

Nachweis gentechnischer Veränderungen in Lebensmitteln

Knut Heller und Sonja Lick (Kiel)

Bei der Herstellung von Lebensmitteln werden weltweit immer häufiger gentechnische Verfahren angewandt. Die Verbraucherinnen und Verbraucher haben ein berechtigtes Interesse, über Art und Beschaffenheit der Produkte, die sie konsumieren, informiert zu werden. Aus diesem Grund wurde seitens der EU-Administration eine Verordnung erarbeitet, die den Umgang mit sogenannten 'neuartigen Lebensmitteln (novel food)' europaweit regelt. Kern dieser Verordnung, die ab Mitte Mai 1997 für alle Mitgliedstaaten der Europäischen Union gilt, ist eine Kennzeichnungspflicht für gentechnisch veränderte Lebensmittel.



Jahrelang war die Verabschiedung der Novel-Food-Verordnung völlig ungewiß, da sich in der Europäischen Union kein Konsens über die Art und den Grad einer Kennzeichnung von Lebensmitteln, die mit Hilfe der Gentechnik hergestellt werden, erzielen ließ. Die jetzt verabschiedete Kompromißformel sieht vor, daß Lebensmittel immer dann – aber auch nur dann – „als mit Hilfe der Gentechnik hergestellt“ gekennzeichnet werden müssen, wenn sie

- selbst lebende gentechnisch veränderte Organismen sind (z.B. Obst oder Getreide) bzw. solche Organismen enthalten (z.B. Bakterien in fermentierten Milchprodukten), oder
- gegenüber vergleichbaren 'konventionellen' Lebensmitteln wissenschaftlich nachweisbar verändert sind.

Um diese Regelungen kontrollieren zu können, müssen die für die Über-

wachung zuständigen Lebensmitteluntersuchungsämter über entsprechende Nachweismethoden verfügen. In Deutschland sieht der § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG) eine Sammlung solcher standardisierter Nachweismethoden vor, mit denen sich gentechnisch veränderte Lebensmittel identifizieren lassen.

Die zuständigen Laboratorien werden sich auf eine völlig neue Qualität von Untersuchungen einstellen müssen, die letztlich nur noch mit modernsten Methoden der Molekularbiologie zu gewährleisten ist. Um hier sowohl eine Richtschnur als auch methodische Hilfestellung zu geben, wird unter der Koordination des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) und mit Beteiligung verschiedener Forschungslabors von Bund, Ländern und Wirtschaft die Entwicklung entsprechender §35-LMBG-Methoden vorangetrieben. Dabei werden Nachweisverfahren erarbeitet, die speziell auf einzelne Produkte (z. B. gentechnisch veränderte Kartoffeln) zugeschnitten sind. Ihre Handhabbarkeit und Zuverlässigkeit wird in Ringversuchen an mehreren Labors getestet. Bewährt sich dabei ein Verfahren – wie bei der Kartoffel geschehen –, so wird es in die amtliche Sammlung nach § 35 LMBG aufge-

nommen und steht der Lebensmittelüberwachung zur Verfügung.

MÖGLICHKEITEN DES NACHWEISES

Eine gentechnische Veränderung läßt sich – grob vereinfacht – in folgende drei Ebenen untergliedern: Die Erbsubstanz (DNS) der Zellen wird verändert, entweder durch Inaktivieren oder durch Hinzufügen bestimmter Gene. Diese Gene sind in

Von der Bundesforschung wurden Methoden zum Nachweis gentechnisch veränderter Bakterien erarbeitet



der Zelle Matrizen für bestimmte Proteine. Die Proteine wiederum, z.B. Enzyme oder Stützproteine, bestimmen die Eigenschaften und die Struktur der jeweiligen Zellen.

