		

GVO = Ermittelter GVO-Anteil

Rel. GVO = Wiederfindung

RSD = Relative Standardabweichung

n.q. = nicht quantifizierbar

* n = 10

Tabelle 1: Quantitatives Screening gentechnisch veränderter Rapslinien anhand synthetischer DNA-Standards: LibertyLink™ -System

Erwarteter GVO-Anteil [%]	1. Versuchsreihe*			2. Versuchsreihe*		
	GVO	Rel. GVO	RSD	GVO	Rel. GVO	RSD
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
1,8	2,5	140,1	13,2	2,1	117,8	14,5
0,9	1,0	114,5	10,8	0,9	99,9	20,3
0,09	0,04	46,8	9,6	0,06	64,1	8,8
0,045	n.q.			n.q.		

GVO = Ermittelter GVO-Anteil

Rel. GVO = Wiederfindung

RSD = Relative Standardabweichung

n.q. = nicht quantifizierbar

* n = 10

Tabelle 2: Quantitatives Screening gentechnisch veränderter Rapslinien anhand synthetischer DNA-Standards: SeedLink™ -System

Die quantitativen Screeningsysteme lieferten gute Wiederfindungswerte, insbesondere im Bereich des Kennzeichnungsschwellenwertes (0,9%), bei niedrigen und nahezu konstanten relativen Abweichungen. Darüber hinaus zeigten beide Systeme eine hohe Zuverlässigkeit bei der Detektion von nicht quantifizierbaren Spuren von rekombinanten DNA-Sequenzen. Bei GVO-Anteilen von 0,045 % (~30 Kopien recDNA/Reaktion) konnten keine quantitative Aussagen getroffen werden, es wurden jedoch keine falsch-negative Ergebnisse erhalten.

Das zweite Projekt beschäftigte sich mit der Anwendung einer neuartigen Technik, die ligationsabhängige Amplifizierung synthetischer Hybridisierungssonden (LPA), für den simultanen Nachweis und die relative Quantifizierung von DNA verschiedener gentechnisch modifizierten Organismen. Ziel der Weiterentwicklung dieser ursprünglich für die klinische Diagnostik konzipierten Technik [3] ist der Nachweis eines breiten Spektrums

an rekombinanten DNA Sequenzen in *einem* Reaktionsansatz. Der Ablauf der ligationsabhängigen Reaktion ist in Abbildung 2 dargestellt.

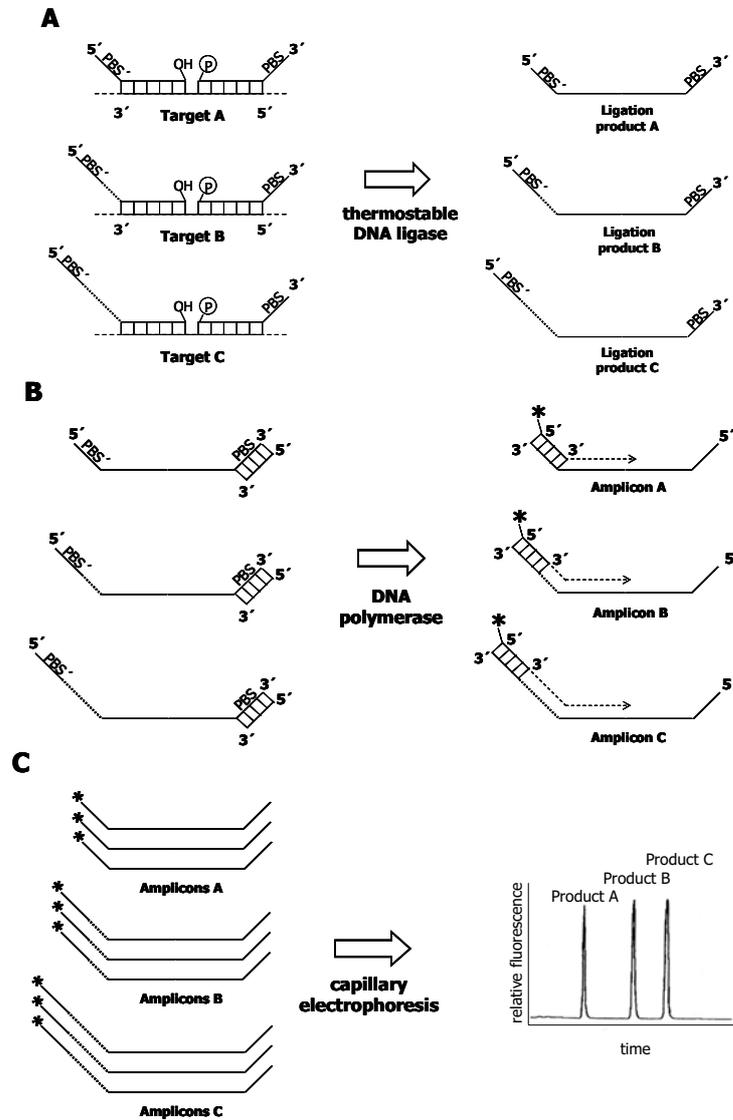


Abb. 2: Ligationsabhängige Amplifizierung von DNA-Sequenzen [4]. In einem ersten Reaktionsschritt (A) hybridisieren die Sondenpaare auf den entsprechenden Targetsequenzen. Diese werden durch eine thermostabile Ligase ligiert. Das Enzym katalysiert ausschließlich die Verknüpfung benachbarter 3'-hydroxylierter und 5'-phosphorylierter Enden in stabilen doppelsträngigen DNA Strukturen. Die Verwendung von Spacersequenzen zwischen Primerbindestellen und Hybridisierungsstellen der Sonden verleiht den Ligationprodukten einer charakteristischen Länge für die jeweiligen Targetsequenzen. Die universelle Primerbindestellen an den 3'- und 5'-Enden aller Ligationprodukte ermöglichen ihre anschließende kompetitive Amplifizierung unter Anwendung eines gemeinsamen Primerpaares (B). Die Benutzung eines markierten Primers erlaubt die Trennung und die Detektion der amplifizierten Produkte mittels Kapillarelektrophorese (C).

