

*Kalottenmodell eines Immunglobulin-Moleküls
Grafik: Ute Schneider*

Ernährung und Gesundheit

Gentechnik und Lebensmittelallergie

Gerald Reese
Stefan Vieths
Wolf-Meinhard Becker

Der Einsatz gentechnischer Verfahren bei der Produktion von Nutzpflanzen und Lebensmitteln wird von Verbrauchern – vor allem solchen, die unter Allergien leiden – oft als Risiko wahrgenommen. In diesem Beitrag werden die Risiken, aber auch die Chancen diskutiert, die sich aus der Anwendung dieser Methoden ergeben. Im Mittelpunkt stehen die Bewertung des allergologischen Risikos von gentechnisch veränderten Lebensmitteln, der Einsatz gentechnischer Verfahren zur Verbesserung der Diagnostik und Therapie von Lebensmittelallergien und die Herstellung von neuartigen Therapeutika und Nahrungsmitteln mit reduziertem allergenem Potenzial.

Ernährung und Gesundheit

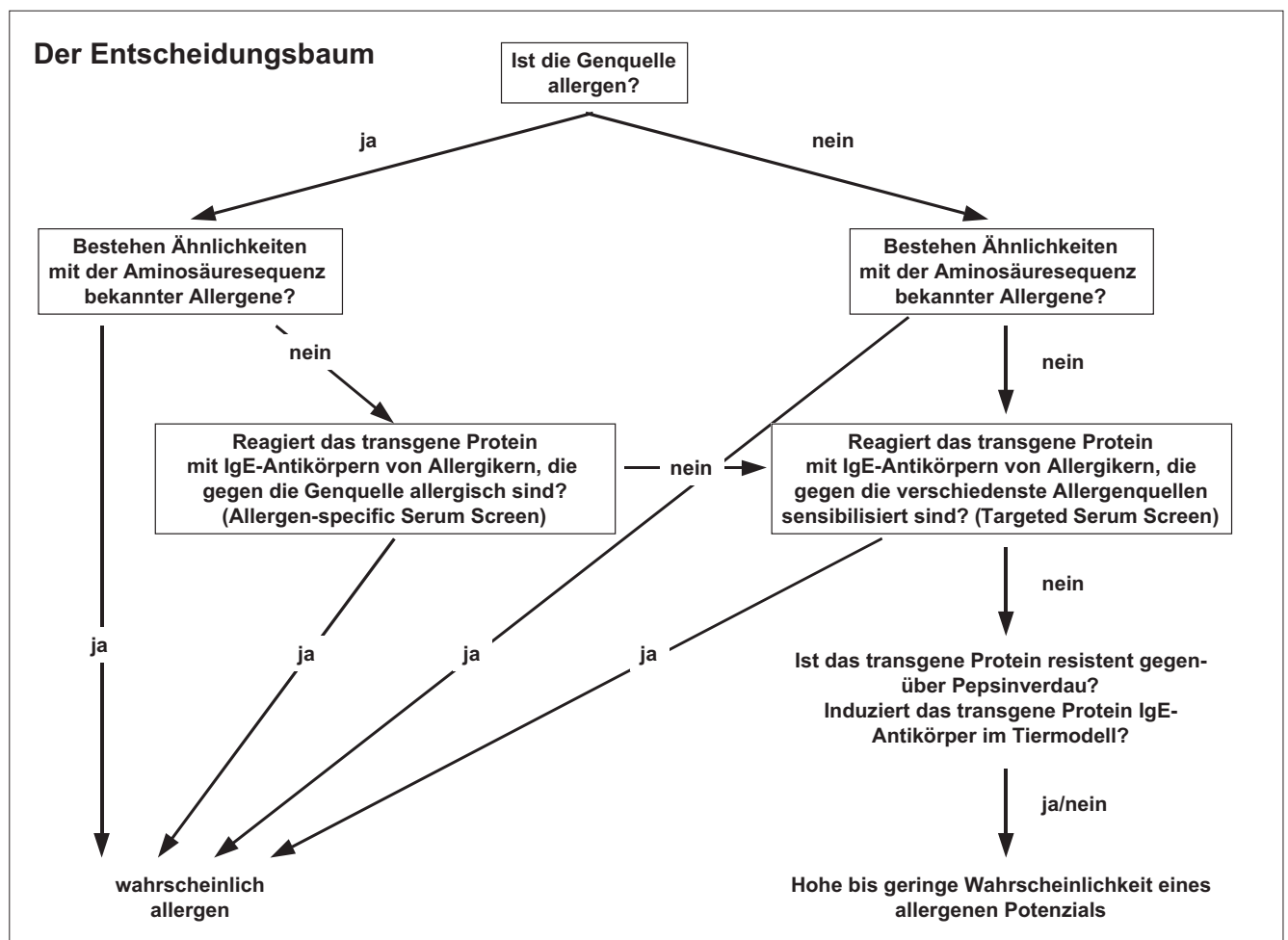
Die Einführung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in die Lebensmittelproduktion hat in der Öffentlichkeit die Diskussion entfacht, ob genmodifizierte Lebensmittel („Genfood“) die Gesundheit der Konsumenten gefährden können. So wird vor allem die Befürchtung geäußert, dass auf GVO basierende Lebensmittel die Entstehung neuer oder zusätzlicher Allergien fördern. Mit der Entwicklung und Veröffentlichung eines Entscheidungsbaums zur Allergieabschät-

zung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln im Jahr 1996 wurde diese Thematik in Fachkreisen zur Diskussion gestellt.