Nachweisverfahren für gentechnische Veränderungen können im Prinzip auf alle drei der genannten Ebenen abzielen, also auf die DNS, die direkten Genprodukte (Proteine) und die Eigenschaften der Zellen (Veränderung ihrer physiologischen oder biochemischen Leistungen). Welches Nachweisverfahren letztendlich zum Einsatz kommt, hängt von dem zu untersuchenden Produkt ab: Enthält das Lebensmittel keine lebenden Zellen (z. B. Mehl), ist ein Nachweis allenfalls über DNS oder Proteine möglich. Handelt es sich hingegen um einen lebenden Organismus (z. B. Tomaten) oder um ein Lebensmittel, das lebende Zellen enthält (z. B. Joghurt, Rohwurst), so ist auch ein Nachweis veränderter Eigenschaften dieser Zellen prinzipiell möglich. Hieraus wird klar, daß es eine Universalmethode für den Nachweis sämtlicher gentechnischer Veränderungen in Lebensmitteln nicht geben kann. Der Nachweis wird sich auf das einzelne Lebensmittel beziehen müssen; allenfalls lassen sich einige Produkte mit vergleichbaren Veränderungen zu Gruppen zusammenfassen.

Eine Möglichkeit, mit der sich verlässliche Aussagen erzielen lassen, ist der spezifische stoffliche Nachweis des Moleküls, das in den gentechnisch veränderten Zellen neu ist. So läßt sich beispielsweise die Herbizidresistenz einer Pflanze mit immunologischen Methoden eindeutig auf ein Protein bakteriellen Ursprungs zurückverfolgen. Diese Methodik versagt allerdings in solchen Fällen, bei denen lediglich die Synthese eines natürlicherweise im Organismus vorkommenden Proteins unterbunden wurde (z.B. bei der „Anti-Matsch-Tomate“, die ein bestimmtes zellwandabbauendes Enzym nicht mehr bildet) oder aber die Syntheserate eines solchen Proteins erhöht ist. Allein der Gehalt an einem bestimmten Protein

kann kein Nachweis für eine gentechnische Veränderung sein. In solchen Fällen läßt sich ein Nachweis nur auf der Ebene der DNS führen.

Hieraus folgt, daß das sicherste Nachweisverfahren dasjenige ist, das direkt auf die geänderte genetische Information – also die DNS – abzielt. Voraussetzung ist allerdings, daß das Lebensmittel überhaupt nachweisbare Mengen an DNS enthält.

PUNKTGENAUE VERÄNDERUNGEN MÖGLICH

Bei Bakterien sind die Möglichkeiten der gentechnischen Veränderungen am weitesten fortgeschritten. Manipulationen lassen sich mit absoluter Präzision und Sequenzgenauigkeit am vorbestimmten Ort durchführen. Häufig werden Veränderungen an Plasmiden vorgenommen, ringförmigen DNS-Molekülen, die in den Bakterienzellen neben dem eigentlichen Bakterienchromosom vorliegen. Diese Plasmide lassen sich verhältnismäßig leicht in die gewünschten Bakterienzellen einschleusen. Aber auch das Bakterienchromosom selbst läßt sich gezielt manipulieren. Dabei geht die Genauigkeit mittlerweile so weit, daß sich einzelne DNS-Basenpaare an spezifischen Stellen des bakteriellen Chromosoms austauschen lassen.

JOGHURT MIT GENTECHNISCH VERÄNDERTEN BAKTERIEN ALS MODELL

Joghurt und ähnliche Produkte werden durch Fermentation der Milch mit mindestens zwei verschiedenen Bakterienstämmen hergestellt. Für den klassischen Joghurt sind dies *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (meist kurz *Lactobacillus bulgaricus* genannt). Im folgenden soll anhand

eines konkreten Beispiels – dem Modellsystem Joghurt mit gentechnisch verändertem *Streptococcus thermophilus* – dargestellt werden, wie sich eine gentechnische Veränderung nachweisen läßt.