Wie in Abbildung 3 dargestellt, erlaubt das gezielte Design von LPA-Sonden sowohl den Nachweis Event-spezifischer Regionen in transgenen Linien (Mais MON810 und Roundup

Ready Soja), einer Konstrukt-spezifischen Übergangssequenz in LibertyLink™- Linien (P35S/*pat*-Gen), eines in GVO oft vorkommenden regulatorischen Elements (CaMV 35S-Promotor) als auch den Nachweis Mais-, Soja- und Raps-spezifischer Referenzgene (*HMGa*-, *Le1*-, bzw. *BnACCg8*- Gene).

Die potentielle Anwendbarkeit dieser Technik für die relative Quantifizierung rekombinanter DNA wurde bereits in einer früheren Arbeit durch die Erstellung von Kalibriergeraden unter Anwendung von kommerziellen Referenzstandards demonstriert [4]. Diese analytische Strategie erlaubt den Aufbau eines modularen Systems, dessen Flexibilität Erweiterungen für den Nachweis und die Quantifizierung weiterer Zielsequenzen durch das Design zusätzlicher Sonden zulässt.

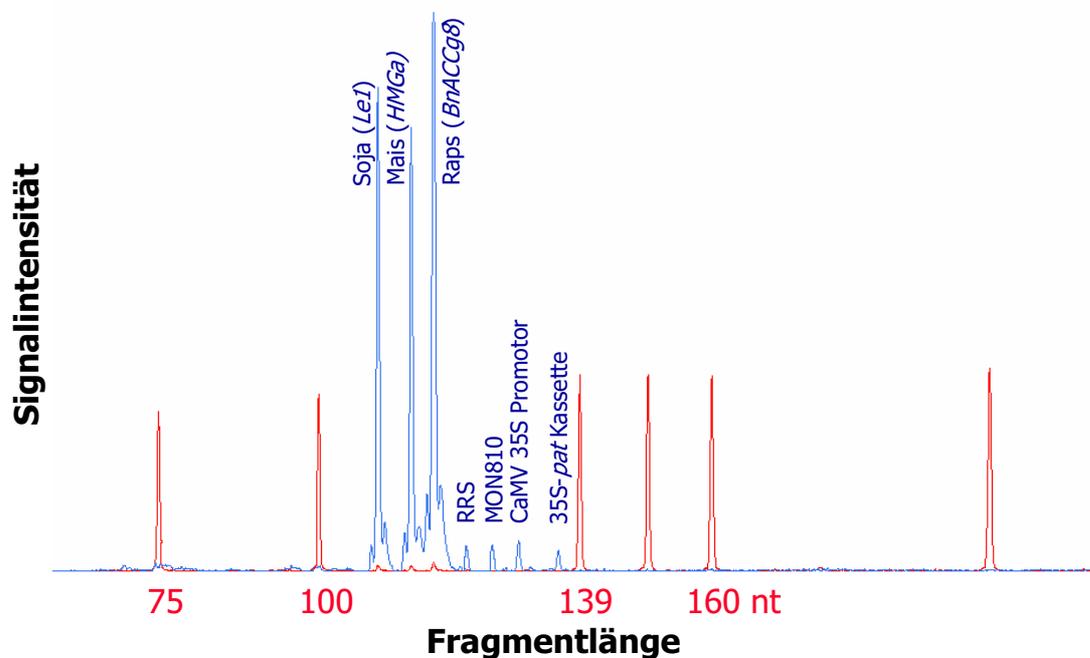


Abb. 3: Simultaner Nachweis mehrerer rekombinanter DNA-Sequenzen und Taxa-spezifischer Referenzgene mittels ligationsabhängiger Amplifizierung (LPA) [5]. Kapillarelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Ligationsprodukte nach ihrer Länge. Soja (*Le1*- Gen), 110 nt; Mais (*HMGa*- Gen), 114 nt; Raps (*BnACCg8*- Gen), 118 nt; Roundup Ready Soja, 122 nt; Mais MON810, 126 nt; CaMV 35S Promotor, 130 nt; Übergangssequenz 35S/*pat*-Gen, 135nt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl die Etablierung als auch die Durchführung eines ausgedehnten Überwachungsprogramms von GVO in Lebens- und Futtermitteln durch eine gezielte Entwicklung neuer analytischen Strategien gefördert werden können. Mit der dargestellten Kombination von etablierten und neuartigen

Technologien ist die amtliche Überwachung selbst in der Lage synthetische Referenzstandards für die GVO-Analytik zu entwickeln und diese für die Etablierung von qualitativen und quantitativen Screeningverfahren einzusetzen. Damit kann eine zuverlässige Detektion, Identifizierung und Quantifizierung eines breiten Spektrums an zugelassenen bzw. nicht zugelassenen GVO innerhalb der gesamten Lebens- und Futtermittelkette durchgeführt werden.

Danksagung

Diese Projekte wurden aus Mitteln des Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz gefördert.

