

**Christiane Albrecht, Bodo Lutz und
Steffi Wiedemann**

**Experimentelle Untersuchungen zur Verbrei-
tung von Transgenen durch Tiere über
pflanzliche Verbreitungseinheiten nach Ma-
gen-Darm-Passage und über
horizontalen Gentransfer**



Experimentelle Untersuchungen zur Verbreitung von Transgenen durch Tiere über pflanzliche Verbreitungseinheiten nach Magen-Darm-Passage und über horizontalen Gentransfer

**Abschlussbericht eines F+E-Vorhabens
(FKZ 201 67 432)
in den Jahren 2002 bis 2005
im Auftrag des Umweltbundesamtes
und des Bundesamtes für Naturschutz**

**Bodo Lutz
Christiane Albrecht
Steffi Wiedemann**



Titelfotos: C. Albrecht

Adressen der Autoren:

Dr. habil. Christiane Albrecht
Dr. Bodo Lutz
Steffi Wiedemann

Lehrstuhl für Physiologie
Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Technische Universität München
Weihenstephaner Berg 3
85354 Freising

Fachbetreuung durch das UBA/BfN:

Birgit Winkel
Hanka Teichmann

Fachgebiet II 2.3 „Bewertung gentechnisch veränderter
Organismen, Vollzug GenTG“

Das Projekt wurde gefördert durch das Umweltbundesamt und das Bundesamt für Naturschutz mit Mitteln des Ministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit;
Laufzeit: 01.01.2002 – 30.09.2005, Förderkennzeichen FKZ: 201 67 4320

Die Beiträge der Skripten werden aufgenommen in die Literaturdatenbank „DNL-online“ (www.dnl-online.de).

Die Publikation kann im Internet unter: www.bfn.de/ abgerufen werden.

Die BfN-Skripten sind nicht im Buchhandel erhältlich.

Herausgeber:

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie für die Beachtung privater Rechte Dritter.

Die in den Beiträgen geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

Nachdruck, auch in Auszügen, nur mit Genehmigung des BfN.

Druck: BMU-Druckerei

Gedruckt auf 100% Altpapier

Bonn - Bad Godesberg 2007

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
VORWORT	5
EINLEITUNG	6
1.1 Mais (<i>Zea Mays</i>)	6
1.2 Maiszünsler (<i>Ostrinia nubilalis</i>)	6
1.3 Cry1Ab Protein	6
1.4 Agrogentechnik	8
1.5 Futtermittelprozessierung von Mais	8
1.5.1 Silierung	8
1.5.2 Mais-Kobs	8
1.6 Nichtzielorganismen	9
1.6.1 Wildschwein (<i>Sus scrofa</i>)	9
1.6.2 Fasan (<i>Phasianus colchicus</i>)	9
1.6.3 Damhirsch (<i>Dama dama</i>)	10
2. PROJEKTVORHABEN	11
3. MATERIAL UND METHODEN	13
3.1 Futtermittel	13
3.2 Wildschweinstudien	14
3.3 Fasanstudien	15
3.4 Damhirschstudien	15
3.5 DNA Analysen	16
3.5.1 DNA Extraktion	16
3.5.2 PCR und qPCR	17
3.5.3 Sequenzierung	18
3.6 Cry1Ab Protein Analysen	19
3.6.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	19
3.6.2 Immunoblot	20
3.7 Keimfähigkeitsprüfung von Mais- und Rapssaat	21

4.	ERGEBNISSE	22
4.1	Etablierung der DNA Analytik	22
4.2	Etablierung der Cry1Ab Protein Analytik	23
4.3	Keimfähigkeitsprüfung	25
4.4	Wildschweinstudien	25
4.5	Fasanstudien	28
4.6	Damhirschstudien	28
5.	DISKUSSION	31
5.1	DNA Analytik der Fütterungsstudien	31
5.2	Cry1Ab Protein Analytik der Fütterungsstudien	33
5.3	Keimfähigkeitsanalytik in den Fütterungsstudien	35
6.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	37
7.	ZUSAMMENFASSUNG	40
8.	SUMMARY	45
9.	LITERATUR	51

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Darstellung der Wirkungsweise des Cry Proteins	7
Abb. 2: Darstellung der exprimierten DNA-Konstrukte in Event 176 und MON 810	14
Abb. 3: Oligonukleotidsequenzen und PCR-Reaktionsbedingungen	18
Abb. 4: DNA Nachweis in frischen Maisblättern mittels konventioneller PCR Technik	22
Abb. 5: DNA Nachweis in frischen Maisblättern mittels qPCR Technik	23
Abb. 6: Detektionslimit des Immunoblot Assays mit polyklonalem Antikörper	24
Abb. 7: Immunoblot von Proben aus bovinem GIT mit polyklonalem Antikörper	24
Abb. 8: Aus Fäzes von Wildschweinen isolierte Maiskörner	26
Abb. 9: Ergebnis des Keimversuchs mit Maiskörnern nach Magen-Darm-Passage	26
Abb.10: Zusammenfassung der DNA-Fragmentlängen-Analyse in Ingestaprobe von Wildschweinen	27
Abb.11: Zusammenfassung der Cry1Ab Protein Analytik beider Wildschweinstudien mittels ELISA in Ingesta von Wildschweinen	mit- 27
Abb.12: Zusammenfassung der in Fasanen detektierten DNA Fragmente	28
Abb.13: Zusammenfassung der in Damhirschen detektierten DNA Fragmente	29
Abb.14: Immunoblot von GIT-Inhalten und Geweben aus Damhirschen mit polyklonalem Antikörper	30
Abb.15: Zusammenfassung zum Nachweis der <i>rubisco</i> DNA in Wildtierarten mit verschiedenen Verdauungssystemen	37
Abb.16: Zusammenfassung zum Nachweis der rekombinanten <i>cryIAb</i> DNA in Wildtierarten mit verschiedenen Verdauungssystemen	38
Abb.17: Zusammenfassung zum Cry1Ab Protein Nachweis in Wildtierarten mit verschiedenen Verdauungssystemen	39

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Bp	Basenpaare
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CDPK	Calcium dependent protein-kinase Promoter
Cry	Crystal
DNA	Desoxyribo Nucleic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GIT	Gastrointestinaltrakt
GV	Gentechnisch verändert
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
ISTA	International Seed Testing Association, Schweiz
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEPC	Phosphoenolpyruvat Carboxylase Promoter
qPCR	quantitative PCR
TKG	Tausendkorngewicht
TS	Trockensubstanz

VORWORT

Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Fütterungsstudien sowie die damit verbundenen experimentellen Arbeiten erfolgten im Zeitraum von 2002 - 2005. Wir danken Professor Dr. O. Rottmann, PD Dr. R. Kühn, Dr. B. Killermann, Dr. H. Spiekers und J. Mayer sowie allen beteiligten Mitarbeitern des Lehrstuhls für Physiologie, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL), Technische Universität München, der Versuchstation Thalhausen, des Fachgebietes für Wildbiologie und Wildtiermanagement, des Instituts für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung (LfL, Freising) und des Instituts für Tierernährung und Futterwirtschaft (LfL, Grub) für die fachliche und logistische Unterstützung.

1. EINLEITUNG

1.1 Mais (*Zea mays*)

Unter allen Ackerkulturen weltweit nimmt Mais den zweiten Platz im Anbauumfang und den ersten Platz bei der Nahrungserzeugung ein und findet als Nahrungsmittel, als Viehfutter und als Industrierohstoff seine Verwendung. Besondere Bedeutung kommt Maissilage bei der bedarfsgerechten Nährstoffversorgung von Wiederkäuern, Pferden, Schweinen und Geflügel zu, da Mais neben allen Getreidearten eine sehr gute Verdaulichkeit und Energiekonzentration besitzt. Mais wird in Form von Silage (s.1.5.1), Mais-Kobs (s.1.5.2) und als Bestandteil von Zusatzfutter verfüttert.

Verschiedene Krankheitserreger z.B. der Maisbrandpilz *Ustilago maydis*, Pilze der Gattung *Fusarium*, tierische Schädlinge (Drahtwurm *Agriotes* sp., Fritfliege *Oscinella frit*, Maisblattlaus *Rhopalosiphum maidis*) sowie verschiedene Nematoden und Larven des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) können beim Maisanbau zu Ernteeinbußen führen (ZSCHEISCHLER et al. 1990).

1.2 Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*)

Ostrinia nubilalis stellt den wirtschaftlich bedeutendsten Maisschädling dar. Weltweit werden circa 7% der jährlichen Maisernte durch ihn vernichtet. Während in den USA bis zu drei Generationen auftreten, durchläuft er in Deutschland nur eine Generation pro Jahr. Als Lepidopterenlarve überwintert *Ostrinia nubilalis* in Ernterückständen und Stoppeln und verpuppt sich im Frühjahr. Nach dem Schlüpfen legen die Imagines 10 - 30 Eier in dachziegelartiger Anordnung an der Blattunterseite ab. Die Larven schlüpfen nach etwa einer Woche und fressen anfangs an den Blättern und Rispen, bevor sie sich in den Stengel bohren. Bis zum Herbst fressen sich die Larven im Stengel nach unten bis zum Wurzelbereich, wo sie überwintern. Auch der Maiskolben kann befallen werden. Durch starken Wind knicken die Maispflanzen und können nicht mehr geerntet werden. Die Fraßlöcher dienen u.a. Fusarien als Eintrittsstellen, welche die Maispflanze weiter schädigen. Die wirksame Bekämpfung von *Ostrinia nubilalis* ist mit synthetischen Pyrethroiden nur während der Zeit erfolgreich, in der sich *Ostrinia nubilalis* auf der Pflanzenoberfläche befindet. Als biologisches Schädlingsbekämpfungsmittel kommt die Schlupfwespe *Trichogramma brassicae*, die die Eier von *Ostrinia nubilalis* parasitiert, ebenso zum Einsatz wie Suspensionen von Sporen und parasporalen Kristallen von *Bacillus thuringiensis* (Bt), einem natürlich vorkommenden insektenpathogenen Bodenbakterium.

1.3 Cry1Ab Protein

Als Sporenbildner produziert *Bacillus thuringiensis* überdauerungsfähige Sporen und als Besonderheit zusätzlich sogenannte parasporale Proteinkristalle (crystal proteins). Diese sind ein für

Fraßinsekten giftiges δ -Endotoxin. Inzwischen sind circa 50 Cry-Proteine mit strukturellen und spezifischen Unterschieden für bestimmte Insekten bekannt. Damit das Pro-Toxin seine Wirkung entfalten kann, muss es innerhalb einer Insektenlarve durch ein basisches Darmmilieu aufgelöst werden. Durch proteolytische Spaltungen entsteht das biologisch aktive Toxin, das an Rezeptoren der Epithelzellmembranen im Mitteldarm der Insektenlarve bindet. Nach struktureller Änderung des Cry Proteins kommt es zuerst zur Porenbildung, anschließend zur Zellyse und zum Tod der Larve (Abb. 1; De MAAGD et al. 2001). Die Varianten des Cry Proteins wirken spezifisch auf bestimmte Insektenarten (CANNON 1995). Das Erntegut von Pflanzen, die mit Bt-Produkten behandelt worden sind, stellt für die Konsumenten kein Risiko dar, da durch UV-Strahlen und Regenabwaschungen das Präparat schnell inaktiviert wird (BEHLE et al. 1997). Um den Wirkungszeitraum der Cry-Proteine gegen *Ostrinia nubilalis* Larven im Vergleich zur äußeren Anwendung zu verlängern, wurde Mais gentechnisch mit verschiedenen Konstrukten des *cry* Gens transformiert. Transgener Mais exprimiert ein synthetisches aktives Insektizid (z.B. Cry1Ab Protein) in den eigenen Zellen, so dass er gegen *Ostrinia nubilalis* resistent ist (HÖFTE & WHITELEY 1989). Während das Bt-Toxin als biologisches Schädlingsbekämpfungsmittel bei Bedarf zur äußeren Anwendung gelangt und anschließend in der Umwelt abgebaut wird, kommt es in der gentechnisch veränderten Bt-Pflanze zu einer kontinuierlichen Produktion des Toxins in verschiedenen Pflanzenteilen. Bei Verzehr wird das Toxin vom Schädling aufgenommen, was zu dessen Tod führt. Durch diesen Selbstschutz der Pflanze gegenüber seinem Fraßfeind kann der Einsatz von Insektiziden vermindert werden und damit ebenso Belastungen für die Umwelt und die Gesundheit des Menschen (SCHULER et al. 1998).

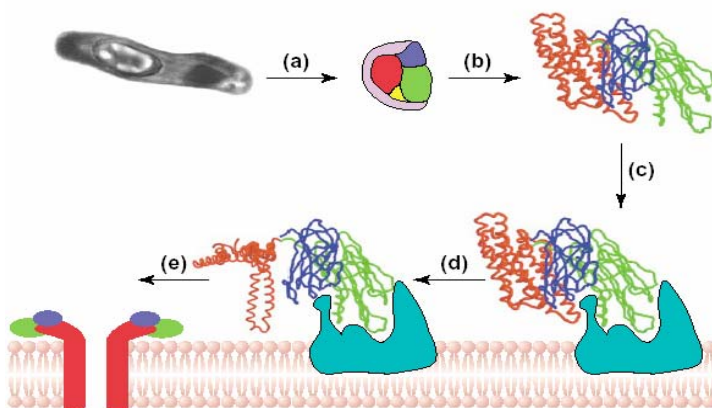


Abb.1: Darstellung der Wirkungsweise des Cry Proteins.

a) Nach Verdauung durch das Insekt lösen sich die Protein-Kristalle in der Magenflüssigkeit. b) Proteasen spalten Bereiche (violett, gelb) des Pro-Toxins ab. c) Das bioaktive Cry Protein bindet an Rezeptoren der Epithelmembran. d) Struktureller Umbau der Domäne I und Insertion eines Zwei-Helix-Hairpin in die Epithelmembran. e) Das in die Membran eingedrungene Protein verursacht dort die Bildung von Poren, die das osmotische Potential der Zelle zerstören und damit Zellyse bewirken (De MAAGD et al. 2001).

1.4 Agrogentechnik

Im Jahr 1996 wurden in den USA transgene Pflanzen erstmals kommerziell freigesetzt. Mittlerweile erfolgt vor allem in den USA, Argentinien, Kanada, Brasilien und China ein großflächiger Anbau. Die Gesamtanbaufläche mit transgenen Pflanzen betrug im Jahr 2005 90 Millionen Hektar mit einem Anteil an transgenem Mais von 21,2 Millionen Hektar sowie 4,6 Millionen Hektar an transgenem Raps (JAMES 2005). Die ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Metro Manila, Philippinen) schätzt den weltweiten Anbau von GV Pflanzen für das Jahr 2010 auf insgesamt 150 Millionen Hektar. Nach Angabe der Biotechnologie Branche soll die Agrogentechnik die Erträge in der Landwirtschaft steigern und u.a. einen Beitrag zur Lösung des Hungerproblems leisten. Bei der Agrogentechnik gibt es im Wesentlichen drei Anwendungsfelder: 1) die Verbesserung der agronomischen Eigenschaften der Pflanze wie beispielsweise die Widerstandsfähigkeit gegen Schädlinge, Herbizide, Trockenheit oder Kälte, 2) die Veränderung bestimmter qualitativer Eigenschaften von Pflanzen (z.B. Proteinanteil oder Vitamingehalt) und 3) die kostengünstige Herstellung von Enzymen, therapeutisch wirksamen Stoffen („molecular farming“) oder Rohstoffen für die industrielle Verarbeitung. Bislang sind jedoch nur Pflanzen mit verbesserten agronomischen Eigenschaften zur Marktreife gelangt. Im Zusammenhang mit dem Einsatz der Agrogentechnik werden verschiedene ökologische Risiken diskutiert, wie zum einen die Verbreitung und Auskreuzung von Transgenen auf verwandte Kultur- oder Wildarten und zum anderen Konsequenzen auf Organismen, die nicht Ziel der transgenen Proteine der GV-Pflanze sind (Nichtzielorganismen).

1.5 Futtermittelprozessierung von Mais

1.5.1 Silierung

Bei dieser Art der Konservierung wird gehäckselter oder kurzgeschnittener Mais in Fahrtilos, Hochtilos oder in Folie eingewickelten Großballen eingelagert. Nach der Befüllung wird das Silo luftdicht verschlossen, der Restsauerstoff wird durch aerobe Bakterien und Pilze verbraucht. Im Anschluss setzt die anaerobe Gärung durch Lactobacteriaceae ein. Hierbei wird die Stärke und die Glucose der Pflanzen zu Laktat metabolisiert und der pH-Wert der Silage auf einen Wert von ca. 4,0 - 4,5 abgesenkt. Bei diesem sauren Milieu kommen mikrobielle Prozesse zum Stillstand, die Silage ist über einen längeren Zeitraum hinweg konserviert.

1.5.2 Mais-Kobs

Neben Silierung bietet die Herstellung von Mais-Kobs eine weitere Methode der Maiskonservierung. Dazu wird Maishäcksel bei einer Temperatur von etwa 80°C in großen Trommeln getrock-

net und zu etwa 18 mm langen Pellets gepresst. Durch den Trocknungsvorgang wird der Feuchtigkeitsgehalt im Mais stark reduziert (Trockensubstanz ca. 92%), wodurch mikrobielle Abbauprozesse zum Erliegen kommen.

1.6 Nichtzielorganismen

Eine Vielzahl von Tierarten konsumieren direkt oder indirekt GV Pflanzen. Der Anbau von gentechnisch modifiziertem Mais könnte sich auf einzelne Organismen über die Nahrungskette auswirken, obwohl sie nicht Ziel des exprimierten Insektizides sind. Mais wird als qualitativ hochwertiges Grundfuttermittel für eine bedarfsgerechte Nährstoffversorgung bei hochleistenden Milchkühen eingesetzt. Laktierende Rinder können täglich bis zu 8 kg Trockensubstanz (TS) Mais als energiereiches Futter bekommen. Während die Landwirte über die Art und Menge des Futtermittels entscheiden können, konsumieren Wildtiere unkontrolliert die Pflanzen, die auf den Feldern angebaut werden. Von besonderem Interesse waren in dieser Gesamtstudie Wildschweine, Damhirsche und Fasane.