Der uns von der Industrie zur Verfügung gestellte Teststamm *Streptococcus thermophilus* St 11-Cat ist dadurch charakterisiert, daß in sein Chromosom ein Resistenzgen für das Antibiotikum Chloramphenicol (cat-Gen) eingefügt wurde, und zwar ohne daß dabei irgendwelche technischen Sequenzen wie Plasmid- oder andere Markersequenzen im Chromosom verblieben sind. Dieses neue Gen liegt genau zwischen zwei Genen des Laktose-Stoffwechsels (*lacS* und *lacZ*) und wird zusammen mit ihnen abgelesen



(Abb. 1, nächste Seite). Ein Stamm mit Chloramphenicol-Resistenz hat natürlich keine Bedeutung für die Herstellung von Milchprodukten; er wird daher auch niemals kommerziell eingesetzt werden. Seine Bedeutung liegt vielmehr darin, daß er sich ganz hervorragend als Ausgangsstamm zur Herstellung anderer gentechnisch veränderter Bakterienstämme eignet, die Verwendung in Lebensmitteln finden könnten. Denn dieses Resistenzgen läßt sich relativ einfach durch ein beliebiges anderes Gen oder durch mehrere Gene ersetzen. Auch solche neu konstruierten Bakterienstämme würden dann weder Plasmid- noch Markersequenzen enthalten (und natürlich auch nicht mehr das Chloramphenicol-Resistenzgen).

Die besondere Eignung entsprechender Stämme ergibt sich aus folgenden Aspekten:

1. Die gentechnische Veränderung ist in die chromosomale DNS integriert. Dieses bewirkt eine höhere Stabilität der erzeugten Veränderung und eine im Vergleich zur Plasmid-DNS geringere Wahrscheinlichkeit der Teilnahme an Gentransfervorgängen.
2. Das Laktose-Operon – also die Funktionseinheit der beiden Gene *lacS* und *lacZ* – ist für die Bakterien essentiell, da es für den Milchezuckerabbau und damit für das Wachstum in Milch verantwortlich ist. Die Integration eines neuen Gens an dieser Stelle beugt also einem Verlust oder einer Inaktivierung der neu erworbenen Eigenschaft vor, da Bakterienzellen mit fehlerhaftem Laktose-Operon nicht in Milch wachsen können. Dadurch ist die zusätzliche Integration eines Marker-Gens, das lediglich zur Auffindung erfolgreich manipulierter Zellen dient, unnötig.

Wie läßt sich nun erkennen, ob eine Joghurtprobe den gentechnisch veränderten Bakterienstamm St11-Cat enthält? Eine entsprechende Nachweismethodik wurde am Institut für Mikrobiologie der Bundesanstalt

für Milchwirtschaft entwickelt und im Verbund mit dem Staatlichen Lebensmitteluntersuchungsamt Braunschweig sowie anderen Labors optimiert.

NACHWEIS DER NAHTSTELLE IN DER DNS

Der Nachweis eines normalerweise in einem Organismus nicht vorkommenden Gens kann in vielen Fällen lediglich als Hinweis, nicht aber als Beweis für eine gentechnische Veränderung dienen (das Gen könnte auch durch einen seltenen biologischen Gentransfer in den Organismus gelangt sein). Von besonderem Interesse sind daher die Verknüpfungsstellen, an denen ein fremdes Gen gezielt in die DNS eingebaut wurde. Dort liegen wirklich einzigartige und für die gentechnische Veränderung absolut indikative Sequenzbereiche vor. Im Falle des *Streptococcus thermophilus* St11-Cat sind es die linke und die rechte Fusionsstelle des *cat*-Gens im Laktose-Operon. Diese DNS-Sequenzen kommen in dieser Nachbarschaft in der Natur sonst nicht vor.

Zum Nachweis selbst: Die Strecke zwischen einer bestimmten Position



'X' im *cat*-Gen und einer anderen fest definierten Stelle 'Y' im bakterieneigenen *lacZ*-Gen beschreibt ein DNS-Fragment mit einer genau definierten Größe (hier: 623 Basenpaare), welches nur in dem Stamm St11-Cat und sonst in keinem anderen natürlichen *Streptococcus thermophilus*-Stamm existiert (Abb.1). Ein solches Fragment läßt sich heutzutage in einer vielfältig angewandten Reaktion nachweisen, nämlich der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mit ihrer Hilfe läßt sich ein exakt definiertes Stück DNS im Reagenzglas exponentiell vermehren. Es ist dann mit relativ einfachen Methoden nachzuweisen und in seiner Größe bestimmbar.