Literatur

1. Macilwain C. (2005): US launches probe into sales of unapproved transgenic corn. *Nature*, 2. doi:10.1038/nature03570.
2. Pardigol A., Guillet S., Pöpping B. (2003): A simple procedure for quantification of genetically modified organisms using hybrid amplicon standards. *Eur Food Res. Technol.*, 216, 412–420.
3. Schouten J. P., McElgunn C. J., Waaijer R., Zwiijnenburg D., Diepvens F., Pals G. (2002): Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucl. Acids. Res.* 30 (12); e57.
4. Moreano F., Ehlert A., Busch U., Engel K.-H. (2005): Ligation-dependent probe amplification for the simultaneous event-specific detection and relative quantification of DNA from two genetically modified organisms. *Eur. Food Res. Technol.* DOI: 10.1007/s00217-005-0169-9.
5. Ehlert A., Moreano F., Busch U., Engel K.-H. Use of ligation-dependent probe amplification for simultaneous detection of different genetically modified organisms. *Euro Food Chem XIII*, Sept. 19. – 21. Hamburg.

Qualitätssicherung in der GVO-Analytik in bayerischen Untersuchungslaboratorien

O. Goerlich¹, S. Grüneberg², C. Burtscher², U. Busch¹

¹ Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Veterinär Str. 2, 85764 Oberschleißheim

² Bayerisches Landesamt für Umwelt, Bürgermeister-Ulrich-Str. 160, 86179 Augsburg

Hintergrund und Zielsetzung

Die Analytik gentechnisch veränderter Organismen (GVO) gewinnt insbesondere aufgrund der EU-weiten Regelung zur Kennzeichnungspflicht von Produkten, die aus GVO bestehen, daraus hergestellt wurden, bzw. solche enthalten, eine außerordentliche Bedeutung.

Als Methode der Wahl für die Quantifizierung von GVO-Anteilen hat sich die Real-time PCR durchgesetzt. Wesentlich für eine verlässliche Quantifizierung von GVO-Anteilen ist der Einsatz von geeigneten Kalibrierstandards. In der Regel wird eine Verdünnungsreihe aus genomischer GVO-DNA für die Kalibrierung verwendet und die transgene DNA-Sequenz in der Probe ins Verhältnis mit einem Referenzgen gesetzt (relative Quantifizierung).

Zertifiziertes Referenzmaterial bzw. Referenz-DNA-Standards sind gegenwärtig für viele GVO nur schwer bzw. gar nicht verfügbar. Das Ziel dieses Projektes ist es, die für die GVO-Analytik relevanten Genbereiche in Form von Plasmidstandards zu entwickeln und herzustellen. Die Standards sollten für GVO-Analysen von Saatgut, Lebens- und Futtermitteln validiert werden.

In Bayern werden qualitative und quantitative Untersuchungen zum Nachweis von GVO in Saatgut, in Lebens- und Futtermitteln, sowie von gentechnisch veränderten Pflanzen auf und in der Umgebung von Freisetzungsfeldern sowohl von amtlichen Untersuchungslaboratorien als auch von kommerziellen Unternehmen durchgeführt. Dabei werden unterschiedlichste Verfahren und Methoden eingesetzt, die nicht immer zu

vergleichbaren Messergebnissen führen. Insbesondere variieren die verwendeten Positivkontrollen und Referenzstandards für die Quantifizierung von GVO-Anteilen in Mischproben. Ein Hauptziel des Projektes ist es, einheitliche Referenzstandards zu entwickeln. Die Standards werden in Anlehnung an bereits vorhandene Länder- bzw. EU-Richtlinien für GVO-Analysemethoden entwickelt und sollen zunächst in bayerischen Untersuchungslaboren für verschiedene Matrices getestet und etabliert werden. Schließlich werden die Standards in einem Ringversuch, an dem sowohl Bundes- als auch EU-weit Analytiklabore teilnehmen können, validiert. Die GVO-Analytik soll somit weiter verbessert und harmonisiert werden, um die Qualität und justiziable Akzeptanz von quantitativen Analyseergebnissen wesentlich zu erhöhen.

Ergebnisse

Beteiligte Labore

Institution/Firma	Aufgabe
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit * Veterinärstraße 2 85764 Oberschleißheim Bayerisches Landesamt für Umweltschutz * Bürgermeister-Ulrich-Str. 160 86177 Augsburg	Koordination, fachliche Betreuung, Literaturlauswertung, Entwicklung geeigneter PCR-Systeme, Etablierung der Plasmidstandards für Pflanzen und Saatgut, Organisation und Auswertung von Referenzmessungen und Ringversuchen, Qualitätssicherung, Erstellung von Berichten
EpiGene GmbH Hohenbachernstrasse 19-21 85354 Freising	Entwicklung und Herstellung der Plasmidstandards für die qualitative und quantitative GVO-Analytik,
lifeprint GmbH Industriestr. 12 89257 Illertissen	Etablierung der Plasmidstandards für Lebens- und Futtermittel Teilnahme an Referenzmessungen/ Ringversuchen
Genetic ID AG Am Mittleren Moos 48 86167 Augsburg	Etablierung der Plasmidstandards für Lebens- und Futtermittel Teilnahme an Referenzmessungen/ Ringversuchen

* die Aufgaben des Bayerischen Landesamts für Umweltschutz in diesem Projekt wurden ab 01.08.05 vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit übernommen.

Plasmidstandards

Es wurden 2 Plasmidstandards hergestellt:

Screeningplasmid

Ein Plasmid, das häufig in gentechnisch veränderten Pflanzen verwendete genetische Elemente enthält und deshalb für das Screening nach gentechnisch veränderten Bestandteilen geeignet ist.