1.6.1 Wildschwein (*Sus scrofa*)

In vielen europäischen Ländern und den Vereinigten Staaten von Amerika stiegen die Wildschweinpopulationen in den vergangenen Jahrzehnten an (EISFELD & HAHN 1998; GEISSER 1998). Wildschweine leben in Rotten mit bis zu 30 Tieren, aber auch vornehmlich männliche Einzeltiere sind zu beobachten. Jede Gruppe hat ihr eigenes Territorium und ist sehr reviertreu. Wildschweine haben sich den modernen Agrarbedingungen bestens angepasst und lassen sich von menschlichen Aktivitäten kaum stören (GENOV 1981; GEISSER & BÜRGIN 1998). Beobachtungen in Deutschland ergaben, dass Wildschweine, die in Waldrandnähe leben, bis zu 50% ihrer nächtlichen Aktivitäten auf landwirtschaftlich genutzten Flächen verbringen (HAHN 2002). Mindestens eine energiereiche Pflanze wie Mais oder eine andere Getreideart sind Bestandteil ihrer Nahrung (SCHLEY & ROPER 2003). Im Herbst fressen sie z.B. ausgewachsene Pflanzen auf Maisfeldern während sie im Frühjahr frisch gesäte Maiskörner ausgraben (MACKIN 1970; SCHLEY & ROPER 2003).

1.6.2 Fasan (*Phasianus colchicus*)

Die Fasane stammen ursprünglich aus Asien und sind heute in fast allen europäischen Ländern ebenso beheimatet wie in Amerika (REINWALD 1993; GIUDICE & RATTI 2001). Sie scharren und fressen neugesätes Saatgut sowie das Hypokotyl von jungen Pflanzen. Der Fasan bevorzugt Getreide, Mais, Rote Beete und Zuckerrüben. Sogar ältere Maispflanzen, welche schon das vier-

te von sechs Blattstadien erreicht haben, werden von Fasanen ausgerissen (KNIGHT 1995). Bis zu 80% der Nahrung von erwachsenen Fasanen besteht aus Getreide landwirtschaftlichen Anbaus, vor allem aus Ernterückständen.

1.6.3 Damhirsch (*Dama dama*)

Ursprünglich waren Damhirsche nur in den Küstenregionen des Mittelmeerraumes beheimatet. Heute ist die Art über ganz Europa, Amerika und Neuseeland verbreitet. Der bevorzugte Lebensraum des Damhirsches sind lichte Wälder in der Ebene und im Mittelgebirge. Damhirsche sind äußerst anpassungsfähig, was dazu führte, dass die Tiere auch in felsigem und trockenem Buschland eine Lebensgrundlage gefunden haben. Zur Äsung halten Damhirsche sich gerne in Wildwiesen und -äckern auf. Bevorzugt werden bestimmte Gräserarten, Futterpflanzen und Kräuter, Früchte, Samen und Knollen. Daneben werden Eicheln, Bucheckern sowie Kastanien gern angenommen.

2. PROJEKTVORHABEN

Der Nachweis von rekombinanter DNA in Nahrungs- und Futtermitteln sowie Untersuchungen zum Verbleib in domestizierten Tieren wurden vom Lehrstuhl für Physiologie, TUM, Freising (EINSPANIER et al. 2004), der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL Braunschweig; AULRICH et al. 2004) sowie dem Lehrstuhl für allgemeine Lebensmitteltechnologie, TUM, Freising (HUPFER et al. 1999) beschrieben. Eine erkennbare Persistenz des Cry1Ab Proteins im Boden (ZWAHLEN et al. 2003) und Auswirkungen verschiedener Cry-Proteine auf Insekten und deren Predatoren wurden publiziert (DUTTON et al. 2002, 2003; HILBECK et al. 1998). Bislang waren keinerlei Informationen über die Aufnahme von transgenem Mais und den Verbleib von rekombinanter DNA und transgenem Protein in Wildtieren verfügbar. Eine wichtige ökologische Fragestellung zum Anbau von gentechnisch modifizierten Pflanzen ist die Ausbreitung auf konventionell bebaute Felder und landwirtschaftlich unbebaute Biotope. Bislang wurden verschiedene Versuche zum Pollenflug und zur Auskreuzung durchgeführt (RAMSAY et al. 1999; SQUIRE et al. 1999; EASTHAM & SWEET 2002). Erkenntnisse über eine mögliche Verbreitung von keimfähigem transgenem Saatgut durch Wildtiere lagen bislang nicht vor.

Ziele dieses Forschungsprojektes waren:

- die Etablierung von Methoden zum Nachweis pflanzlicher und rekombinanter DNA und des rekombinanten Cry1Ab Proteins in nativen Maispflanzen, in tierischen Geweben sowie in Magen-Darm-Inhalten und Fäzes der untersuchten Tierart.
- Nachweis des Verbleibs von pflanzlicher und rekombinanter DNA und des rekombinanten Cry1Ab Proteins nach Aufnahme durch Wildtiere.
- Untersuchungen zur Verbreitung von keimfähigem Saatgut nach Magen-Darmpassage (Endozoochorie) in Nichtzielbiotop anhand der drei o.g. Wildtierart.

Von Nutztieren ausgehend wurden die Wildtierarten in Bezug auf ihr Verdauungssystem und die unmittelbare Nahrungskette ausgewählt. Als Monogastrier wurde das Wildschwein, als Vertreter der Ruminantia der Damhirsch und als Hühnervogel der Fasan gewählt.

Ergebnisse von Studien mit vergleichbaren Nutztieren - Schweine, Hühner und Rinder - gefüttert mit transgenem Mais wurden bereits publiziert (WEBER et al. 2000; EINSPANIER et al. 2001; CHOWDHURY et al. 2003 a, b, c). CHOWDHURY et al. (2003 a, b) detektierten 242 bp Fragmente des *zein* Gens, 226 bp Fragmente des *invertase* Gens und 1028 bp Fragmente des *rubisco* (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase) Gens im Gastrointestinaltrakt (GIT) von domestizierten Schweinen, die mit iso- und transgenem Mais gefüttert worden waren. Fragmente des rekombinanten *cryIAb* Gens (110 bp und 437 bp) wurden in GIT Inhalten von Schweinen nachgewiesen, die mit der transgenen Maissorte Bt11 gefüttert wurden (CHOWDHURY et al. 2003 a, b). Weder maisspezifische noch *cryIAb* Genfragmente konnten im peripheren Blut mittels PCR nachgewiesen werden. ELISA Messungen ergaben positive Signale für das Cry1Ab Protein in GIT Inhalten.

EINSPANIER et al. (2001) amplifizierten 199 bp des *rubisco* Genfragments in Gewebe von Hühnern (Muskel, Leber, Niere, Milz). *CryIAb* Genfragmente waren in Organen von Hühnern nicht nachweisbar.

Bisher veröffentlichte Fütterungsstudien mit Rindern, in denen pflanzenspezifische und transgene DNA bzw. transgenes Cry-Protein untersucht wurden, ergaben, dass Chloroplasten DNA in verschiedenen Geweben nachweisbar ist (EINSPANIER et al. 2001, 2004; CHOWDHURY et al. 2003 c, 2004). Es wurden bislang jedoch keine Fragmente des rekombinanten *cryIAb* Gens in Geweben von Rindern detektiert.

Die Auswertungen zu Degradationsprozessen des rekombinanten Cry1Ab Proteins im Verdauungstrakt von Rindern zeigten, dass eine rasche Degradation des funktionsfähigen Cry1Ab Proteins im Pansen stattfindet, da schon nach kürzester Zeit lediglich immunoaktive Fragmente und nicht das vollständige Protein nachweisbar war (LUTZ et al. 2005 a; WIEDEMANN et al. 2006)

3. MATERIAL UND METHODEN

Die Fütterungsstudien mit Wildtieren erfolgten im Zeitraum von 2002 bis 2005. Die Studien mit Fasanen fanden an der Forschungsstation Thalhausen (Lehrstuhl Biotechnologie der Nutztiere, TUM, Freising), mit Wildschweinen und mit Damhirschen in Zusammenarbeit mit dem Fachgebiet für Wildbiologie und Wildtiermanagement, TUM, Freising statt. Die experimentellen Arbeiten wurden im Zeitraum vom Januar 2003 bis Mai 2005 am Lehrstuhl für Physiologie, TUM, durchgeführt.

3.1 Futtermittel

Für die Fütterungsstudien mit Wildtieren wurde die transgene Maissorte Navares (Event 176) und die korrespondierende nicht-transformierte Sorte Antares (Syngenta International AG, Basel, Schweiz) in den Jahren 2002 bis 2004 auf Versuchsfeldern der Bayrischen Landesanstalt für Landwirtschaft angebaut und geerntet. Nach der Ernte wurde der Mais gehäckselt und zum Teil siliert oder zu Mais-Kobs verarbeitet. Körnermais wurde, damit die Keimfähigkeit erhalten blieb, bei einer Temperatur von etwa 35°C getrocknet. Auf die Verwendung von Beizstoffen zur Konservierung der Körner wurde verzichtet. Konventionelles Rapssaatgut wurde von Wagner & Sohn Ölsaatenverarbeitungs KG, Niederviehbach bezogen. Die transgene Maissorte Novelis (Event MON810, Monsanto) wurde uns mit freundlicher Genehmigung der Monsanto Agrar Deutschland GmbH durch das Ingenieurbüro für landwirtschaftliche Versuche, Schwarzach zur Verfügung gestellt.

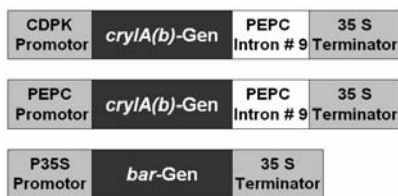
Navares (Event 176) enthält zwei Kopien des synthetischen *cryIAb* Gens (Abb. 2A) Die Genexpression unterliegt den Promotoren der aus Mais isolierten Phosphoenol-Pyruvat-Carboxylase (phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) oder der kalziumabhängigen Protein-Kinase (calcium-dependent protein kinase, CDPK). Die Maissorte Novelis enthält eine Kopie des *cryIAb* Gens unter der Regulation des CaMV eP-35S-Promotors (CaMV = Cauliflower Mosaic Virus, eP = enhanced version des 35S Promotors; Abb. 2B). Der 35-S Promotor entstammt dem Blumenkohlmosaikvirus (Cauliflower Mosaic Virus, CaMV) und ist einer der stärksten Promotoren für die Expression in pflanzlichen Zellen. Maissorten mit dem Event 176 exprimieren das Cry1Ab Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa. In Maisblättern kann auch immunreaktives Cry1Ab Protein in Größen von ca. 65, 40 und 36 kDa mittels Immunoblot nachgewiesen werden. In Maispflanzen des Events MON810 wird das Cry1Ab Protein mit einem Molekulargewicht von 91 kDa nicht nur in den grünen Pflanzenteilen, sondern auch in den Maiskolben und Maiskörnern produziert. In Navares (Event 176) beginnt die Expressionsrate auf hohem Niveau, sinkt jedoch nach

dem Pollenflug stark ab. Novelis (Event MON810) produziert das Cry1Ab Protein in gleichbleibenden Mengen während der gesamten Vegetationsperiode.

Das im Event 176 zusätzlich vorkommende *bar*-Gen (Abb. 2A) vermittelt eine Herbizid-Resistenz durch die Phosphinothricin N-Acetyltransferase (PAT) gegenüber Glufosinat Ammonium. Das *bar*-Gen liegt unter der Kontrolle des 35S-Promotors und des 35S-Terminators vom CaMV. Es wird nur in geringer Menge exprimiert und ist nicht für die landwirtschaftliche Nutzung geeignet.

Während der Fütterungsstudien wurden aus den Futterrationen Proben genommen, die DNA extrahiert und einer Analyse mittels PCR unterzogen, um eine Kontamination von isogenem mit transgenem Mais auszuschließen.

A Event 176



B Event MON810



Abb.2: Darstellung der exprimierten DNA-Konstrukte in Event 176 und MON 810
(nach MATSUOKA et al. 2002).

3.2 Wildschweinstudien

Es wurden zwei Fütterungsstudien mit Wildschweinen (Überläufer) von je fünfwöchiger Dauer durchgeführt. Die erste Studie umfasste sechs ca. 24 Monate alte Tiere mit einem Lebendgewicht von ca. 45 - 50 kg, von denen jeweils drei mit isogenem (Antares) bzw. transgenem (Navares) Mais gefüttert wurden. Die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme betrug 1,5 kg Grünmais (frische Maispflanzen), 0,25 kg Körnermais und 0,1 kg Rapsaat. Die zweite Fütterungsstudie umfasste acht ca. 18 Monate alte Wildschweine: fünf Tiere wurden mit transgenem (Navares) und drei mit isogenem Mais (Antares) gefüttert. Das Lebendgewicht lag zwischen 35-40 kg und die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme bei 1,0 kg Maishäcksel, 0,25 kg Körnermais und 0,2 kg Rapssaat. In beiden Studien bekamen die Tiere Zusatzfutter in Form von Weizen, Kartoffeln und Mineralfutter. Das Futter wurde getrennt angeboten und war ebenso wie Wasser *ad libitum* verfügbar. Während des Versuchs wurden die Fäzes einmal pro Woche gruppenweise gesammelt, in Wasser aufgeschlämmt und die Körner unter Zuhilfenahme eines Siebes auf intaktes Saatgut bzw. im Anschluss auf Keimfähigkeit hin untersucht. Nach der Schlachtung wurden Pro-

ben von sämtlichen inneren Organen, Blut, Ingesta, Darmepithel und Lymphknoten entnommen (LUTZ et al. 2005 b).

3.3 Fasanstudien

Es wurden insgesamt drei Fütterungsstudien mit Fasanen durchgeführt. Im ersten und zweiten Experiment wurden jeweils 15 Fasane im Alter von ca. 12 Monaten in drei Gruppen mit isogenem (Antares) und transgenem (Navares) Körnermais sowie konventioneller Rapssaat gefüttert. Die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme lag bei $48,7 \pm 3,2$ g transgenem Körnermais, $45,1 \pm 2,7$ g isogenem Körnermais bzw. $34,5 \pm 2,3$ g konventioneller Rapssaat.

Im dritten Experiment wurden 12 Fasane ohne Grit aufgezogen, um zu untersuchen, ob bei Beeinträchtigung der Muskelmagentätigkeit intakte Körner ausgeschieden werden können. Als Grit werden kleine Steinchen im Muskelmagen bezeichnet, die der Fasan mit seiner Nahrung aufgenommen hat. Im Muskelmagen wird die Nahrung unter zu Hilfenahme des Grit zu einem sehr feinen Brei zermalmt.

Im Alter von sechs Monaten wurden die 12 Fasane in getrennten Gruppen mit isogenen (Antares) und transgenen Maiskörnern der Sorte Novelis (Event MON810) und Navares (Event 176) gefüttert. Vor Verfütterung der Maiskörner wurden die Fasangruppen mit konventionellen Rapskörnern gefüttert, um deren Ausscheidung nach Magen-Darm-Passage zu untersuchen. Die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme war für Antares $34,5 \pm 0,9$ g, für Navares $32,6 \pm 1,7$ g, für Novelis $34,6 \pm 2,6$ g, für Raps $26,4 \pm 0,5$ g und für Mineralfutter (94,4 % Rohasche, 30,2 % Calcium, 5,4 % Phosphor, 4,3 % Natrium, 0,64 % Magnesium, Vitamine A, D, E) $3,5 \pm 0,1$ g. Die Studiendauer lag bei 33 Tagen, 40 Tagen bzw. 37 Tagen pro Fütterungsexperiment. Das Futter und Wasser waren *ad libitum* zugänglich. Während der Fütterungsversuche wurden die Fäzes gruppenweise gesammelt, in Wasser aufgeschlämmt und mit einem Sieb auf intaktes Saatgut untersucht. Nach der Schlachtung wurden Proben von sämtlichen inneren Organen, Blut, Ingesta, Darmepithel und der *Bursa fabricii* entnommen (LUTZ et al. 2005 b).

3.4 Damhirschstudien

Eine Fütterungsstudie mit 11 Damhirschen wurde am Staatlichen Versuchsgut Achselschwang durchgeführt. Die Damhirsche wurden im Versuchsgehege gehalten; 6 Damhirsche wurden mit isogenem (Antares) und 5 Damhirsche mit transgenem Mais (Navares) gefüttert. Eine zweite Fütterungsstudie mit jeweils drei Damhirschen fand in Zusammenarbeit mit dem Fachgebiet für Wildbiologie und Wildtiermanagement statt. In beiden Studien

bestand das Futter aus Maishäcksel, Körnermais und Rapssaat. Das Futter wurde getrennt angeboten und stand ebenso wie Wasser und Wiesenbewuchs *ad libitum* zur Verfügung. Die Fütterungsdauer der beiden Studien betrug sechs bzw. fünf Wochen. Während der gesamten Fütterungsperioden wurden die Fäzes gruppenweise gesammelt und unter Zuhilfenahme eines Siebes auf intakte Mais- und Rapssamen hin untersucht. Nach der Schlachtung wurden von allen Organen, Blut, Geweben und Inhalten des GIT Proben genommen. Gewebe der Organe und Epithelien der entnommenen Darmabschnitte wurden in PBS-Puffer gewaschen und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung wurde das Probenmaterial bei -80°C gelagert (GUERTLER et al. 2007).

3.5 DNA Analysen

Um die Degradation der DNA zu untersuchen, wurden Fragmente des ubiquitär und in hoher Kopienanzahl vorkommenden chloroplastenspezifischen *rubisco* Gens, der mais-spezifischen *zein* und *invertase* Gene sowie des rekombinanten *cryIAb* Gens analysiert. Das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (Rubisco) katalysiert die kovalente Bindung von gasförmigem Kohlendioxid in den Chloroplasten von grünen Pflanzen; das 10 kDa große Zein, ein Prolamin, kommt in den Samenkörnern des Mais vor. Bei allen Proben zur Detektion des *cryIAb* Gens mittels quantitativer PCR (qPCR) wurde auch das *invertase* Gen quantifiziert. Dies lässt Aussagen über die Anwesenheit von amplifizierbarer Mais-DNA und den Maisanteil in der extrahierten DNA zu. Invertase (β -Fruktofuranosidase) gehört zu den Disaccharidasen und ist bei der hydrolytischen Spaltung von Disacchariden involviert.