Ein bekanntes Beispiel für transgene Nahrungspflanzen sind Sojabohnen. Da diese von Natur aus nur geringe Mengen an Methionin enthalten – eine essenzielle Aminosäure, die mit der Nahrung aufgenommen werden muss –, wurden auch transgene Pflanzen mit erhöhtem Methioningehalt hergestellt. Diese transgenen Sojabohnen exprimierten das Methioninreiche 2S-Albumin der Paranuss. Die immunologische Charakterisierung dieser Sojabohnen mit Seren von Paranussallergikern ergab jedoch, dass es sich bei dem transgenen Protein um ein potentes Allergen handelte, das seine Allergenität auch im Umfeld einer anderen Pflanze – in diesem Fall die Sojabohne – nicht verliert. Diese trans-

genen Sojabohnen wurden daher nicht vermarktet. Für die einen war diese Episode das Wahrwerden schlimmster Befürchtungen und für die anderen der Beweis, dass die Kriterien, wie sie im Entscheidungsbaum für die Bewertung der allergenen Potenz von transgenen Lebensmitteln verwendet werden, den Konsumenten vor einem allergenen Risiko schützen können.

Bedeutet dies also, dass mithilfe des Entscheidungsbaums von 1996 und seiner modifizierten Version von 2001 die Allergenität von Proteinen im Allgemeinen und von solchen, die gentechnisch in traditionelle Nahrungsmittel eingeführt werden sollen, vorhergesagt werden kann? Ist also eine definitive Antwort auf die von Kjell Aas 1978 formulierte Frage „What makes an allergen an allergen?“ möglich? Die Antwort auf beide Fragen ist auch heute noch ein klares Nein. Nach-



Modifizierter Entscheidungsbaum der WHO Expertenrunde Rom, 2001
(verändert nach www.biotech-info.net/allergenicity_report.pdf).

folgend werden die pathophysiologischen Grundlagen von Lebensmittelallergien kurz erläutert und der Entscheidungsbaum kritisch gewürdigt.

Die Typ-1-Allergie

Allergische Erkrankungen beruhen im Wesentlichen auf vier pathologischen Mechanismen. Im Folgenden wird nur auf die durch IgE-Antikörper vermittelte Allergie vom Soforttyp – die sogenannte Typ-1-Allergie – eingegangen, da sie für die meisten Lebensmittelallergien wie zum Beispiel Erdnuss- oder Haselnussallergie verantwortlich ist.

Die Typ-1-Allergie ist eine Erkrankung des Immunsystems, bei der sich die fehlgeleitete Abwehrreaktion gegen ein harmloses Antigen – zum Beispiel ein Protein – richtet, das von den meisten Menschen toleriert wird. Nach der Sensibilisierung kommt es bei erneutem Kontakt mit diesem nun als *Allergen* bezeichneten Antigen zur Freisetzung von Boten- und Wirkstoffen wie Histamin, die dann für die allergischen Symptome verantwortlich sind. Die Antigene der Typ-1-Allergie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, Antikörper der Klasse E (Immunglobulin E oder IgE) zu induzieren oder spezifisch zu binden. Diese IgE-Reaktivität ist für die allergene Wirkung eines Antigens eine notwendige, aber keine hinreichende Bedingung, da Antigene erst dann funktionell als Allergene agieren, wenn sie zellständiges IgE auf Basophilen und Mastzellen – das sind spezialisierte Zellen des Immunsystems – vernetzen können und eine Freisetzung von Mediatoren induzieren. Hieraus leitet sich ab, dass Allergene mindestens zwei Bindungsstellen für IgE-Antikörper besitzen müssen, da sonst keine Vernetzung stattfinden kann.

Um das Problem eines zusätzlichen Allergierisikos durch Lebensmittel, die auf gentechnisch veränderten Organismen basieren, richtig abschätzen oder vorhersagen zu können, muss der Begriff „Allergierisiko“ definiert werden, da er *per se* nicht eindeutig ist. Für eine klare Argumentation muss zwischen po-

tenziellem Allergierisiko (englisch: *hazard*) und Risikobeurteilung (englisch: *risk*) unterschieden werden. Hier geht es um die Vorhersage des potenziellen Allergierisikos.

Die Bewertung der potenziellen Allergenität gentechnisch veränderter Lebensmittel konzentriert sich grundsätzlich auf (1) den Spenderorganismus als Quelle des eingebrachten Gens, (2) Vergleiche des neuen Proteins mit bekannten Allergenen und (3) IgE-Reaktivitäten mit Seren von Allergikern. Resistenz gegenüber dem Verdauungsenzym Pepsin oder die Induktion von IgE-Antikörpern in Tieren können als weitere Parameter zur Bewertung der allergenen Potenz herangezogen werden.