Parameter	Beschreibung	Real-time-PCR Systeme
35S	35S Promotor des CaMV	DRAFT prEN ISO 21570, 2003 (5)
Nos	nos-Terminator aus <i>A. tumefaciens</i>	Kuribara et. al, 2002 (6) Eigene Systeme § 64 LFGB Vorringversuch
nptII	Neomycintransferase aus <i>E.coli</i>	Eigene Systeme
CaMV	CaMV-spezifische Sequenz zum Ausschluss v. CaMV-Infektionen	Eigene Systeme

Referenzgenplasmid

Ein Plasmid, das für die wichtigsten in der grünen Gentechnik verwendeten Pflanzenarten (Mais, Raps, Soja) spezifische Sequenzen enthält und bei der relativen Quantifizierung von GVO-Anteilen eingesetzt werden kann.

Parameter	Beschreibung	Real-time-PCR Systeme
Maisreferenzgen	Mais High Mobility Gen	DRAFT prEN ISO 21570, 2003 (5)
Sojareferenzgen	Soja-Lectin	DRAFT prEN ISO 21570, 2003 (5)
Rapsreferenzgen	S. glucosyltransferase	Block A., Schwarz G., 2003 (4)
Rapsreferenzgen	pep-C Gen	Zeitler et. al. 2002 (3)

Charakterisierung der Plasmidstandards

Zu den Standards passende Real-time PCR Systeme wurden – soweit bereits beschrieben – etabliert oder neu entwickelt.

Es wurde anhand der vorliegenden Sequenzinformationen und experimentell verifiziert, dass die Plasmidstandards mit den aufgeführten PCR—Systemen kompatibel sind.

Anhand von Verdünnungsreihen der Standards wurde mit den Real-time PCR Systemen eine Grundvalidierung durchgeführt. Die Messungen erlauben Rückschlüsse auf wichtige Parameter der Systeme, wie PCR-Effizienz, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.

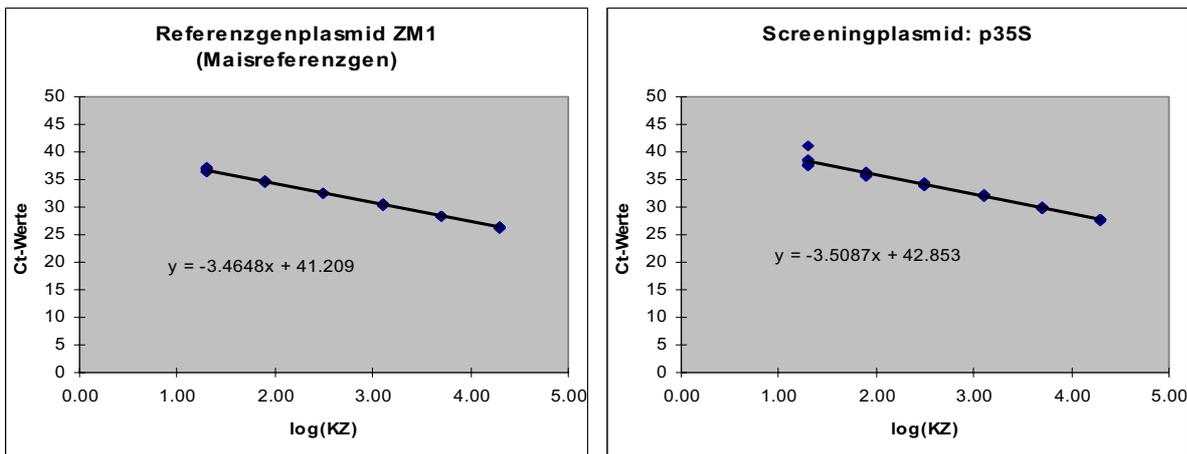


Abbildung 1: Kalibriergeraden für die Real-time PCR-Systeme p35S (Screening-Plasmid) und ZM1 (Referenzgenplasmid)

Die Grafiken zeigen eine Auftragung der C_t -Werte der PCR-Reaktion (6-fach-Bestimmung) gegen den Logarithmus der Plasmid-Kopienzahl. Real-time PCR Messungen wurden mit einem ABI Prism 7900 Sequence Detection System durchgeführt. Bei der Bestimmung der Plasmid-Kopienzahlen durch Fluoreszenzmessung kam das PicoGreen-System (Molecular Probes, Eugene, USA) (4) zum Einsatz.

Aus den Kalibriergeraden lassen sich folgende Parameter ermitteln:

	ZM1	p35S
PCR-Effizienz	1.94	1.93
Korrelationskoeffizient R^2	0.999	0.997

Die gemessenen PCR-Effizienzen liegen nahe bei dem für 100% PCR-Effizienz zu erwartenden Wert von 2.