3.5.1 DNA Extraktion

Die Zerkleinerung des Probenmaterials (100 mg) erfolgte mit dem FastPrep System (BIO101, Carlsbad, USA) unter Verwendung von 0,5 g - 1,2 g Green Matrix (5,5 m/s, 30 s). Mit Kühlpausen wurde der Vorgang wiederholt, bis das Probenmaterial ausreichend gemahlen war. Die DNA Extraktion erfolgte für pflanzliches Probenmaterial und Ingestaprobe mit 600 μl C1 Lysepuffer (Nucleo Spin Plant Kit; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) für mindestens 30 min bei 60°C . Anschließend wurden die Proben für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert und der Überstand für die weitere DNA Reinigung verwendet. Tierisches Gewebe wurde mit 1 ml TriFast (PeqLab, Erlangen) unter Bewegung bei Raumtemperatur (RT) lysiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in 200 μl Chloroform überführt, circa 10 s geschüttelt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 11.000 x g wurde die untere Phase für die DNA Reinigung verwendet. Die DNA Aufreinigung erfolgte nach den Vorschriften von Mache-

rey & Nagel. Die resultierende DNA wurde in 40 µl CE-Puffer (Nucleo Spin Plant Kit) eluiert. Die Konzentration der DNA Lösungen wurde durch die Messung bei 260nm im Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) in Einwegküvetten (Uvette, Eppendorf) gemessen (LUTZ et al. 2005 b; WIEDEMANN et al. 2006).

3.5.2 PCR und qPCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction = PCR) ist eine Methode zur Detektion von bestimmten DNA Abschnitten. Die doppelsträngig vorliegende DNA wird zu Beginn durch Erhitzen in Einzelstränge getrennt. An den Anfang und das Ende des spezifischen Abschnitts binden Primer, d.h. Oligonukleotidsequenzen, die das komplementäre Muster der DNA besitzen und sich daher an die vorbestimmten Stellen anheften. Zu dem dazwischen liegenden DNA Abschnitt wird mittels Polymerase der jeweils komplementäre DNA Strang synthetisiert. Der gebildete Doppelstrang wird anschließend durch Erhöhung der Temperatur wieder getrennt, die Bindungsstellen für die Primer sind erneut frei und der Vorgang wiederholt sich nach dem Absinken der Temperatur. Durch Wiederholen dieses Vorganges wird eine Amplifizierung des DNA Abschnittes erreicht. Die entstandenen DNA Amplifikate können anschließend durch Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärben sichtbar gemacht werden. Die quantitative PCR-Technologie (qPCR) erlaubt über die Messung von induzierten Fluoreszenzsignalen eine quantitative Analyse der PCR-Produkte.

Für das *rubisco* Gen wurden anhand der Gensequenz Acc. Nr. X86563 (*Zea mays* Chloroplasten Genom) Primer für Fragmentlängen von 173 bp, 199 bp, 430 bp, 896 bp, 1197 bp, 1753 bp und 2521 bp unter Verwendung der Software „Primer 3“ (<http://frodo.wi.mit.edu>) generiert. Die Primersequenzen zur Amplifikation von 199 bp *rubisco*- und 329 bp *zein* Gen-Fragmenten wurden von EINSPANIER et al. (2001) veröffentlicht. *CryIAb* Gen Fragmente von 211 bp und 420 bp wurden von HUPFER et al. (1998) bzw. STUDER et al. (1997) publiziert. Für Fragmentlängen von 727 bp und 1423 bp wurden Primer anhand der Sequenz Acc. Nr. I41419 (*cryIAb* Gen, US-Patent 5625136) generiert (Abb.3; GUERTLER et al. 2007). Um die Amplifizierbarkeit der isolierten DNA festzustellen, wurde ein *18S* Genabschnitt der ribosomalen DNA als Referenzgen amplifiziert.

Zielgen	Fragmentlänge	Primersequenzen	Denaturierung	Amplifikation	Zyklen	Extention	
cryIAb	211 bp	5'-CTC TCG CCG TTC ATG TCC GT-3' 5'-GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT-3'	94°C, 3 min	94°C 30s; 56°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 2 min	
	420 bp	5'-CGG CCC CGA GTT CAC CTT-3' 5'-CTG CTG GGG ATG TTG TTG-3'	94°C, 3 min	94°C 30s; 56°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 2 min	
	727 bp	5'-ACG AGT GCA TCC CCT ACA AC-3' 5'-TAG TTG GGG AAC AGG CTC AC-3'	94°C, 5 min	94°C 30s; 56°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 5 min	
	1423 bp	5'-ACG AGT GCA TCC CCT ACA AC-3' 5'-AGG TTG GTG CTC TTG GTC AG-3'	94°C, 5 min	94°C 45s; 56°C 45s; 72°C 45s	40	72°C, 5 min	
rbcL	173 bp	5'-AGC TAA TCG TGT GGC TTT AGA AGC C-3' 5'-TGG TAT CCA TCG CTT TGA AAC CA-3'	94°C, 3 min	94°C 30s; 60°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 5 min	
	199 bp	5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3' 5'-GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC-3'	94°C, 3 min	94°C 30s; 61°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 5 min	
	384 bp	5'-ATT GCA ATT CAA TTC GGC TC-3' 5'-TGT ATG TCC CAG AAT AGG TCC C-3'	94°C, 3 min	94°C 30s; 53°C 30s; 72°C 45s	35	72°C, 5 min	
	896 bp	5'-AGG TAA GTT AGA AGG GGA ACG C-3' 5'-TGT ATG TCC CAG AAT AGG TCC C-3'	94°C, 5 min	94°C 45s; 58°C 45s; 72°C 45s	40	72°C, 5 min	
	1197 bp	5'-GGC CTA CTT CTT CAC ATT CAC C-3' 5'-CAT TCT CAT CGC CTT TCT ATC C-3'	94°C, 5 min	94°C 45s; 58°C 45s; 72°C 45s	40	72°C, 5 min	
	1753 bp	5'-GGC CTA CTT CTT CAC ATT CAC C-3' 5'-AAA CTC GCT ATA GTC GGC TAC G-3'	94°C, 5 min	94°C 45s; 58°C 45s; 72°C 45s	40	72°C, 5 min	
	2521 bp	5'-AAC TCA CAA CCA TTT ATG CGC-3' 5'-ATG CGA CGT TTT ATT CCA GG-3'	94°C, 5 min	94°C 60s; 64°C 60s; 72°C 60s	40	72°C, 10 min	
	329 bp	5'-TGC TTG CAT TGT ACG CTC CCT AGC-3' 5'-GTC GCA GAG ACA TTG TGG CAT-3'	94°C, 3 min	94°C 30s; 61°C 30s; 72°C 30s	40	72°C, 2 min	
	18S	365 bp	5'-AAG TCT TTG GGT TCC GGG-3'	94°C, 2 min	94°C 30s; 60°C 30s; 72°C 30s	25	72°C, 2 min
			5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA-3'				

Abb.3: Oligonukleotidsequenzen und PCR-Reaktionsbedingungen

Die Amplifikationen erfolgten in T-Personal und T-Gradient Thermocyclern (Biometra GmbH, Göttingen). Der Reaktionsansatz bestand aus 150 ng DNA; 1x PCR Reaktions-Puffer (ABgene, Epsom, UK); 2,5 mM MgCl₂ (ABgene); 0,4 µM Primer (Metabion, Martinsried, Germany); 0,2 mM dNTPs (ABgene) und 0,5 U Thermoprime Plus DNA Polymerase (ABgene). Der Mastermix für die Amplifikation der 1753 bp und 2521 bp Fragmente enthielt 3,5 mM MgCl₂ (ABgene). Als Positivkontrolle diente isolierte DNA aus Bt176-Maisblättern und als Negativkontrolle für den *cryIAb* Gen Nachweis DNA aus isogenen Maisblättern. Alle PCR Analysen wurden je in zwei Ansätzen durchgeführt.

Die PCR-Produkte wurden in 1,8% Agarosegelen aufgetrennt und anhand eines Videodokumentationssystems (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex 1, France) visualisiert.

Als standardisierte Methode zum Nachweis der *cryIAb* Kasette des Event 176 und von Fragmenten des *invertase* Gens wurde die qPCR Technik mittels „LightCycler GMO Maize Quantification Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gemäß Herstelleranweisung angewendet (LUTZ et al. 2005 b; WIEDEMANN et al. 2006). Die Primer amplifizieren einen Genabschnitt des CDPK Promotors. Als Negativkontrollen dienten isogene Maisproben für die *cryIAb* Analysen. Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 15,0 µl enthielt 50 ng DNA, 11,0 µl ddH₂O, 2,0 µl LightCycler GMO Maize Detection Mix und 2,0 µl LightCycler GMO Maize Enzyme Master Mix.

3.5.3 Sequenzierung

Um sicherzustellen, dass ausschließlich die erwarteten Genabschnitte amplifiziert wurden, wurden die PCR Produkte sequenziert, d.h. die Nukleotid-Abfolge bestimmt. Die Sequenzierungen wurden von Medigenomix GmbH, Martinsried durchgeführt.

3.6 Cry1Ab Protein Analysen

3.6.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren für biomolekulare Substanzen (z.B. Proteine, Viren) oder auch niedermolekulare Verbindungen (z.B. Hormone, Toxine, Pestizide). Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezieller, spezifischer Antikörper zu Nutze, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. Die klassische ELISA Technik (Sandwich-ELISA) verwendet zwei Antikörper, die beide hoch spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Der erste Antikörper (coating Antikörper) wird an eine feste Phase (meist eine spezielle 96-Well Mikrotiterplatte) gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird zugegeben und inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das Antigen. Nach der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen, wodurch die ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt werden. Im nächsten Schritt wird ein Detektions-(detection)Antikörper zugegeben, der an ein Enzym (meistens Meerrettichperoxidase oder Alkalische Phosphatase) gekoppelt ist. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex (deshalb der Name Sandwich ELISA). Durch erneutes Waschen der Platte wird die überschüssige Menge des zweiten Antikörpers entfernt. Das an den zweiten Antikörper gebundene Enzym ist in der Lage, ein hinzugefügtes Substrat zu aktivieren und eine Farb-reaktion auszulösen. Die Enzymaktivität kann photometrisch erfasst und damit die Menge des untersuchten Proteins ermittelt werden. Diese Methode ist sensitiv, erlaubt aber keine Aussage zur Proteingröße. So werden immunoaktive Proteinfragmente, an die der erste Antikörper binden kann, ebenso erfasst, wie intakte Proteine. Aus diesem Grund wurde ein zweiter immunologischer Test (Immunoblot) durchgeführt, mit dem bestimmt werden kann, ob in den Messwerten des ELISA Testverfahrens das intakte Protein oder lediglich Proteinfragmente erfasst werden.

Der Nachweis des Cry1Ab Proteins in den tierischen und pflanzlichen Proben erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (Agdia Inc.). Das Probenmaterial (200 mg) wurde mittels FastPrep-System (BIO101) unter Verwendung von 0,8 mg Green Matrix bei 6 m/s für 40 s gemahlen. Die Prozedur wurde wiederholt bis das Probenmaterial ausreichend zerkleinert war; danach wurde das Probenmaterial in 1000 µl Multi-Event Puffer (im Kit enthalten) gelöst. Für die Standardkurve wurde das Kontroll-Cry1Ab/1Ac Protein (im Kit enthalten) in Konzentrationen von 0,015, 0,03, 0,06, 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 und 1,6 ng/ml verwendet. Alle Standards und Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Die Messung der immunologischen Reaktion erfolgte mittels SLT Spectra ELISA Reader (SLT

Labinstrumente Deutschland GmbH, Crailsheim; LUTZ et al. 2005 a, b, 2006, GUERTLER et al. 2007).

3.6.2 Immunoblot

Beim Immunoblot-Verfahren werden Proteine eines Gemisches mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe oder Ladung aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten Proteingemische aus der Gelmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Identität von Proteinen auf der Membran kann anschließend mit Hilfe einer Immunodetektion bestimmt werden. Die Proteine werden dabei von spezifischen Antikörpern erkannt. Durch eine Enzym-Antikörper-Konjugation wird eine Farb- oder Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Der Nachweis erfolgt anschließend durch einen photographischen Film. Der Immunoblot ermöglicht eine Aussage über die Größe der immunoaktiven Proteine.

Für den Immunoblot wurde das Probenmaterial mit der gleichen Methodik aufbereitet wie für die Verwendung im ELISA, mit der Ausnahme, dass PBS (pH 7,4) mit Protease-Inhibitor (Merck KGaA, Darmstadt) als Extraktionspuffer verwendet wurde. 17,75 µl des extrahierten Proteins, 1,0 µl 1,4-Dithiothreitol (DTT; 10 mM; Merck KGaA) und 6,25 µl SDS Puffer (200 mM Tris-HCl, 40% (w/v) Glycerol, 8% (w/v) SDS, 0,4% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) wurden für ein SDS-PAGE mit einem 4 - 12% Gradient Bis-Tris Gel (NuPage, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) eingesetzt. Nach der Auftrennung und dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm; Schleicher & Schuell BioScience, Keene, USA) wurde das Cry1Ab Protein mittels polyklonalem Cry1Ab/1Ac Antikörper (Endkonzentration 5 µg/ml, Agdia Inc.) und sekundärem Antikörper (biotinyliertes Anti-Kaninchen IgG in Caseinlösung, Endkonzentration 1,5 µg/ml) detektiert. Zur Verstärkung der Signale wurden die Membranen in Vectastain ABC-Amp Reagenz (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) inkubiert. Die Signale wurden mittels Chemilumineszenzverfahren (DuoLuX, Vector Laboratories, Inc.) visualisiert. Isogener Mais (Antares) wurde als Negativkontrolle und das im ELISA-Kit (Agdia Inc.) enthaltene Cry1Ab/1Ac Protein als Positivkontrolle verwendet. Für den Immunoblot wurden die gleichen Antikörper eingesetzt wie sie im ELISA Verwendung fanden (LUTZ et al. 2005 a, b, 2006, GUERTLER et al. 2007).

3.7 Keimfähigkeitsprüfung für Mais- und Rapssaat

Vor Fütterungsbeginn wurde die Keimfähigkeit der Mais- und Rapskörner analysiert. Das Saatgut wurde unter optimalen Standardbedingungen nach den internationalen Regeln für Saatgutprüfung (International Seed Testing Association, ISTA, Schweiz) geprüft. Der Test für Mais wurde mit 8 x 100 Körnern für jede Maissorte in Sand bei 20°C und 8 stündigem Tageslicht durchgeführt. Rapssaatgut wurde mit 8 x 100 Samen im Keimapparat nach Jacobsen (ISTA 2004) mit wechselnden Temperaturen, 8 Stunden Tageslicht (30°C) und 16 Stunden Dunkelheit (20°C) wachsen gelassen. Die Keimlinge wurden nach 7 Tagen mit einer Einteilung in drei Kategorien bewertet: „normal wachsende Keimlinge“, „abnormal wachsende Keimlinge“ und „toter Samen“. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte aus den Wiederholungen errechnet und in Prozent auf die Gesamtmenge angegeben. Die Überprüfung der Lebensfähigkeit von nicht gekeimten Samen wurde mit Hilfe des „Topographischen Tetrazolium Tests“ (TTC-Test) nach den ISTA Vorschriften bestimmt. Die Maiskörner wurden der Länge nach durch den Embryo und das Endosperm aufgeschnitten und 24 Stunden in 1% 2,3,5-Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid-Lösung (w/v) bei 30°C in Dunkelheit inkubiert. In lebendigen Samen werden die essenziellen Strukturen vollständig gefärbt. Als lebensfähig werden die Samen eingestuft, die das Potential haben, „normal wachsende Keimlinge“ zu produzieren.

4. ERGEBNISSE

4.1 Etablierung der DNA Analytik

Um rekombinate und maisspezifische DNA Fragmente nachzuweisen, wurden verschiedene Primer generiert, die es ermöglichten, Degradationsprozesse zu untersuchen. Die Identität der PCR Produkte wurde durch Sequenzierung nachgewiesen. Um die Degradationsprozesse nachweisen zu können, erfolgte der DNA-Nachweis mit ansteigender Fragmentgröße bis zur Unterschreitung des Detektionslimits. In allen aus nativen Pflanzen isolierten DNA-Proben konnten sämtliche Fragmentlängen des *rubisco* Gens detektiert werden. Das 329 bp große *zein* Genfragment war ebenfalls in allen Proben nachweisbar. Die *cryIAb* Genfragmente wurden lediglich in DNA-Proben detektiert, die aus transgenem Pflanzenmaterial extrahiert wurden (Abb.4).

Um auszuschließen, dass die zur Detektion von Abschnitten des *cryIAb* Gens eingesetzten Primer pflanzen- oder tierspezifische DNA amplifizierten, wurde parallel immer Probenmaterial isogener Herkunft analysiert. Entsprechende Proben waren Negativkontrollen für den *cryIAb* Gen Nachweis. Um eine Detektion von *rubisco* Genfragmenten aufgrund von Kontaminationen der Reagenzien auszuschließen, wurden Negativkontrollen mit H₂O und verschiedenen Puffern analysiert. Alle Negativkontrollen zeigten keine Banden bzw. Fluoreszenzsignale.

Mais	<i>rubisco</i> Gen							<i>zein</i> Gen	<i>cryIAb</i> Gen			
	173 bp	199 bp	384 bp	896 bp	1197 bp	1753 bp	2521 bp	329 bp	211 bp	420 bp	727 bp	1423 bp
isogen	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
transgen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Abb.4: DNA Nachweis in frischen Maisblättern mittels konventioneller PCR Technik.

Als standardisierte Methode zur Detektion des *cryIAb* und des *invertase* Gens wurde die qPCR Technik mit dem kommerziell erhältlichen „LightCycler GMO Maize Quantification Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gemäß Herstellerangaben verwendet. Diese Methode eignete sich nur zum Nachweis des *cryIAb* Kasette im Event 176, jedoch nicht zum Nachweis des Event MON810, da sich eine der Primerbindungsstellen im Event 176-Promotor befindet, der im Event MON810 nicht vorkommt. Da die Primerbindungsstelle am MON810 Promotor nicht vorhanden ist, fällt das Ergebnis auch bei vollständigem *cryIAb* Gen negativ aus (Abb.5). Das *invertase* Genfragment konnte in allen iso- und transgenen Maissorten detektiert werden (Abb.5)

Maissorte	Event	<i>invertase</i> Gen	<i>cry1Ab</i> Gen
Antares	isogen	+	-
Navares	176	+	+
Novelis	MON810	+	-

Abb.5: DNA Nachweis in frischen Maisblättern mittels qPCR Technik.

