

Aus dem Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in
Braunschweig und dem Institut für Ernährungswissenschaften der Landwirtschaftlichen
Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Vergleichende Untersuchungen zur ernährungsphysiologischen Bewertung
von isogenem und transgenem (Bt) Mais und zum Verbleib von „Fremd“-DNA
im Gastrointestinaltrakt und in ausgewählten Organen und Geweben des
Schweines sowie in einem rohen Fleischerzeugnis**

als

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)

vorgelegt von

Dipl. oec. troph. (FH)
Tim Reuter

geboren am 07.06.1970
in Rodewisch

Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. K. Eder
2. Prof. Dr. habil. M. Rodehutschord
3. Prof. Dr. habil. G. Flachowsky

Dekan:

Prof. Dr.-Ing. P. Pickel

Verteidigung am:

27.10.2003

Halle/Saale 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005808

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005808>]

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht und Ableitung der Aufgabenstellung	3
2.1	Gentechnik bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen und deren Einsatz in der Tierernährung	4
2.2	Evaluierung von gentechnisch veränderten Pflanzen	8
2.3	Der Gastrointestinaltrakt als Eintrittspforte für "Fremd"-DNA	11
2.3.1	Aufbau und Funktion des Verdauungstraktes	11
2.3.2	Schicksal von mit der Nahrung aufgenommenen "Fremd"-DNA	12
2.4	Ableitung der Aufgabenstellung	18
2.4.1	Stoffliche Zusammensetzung von isogenen und transgenen Maishybriden und deren ernährungsphysiologische Bewertung	18
2.4.2	Vergleichende Betrachtung der Mastleistung von Schweinen nach der Verfütterung von Futtermischungen mit isogenem und transgenem Mais	19
2.4.3	Schicksal von fremder DNA im Organismus von Schweinen nach oralen Aufnahme	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Beschreibung der isogenen und transgenen Maishybriden	21
3.2	Eingesetzte Futtermittel	21
3.3	Chemisch-analytische Untersuchung der Maishybriden und Futtermischungen	22
3.4	Untersuchungen zur ernährungsphysiologischen Bewertung	23
3.4.1	Versuchstiere, Haltung und Fütterung	23
3.4.2	Verdaulichkeit der Rohnährstoffe	24
3.5	Fütterungsversuch	25
3.5.1	Versuchstiere, Haltung	25
3.5.2	Futtermischungen und Fütterung	26
3.5.3	Schlachtung	26
3.5.3.1	Erfassung von Schlachtdaten und Organmassen	28
3.5.3.2	Probenentnahme während der Schlachtung	28
3.6	Herstellung roher Fleischerzeugnisse	29
3.7	DNA-Analytik	29

3.7.1	DNA-Extraktion	30
3.7.2	Oligonukleotid Primer	30
3.7.3	Polymerase-Kettenreaktion	32
3.7.4	Agarose-Gelelektrophorese	36
3.7.5	Verifizierung der PCR-Produkte	37
3.7.5.1	Restriktionsanalyse	38
3.7.5.2	Southern-Blot Analyse	39
3.7.6	Nachweisgrenze	40
3.8	Statistik	40
4	Ergebnisse und Diskussion	41
4.1	Inhaltsstoffe der Maishybriden	41
4.2	Inhaltsstoffe der Futtermischungen	47
4.3	Vergleichende ernährungsphysiologische Bewertung	49
4.4	Fütterungsversuch	52
4.4.1	Mastleistung	52
4.4.2	Schlachtleistung	54
4.5	DNA-Analytik	56
4.5.1	DNA-Extraktion	56
4.5.2	Polymerase-Kettenreaktion	60
4.5.2.1	Mais und Futtermischungen	61
4.5.2.2	Ingesta	62
4.5.2.3	Organe und Gewebe	67
4.5.2.4	Rohe Fleischerzeugnisse	72
4.5.3	Verifizierung der PCR-Produkte	74
4.5.4	Nachweisgrenze	76
5	Schlussfolgerungen	78
6	Zusammenfassung	79
7	Summary	82
8	Literaturverzeichnis	84
9	Anhang	100

Tabellenverzeichnis		Seite
Tabelle 1	Auflistung von Untersuchungen zum Nachweis von pflanzlichen und transgenen DNA-Bruchstücken sowie von Fragmenten aus Phagen-DNA nach oraler Aufnahme in verschiedenen Organen und Geweben unterschiedlicher Tierspezies	16
Tabelle 2	Zusammensetzung der Futtermischungen für Schweine und deren Gehalt an umsetzbarer Energie (ME)	23
Tabelle 3	Gruppeneinteilung, Lebendmassebereich und Futterzuteilung in den Verdauungsversuchen	24
Tabelle 4	Anzahl der Versuchstiere je Schlachtzeitpunkt [h] nach Fütterung der letzten maishaltigen Diät	27
Tabelle 5	Oligonucleotide Primer	32
Tabelle 6	Ausgewählte Inhaltsstoffe und ME in isogenem und transgenem Mais (Tabellenwerte zum Vergleich, DLG 1991)	42
Tabelle 7	Aminosäuregehalt der isogenen und transgenen Maishybriden	44
Tabelle 8	Ausgewählte Fettsäuren der isogenen und transgenen Maishybriden	44
Tabelle 9	Gehalt an Zearalenon (ZON) und Deoxynivalenol (DON) im verwendeten Mais und deren kritische Konzentration in Futtermischungen für Mastschweine	46
Tabelle 10	Ausgewählte Inhaltsstoffe in Futtermischungen mit isogenem und transgenem Mais und deren Gehalt an ME	47
Tabelle 11	Aminosäuregehalte in den Futtermischungen mit isogenem und transgenem Mais	48
Tabelle 12	Verdaulichkeit der Rohnährstoffe und Gehalt an Umsetzbarer Energie	51
Tabelle 13	Mittlere Futter- und Energieaufnahme, Lebendmassezunahme (LMZ) sowie Futter- und Energieaufwand während einer Mastdauer von 91 Tagen	52
Tabelle 14	Schlachtgewicht, Schlachtkörpergewicht und Organgewichte von Schweinen, gemästet mit Futtermischungen mit isogenem oder transgenem Mais bei einer unterschiedlichen Mastdauer	55

Tabelle 15	Amplifizierbarkeit einzelner Gen-Fragmente in isogenem und transgenem Mais und in den eingesetzten maishaltigen Futtermischungen	62
Tabelle 16	Amplifiziertes DNA-Fragment der gentechnischen Veränderung im Bt-Mais in Ingestaprobe n aus unterschiedlichen Abschnitten des Magendarmtraktes von Schweinen der Bt-Gruppen (n = 6) mit verschiedenen Schlachtzeitpunkten nach der letzten Fütterung einer (Bt) maishaltigen Diät	64
Tabelle 17	Amplifiziertes DNA-Fragment aus dem Rubisco-Gen (140 bp) in unterschiedlichen Organen und Geweben aus den Versuchsgruppen mit verschiedenen Schlachtzeitpunkten nach der letzten Fütterung einer maishaltigen Diät	71

Abbildungsverzeichnis		Seite
Abbildung 1	Anwendungsbereiche der Gentechnik in der Pflanzenproduktion	3
Abbildung 2	Generelles Konzept der Antigen-Aufnahme durch die M-Zellen der Peyerschen Platten nach GEBERT et al. (1996).	17
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Dauer des Mastversuches und der Schlacht-Zeitpunkte nach Fütterung der letzten maishaltigen Diät sowie Dauer der Nüchterung	27
Abbildung 4	Darstellung der im Schlachtprozess gewonnen Ingesta-, Organ- und Gewebeprobe sowie wertvoller Fleischteile	29
Abbildung 5	Schematische Darstellung des Maisgenoms und ein Ausschnitt aus dem zusätzlich eingefügten Genkonstrukt im Bt-Mais sowie die Lage des Primerpaares Cry 03/04	31
Abbildung 6	Prinzip der Polymerasekettenreaktion (modifiziert nach GASSEN und HAMMES 2001)	34
Abbildung 7	Programmierte Temperatur- und Zeitverläufe der angewandten PCR	36
Abbildung 8	Drei Beispiele für Restriktionsschnittstellen (GASSEN und HAMMES 2001)	38
Abbildung 9	Die Entwicklung der mittleren Lebendmasse der Versuchstiere beider Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum, gemessen im Abstand von 7 Tagen	53
Abbildung 10	Extrahierte DNA aus Mais und Futtermischungen (isogen vs. transgen); Banden: M DNA-Größenmarker, 1 und 2 Mais, 3 und 4 Mais mit flüssigem Stickstoff behandelt, 5 und 6 Futtermischung der Anfangsmast, 7 und 8 Futtermischung der Endmast	57
Abbildung 11	Extrahierte DNA aus Ingestaprobe: Banden; M DNA-Größenmarker, 1 und 2 Kontrollgruppe 4 und 8 h, 3 bis 8 Bt-Gruppe 4, 8, 12, 24, 48 und 72 h	58
Abbildung 12	Extrahierte DNA aus Gewebeprobe: Banden; M DNA-Größenmarker, 1 und 2 Kontrollgruppe 4 und 8 h, 3 bis 8 Bt-Gruppe 4, 8, 12, 24, 48 und 72 h	59
Abbildung 13	Amplifizierte Bt-Gen -Fragmente im Darminhalt des Rectums; Banden: M DNA-Größenmarker, 1 Negative Kontrolle, 2 Positive Kontrolle, 3 und 4 Kontrollgruppe 4 und 8 h, 5 bis 10 Bt-Gruppe 4,	

	8, 12, 24, 48 und 72 h	63
Abbildung 14	Amplifizierte Chloroplasten-Gen-Fragmente im Darminhalt des Rectums; Banden: M DNA-Größenmarker, 1 Negative Kontrolle, 2 Positive Kontrolle, 3 und 4 Kontrollgruppe 4 und 8 h, 5 bis 10 Bt-Gruppe 4, 8, 12, 24, 48 und 72 h	65
Abbildung 15	Amplifizierte Rubisco-Gen-Fragmente im Gewebe; Banden: M DNA-Größenmarker, 1 Negative Kontrolle, 2 Positive Kontrolle, 3 und 4 Kontrollgruppe 4 und 8 h, 5 bis 10 Bt-Gruppe 4, 8, 12, 24, 48 und 72 h	70
Abbildung 16	Extrahierte DNA aus Schinkenspeckproben; Banden: M DNA-Größenmarker, 1 Kontrollgruppe 4 h 2 und 3 Kontrollgruppe 8 h, 4 Kontrollgruppe 4 h 5 bis 6 Bt-Gruppe 4 und 8 h, 7 und 8 Bt-Gruppe 12 h, 9 Bt-Gruppe 24 h, 10 bis 12 Bt-Gruppe 48 h	72
Abbildung 17	PCR-Produkte aus der DNA der Schinkenspeckproben; Banden: M DNA-Größenmarker, 1 Kontrollgruppe 4 h 2 und 3 Kontrollgruppe 8 h, 4 Kontrollgruppe 4 h 5 bis 6 Bt-Gruppe 4 und 8 h, 7 und 8 Bt-Gruppe 12 h, 9 Bt-Gruppe 24 h, 10 bis 12 Bt-Gruppe 48 h	73
Abbildung 18	Restriktionsanalyse der amplifizierten Bt-Gen-Fragmente; Banden: M DNA-Größenmarker, 1 bis 8 Ingestaprobe der Bt-Gruppe	74
Abbildung 19	Restriktionsanalyse der amplifizierten Rubisco-Gen-Fragmente; Banden: M DNA-Größenmarker, 1 und 2 Kontrollgruppe 4 und 8 h, 3 bis 8 Bt-Gruppe 4 bis 72 h	75
Abbildung 20	Restriktionsanalyse der amplifizierten Chloroplasten-Gen-Fragmente; Banden: M DNA-Größenmarker, 1 und 2 Kontrollgruppe 4 und 8 h, 3 bis 8 Bt-Gruppe 4 bis 72 h	75
Abbildung 21	Identifizierung spezifischer Rubisco-Gen-Fragmente durch Southern Blot Analyse; Banden: 1 : Blut, 2-4 Muskelproben, 5 Eierstock, 6 Leber, 7 Milz, 8 Niere, 9 Lymphknoten, 10 und 11 Ingestaprobe, 12 Maisprobe, 13 und 14 Futtermittelproben	76

-
- Abbildung 22 Nachweisgrenze der PCR bei der Amplifizierung von Pflanzen-DNA und transgener Mais-DNA in verdünnten Lösungen extrahierter DNA aus einer Mischung von isogenem und transgenem (2%) Mais unter Verwendung der Primer Rub 01/02 (Banden 1 bis 7) und Cry 03/04 (Banden 8 bis 12); Banden: **M**: DNA-Größenmarker, **1 und 8**: 8 ng/μL DNA Matrix, **2 und 9**: 0.8 ng/μL DNA Matrix, **3 und 10**: 0.08 ng/μL DNA Matrix, **4 und 11**: 0.008 ng/μL DNA Matrix, **5**: 0.0008 ng/μL DNA Matrix, **6**: 0.00008 ng/μL DNA Matrix, **7 und 12**: negative Kontrolle ohne DNA-Matrix 77
- Abbildung 23 Position der Primer Plant1 F/R sowie der enzymatischen Schnittstelle beim Restriktionsverdau (*AluI*) im maisspezifischen Fragment aus dem Chloroplasten-Gen 100
- Abbildung 24 Position der Primer Rub 01/02 sowie der enzymatischen Schnittstelle beim Restriktionsverdau (*RsaI*) im Chloroplasten rbcL Gen für Ribulose-bisphosphate-carboxylase im Mais 101

A	Adenin
amplifizieren	exponentielle Vervielfältigung einer DNA-Sequenz mittels Polymerase-Kettenreaktion
bp	Basenpaare
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C	Cytosin
CCW	Masse der kalten Schlachtkörperhälften (24 h p.m.)
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
Degradierung	Mechanismus der Teilung eines DNA-Stranges durch physikalische und/oder chemische Einflüsse
dGTP	Deoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat; umfasst dATP, dCTP, dGTP und dTTP
DON	Deoxynivalenol
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fragment	kleiner Abschnitt eines DNA-Moleküles
FM	Futtermischung
G	Guanin
GALT	gut associated lymphoid tissue
GfE	Gesellschaft für Ernährungsphysiologie
GIT	Magen-Darm-Trakt
GMO	gentechnisch modifizierte Organismen
GVP	gentechnisch veränderte Pflanzen
HCW	Masse der warmen Schlachtkörperhälften (45 min p.m.)
kbp	Kilobasenpaare
LMZ	Lebendmassezunahme
Mbp	Megabasenpaare
ME	umsetzbare Energie (metabolizable Energie)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
NfE	N-freie Extraktstoffe (nitrogen free extractives)

NSP	Nicht-Stärke-Polysaccharide
OD ₂₆₀	optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge
OM	Frischmasse (organic matter)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Primer	Oligonucleotid, das als Startfragment für eine DNA-Synthese dient
Restriktionsenzym	Enzyme, die die Phosphodiester-Bindungen in beiden Strängen eines DNA-Moleküles im Bereich definierter Basensequenzen spalten
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>T</i>	Thymin
T	Trockenmasse
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer; Elektrophoresepuffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
unit	Einheit der Enzymaktivität
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
ZON	Zearalenon

1 EINLEITUNG

Ergebnisse aus der Entwicklung von Wissenschaft und Technologie fließen beständig in die primäre und sekundäre Erzeugung von Lebens- und Futtermitteln ein. Schon frühgeschichtlich begannen Homininen, basierend auf kognitivem Denken und empirisch gewonnenen Informationen, sich interaktiv mit ihrer Umwelt auseinander zu setzen. Der Übergang von der Gesellschaftsform Jäger und Sammler zu Ackerbauern und Viehzüchtern stellte eine bedeutsame Veränderung in der Beschaffung von Nahrungsmitteln dar (LEWIN 1998).

Vor etwa 10.000 Jahren wurde mit der Domestikation wichtiger landwirtschaftlich genutzter Pflanzen begonnen (SMITH 1996; WANG et al. 1999). GOLOUBINOFF et al. (1993) und MATSUOKA et al. (2002) datierten beispielsweise die Domestikation von Maispflanzen in Südamerika zwischen 4.700 und 9.000 Jahren vor unserer Zeit.

Nach 1900 wurden unter Nutzung der Mendelschen Vererbungsregeln immer ertragreichere und ertragssichere Kulturpflanzen mit optimierten Qualitäts- und Verarbeitungseigenschaften gezüchtet (ALLEN 2000; ROLL-HANSEN 2000). Besonders beim Mais wurde festgestellt, dass die Kreuzung von Inzuchtlinien, die durch Selbstbefruchtung entstanden, zu besonders starkwüchsigen und ertragreichen Hybriden führt. Später wurde von Pflanzenzüchtern energiereiche Strahlung zur Mutation von Kulturpflanzen eingesetzt (BROCK 1976; POEHLMAN 1979). Seit 1970 wurden mehr als 1.800 verschiedene Pflanzen selektiert und gezüchtet, deren genomische DNA durch Einwirkung von Gammastrahlung aus radioaktiven Kobaltisotopen (Co^{60}) unspezifisch mutierte (HARLANDER 2002).