Der Entscheidungsbaum – eine kritische Analyse

Zunächst wird geprüft, ob das Strukturgen, das zur Produktion eines neuen oder veränderten Proteins in eine Pflanze eingeführt werden soll, einer bereits bekannten Allergenquelle – etwa der Paranuss – entstammt. Danach richtet sich die weitere Vorgehensweise. Ist der Spenderorganismus eine bekannte Allergenquelle, so werden die Sequenzen verglichen und, falls das Protein noch nicht als Allergen beschrieben ist, mit Seren von Personen, die gegen den Spenderorganismus allergisch sind, auf seine IgE-bindenden Eigenschaften untersucht. Für Hersteller transgener Organismen stellt eine allergene Genquelle ein Ausschlusskriterium dar, so dass dieser „einfache“ Fall in der Praxis nur selten vorkommt.

Vergleich der Aminosäuresequenzen

Auf Grund von Sequenzähnlichkeiten mit bekannten Allergenen hofft man auf die mögliche Allergenität des fraglichen Proteins schließen zu können. Sind diese groß, kann zumindest eine partielle strukturelle und immunologische Ähnlichkeit vermutet werden. Antikörper erkennen ein Protein jedoch nicht als

ganzes, sondern immer nur Teilbereiche davon. Diese als Epitope bezeichnete Bindungsstellen sind quasi die Schnittstellen von Antigenstruktur und Immunsystem und in der Regel räumlich im Protein verteilt. Für die Allergenität eines Proteins sind die IgE-bindenden Epitope verantwortlich, die sich aus sechs bis etwa zwanzig Aminosäureresten zusammensetzen. Die Aminosäurereste müssen nicht unbedingt linear aufeinander folgen wie bei den so genannten kontinuier-



Hauttests liefern wichtige Hinweise auf Nahrungsmittelallergien.

Foto: Alk-Scherax

lichen Epitopen, sondern können voneinander getrennt in der Proteinsequenz lokalisiert sein (diskontinuierliche Epitope). Schließlich nehmen auch kürzere Sequenzabschnitte im Gesamtprotein eine definierte räumliche Struktur ein, die bei der Beurteilung der Reaktivität kontinuierlicher Epitope berücksichtigt werden muss. Obwohl von Antikörpern erkannte Epitope mehrheitlich diskontinuierlich zu sein scheinen, können auch kurze Peptide einiger Allergene eine starke IgE-Antikörperbindung besitzen, so dass zumindest in diesen Fällen das Peptid eine identische oder ähnliche Konformation aufzuweisen scheint wie im Gesamtprotein.

Hinsichtlich der Bewertung allergologisch unbekannter Proteine ergibt sich hieraus ein Dilemma: Beim Vergleich von Aminosäuresequenzen werden diskontinuierliche Epitope und solche, die auf eine natürliche Konformation des Gesamt-

Ernährung und Gesundheit

proteins angewiesen sind, nicht erfasst. Gleiches gilt auch für allergene Strukturen, die durch posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel durch Anheftung von Zuckermolekülen (Glykosilierung), gebildet werden. Bestimmte Untergruppen von Allergikern produzieren allergenspezifische IgE-Antikörper, die an so genannte kreuzreagierende Kohlenhydrat-Determinanten binden. Solche potenziell allergenen Epitope können durch Sequenzvergleiche nicht identifiziert werden.

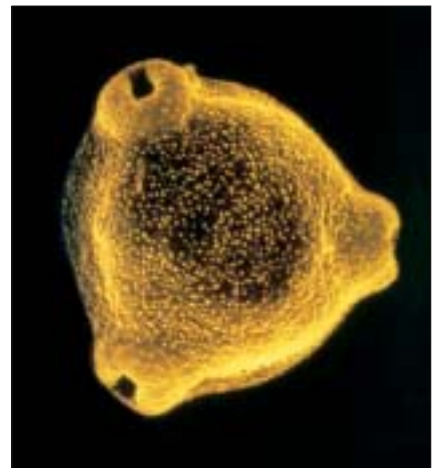
Beim ursprünglichen Entscheidungsbaum aus dem Jahr 1996 wurde eine Sequenzübereinstimmung von acht aufeinander folgenden identischen Aminosäuren im Vergleich mit einem bekannten Allergen als Hinweis für eine mögliche allergene Aktivität angesehen. Allerdings wurden mittlerweile auch IgE-reaktive Epitope beschrieben, die nur aus vier (Parvalbumin, Hauptallergen des Kabeljaus) beziehungsweise sechs aufeinander folgenden Aminosäuren (Erdnussallergen Ara h 2) bestehen. Für den modifizierten Entscheidungsbaum von 2001 wurden daher folgende Kriterien für eine positive Sequenzübereinstimmung mit bekannten Allergenen formuliert: Sequenzidentität von mehr als 35 Prozent über einem Bereich von 80 Aminosäuren Länge – hierdurch könnten indirekt auch Konformationsepitope berücksichtigt werden – und/oder sechs aufeinander folgende identische Aminosäuren. Mit dieser Strategie werden somit die kürzesten beschriebenen sequenziellen IgE-Epitope noch erfasst. Dieser Vorschlag wird von der Industrie jedoch als nicht praktikabel kritisiert, da er zu vielen falsch positiven Ergebnissen führt. Kürzlich wurde aber ein Weg gefunden, falsch positive Ergebnisse durch computer-