Die Spezifität der PCR-Reaktion kommt dadurch zustande, daß die Neusynthese der DNS von bestimmten Ansatzpunkten der zu kopierenden DNS-Stränge aus erfolgt – in diesem Fall von den Punkten 'X' und 'Y' der *cat*- und *lacZ*-Gene. Dieses geschieht durch kurze, einzelsträngige, synthetische DNS-Stückchen – sogenannte Primer. Sie bestehen aus etwa 15 Nukleotiden (den Einzelbausteinen der DNS) und sind in ihrer Sequenz exakt komplementär zu vorher

Abb. 1: Gentechnische Veränderung in *Streptococcus thermophilus* St11-Cat: Raster-EM Aufnahme von *S. thermophilus* und Darstellung des Laktose-Operons (P_{lac}) mit eingefügtem Chloramphenicol-Resistenzgen (*cat*). Die unterstrichene Sequenz stellt die Bindestelle für das Oligonukleotid in der sogenannten Bestätigungsreaktion dar (Erklärung s. Text)



ausgewählten Abschnitten auf der DNS, hier also den Abschnitten, die bei den Punkten 'X' und 'Y' beginnen. Die Wahrscheinlichkeit, daß eine Primer-Bindungsstelle mit einer Länge von 15 Nukleotiden zufällig auch an einer anderen Stelle der DNS vorkommt, ist $1 : 4^{15}$, entsprechend etwa 1 zu einer Milliarde. Da das Erbgut eines Bakteriums aber nur aus etwa 2 bis 6 Millionen Nukleotidpaaren besteht, kann man davon ausgehen, daß eine solche Bindungsstelle dort maximal einmal vorkommt. Das durch die PCR-Reaktion von *Streptococcus thermophilus* St 11-Cat DNS vermehrte Fragment ist exakt definiert durch seine Größe und durch die Abfolge der Nukleotide (DNS-Sequenz). Im allgemeinen ist die Größe des Fragments als Nachweis vollkommen ausreichend. Dieser Nachweis ist in Abb. 2A dargestellt. In Zweifelsfällen, die eventuell auftreten könnten, läßt sich in einer zweiten Reaktion – der Bestätigungsreaktion – aber auch die Sequenz des vermehrten DNS-Fragments ausnutzen. Hier kommt wiederum ein künstlich hergestellter, einsträngiger DNS-Strang – ein synthetisches Oligonukleotid – zum Einsatz, nun aber in einer Bindungsreaktion. Das Oligonukleotid wurde so konstruiert, daß es quasi das Spiegelbild eines der DNS-Stränge darstellt, die erwartet werden (vgl. Abb. 1). Nur wenn die DNS aus der PCR diesen Erwartungen entspricht, bindet sie sich an das Oligonukleotid, was mit Hilfe bestimmter Detektionsmoleküle nachgewiesen werden kann (Abb. 2B).

BEDEUTUNG VON KONTROLLREAKTIONEN

Joghurt enthält neben *Streptococcus thermophilus* auch *Lactobacillus bulgaricus* und möglicherweise andere Bakterien, die zum Beispiel nach dem Öffnen der Verpackung in das Produkt gelangt sein können. Um sicherzustellen, daß in der Nachweisreaktion auch *Streptococcus thermo-*

philus-DNS und nicht nur die DNS irgendwelcher anderer Bakterien zur Verfügung steht, wird eine Kontroll-PCR-Reaktion durchgeführt. In dieser Reaktion sind die Primer so gewählt, daß ein bestimmter DNS-Abschnitt nur dann vermehrt wird, wenn die DNS aus *Streptococcus thermophilus* (gentechnisch verändert oder nicht verändert) stammt. Alle anderen bakteriellen Nucleinsäuren werden, soweit bekannt, ausgeschlossen. Im konkreten Fall handelt es sich um eine Sequenz aus dem *lacZ*-Gen, die 968 Basenpaare umfaßt (vgl. Abb. 1).