Mit biotechnologischen Methoden wurden 1971 die ersten gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) erzeugt. Weltweit wurden in den Jahren 1986 bis 1996 insgesamt 3.647 Feldversuche mit transgenen Kulturpflanzen durchgeführt (JAMES und KRATTIGER 1996). In den Jahren 1996 bis 2002 wurden auf insgesamt 235 Millionen Hektar in 16 Ländern gentechnisch veränderte Pflanzen (GVP) angebaut. Dabei betrug der Anbauumfang im Jahr 2002 58,7 Millionen Hektar (JAMES 2002).

Die beiden dominierenden Pflanzen waren im Jahr 2002 gentechnisch veränderte Sojabohnen mit einer Anbaufläche von 36,5 Millionen ha (ca. 62 % der gesamten Anbaufläche) und GV Mais mit 12,4 Millionen ha (ca. 21 %) (JAMES 2002).

Der Anteil der kultivierten Pflanzen im Vergleichsjahr, die mit einem synthetisierten Gen aus dem Bakterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) modifiziert waren, betrug insgesamt 10,1 Millionen ha. Davon entfielen 7,6 Millionen ha auf Bt-Mais, was ca. 5,4 % der weltweit landwirtschaftlich genutzten Anbaufläche für Mais von 140 Million ha darstellt (JAMES 2002).

Die ansteigende Anbaufläche von gentechnisch veränderten Pflanzen ist gleichzeitig verbunden mit einer zunehmenden globalen Marktdurchdringung. Weltweit werden Verbraucher immer stärker durch Lebensmittel direkt und indirekt über die Nahrungskette von landwirtschaftlichen Nutztieren mit gentechnisch veränderten Organismen in Berührung gebracht. In vielen Fällen stehen sich Befürworter und Kritiker zum Thema Chancen und Risiken der Gentechnik in ihren Meinungen konträr gegenüber. Zudem ist eine Vielzahl von Verbrauchern in den letzten Jahren durch Unzulänglichkeiten seitens der Futter- und Lebensmittelindustrie sowie durch den Mangel einer objektiven Aufklärungspolitik seitens wirtschaftlicher und politischer Entscheidungsträger verunsichert.

Für eine wissenschaftlich begründete Evaluierung von gentechnisch veränderten Pflanzen als Futtermittel für landwirtschaftliche Nutztiere kann nur in geringem Umfang auf Literaturdaten zurückgegriffen werden. Die vorhandene Literatur beschränkt sich vordergründig auf Stoffwechsel- und Wachstumsversuche mit Rindern und Geflügel. Aus diesem Grund sind weitere umfassende Forschungsarbeiten besonders an der Nutztierart Schwein erforderlich. Zudem sind der Verbleib sowie die physiologische Bedeutung der mit der Nahrung aufgenommenen „Fremd“-DNA im tierischen Organismus bisher noch weitestgehend ungeklärt.

Die aus der Ausprägung neuer genetischer Informationen resultierende Veränderung der stofflichen Zusammensetzung ist durch chemisch-analytische Untersuchungen im Vergleich zur unveränderten Ausgangslinie zu überprüfen. Eine mögliche Veränderung der ernährungsphysiologischen Wertigkeit ist durch Stoffwechsel- und Wachstumsversuche nachzuweisen. Weiterhin sind die Abbauege der „Fremd“-DNA im tierischen Organismus aufzuzeigen. Mit dieser Kenntnis könnten die Entsorgungswege untersucht als auch mögliche Risiken abgeschätzt werden.

2 LITERATURÜBERSICHT UND ABLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG

Mit dem Prozess, da Menschen sesshaft wurden, war es stets eines ihrer primären Ziele, Nahrungsmittel in ausreichenden Mengen und guter Qualität herzustellen. Um die Natur in ihrem Sinne zu beeinflussen, haben die Menschen traditionelle Züchtungsmethoden, beruhend auf Kreuzung und Selektion eingesetzt und so beispielsweise neue Pflanzensorten erhalten. Auch Mikroorganismen und Hefen kamen schon früh zur Herstellung und Verarbeitung von Lebensmitteln zum Einsatz. Diese Verfahren werden auch als traditionelle Biotechnologie bezeichnet.

Die Gentechnik als Methode der modernen Biotechnologie ist in diesem Zusammenhang als eine Weiterentwicklung der seit Jahrtausenden bestehenden Züchtungs- und Produktionsverfahren zu betrachten. Gegenwärtig bestehen für gentechnisch veränderte Pflanzen die in Abbildung 1 dargestellten Ziele.

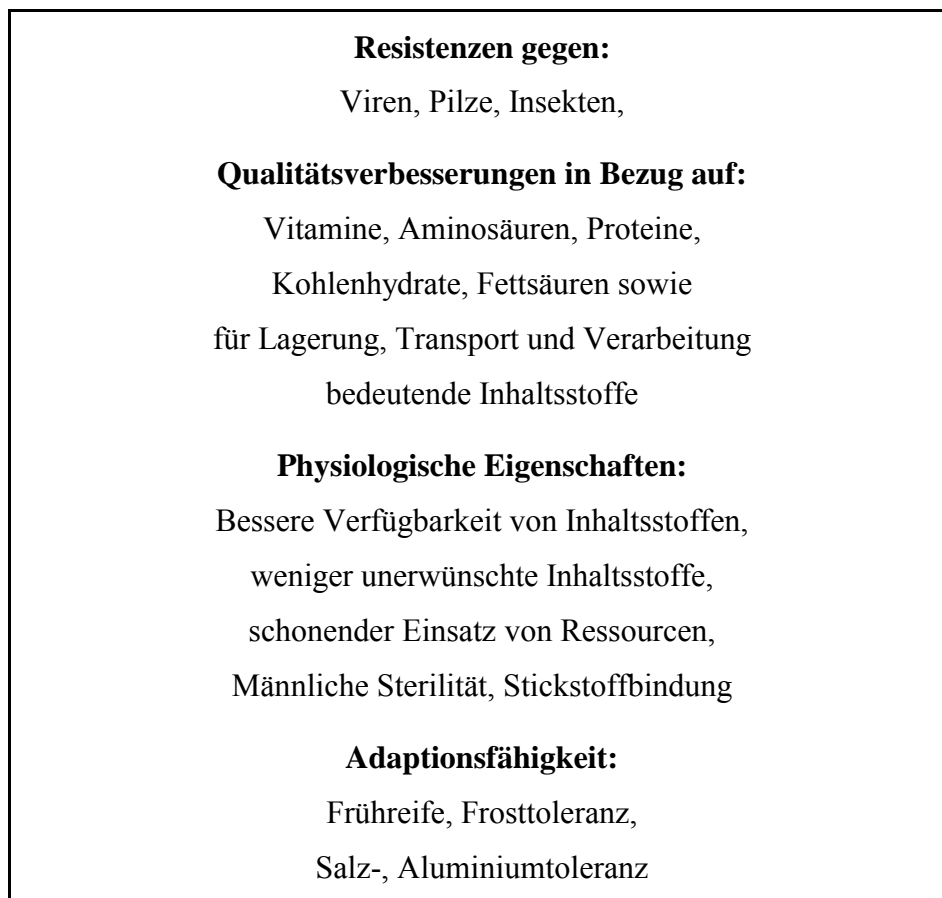


Abbildung 1 Anwendungsbereiche der Gentechnik in der Pflanzenproduktion
modifiziert nach MATISSEK (1998)

SCHELL und MOHR (1995) beschreiben die Gentechnik als die Summe aller Methoden zur Isolierung, Charakterisierung und gezielten Veränderung und Übertragung von Erbgut. Mittels gentechnischer Methoden ist es möglich, gezielt einzelne vorteilhafte Eigenschaften in einen Organismus einzubauen oder eine unerwünschte Eigenschaft daraus zu entfernen oder deren Ausprägung zu verhindern. Der Unterschied zur traditionellen Züchtung liegt darin, dass die Änderungen rascher und effizienter herbeigeführt werden können. Zudem können mit Hilfe dieser modernen Züchtungsmethode Erbeigenschaften artübergreifend kombiniert werden. So ist es zum Beispiel möglich, ein Gen aus einem Bakterium in eine Pflanze zu übertragen, um diese ein entsprechendes artfremdes Eiweiß in ihren Zellen produzieren zu lassen (GASSEN und HAMMES 2001).

2.1 GENTECHNIK BEI LANDWIRTSCHAFTLICHEN NUTZPFLANZEN UND DEREN EINSATZ IN DER TIERERNÄHRUNG

Jede Etablierung einer neuen Technologie, welche in der menschlichen Gesellschaft auf die „physiologischen Grundbedürfnisse“ oder das „Sicherheitsbedürfnis“ in der von MASLOW (1987) beschriebenen Bedürfnispyramide Einfluss nehmen, resultiert mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer Kontroverse. Biotechnologische Methoden, wie die gentechnische Modifikation landwirtschaftlicher Nutzpflanzen, stellen in diesem Zusammenhang keine Ausnahme dar.

Mit dem Einsatz von gentechnisch veränderten Pflanzen oder entsprechenden Nebenprodukten in der Human- und Tierernährung entwickelte sich aus der Frage nach der Sicherheit von GVP für Mensch, Tier und Umwelt eine kontrovers geführte Diskussion auf öffentlicher und wissenschaftlicher Ebene. Gegenwärtig ist die gentechnische Modifikation von landwirtschaftlichen Nutzpflanzen und besonders die Entwicklung von transgenen Pflanzen mit einem Gen aus dem Mikroorganismus *Bacillus thuringiensis* (Bt) eng verbunden mit einer weitreichenden Meinungsverschiedenheit der ökonomischen, ökologischen und sozialen Konsequenzen (FINUCANE 2002; SHELTON et al. 2002). Die überwiegende Kontroverse zwischen Befürwortern und Kritikern besteht in der Konfrontation um die Vorteile und Risiken der angewandten Biotechnologie im Gegensatz zu konventionell gezüchteten und genutzten Pflanzen (CLARK und LEHMAN 2001;

PHIPPS und PARK 2002). Diese Kontroverse spiegelt sich auch in der allgemeinen öffentlichen Auffassung zu gentechnisch veränderten Lebensmitteln wieder. Tendenziell erwarten Verbraucher eine höhere sachbezogene Aufklärungsrate, Argumente für die Notwendigkeit von GV Lebensmitteln sowie transparente Beweise der Lebensmittelsicherheit aus Forschung, Politik und Wirtschaft (FALK et al. 2002; SHAW 2002).

Die Inhaltsstoffe von Futterpflanzen stellen ein maßgebliches Kriterium für die Nutzung in der Tierernährung dar. Maßgebend für die wertbestimmenden Eigenschaften von Futterpflanzen sind deren Gehalt an Umsetzbarer Energie sowie der Gehalt an Kohlenhydraten, Lipiden und Proteinen. Von weiterer Bedeutung ist der Gehalt an Vitaminen und Mineralstoffen (JEROCH et al. 1999).

Alle Pflanzen ohne eine wesentliche Veränderung der Inhaltsstoffe zählen zu den gentechnisch veränderten Pflanzen der 1. Generation (FLACHOWSKY und AULRICH 2001b).

Die Veränderung von agrotechnischen Merkmalen stellt eine Form der gentechnischen Modifikation von landwirtschaftlichen Nutzpflanzen dar. Die Integration des Pat-Gens (**Phosphinotricin-acetyltransferase-Gen**) verleiht der Pflanze eine Toleranz gegenüber Herbiziden mit dem Wirkstoff Glufosinat-Ammonium, z.B. gegenüber dem Herbizid Basta[®]. Vergleichbares gilt auch für das Gt-Gen (**Glyphosat-Toleranz-Gen**, z.B. Roundup Ready[®]). Herbizidresistente Pflanzen bieten den Vorteil der alleinigen Anwendung eines Herbizids, wogegen bisher mehrere verschiedene Produkte angewendet wurden. Da eine Schädigung der modifizierten Kulturpflanzen durch den Einsatz des entsprechenden Herbizids nicht zu befürchten ist, besteht die Möglichkeit, das Pflanzenschutzmittel selektiv erst bei zu starkem Unkrautbefall unabhängig vom Wachstumsstadium der Nutzpflanze auszubringen.

Dem gegenüber steht die gezielte Beeinflussung im Gehalt an bestimmten Inhaltsstoffen bei gentechnisch veränderten Pflanzen der 2. Generation (FLACHOWSKY und AULRICH 2001b). Für eine angestrebte Verbesserung der Nahrungsmittelqualität werden Gene für die Bildung von bestimmten Proteinen oder Aminosäuren (CHAKRABORTY et al. 2000; NIKIFOROVA et al. 2002), bestimmten Fettsäuren, Kohlenhydraten und Vitaminen gezielt modifiziert oder in das Genom der Zielpflanze eingeschleust. LAI und MESSING

(2002) und ZEH et al. (2001) berichten in diesem Zusammenhang beispielsweise über einen gesteigerten Methioningehalt in den Körnern von gentechnisch veränderten Maispflanzen als auch in Kartoffeln.

Neben der Erhöhung erwünschter Inhaltsstoffe besteht das Bestreben einer Verminderung unerwünschter bzw. antinutritiver Inhaltsstoffe (BEEVER und MUELLER-HARVEY 2000). Durch eine Verminderung des Gehaltes an unerwünschten Stoffen ist auch eine bessere Nutzung von wertbestimmenden Inhaltsstoffen möglich (FLACHOWSKY und AULRICH 2001b). Dies belegen beispielsweise Ergebnisse von SPENCER et al. (2000a; b) aus Untersuchungen mit phytatarmen Mais. Im Fütterungsversuch wurde dabei eine signifikant bessere Leistung der Mastschweine bei gleichzeitig verminderter Phosphorausscheidung jeweils im Vergleich zur Fütterung mit konventionellem Mais festgestellt.

Gentechnische Modifikationen basieren prinzipiell auf einer Veränderung der genetischen Informationen in ihrer molekularen Speicherform, der DNA. Dabei stellt Desoxyribonukleinsäure (DNA) ein sehr stabiles Molekül dar, dass trotz extremer Umweltbedingungen in organischen Überresten über Tausende von Jahren ihre genetischen Informationen bewahrt (OOTA et al. 1999; PAABO et al. 1988).

Ausgangspunkt für Untersuchungen der DNA sind die Genome in lebenden Organismen mit unterschiedlicher Größe. Beispielsweise beträgt die Größe des bereits vollständig sequenzierten Genoms der Pflanze *Arabidopsis thaliana* nur etwa 120 Megabasenpaare (Mbp) gegenüber dem Reisgenom mit einer Größe von etwa 400-450 Mbp sowie Klee mit etwa 450 Mbp (HOLTORF et al. 2002). Um ein Vielfaches größer ist das Maisgenom mit ca. 2500 Mbp (FU und DOONER 2002).

FORBES et al. (1998) prüften die Stabilität von DNA-Molekülen in nicht gentechnisch modifizierten Pflanzen, die als Futtermittel für Nutztiere eingesetzt werden. Untersucht wurden die bei der Herstellung von Futtermitteln relevanten physikalisch technologischen Einflüsse von Mahl- und Zerkleinerungsprozessen und durch thermische Behandlung. Die angewandten unterschiedlichen Prozesse zeigten keine nachweisbare Fragmentierung der Pflanzen-DNA in Bruchstücke unterhalb der Größe von 21.000 Basenpaaren (bp). Aus den Versuchsergebnissen folgerten die Autoren, dass lediglich der Einsatz von thermischer

Energie mit Temperaturen zwischen 100°C und 150°C eine Fragmentierung der Pflanzen-DNA in Bruchstücke kleiner 100 Basenpaare zur Folge hat (FORBES et al. 1998).

CHITER und Mitarbeiter untersuchten die physikalischen und chemischen Bedingungen für eine ausreichende Fragmentierung der verwendeten Pflanzen-DNA bis zu einer Größe die beispielsweise einen horizontalen Gentransfer in die Zellen von Bakterien der Darmflora unmöglich erscheinen lassen (CHITER et al. 2000). Die Ergebnisse zeigten, dass die Anwendungen von Temperaturen über 95°C als auch die chemischen Verfahren bei der kommerziellen Bearbeitung von Ölsaaten eine vollständige Degradierung der pflanzeigenen DNA zur Folge hatten (CHITER et al. 2000).

Nach einer Untersuchung des DNA-Abbaus während der Rapsölgewinnung und Futtermittelherstellung unter Berücksichtigung verschiedener Verarbeitungsmethoden konnten BERGER et al. (2003) feststellen, dass die mechanische Bearbeitung keinen Einfluss auf die Stabilität der DNA-Moleküle hat. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von CHITER et al. (2002) amplifizierten BERGER et al. (2003) trotz starker DNA-Fragmentierung nach der Konditionierung bei Temperaturen von 96°C über 20 min und von 105°C beim Toasten Fragmente mit einer Größe von 248 bp im Extraktionsschrot. Selbst die Konditionierung bei 103 bis 111°C über 30 min und Toasten bei 105°C ließ amplifizierbare Fragmente mit 194 bp im Extraktionsschrot zurück.

Insgesamt zeigen die verschiedenen Untersuchungen, dass die genomische DNA in konventionellen als auch in gentechnisch modifizierten Pflanzen ein stabiles Molekül darstellt. Trotz der Einwirkung von unterschiedlichen physikalischen und chemischen Bedingungen bleiben DNA-Bruchstücke auch in den bearbeiteten Produkten erhalten. Gelangen be- oder unverarbeitete pflanzliche Produkte in die Nahrungskette, wird der menschliche oder tierische Organismus mit der pflanzeigenen und/oder der zusätzlich integrierten DNA aus der gentechnischen Modifikation konfrontiert. Als Bestandteil von Nahrungs- und Futtermitteln bleiben demzufolge DNA-Moleküle mit ihren gespeicherten Erbinformationen existent.