gestützte Verfahren zur Epitopvorhersage zu minimieren. Außerdem wurde eine neue Strategie zur Vorhersage der allergenen Potenz von Proteinen veröffentlicht, die auf dem Vergleich mit und der Identifizierung von allergenen Motiven basiert. Diese Strategie ist aber noch nicht allgemein anerkannt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die modifizierten Kriterien zur Identifizierung struktureller Ähnlichkeiten allergologisch unbekannter Proteine mit bekannten Allergenen nur eine Annäherung an die Lösung des Problems ermöglichen. Die räumliche Struktur kann nur begrenzt und bestimmte Aminosäurepositionen, die für die Bindung von IgE-Antikörpern kritisch sind, können faktisch nicht berücksichtigt werden. Dies liegt auch darin begründet, dass für viele bekannte Allergene keine umfassenden Informationen über IgE-bindende Epitope verfügbar sind. Ferner haben Substitutionsanalysen gezeigt, dass einzelne Aminosäureaustausche die Bindungseigenschaften von Epitopen in nicht vorhersehbarer Weise verstärken können. Dies macht das grundsätzliche Dilemma der Sequenzanalyse im Rahmen der Allergenitätsbewertung unbekannter Proteine deutlich: Es können nur Hinweise auf ein Allergenitätsrisiko erhalten werden. Wird keine Sequenzähnlichkeit mit bekannten Allergenen nachgewiesen, so kann ein Allergierisiko – schon wegen der Komplexität und Individualität des Immunsystems – trotzdem nie völlig ausgeschlossen werden.

Screening auf reaktive IgE-Antikörper

Stammt das fragliche Protein aus einer bekannten Allergenquelle, besitzt aber keine Sequenzähnlichkeit mit bekannten Allergenen, wird es mit Seren von Patienten, die auf die entsprechende Allergenquelle sensibel reagieren, auf IgE-Antikörperreaktivität untersucht (*Allergen-specific Serum Screen*). Wenn hingegen das fragliche Protein aus einem nicht allergenen Spenderorganismus stammt und auch keine Sequenz-



Gefürchtet bei Allergikern: Birkenpollen im Flug (oben) und stark vergrößert (unten). Fotos: Alk-Scherax

ähnlichkeit mit bekannten Allergenen vorhanden ist, wird ein sogenannter *Targeted Serum Screen* mit Seren von Allergikern durchgeführt, die gegen die verschiedenartigsten Allergene sensibilisiert sind.

Die fraglichen Proteine mit einer Sammlung von Allergikerseren auf IgE-Reaktivität zu testen, ist prinzipiell eine gute Idee. Zur Zeit gibt es jedoch keine allgemein zugänglichen Serumbanken, die über eine umfassende Sammlung von Allergikerseren verfügen. Mit zunehmendem Wissen über die Häufigkeit von bestimmten Allergien stellt sich auch die Frage, wie viele Allergikerseren in einem Serum Screen getestet werden müssen. Bei der Haselnussallergie ist zum Beispiel bekannt, dass nur etwa 1,6 Prozent aller Haselnussallergiker mit schweren Symptomen auf ein bestimmtes Allergen der Haselnuss reagieren. Wollte man also mindestens

fünf dieser Allergikersonen in einem Serum Screen verwenden, müssten mindestens 314 Seren untersucht werden. Außerdem zeigen neuere Studien, dass das Allergenspektrum regional unterschiedlich ist, das heißt, dass bestimmte Allergenmoleküle in verschiedenen Regionen der Welt unterschiedlich häufig von IgE-Antikörpern der Allergiker erkannt werden und dass auch der Schweregrad der Symptome bei Allergien gegen ein bestimmtes Lebensmittel regional unterschiedlich sein kann.

Resistenz gegen Verdauung mit künstlichem Magensaft

Dieser Ansatz geht von der Hypothese aus, dass die Sensibilisierung gegen Lebensmittel über den Magen-Darmtrakt erfolgt und die Stabilität einzelner Proteine gegenüber Verdauungsenzymen eine Voraussetzung ist, um eine Immunantwort hervorzurufen, da das intakte Allergen oder ein größeres Bruchstück davon das immunkompetente Gewebe der Darmschleimhaut erreichen muss. Dies trifft wahrscheinlich für die „klassischen“ Lebens-