4.2 Etablierung der Cry1Ab Protein Analytik

Für die Proteinanalysen wurde ein kommerziell erhältliches ELISA-Kit (Agdia Inc.) verwendet. Zur Etablierung des Cry1Ab Protein Nachweisverfahrens wurde isogenes Probenmaterial mit Cry1Ab/1Ac Proteinstandard (im ELISA-Kit enthalten) versetzt und die Wiederfindungsrate ermittelt. Dazu wurden 2,0 g Ingesta aus dem Pansen von konventionell gefütterten Tieren mit der Proteinmenge entsprechend der Standardkurve (0,06, 0,12, 0,25, 0,5, 1,0 und 1,6 ng Cry1Ab Protein / g Frischgewicht) versetzt. Die Wiederfindung (\pm Standardabweichung) betrug $87,6 \pm 1,2\%$, $81,0 \pm 3,7\%$, $65,5 \pm 5,5\%$, $68,4 \pm 5,3\%$ und $79,7 \pm 1,6\%$ entsprechend 0,12, 0,25, 0,5, 1,0 und 1,6 ng Cry1Ab Protein. Aufgrund der hohen Standardabweichung von 53,0% für den Standard 0,06 ng (Wiederfindungsrate: 71,7 %) wurden Ergebnisse ab 0,06 ng als negativ bewertet. Um Kreuzreaktionen von tier-eigenen, mikrobiellen und pflanzlichen Proteinen mit dem Cry1Ab Antikörper auszuschließen, wurde entsprechendes Probenmaterial von isogen gefütterten Tieren als Vergleichsprobe analysiert. Alle isogenen Futtermittel- und tierischen Proben zeigten keine Signale, was auf einen spezifischen Nachweis für das Cry1Ab Protein schließen lässt (LUTZ et al. 2005 a).

Da der ELISA keine Erkenntnisse darüber gibt, ob das intakte Protein oder nur immunoaktive Fragmente quantitativ bestimmt werden, wurde mit den gleichen Antikörpern, die bei der Durchführung des ELISA verwendet wurden, ein Immunoblot Assay etabliert. Anhand einer Verdünnungsreihe mit nativen transgenen Maisblättern (Navares) wurde das Detektionslimit des Immunoblots bestimmt. Es lag bei 50 mg (Frischgewicht), was bei dieser Methodik einer Menge von circa 2 ng Cry1Ab Protein, gemäß ELISA Messung entspricht (Abb.6).

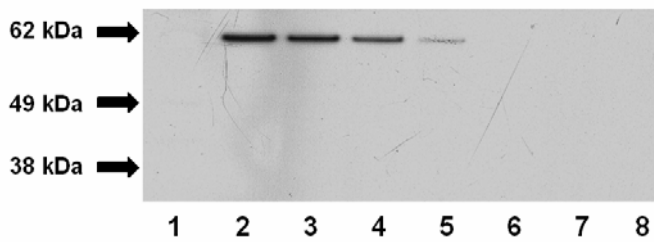


Abb.6: Detektionslimit des Immunoblot Assays mit polyklonalem Antikörper.

Ermittelt in einer Verdünnungsreihe mit Cry1Ab Protein extrahiert aus einer frischen transgenen Maispflanze (Navares). 1= Antares; 2= Navares (200 mg ~ 100%); 3= Navares (75%); 4= Navares (50%); 5= Navares (25%); 6= Navares (10%); 7= Navares (1%); 8= Navares (0.1%); Pfeile verweisen auf den Molekulargewichtsstandard (SeeBlue Plus2, Invitrogen GmbH) (LUTZ et al. 2005 a).

Nach der Etablierung wurde bovines Probenmaterial aus vorangegangenen Fütterungsstudien analysiert. Der ELISA detektierte positive Signale für das Cry1Ab Protein in Ingesta und Fäzes von transgen gefütterten Rindern. Die Messwerte für das rekombinante Protein zeigten einen Anstieg im Verlauf der Darmpassage, was sich auf die Absorption von Wasser im Darm und der daraus folgenden Eindickung des Inhaltes zurückführen lassen könnte. Für Fäzes waren die Messwerte am Detektionslimit des ELISA (EINSPANIER et al. 2004). Um zu überprüfen, ob die gemessenen Werte auf intaktes Cry1Ab Protein (ca. 65 kDa) zurückgeführt werden können, wurden die gemessenen Proben mittels Immunoblot analysiert. Der immunologische Nachweis im Immunoblot zeigte jedoch, dass sich die Messwerte des ELISA aus immunoaktiven Fragmenten mit Molekulargewichten von etwa 17 und 34 kDa im Pansen und aus immunoaktiven Fragmenten von ca. 17 kDa in den Darmabschnitten zusammensetzten (Abb.7). Bereits in Pansenproben zeigte sich kein Signal für ein vollständiges Cry1Ab Protein (LUTZ et al. 2005 a).

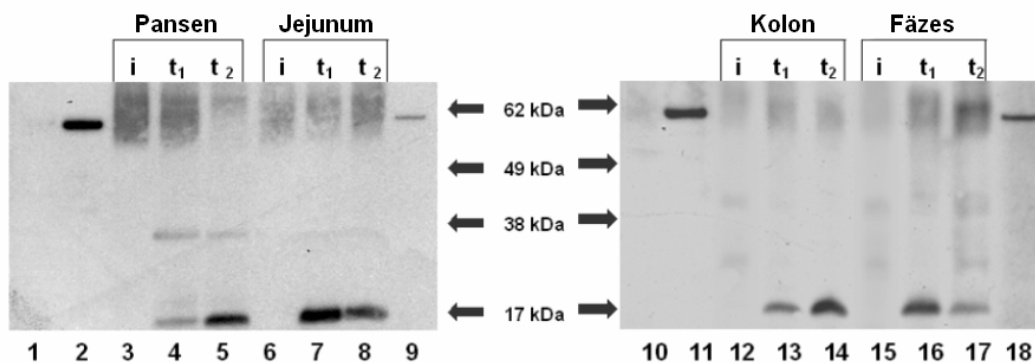


Abb.7: Immunoblot von Proben aus bovinem GIT mit polyklonalen Antikörpern.

1= Antares; 2= Navares; 3,4,5= Pansen; 6,7,8= Jejunum; 9= Positivkontrolle; 10= Antares; 11= Navares; 12,13,14= Kolon; 15,16,17= Fäzes; 18= Positivkontrolle. i: Proben eines isogen gefütterten Rindes; t: Proben von zwei transgen gefütterten Rindern. Positivkontrolle (Cry1Ab/1Ac Protein, Agdia Inc.). Die Pfeile geben die Proteingrößen des Proteinstandards (SeeBlue Plus2, Invitrogen GmbH) an.

4.3 Keimfähigkeitsprüfung

Die Keimfähigkeitsprüfung für Mais und Raps vor Beginn der Fütterungsstudien zeigte für die isogene Maissorte (Antares) $74,5 \pm 3,7\%$ normal wachsende Keimlinge, $11,3 \pm 2,3\%$ abnormal wachsende Keimlinge und $14,3 \pm 3,3\%$ tote Samen. Die Prüfung der transgenen Maissorte Navares ergab, dass $79,3 \pm 5,6\%$ der Keimlinge normal und $10,1 \pm 3,6\%$ abnormal wuchsen; $10,6 \pm 2,7\%$ der Samen waren tot. Für Novelis wurde eine normale Keimfähigkeit von $81,3 \pm 2,9\%$ und eine abnormale Keimfähigkeit von $11,7 \pm 4,1\%$ festgestellt; die Menge an toten Keimlinge lag bei $7,0 \pm 2,3\%$. Raps zeigte $93,5 \pm 3,7\%$ normal wachsende Keimlinge, $4,5 \pm 2,8\%$ abnormal wachsende Keimlinge und $2,3\% \pm 1,9\%$ tote Samen. Bei den in den Studien verwendeten Maiskörnern handelte es sich um Konsummais, bei dem keine gesetzliche Mindestnorm für normale Keimfähigkeit bestimmt ist. Im Gegensatz dazu ist für Saatgut eine normale Keimfähigkeit von nicht weniger als 90% vorgeschrieben (Saatgutverordnung, Anlage 3).

Zur Berechnung der Samenanzahl wurde bei Raps ein Tausendkorngewicht (TKG) von 5 g und für Mais ein TKG von 280 g zugrunde gelegt (LÜTKE-ENTRUP & OEHMICHEN 2000).

Die Ergebnisse zu den Keimfähigkeitsprüfungen aus Fäzes isolierter Mais- und Rapssaat sind in den Kapiteln 4.4, 4.5 und 4.6 beschrieben.

4.4 Wildschweinstudien

Die Untersuchungen zur Verbreitung von keimfähigem Saatgut ergaben, dass bei einer Gesamtfuttermenge von $\sim 13,0 \cdot 10^6$ Rapssamen (~ 65 kg), $\sim 0,35 \cdot 10^6$ isogenen (~ 98 kg) und $\sim 0,41 \cdot 10^6$ transgenen Maiskörnern (~ 114 kg) insgesamt 51 isogene und 37 transgene Maiskörner die Kau- bzw. Schluckphase und das Durchlaufen der Magen-Darm-Passage unbeschädigt überstanden haben (Abb.8). Nur eine transgene Pflanze konnte unter standardisierten Laborbedingungen nach ISTA wachsen, ein weiterer Keimling zeigte ein abnormales Wachstum (Abb.9).



Abb.8: Aus Fäzes von Wildschweinen isolierte Maiskörner.

Links sind oberflächlich intakte Maiskörner, rechts Maiskörner mit Bisspuren abgebildet.

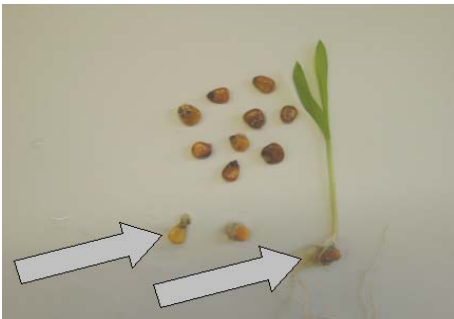


Abb.9: Ergebnis des Keimversuchs mit Maiskörnern nach Magen-Darm-Passage.

Rechts: Keimling mit normalen Wachstum; Links: Keimling mit abnormalem Wachstum; Restliche Maiskörner: tote Samen.

In DNA Analysen konnten in den Inhalten des GIT nur *rubisco* Genfragmente mit einer Länge von 173 bp nachgewiesen werden. Längere Fragmente des *rubisco* Gens und Fragmente rekombinanter DNA waren nur in den Mageninhalten amplifizierbar (Abb.10). In Gewebe außerhalb des GIT konnten keine pflanzenspezifische DNA Fragmente detektiert werden. Das Referenzgen (*18S rDNA*) wurde in allen Proben nachgewiesen, was einen generell negativen Einfluss der Matrix (z.B. Magen- oder GIT-inhalt) auf die Amplifizierbarkeit ausschließt. In allen aus nativen Pflanzen isolierten DNA-Proben konnten sämtliche Fragmentlängen des *rubisco* Gens detektiert werden (Positivkontrolle). Ebenso wurden *cryIAb* Genfragmente in allen DNA-Proben detektiert, die aus transgenem Pflanzenmaterial extrahiert wurden. Probenmaterial isogener Herkunft waren Negativkontrollen für den *cryIAb* Gen Nachweis; alle Negativkontrollen zeigten keine Banden (siehe auch Abschnitt 4.1).

	<i>rubisco</i> Gen						<i>cry1Ab</i> Gen			
	173 bp	384 bp	896 bp	1197 bp	1753 bp	2521 bp	211 bp	420 bp	727 bp	1423 bp
Magen	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Jejunum	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kolon	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cäcum	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abb.10: Zusammenfassung der DNA-Fragmentlängen-Analyse in Ingestaprobe von Wildschweinen.
 „+“: positiver Nachweis des Zielgens; „-“: kein Nachweis des Zielgens.

Die LightCycler Technik (qPCR) wurde genutzt, um die *cry1Ab* Kasette im Event 176 und einen Abschnitt des *invertase* Gens nachzuweisen. Mit dieser Methode konnten in 42,9% und 14,3% aller Proben aus Mageninhalten bzw. Jejunuminhalten Fragmente des *cry1Ab* Gens, sowie in 28,6% aller Mageninhalte Fragmente des *invertase* Gens gefunden werden.

Die Cry1Ab Protein Analytik mittels ELISA ergab Signale für immunoaktives Cry1Ab Protein in Höhe von $3,5 \pm 3,2$, $0,67 \pm 0,11$ und $1,58 \pm 0,59$ ng/g in Inhalten aus Magen, Kolon bzw. Rektum (Abb.11). Der Immunoblot hingegen zeigte nur spezifische Banden für das intakte Cry1Ab Protein (~65 kDa) in der Positivkontrolle (Cry1Ab/1Ac Proteinstandard, im ELISA-Kit enthalten, Agdia Inc.) und in transgenen Maisproben (LUTZ et al. 2005 b). In Geweben außerhalb des GIT konnte das Cry1Ab Protein nicht nachgewiesen werden.

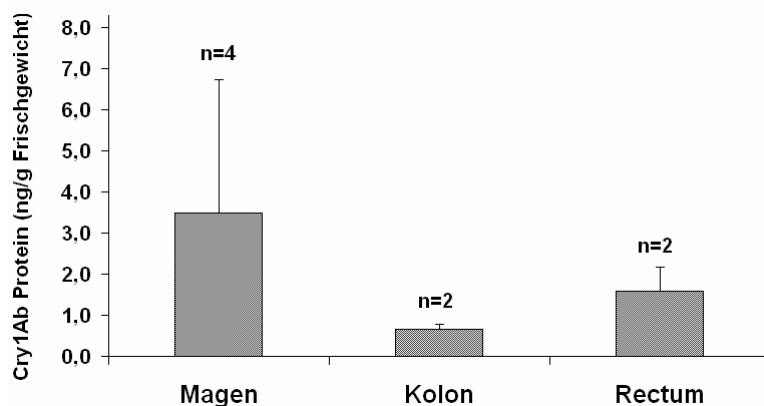


Abb.11: Zusammenfassung der Cry1Ab Protein Analytik beider Wildschweinstudien mittels ELISA in Ingestaprobe von Wildschweinen

4.5 Fasanstudien

Insgesamt wurden in den Fasanenstudien $\sim 5,9 \cdot 10^6$ ($\sim 29,5$ kg) Rapssamen, $\sim 0,12 \cdot 10^6$ ($\sim 36,4$ kg) isogene und $\sim 0,13 \cdot 10^6$ ($\sim 34,9$ kg) transgene Maiskörner verfüttert. Es konnten keine intakten Mais- und Rapssamen in Fäzes und in GIT Inhalten gefunden werden. Auch die Fütterungsstudien mit Fasanen, die ohne Grit aufwuchsen, ergaben, dass keine intakten Körner ausgeschieden wurden.

Die DNA Analysen zeigten, dass in allen Gewebe- und Ingestaprobe Fragmente des *rubisco* Gens (199 bp) im Gegensatz zum *zein* Gen (329 bp) nachweisbar sind (Abb.12). Mit der LightCycler Technik war es zudem möglich, in 40% (n=10) der untersuchten Muskelmageninhalte *invertase* Genfragmente zu detektieren. Das Cry1Ab Protein konnte weder in Organen noch in GIT Inhalten mittels ELISA nachgewiesen werden (LUTZ et al. 2005 b).

Fasan		<i>rubisco</i>	<i>zein</i>	<i>invertase</i>	<i>cry1Ab</i>
Ingesta	Muskelmagen	+	+	+	-
	Jejunum	+	+	-	-
	Caecum	++	+	-	-
	Fäzes	++	-	-	-
Epithelgewebe	Kropf	+	+	-	-
	Drüsenmagen	+	+	-	-
	Muskelmagen	++	+	-	-
	Jejunum	++	+	-	-
	Duodenum	++	+	-	-
	Ileum	+	+	-	-
	Caecum	++	+	-	-
Gewebe	Blut	+	-	-	-
	Herz	+	+	-	-
	Muskel	+	+	-	-
	Leber	+	+	-	-
	Milz	++	+	-	-
	Bursa fabricii	+	+	-	-
	Niere	+	+	-	-

Abb.12: Zusammenfassung der in Fasanen detektierten DNA Fragmente.

„++“: > als 50% , „+“: in weniger als 50% der untersuchten Fasane detektiert. „-“: keine Detektion.

4.6 Damhirschstudien

In den Fäzes der Damhirsche konnten keine intakten Maiskörner, jedoch intakte Rapssamen gefunden (n=81) werden. Durch den Kau- und Verdauungsprozess wurden die Maiskörner offenbar aufgeschlossen und metabolisiert. Rapssamen sind offenbar klein genug, um unzerkaut die Nahrungsaufnahme zu überstehen. Raps- und Maissaatgut wurde in den Fütterungsstudien immer in ausreichender Menge angeboten. Da die Tiere im Gehege untergebracht waren, kann die durch die Damhirsche aufgenommene Saatmenge nicht berechnet werden, da zum einen die Körner auch von anderen Tieren (z.B. Vögeln) gefres-

sen, zum anderen liegengelassen wurden. Die aus den Fäzes isolierten Rapssamen zeigten eine Keimfähigkeit von 13,6% (n=11), ein abnormales Wachstum von 3,7% (n=3); 82,7% (n=67) waren tot (GUERTLER et al. 2007).

Mittels PCR konnten 199 bp Fragmente des *rubisco* Gens in Ingesta- und Epithelproben des GIT und ebenso in verschiedenen Organen sowie Blut nachgewiesen werden. Die Detektion des *zein* Gens war in den GIT- und den Darmepithelproben mit Ausnahme von Labmagen möglich. In Blut, Muskel und Milz waren die Ergebnisse negativ. Die DNA Analysen mittels qPCR Technik für das *cry1Ab* Gen ergaben keine Nachweisbarkeit; das maisspezifische *invertase* Gen konnte nur im Panseninhalt in einer geringen Anzahl von Proben detektiert werden (Abb.13).