2.2 EVALUIERUNG VON GENTECHNISCH VERÄNDERTEN PFLANZEN

Für die Bewertung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit neuartiger Lebens- und Futtermittel wurden von EC (2001), OECD (1993) und WHO/FAO (2000) Empfehlungen und Richtlinien erarbeitet. Bis zum Inkrafttreten einer einheitlichen „Novel Food and Feed“ Verordnung (EC 2001) wird der prinzipielle Umgang mit und die Zulassung von „neuartigen“ Lebensmitteln durch die „Novel Food“-Verordnung, einem Festlegungspapier der COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2001) geregelt. Ziel der „Novel Food and Feed“ ist ein verbessertes, einheitlicheres und transparenteres Verfahren für die Sicherheitsbewertung von gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermitteln. Bisher basierte die Sicherheitsbewertung von GMOs auf dem Nachweis der substanziellen Äquivalenz (OECD 1993). Als substanziell äquivalent wird ein neues Lebensmittel oder ein neuer Lebensmittelbestandteil betrachtet, wenn keine Unterschiede zu einem vergleichbarem traditionellem bestehen. Solche Lebensmittel können dann auch bezüglich der Sicherheit analog dem traditionellen Lebensmittel beurteilt werden (OECD 1993). In der neuen Verordnung (EC 2001) ist im Bezug auf die substanzielle Äquivalenz vermerkt, dass die Sicherheitsprüfung gentechnisch veränderter Lebensmittel auf der Feststellung der wesentlichen Gleichwertigkeit basiert, jedoch keine eigentliche Sicherheitsprüfung darstellt. In diesem Zusammenhang empfehlen AUMAITRE et al. (2002), FAUST (2002) und FLACHOWSKY und AULRICH (2001b) die Evaluierung von gentechnisch veränderten Pflanzen der ersten Generation im Rahmen einer Sicherheitsbewertung in einen definierten Entscheidungsbaum einzubinden. In einem Dokument des Scientific Institute of Public Health werden die gegenwärtig geltenden Richtlinien in der Europäischen Union sowie nach einer Zusammenfassung der aktuellen Daten aus Wissenschaft und Technik Empfehlungen zur Sicherheitsbewertung von GVP abgeleitet (VAN HAVER et al. 2003).

Die substanzielle Äquivalenz von gentechnisch veränderten Pflanzen konnte in einer Vielzahl von Versuchen weitgehend bestätigt werden. FLACHOWSKY und AULRICH (2001b) fassten in einem Übersichtsbeitrag eine große Anzahl an Verdauungs- und Fütterungsstudien zusammen. Die dem Schrifttum entnommenen Befunde zur ernährungsphysiologischen Bewertung zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen

den untersuchten isogenen und transgenen Hybriden. In den vergleichenden Untersuchungen konnten keine wesentlichen Veränderungen der Inhaltsstoffe (AULRICH et al. 2001; BÖHME et al. 2001; CROMWELL et al. 2002; SIDHU et al. 2000), der Verdaulichkeit der Rohnährstoffe sowie im umsetzbaren Energiegehalt festgestellt werden. Allerdings merken FLACHOWSKY und AULRICH (2001a) kritisch an, dass es sich bei den zusammengestellten Versuchsergebnissen häufig um Mitteilungen auf wissenschaftlichen Tagungen handelt und bisher nur wenige Originalarbeiten publiziert wurden.

Umfassend beschreiben CLARK und LEHMAN (2001) in einer Studie das nicht befriedigte Sicherheitsbedürfnis und weisen besonders auf den Mangel an veröffentlichten Daten zur Sicherheit von gentechnisch modifizierten Pflanzen durch unabhängige Forschungseinrichtungen hin.

Die Autoren (CLARK und LEHMAN 2001) merken kritisch an, dass sie bei ihrer Literaturrecherche 60 Veröffentlichungen mit Kommentaren und Meinungen zur Sicherheit von GMOs fanden, wobei keiner der 60 Autoren eigene Untersuchungen zu dieser Thematik durchgeführt hat.

Im gleichen Zeitraum fassen CLARK und IPHARRAQUERRE (2001) in einer Übersichtarbeit die Daten von 23 Untersuchungen mit gentechnisch veränderten Pflanzen zusammen. Die Übersichtarbeit beinhaltet Verdauungs- und Fütterungsversuche mit Rindern und Geflügel sowie vergleichende Untersuchungen der chemischen Zusammensetzung von isogenen und transgenen Futterpflanzen. Die Autoren gelangten in ihrer Auswertung zu einer analogen Einschätzung wie FLACHOWSKY und AULRICH (2001a), dass bei vergleichenden Untersuchungen von isogenen und transgenen Futterpflanzen der 1. Generation keine signifikanten Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung, in der Rohnährstoffverdaulichkeit und im Futterwert für landwirtschaftliche Nutztiere bestehen.

Neben dem Nachweis der substanziellen Äquivalenz bleiben eine Reihe von Fragen unbeantwortet. Eine Frage für den Verbraucher besteht in der Sicherheit von Lebensmitteln tierischen Ursprungs, wenn Nutztiere mit Futtermitteln aus gentechnisch veränderten Pflanzen gefüttert wurden. Für eine Prävention des Verbrauchers und dessen Gesundheit wird seitens der Kommission der Europäischen Gemeinschaften vor der Markteinführung und Nutzung von GV Pflanzen eine wissenschaftliche Evaluierung auf dem

höchstmöglichen Standard gefordert (EC 2001). Eine Evaluierung sollte daher auf umfassenden Sicherheitsbewertungen von GV Pflanzen jeder Spezies basieren, wobei unerwünschte Eigenschaften ebenso wie denkbare Risiken schon mit Beginn der Entwicklung und im Vorfeld einer kommerziellen Nutzung erkannt und bewertet werden sollten (EC 2001).

Gegenwärtig werden als denkbare ökologische Risiken durch den Einsatz von gentechnisch veränderten Pflanzen eine unkontrollierte Auswilderung und/oder Auskreuzung, ein horizontaler Gentransfer der eingebrachten Gene über Artgrenzen hinweg, die Bildung neuer Viren, die Auswirkungen auf Nichtzielorganismen im Ökosystem sowie eine Resistenz der Schadinsekten gegen Bt-Toxine diskutiert (MARTIN-ORUE et al. 2002; SHELTON et al. 2002).

Ein weiterer Aspekt ist die Bestätigung einer gesundheitlichen Unbedenklichkeit durch den Verzehr gentechnisch veränderter Nahrungsmittel, wobei an dieser Stelle als denkbare Risiken die Entstehung toxischer Inhaltsstoffe, die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen sowie mögliche allergische Reaktionen als besonders relevant zur Diskussion stehen (CHAMBERS et al. 2002; JANY und KIENER 2002; TAYLOR 2002).

Als ein möglicher Ausgangspunkt für unerwartete Effekte wird die Übertragung des Bt-Gens aus dem Spenderorganismus *Bacillus thuringiensis* in die genomische DNA von landwirtschaftlichen Nutzpflanzen angesehen. Diese zusätzliche Informationseinheit im Genom befähigt die modifizierte Pflanze zur Synthese eines Endotoxins. Das gebildete Gift wiederum wird von Fraßschädlingen aufgenommen und entfaltet im Darmtrakt der Insekten seine letale Wirkung (HOFTE und WHITELEY 1989).

Außer der selektiv letalen Wirkung für gewisse Insekten war der toxische Mechanismus etwa 4 Jahrzehnte zuvor noch nicht vollständig bekannt. Jedoch erweckten Versuche mit dem Bakterium *Bacillus thuringiensis*, das im Jahre 1911 in Thüringen entdeckt wurde, bereits große Hoffnungen für eine biologische Schädlingsbekämpfung. Im Jahre 1960 startete in Freilandversuchen der kommerzielle Einsatz von Präparaten mit *Bacillus thuringiensis*. Dabei waren die ersten Erfolge der bakteriellen Schädlingsbekämpfung ebenso gut wie die mit DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan) erzielten (CARSON 1962).

Neben Genen, die eine erwünschte Information codieren, enthalten gentechnisch modifizierte Pflanzen oftmals ein Gen, das zu Selektionszwecken in das Genom

eingbracht wurde und eine Antibiotikaresistenz ausbildet. Bisher stellte die Resistenz gegen Antibiotika die Kontrollreaktion für einen positiven Gentransfer bei der Erzeugung von GVP dar. Aufgrund der vorangestellten Risiken wird jedoch seitens der Hersteller von GVP verstärkt nach alternativen Selektionsmethoden unter Ausschluss von Antibiotikaresistenzgenen geforscht (DANIELL et al. 2002).

Neben der dargestellten Komplexität der Evaluierung von gentechnisch modifizierten Pflanzen bleiben eine Reihe von Fragen zunächst noch unbeantwortet. Im Focus vieler Fragestellungen steht jedoch die DNA als Träger der modifizierten Erbinformationen für die in der Human- und Tierernährung genutzten Pflanzen.

2.3 DER GASTROINTESTINAL-TRAKT ALS EINTRITTSFORTE FÜR "FREMD"-DNA

2.3.1 AUFBAU UND FUNKTION DES VERDAUUNGSTRAKTES

Um den Stoff- und Energiebedarf von Organismen mit einem entwickelten und differenzierten Verdauungssystem zu decken, muss die Nahrung geschluckt, im Gastrointestinal-Trakt (GIT) aufgespalten (Verdauung) und anschließend aus dem Darm aufgenommen (Resorption) werden (SILBERNAGEL und DESPOPULUS 1991).

Bei nicht wiederkäuenden Säugetieren untergliedert sich der GIT in den Magen, in welchem die aufgenommene Nahrung mit Magensaft gemischt sowie durch eine anhaltende Kontraktion des Magens zermahlen und homogenisiert wird. Die funktionell wesentlichen Bestandteile des sezernierten Magensaftes sind eiweißspaltende Enzyme (Pepsinogene), Schleim (Muzine) und Salzsäure. Mit der Entleerung des Magens gelangt der Nahrungsbrei in den Darm. Der Darm wird unterteilt in den Dünndarm und den Dickdarm. Der Dünndarm ist ein schlauchförmiges Organ, das als Zwölffingerdarm (Duodenum) am Magenausgang beginnt, sich als Leerdarm (Jejunum) fortsetzt und als Krummdarm (Ileum) in den Dickdarm einmündet. Der Dickdarm wird weiter in die Abschnitte Blinddarm (Caecum), Grimmdarm (Colon) und Enddarm (Rektum) differenziert (ENGELHARDT und BREVES 2000; NICKEL et al. 1995; SILBERNAGEL und DESPOPULUS 1991).

Die Hauptfunktion des Dünndarms besteht in der weiteren Verdauung der Nahrung und der Absorption der Spaltprodukte. Die Aufspaltung der Nahrungsbestandteile erfolgt durch körpereigene Verdauungsenzyme, die in das Darmlumen abgegeben werden. Die Bauchspeicheldrüse ist der Bildungsort der Verdauungsenzyme, die zur Spaltung von Proteinen, Fetten und Kohlenhydraten benötigt werden. Zur Fettverdauung benötigt der Organismus zusätzlich den in der Leber gebildeten Gallensaft. Die aus den mechanischen und enzymatischen Verdauungsprozessen resultierenden Spaltprodukte können absorbiert und dem Stoffwechsel des Organismus zugeführt werden (ENGELHARDT und BREVES 2000; SILBERNAGEL und DESPOPULUS 1991).

Die Absorption der Hauptnährstoffe erfolgt über verschiedene Mechanismen. Die zu Monosacchariden aufgespalteten Kohlenhydrate werden über einen Natrium-abhängigen aktiven Glukose-Transport in das Darmepithel aufgenommen. Die bei der Hydrolyse von Proteinen entstehenden Aminosäuren werden durch mehrere spezifische Transportsysteme sekundäraktiv aus dem Darmlumen in die Mukosazelle und von dort passiv in die Blutbahn transportiert. In die Mukosazellen transportierte Peptide werden dort hydrolysiert, so dass nur freie Aminosäuren, für den Körper nicht als "fremd" erkennbar, mit dem Pfortaderblut zur Leber gelangen. Aus den freien Fettsäuren und den Monoglyzeriden bilden sich unter Mitwirkung der Gallensalze Mizellen. Eingebettet in Mizellen erreichen die lipophilen Fettspaltprodukte einen innigen Kontakt mit der Darmwand und stellen die notwendige Voraussetzung für eine normale Lipidabsorption her (ENGELHARDT und BREVES 2000; SILBERNAGEL und DESPOPULUS 1991).

Über die Absorptionsmechanismen von mit der Nahrung aufgenommener DNA ist hingegen nur wenig bekannt. Gegenwärtig wird eine Aufnahme der DNA über so genannte M-Zellen im Darmepithel diskutiert (Kapitel 2.3.2).

2.3.2 SCHICKSAL VON MIT DER NAHRUNG AUFGENOMMENER "FREMD"-DNA

Über einen langen Zeitraum bestand die Hypothese, dass die mit der Nahrung aufgenommenen Nukleinsäuren im GIT von Säugetieren vollständig degradiert würden (RAZZAQUE et al. 1981). McALLAN und Mitarbeiter beschrieben in den siebziger Jahren eine nahezu vollständige Degradierung von oral aufgenommener DNA im GIT von Ochsen (MCALLAN 1982).

Ausgangspunkt dieser Hypothese waren methodische Untersuchungen zur Aufreinigung und Bestimmung von RNA und DNA aus Ingestaprobe (MCALLAN und SMITH 1969). Nach der Inkubation von DNA oder gemahlenem Heu mit Extrakten aus dem Pansen von Kühen, Schafen oder Stieren *in vitro* wurde ein schneller Abbau der DNA beobachtet. Die Abbauprodukte wurden säulenchromatographisch getrennt und die verschiedenen Eluate photometrisch quantifiziert. Nach 4 h wurden sowohl in den *in vivo* als auch *in vitro* Experimenten nur noch ultrafiltrierbare Oligo- und Mononukleotide sowie deren Abbauprodukte nachgewiesen (MCALLAN und SMITH 1973a; MCALLAN und SMITH 1973b). Unter Verwendung der gleichen Methode ließen sich Oligonukleotide und Nucleoside im oberen Abschnitt des Dünndarms von Stieren, aber nicht mehr im terminalen Ileum nachweisen (MCALLAN 1980). McALLEN (1980) vermutete, dass die im Darm abgebauten Nucleinsäuren entweder als freie Nucleotide absorbiert oder weiter katabolisiert würden.

ELLIS und BLEICHNER (1969) nahmen an, dass die vom Darm absorbierten Purine zur Nucleinsäuresynthese in den Geweben dienen. Um den Weg von oral verabreichter DNA zu verfolgen, wurden Schafe neben herkömmlichem Futter mit [¹⁴C] markierter DNA gefüttert. Nach 48 h detektierten (RAZZAQUE et al. 1981) ca. 50 % der markierten Kohlenstoffatome in Geweben Leber, Milz, Blut, Thymus und Pankreas. Über 40 % der absorbierten markierten Kohlenstoffatome wurden über den Urin als Harnsäure, Allantoin und Harnstoff ausgeschieden. Der verbleibende Rest der absorbierten Radioaktivität wurde in anderen Stoffwechselprodukten, wie beispielsweise dem ausgeatmeten Kohlendioxid nachgewiesen (RAZZAQUE et al. 1981).

Mensch und Tier treffen seit Beginn ihrer Entwicklung auf vielfältige Weise mit „Fremd-DNA“ zusammen (DOERFLER 2000). Speziell der Magen-Darm-Trakt (GIT) von lebenden Organismen ist ständig, durch den ununterbrochenen Fluss von teilweise oder komplett verdauten Nahrungsmittelbestandteilen, mit fremder DNA konfrontiert (SCHUBBERT et al. 1994). Die mit der Nahrung aufgenommene DNA wird im Gastrointestinal-Trakt (GIT) von Säugetieren nicht vollständig zu niedermolekularen Desoxyribomononucleotiden, den chemischen Grundbausteinen der DNA, abgebaut.

In Modellversuchen fütterten (SCHUBBERT et al. 1994) große Mengen reiner DNA an Mäuse. Die Größe der verabreichten Test-DNA betrug 7250 Basenpaare mit einer in

verschiedenen Vorversuchen umfangreich charakterisierten Struktur, die keine Übereinstimmung zur DNA der Versuchstiere aufweist. Nach der oralen Aufnahme über unterschiedlich lange Zeiträume enthielt das Blut der Versuchstiere nachweislich Fragmente der aufgenommenen DNA mit einer Größe bis zu 472 Basenpaaren. In einem weiteren Versuch von SCHUBBERT et al. (1997) wurden Fragmente mit einer Größe zwischen 194 und 976 Basenpaaren der oral verabreichten DNA wiederholt im Blut sowie in den Organen Leber und Milz der Versuchstiere entdeckt. Wurden trächtige Mäuse während der ersten 14 Tage der Trächtigkeit mit der Test-DNA gefüttert, konnte die fremde DNA in Fragmenten bis 830 Basenpaaren in verschiedenen Organen der Föten oder der neugeborenen Mäuse nachgewiesen werden (SCHUBBERT et al. 1998).