mittelallergene wie zum Beispiel die Proteine der Erdnuss zu, die primär eine allergische Sensibilisierung induzieren können. Allerdings wird hier eine große Gruppe von Lebensmittelallergenen außer Acht gelassen, die Allergien aufgrund von Sensibilisierungen gegen strukturell ähnliche „kreuzreaktive“ Pollenallergene verursachen. Die Apfelallergie in Zentraleuropa wird zum Beispiel durch IgE-Antikörper gegen das Birkenpollenhauptallergen Bet v 1 verursacht. Die Sensibilisierung wird in diesem Fall nicht durch das Essen eines Apfels über den Verdauungstrakt, sondern durch direkten Kontakt der Birkenpollenproteine mit den Immunzellen des Respirationstraktes ausgelöst. Diese Pollenallergene und ihre Gegenstücke in Lebensmitteln sind häufig nicht besonders stabil, so dass transgene Proteine, die mit solchen Pollenallergenen verwandt sind, vermutlich auch keine hohe Resistenz gegenüber Verdauungsenzymen (Proteasen) aufweisen werden. Zu solchen Tests ist auch anzumerken, dass sie mit Reinsubstanzen durchgeführt werden. Interaktionen mit der Lebensmittelmatrix und die Individualität des Verdauungsprozesses werden ignoriert und die

Bildung immunologisch aktiver Fragmente nicht berücksichtigt. Es kann also bei fehlender Resistenz gegen Verdauungsenzyme ein mögliches Allergierisiko nicht ausgeschlossen werden.

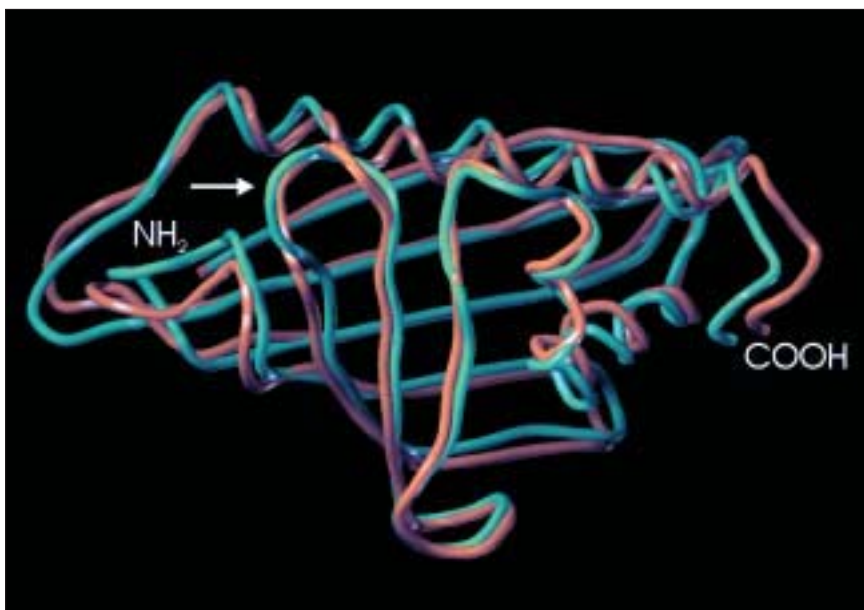
Tiermodell

Der prinzipielle Vorteil eines Tiermodells zur Beurteilung der Allergenität von transgenen Proteinen ist, dass die Untersuchungen in einem kompletten Immunsystem durchgeführt werden können. Häufig wird ein Ratten-Modellsystem verwendet, dessen Tauglichkeit jedoch noch nicht allgemein anerkannt ist. Zudem besteht der generelle Einwand, dass Ergebnisse aus Tierversuchen nur eingeschränkt auf den Menschen übertragen werden können und daher aus solchen Untersuchungen keine sicheren Vorhersagen über die Allergenität eines transgenen Proteins möglich sind.

Änderung des Allergenspektrums der Wirtspflanze

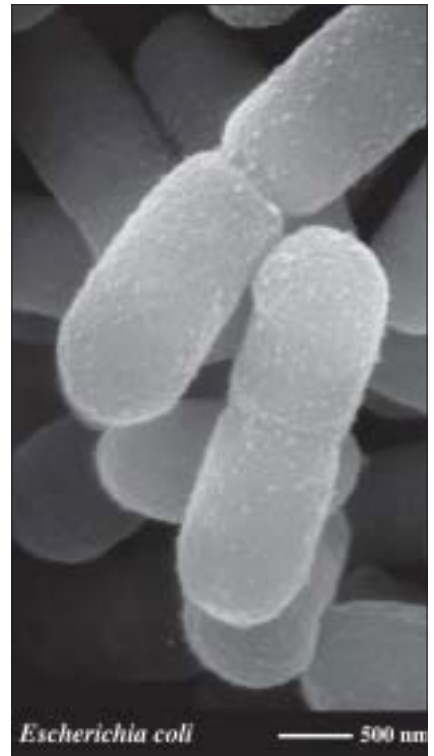
Neben der möglichen Allergenität eines transgenen Proteins besteht die Möglichkeit, dass durch die Integration des neuen Gens die Expression von pflanzeigenen Proteinen verändert wird. Dadurch könnte sich zum Beispiel bei einer transgenen Sojapflanze die Menge der bekannten Allergene erhöhen. In den bisher durchgeführten Studien wurde ein solcher Effekt jedoch noch nicht beobachtet. Ferner ist denkbar, dass Proteine, die im Wildtyp in nur geringer Menge vorkommen, in der transgenen Pflanze in so hohen Mengen produziert werden, dass im Laufe der Zeit diese „natürlichen“ Proteine die Ursache für neue Allergien sein könnten. Auch dieser Fall ist jedoch bis heute nicht beschrieben worden. Sehr umfangreiche Studien wären nötig, um eine durch ein Fremdgen verursachte Änderung der Proteinexpression von der natürlichen Variabilität der Proteinsynthese in den verschiedenen Nutzpflanzen sicher differenzieren zu können.