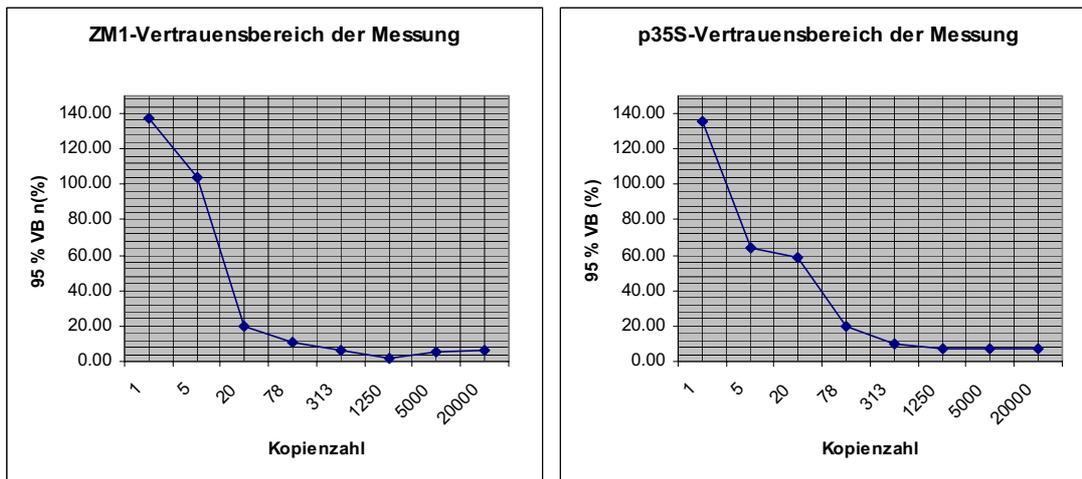


Abbildung 2: Abschätzung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Der Vertrauensbereich der Messung (95% Wahrscheinlichkeit) in % wurde nach (1) berechnet. Aus der Auftragung des Vertrauensbereichs gegen die Kopienzahlen können Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen abgeschätzt werden (2). Die aus den Auftragungen ablesbaren Bestimmungsgrenzen (95% VB > 30%, etwa 30 Kopien) und Nachweisgrenzen (95 % VB > 100%, etwa 5 Kopien) kommen den theoretisch für optimal eingestellte PCR—Systeme zu erwartenden Werten nahe.

Geplante Projektschritte

Voraussichtlich in einem Folgeprojekt sollen folgende Themenbereiche/ Fragen bearbeitet werden:

- Sind die Plasmidstandards äquivalent zu Standards aus genomischer Pflanzen-DNA?
- Sollen die Standards in reiner Form oder in einem Background aus genomischer DNA verwendet werden?
- Die Stabilität der Standards soll überprüft werden.
- Die Eignung der Standards für die Saatgut- und Lebensmittelanalytik soll in Zusammenarbeit mit anderen bayerischen Untersuchungslaboren erprobt werden.
- Die Verfahren sollen durch Ringversuche, für die eine bundes- und EU-weite Beteiligung vorgesehen ist, validiert werden.

Danksagung

Dieses Projekt wird gefördert aus Mitteln des Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz.

Literatur

- [1] Kromidas, S.: Validierung in der Analytik, Wiley-VCH,, Weinheim (1999)
- [2] Hübner, P. Waiblinger, H.-U., Pietsch, K. and P. Bordmann:
Validation of PCR Methods for Quantitation of Genetically Modified Plant in Food.
Journal of AOAC International 84: 1855-1864 (2001)
- [3] Zeitler, R. Pietsch, K. Waiblinger, H.-U.: Validation of real-Time PCR methods for the
quantification of transgenic contaminants in rape seed.
Eur Food Res Technol 214: 346-351. (2002)
- [4] Block, A., Schwarz, G.: Validation of different genomic and cloned DNA calibration standards
for construct-specific quantification of LibertyLink rapeseed by real-time PCR
Eur Food Res Technol 216: 421-427 (2003)
- [5] DRAFT prEN ISO 21579 Foodstuffs- Methods of analysis for the detection of genetically
modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods
(IS/DIS 21570:2003)
- [6] Kuribara, H.: Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and
soybean. Journal of AOAC International 85:1077-1089 (2002)

Entwicklung und Validierung molekularbiologischer Nachweissysteme in der Allergenanalytik

Christine Hupfer, Ulrich Busch
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
85764 Oberschleißheim

Die steigende Häufigkeit von Lebensmittelallergien stellt eine Herausforderung für den gesundheitlichen Verbraucherschutz dar. So sind derzeit 1-3 % der Erwachsenen und 4-6 % der Kinder und Jugendlichen von echten immunologisch vermittelten Allergien auf Lebensmittel betroffen [1]. Obwohl sehr viele Allergiker sich ihrer Empfindlichkeit bewusst sind, kommt es immer wieder zu zum Teil schweren allergischen Reaktionen, da die entsprechenden allergenen Zutaten aufgrund unzureichender Kennzeichnung unbemerkt verzehrt wurden. Die Symptome von Lebensmittelallergien reichen dabei von Reizungen der Haut und Schleimhaut, über Störungen im Magen-Darmtrakt, Erkrankungen der Atemwege (z.B. Asthma) bis hin zu Herz-Kreislaufversagen infolge eines anaphylaktischen Schocks [2].

Vor diesem Hintergrund hat der Gesetzgeber mit erweiterten Kennzeichnungsvorschriften zur besseren Information aller Verbraucher und zum Schutz der betroffenen Allergiker reagiert.

Kennzeichnung allergener Zutaten

Basis der neuen Allergen Kennzeichnung ist die EU-Richtlinie 2003/89/EG vom 10. November 2003 [3], durch die die sog. Etikettierungsrichtlinie 2000/13/EG [4] geändert wurde. Im Anhang IIIa der Richtlinie 2003/89/EG sind die potentiell Allergie-auslösenden Lebensmittelgruppen und -zutaten aufgelistet, auf die sich die neuen Kennzeichnungsvorschriften erstrecken. Im Einzelnen handelt es sich dabei um:

- Glutenhaltiges Getreide (Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Dinkel, Kamut oder Hybridstämme davon) und daraus hergestellte Erzeugnisse
- Krebstiere und Krebserzeugnisse

- Eier und Eierzeugnisse
- Fisch und Fischerzeugnisse
- Erdnüsse und Erdnusserzeugnisse
- Soja und Sojaerzeugnisse
- Milch und Milcherzeugnisse
- Schalenfrüchte (Mandel, Haselnuss, Walnuss, Cashewnuss, Pecannuss, Paranuss, Pistazie, Macadamia- und Queenslandnuss)
- Sellerie und Sellerieerzeugnisse
- Senf und Senferzeugnisse
- Sesamsamen und Sesamsamenerzeugnisse
- Schwefeldioxid und Sulfite >10 mg/kg (SO₂)