Hirsch		<i>rubisco</i>	<i>zein</i>	<i>invertase</i>	<i>cry1Ab</i>
Ingesta	Pansen	++	+	+	-
	Labmagen	++	+	+	-
	Jejunum	++	+	-	-
	Kolon	++	+	-	-
Epithelgewebe	Pansen	+	+	-	-
	Labmagen	+	-	-	-
	Jejunum	+	+	-	-
	Kolon	+	+	-	-
Gewebe	Blut	++	-	-	-
	Muskel	+	-	-	-
	Niere	+	+	-	-
	Leber	+	+	-	-
	Milz	+	-	-	-
	Lymphknoten	+	+	-	-

Abb.13: Zusammenfassung der in Damhirschen detektierten DNA Fragmente.

„++“: > als 50% , „+“: in weniger als 50% der untersuchten Damhirsche detektiert. „-“: keine Detektion.

In den Untersuchungen mittels ELISA und Immunoblot konnten in Ingesta-, Epithelgewebe- und Gewebeproben keine positiven Signale für das Cry1Ab Protein detektiert werden (Abb.14). Beobachtungen während der Fütterungsperiode zeigten jedoch, dass die Damhirsche nicht nur das angebotene transgene Futter und Rapssamen, sondern auch frisches Gras fraßen.

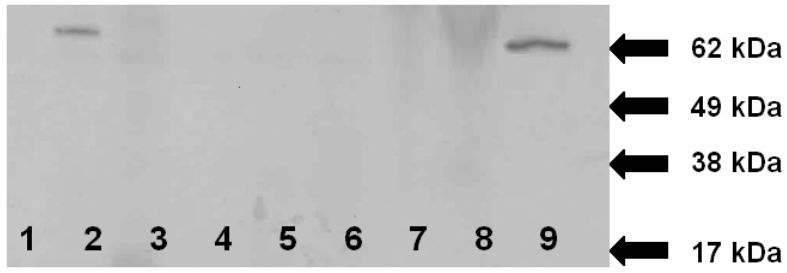


Abb.14: Immunoblot von GIT-Inhalten und Geweben aus Damhirschen mit polyklonalem Antikörper.
1= Antares; 2= Navares; 3= Pansen-Inhalt; 4= Jejunum-Inhalt; 5= Cäcum-Inhalt; 6= Kolon-Inhalt; 7= Milz;
8= Lymphknoten; 9= Positiv-Kontrolle (Cry1Ab/1Ac Protein, Agdia Inc.)

DISKUSSION

5.1 DNA Analytik der Fütterungsstudien

Die Verdauung und der Verbleib von pflanzeigener und rekombinanter DNA aus Maispflanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit in mehreren Fütterungsstudien untersucht. Von besonderem Interesse war in allen Studien der Nachweis der rekombinanten Abschnitte des Genoms, d.h. die dem Erbgut der Pflanze hinzugefügte DNA.

In den Fütterungsstudien mit Damhirschen konnte maisspezifische DNA in allen Abschnitten des GIT, Blut und in verschiedenen Organen nachgewiesen werden. Dabei wurde ein 199 bp langer Genabschnitt des *rubisco* Gens amplifiziert. Das 329 bp große *zein* Fragment konnte im Vergleich zu *rubisco* in einem geringeren Umfang nachgewiesen werden. Dies liegt vermutlich in der geringeren Kopienanzahl des *zein* Gens und der größeren Fragmentlänge begründet. Maisspezifische *invertase* DNA-Fragmente konnten nur in Pansen- und Labmageninhalten nachgewiesen werden. Rekombinante DNA konnten weder in Panseninhalten noch in Geweben detektiert werden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit veröffentlichten Resultaten von CHOWDHURY et al. (2004), die *zein*- und *invertase* DNA-Fragmente in Inhalten des Pansens und Rektums bis zu 18 Stunden nach Fütterung nachweisen konnten. In hoher Kopienzahl vorliegende kurze maisspezifische DNA-Bruchstücke des *rubisco* Gens wurden in Inhalten des Magen-Darm-Traktes, im Blut und in verschiedenen Organen nachgewiesen. Fragmente des rekombinanten *cryIAb* Gens wurde weder in Rindern, noch in Damhirsch detektiert.

Fütterungsstudien mit Fasanen zeigten, dass maisspezifische DNA, im Gegensatz zu rekombinanter DNA, im GIT, Blut und in Organen detektiert werden konnte (LUTZ et al. 2005 b). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die mit der Nahrung aufgenommene DNA zum Teil resistent gegenüber mechanischen, chemischen und enzymatischen Aktivitäten des GIT von Hühnervögeln ist und nicht vollständig degradiert wird. Studien mit Hühnern, gefüttert mit insektenresistentem Mais kommen zu vergleichbaren Ergebnissen. So konnte DNA aus dem Chloroplastengenom im GIT, sowie in Blut und Organen von Hühnern nachgewiesen werden (EINSPANIER et al. 2001; KLOTZ, A. et al. 2002; JENNINGS et al. 2003). Rekombinante DNA war weder im Blut noch im Gewebe detektierbar. In den Fütterungsstudien mit Wildschweinen wurden mittels PCR-Analytik DNA-Fragmente des *rubisco* Gens in Inhalten des GIT nachgewiesen. Die Detektion rekombinanter DNA-Fragmente war nur im Mageninhalt bis zu einer Größe von 727 bp möglich. Untersuchungen zum Abbau und Verbleib der nahrungsspezifischen DNA im Körper von Schweinen ergaben, dass DNA-Fragmente des *rubisco*- und *cryIAb*-Gens in allen Abschnitten des GIT gefunden werden können (CHOWDHURY et al. 2003 a,b). REUTER & AULRICH (2003) gelang der Nachweis von pflanzenspezifischer DNA (140bp) im Blut

und in verschiedenen inneren Organen, aber eine Detektion von rekombinanter DNA außerhalb des GIT war nicht möglich. Der positive Nachweis von REUTER & AULRICH von maisspezifischer DNA im Blut und Gewebe, im Gegensatz zu anderen Fütterungsstudien, liegt möglicherweise an der geringeren Produktgröße ihres nachgewiesenen DNA-Fragments (140 bp). PHIPPS et al. (2002) argumentieren, dass durch die Enzymaktivität und durch die sauren Bedingungen im Magen eine extensive Degradation von DNA aus der Nahrung stattfindet.

Es zeigte sich eine hohe Äquivalenz in der Nachweisbarkeit von Futter-DNA im Körper von Wildtieren im Vergleich zu Nutztierarten vergleichbaren Ernährungstyps. Ein Vergleich der Verdauungssysteme zeigt, dass die Verdauung von Futter-DNA beim Monogastrier effektiver ist als bei den Ruminantia und den Hühnervögeln. In unseren Fütterungsversuchen war bei Wildschweinen außer in Magen- und GIT-Inhalten weder *rubisco* noch *cryIAb* DNA nachweisbar, jedoch wurde Futter-DNA außerhalb des GIT bei Damhirschen und Fasanen detektiert (siehe 4.4, 4.5 und 4.6).

Alle Untersuchungen belegen übereinstimmend, dass durch Fütterung aufgenommene DNA während der Magen-Darm-Passage rapide in einzelne Bestandteile, die Nukleinsäuren, oder kleinere DNA-Fragmente abgebaut wird. Trotz bestehender Nachweise für den transintestinalen Übergang von Futter-DNA in den Organismus von Versuchstieren (EINSPANIER et al. 2001; HOHLWEG & DÖRFLER 2001, KLOTZ, A. et al. 2002; LUTZ et al. 2005 b) sind die verantwortlichen Mechanismen bisher noch ungeklärt. Denkbar ist ein Übergang von DNA aus der Nahrung über die M-Zellen der Peyerschen Plaques (GEBERT et al. 1996; SIEBERS & FINLAY 1996; OWEN 1999).

In der Vergangenheit galt es als sicher, dass mit der Nahrung aufgenommene, in Zellkernen von Pflanzen und Tieren natürlich fixierte DNA während der Magen-Darm-Passage vollständig degradiert würde. Ein nahezu vollständiger Abbau von oral aufgenommener DNA im GIT von Rindern wurde von McALLAN (1980, 1982) beschrieben. Er vermutete, dass die im Darm abgebauten Nukleinsäuren entweder als freie Nukleotide absorbiert oder weiter metabolisiert würden. Studien mit radioaktiv markierter DNA zeigten, dass nach 2 Tagen ca. 50% der markierten Kohlenstoffatome in Geweben von Leber und Milz sowie in Blut, Thymus und Pankreas zu detektieren waren. Etwa 40% wurden über Urin als Harnsäure, Allantoin und Harnstoff ausgeschieden, während die restlichen markierten Kohlenstoffe in anderen Stoffwechselprodukten, z.B. dem ausgeatmeten Kohlendioxid nachgewiesen wurden (RAZZAQUE et al. 1981).

Die Tatsache, dass mit der Nahrung aufgenommene DNA im GIT von Tieren nicht vollständig zu Nukleotiden abgebaut wird, zeigte SCHUBBERT et al. (1994) in einem Modellversuch, bei dem Mäuse mit großen Mengen an M13mp18 Phagen DNA gefüttert wurden. In den Fäzes konnten DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 1692 bp und im Blut mit einer Größe von 967 bp 2 h nach Fütterung nachgewiesen werden. In einem weiteren Versuch konnte die Phagen DNA mittels Fluorescence-in-situ-Hybridisierung (FISH) in Epithelzellen, in den Leukozyten der Peyerschen Plaques der Cäcumwand, in Leberzellen sowie in B- und T-Zellen und Makrophagen der Milz nachgewiesen werden (SCHUBBERT et al. 1997). Dies lässt vermuten, dass der Transport von mit der Nahrung aufgenommener DNA durch die Darmwand und Peyerschen Plaques erfolgt und so in das periphere Blutsystem und verschiedene Organe gelangt.

Eine Übertragung von M13mp18 Phagen-DNA auf Föten konnte SCHUBBERT et al. (1998) nachweisen. Fragmente mit Größen bis zu 830 bp wurden in Organen von Föten und neugeborenen Mäusen mittels PCR und FISH detektiert, nachdem Mäuse während der ersten 14 Tage ihrer Trächtigkeit mit M13mp18 Phagen DNA gefüttert wurden. Da Bruchstücke nicht überall im Fötus nachgewiesen wurde, folgern SCHUBERT et al. (1998), dass DNA zwar über die Plazentaschranke in den fötalen Organismus gelangen kann, jedoch nicht in die Keimbahn gelangt und daher nicht vererbt wird. Auswertungen des humanen und bovinen genetischen Codes haben bislang keine Homologien mit pflanzlicher DNA ergeben.

5.2. Cry1Ab Protein Analytik der Fütterungsstudien

Beim ELISA handelt es sich um ein äusserst sensitives Protein-Nachweisverfahren, welches ein schnelles Screening erlaubt und zudem einfach zu handhaben ist. Diese Methode ist im Allgemeinen wesentlich sensitiver als das Immunoblot-Verfahren, erlaubt jedoch keine Aussage über die Proteingröße und -struktur. So werden auch immunoaktive Proteinfragmente, an die der Antikörper binden kann, quantitativ in die Messung einbezogen. Um die gesetzlichen Vorschriften der Kommission der Europäischen Gemeinschaft (93/256/EEC) einzuhalten, müssen die analytischen Methoden aus einer geeigneten Kombination aus Aufreinigung, chromatographischer Auftrennung und spektrometrischer oder immunologischer Detektion durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden in unseren Studien die mit dem ELISA generierten Ergebnisse mittels Immunoblot Verfahren verifiziert.

Mittels ELISA wurden positive Signale, die auf eine Präsenz des Cry1Ab Proteins schließen lassen, in den Inhalten von Magen, Kolon und Rektum von Wildschweinen gemessen.

Im Immunoblot konnten keine signifikanten Banden für ein vollständiges Cry1Ab Protein detektiert werden. Die Ergebnisse aus dem Fütterungsversuch mit Wildschweinen sind vergleichbar mit Studien von CHOWDHURY et al. (2003 a). Sie konnten Signale für das Cry1Ab Protein in Inhalten verschiedener GIT Abschnitte von mit Bt-11 gefütterten Schweinen detektieren und ein Immunoblot zeigte eine schwache Bande für das Cry1Ab Protein aus Mageninhalten. Weder in Gewebeproben von Wildschweinen (diese Studie, siehe 4.4) noch von domestizierten Schweinen (CHOWDHURY et al. 2003 a) war das Cry1Ab Protein detektierbar. Basierend auf den Ergebnissen dieser beiden Studien ist zu vermuten, dass kein oder nur eine geringe Menge immunoaktives Cry1Ab Protein den GIT beim Wild- und Hausschwein verlässt und dass es keine nennenswerten Unterschiede im Abbauverhalten der beiden Tierlinien gibt. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass die meisten Fütterungsstudien lediglich über einen Zeitraum von 1-3 Monaten durchgeführt wurden, langfristige wissenschaftlich angelegte Fütterungsexperimente fehlen derzeit noch.

Untersuchungen zu Auswirkungen von transgenem Mais auf die mikrobielle Bodenökologie wurden von der FAL Braunschweig durchgeführt. Sie gaben Hinweise, dass das durch Wurzelreste der abgeernteten transgenen Maispflanzen in Böden gelangte Cry1Ab Protein in geringen Mengen eine Vegetationsperiode überdauern kann und eine Anreicherung in Böden möglich ist (BAUMGARTE & TEBBE 2004). Die ermittelten Cry1Ab Proteinmengen waren unterhalb der Wirkungsschwelle für die Zielorganismen. Informationen darüber, ob es sich um das funktionsfähige Cry1Ab Protein oder um immunoaktive Fragmente handelt, liegen zur Zeit nicht vor. Auch müsste in diesem Zusammenhang die Ausbringung von zusätzlichem Cry1Ab Protein durch Mist und Gülle untersucht werden.

Die Fütterungsstudien mit Fasanen und die anschließenden Analysen ergaben keine Nachweisbarkeit des Cry1Ab Proteins in Proben des GIT bzw. in Geweben. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Fütterungsstudien an Hühnern von JENNINGS et al. (2003), wo weder das Cry1Ab Protein, noch immunoaktive Fragmente mittels kompetitivem Immunoassay nachgewiesen werden konnten. Es zeigte sich, dass das Cry1Ab Protein rasch unter simulierten Magenbedingungen abgebaut wurde und damit die Cry1Ab Proteinmenge im weiteren Verlauf der Magen-Darm-Passage sehr gering ist.

Studien zu Degradationsprozessen des transgenen Cry1Ab Proteins im Verdauungstrakt von Rindern waren Bestandteil weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen. Deren Resultate zeigten, dass eine rasche Degradation des Cry1Ab Proteins im Pansen stattfindet, da sich schon nach kürzester Zeit lediglich immunoaktive Fragmente und nicht das vollständige Protein nachweisen ließen (LUTZ et al. 2005 a; WIEDEMANN et al. 2006). Es konn-

te auch in keinem Gewebe außerhalb des Magen-Darm-Trakts immunoaktives Cry1Ab Protein nachgewiesen werden (LUTZ et al. 2005 a; CHOWDHURY et al. 2003 a). Es ist daher unwahrscheinlich, dass intaktes, funktionsfähiges Cry1Ab Protein aus dem Pansen in nachfolgende Darmabschnitte gelangt.

Grundsätzlich können mögliche Auswirkungen von Cry1Ab Proteinfragmenten auf das Darmepithelgewebe von Insekten und Magen-Darm-Organismen nicht ausgeschlossen werden. HAIDER et al. (1986) zeigten, dass sich die Spezifität des Bt-Toxins des *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* in Abhängigkeit der Verdauungssäfte verändern kann. Ihre Studien ergaben, dass die Prozessierung des nativen Bt-Toxins (130 kDa) durch Verdauungsenzyme der *Pieris brassicae* Larve in einem 55 kDa Protein resultiert, welches seine toxische Wirkung auf Lepidopteren Zelllinien beschränkt. Eine Inkubation des Bt-Toxins mit Verdauungsenzymen der *Aedes aegypti* Diptera Larven ergab eine Proteingröße von 52 kDa und zeigte seine toxische Wirkung auf nur eine Lepidopteren Zelllinie (*Spodoptera frugiperda*). Untersuchungen über eine mögliche Bioaktivität der 17 kDa und 34 kDa Cry1Ab Proteingrößen aus den Rinderstudien sind zur Zeit noch nicht verfügbar.

Die Auswertungen der Cry1Ab Protein Analytik der Damhirschstudien ergaben keine Präsenz des Cry1Ab Proteins, weder im GIT noch in anderen Geweben. Da in den Fütterungsversuchen darauf Wert gelegt wurde, möglichst realitätsnahe Bedingungen für die Damhirsche zu schaffen, wurde den Tieren die Möglichkeit eingeräumt, sich nicht nur ausschließlich von Mais zu ernähren. Tierbeobachtungen während der Fütterungsphase zeigten daher auch, dass sich die Damhirsche nicht nur von dem angebotenen Maishäcksel und Körnermais, sondern auch von frischem Wiesenbewuchs ernährten. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Tatsache zur fehlenden Detektierbarkeit des Cry1Ab Proteins beigetragen haben könnte.

5.3 Keimfähigkeitsanalytik in den Fütterungsstudien

Die Keimfähigkeitsuntersuchungen in den verschiedenen Wildtierstudien zeigten, dass Fasane kein keimfähiges Saatgut, Wildschweine und Damhirsche nur geringe Mengen keimfähige Mais- bzw. Rapskörner ausscheiden können. Die Schäden durch das Kauen der Nahrung und der Aufenthalt im Magen bzw. Pansen lässt die Keimfähigkeit von Mais- und Rapskörnern stark absinken. Bei Verkürzung der Kauphase während der Nahrungsaufnahme durch Störungen und bei einer geringeren Verweildauer der Körner im GIT durch Krankheiten, könnte unter Umständen vermehrt keimfähiges Saatgut ausgeschieden werden. Eine Studie von HEINKEN et al. (2005) zur Ausbreitung von Gefäßpflanzen (*Tracheobionta*) durch Rehe (*Capreolus capreolus*), Dam- und Rothirsche (*Cervus e-*

laphus) sowie Wildschweine (*Sus scrofa*) kam zu dem Ergebnis, dass zahlreiche Pflanzenarten in zum Teil erheblichen Maße durch Kot (Endozoochorie) sowie durch Anheftung an das Fell (Epizoochorie) verbreitet werden können. In den Losungen von Damhirschen konnten 42 und in den von Wildschweinen 76 Samenarten nachgewiesen werden. Während Herbivoren überwiegend Samen krautiger Arten ausbreiten (SCHMIDT et al. 2003) wurden beim omnivoren Wildschwein relativ hohe Samenanteile von Offenland- und auch Kulturpflanzen gefunden (HAHN 2002). Von den Herbivoren wurden fast ausschließlich sehr kleine Samen (< 1 mg) ausgebreitet; nur Wildschweine schieden größere Samen (> 1 mg) aus (KLOTZ, S.I. et al. 2002).