Überlagerte dreidimensionale Strukturen des Birkenpollenallergens Bet v 1 (rot) und des homologen Allergens der Kirsche Pru av 1 (blaugrün). Die Allergie gegen Kirsche wird in diesem Fall durch kreuzreagierende Antikörper verursacht, die gegen das Birkenpollenallergen gerichtet sind. Die Symptome entstehen an der Mundschleimhaut direkt nach dem Verzehr des Lebensmittels.



***E. coli*-Bakterium unter dem Mikroskop: Neben anderen Organismen dienen *E. coli* als Produzenten rekombinanter Allergene für Diagnose und Therapie von Lebensmittelallergien.**

Foto: G. Wanner

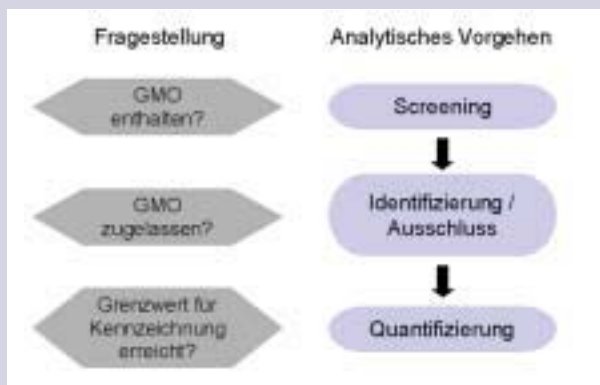


Neue Ansätze zur Diagnostik und Therapie von Lebensmittelallergien

Molekularbiologische Methoden können auch zur Verbesserung der Diagnostik und Therapie von Lebensmittelallergien eingesetzt werden. In der biomedizinischen Forschung werden Allergene seit mehr als zehn Jahren gentechnisch in *E. coli* und anderen Organismen hergestellt. In Zukunft werden sie möglicherweise die rohen natür-

lichen Allergenextrakte, die unvermeidlich auch nicht allergene Proteine und andere Begleitstoffe enthalten, in der Diagnostik und der Immuntherapie der Typ-1-Allergie weitgehend ersetzen können. In Studien zur Verbesserung der *in vitro* Diagnostik werden zunehmend rekombinante Einzelallergene zur Beurteilung des Sensibilisierungsmusters eingesetzt. Dieses als „*Component-resolved Diagnosis*“ bezeichnete Verfahren zeigt gegenüber der Verwendung von Allergenextrakten eine deutlich höhere Sensitivität und Spezifität. Auch bie-

Nachweis von transgenen Pflanzen – Claudia Harms



Strategie zum Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen.

Gentechnisch veränderte Organismen (GVO) oder Bestandteile davon können in Lebens- und Futtermitteln, in Rohstoffen oder in Saatgut durch verschiedene molekularbiologische Methoden nachgewiesen werden. Am besten bewährt hat sich der Nachweis auf Ebene der DNA, da diese nahezu unabhängig vom Verarbeitungsgrad der Probe analysiert werden kann. Proteine hingegen denaturieren während der Verarbeitung in zunehmendem Maße und lassen sich oft nicht mehr eindeutig identifizieren.

Bei der Isolierung der Erbsubstanz aus pflanzlichem Material wird eine für das jeweilige Probenmaterial optimierte Extraktionsmethode verwendet und so gewährleistet, dass ausreichende DNA-Mengen zur Ver-

fügung stehen. Mit der isolierten DNA können dann durch verschiedene *in vitro* Amplifikationsmethoden qualitative und quantitative Bestimmungen durchgeführt werden. Grundlegende Methode für alle Arten der DNA-Amplifikation ist die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