Nur wenn das entsprechende Kontrollfragment vermehrt wird, läßt sich durch die Nachweisreaktion entscheiden, ob eine gentechnische Veränderung vorliegt oder nicht. Bei Nichtauftreten des Kontrollfragments ist keine Aussage möglich, da unklar ist, ob die gewünschte DNS überhaupt isoliert wurde. Wird das Kontrollfragment vermehrt, nicht aber das Nachweisfragment (Abb. 2A, Probe 2), dann läßt sich eine gentechnische Veränderung mit großer Sicherheit ausschließen.

NUR NACHWEISBAR, WAS BEKANT IST

Mit der Entwicklung von §35-LMBG-Methoden werden die Voraussetzungen (Aufarbeitung und Extraktion des Lebensmittels, durchzuführende Kontrollen, prinzipieller Ablauf der Nachweismethode) für den Nachweis gentechnischer Veränderungen in einzelnen Lebensmitteln oder Lebensmittelgruppen geschaffen. Für jeden speziellen Fall müssen allerdings spezifische Anpassungen der Methode erfolgen. Hieraus folgt, daß eine genaue Kenntnis der jeweiligen gentechnischen Änderung notwendig ist. Die Entwicklung von §35-LMBG-Methoden zum „Nachweis der mit Hilfe der Gentechnik hergestellten Lebensmittel“ darf also nicht verstanden werden als der Versuch, ein Instrumentarium zu schaffen, das den Verbraucher

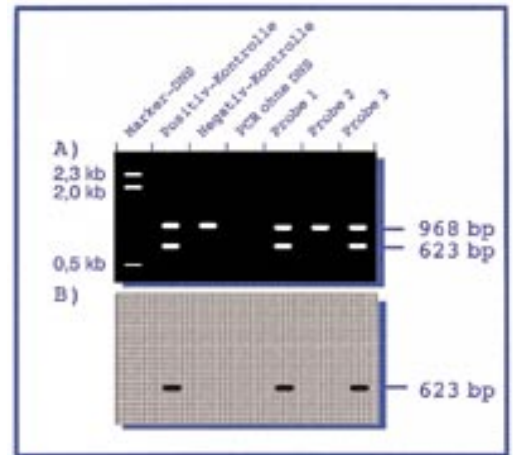


Abb. 2: Analyse vermehrter PCR-Fragmente der Kontroll- und Nachweisreaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (oben) und Bestätigung des Nachweisfragments durch „Southern“-Hybridisierung (unten).

vor unbekanntem gentechnischen Veränderungen schützen soll. Unbekannte Veränderungen sind nur in sehr eingeschränktem Maße nachweisbar!

Was die §35-LMBG-Methoden leisten können, ist die Überprüfung, ob angegebene gentechnische Veränderungen auch tatsächlich in der entsprechenden Form vorgenommen wurden und in dieser Form immer noch vorhanden sind. Sie leisten damit durchaus einen wichtigen Beitrag zum Schutz des Verbrauchers vor Irreführung. Daß solch ein Schutz sogar lebenswichtig sein kann, läßt sich am Beispiel von Lebensmittelallergien aufzeigen. Zur Zeit werden in verschiedenen Ländern der Erde Anstrengungen unternommen, aus Grundnahrungsmitteln, die als allergen bekannt sind, die Hauptallergene mit Hilfe der Gentechnik zu entfernen. Allergiker, die solche Lebensmittel dann zu sich nehmen, müssen sich darauf verlassen können, daß die entsprechenden Allergene nicht mehr gebildet werden, da sonst lebensbedrohliche Situationen (anaphylaktischer Schock) eintreten können. Routineüberprüfungen mit Hilfe der §35-LMBG-Methoden sind hier ein wichtiger Beitrag zum Gesundheitsschutz. ■

Prof. Dr. Knut J. Heller, Dr. Sonja Lick, Bundesanstalt für Milchwirtschaft, Institut für Mikrobiologie, Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103 Kiel