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass *Zea mays* als empfindlich für geringe Temperaturen gilt. Die Keimung beginnt bei Temperaturen über 10°C und das Temperaturoptimum liegt für Mais bei 25°C (HOFFMANN et al. 1985). In Europa wäre demnach eine Ausbreitung in erster Linie nach der Saatausbringung durch den Landwirt im Frühjahr denkbar. Ein Auskreuzen von *Zea mays* und die Weitergabe rekombinanten Erbgutes an Wildpflanzen konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Mais behalten Rapsamen ihre Keimfähigkeit 10 bis möglicherweise 15 Jahren, manchmal sogar länger (RENARD et al. 1993; GERDEMANN-KNÖRCK & TEGEDER 1997). Finden Rapsamen gute Umweltbedingungen ist ein Wachstum nicht ausgeschlossen (PEKRUN et al. 1998). Eine Auskreuzung von Raps auf wildlebende verwandte Arten wurde nachgewiesen (DANIELS et al. 2005).

Für die Erfassung der Epizoochorie (Ausbreitung durch Anheftung an der Oberfläche der Tiere) wurden in unseren Studien keine Untersuchungen durchgeführt. Andere Studien zeigten jedoch, dass beim Reh 46, beim Rothirsch 18 und beim Wildschwein 65 Pflanzenarten im Fell und an den Hufen zu finden waren (HEINKEN & RAUDNITSCHKA 2002). Mit Ausnahme von sehr großen und glatten Früchten können Diasporen fast aller Pflanzenarten epizoochor ausgebreitet werden (HEINKEN 2005).

6. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Mit der täglichen Nahrung wird pflanzliche und tierische DNA aufgenommen. Die mit dem Futter aufgenommene DNA wurde beim Wildschwein (Abb.15C) effektiv abgebaut während bei Damhirschen (Abb.15A) und Fasanen (Abb.15B) noch Fragmente des pflanzenspezifischen *rubisco* Gens detektierbar waren.

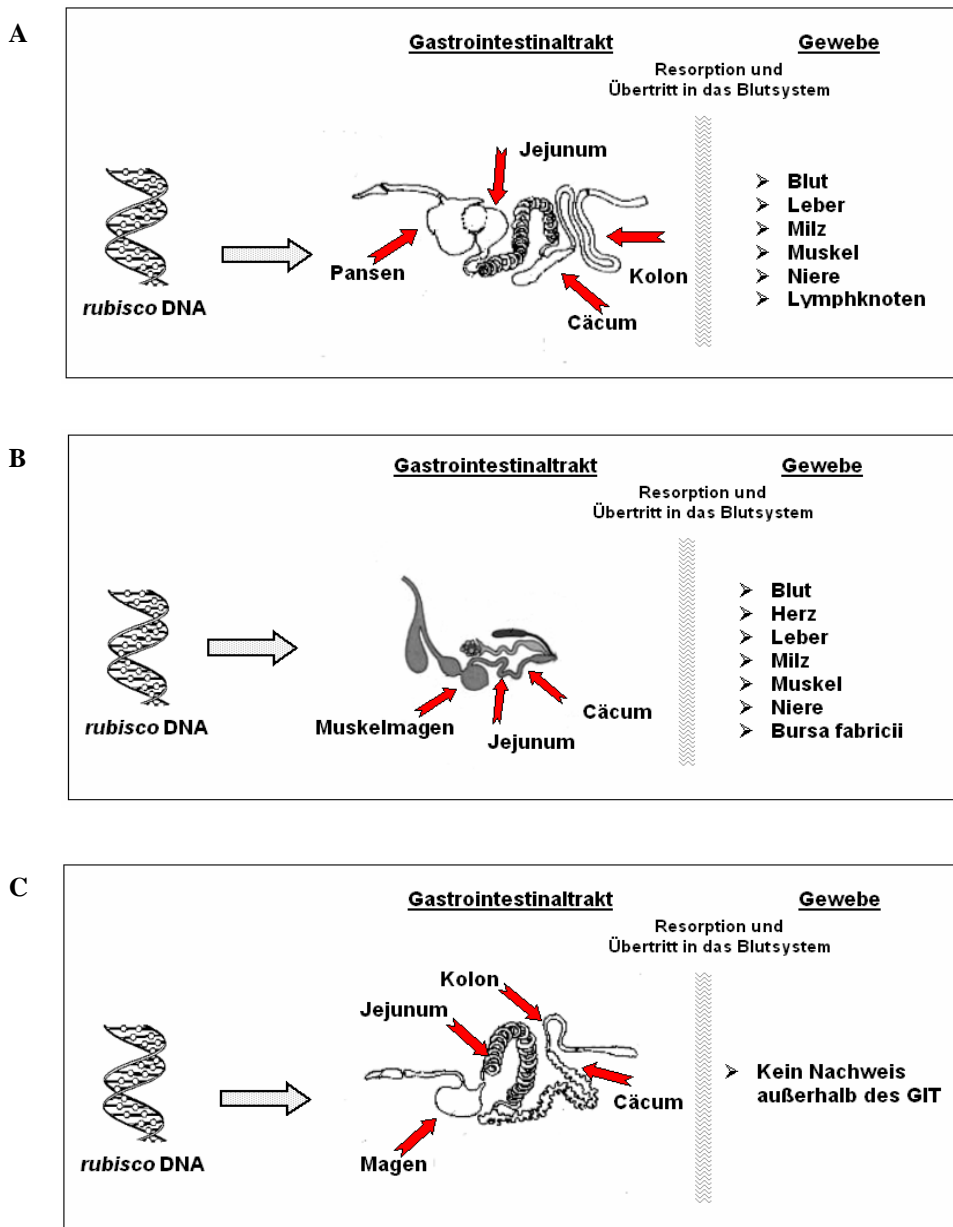


Abb.15: Zusammenfassung zum Nachweis der *rubisco* DNA in Wildtierarten mit verschiedenen Verdauungssystemen. A) Damhirsch, B) Fasan, C) Wildschwein

Die Pfeile geben die Regionen des GIT und Gewebe an, in denen Fragmente des *rubisco* Gens detektiert wurden.

Ebenso wie pflanzenspezifische Chloroplasten-DNA wurde die rekombinante *cry1Ab* DNA in allen Verdauungssystemen effektiv abgebaut. Nur in Mageninhalten von Wildschweinen konnten Fragmente des *cry1Ab* Gens detektiert werden. Die Detektierbarkeit des chloroplastenspezifischen Genfragments außerhalb des GITs in Damhirschen und Fasanen (Abb. 15 A und B) liegt möglicherweise in der höheren Kopienzahl im Vergleich zum rekombinanten *cry1Ab* Gen begründet.

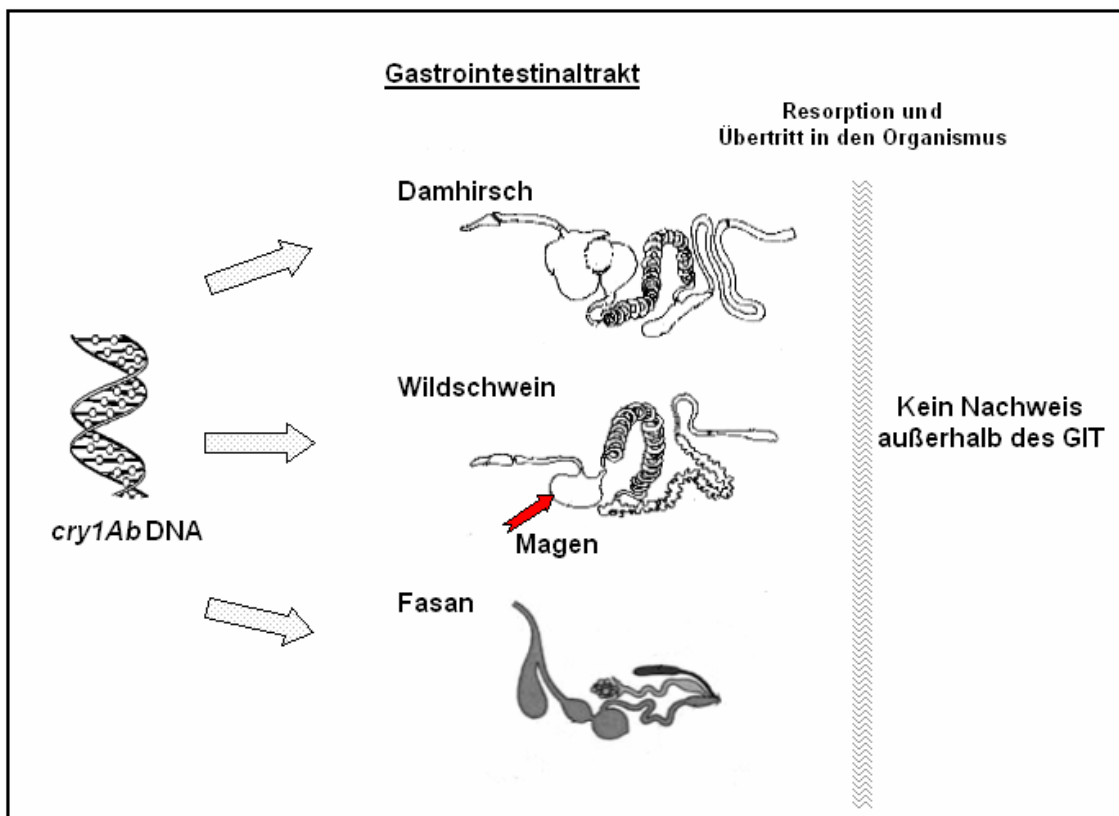


Abb.16: Zusammenfassung zum Nachweis der rekombinanten *cry1Ab* DNA in Wildtierarten mit verschiedenen Verdauungssystemen.

Der Pfeil gibt die Regionen des GIT an, in denen Fragmente des *cry1Ab* Gens detektiert wurden. In anderen Geweben sowie Inhalten des Magen-Darm-Takts konnten keine Fragmente des *cry1Ab* Gens detektiert werden.

Das in transgenen Pflanzen exprimierte Cry1Ab Protein wird im Verlauf der Magen-Darm-Passage schnell in 34 bzw. 17 kDa große Fragmente abgebaut. Letztere werden zum Teil noch mit den Fäzes ausgeschieden. In Hühnervögeln wurde das Cry1Ab Protein nicht detektiert. In den Ruminantia fand ein Nachweis im Pansen, im Monogastrier in verschiedenen Abschnitten des GIT statt (Abb.17).

Bislang wurden keine Beeinträchtigungen der Gesundheit bei domestizierten bzw. Wildtieren, die mit transgenen Pflanzen gefüttert wurden, nachgewiesen. Jedoch fehlen Ergebnisse aus Langzeitfütterungsstudien, in denen mögliche Auswirkungen von GVO und der von ihnen neu gebildeten (z.B. insektiziden) Proteine auf Tiere untersucht werden. Diese sind insbesondere dann erforderlich, wenn die transgenen Pflanzen als Lebens- oder Futtermittel eingesetzt werden sollen. Unter optimierten Standardbedingungen erscheint eine unkontrollierte Ausbreitung von Saatgut durch Tiere möglich, was allerdings in weitergehenden Studien unter Feldbedingungen eingehender untersucht werden sollte.

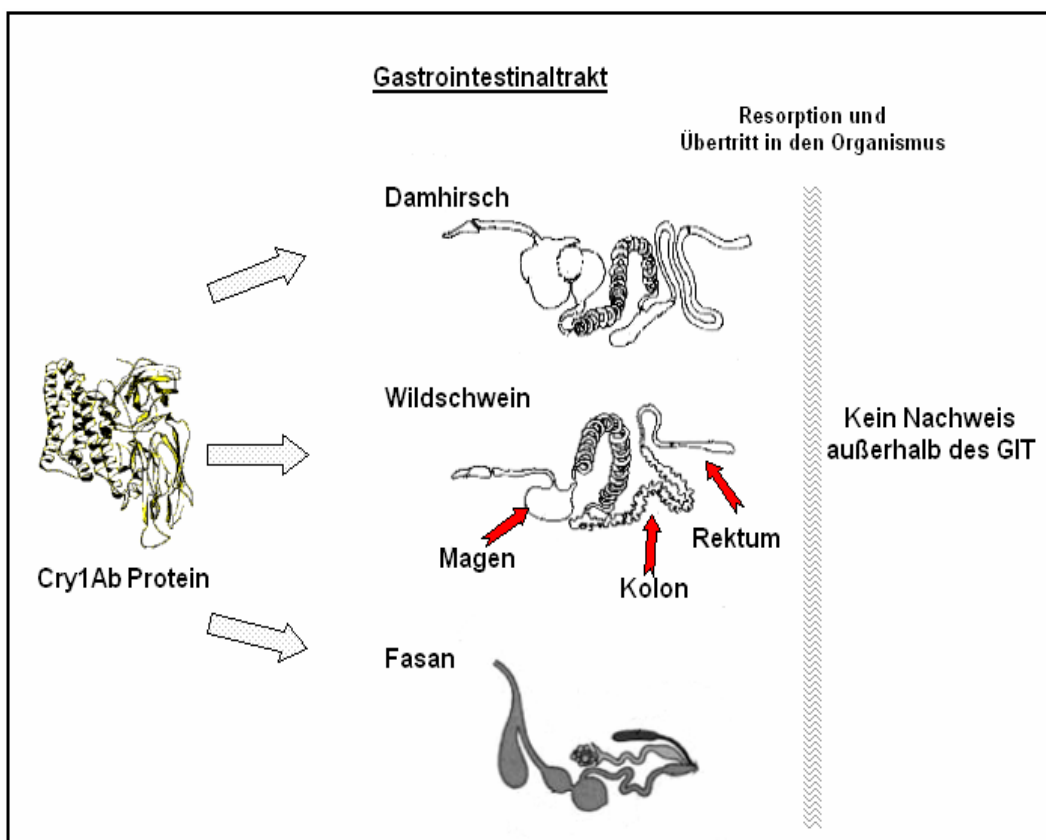


Abb.17: Zusammenfassung zum Cry1Ab Protein Nachweis in Wildtierarten mit verschiedenen Verdauungssystemen.

Die Pfeile geben die Abschnitte des GIT an, in denen das Cry1Ab Protein detektiert wurde. In anderen Geweben sowie Inhalten des Magen-Darm-Trakts konnten keine Fragmente des Cry1Ab Proteins detektiert werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Zehn Jahre nach der ersten kommerziellen Nutzung gentechnisch veränderter (GV) Pflanzen ist die weltweite Anbaufläche im Jahr 2005 auf 90 Mio. ha gestiegen. Davon entfallen etwa 24 % (21,2 Mio. ha) auf GV Mais und 5% (4,6 Mio. ha) auf GV Raps. Bei diesen biotechnologisch hergestellten Pflanzen wurde vorwiegend die Widerstandsfähigkeit gegen Pflanzenschutzmittel und/oder Insekten verändert.

Der wirtschaftlich bedeutendste Maisschädling ist der sog. Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*). Er schädigt weltweit etwa 7% der Maisernte durch Fraßlöcher, die ideale Eintrittspforten für z.B. Fusarien darstellen oder bei starkem Wind das Umknicken der Pflanze begünstigen. Die wirksame Bekämpfung des Maiszünslers von außen ist nur während der kurzen Zeitspanne möglich, in der sich die Larven an der Blattoberfläche befinden (etwa 10 Tage). Seit längerem wird im biologischen Anbau die Wirkung des vom Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* produzierten Cry1Ab Proteins genutzt, um den Schädling abzutöten. Das Gen, welches für das Cry1Ab Protein codiert, wurde in den sog. insektenresistenten Bt Mais eingebracht. Somit kann sich die Pflanze nun selbständig durch Eigenproduktion des Cry1Ab Proteins gegen seinen Fraßfeind schützen.

Da nicht nur der Maiszünsler als sog. Zielorganismus den gentechnisch veränderten Mais konsumiert, sondern auch sog. Nicht-Zielorganismen wie z. B. Wildtiere, war es Ziel dieses Forschungsvorhabens die Verbreitung von Transgenen nach der Magen-Darm-Trakt Passage zu untersuchen. Im Blickpunkt der Untersuchungen standen hierbei Wildschweine, Damhirsche und Fasane, die während ihres natürlichen Fressverhaltens u.a. auch im Maisfeld Nahrung suchen. Hintergrund der Forschungsarbeiten war, dass bislang keinerlei Informationen über die Aufnahme von transgenem Mais und den Verbleib von rekombinanter DNA und transgenem Protein in Wildtieren verfügbar waren. Weiterhin lagen keine Erkenntnisse über eine mögliche Verbreitung von keimfähigem transgenem Saatgut durch Wildtiere vor. Die Untersuchung dieser Aspekte sind essentiell, da eine der diskutierten ökologischen Fragestellungen zum Anbau von GV Pflanzen die Ausbreitung auf konventionell bebaute Felder und landwirtschaftlich unbebaute Biotope darstellt.

Somit bestanden die Zielsetzungen dieses Forschungsprojektes in

- der Etablierung von Methoden zum Nachweis pflanzlicher und rekombinanter DNA und des rekombinanten Cry1Ab Proteins in nativen Maispflanzen, in tierischen Geweben sowie in Magen-Darm-Inhalten und Fäzes der untersuchten Tierespezies

- dem Nachweis des Verbleibs von pflanzlicher und rekombinanter DNA und des rekombinanten Cry1Ab Proteins nach Aufnahme durch Wildtiere
- Untersuchungen zur Verbreitung von keimfähigem Saatgut nach Magen-Darmpassage (Endozoochorie) in Nichtzielbiotope anhand der drei o.g. Wildtier-spezies.

Von Nutztieren ausgehend wurden die Wildtierarten in Bezug auf ihr Verdauungssystem und die unmittelbare Nahrungskette ausgewählt. Als Monogastrier wurde das Wildschwein, als Vertreter der Ruminantia der Damhirsch und als Hühnervogel der Fasan gewählt.