Die EU-Richtlinie wurde durch die 3. und 5. Änderung der Lebensmittelkennzeichnungsverordnung [5, 6] in nationales Recht umgesetzt und ist ab 25. November 2005 anzuwenden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genannten allergenen Lebensmittel, so sie als Zutaten verwendet werden, von allen Kennzeichnungserleichterungen ausgenommen sind. Das bedeutet beispielsweise, dass sie im Zutatenverzeichnis aufgeführt werden müssen, auch wenn grundsätzlich keine Zutatenliste vorgeschrieben ist. Ebenfalls zu kennzeichnen sind allergene Zutaten, die in Form von "Carry over"-Zusatzstoffen, technischen Hilfsstoffen, Lösungsmitteln und Trägerstoffen, Extraktionslösungsmitteln oder Nichtzusatzstoffen, die wie technische Hilfsstoffe verwendet werden, in einem Lebensmittel eingesetzt werden. Darüber hinaus sind sie explizit aufzuführen, wenn sie als Bestandteil zusammengesetzter Zutaten (z.B. in Gewürzmischungen) oder unter einem Klassennamen Verwendung finden.

Die Kennzeichnung erfolgt unter Angabe der Verkehrsbezeichnung und gegebenenfalls einem Hinweis auf den Ausgangsstoff, z. B. "Aroma (mit Sellerieextrakt, Magermilchpulver, Weizenstärke)" oder "Emulgator E322 (aus Soja)".

Dennoch gibt es Fälle, in denen eine Zutat aus einem potentiell Allergie-auslösenden Lebensmittel nicht gekennzeichnet werden muss:

1) So muss auf eine allergene Zutat nicht noch einmal hingewiesen werden, wenn ihre Anwesenheit bereits aus der Verkehrsbezeichnung des Produktes hervorgeht;

beispielsweise ist kein zusätzlicher Hinweis auf Milchbestandteile erforderlich, wenn für ein Erzeugnis der Verkehrsbezeichnung Milchmischgetränk ein Aroma mit dem Trägerstoff Magermilchpulver verwendet wurde.

II) Der umfangreichste Teil der Ausnahmen ergibt sich jedoch aus der EU-Richtlinie 2005/26/EG vom 21. März 2005 zur Erstellung eines Verzeichnisses von Lebensmittelzutaten oder Stoffen, die vorläufig aus Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG ausgeschlossen sind [7]. Dabei handelt es sich um Zutaten, von denen im Rahmen wissenschaftlicher Studien gezeigt wurden, dass sie praktisch keine allergene Wirkung mehr haben, wie z. B. Glukosesirup auf Weizen- oder Gerstenbasis, vollständig raffiniertes Sojabohnenöl, Sellerie- und Senfsamenöl, aus Ei gewonnenes Lysozym (bei Verwendung in Wein) oder Nüsse, sofern sie in Destillaten oder als Aroma in Spirituosen eingesetzt werden.

Die im Anhang der Richtlinie 2005/26/EG aufgeführten Zutaten oder Stoffe werden vorläufig bis 25. November 2007 von der Kennzeichnungspflicht ausgenommen.

III) Ein weiterer Punkt betrifft den Umgang mit unbeabsichtigt ins Lebensmittel gelangten Stoffen. Ein Eintrag kann unter anderem infolge einer unzureichenden Reinigung einer Produktionslinie oder durch im Betrieb entstehende Stäube stattfinden. Diese sog. Kreuzkontaminationen sind nach wie vor nicht von der Kennzeichnungspflicht betroffen, da sie nicht Bestandteil der Rezeptur und somit keine Zutat sind. Sie fallen jedoch unter die Sorgfaltspflicht des Inverkehrbringers. Wie bisher ist daher ein freiwilliger Hinweis ("kann ... enthalten", "Spuren von ...") auf zu erwartende Verunreinigungen möglich, durch den der Hersteller sich gegen etwaige Ansprüche im Rahmen des Produkthaftungsgesetzes [8] absichern kann. Ob eine Überstrapazierung dieser Möglichkeit jedoch noch im Sinne des Allergikers ist, bleibt fraglich (Abb. 1).



Abb. 1: Zutatenliste eines Instant-Kartoffelbrei-Erzeugnisses

Nachweismethoden in der Allergen-Analytik

Wie in allen anderen Bereichen der Lebensmittelkennzeichnung, sind auch zur Überwachung der gesetzlichen Kennzeichnungsvorschriften für Allergie-auslösende Zutaten geeignete analytische Methoden erforderlich.

Nachweismethoden für allergene Zutaten müssen hoch spezifisch sein, da unter Umständen zwischen phylogenetisch engen Verwandten differenziert werden muss. Z. B. umfasst die Familie der Apiaceen sowohl die allergene Spezies Sellerie als auch nicht allergene Spezies wie Petersilie oder Kümmel. Ebenfalls eng verwandt sind die beiden kennzeichnungspflichtigen Schalenfrüchte Walnuss und Pekannuss, die es analytisch zu unterscheiden gilt.

Im Hinblick auf die Sensitivität der Methoden orientiert man sich - mangels Existenz eines Schwellenwertes – derzeit nicht an juristischen sondern an medizinischen Vorgaben. Die Nachweisgrenzen sollten in einem Bereich liegen, der bei empfindlichen Allergikern gerade noch eine Reaktion auslösen kann, was in etwa dem niedrigen ppm-Bereich entspricht. So waren in sog. DBPCFC (double-blind placebo-controlled food challenge) Studien, dem Goldstandard zur Beurteilung Allergie-auslösender Dosen, Mengen von nur 0,2 mg Erdnuss ausreichend um allergische Symptome hervorzurufen. Dies entspricht dem Verzehr von einer Tafel Schokolade mit 2 ppm Erdnuss [9].