Normalerweise nehmen Menschen und Tiere keine reine DNA auf, sondern die in den Zellkernen von Pflanzen und Tieren natürlich fixierte DNA. HOHLWEG und DOERFLER (2001) wählten ein natürliches Szenario und verfütterten Sojablätter an Mäuse und untersuchten den Verbleib eines für Pflanzen spezifischen Gen-Fragmentes (Rubisco) in den Labortieren. Rubisco-Gen-Fragmente mit einer Größe von 1516 Basenpaaren wurden im Dünndarm 2 bis 49 Stunden bzw. im Caecum bis zu 121 Stunden nach der letzten Fütterung mit Sojablättern nachgewiesen. Weiterhin wurden im Verlauf der Studie kleinere Fragmente vom Rubisco-Gen (337 bp) in der Leber und in der Milz von einigen der untersuchten Tiere gefunden.

Aus den Befunden bei Modelltieren stellt sich die Frage nach dem Verbleib der DNA aus konventionellen und besonders aus gentechnisch veränderten Futtermitteln im Körper von landwirtschaftlichen Nutztieren. AULRICH et al. (2001) verfütterten Futtermischungen mit konventionellem oder gentechnisch verändertem Mais an Rinder und Hühner. Im Anschluss wiesen EINSPANIER et al. (2001) DNA-Fragmente aus dem Chloroplasten-Gen in verschiedenen Organen und Geweben der untersuchten Tiere mit einer Größe von 199 bp nach. Fragmente der gentechnischen Veränderung konnten in den untersuchten Proben mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nicht vervielfältigt (amplifiziert) werden.

DUGGAN et al. (2003) untersuchten das Schicksal von gentechnisch veränderter Mais-DNA im Schafpansen. Das verabreichte Futter bestand aus Silage und Körnermais einer

insektenresistenten Maislinie. Unter Verwendung der PCR wurde der Pansensaft auf Gen-Fragmente untersucht. Als Nachweis für gentechnisch veränderte Mais-DNA dienten zwei Fragmente aus der synthetischen Region des CryIA(b) Gens. Die Größe der Fragmente betrug 1914 bp und 211 bp. Bis zu 5 Stunden nach der Fütterung von Körnermais wurden Fragmente der Größe 1914 bp im Pansensaft nachgewiesen. Demgegenüber gelang es den Autoren nicht, das größere Fragment (1914 bp) nach der Verfütterung von Maissilage im Pansensaft zu amplifizieren. Unter der Annahme, dass die mit dem Futter aufgenommene DNA rasch degradiert wurde, wählten die Autoren ein kleineres Gen-Fragment (211 bp) für den spezifischen Nachweis der modifizierten Mais-DNA. Dabei erfolgte ein positiver Nachweis im Pansensaft bis zu 3 Stunden nach Verfütterung von Maissilage sowie bis zu 24 Stunden nach der Aufnahme von Körnermais (DUGGAN et al. 2003).

AESCHBACHER et al. (2002) untersuchten den Verbleib der DNA von Bt-Mais nach der Verfütterung an Broiler und fanden ein maisspezifisches Genfragment (226 bp) aus dem Invertase-Gen im Kropfinhalt und im Muskelmagen der Versuchstiere sowie in der Leber, Milz und im Muskelgewebe. Demgegenüber konnte das ausgewählte Bt-Gen-Fragment (479 bp) außer im Kropfinhalt der Tiere in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden.

In Untersuchungen mit Schweinen konnten durch KLOTZ et al. (2002) kurze Fragmente des Chloroplasten-Gens (199 bp) im Dünndarminhalt der Tiere bis zu 12 Stunden nach der Fütterung amplifiziert werden. Konträr zu den Untersuchungsergebnissen bei anderen Zieltierarten wurden in den Organen und Geweben der Versuchstiere keine pflanzlichen Genfragmente nachgewiesen. Die Autoren schlussfolgerten aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse, dass ein Übergang von DNA-Fragmenten durch die Magen-Darmschranke beim Schwein, im Gegensatz zu anderen Tierarten, sehr unwahrscheinlich erscheint (KLOTZ et al. 2002).

Die Untersuchungen bei verschiedenen Tierspezies machen deutlich, dass mit der Anwendung sensitiver molekularbiologischer Verfahren der Nachweis von DNA-Fragmenten aus der Nahrung in Organen und Geweben möglich ist. Einschränkend erscheint aufgrund der Befunde die maximal nachweisbare Fragmentgröße von ca. 1000 bp in den Organen und Geweben der untersuchten Spezies. Ungeklärt stellt sich jedoch die tierspezifische Einschränkung für Schweine dar. Zusammengefasst sind die Untersuchungen zum Nachweis von DNA-Bruchstücken in den Organen und Geweben verschiedener Tierspezies in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Auflistung von Untersuchungen zum Nachweis von pflanzlichen und transgenen DNA-Bruchstücken sowie von Fragmenten aus Phagen-DNA nach oraler Aufnahme in verschiedenen Organen und Geweben unterschiedlicher Tierspezies

Autoren	Tierart	Nachweisorgan	Fragmentgröße	Quelle
SCHUBBERT et al. (1994)	Maus	Blut	(+) 472 bp	Phagen-DNA
SCHUBBERT et al. (1997)	Maus	Blut, Leber, Milz	(+) 194 bp (+) 976 bp	Phagen-DNA
SCHUBBERT et al. (1998)	Maus	Fötus	(+) 830 bp	Phagen-DNA
HOHLWEG und DOERFLER (2001)	Maus	Leber, Milz	(+) 337 bp	Rubisco-Gen
EINSPANIER et al. (2001)	<u>Rind</u> Huhn	<u>Blut</u> Leber, Milz, Muskel, Niere	(+) 199 bp (-) 189 bp	Chloroplasten-Gen Bt-Gen
AESCHBACHER et al. (2002)	Huhn	Leber, Milz	(+) 226 bp (-) 479 bp	Invertase-Gen Bt-Gen
KLOTZ et al. (2002)	Schwein	Blut, Leber, Lymphknoten Milz, Muskel, Niere	(-) 199 bp (-) 251 bp	Chloroplasten-Gen Bt-Gen

(+) positiver Nachweis, (-) kein Nachweis möglich

Als Eintrittspforte für DNA-Fragmente werden momentan die M-Zellen in den Peyerschen Platten diskutiert (SCHUBBERT et al. 1997). Aufgrund der physiologisch bedingten, ausgedehnten Oberfläche besteht an der Darmwand ein ständiger Kontakt zu den Bestandteilen der Nahrungsstoffe als auch zu den mit der Nahrung aufgenommenen und oder der im Darmtrakt persistierenden Mikroorganismen sowie zu Toxinen. Gegen das Eindringen von Fremdstoffen besitzt der Organismus Abwehrsysteme. Das Lymphgewebe der Mukosa im Darm wird auch als GALT (gut associated lymphoid tissue) bezeichnet. Es stellt ein immunkompetentes Organ des Organismus dar und wird neben den Lymphozyten und Makrophagen aus den Peyerschen Platten sowie einzelnen Lymphfollikeln gebildet (BIENENSTOCK et al. 1978). Der Name der Peyerschen Platten rührt von ihrem Entdecker Johann Konrad Peyer, der schon vor 300 Jahren die Ansammlung von Lymphfollikeln im Darm beobachtete (GEBERT et al. 1996). Durch die M-Zellen der Peyerschen Platten gelangen feste oder gelöste Partikel und Mikroorganismen in den Organismus. Dieser Mechanismus basiert auf Endozytose, transzytotischen Transport und exozytotische Freilassung der luminalen Substanzen in den interzellulären Raum (GEBERT et al. 1996; OWEN 1999; SIEBERS und FINLAY 1996) und ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

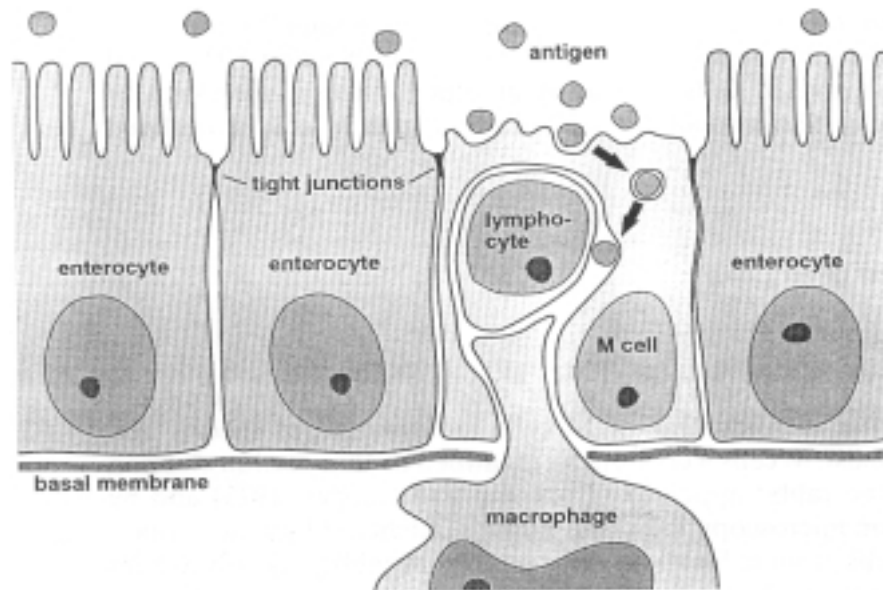


Abbildung 2 Generelles Konzept der Antigen-Aufnahme durch die M-Zellen der Peyerschen Platten nach GEBERT et al. (1996).

M-Zellen enthalten nur eine geringe Anzahl an Lysosomen für einen intrazellulären Abbau von organischen Substanzen. Dies deutet darauf hin, dass aufgenommene Mikroorganismen und Makromoleküle mit antigener Struktur mehr oder weniger intakt durch die Zelle in den interzellulären Raum transportiert werden (OWEN et al. 1986). In weiteren Untersuchungen in den Peyerschen Platten von Schweinen konnte beispielsweise die Aufnahme von intakten Hefezellen beobachtet werden (GEBERT et al. 1994). Dennoch bauen die vorhandenen Lysosomen einen Teil des aufgenommenen Materials ab. Mit Hilfe von spezifischen Molekülen werden die Abbauprodukte an der basolateralen Membran den Lymphozyten präsentiert (ALLAN et al. 1993). Ungeklärt ist, wie dieser Mechanismus an der Stimulation des Immunsystems beteiligt ist bzw. die körpereigene Immunantwort initiiert (MAKALA et al. 1998).

Insgesamt zeigten Untersuchungen, dass verschiedene Bestandteile des Darmlumen über die Peyerschen Platten in den interzellulären Raum transportiert werden (Übersicht in GEBERT et al. 1996). Eine Aufnahme von Fremd-DNA über die dargestellten Mechanismen ist noch nicht geklärt, wird jedoch vermutet (SCHUBBERT et al. 1997).

2.4 ABLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG

Der Einsatz gentechnisch modifizierter Pflanzen in der Human- und Tierernährung wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Für eine wissenschaftlich begründete Evaluierung der verschiedenen GMP existieren nur wenige Studien. Zur Fütterung von gentechnisch verändertem Bt-Mais bei der Nutztierart Schwein wurden bisher zwei Verdauungsstudien von AULRICH et al. (2001) und GAINES et al. (2001) sowie ein Mastversuch von WEBER et al. (2000) publiziert. Untersuchungen zum Abbau und zum Verbleib der nahrungsspezifischen DNA im Körper von Schweinen publizierten bisher lediglich KLOTZ et al. (2002).

Aufgrund der wenigen bisher verfügbaren wissenschaftlichen Studien sowie der gegensätzlichen Untersuchungsergebnisse bei den verschiedenen Tierspezies erscheinen weitere Untersuchungen, besonders im Hinblick auf die von der Kommission der Europäischen Gemeinschaften geforderten Sicherheitsbewertung, notwendig.

Unter Berücksichtigung der dargestellten Literaturbefunde ergibt sich die Notwendigkeit einer umfassenden Prüfung von Bt-Mais und dies speziell beim Einsatz als Futtermittel an die Nutztierart Schwein.

Aus den bisherigen Literaturbefunden sowie den Forderungen administrativer Stellen wurden für diese Arbeit die in Punkt 2.4.1 bis 2.4.3 beschriebenen Ansätze verfolgt.

2.4.1 STOFFLICHE ZUSAMMENSETZUNG VON ISOGENEN UND TRANSGENEN MAISHYBRIDEN UND DEREN ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGISCHE BEWERTUNG

Eine Sicherheitsbewertung von gentechnisch modifizierten Pflanzen basiert nach einer Empfehlung der OECD (1993) und EC (2001) auf einer Feststellung wesentlicher Gleichwertigkeit. Die substanzielle Äquivalenz von Bt-Mais und der unveränderten Ausgangssorte lässt sich im Vergleich der Inhaltsstoffe sowie in einer vergleichenden ernährungsphysiologischen Bewertung im Verdauungsversuch ermitteln. Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Besteht beim Vergleich der Inhaltsstoffe in beiden Maishybriden substanzielle Äquivalenz?

- Weisen beide Maishybriden als Bestandteil von Futtermischungen bei Schweinen in ihrer ernährungsphysiologischen Wertigkeit signifikante Unterschiede auf?

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Inhaltsstoffe durch verschiedene analytische Verfahren untersucht werden. Die ernährungsphysiologische Wertigkeit sollte jeweils durch drei aufeinander folgende Verdauungsversuche mit Mastschweinen für beide Maishybriden ermittelt werden.

2.4.2 VERGLEICHENDE BETRACHTUNG DER MASTLEISTUNG VON SCHWEINEN NACH DER VERFÜTTERUNG VON FUTTERMISCHUNGEN MIT ISOGENEM UND TRANSGENEM MAIS

Bisher wurde lediglich durch WEBER et al. (2000) der Einsatz von Futtermischungen mit steigenden Anteilen an isogenem oder transgenem (Bt) Mais bei Mastschweinen in einem praxisrelevanten Lebendmassebereich untersucht. Protokolliert wurden im Abstand von zwei Wochen jeweils die Daten von 6 Schweinen pro Box (n = 180) mit *ad libitum* Zugang zu den Futterautomaten. Dabei zeigten die Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Maishybriden für die Parameter mittlere Futterraufnahme, Lebendmassezunahme und Futteraufwand. Vor diesem Hintergrund ergab sich folgende Fragestellung:

- Bestehen signifikante Unterschiede bei den Mastleistungsparametern mittlere tägliche Futterraufnahme, Lebendmassezunahme und Futteraufwand bei einer restriktiven Fütterung von Diäten mit gleich bleibenden Anteilen an isogenem oder transgenem (Bt) Mais an Mastschweine?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden 48 weibliche Schweine in zwei Gruppen mit maishaltigen Futtermischungen gemästet. Für eine tierindividuelle Datenerfassung fand die Haltung in Einzelboxen statt. Über den gesamten Versuchszeitraum sollte detailliert durch täglich zweimalige Futterrückwaage vor der anschließenden Folgefütterung bei wöchentlicher Erfassung der Lebendmasse die Mastleistung beschrieben werden.

2.4.3 SCHICKSAL VON FREMDER DNA IM ORGANISMUS VON SCHWEINEN NACH ORALER AUFNAHME

In Untersuchungen mit Modelltieren konnten SCHUBBERT et al. (1994; 1997) zeigen, dass oral verabreichte DNA im Magen-Darm-Trakt von Mäusen nicht vollständig degradiert wird. Weiterhin wiesen die Autoren nach, dass die applizierte DNA in Form von kleinen Fragmenten über die Darmbarriere ins Blut und in innere Organe gelangt. Studien zum Verbleib von natürlich fixierter Nahrungs-DNA im Organismus der Nutztierarten Rind und Geflügel bestätigten einen DNA-Übergang in verschiedene Organe und Gewebe der Versuchstiere (AESCHBACHER et al. 2002; EINSPANIER et al. 2001; TONY et al. 2003). Demgegenüber konnten KLOTZ et al. (2002) keine "Fremd"-DNA in verschiedenen Organen und Geweben von Schweinen nachweisen. Aus den gegensätzlichen Befunden zum DNA-Transfer ergaben sich folgende Fragestellungen nach der Verfütterung von Diäten mit konventionellem oder transgenem Mais an die Nutztierart Schwein:

- Wie stabil ist die Nahrungs-DNA im Magen-Darm-Trakt?
- Über welchen Zeitraum persistieren spezifische DNA-Moleküle im Magen-Darm-Trakt nach der letzten Futteraufnahme?
- Blockiert die Darmbarriere von Schweinen den Eintritt von "Fremd"-DNA oder sind DNA-Moleküle der Nahrung im Gewebe von Schweinen nachweisbar?
- Zeigen sich möglicherweise Unterschiede beim DNA-Transfer im Tierorganismus in Abhängigkeit von der Aufnahme gentechnisch veränderter oder nicht veränderter Mais-DNA?
- Bleiben bei einem bestehenden DNA-Übergang fremde DNA-Bruchstücke in verarbeiteten Lebensmitteln für den menschlichen Verzehr nachweisbar erhalten?