Screening und Identifizierung

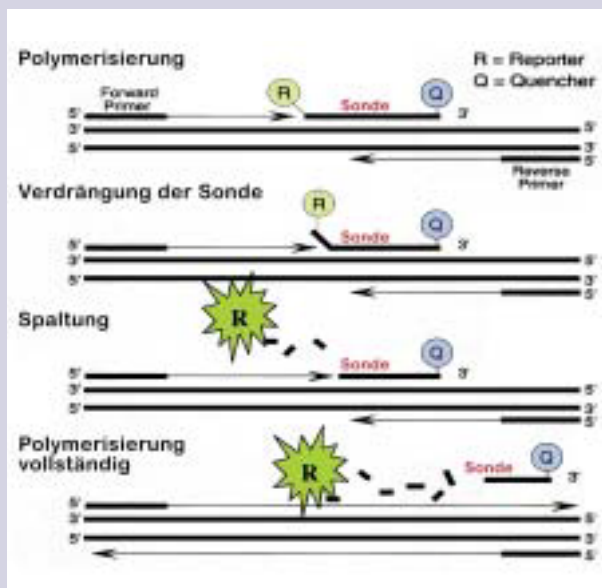
Qualitative PCR-Tests ermöglichen eine Ja-/Nein-Aussage über das Vorhandensein von GVO, wobei sich Screening-Analysen besonders für Proben unbekannter Zusammensetzung eignen. Es wird auf DNA-Sequenzen getestet, die typischerweise in gentechnisch modifizierte Pflanzen eingebracht werden. Zu nennen sind hier insbesondere der Promotor 35S aus dem Blumenkohlmosaikvirus und der Terminator NOS aus dem Bodenbakterium *A. tumefaciens*. Diese Sequenzen dienen als Regulationselemente – als „Ein“- beziehungsweise „Aus“-Schalter. So ist mithilfe dieser beiden Regulatorsequenzen der Nachweis sehr vieler verschiedener GVO-Pflanzen wie zum Beispiel gentechnisch veränderte Soja-, Mais-, Raps-, Kartoffel-, Kürbis-, Tomate-, Papaya-, Tabak- und Radicchiosorten möglich.

Im Gegensatz zu Screening-Verfahren werden bei der Identifizierung von gentechnisch veränderten Organismen nicht die allgemeinen Regulatorsequenzen nachgewiesen, sondern Modifikations-spezifische beziehungsweise Event-spezifische Sequenzen. Event-spezifische Tests haben die höchste Spezifität, da sie den Übergang eines künstlich in die Pflanze eingebrachten

Nachweis von transgenen Pflanzen (Fortsetzung)

Genkonstrukts in die natürlicherweise vorhandene genomische Pflanzen-DNA nachweisen. Im Gegensatz dazu sind Modifikations-spezifische Tests für eine bestimmte gentechnische Modifikation spezifisch; sie können diese Modifikation aber nicht nur in einer, sondern in mehreren Pflanzensorten nachweisen. So ist zum Beispiel der Nachweis für LibertyLink sowohl bei LibertyLink™-Mais als auch bei LibertyLink™-Raps möglich.

Sowohl bei Screening- als auch bei Identifizierungsverfahren kann die amplifizierte DNA nach elektrophoretischer Größentrennung in einem Gel sichtbar gemacht werden. Der Vergleich mit einer Kontroll-DNA



Prinzip der quantitativen real-time PCR: Bei dieser Technik wird die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase genutzt, die während der PCR-Amplifikation Oligonukleotide, die „den Weg versperren“, abbaut. Es wird eine Oligonukleotid-Sonde verwendet, die an einen Sequenzabschnitt zwischen den beiden Amplifikationsprimern binden kann und besondere Eigenschaften besitzt: Sie enthält zwei kovalent gebundene Farbstoffe, ein Fluorochrom („Reporter“, R) und einen sogenannten „Quencher“ (Q). Bei Bestrahlung der intakten Sonde mit kurzwelligem Licht wird die Fluoreszenz-Emission des Reporter-Farbstoffes wegen seiner räumlichen Nähe zum Quencher aufgrund von Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt. Kommt es jedoch zum Abbau der Sonde, wird die Verbindung zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und die Fluoreszenz wird nicht mehr unterdrückt. Da die Sonde zur GVO-Sequenz komplementär ist, wird das Signal sequenzspezifisch erzeugt. Die Fluoreszenz des in jedem einzelnen PCR-Zyklus freigesetzten Reporters wird gemessen und dient als Maß für die Akkumulation des spezifischen PCR-Produkts.

Grafik: GeneScan/H. Guldner

zeigt, ob das gesuchte DNA-Fragment in der Pflanzenprobe vorhanden ist.

Quantitative Verfahren

Um feststellen zu können, ob Grenzwerte zur Kennzeichnungspflicht von gentechnisch veränderten Organismen eingehalten wurden, muss eine quantitative Analyse durchgeführt werden.

Beim quantitativen *realtime*-Verfahren bindet eine kurze DNA-Sonde an das PCR-Produkt, die sowohl mit einem *Reporter*- als auch mit einem *Quencher*-Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Durch eine besondere Eigenschaft der Taq-Polymerase wird diese Sonde bei der Amplifikation zerschnitten, so dass Quencher und Reporter räumlich voneinander getrennt werden und ein Fluoreszenzsignal abgegeben wird. Die mit Hilfe einer CCD-Kamera erfasste Fluoreszenzintensität verhält sich der Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen direkt proportional und wird während der PCR direkt im Reaktionsgefäß gemessen. Aus Material mit bekannten Konzentrationen, zum Beispiel Spezies-spezifischer DNA, werden Kalibrierungskurven erstellt. Der prozentuale Anteil an transgenem Material wird über das Verhältnis von GVO-DNA zu Spezies-spezifischer DNA berechnet.