Bei der Entwicklung von Nachweismethoden ist weiterhin zu berücksichtigen, dass eine Anwendung für viele unterschiedliche Lebensmittelmatrixen sowie für verarbeitete Lebensmittel gegeben sein muss und darüber hinaus die Untersuchungsmethoden für die Routineanalytik geeignet und möglichst automatisierbar sind.

Vor diesem Hintergrund gibt es im wesentlichen zwei Säulen der Allergenanalytik: den molekularbiologischen Nachweis speziesspezifischer DNA-Sequenzen mittels PCR und den immunochemischen Nachweis der allergenen Proteine bzw. geeigneter Markerproteine mittels ELISA-Methoden.

Für beide Technologien sind bereits zahlreiche Nachweismethoden publiziert bzw. in Form kommerzieller Kits erhältlich [10]. Viele kennzeichnungspflichtige Zutaten können jedoch noch immer nicht valide nachgewiesen werden. Für einen Einsatz in der Lebensmittelüberwachung bzw. Routineanalytik müssen die Nachweissysteme außerdem entsprechend validiert sein.

Sellerie gilt zum einen im europäischen Raum als eines der häufigsten Allergene bei Erwachsenen, zum anderen kommt er in einer Vielzahl an Lebensmittelprodukten vor, woraus sich insgesamt ein erhöhtes Risikopotential für den allergischen Verbraucher ergibt. Die publizierten PCR-Systeme für Sellerie sind entweder konventioneller Art [11] und damit schwer automatisierbar und kontaminationsanfällig oder nicht ausreichend spezifisch für die Diskriminierung des Sellerie von Pflanzen der gleichen Familie [12]. Auf ELISA-Basis sind derzeit keine Detektionsmethoden verfügbar. Daher besteht ein besonderer Bedarf für die Entwicklung einer validierten Detektionsmethode für Sellerie.

Der Nachweis mittels Real-time PCR erlaubt die Amplifizierung, Detektion und Verifizierung einer gesuchten DNA-Zielsequenz in einem Schritt und ist gut automatisierbar. Primer und fluoreszenzmarkierte TaqManTM-Hybridisierungssonde wurden auf der Basis einer Zielsequenz aus dem Gen der Mannitoldehydrogenase entwickelt. Damit konnte genomische Sellerie-DNA in Mengen von 10^9 – bis 10 Kopien detektiert werden (Abb. 2).

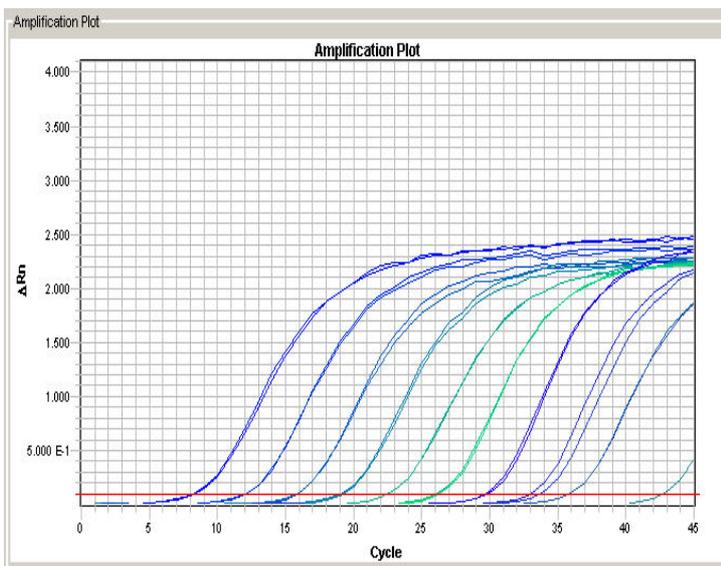


Abb. 2: Amplifizierung einer Verdünnungsreihe von 10^9 bis 10 Kopien Sellerie-DNA mittels Real-time PCR

Die Methodvalidierung erfolgte in enger Anlehnung an die Vorgaben des European Network of GMO Laboratories (ENGL) bezüglich Mindestanforderungen an PCR-Nachweismethoden für gentechnisch veränderte Organismen [13], da entsprechende Verfahren für die Anwendung in der Allergenanalytik, z.B. im Rahmen einer Arbeitsgruppe des CEN/TC 275 (WG 12) noch in Arbeit sind. Im Zuge der Validierung der entwickelten

Real-time Sellerie-PCR wurden die folgenden Parameter untersucht: Spezifität, Sensitivität, Wiederholbarkeit, Robustheit, Wiederfindung und Anwendbarkeit.

Zur Bestimmung der Spezifität der Methode wurde die Kreuzreaktivität gegen zahlreiche Vertreter der Apiaceen-Familie, wie Dill, Fenchel, Karotte, Kümmel, Liebstöckel und Petersilie sowie weitere häufig im gleichen Lebensmittel mit verwendete Zutaten getestet. DNA aus insgesamt mehr als 50 pflanzlichen und tierischen Organismen zeigte kein falsch-positives PCR-Signal. Der Nachweis ist somit hochspezifisch für Sellerie.

Zur Beurteilung der Sensitivität wurde eine Verdünnungsreihe mit Mengen von 12.500 bis 0,125 pg genomischer Sellerie-DNA analysiert. Die Nachweisgrenze, definiert als die niedrigste Konzentrationsstufe, bei der alle Wiederholungen einen positiven Nachweis liefern, lag bei 1,25 pg.

Als weitere Parameter der Validierung wurden die Wiederholbarkeit der Methode getestet sowie die Robustheit mit unterschiedlichen Real-time PCR Geräten (ABI 7900 und MPx3000 von Stratagene).