Diese Fragen sollten durch verschiedene molekularbiologische Methoden an ausgewählten Proben der zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Fütterung einer letzten maishaltigen Diät geschlachteten Tiere aus dem Mastversuch untersucht werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 BESCHREIBUNG DER ISOGENEN UND TRANSGENEN MAISHYBRIDEN

Die isogenen und transgenen Maishybriden wurden 1999 auf benachbarten Feldern in Sachsen-Anhalt im Landkreis Köthen angebaut und als Körnermais geerntet. Die Maiskörner beider Sorten wurden bis zu einer Trockenmasse von ca. 87 % getrocknet. Die untersuchten Sorten Prelude (isogen) und Prelude NX6262 (transgen) entstanden aus Inzuchtlinien und Hybriden von einer Maislinie (*Zea Mays* L.CG 00256-176). Unter der Verwendung von Plasmiden, die Folgendes kodieren, wurde die isogene Ausgangslinie gentechnisch modifiziert (EC 1997):

- Kopie eines synthetischen verkürzten Gens (KOZIEL et al. 1993), das den aktiven Teil des CryIA(b)-delta-endotoxins darstellt, aus *Bacillus thuringiensis*,
- Kopie des Bar-Gens aus *Streptomyces hygroscopicus* (das eine Phosphinothricinacetyltransferase codiert),
- das prokaryoten Gen bla (das für eine beta-Lactamase, die Ampicillinresistenz hervorruft, codiert).

Die Größe des gesamten Maisgenoms wird mit ca. $2,5 \times 10^9$ Basenpaaren angegeben (FU und DOONER 2002). Die Größe des synthetischen verkürzten CryIA(b)-delta-endotoxin-Gen beträgt 3468 Basenpaare, wobei die synthetisierte Region die Nukleotide 1-1938 und die native Region die Nukleotide 1939-3468 umfasst (KOZIEL et al. 1997). Die Ablesung oder Transkription des Bt-Gens in der gentechnisch modifizierten Maispflanze wird durch einen pollenspezifischen Promotor einer maiseigenen Calcium-abhängigen Proteinkinase ermöglicht (HUPFER et al. 1998a).

3.2 EINGESETZTE FUTTERMITTEL

Zur Durchführung der Verdauungsversuche und des Mastversuches wurden Futtermischungen, mit einem Anteil von 70% Körnermais, hergestellt (Tabelle 2). Im Nährstoff- und Energiegehalt entsprechen die Futtermischungen den Empfehlungen und Bedarfsnormen für Mastschweine, veröffentlicht von der Gesellschaft für

Ernährungsphysiologie (GFE 1987). Es wurden in der Mahl- und Mischanlage des Instituts für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft jeweils zwei (isogen vs. transgen) Mischungen Anfangsmastfutter und zwei Mischungen Endmastfutter hergestellt. Die Futtermischungen mit isogenem Körnermais wurden, um Kontaminationen mit transgenem Material zu vermeiden, zuerst gemahlen (Hammermühle, Typ 840, *MIAG* Braunschweig, Germany) und gemischt (1600 l Mischer, *DRAIS-WERKE*, Mannheim, Germany). Zur Minimierung einer futterbedingten Staubentwicklung im Stall erfolgte der Zusatz von Rapsöl zu den Mischungen. Während der gesamten Dauer des Versuches lagerten die isogenen und transgenen Futtermischungen getrennt in separaten Räumen sowie in geschlossenen Stahlcontainern. Zur Bereitstellung der täglichen und individuellen Einzelrationen wurden unabhängige Systeme zur Einwaage und Vorlage benutzt.

3.3 CHEMISCH-ANALYTISCHE UNTERSUCHUNG DER MAISHYBRIDEN UND FUTTERMISCHUNGEN

Zur Bestimmung der Inhaltsstoffe der Maishybriden und der Futtermischungen (Punkt 3.2) wurden jeweils von der isogenen und von der transgenen Charge eine repräsentative Probe entnommen. Für die Analyse der Roh Nährstoffe wurden die Proben mittels Analysenmühle (*Fa. Retsch*, Haan, Modell ZM 100) auf eine Größe von 1 mm bzw. zur Bestimmung von Zucker, Stärke, Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) und Aminosäuren auf eine Größe von 0,5 mm vermahlen. Von allen Proben wurde der Gehalt an Roh Nährstoffen, Stärke, Zucker und das Aminosäurenmuster sowie von beiden Maishybriden das Fettsäurenmuster untersucht. Weiterhin wurde in allen Proben der Gehalt an Phosphor, Calcium, Magnesium und Kalium analysiert. Diese Inhaltsstoffe wurden nach den im Methodenbuch der VDLUFA (NAUMANN und BASSLER 1997) beschriebenen Verfahren bestimmt, jedoch wurde die Veresterung der Fettsäuren zu Fettsäuremethylester mit Trimethylsulfoniumhydroxid übereinstimmend mit der Methode von SCHULTE und WEBER (1989) durchgeführt. Die Bestimmung der NSP erfolgte nach der von THEANDER et al. (2002) beschriebenen Methode.

Darüber hinaus erfolgte in den Körnern beider Maishybriden die Bestimmung des Gehaltes an den Mykotoxinen Zearalenon und Deoxynivalenol mit der Methode von VALENTA und OLDENBURG (1995) und VALENTA et al. (2002).

Tabelle 2 Zusammensetzung der Futtermischungen für Schweine und deren Gehalt an umsetzbarer Energie (ME)

Komponenten		Anfangsmast	Endmast
Körnermais (isogen oder transgen)	%	70,00	70,00
Erbsen	%	10,00	17,05
Kartoffeleiweiß	%	5,50	2,50
Fischmehl	%	5,50	2,50
Weizenkleie	%	5,25	5,00
Mineral/Vitamin Premix ²	%	2,50	2,00
Rapsöl	%	0,75	0,50
Lysinmonohydrochlorid	%	0,30	0,15
DL-Methionin	%	0,10	0,05
L-Threonin	%	0,05	-
L-Tryptophan	%	0,05	0,05
Ca-Carbonat	%	-	0,20
ME ¹	MJ/kg	13,7	13,6
	MJ/kg T	15,4	15,4

¹ Berechnet nach der Formel der GfE (1987) und den Daten der DLG-Futterwerttabellen (1991)

² Pro kg Premix: 245 g Calcium, 60 g Phosphor, 55 g Natrium, 10 g Magnesium, 400,000 I.U. Vit. A, 40,000 I.U. Vit. D₃, 1200 mg Vit. E, 37,5 mg Vit. B₁, 100 mg Vit. B₂, 100 mg Vit. B₆, 750 µg Vit B₁₂, 52,5 mg Vit. K, 500 mg Nikotinsäure, 337,5 mg Ca-Pantothenat, 5000 mg Cholinchlorid, 4000 mg Eisen, 1000 mg Kupfer, 2000 mg Mangan, 4000 mg Zink, 50 mg Jod, 15 mg Selen

3.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGISCHEN BEWERTUNG

3.4.1 VERSUCHSTIERE, HALTUNG UND FÜTTERUNG

Zur ernährungsphysiologischen Bewertung wurden mit zwölf männlichen Kastraten einer Mehr Rassengebrauchskreuzung (Vaterlinie (Pietrain x Hampshire) x Mutterlinie (Large White x Deutsche Landrasse)) im Lebendmassebereich von 38 bis 90 kg Verdauungsversuche nach den von SCHIEMANN (1981) veröffentlichten methodischen Richtlinien durchgeführt. Die Lebendmassen der Tiere zu Beginn und Ende der Versuche und die in den einzelnen Sammelperioden zugeteilten Futtermengen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3 Gruppeneinteilung, Lebendmassebereich und Futterzuteilung in den Verdauungsversuchen

	Gruppe	n	Mais	LM Beginn [kg]	Futtermenge [g/d]	LM Ende [kg]
1. Periode	A	6	Isogen	37,9 ±1,3	1700	48,4 ±1,6
	B	6	Transgen	40,2 ±1,2	1700	51,1 ±1,4
2. Periode	A	6	Isogen	59,0 ±2,1	2300	70,9 ±2,6
	B	6	Transgen	62,1 ±1,4	2300	72,6 ±2,1
3. Periode	B	5	Isogen	80,3 ±2,0	2500	89,5 ±2,2
	A	6	Transgen	77,6 ±1,9	2500	88,7 ±3,0

In einer Vorfütterungsperiode erhielten alle Tiere über einen Zeitraum von 13 Tagen die Anfangsmastmischung mit isogenem Mais. Während dieser Zeit waren die Tiere in einstreulosen Einzelboxen eines klimatisierten Stalles (23°C, Luftfeuchte 60 %) untergebracht. Im Anschluss wurden die Tiere für 11 Tage in Stoffwechselkästen aufgestellt (FARRIES und OSLAGE 1961). Nach einer Adaptionszeit von jeweils drei Tagen folgten die Bilanzperioden über einen Zeitraum von acht Tagen, in denen Kot und Harn getrennt gesammelt wurden. Täglich zweimal wurde während der Sammelperiode die Kotmenge erfasst und bis zur Analyse der Inhaltstoffe bei -18°C aufbewahrt. Die Tiere wurden zu Beginn und am Ende jeder Bilanzperiode vor der Morgenfütterung nüchtern gewogen. Die Fütterung erfolgte zweimal pro Tag (6.30 und 14.30 Uhr). Die Durchführung der 2. und 3. Periode des Verdauungsversuches war analog zum Ablauf der 1. Periode. In der ersten Periode erhielten die Tiere die Anfangsmastmischung und in den beiden folgenden Perioden die Endmastmischung. Die Tiere erhielten restriktiv Futter und Wasser im Verhältnis von 2:1 zur jeweiligen Futtermenge, wobei das Fütterungsniveau auf 750 g mittlere tägliche Lebendmassezunahme bei 2,3-fachem Erhaltungsbedarf ausgelegt war.

3.4.2 VERDAULICHKEIT DER ROHNÄHRSTOFFE

Zur Analyse der Roh Nährstoffe wurde der von jedem Schwein gesammelte Kot aufgetaut, gewogen und in einem Kutter homogenisiert. Es erfolgte die Entnahme einer Mischprobe. Zur Vermeidung von Verlusten, insbesondere an Stickstoff, wurde in einem Teil dieser

frischen Mischprobe der Stickstoffgehalt bestimmt (Abschnitt 3.3) Der verbleibende Teil der Mischprobe wurde gefriergetrocknet und im Anschluss für die analytischen Untersuchungen vermahlen (Abschnitt 3.3).

Aus den Differenzen der Rohnährstoffaufnahme mit den Futtermischungen und den im Kot ausgeschiedenen Rohnährstoffen ergaben sich die Verdaulichkeitsquotienten für die Organische Masse, das Rohprotein, das Rohfett, die Rohfaser und die N-freien Extraktstoffe (SCHÜRCH 1969). Aus den Rohnährstoffgehalten und den ermittelten Verdaulichkeitsquotienten errechnete sich der Gehalt an Umsetzbarer Energie auf der Grundlage der von der GFE (1987) publizierten Gleichung.

3.5 FÜTTERUNGSVERSUCH

Das Ziel des Versuches bestand im Vergleich der Mastleistungsparameter bei Schweinen nach der Verfütterung von Mischungen mit isogenem oder transgenem Mais über einen Zeitraum von 91 Tagen. Darüber hinaus erfolgte im Verlauf der Schlachtung die Probennahme der zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der letzten Fütterung einer maishaltigen Diät geschlachteten Versuchtiere. Die gewonnenen Proben dienten Untersuchungen zum Verbleib und Abbau der Nahrungs-DNA im Tierkörper.

3.5.1 VERSUCHSTIERE, HALTUNG

Im Mastversuch wurden 48 weibliche Schweine der im Punkt 3.4.1 beschriebenen Mehrzweckgebrauchskreuzung eingesetzt. Die mittlere Lebendmasse der Tiere betrug zu Versuchsbeginn 23,9 kg (\pm 3,0 kg). Der Versuch wurde über 91 Tage in der Versuchsanlage des Instituts für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft durchgeführt. Die Schweine wurden in Einzeltierhaltung in mit Nippeltränken ausgestatteten einstreulosen Einzeltierboxen mit einer Grundfläche von 2,6 m² / Box gemästet. Diese Art der Aufstallung erlaubte die tierindividuelle Erfassung der täglichen Futteraufnahme und die Beurteilung des Gesundheitszustandes. Die Gesamtkapazität der Mastanlage betrug 96 Einzelboxen, unterteilt in 24 Boxen in vier Reihen. Die Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Um die Möglichkeit einer Kontamination zwischen den Futtermischungen mit isogenem und transgenem Mais beider Gruppen zu minimieren, wurde zwischen beiden Gruppen eine Boxenreihe nicht besetzt.

3.5.2 FUTTERMISCHUNGEN UND FÜTTERUNG

Neben der Mastleistung beim Einsatz von Futtermischungen mit isogenem oder transgenem Mais, stellte besonders der Verbleib von gentechnisch veränderter DNA im Tierkörper ein wesentliches Untersuchungskriterium dar. Um den Einfluss auf den Abbau und den Verbleib der DNA aus dem Bt-Mais von der Dauer verschiedener Absetzzeiten der transgenen Futtermischung bis zur Schlachtung zu untersuchen, wurde eine größere Anzahl der Versuchstiere mit Bt-Mais gefüttert. Im Versuchszeitraum erhielt eine Gruppe (n = 12) die Anfangs- und Endmastfuttermischung mit isogenem Mais, die zweite Gruppe (n = 36) die Futtermischungen mit transgenem Mais. Die Zusammensetzung der Versuchsfuttermischungen für die gewählte Zweiphasenmast ist der Tabelle 2 zu entnehmen. Beide Anfangs- (< 80 kg Lebendmasse) und Endmastfuttermischungen waren im Energie- und Proteingehalt gleich (isoenergetisch und isonitrogen). Gefüttert wurde semi ad libitum mit dem Ziel, im Mittel der gesamten Mastperiode eine mittlere Lebendmassezunahme von 800 g je Tier und Tag zu erreichen. Die Menge der Futterzuteilung für jedes Tier erfolgte in Abhängigkeit von den wöchentlich ermittelten Lebendmassen. Die Tiere wurden zweimal pro Tag gefüttert (7.30 und 14.30 Uhr). Vor der Fütterung wurde, wenn vorhanden, die Menge an nicht gefressenem Futter tierindividuell erfasst und nach der Bestimmung der Trockenmasse bei der Erfassung der täglichen Futteraufnahme berücksichtigt. Zur Beschreibung des Wachstumsverlaufs sowie zur Festlegung der Futtermenge in Abhängigkeit von den individuellen Lebendmassen wurden alle Tiere einmal wöchentlich vor der Morgenfütterung gewogen.

3.5.3 SCHLACHTUNG

Die Schlachtung aller Tiere wurde im institutseigenem Schlachthaus durchgeführt und erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung der letzten maishaltigen Diät. In Abbildung 3 und Tabelle 4 sind die wesentlichen Daten zur Schlachtung dargestellt. Neben der Erfassung der Schlachtleistung bestand das vornehmliche Ziel der Schlachtung in der Gewinnung von Probenmaterial aus dem Inhalt des GIT, ausgewählter Organe und Gewebe sowie wertvoller Fleischteile.

Jeweils sechs Tiere der Kontrollgruppe und der Bt-Gruppe wurden 4 und 8 Stunden nach der letzten Fütterung der maishaltigen Diät geschlachtet. Von den verbleibenden Tieren der Bt-Gruppe wurden jeweils sechs Tiere 12, 24, 48 und 72 Stunden nach der letzten

Fütterung mit Bt-Maismischungen geschlachtet. Bis zur Schlachtung erhielten die Tiere mit dem Schlachtzeitpunkt 24, 48 und 72 Stunden eine maisfreie Futtermischung. In der maisfreien Futtermischung wurde der Bt-Maisanteil durch 45 % Gerste und 25 % Weizen ersetzt.

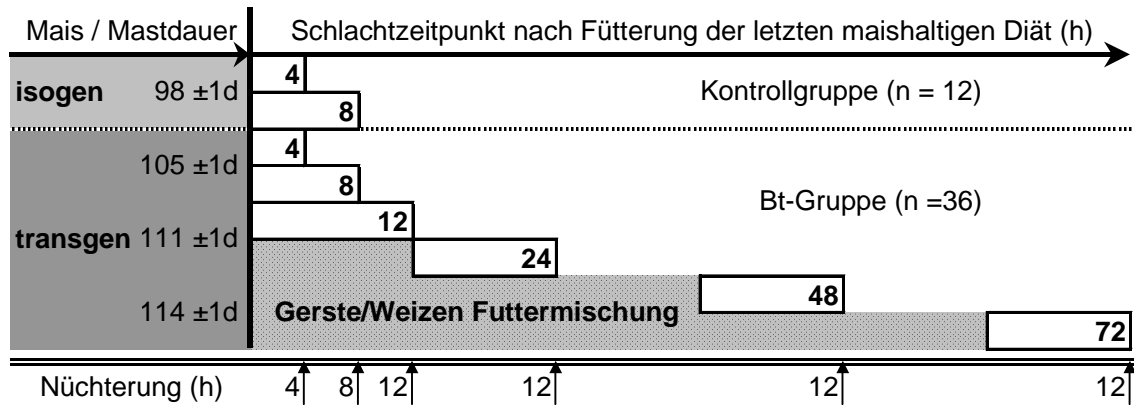


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Dauer des Mastversuches und der Schlachtzeitpunkte nach Fütterung der letzten maishaltigen Diät sowie Dauer der Nüchterung

Um im Schlachtprozess Kontaminationen zwischen den Schlachtkörpern und Proben der mit isogenem und transgenem Mais gefütterten Tiere zu vermeiden, wurden die Tiere der Kontrollgruppe zeitlich getrennt vor den Tieren der Bt-Gruppe geschlachtet. Die Kapazität im Schlachtprozess betrug aufgrund der diffizilen Probenentnahme und -behandlung (siehe Punkt 3.5.3.2) maximal 4 Tiere pro Tag. Infolgedessen erfolgte die Schlachtung der Tiere der Kontrollgruppe (4 und 8 h) am 98 ±1 Versuchstag, gefolgt von den Tieren der Bt-Gruppe mit dem Schlachtzeitpunkt 4 und 8 h nach der letzten Fütterung am 105 ±1 Versuchstag. Die Tiere der Bt-Gruppe mit dem Schlachtzeitpunkt 12 und 24 h nach der letzten Fütterung der Mais-Diät wurden am Versuchstag 111 ±1 geschlachtet, während die Schlachtung von jeweils 2 Versuchstieren der Gruppe 48 und 72 h am 113, 114 und 115 Versuchstag stattfand.