Für die Beantwortung der Fragestellungen wurden zunächst mehrere DNA- und Protein-Extraktionsmethoden zur Aufarbeitung der diversen pflanzlichen und tierischen Gewebeproben generiert und später optimiert. Daraufhin wurden spezifische hochempfindliche Methoden für den qualitativen und quantitativen Nachweis rekombinanter und maiseigener DNA bzw. des rekombinanten Proteins etabliert.

Um die Degradation der DNA zu untersuchen, wurden Fragmente des ubiquitär in hoher Kopienanzahl vorkommenden *rubisco* Gens (173, 199, 430, 896, 1197, 1753 und 2521 bp), des maisspezifischen *zein* Gens (329 bp) und des *invertase* Gens (ca. 100 bp) sowie des rekombinanten *cryIAb* Gens (211, 420, 727, 1423 bp) analysiert. Die quantitative Erfassung des Cry1Ab Proteins in den tierischen Proben erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA Kits. Da das ELISA-Verfahren keine Erkenntnisse darüber gibt, ob das intakte Protein oder nur immunoaktive Fragmente bestimmt werden, wurde mit den gleichen Antikörpern, die bei der Durchführung des ELISA verwendet wurden, ein Immunoblot Assay etabliert. Nach der Optimierung der Methodik erfolgte die Analyse von bovinem Probenmaterial aus vorangegangenen Fütterungsstudien. Es konnte nachgewiesen werden, dass es bereits im Pansen der Rinder zu einem Abbau des Cry1Ab Proteins zu immunoaktiven Fragmenten der Größen 17 und 34 kDA kommt.

Zur Beantwortung der Fragestellungen bezüglich der Abbauvorgänge des GV Maises während der Verdauung sowie der Verbreitung von keimfähigem Saatgut durch Wildtiere wurden auf Versuchsfeldern die beiden gentechnisch veränderten Maissorten Bt176 und MON810 angebaut. Zum Vergleich wurden ferner die jeweils korrespondierenden, nicht-gentechnisch veränderten Sorten gepflanzt.

Mit Wildschweinen wurden zwei Fütterungsstudien an 6 Tieren (3 transgen und 3 isogen gefüttert) bzw. 8 Tieren (5 transgen und 3 isogen gefüttert) von jeweils fünfwöchiger Dauer durchgeführt. Die Ration der Tiere enthielt sowohl frische Maispflanzen als auch Körnermais. Während des Versuches wurden die Fäzes einmal pro Woche gruppenweise gesammelt und für die Keimfähigkeitsuntersuchung aufgearbeitet. Nach der Schlachtung wurden Proben von sämtlichen inneren Organen, Blut, Ingesta, Darmepithel und Lymphknoten entnommen.

Die Untersuchungen zur Verbreitung von keimfähigem Saatgut durch Wildschweine ergaben, dass ca. 0,015% der isogenen und 0,009% der transgenen Maiskörner die Kau- bzw. Schluckphase und die Passage im Magen-Darm-Trakt unbeschädigt überstanden. Nur eine transgene Pflanze (0,00013%) konnte unter standardisierten Laborbedingungen wachsen, ein weiterer Keimling zeigte ein abnormes Wachstum. In DNA Analysen konnten in den Inhalten des Magen-Darm-Traktes ausschließlich *rubisco* Genfragmente mit einer Länge von 173 bp nachgewiesen werden. Längere Fragmente des *rubisco* Gens und Fragmente rekombinanter DNA waren nur in den Mageninhalten amplifizierbar. In den Geweben außerhalb des GIT konnte keine pflanzenspezifische DNA nachgewiesen werden. Die quantitative Bestimmung von kurzen DNA Abschnitten erbrachte einen Nachweis des *cryIAb* Genfragments in 42,9% und 14,3% aller Proben aus Mageninhalten bzw. Jejunuminhalten und des *invertase* Genfragmentes in 28,6% aller Magenproben. Die Cry1Ab Proteinanalytik mittels ELISA ergab Signale für immunoaktives Cry1Ab Protein in Höhe von $3,5 \pm 3,2$; $0,67 \pm 0,11$ und $1,58 \pm 0,59$ ng/g in Inhalten aus Magen, Kolon bzw. Rektum. Der Immunoblot hingegen zeigte nur spezifische Banden für das intakte Cry1Ab Protein in transgenen Frischmaisproben. In Geweben außerhalb des GIT konnte das Cry1Ab Protein nicht nachgewiesen werden.

Mit Fasanen wurden insgesamt drei Fütterungsstudien durchgeführt. In zwei Studien wurden jeweils 15 Tiere in drei Gruppen eingeteilt und mit isogenem und transgenem Körnermais sowie mit konventioneller Rapssaat gefüttert. Im dritten Fütterungsexperiment wurden 12 Fasane ohne Grit aufgezogen, um zu untersuchen, ob bei Beeinträchtigung der Muskelmagentätigkeit intakte Körner ausgeschieden werden könnten. Die Fasangruppen wurden mit konventionellen Rapskörnern gefüttert, um deren Ausscheidung nach Magen-Darm-Passage zu untersuchen. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt. Die Kontrollgruppe erhielt isogene Maiskörner, die beiden anderen Gruppen entweder Maiskörner der Sorte Bt176 oder Mon810. Während des Versuches wurden die Fäzes gruppenweise gesammelt und auf intaktes Saatgut untersucht. Nach der Schlachtung wurden Proben von

sämtlichen inneren Organen, Blut, Ingesta, Darmepithel und der *Bursa fabricii* entnommen.

In den Kotproben konnten keine intakten Mais- und Rapssamen gefunden werden. Die DNA Analysen ergaben, dass in allen Gewebe- und Ingestaprobe Fragmente des *rubisco* Gens (199 bp) nachweisbar waren. In 40% der untersuchten Muskelmageninhalte war es mittels quantitativer PCR möglich, Fragmente des *invertase* Gens zu finden. Das Cry1Ab Protein konnte weder in Organen noch in GIT Inhalten mittels ELISA nachgewiesen werden.

Mit Damhirschen wurden zwei Fütterungsstudien an 11 Tieren (5 transgen und 6 isogen; gefüttert über 6 Wochen) bzw. 6 Tieren (3 transgen und 3 isogen; gefüttert über 5 Wochen) durchgeführt. Die Ration der Tiere enthielt Maishäcksel, Körnermais und Rapssaat. Während der gesamten Fütterungsperioden wurden die Fäzes gruppenweise gesammelt und auf intakte Mais- und Rapskörner untersucht. Nach der Schlachtung wurden von allen Organen, Blut, Geweben und Inhalten des GIT Proben genommen.

In den Fäzes der Damhirsche wurden keine intakten Maiskörner, jedoch intakte Rapssamen gefunden. Diese zeigten eine normale Keimfähigkeit von 13,6% (n=11), ein abnormales Wachstum von 3,7% und kein Wachstum bei 82,7% der Samen. Mittels PCR konnten 199 bp Fragmente des *rubisco* Gens in Ingesta- und Epithelproben des Magen-Darm-Traktes und ebenso in verschiedenen Organen sowie Blut nachgewiesen werden. Das *zein* Gen wurde in den GIT- und den Darmepithelproben mit Ausnahme von Labmagen detektiert. Die DNA Analysen mittels quantitativer PCR ergaben für das *cry1Ab* Gen keine Nachweisbarkeit. Fragmente des maisspezifischen *invertase* Gens konnten nur im Panseninhalt in einer geringen Anzahl von Proben detektiert werden. In den Proteinuntersuchungen mittels ELISA und Immunoblot waren weder in Ingesta-, noch in Epithelgewebe- oder Gewebeproben positive Signale nachweisbar.

Die Ergebnisse der Fütterungsstudien an Wildschwein, Fasan und Damhirsch sind vergleichbar mit Daten, die in Studien mit vergleichbaren domestizierten Tieren (Rind, Huhn, Schwein) erhalten wurden. Im Monogastrier wird die pflanzenspezifische DNA offensichtlich sehr effektiv abgebaut und konnte daher außerhalb des GIT nicht detektiert werden, während ein Nachweis der pflanzenspezifischen DNA bei den Ruminantia und Hühnervögeln in verschiedenen Organen möglich war. Das aufgenommene Cry1Ab Protein wurde während der Magen-Darm-Trakt Passage in allen Tieren abgebaut und konnte in keinerlei Gewebeproben detektiert werden. Die Untersuchungen zur unkontrollierten Verbreitung von Saatgut zeigten, dass Wildschweine ggf. intakte keimfähige Maiskörner ausscheiden

können. Keimfähigkeitsstudien nach Fütterung von Damhirschen ergaben, dass bei dieser Tierart intakte Rapssamen ausgeschieden werden können. Bei Fasanen konnte kein intaktes Saatgut nach Magen-Darm-Passage gefunden werden.

8. SUMMARY

Since their commercial release in 1996, the global area of genetically modified (GM) plants has increased from 2 to 90 million ha including approximately 24 % of GM maize and 5% of GM rapeseed. The genetic makeup of those crops has been altered to tolerate herbicides and/or resist pests. Many insect-resistant crops have been engineered by incorporating a gene encoding a protein originating from the soil bacterium, *Bacillus thuringiensis* (Bt). This protein, referred to as Bt, is produced by the plant and renders it resistant to insect pests like the European Corn Borer.

The release of GM plants into the food and feed market has raised questions and public concerns with regard to their environmental impact and safety. Therefore, studies on the effect and the digestive fate of recombinant DNA and proteins of GM crops on domesticated animals, e.g. cows, poultry and pigs were performed by several research groups. Within these investigations the degradation of both recombinant DNA and protein during the passage of the gastro-intestinal tract was reported. However, little information is available about the impact of GM crops after feeding GM plants to wildlife. It could be hypothesized that wild animals may consume GM crops and may thereby contribute to the dispersal of transgenic DNA, novel protein and viable seeds into areas where conventional crops are grown. To shed light on these aspects exemplary feeding experiments on fallow deer, pheasants and wild boars were performed.

Originally fallow deer was native to the Mediterranean region and parts of the Middle East, but spread out widely in Europe, parts of North and South America and New Zealand. Today fallow deer is used in extensive and intensive farming operations, for stocking of parks and in some regions as introduced game. Since the intensive fallow deer farming is very popular, this species constitutes an ideal model for research experiments.

In many countries the populations of wild boars have recently increased. Wild boars are well adapted to modern agricultural systems, and thrive even in areas highly influenced by human activity. The diet of the omnivorous wild boars consists predominantly of vegetation: in autumn, they consume maize plants while in spring they root out maize seeds. Observations showed that wild boars living at the edge of a forest and spend 50% of their nightly activity in cultivated fields.

Pheasants originate from Asia and occur in almost all European countries as well as in North America. The diet of adult pheasants consists up to 80% of grains originating from

cultivated species, usually provided by maize lost in the harvest process. They unearth and feed on newly seeded plants as well as the hypocotyl of young plants.

Fallow deer, wild boars and pheasants could be involved in the distribution of maize grains and rapeseed, making them interesting candidates to study the likelihood of a potential dispersal of viable transgenic seeds. Those species were also chosen based on their alimentary system and alimentary behavior as compared to domesticated animals. An example for monogastric animals is the species of wild boars, for ruminants the species of fallow deer and fowl-like birds are represented by pheasants.

The aims of this study were

- to develop and optimize methods for the detection of endogenous plant and recombinant DNA and Cry1Ab protein in fresh maize, in animal tissues, in the contents of the gastrointestinal (GI) tract and in feces of all investigated species
- to investigate the fate of plant and recombinant DNA and recombinant Cry1Ab protein during GI digestion by wild animals
- to analyze the likelihood of endozoochory of viable seed into areas of non-GM planted fields.

To address these aspects, several DNA and protein extraction methods for processing different plant and animal tissues were tested and/or developed and further optimized. Specific and sensitive methods for the qualitative and quantitative detection of endogenous plant and recombinant DNA as well as for the analysis for the recombinant protein were established.

For DNA analyses by conventional PCR, oligonucleotide primers amplifying different fragments of the high-copy chloroplast *rubisco* gene (173, 199, 430 896, 1197, 1753 and 2521 bp), of the maize-specific *zein* gene (329 bp) and of the recombinant *cry1Ab* gene (211, 420, 727 and 1423 bp) were designed. PCR amplification of transgenic and isogenic maize diets revealed amplicons for the *rubisco* gene. Fragments of the *cry1Ab* gene were amplified only in transgenic feed which excluded any contamination of isogenic maize with components of the transgenic cultivar.

Using quantitative real-time PCR (qPCR), the *cry1Ab* and *invertase* genes were analyzed detecting approximately 100 bp size fragments of the synthetic *cry1Ab* gene in combination with the maize-specific *invertase* gene.

Estimation of the Cry1Ab protein was carried out using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit designed for plant material. To determine the fragment size of the Cry1Ab protein an immunoblotting technique was applied. Isogenic maize served as negative control and Cry1Ab/1Ac protein included in the ELISA kit served as positive control. In order to exclude any cross-reactions, e.g. with animal or intestinal bacteria proteins, samples of animals fed with isogenic maize were used as controls.

Isogenic (Antares) and transgenic (Navares, Bt176) maize (Syngenta International AG, Basel, Switzerland) were planted and grown on experimental fields of the Bavarian State Research Center for Agriculture in Poing, Germany. Commercially available rapeseed (Alkido) was provided by Wagner & Sohn ÖlsaatenverarbeitungsKG, Niederviehbach, Germany. The transgenic maize Novelis (MON810, Monsanto, St. Louis, USA) was provided by Monsanto Agrar Deutschland GmbH. Navares (Bt176) expresses the Cry1Ab protein in green parts of the plant and in pollen whereas in Novelis (MON810) the transgenic protein is also found in maize kernels. In Navares the expression rate of Cry1Ab protein starts at high levels but decreases after pollen dispersal, whereas Novelis expresses the Cry1Ab protein during the entire vegetation period.

Feeding experiments with fallow deer

Two feeding experiments with fallow deer were carried out. The first experiment included 6 animals fed with isogenic (Antares) and 5 fed with transgenic maize (Navares). The second experiment was performed on 6 fallow deer, 3 fed with isogenic and 3 with transgenic maize (MON810). In the second experiment conventional rapeseed was added to investigate endozoochory of small seeds. Feces were collected on a daily basis. The average daily feed intake (ADFI) was approximately 1.0 kg fresh maize, 0.5 kg maize kernels and 0.1 kg rapeseed. After slaughtering the contents of different parts of the GI tract, visceral tissues and all organs were collected.

In germination tests no intact maize seeds in feces and rectum contents were found. Macroscopically identifiable particles of maize grains in feces were present, but they were classified as non-germinable and therefore not relevant regarding the dispersal of GM maize. A total of 81 intact isogenic rapeseeds were isolated from feces collected from 6 animals throughout the entire experimental period. The germination tests revealed 13,6% (n=11) normal seedlings, 3,7% (n=3) abnormal seedlings, 82,7% (n=67) dead seeds.

Applying conventional PCR, amplicons (173 bp) of the highly abundant *rubisco* gene were detectable in all contents of the GI tract and visceral tissues of animals fed with isogenic and transgenic maize. Larger fragments of 430 bp and 896 bp were found in all GI contents and in rumen contents, respectively. Larger fragments were not found in any sample tested. Maize-specific *zein* gene fragments (329 bp) were amplifiable in GI contents and intermittently in visceral tissues. Fragments of the *cryIAb* gene were not found in any sample. Analysis of the Cry1Ab protein by ELISA and immunoblotting technique revealed no immunoreactive protein in any sample.

Feeding experiments with wild boars

Two feeding experiments with wild boars were carried out for five weeks each. The first experiment consisted of 3 animals fed with isogenic (Antares) and 2 sows fed with transgenic maize (Navares). The ADFI was 1.5 kg fresh maize, 0.25 kg maize kernels and 0.1 kg rapeseed. In the second experiment 3 wild boars were fed with isogenic maize and 5 with transgenic maize. The ADFI of the animals fed with transgenic maize was 1.0 kg Navares, 0.25 kg maize kernels and 0.1 kg rapeseed per day. The ADFI of the animals fed the isogenic diet was 1.0 kg Antares, 0.25 kg maize kernels and 0.1 kg rapeseed per day. Rapeseed was added to investigate a possible dispersal by wild boars. Feces were collected during the experimental period. After slaughtering, the contents of the GI tract, all organs and visceral tissues were collected.

In the feeding studies with wild boars a total of 65 kg rapeseed ($\approx 13.0 \cdot 10^6$ seeds), 98 kg Antares ($\approx 0.35 \cdot 10^6$ seeds) and 114 kg Navares ($\approx 0.41 \cdot 10^6$ seeds) was fed. Within these investigations 51 intact isogenic maize seeds and 37 intact transgenic maize seeds were isolated from feces during the feeding period. The germination test resulted in one normally growing transgenic maize seedling and one abnormally growing isogenic maize seedling. No intact rapeseed were isolated from feces.

PCR analyses revealed *rubisco* DNA fragments of 173 bp length in all digesta samples of wild boars. PCR amplicons of the *rubisco* gene up to a size of 1753 bp were only generated with DNA extracted from samples of gastric content. A *rubisco*-specific amplicon of 2521 bp was not detectable in sample except the positive control (fresh maize). DNA fragments of the *cryIAb* gene with sizes up to 727 bp were only amplified in samples of gastric content. 1423 bp fragments of the *cryIAb* gene were not detected. Using the qPCR method, the *cryIAb* gene fragment (~ 100 bp) was found in samples of stomach content (n=3) and jejunum content (n=1) from wild boars (n=7) receiving diets containing transgenic compo-

nents. The *invertase* gene fragment was also detected in stomach content of wild boars (n=2). All other samples were negative for both genes.

Immunoactive Cry1Ab protein was detected using ELISA technique in samples of gastric content (3.50 ± 3.23 ng/g), colon content (0.67 ± 0.11 ng/g) and rectal content (1.58 ± 0.59 ng/g) of wild boars fed with transgenic maize. In order to determine the fragment size of the Cry1Ab protein detected by ELISA, the samples were tested using an immunoblotting assay. As expected samples of transgenic maize and the positive control (Cry1Ab/1Ac protein included in the ELISA kit) showed specific bands at the appropriate size of 60 kDa. Samples from animals fed transgenic maize showed no Cry1Ab specific bands.