Einer der wichtigsten Punkte bei Validierungen analytischer Methoden sind Wiederfindungsversuche. Hierfür wird Probenmaterial mit einem bekannten Gehalt des Analyten, im Optimalfall zertifiziertes Referenzmaterial, eingesetzt. Da ein solches für Sellerie nicht verfügbar ist, wurden für die Wiederfindungsversuche Brühwürste mit definierten Konzentrationen an Selleriesaat hergestellt (Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der LMU München, Leiter Prof. Dr. A. Stolle), aus diesen Proben mehrfach DNA extrahiert und der Anteil der positiven Nachweisreaktionen an der Gesamtzahl der pro Dotierungsstufe durchgeführten Reaktionen ermittelt. Ein Sellerie-Anteil von 10 ppm war hierbei zuverlässig nachweisbar.

Abschließend wurde für eine Auswahl handelsüblicher Lebensmittelprodukte die Anwendbarkeit der entwickelten Real-time PCR gezeigt (Tabelle).

	Sellerie deklariert	Sellerie detektiert
Gewürzmischungen		
Barbecue Grill-Steak-Gewürz	+	+
Gyros+Fleisch Gewürzsalz	+	+
Gewürzmischung "Vegetal"	+	+
"Fix für Bauertopf" Gewürzmischung	+	-
Hendl Gewürzzubereitung	+	+
Rohwurststreifemittel	-	-
Reichenauer Fischgewürz	+	-
Brühen		
Fleischbrühwürfel	+	+
Klare Delikateß-Suppe	+	+
Konzentrierte Rindsbouillon	+	+
Gemüsebouillon "Mediterranea"	"Gewürzextrakte"	-
Gemüsebrühwürfel Cenovis	+	+
Soßen, Dressings		
Soße von Ragout fin	+	-
Nudel-Sauce-Bolognese (vegetarisch)	+	+

Tabelle: Nachweis von Sellerie-DNA in Handelsproben

Die entwickelte Real-time PCR hat sich nach umfangreicher Validierung als geeignete Methode zum spezifischen und sensitiven Nachweis von Sellerie in Lebensmitteln erwiesen. Im Rahmen des gesundheitlichen Verbraucherschutzes wird sie zur Überwachung der neuen Allergenkennzeichnung zur Anwendung kommen. Ab Dezember werden dabei in einem Schwerpunktprogramm vorwiegend Trockensuppen, Fertiggerichte und Gewürzmischungen auf Selleriebestandteile untersucht werden.

Danksagung

Dieses Projekt wird gefördert aus Mitteln des Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz.

Ebenfalls danken wir dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der LMU München für die Herstellung der dotierten Brühwürste.

Literatur

- [1] Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2004). The EFSA Journal 32: 1-197. http://efsa.eu.int/science/nda/nda_opinions/catindex_en.html
- [2] Jackson W. F., Food Allergy, ILSI Europe Concise Monograph Series, 2003, <http://europe.ilsa.org>
- [3] EU-Richtlinie 2003/89/EG vom 10. November 2003 zur Änderung der Richtlinie 2000/13/EG hinsichtlich der Angabe der in Lebensmitteln enthaltenen Zutaten. ABl. L 308: 15 vom 25.11.2003
- [4] EU-Richtlinie 2000/13/EG vom 20. März 2000 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung hierfür. ABl. L 109: 29 vom 6.5.2000
- [5] Dritte Verordnung zur Änderung der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung und anderer lebensmittelrechtlicher Verordnungen vom 10. November 2004, BGBl I Nr. 58: 2799
- [6] 5. Verordnung zur Änderung der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung vom 23. September 2005, BGBl I Nr. 62: 2896
- [7] EU-Richtlinie 2005/26/EG vom 21. März 2005 zur Erstellung eines Verzeichnisses von Lebensmittelzutaten oder Stoffen, die vorläufig aus Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG ausgeschlossen werden. ABl. L 75: 33 vom 22.03.2005
- [8] Gesetz über die Haftung für fehlerhafte Produkte (Produkthaftungsgesetz) vom 15. Dezember 1989, BGBl I 1989: 2189
- [9] Hourihane J., O'B., Kilburn S. A., Nordlee J. A., Hefle S. L., Taylor S. L., Warner J. O., An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: a randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997, 100, 596-600.
- [10] www.gdch.de/strukturen/lm/ag/bioanal/suppliers.htm
- [11] Dovičovičová L., Olexová L., Pangallo D., Siekel P., Kuchta T: Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of celery (*Apium graveolens*) in food, *Eur. Food Res. Technol.*, 2004, 218, 493-495.
- [12] Stephan, O., Weisz, N., Vieths, S., Protein Quantification, Sandwich ELISA, and Real-Time PCR Used to Monitor Industrial Cleaning Procedures for Contamination with Peanut and Celery Allergens, *J. AOAC Int.*, 2004, 87, 1448-1457.
- [13] European Network of GMO Laboratories, Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing, 2005, <http://gmo-crl.jrc.it/guidancedocs.htm>



91058 **Erlangen**
Eggenreuther Weg 43
Telefon: 09131/764-0



85764 **Oberschleißheim**
Veterinärstraße 2
Telefon: 089/31560-0



97082 **Würzburg**
Luitpoldstraße 1
Telefon: 0931/41993-0



80538 **München**
Pfarrstraße 3
Telefon: 089/2184-0

www.lgl.bayern.de

**Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit**
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen

Telefon: 09131/764-0
Telefax: 09131/764-102

Internet: www.lgl.bayern.de
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de

Druck: Print Com, Erlangen

ISBN 3-939652-02-4

ISBN 978-3-939652-02-1

(Online Ausgabe bis 31.12.2006)

(Online Ausgabe ab 01.01.2007)