Tabelle 4 Anzahl der Versuchstiere je Schlachtzeitpunkt [h] nach Fütterung der letzten maishaltigen Diät

Zeitpunkt der Schlachtung	[h]	4	8	12	24	48	72
Kontrollgruppe	n	6	6	-	-	-	-
Bt-Gruppe	n	6	6	6	6 ¹	6 ¹	6 ¹

¹ Schweine erhielten nach dem Absetzen der Futtermischung mit transgenem Mais bis zur Schlachtung eine maisfreie, durch Gerste und Weizen substituierte, Futtermischung

3.5.3.1 ERFASSUNG VON SCHLACHTDATEN UND ORGANMASSEN

Vor der Schlachtung wurden die Lebendmasse der Tiere erfasst. Nach der elektrischen Betäubung und der anschließenden Tötung durch Blutentzug erfolgte die Entnahme der Organe des Bauchraumes. Es wurden die Nierenfettmasse sowie die Massen von Herz, Leber und Nieren aufgezeichnet. Nach der Bestimmung der Massen der warmen Schlachtkörperhälften (HCW) 45 min post mortem wurden diese bei $\leq 7^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Von den kalten Schlachtkörperhälften (CCW) wurde 24 h post mortem die Masse erfasst.

3.5.3.2 PROBENENTNAHME WÄHREND DER SCHLACHTUNG

Für die Probenentnahme fanden sterile Einwegmaterialien und Gläser Verwendung. Nicht autoklavierbare Werkzeuge, wie z. B. Fleischermesser wurden in Gefäßen mit Ethanol (70% v/v $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) bis zur einmaligen Benutzung aufbewahrt. Um Kontaminationen zwischen den Proben von verschiedenen Tieren zu vermeiden, fand vor und nach jeder Probenentnahme von verschiedenen Tieren eine Behandlung der Arbeitsflächen mit Ethanol statt. Arbeitstische mit direktem Probenkontakt waren mit Einwegkunststofffolien abgedeckt, welche nach jedem Versuchstier gewechselt wurden. Im gesamten Prozess der Schlachtung und Probenentnahme trugen alle Mitarbeiter Einweghandschuhe. Die Einweghandschuhe wurden bei direktem Kontakt nach jeder Probe gewechselt. Die Proben lagerten unmittelbar nach der Entnahme bis zur DNA-Extraktion bei -21°C in verschließbaren Röhrchen (50 ml, *Sarstedt*, Nümbrecht, Germany). Proben wurden sowohl von Organen (Blut, Leber, Lymphknoten (Mesenterial-Lymphknoten im Bereich des Dünndarmes), Milz, Niere, Ovarien), als auch von Geweben (Musculus longissimus dorsi, Musculus trapezius und gluteus maximus) und vom Inhalt des Magen-Darm-Traktes (Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon, Rectum) entnommen. Weiterhin wurden nach der Erfassung der Schlachtkörpermassen 24 h p.m. von den linken Schlachtkörperhälften die Keulen abgetrennt und in Einzelteilstücke zerlegt. Zielstellung bei der Fleischwertsortierung war die Gewinnung von definierten Teilstücken für die Herstellung eines verarbeiteten Lebensmittels. Die bei der Zerlegung gewonnenen Hüftstücke lagerten bis zur weiteren Verarbeitung einzeln unter Vakuum verpackt bei -21°C . Zusammenfassend sind in Abbildung 4 alle im Schlachtprozess gewonnenen Proben dargestellt.

Abbildung 4 Darstellung der im Schlachtprozess gewonnenen Ingesta-, Organ- und Gewebeprobe sowie wertvoller Fleischteile

Inhalte aus Abschnitten des GIT	Organ- und Gewebeprobe	Wertvolle Fleischteile
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Magen ▪ Duodenum ▪ Jejunum ▪ Ileum ▪ Caecum ▪ Colon ▪ Rectum 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Blut ▪ Leber ▪ Lymphknoten ▪ Milz ▪ M. gluteus maximus ▪ M. long. dorsi ▪ M. trapezius ▪ Niere ▪ Ovarien 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hüftstück

3.6 HERSTELLUNG ROHER FLEISCHERZEUGNISSE

Die gefrorenen Hüftstücke wurden im Kühlraum bei Temperaturen $< 6^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Die Auswahl der Hüftstücke beschränkte sich auf Proben, die nachweislich pflanzliche DNA-Bruchstücke enthielten. Nach dem Temperatúrausgleich erfolgte Entnahme aus den Vakuumbuteln. Die Hüftstücke wurden mit Natriumchlorid trocken gesalzen und 2 Wochen im Kühlraum einzeln gereift. Anschließend lagerten die Hüftstücke nach dem Entfernen der Salzhüllen 1 Woche weiter im Kühlraum. Im Anschluss wurden die gesalzenen Hüftstücke in Wasserbädern zwei Stunden gewässert. Danach wurden die Schinkenspeckstücke in einer Rauch- und Kochanlage (ASR 1297 EL/WA, Maurer AG, Reichenau, Germany) fünf Stunden getrocknet und 7 Tage kalt bei $< 20^{\circ}\text{C}$ geräuchert. Das Ziel der Herstellung bestand in der Gewinnung von Probematerial aus einem Lebensmittel mit niedrigem technologischen Verarbeitungsgrad für die Untersuchung von möglichen Rückständen der aus dem Futter in den Körper der Versuchstiere gelangten „Fremd“-DNA.

3.7 DNA-ANALYTIK

Für alle Stufen der DNA-Analytik wurden sterile Einwegmaterialien, sowie analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Chemikalien (inklusive H_2O) verwendet. Glasgefäße, Mörser und weitere Geräte wurden autoklaviert. Während aller Laborarbeiten wurden

Einweghandschuhe getragen. Um falsch-positive Signale durch Kontaminationen zu vermeiden, wurden die DNA-Extraktion und die weiterführenden Analysen (PCR, Gelelektrophorese, Restriktionsanalyse) und die damit verbundenen Arbeiten räumlich voneinander getrennt durchgeführt. Die Extraktion der DNA von isogenem Mais wurde zeitlich getrennt vor der DNA-Extraktion von transgenem Mais durchgeführt, ebenso wie die Extraktion von den Proben der Kontrollgruppe vor der Bt-Gruppe. Die Arbeitsflächen und Laborgeräte wurden vor und nach jeder Benutzung mit Ethanol (70 % v/v C₂H₅OH) gereinigt.

3.7.1 DNA-EXTRAKTION

Von beiden Maishybriden und der aus ihnen hergestellten Futtermischungen wurde die DNA unter Verwendung des kommerziellen Systems NucleoSpin Plant (*Macherey-Nagel*, Düren, Germany) extrahiert. Parallel wurden Proben der isogenen und transgenen Maishybriden unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zu feinsten Puder vermahlen und der gleichen, wie zuvor beschriebenen, DNA-Extraktion unterzogen. Zur Extraktion von DNA aus porcinen Organen und Geweben wurde das System NucleoSpin Tissue (*Macherey-Nagel*, Düren, Germany) verwendet. Für die Extraktion von DNA aus dem Chymus verschiedener Abschnitte des Magen-Darm-Traktes kam der QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (*Qiagen*, Hilden, Germany) zum Einsatz. Die Extraktion der DNA erfolgte in Übereinstimmung mit den Herstellerangaben.

Die Konzentration und die Reinheit der isolierten DNA-Moleküle wurde mit Hilfe der Absorptionsmessung bestimmt (SEGEL 1976). Die Konzentrationsbestimmung resultiert aus dem gemessenen Wert der optischen Absorption (Spectrophotometer: UV4, *ATI UNICAM*, Kassel, Germany) im UV-Bereich bei 260 nm. Die Reinheit der isolierten DNA wurde aus dem Verhältnis der Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm bestimmt. Parallel wurde die Qualität der isolierten DNA durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel (1 %) ermittelt.

3.7.2 OLIGONUKLEOTID PRIMER

Die Spezifität der PCR hängt entscheidend von der Struktur der eingesetzten Primer ab. Bei der Auswahl der Primer stellen die Nukleotidzusammensetzung bzw. -verteilung, die Schmelztemperatur sowie Wechselwirkungen zwischen beiden Primern wichtige Kriterien dar. Die vorwiegend verwendete Größe von Primern liegt im Bereich von 15 bis 30

Basenpaaren, wobei die Primer keine Eigenschaften zur Bildung von stabilen Sekundärstrukturen noch von Dimeren besitzen sollten. Für die Einstellung von optimalen Bedingungen im Verlauf einer PCR sollten die verwendeten Primer die gleiche Schmelztemperatur aufweisen.

Die eingesetzten Primer (Tabelle 5) wurden von *MWG Biotech*, Ebersberg, Deutschland synthetisiert, mit Wasser auf eine Konzentration von 50 pmol/μl eingestellt und aliquote Teile bei -21°C bis zur Benutzung gelagert. Es wurden fünf Primersysteme mit spezifischen Bindungsstellen an Zielsequenzen eingesetzt. Das Primerpaar Plant1 F/R stellt ein universelles Primersystem für Pflanzen dar und rahmt in seiner Zielsequenz ein Fragment des Chloroplasten-Gens ein (TABERLET et al. 1991). In verschiedenen Pflanzenspezies amplifiziert dieses Primerpaar ein Produkt mit ungleicher Fragmentgröße (EINSPANIER et al. 2001). Die Ergebnisse bereits sequenzierter Chloroplasten-Gene sind in der NCBI Gen-Bank Datenbasis (für Mais: Genbank-Nr. V00178; STEINMETZ et al. 1982) und für Gerste: Genbank-Nr. AF280795) veröffentlicht. Die Zielsequenz des Primerpaares Ivr1 F/R (EHLERS et al. 1997) ist ein Fragment aus dem maisspezifischen Invertase-Gen (Genbank-Nr. U16123; XU et al. 1995). Dieses Gen wurde gewählt, um neben dem Fragment der gentechnischen Modifikation ein zusätzliches Einzelkopie-Gen mit nahezu gleicher Fragmentgröße zu amplifizieren. Zum Nachweis der gentechnischen Modifikation wurde das Primerpaar Cry 03/04 gewählt (HUPFER et al. 1998b). Cry 03/04 amplifiziert ein Fragment zwischen dem Übergang der benachbarten Promotorsequenz des calciumabhängigen Proteinkinase-Gens (CDPK) und der Struktursequenz (Cry1A(b) Gen), welches für die gentechnische Veränderung spezifisch ist.

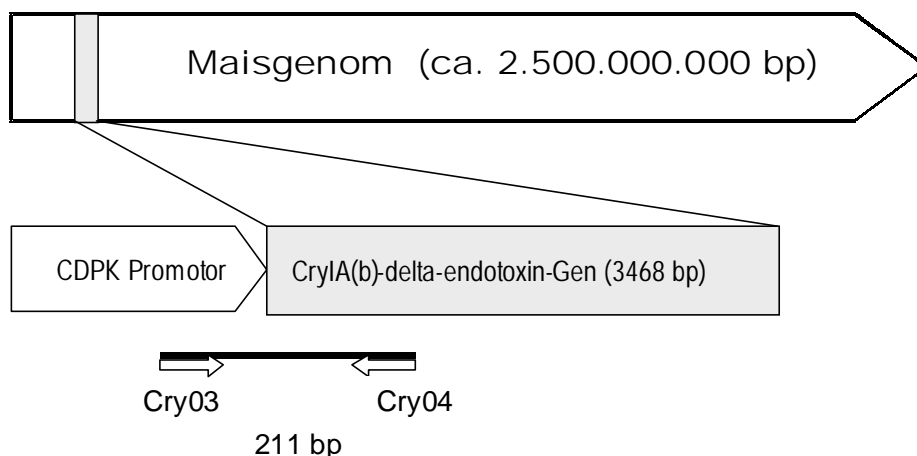


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Maisgenoms und ein Ausschnitt aus dem zusätzlich eingefügten Genkonstrukt im Bt-Mais sowie die Lage des Primerpaares Cry 03/04

Das Primerpaar Rub 01/02 ist ein universeller Pflanzenprimer und amplifiziert ein Fragment aus dem Chloroplasten-rbcL-Gen, welches die Information für Ribulose-biphosphat-carboxylase codiert (für Mais: Genbank-Nr. Z11973; GAUT et al. 1992).

Neben dem Nachweis von Sequenzen mit spezifischen Systemen, ist eine Kontrolle über die Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA notwendig. Als Kontrollsystem für die Amplifizierbarkeit aller porcinen Gewebeproben diente das Primerpaar SW 01/02 (MEYER et al. 1994), das ein Fragment des porcinen Wachstums-Hormon-Gens (Genbank-Nr. M17704; VIZE und WELLS 1987) einrahmt.

Tabelle 5 Oligonucleotide Primer

Name	Sequenz (5' - 3')	Produktgröße	Referenz
Plant 1-F	cga aat cgg tag acg cta cg	532 bp (Mais)	TABERLET et al. (1991)
Plant 1-R	ggg gat aga ggg act tga ac	642 bp (Gerste)	
Ivr 1-F	ccg ctg tat cac aag ggc tgg tac c	226 bp	EHLERS et al. (1997)
Ivr 1-R	gga gcc cgt gta gag cat gac gat c		
Cry 03	ctc tcg ccg ttc atg tcc gt	211 bp	HUPFER et al. (1998b)
Cry 04	ggg cag gct cag gct gat gt		
Rub 01	ctt ggc agc att ccg agt a	140 bp	Aulrich ¹
Rub 02	cct ttg taa cga tcaa gac tgg		
SW 01	tca gtt tac act cac ctg ata gca tct	108 bp	MEYER et al. (1994)
SW 02	ggg tgg tgg aga ggg gtg aat t		

¹ persönliche Mitteilung

3.7.3 POLYMERASE-KETTENREAKTION

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt (SAIKI et al. 1988) und ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt. Dieses Verfahren ermöglicht es, in vitro von bestimmten Nukleotidsequenzen millionenfach Kopien enzymatisch herzustellen. Bei diesem, als Amplifikation bezeichneten Vorgang, synthetisiert eine DNA-Polymerase einen neuen DNA-Strang, ausgehend von Startermolekülen (Oligonukleotide Primer), die an einer einzelsträngigen Matrizen-DNA hybridisieren.

Die PCR-Reaktionen wurden mit 2 µl extrahierter DNA (ca. 50 ng), 5 µl 10x PCR-Puffer (*Qiagen*, Hilden, Germany), 1 µl dNTP (Desoxynucleotidtriphosphate) Gemisch (10 mmol je dNTP; *MBI Fermentas*, St. Leon-Rot, Germany), 40 µl H₂O (*Eppendorf*, Hamburg, Germany) und 0,2 µl (1 Unit) DNA-Polymerase (HotStarTaq, *Qiagen*, Hilden, Germany) durchgeführt. HotStarTaq weist bei Raumtemperatur keine enzymatische Aktivität auf. Diese Polymerase wird erst durch Einwirkung einer Temperatur von 95°C über einen Zeitraum von 15 min aktiviert. Die programmierten Temperaturabläufe im Thermocycler (T-Gradient, *Biometra*, Göttingen, Germany) sind in Abbildung 7 dargestellt.