Besonders wichtig bei diesen Methoden ist die Nachweisgrenze. Die Bestimmung und Angabe der Nachweisgrenze muss für jede Probe gesondert vorgenommen werden, da dieser Wert letztlich von der Menge an DNA abhängt, die aus der Probe extrahiert werden konnte. Bei Saatgut und Rohstoffen wie zum Beispiel Mehl kann eine Nachweisgrenze von 0,01 Prozent erreicht werden, wohingegen bei hoch verarbeiteten Proben wie Maisstärke der entsprechende Wert zwischen 0,1–0,3 Prozent oder noch höher liegen kann.

Literaturhinweis:

Pietsch, K. et al.: Screeningverfahren zur Identifizierung gentechnisch veränderter Lebensmittel. *Deutsche Lebensmittelrundschau* 93, Heft 2, 35-39 (1997)



Dr. Claudia Harms leitet die Marketingabteilung der Freiburger Firma GeneScan Analytics



Molekularbiologische Methoden verbessern die Diagnostik von Lebensmittelallergien. Foto: Bernd Müller

tet der Einsatz rekombinanter Allergene die Möglichkeit, Patienten mit einem maßgeschneiderten und exakt standardisierten „Allergencocktail“ zu desensibilisieren und so die Allergie effizienter zu behandeln, als das mit natürlichen Allergenextrakten möglich ist. Gentechnisch lassen sich Allergene mit reduzierter Allergenität und gleichzeitig erhaltener therapeutischer Aktivität herstellen. Mit ihnen kann möglicherweise die Entwicklung einer effizienteren Immuntherapie ohne Nebenwirkungen gelingen. Dies wäre insbesondere bei der Lebensmittelallergie wichtig, für die es bislang noch keine an den Krankheitsursachen angreifende Therapiemethode gibt.

Reduktion der Allergenität

Inzwischen gibt es Ansätze, die „natürliche“ Allergenität von Pflanzen beziehungsweise Pflanzenbestand-

teilen mit gentechnischen Methoden zu reduzieren. Mit der so genannten „Antisense-Strategie“, bei der ein Gen in umgekehrter Anordnung in den Wirtsorganismus kloniert wird, oder durch RNA-Interferenz-Technik kann die Biosynthese von Proteinen – zumindest zum Teil – unterdrückt werden. Die Expression eines Allergens in transgenem Reis konnte so auf 15 Prozent der ursprünglichen Menge reduziert werden.

Allerdings treten bei der Unterdrückung von Allergenen in gentechnisch veränderten Pflanzen zahlreiche Probleme auf. So ist es zum Beispiel kaum möglich, die Expression eines Proteins vollständig zu unterdrücken. Unklar ist auch, wieviel „Rest-Allergen“ für einen Allergiker noch verträglich oder schon gefährlich ist. Ferner enthalten viele Lebensmittel mehrere oder sogar zahlreiche Allergene, die – wenn überhaupt – nur mit immensem Aufwand gleichzeitig unterdrückt werden könnten. Und dann ist noch zu berücksichtigen, dass das oder die Allergene in der Pflanze eine physiologische Funktion haben und die Unterdrückung ihrer Expression Probleme bei der Vitalität dieser „hypoallergen“ Pflanze nach sich ziehen können. Zur Erhaltung der vollen biologischen Funktion solcher Pflanzen müssten die Allergene gegebenenfalls durch homologe, nicht allergene Proteine ersetzt werden. Allerdings besteht dann aber wieder das Risiko einer Neusensibilisierung gegen diese Proteine.

Literaturhinweise:

- Aas, K.: *What makes an allergen an allergen.* *Allergy* 33, 3-14 (1978)
- Becker, W.-M.: *Novel Foods und Allergierisiko.* *Allergo J.* 13, 323-327 (2004)
- Bohle, B., Vieths, S.: *Improving diagnostic tests for food allergy with recombinant allergens.* *Methods* 32, 292-9 (2004)
- Lorenz, A.R., Scheurer, S., Hausteiner, D., Vieths, S.: *Recombinant food allergens.* *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 756, 255-79 (2001)
- Metcalfe, D.D., Astwood, J.D., Townsend, R., Sampson, H.A., Taylor, S.L., Fuchs, R.L.: *Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants.* *Crit. Rev. Food Sci. Nutr., Special Supplement* 36, 165-186. (1996)

Stadler, M.B., Stadler, B.M.: *Allergenicity prediction by protein sequence.* *FASEB J.* 17, 1141-3 (2003)

Stich, O., Pichler, W.J.: *Nahrungsmittelallergien bei Pollensensibilisierungen.* *Allergologie* 16, 288-94 (1996)

Internet:

FAO/WHO (2001). *Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. 22-25 January 2001.* Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
www.fao.org/es/esn/food/risk_biotech_papers_en.stm
oder
www.fao.org/es/ESN/food/pdf/allergygm.pdf

AG BioTech InfoNet Genetic Engineering Applications – Impact and Implications
www.biotech-info.net/allergenicity_report.pdf