Feeding experiments with pheasants

Three feeding experiments were carried out. In experiments I & II, 5 pheasants were fed with isogenic maize kernels (Antares), transgenic maize kernels (Navares) and rapeseed, respectively. All pheasants were approximately 12 months old. The ADFI was 48.7 ± 3.2 g transgenic maize, 45.1 ± 2.7 g isogenic maize or 34.5 ± 2.3 g rapeseed, respectively. During the feeding trials feces were collected and washed in a strainer to separate maize and rapeseed. After slaughtering, the rectal contents were rummaged to determine if intact maize kernels and rapeseed were present. Samples for DNA and protein analyses were taken from all visceral organs, GI contents and muscles.

In experiment III, 12 pheasants were reared without grit in order to investigate the effect of impaired stomach activity on the digestion and dispersal of maize seeds and rapeseed. The pheasants were approximately six months old; they were fed either with isogenic maize (Antares), with the transgenic maize cultivars Navares or Novelis or with rapeseed. The ADFI was 34.5 ± 0.9 g Antares, 34.6 ± 2.6 g Novelis, 32.6 ± 1.7 g Navares or 26.4 ± 0.5 g rapeseed, respectively. The experiments lasted 33, 40 and 37 days for experiment I, II and III, respectively.

In the feeding experiments with pheasants a total of 29.5 kg rapeseed ($\approx 5.9 \cdot 10^6$ seeds), 34.9 kg ($\approx 0.12 \cdot 10^6$ seeds) isogenic and 36.4 kg ($\approx 0.13 \cdot 10^6$ seeds) transgenic maize were fed. No intact maize kernels and rapeseed were found in feces. Using conventional PCR, fragments of the *rubisco* gene (199 bp) and the *zein* gene (275 bp) were amplified in all pheasant samples. The *rubisco* gene fragments were detected in all tissues examined as well as in samples of the GI content. In contrast, the *zein* gene fragment was not found in feces and blood. In all samples the detection rate of fragments of the *zein* gene was lower compared to the *rubisco* gene. Applying qPCR technique, analysis of the gizzard content

samples of pheasants fed with transgenic maize (n=10) revealed no fragments of the *cry1Ab* gene; 3 samples from different gizzard contents were positive for the *invertase* gene fragment. The analysis of all pheasant samples using ELISA yielded no positive signals for immunoactive Cry1Ab protein. Likewise, and similar to the experiments with wild boars, immunoblot analysis yielded no positive bands for the Cry1Ab protein in any sample tested.

These studies were conducted to test the potential impact of GM plant cultivation on wild animals and the endozoochory of viable seeds, genes and gene products. No differences in the ADFI between the isogenic and transgenic diets were found in fallow deer, wild boars and pheasants. Analyzing potential endozoochory of viable maize seed and rapeseed by those species showed that, depending of the species investigated, excreted maize seeds were not able or rarely able to germinate. Therefore, the possibility of an uncontrolled dispersal of germinable seeds by fallow deer, wild boars and pheasants is rather low due to effective mastication and digestion processes. Applying conventional PCR, highly abundant chloroplast DNA fragments were amplified in GI and sporadically in tissue samples of fallow deer and pheasants and in GI samples of wild boars. Transgenic DNA was not found in any tissue or organ sample of fallow deer and wild boars and in any tested sample of pheasants. No Cry1Ab protein was found in any sample of fallow deer and pheasants using sensitive ELISA and immunoblot techniques. In wild boars low amounts of immunoactive Cry1Ab protein were detected by ELISA in samples of the gastric, colon and rectum content, but by immunoblotting no full-size protein was found.

9. LITERATUR

Aulrich, K. G. Pahlow und G. Flachowsky. (2004): Influence of ensiling on the DNA-degradation in isogenic and transgenic corn. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology 13. 112.

Baumgarte S. und C.C. Tebbe. (2004): Freilanduntersuchungen zum Einfluss vom Bt-Mais auf Bodenbakterien und zum Verbleib des rekombinanten Cry1Ab-Proteins. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem 396: 383-384.

Behle, R.W., M.R. McGuire und B.S. Shasha. (1997): effects of sunlight and simulated rain on residual activity of *Bacillus thuringiensis* formulations. Journal of Economic Entomology 90: 1560-1566.

Cannon, R.J.C. (1995): *Bacillus thuringiensis* in pest control. In: Biological control, benefits and risks. Plant and Microbial Biotechnology Research Series: 4. Hokkanen HTM & Lynch JM (Eds), Cambridge University Press: 190-200.

Chowdhury, E.H., O. Mikami, H. Murata, P. Sultana, N. Shimada, M. Yoshioka, K. S.Guruge, S. Yamamoto, S. Miyazaki, N. Yamanaka, und Y. Nakajima. (2004): Fate of maize intrinsic and recombinant genes in calves fed genetically modified maize Bt11. Journal of Food Protection 67: 365-370.

Chowdhury, E.H., H. Kuribara, A. Hino, P. Sutana, O. Mikami, N. Shimada, K.S. Guruge, M. Saito und Y. Nakajima. (2003 a): Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the GI contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. Journal of Animal Science 81: 2546-2551.

Chowdhury, E.H., O. Mikami, Y. Nakajima, A. Hino, H. Kuribara, K. Suga, M. Hanazumi und C. Yomemochi. (2003 b): Detection of genetically modified maize DNA fragments in the intestinal contents of pigs fed StarLink CBH351. Veterinary and Human Toxicology 45: 95-96.

Chowdhury, E.H., N. Shimada, H. Murata, O. Mikami, P. Sultana, S. Miyazaki, M. Yoshioka, N. Yamanaka, N. Hirai und Y. Nakajima. (2003 c): Detection of Cry1Ab protein in GI

contents but not visceral organs of genetically modified Bt11-fed calves. *Veterinary and Human Toxicology* 45: 72-75.

Commission Decision of 14. April 1993 (93/256/EEC). *Official Journal L* 118, 14/04/1993, 64-74

Daniels, R., Boffey, C., Mogg, R., Bond, J. & Clarke, R. (2005): The potential for dispersal of herbicide tolerance genes from genetically modified herbicide-tolerant oilseed rape crops to wild relatives. Final report to DEFRA. – Im Internet unter: http://www.defra.gov.uk/environment/gm/research/pdf/epg_1-5-151.pdf

De Maagd R.A., A Bravo und N. Crickmore. (2001): How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17: 193-199.

Dutton, A., H. Klein, J. Romeis und F. Bigler. (2002): Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecological Entomology* 27: 441-447.

Dutton, A., H. Klein, J. Romeis und F. Bigler. (2003): Prey-mediated effects of *Bacillus thuringiensis* spray on the predator *Chrysoperla carnea* in maize. *Biological Control* 26: 209-215.

Eastham, K. und J. Sweet. (2002): Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer, European Environment Agency (EEA), Mai 2002

Einspanier, R., A. Klotz, J. Kraft, K. Aulrich, R. Poser, F. Schwägele, G. Jahreis und G. Flachowsky. (2001): The fate of forage DNA in farm animals: a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. *European Food Research and Technology* 212: 129-134.

Einspanier, R., B. Lutz, S. Rief, O. Bereziņa, W. Schwarz, J. Mayer. 2004. Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize. *European Food Research and Technology* 218: 269-273.

Eisfeld, D. und N. Hahn. (1998): Raumnutzung und Ernährungsbasis von Schwarzwild. Abschlußbericht an das Ministerium Ländlicher Raum Baden-Württemberg. 61 S.

Gebert, A., H.J. Rothkotter und R. Papst. (1996): M cells in Peyer's patches of the intestine. *International Review of Cytology* 167: 91-159.

Geisser, H. (1998): The wild boar in the Thurgau (northeastern Switzerland): Population status, damages and the influence of supplementary feeding on damage frequency. *Gibier Faune Sauvage* 15: 547-554.

Geisser, H. und T. Bürgin. (1998): *Das Wildschwein*. Verlag Desertina, Chur, Switzerland. 64 S.

Genov, P. (1981): Significance of natural biocenoses and agrocenoses as the source of food for wild boar (*Sus scrofa* L.) *Ekologia Polska* 29: 117-136.

Gerdemann-Knörck, M. and M. Tegeder (1997): *Kompendium der für Freisetzen relevanten Pflanzen; hier Brassicacea, Beta vulgaris, Linum usitatissimum*. Umweltbundesamt Berlin, TEXTE 38/97.

Giudice, J.H. und J.T. Ratti. (2001): Ring-necked Pheasant (*Phasianus colchicus*). In *The Birds of North America*, No. 572 (A. Poole und F. Gill, eds.). The Birds of North America, Inc., Philadelphia, PA. 32 S.

Guertler, P.; B. Lutz; R. Kuehn.; H.H.D. Meyer; R. Einspanier; B. Killermann; C. Albrecht (2007): Fate of recombinant DNA and Cry1Ab protein after ingestion and dispersal of genetically modified maize in comparison to rapeseed by fallow deer (*Dama dama*). *European Journal of Wildlife Research* (in press)

Hahn, N. (2002): *Schwarzwild in Bayern*. LWF aktuell 35. Bayerische Landesanstalt für Wald- und Forstwirtschaft. 43 S.

Haider, M.Z., B.H. Knowles und D.J. Ellar. (1986): Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. colmeri insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *European Journal of Biochemistry* 156: 531-540.

Heinken T., G. v. Oheimb, M. Schmidt, W.-U. Kriebitzsch und H. Ellenberg. (2005): Schalenwild breitet Gefäßpflanzen in der mitteleuropäischen Kulturlandschaft aus – ein erster Überblick. *Natur und Landschaft* 4: 141-147.

Heinken, T. und D. Raudnitschka. (2002): Do wild ungulates contribute to the dispersal of vascular plants in central European forests by epizoochory? A case study in NE Germany. Forstwissenschaftliches Centralblatt 121: 179-194.

Hilbeck, A., W.J. Moar, M. Pusztai-Carey, A. Filippini und F. Bigler. (1998): Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carne* (Neuroptera: Chysopidae). Environmental Entomology 27: 1255-1263.

Hoffmann, W., A. Mudra und W. Plarre. (1985): Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Band 2. Spezieller Teil. 2. Auflage. Berlin Hamburg, Paul Parey. 424 S.

Höfte, H. und H.R. Whitely. (1989): Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews 53: 242-255.

Hupfer, C., H. Hotzel, K. Sachse und K.-H. Engel. (1998): Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt-maize by polymerase chain reaction. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und –Forschung 206, 203-206.

Hupfer, C., J. Mayer, H. Hotzel, K. Sachse und K.-H. Engel. (1999): The effect of ensiling on PCR-based detection of genetically modified Bt maize. European Food Research and Technology 209: 301-304.

International Service for the acquisition of agri-biotech applications SEAsia Center and CAB International: Crop Biotech Update Special Edition 14 January 2004. Global Status of Commercialized Transgenic Crops 2003. <http://www.biotechknowledge.com>

International Rules for Seed Testing. (2004): The International Seed Testing Association (ISTA). Schweiz.

James, C. (2005): Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2005. ISAAA Briefs 34.

Jennings, J.C., L.D. Albee, D.C. Kolwyck, J.B. Suber, M.L. Taylor, G.F. Hartnell, R.P. Lirette und K.C. Glenn. (2003): Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA

and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard Corn borer corn. Poultry Science 82: 371-380.

Klotz, A. und R. Einspanier. (1998): Nachweis von "Novel-Feed" im Tier? Beeinträchtigung des Verbrauchers von Fleisch oder Milch ist nicht zu erwarten. Mais 3: 109-111.

Klotz, A., J. Meyer und R. Einspanier. (2002): Degradation and possible carry over effects of feed DNA monitored in pigs and poultry. European Food Research and Technology 214: 271-275.

Klotz, S.I. Kühn und W. Dukra. (2002): BIOFLOR – Eine Datenbank mit biologisch-ökologischen Merkmalen zur Flora von Deutschland. BfN-Schriftenvertrieb im Landwirtschaftsverlag, Münster. 334 S.

Knight, J. (1995): Managing Montana farm habitat for pheasants. Montguide Land Resource Management E-1.

Lütke-Entrup, N. und J. Oehmichen. (2000 a): Lehrbuch des Pflanzenbaues, Band 1: Grundlagen. Verlag Th. Mann Gelsenkirchen. 816 S.

Lütke-Entrup, N. und J. Oehmichen. (2000 b): Lehrbuch des Pflanzenbaues, Band 2: Kulturpflanzen. Verlag Th. Mann Gelsenkirchen. 272 S.

Lutz, B., S. Wiedemann und C. Albrecht (2006). Degradation of transgenic Cry1Ab DNA and protein in maize during the ensiling process. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 90: 116-123.

Lutz, B., S. Wiedemann, R. Einspanier, J. Mayer und C. Albrecht. (2005 a): Degradation of Cry1Ab-protein from genetically modified maize in the bovine gastrointestinal tract. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:1453-1456.

Lutz, B., C. Albrecht, R. Kühn, O. Rottmann, B. Killermann, R. Einspanier, H.D.D. Meyer: Fate of transgenic maize and rapeseed in non-targeting wildlife: Intake, degradation of DNA and protein, and endozoochory by wild pigs (*Sus scrofa*) and pheasants (*Phasianus colchicus*). Wildlife Biology (eingereicht; 2005 b)

- Mackin, R. (1970): Dynamics of damage caused by wild boar to different agricultural crops. *Acta Theriologica* 15: 447-458.
- Matsuoka, T., H. Kuribara, K. Takubo, H. Akiyama, H. Miura, Y. Goda, Y. Kusakabe, K. Isskiki, M. Toyoda und A. Hino. (2002): Detection of Recombinant DNA Segments Introduced to Genetically Modified Maize (*Zea mays*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2100 – 2109.
- Mc Allan, A.B. (1980): The degradation of nucleic acids in, and the removal of breakdown products from the small intestines of steers. *British Journal of Nutrition* 44: 99-112.
- Mc Allan, A.B. (1982): The fate of nucleic acids in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* 41: 309-317.
- Owen, R.L. (1999): Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches--a personal and historical perspective. *Seminars in Immunology*. Jun;11(3):157-63. Review.
- Pekrun, C.P., J.W. Lutman und K. Baeumer. (1998): Research on volunteer rape. A review. *Pflanzenbauwissenschaften* 2: 84-90.
- Phipps, R.H., E.R. Deaville und B.C. Maddison. (2003): Detection of transgenic and endogenous plant DNA in rumen fluid, duodenal digesta, milk, blood and feces of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86: 4070-4078.
- Razzaque M.A., J.H. Topps, R.N. Kay und J.M. Brockway.(1981): Metabolism of the nucleic acids of rumen bacteria by preruminant and ruminant lambs. *British Journal of Nutrition*: 45(3):517-27.
- Ramsay, G., C.E. Thompson, S.J. Neilson und G. Mackay. (1999): Honeybees as vectors of GM oilseed rape pollen. 1999 BCPC Symposium Proceedings No 72. *Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops*: 209-214.
- Renard, M., J.H. Louter, und L.H. Duke. (1993): Oilseed Rape. In: *Traditional crop breeding practices: An historical review to serve as a baseline for assessing the role of modern biotechnology*. OECD Paris, 147-157.

Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC Official Journal L 268 18/10/2003: 24-28.

Reinwald, G. (1993): Atlas der Verbreitung und der Häufigkeit der Brutvögel Deutschlands – Kartierung um 1985. In Schriftenreihe des Dachverbandes Deutscher Avifaunisten 12.

Reuter, T. und K. Aulrich. (2003): Investigations on genetically modified maize (Bt-maize) in pig nutrition: Fate of feed-ingested foreign DNA in pig bodies. European Food Research and Technology 216: 185-192.

Schley, L. und T.J. Roper. (2003): Diet of wild boar *Sus scrofa* in Western Europe, with particular reference to consumption of agricultural crops. Mammal Review 33: 43-56.

Schmidt, M., J. Ewald, A. Fischer, G. v. Oheimb, W.-U. Kriebitzsch, H. Ellenberg und W. Schmidt. (2003): Liste der in Deutschland typischen Waldgefäßpflanzen. Mitteilung der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft 212.

Schubbert, R., C.M. Lettmann und W. Doerfler. (1994): Ingested foreign DNA persists in the gastrointestinal tract and enters the blood-stream of mice. Molecular and General Genetics 242: 495-504.

Schubbert, R., D. Renz, B. Schmitz und W. Doerfler. (1997): Foreign (M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. Proceedings of the National Academy of Science USA 94: 961-966.

Schubbert, R., U. Hohlweg, D. Renz, und W. Doerfler. (1998): On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transfer to the fetus. Molecular Gen. Genet. 259(6) 569-576

Schuler, T.H., G.M. Poppy, B. Kerry und I. Denholm. (1998): Insect-resistant transgenic plants. Trend in Biotechnology 16, 168-175.

Siebers A. und B.B. Finlay (1996): M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. Trends in Microbiology. 1996 Jan;4(1):22-9. Review.

Squire, G.R., N. Augustin, J. Bown, J.C. Crawford, G. Dunlop, J. Graham, J.R. Hillman, B. Marshall, D. Marshall, G. Ramsay, D.J. Robinson, J. Russell, C. Thompson und G. Wright. (1999): Gene flow in the environment: genetic pollution? SCRI Annual Report 1998/1999: 45-54.

Studer, E., I. Dahinden, J. Lüthy und P. Hübner. (1997): Detection of the genetically engineered Maximizer-maize using the p3polymerase chain reaction (PCR). Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 88, 515-524.

Weber, T.E., B.T. Richert, D.C. Kendall, K.A. Bowers und C.T. Herr. (2000): Grower-Finisher performance and carcass characteristics of pigs fed genetically modified "Bt" corn. Purdue University 2000 Swine Day Report. 5 S.

Wiedemann, S., B. Lutz, H. Kurtz, F. Schwarz und C. Albrecht (2006). *In situ* study on the time-dependent degradation of recombinant maize DNA und protein in the bovine rumen. Journal of Animal Science 84: 135-144.

Zscheischler, J., M.C. Estler, W. Staudacher, F. Gross, G. Burgstaller, H. Stryl und T. Rechmann. (1990): Handbuch Mais – Umweltgerechter Anbau, Wirtschaftliche Verwertung. Frankfurt, Verlagsunion Agrar, DLG-Verlags-GmbH. 320 S.

Zwahlen, C., A. Hilbeck, P. Gugerli und W. Nentwig. (2003): Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the fields. Molecular Ecology 12: 765-775.