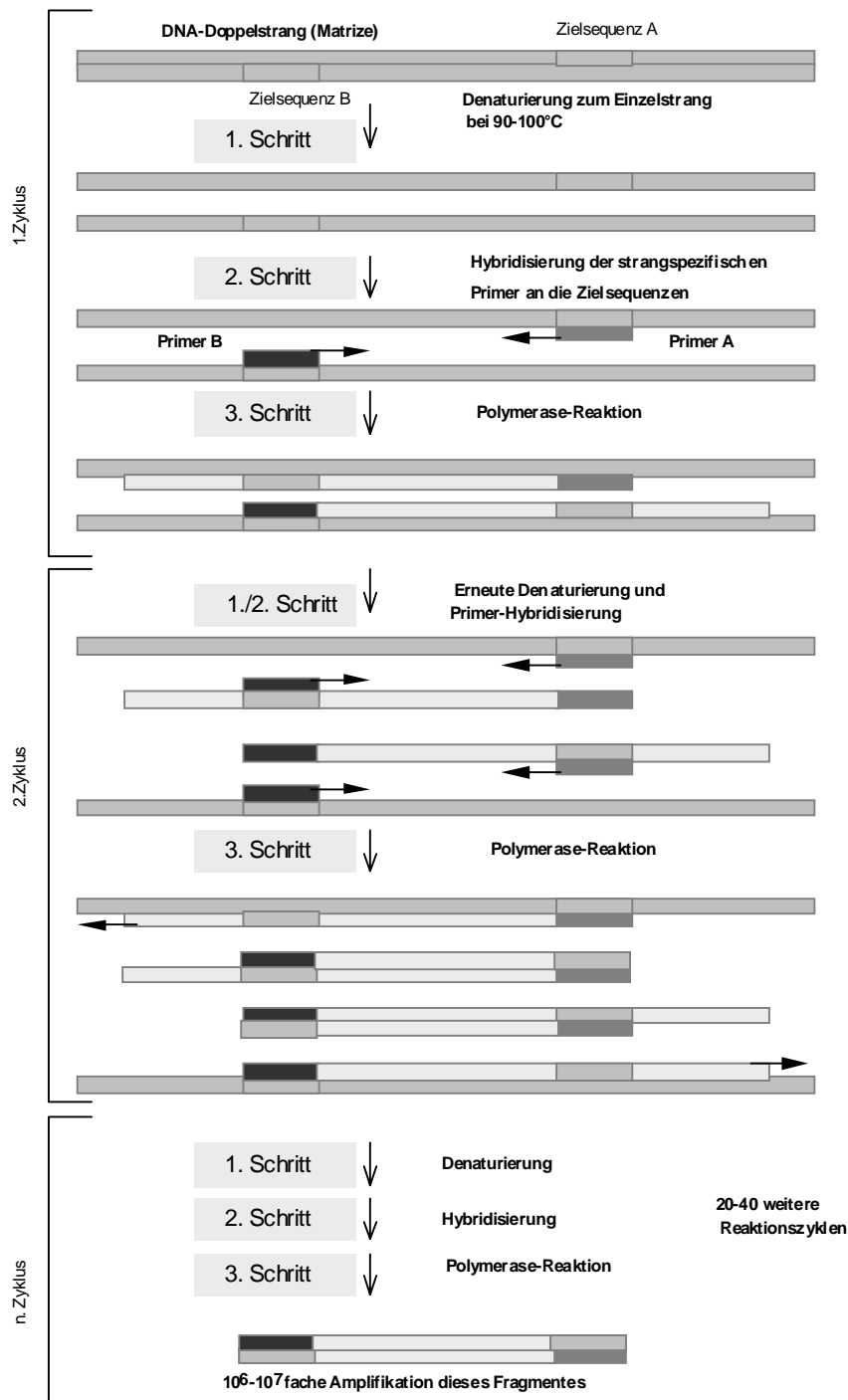


Abbildung 6 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (modifiziert nach GASSEN und HAMMES 2001)

1. Schritt: Die Matrizen-DNA wird durch Erhitzen in zwei Einzelstränge dissoziiert.
2. Schritt: An die somit einzelsträngigen DNA-Moleküle werden die strangspezifischen Primer hybridisiert. Dabei muss eine geeignete Temperatur ("Annealing"-Temperatur) gewählt werden, die nur die Hybridisierung der Primer an die vollständig komplementäre Zielsequenz zulässt. Als

Schmelztemperatur wird dabei diejenige Temperatur bezeichnet, bei der die betrachteten DNA-Moleküle zu 50 % denaturiert sind, also einzelsträngig vorliegen. Die Schmelztemperatur eines DNA-Doppelstranges bis zu einer Größe von etwa 25 bp kann annäherungsweise anhand der Zusammensetzung aus $G \equiv C$ und $A = T$ Paaren berechnet werden. Der Beitrag eines $G \equiv C$ Paares zur Schmelztemperatur beträgt etwa 4°C , der eines $A = T$ Paares 2°C . Bei den meisten PCR-Experimenten wird eine Annealing-Temperatur von 5°C unter der berechneten Schmelztemperatur gewählt. Bei dieser Temperatur wird ein Primer nur an seine vollständig komplementäre Sequenz binden, da bei Basenfehlpaarungen keine effiziente DNA-Doppelstrangbildung möglich ist. Bei zu niedrigen Temperaturen kann es jedoch auch zu unspezifischen Hybridisierungen mit anderen ähnlichen Sequenzbereichen der Matrizen-DNA kommen. Andererseits ist bei Temperaturen deutlich höher als die Schmelztemperatur die Hybridisierung mit den Zielsequenzen nicht effizient genug, und die Ausbeute der PCR wird sehr gering.

3. Schritt: Von den Primern aus wird durch eine Polymerase der Gegenstrang synthetisiert. Die Richtung der Polymerasereaktion wird durch den Pfeil an den Primern angezeigt. Die hierbei gewählte Temperatur ist abhängig vom Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase. Daran anschließend wiederholt sich der Zyklus von vorne. Mit steigender Zahl der Zyklen wird der Sequenzbereich zwischen den Zielsequenzen der Primer exponentiell amplifiziert (GASSEN und HAMMES 2001).

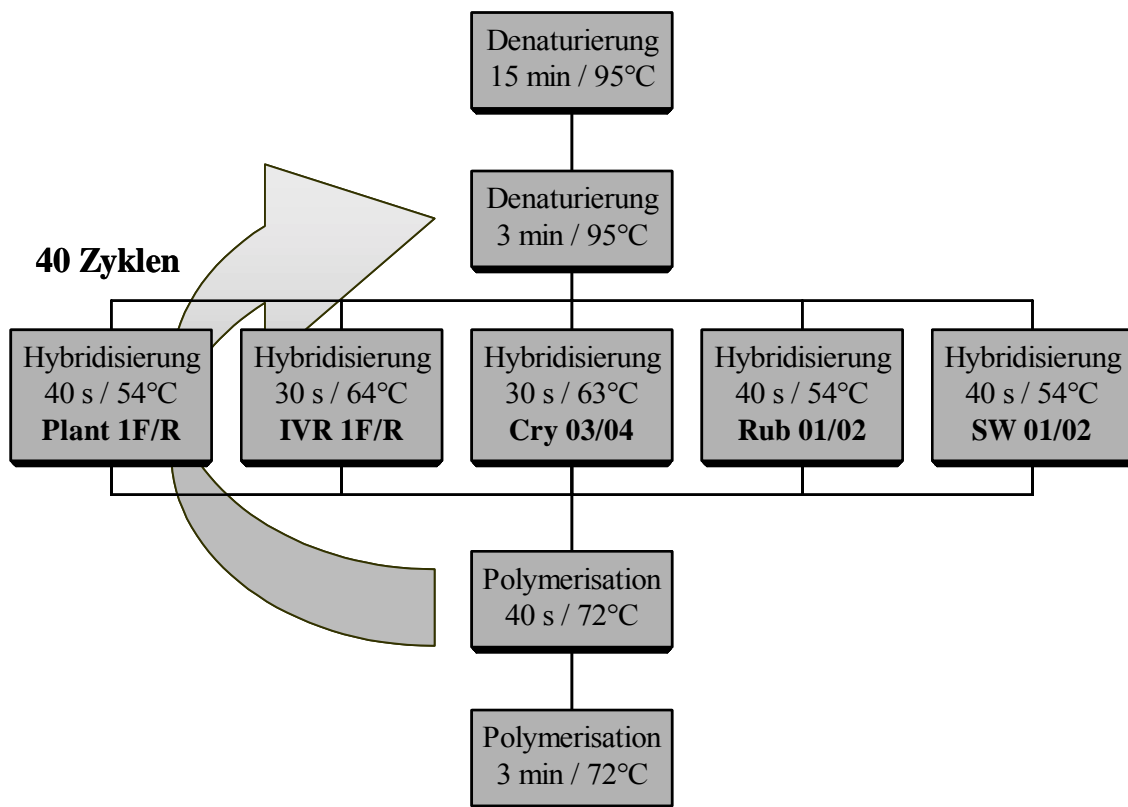


Abbildung 7 Programmierter Temperatur- und Zeitverläufe der angewandten PCR

3.7.4 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die Agarose-Gelelektrophorese stellt eine Methode zur Trennung und Identifizierung von extrahierten oder amplifizierten DNA-Molekülen, in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße dar (RICKWOOD und HAMES 1990). Durch die Variation der Agarosekonzentration können DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe separiert werden. Es wurden jeweils 8 µl extrahierter oder amplifizierter DNA-Lösung in der Gelelektrophorese verwendet. Die Probenlösung wurde mit 2 µl Probenauftragspuffer (50 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol) gemischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die im Probenauftragspuffer enthaltenen Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol dienen zur optischen Kontrolle der wandernden DNA-Fragmente im Agarosegel. In Gelen mit beispielsweise 2 % Agarose wandert Bromphenolblau etwa auf gleiche Höhe eines Fragmentes < 100 bp bzw. Xylencyanol auf der Höhe von 800 bp. Entsprechend der zu trennenden DNA-Fragmentgrößen wurden Gele mit 1 % (extrahierte DNA) und 2 % (amplifizierte DNA) Agarose mit 0,05 µg/ml

Ethidiumbromid in TBE-Puffer (89 mmol/l Tris, 89 mmol/l Borsäure, 2 mmol/l EDTA) hergestellt. Die DNA-Moleküle wurden elektrophoretisch bei konstant 50 V aufgetrennt. Zur Bestimmung der Molekülgröße wurden in jeder Elektrophorese Größenstandards (III, VIII und IX, *Roche*, Mannheim, Germany) in Probenauftragspuffer parallel zu den Proben aufgetrennt. Parallel zu extrahierter DNA wurde der Standard III mit DNA-Fragmenten der Größe 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831 und 564 bp verwendet. Der Standard VIII wies DNA-Fragmente mit der Größe 1116, 883, 692, 501, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 67 und 34 bp auf. Speziell für die Verifizierung kleiner Gen-Fragmente wurde neben dem Standard VIII zusätzlich der Standard IX mit einem ähnlichen Größenspektrum eingesetzt. Der Standard IX wies DNA-Fragmente mit der Größe 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 234, 194, 118 und 72 bp auf. Aufgrund der unterschiedlich großen DNA-Fragmente in beiden Standards konnte die Größe kleiner Fragmente im Agarosegel nach Ablauf der Elektrophorese besser beurteilt werden.

3.7.5 VERIFIZIERUNG DER PCR-PRODUKTE

Nachweisverfahren werden eingesetzt, um die Identität der Sequenz der amplifizierten DNA-Fragmente zu bestätigen. Die Verifizierung der enzymatisch vervielfachten DNA-Fragmente (Amplifikate) erfolgte mittels Restriktion sowie über Hybridisierung.

Die erste Prüfung stellte die elektrophoretische Auftrennung und Visualisierung der PCR-Produkte parallel zu einem definierten Größenstandard dar. Um falsch positive und falsch negative Reaktionen im Verlauf der PCR zu identifizieren, waren positive und negative Kontrollreaktionen ein Bestandteil jeder untersuchten Probenreihe. Als positive Kontrolle in der PCR wurde die aus Referenzproben extrahierte DNA verwendet. Als negative Kontrolle wurde dem Mastermix der PCR, bestehend aus Wasser, den beiden Primern, den Desoxynucleotidtriphosphate und der Polymerase, keine extrahierte DNA sondern Wasser zugesetzt. Nach erfolgter Visualisierung positiver DNA-Fragmente im Agarosegel wurde die Übereinstimmung der Fragmentgröße der Reaktionsprodukte aus dem Probenmaterial und der Referenzprobe verglichen. Zusätzlich diente der eingesetzte Größenstandard als Vergleichsindikator zur Bestimmung der Fragmentgröße. Mit Hilfe der Positivkontrolle bestand auch die Möglichkeit eventuell auftretende Fehlreaktion oder Produkte, die beispielsweise nach einer unspezifischen Primeranlagerung entstehen können, zu identifizieren. Anhand der jeweils mitgeführten Negativkontrolle wurde in Abwesenheit von

positiven Amplifikaten der Nachweis erbracht, dass alle verwendeten Chemikalien in der PCR nicht mit DNA oder DNA-Fragmenten verunreinigt waren bzw. keine als Matrix nutzbaren Moleküle enthielten. Dies wiederum erlaubte die Schlussfolgerung, dass der Ursprung der amplifizierten PCR-Produkte in einer Probenreihe ausschließlich in der jeweils zugesetzten extrahierten DNA lag.

Ausgangspunkt für die eindeutige Verifizierung war die Kenntnis der erwarteten Basenabfolge des PCR-Produktes. Anhand der bekannten Sequenz erfolgte die Auswahl einer produktspezifischen Schnittstelle.

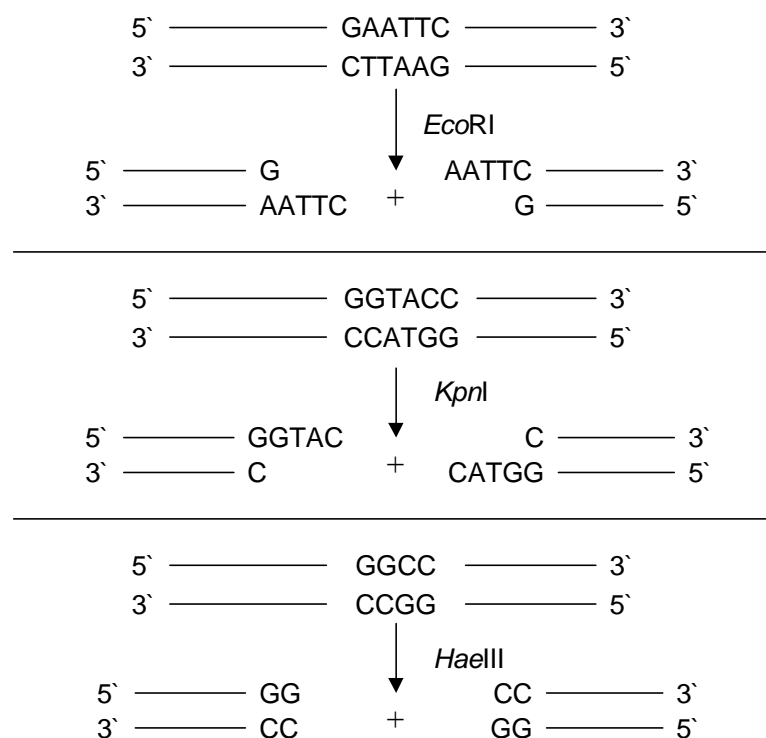


Abbildung 8 Drei Beispiele für Restriktionsschnittstellen (GASSEN und HAMMES 2001)

3.7.5.1 RESTRIKTIONSANALYSE

Mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen können DNA-Moleküle enzymatisch zwischen spezifischen Basenfolgen im Einzelstrang getrennt werden (Abbildung 8). Die Identität der amplifizierten DNA-Fragmente wurde mit ausgewählten Restriktionsenzymen (*MBI Fermentas*, St. Leon-Rot, Germany) bestätigt. Ausgewählt wurden Enzyme mit jeweils einer spezifischen Schnittstelle im PCR-Produkt.

Das PCR-Produkt aus der gentechnischen Veränderung (Bt-Gen, Primerpaar Cry 03/04) wurde mit dem Enzym *HaeIII*, das Rubisco-Gen-Fragment (Primerpaar Rub 01/02) mit *RsaI* sowie das Chloroplasten-Gen-Fragment (Primerpaar Plant1 F/R) mit *AluI* getrennt. Der Reaktionsansatz bestand aus 10 µl PCR-Produktlösung, 2 µl 10x Pufferlösung (*MBI Fermentas*, St. Leon-Rot, Germany), 1 µl Restriktionsenzym (10 u/µl) und 10 µl Wasser. Der Ansatz wurde 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Restriktionsenzyme 20 Minuten bei Temperaturen von 65°C (*AluI* und *RsaI*) bzw. bei 80°C (*HaeIII*) deaktiviert. Im Anschluss erfolgte die elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel (2 %) parallel zum Größenmarker XIII sowie die Visualisierung und Dokumentation der Reaktionsprodukte.

3.7.5.2 SOUTHERN-BLOT ANALYSE

Für den Southern-Blot werden DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht in Agarosegelen elektrophoretisch getrennt (SOUTHERN 1975). Die DNA wird anschließend auf eine Membran transferiert, fixiert und hybridisiert. Die verwendeten Sonden wurden mit radioaktiven [³²P]dCTP (30 µCi pro Ansatz, *Hartmann Analytic*, Braunschweig, Germany) markiert.

Als Membranen fand Nitrocellulose Verwendung. Der DNA-Transfer erfolgte im Kapillarblot-Verfahren. Die Hybridisierung wurde mit Formamid bei 42°C über Nacht durchgeführt. Die Waschzeiten betragen mit 2x SSC/ 0,1 % SDS 10 min bei Raumtemperatur, mit 0,5x SSC/ 0,1 % SDS für 10 min bei 37°C, mit 0,2x SSC/ 0,1 % SDS für 10 min bei 42°C. Abschließend wurden die Membranen exponiert und die Banden mit einem P-Imager der Firma *BioRad* (München, Germany) identifiziert und dokumentiert (SAMBROOK et al. 1989).

3.7.6 NACHWEISGRENZE

Für eine Verifizierung der Ergebnisse aus der angewandten PCR erfolgte mit Hilfe einer Referenzprobe die Bestimmung der Nachweisgrenze. Ziel der Untersuchung war die Ermittlung der quantitativ minimalen Menge an extrahierter DNA, die im angewandten System zu deutlich visuell auswertbaren Ergebnissen führt.

Die Nachweisgrenze in der PCR wurde mit extrahierter DNA in dekadischen Verdünnungsreihen ermittelt. Ausgangswert war der DNA-Gehalt in der Stammlösung, der aus der gemessenen Absorptionsrate bei A_{260} (Spectrophometer: UV4, *ATI UNICAM*, Kassel, Germany) resultierte. Für den Nachweis der Bt- und Rubisco-Gen-Fragmente wurde in der PCR extrahierte DNA aus der Referenzprobe (*Fluka*, Taufkirchen, Germany, mit 2 % Bt-176) eingesetzt.

3.8 STATISTIK

Die Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogrammpaket SAS 6.12 (SAS 1986). Zur Auswertung der Verdauungsversuche und des Mastversuches wurde ein Mittelwertvergleich mit t-Test gewählt. Als Signifikanzniveau wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p < 0,05$) angenommen. Im Mastversuch basieren die Ergebnisse aus der mittleren täglichen Lebendmassezunahme, der Futteraufnahme und dem Energieaufwand nach einer Mastdauer von 91 Tagen.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 INHALTSSTOFFE DER MAISHYBRIDEN

Die Ergebnisse der chemisch analytischen Untersuchungen der Körner beider Maishybriden sind in Tabelle 6 dargestellt. Für eine weiterreichende Evaluierung der gegenübergestellten Analysenergebnisse der beiden Maishybriden wurden zusätzlich die Daten der DLG-Futterwerttabellen für Mais (DLG 1991) in die Darstellung aufgenommen. Die DLG-Daten basieren auf Untersuchungen von 790 einzelnen Körnermaischargen, deren Genom keine gentechnischen Veränderungen enthielt. Die vergleichende Betrachtung der Analysendaten mit den DLG-Daten lässt eine Bewertung gegenüber den Gehalten der Inhaltsstoffe in Maiskörnern aus konventionellem Anbau zu.

Im Vergleich der Inhaltsstoffe weisen beide Maishybriden keine signifikanten Differenzen auf. Die Trockenmasse war zum Zeitpunkt der Untersuchung mit 871 g/kg in den Körner von beiden Maishybriden gleich. Identische Gehalte in beiden Chargen zeigten die Inhaltsstoffe Organische Masse mit 986 g/kg T und Zucker mit 19 g/kg T sowie die untersuchten Mineralstoffe Calcium, Phosphor, Magnesium und Kalium. Die maximale Abweichung, im Vergleich der Inhaltsstoffe beider Maishybriden (isogen vs. transgen) weisen die Ergebnisse bei der Analyse von Stärke (720 vs. 734 g/kg T) auf. Der analysierte Gehalt an Rohprotein in den isogenen Maiskörnern war mit 116 vs. 111 g/kg T lediglich geringfügig höher als in den transgenen Maiskörnern. Insgesamt kann bei einer vergleichenden Betrachtung der untersuchten und ernährungsphysiologisch wertgebenden Inhaltsstoffe beider Maishybriden von einer substanziellen Äquivalenz gesprochen werden. Dies bedeutet, dass die gentechnische Modifikation sowie die zusätzliche Proteinsynthese, resultierend aus der Transkription und Translation der eingefügten Gene, in der beschriebenen Maislinie zu keiner signifikanten Veränderung der Rohnährstoffgehalte im Vergleich zur isogenen Ausgangslinie führte.

Die analysierten Gehalte der isogenen und transgenen Maiskörner liegen im biologischen Schwankungsbereich der DLG-Tabellenwerte (DLG 1991). Bei der Betrachtung des biologischen Schwankungsbereiches darf jedoch nicht übersehen werden, dass herkömmliche Futtermittel eine erhebliche biologische Variabilität in den Inhaltsstoffen aufweisen (FLACHOWSKY und AULRICH 2001b). Diese biologische Variabilität könnte im Vergleich von isogenen und transgenen Futterpflanzen einer identischen Ausgangssorte bereits durch unterschiedliche Umwelteinflüsse am Wachstumsstandort hervorgerufen

werden. Abweichende Gehalte der Inhaltsstoffe resultieren beispielsweise aus der Qualität des Bodens oder der Bioverfügbarkeit von Wasser. Die Beurteilung der substanziellen Äquivalenz wäre somit schwierig durchzuführen.

Die analysierten Gehalte der Inhaltsstoffe in Tabelle 6 stimmen gut mit den Ergebnissen von AULRICH et al. (2001) überein. Analog zu den Ergebnissen anderer Autoren (BRAKE und VLACHOS 1998; HALLE et al. 1998; TONY et al. 2002) konnten keine signifikanten Unterschiede im Gehalt der Inhaltsstoffe von isogenem und transgenem Körnermais festgestellt werden.

Tabelle 6 Ausgewählte Inhaltsstoffe und ME in isogenem und transgenem Mais (Tabellenwerte zum Vergleich, DLG 1991)

Analyse (n=2)		Mais		Tabellenwert ¹
		isogen	transgen	
Trockenmasse	g/kg ²	871	871	880
Organische Masse	g/kg T	986	986	983 ±6
Rohasche	g/kg T	14	14	17 ±6
Rohprotein	g/kg T	116	111	106 ±12
Rohfett	g/kg T	48	48	49 ±11
Rohfaser	g/kg T	23	20	26 ±8
NfE	g/kg T	799	807	805 ±23
Stärke	g/kg T	720	734	695 ±36
Zucker	g/kg T	19	19	19 ±5
NSP (total)	g/kg T	65	63	-
Arabinose	g/kg T	16	14	-
Xylose	g/kg T	20	19	-
Glucose	g/kg T	21	22	-
Ca	g/kg T	0,1	0,1	-
P	g/kg T	3,1	3,1	-
Mg	g/kg T	1,1	1,1	-
K	g/kg T	3,4	3,4	-
ME	MJ/kg ²	13,9	13,9	14,0
	MJ/kg T	15,9	15,9	16,0

¹ DLG-Futterwerttabellen (1991, n = 790)

² Frischmasse

Die Rohproteinqualität eines Futtermittels wird wesentlich durch das Muster der Aminosäuren bestimmt. Speziell für die suidengerechte Fütterung stellen der Anteil und das Verhältnis essentieller Aminosäuren in Futtermitteln einen limitierenden Faktor für die Eiweißsynthese im Leistungsstoffwechsel dar.

Die Aminosäuregehalte beider Maishybriden sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Summe der analysierten Gehalte einzelner Aminosäuren entspricht 11,38 % vs. 10,81 % der Trockenmasse, bzw. 98,2 % vs. 97,7 % des analysierten Rohproteingehaltes, wobei der Gehalt an Tryptophan nicht bestimmt wurde. Die Gehalte der analysierten Aminosäuren weisen zwischen beiden Maishybriden keine oder nur geringe Differenzen auf. Der Glutaminsäuregehalt zeigte mit einer Differenz von 0,2 Prozentpunkten die maximale Abweichung. Bei den weiteren Differenzen beträgt die Abweichung maximal 0,09 Prozentpunkte.

Alle Gehalte der analysierten Aminosäuren in beiden Maishybriden liegen im Vergleich mit den Tabellendaten von HEIMBECK und BALSCHUKAT (1996) oberhalb der mittleren Gehalte bzw. sind im Arginingehalt identisch. Gehalte einzelner Aminosäuren liegen bei beiden Maishybriden geringfügig oberhalb der Maximalwerte der Tabellendaten. Die prozentuale Verteilung der analysierten Fettsäuren (Tabelle 8) in den Proben von isogenen und transgenen Maiskörnern zeigt ein nahezu identisches Muster. Im Fettsäurenmuster stellen die beiden ungesättigten Fettsäuren Ölsäure und Linolsäure mit einem Anteil von 30 % bzw. 50 % die größten Fraktionen dar. Diese Werte, wie auch die Konzentrationen der weiteren analysierten Fettsäuren Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolensäure reihen sich gut in die Ergebnisse anderer Autoren (AULRICH et al. 2001; FLACHOWSKY und JAHREIS 1997; JEROCH et al. 1999) ein, wobei lediglich der um 2 Prozentpunkte geringere Anteil an Stearinsäure im Fettsäurenmuster zu den Untersuchungsergebnissen von AULRICH et al. (2001) differiert.

Tabelle 7 Aminosäuregehalt der isogenen und transgenen Maishybriden (n=2)

		Mais		Tabellenwerte ¹		
		isogen	transgen	MW	Min	Max
Alanin	g/kg T	8,9	8,5	6,3	4,5	8,3
Arginin	g/kg T	4,0	4,0	4,0	2,5	5,1
Asparaginsäure	g/kg T	7,5	7,2	5,8	4,0	7,2
Cystin	g/kg T	2,3	2,2	1,9	1,5	2,4
Glutaminsäure	g/kg T	24,7	22,7	15,6	11,5	20,4
Glycin	g/kg T	3,7	3,5	3,3	2,2	4,6
Histidin	g/kg T	3,2	3,0	2,6	2,1	3,5
Isoleucin	g/kg T	3,9	3,8	2,9	2,1	3,9
Leucin	g/kg T	15,8	14,9	10,5	7,5	14,8
Lysin	g/kg T	2,6	2,8	2,5	1,6	3,4
Methionin	g/kg T	1,9	1,8	1,8	1,3	2,4
Phenylalanin	g/kg T	5,8	5,5	4,2	2,8	5,7
Prolin	g/kg T	9,8	9,4	7,6	5,8	10,5
Serin	g/kg T	5,6	5,2	4,1	2,9	5,3
Threonin	g/kg T	4,1	3,9	3,1	2,2	3,9
Tyrosin	g/kg T	4,4	4,4	3,2	2,4	4,1
Valin	g/kg T	5,6	5,2	4,1	3,1	5,3
Summe		113,8	108,0	83,5	60,0	110,8

¹ HEIMBECK und BALSCHUKAT (1996, n = 173)

Tabelle 8 Ausgewählte Fettsäuren der isogenen und transgenen Maishybriden

	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
	————— % der Gesamtfettsäuren —————				
isogener Mais	13,2	2,2	30,4	50,2	1,0
transgener Mais	12,7	2,0	29,6	50,9	1,0

Die analysierten Gehalte der Mykotoxine Zearalenon (ZON) und Deoxynivalenol (DON) sind in Tabelle 9 dargestellt. In transgenem Mais konnten beide Mykotoxine nicht nachgewiesen werden, ihre Gehalte lagen unterhalb der Nachweisgrenze für ZON mit 1-2 µg/kg T bzw. für DON mit 0,03-0,05 mg/kg T (VALENTA et al. 2002; VALENTA und OLDENBURG 1995). Im isogenen Mais betrug der Gehalt 3,0 µg ZON/kg 88% T bzw. 343 µg DON/kg 88 % T. Vergleichbare Ergebnisse wurden von BAKAN et al. (2002), DUVICK (2001) und MUNKVOLD und HELLMICH (1999) publiziert, die in isogenem Mais ebenso höhere Mykotoxingehalte als in transgenem Mais feststellten. Bei einem Anteil von 70% isogenem Mais im Futter beträgt demnach die Kontamination 2,1 µg ZON/kg bzw. 240 µg DON/kg in der Anfangs- und Endmastmischung (88 % T).

Das Bundesministerium für Landwirtschaft (BML 2000) empfiehlt als Orientierungswert für kritische Konzentration in kompletten Futtermischungen (88 % T) für Mastschweine einen maximalen Gehalt von 250 µg ZON/kg and 1000 µg DON/kg. Der im Vergleich zum Orientierungswert geringere Mykotoxingehalt lässt einen Einfluss auf Leistungsparameter im Fütterungsversuch nicht erwarten.

Beim Vergleich aller Inhaltsstoffe stellt alleinig der abweichende Mykotoxingehalt zwischen beiden Maishybriden einen Unterschied dar. DOWD (2000) untersuchte in mehrjährigen Studien den Einfluss unterschiedlicher Belastungen von isogenen Hybriden und Bt-Hybriden mit Maiszünsler auf die Mykotoxinkontamination und konnte trotz erheblicher Variation bei der transgenen Hybride eine geringere Mykotoxinbelastung beobachten. Dies könnte ein Vorteil für Bt-Mais sein, da aufgrund der reduzierten Fraßschäden ein verminderter Befall mit Fusarien eintreten kann, die über verletztes Gewebe in die Maispflanze eindringen und gesundheitsschädliche Mykotoxine bilden können. Im Ergebnis würde beim Einsatz von Bt-Mais ein weniger belastetes Nahrungsmittel für Mensch und Tier zur Verfügung stehen, denn wie die Studien mit Nutztieren von PIVA et al. 2001a; b) gezeigt haben, kann ein geringerer Mykotoxingehalt im Futter zu einer stabileren Gesundheit und besseren Entwicklung von Ferkeln und Masthühnern führen.

Tabelle 9 Gehalt an Zearalenon (ZON) und Deoxynivalenol (DON) im verwendeten Mais und deren kritische Konzentration in Futtermischungen für Mastschweine

			ZON	DON
Mais	isogen	µg/kg 88% T	3,0	343
Mais	transgen	µg/kg 88% T	u. N. ³	u. N. ³
Futtermischung ¹	isogen	µg/kg 88% T	2,1	240
Futtermischung ¹	transgen	µg/kg 88% T	u. N. ³	u. N. ³
Orientierungswert ²		µg/kg 88% T	250	1000

¹ Maisabhängige Konzentration

² Kritische Konzentration in Futtermischungen für Mastschweine (BML 2000)

³ Unterhalb der Nachweisgrenze (Valenta und Oldenburg 1995; Valenta et al. 2002)

Die Zusammensetzung und der Gehalt ausgewählter Inhaltsstoffe, speziell der untersuchten Rohrnährstoffe, Mineralstoffe, Aminosäuren und Fettsäuren in gentechnisch veränderten Bt-Maiskörnern sowie in Körnern der unveränderten Ausgangssorte lagen im Variationsbereich der Tabellenwerte. Alle analysierten Daten zeigen keine bemerkenswerten Unterschiede im Gehalt der Rohrnährstoffe, Stärke, Zucker, NSP, Aminosäuren und Fettsäuren zwischen den Körnern beider Maishybriden.

4.2 INHALTSSTOFFE DER FUTTERMISCHUNGEN

Die Ergebnisse der chemisch analytischen Untersuchungen der Anfangs- und Endmastfuttermischungen mit isogenem und transgenem Mais sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Der analysierte Gehalt der Rohnährstoffe sowie der errechnete Gehalt an Umsetzbarer Energie zeigt zwischen den Futtermischungen mit isogenem und transgenem Mais sowohl für die Anfangsmast als auch für die Endmast eine gute Übereinstimmung, wobei die zu vergleichenden Futtermischungen auch isoenergetisch und isonitrogen sind.

Tabelle 10 Ausgewählte Inhaltsstoffe in Futtermischungen (n=2) mit isogenem und transgenem Mais und deren Gehalt an ME

		Anfangsmast		Endmast	
		Isogen	Transgen	Isogen	Transgen
Trockenmasse	g/kg ¹	891	887	887	887
Organische Masse	g/kg T	949	948	954	952
Rohasche	g/kg T	51	52	46	48
Rohprotein	g/kg T	201	197	170	171
Rohfett	g/kg T	47	48	42	41
Rohfaser	g/kg T	27	27	32	30
NfE	g/kg T	674	676	710	710
Stärke	g/kg T	571	580	601	605
Zucker	g/kg T	24	23	27	27
NSP (total)	g/kg T	77	74	83	84
Arabinose	g/kg T	18	17	19	19
Xylose	g/kg T	23	21	23	23
Glucose	g/kg T	27	27	32	32
Ca	g/kg T	10	10	9	9
P	g/kg T	7	7	6	6
ME	MJ/kg ¹	14,0	13,9	13,8	13,8
	MJ/kg T	15,7	15,7	15,6	15,5

¹ Futtermischung

Die Darstellung in Tabelle 11 zeigt Gehalte an Aminosäuren in den einzelnen Futtermischungen. Die Gehalte aller analysierten Aminosäuren der einzelnen Maishybriden sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 11 Aminosäuregehalte in den Futtermischungen (n=2) mit isogenem und transgenem Mais

		Anfangsmast		Endmast	
		Isogen	Transgen	Isogen	Transgen
Alanin	g/kg T	12,4	11,9	10,9	10,7
Arginin	g/kg T	10,2	9,8	9,4	9,1
Asparaginsäure	g/kg T	17,6	17,4	15,0	15,3
Cystin	g/kg T	3,2	3,3	3,0	3,1
Glutaminsäure	g/kg T	34,5	33,1	32,3	31,3
Glycin	g/kg T	8,6	8,4	6,9	7,3
Histidin	g/kg T	5,2	4,6	4,7	4,6
Isoleucin	g/kg T	8,0	8,0	6,7	6,8
Leucin	g/kg T	21,0	20,4	18,8	18,0
Lysin	g/kg T	12,8	12,5	9,0	9,5
Methionin	g/kg T	4,6	4,6	3,3	3,4
Phenylalanin	g/kg T	10,3	9,7	8,6	8,3
Prolin	g/kg T	11,9	11,8	11,0	10,8
Serin	g/kg T	9,5	8,9	8,2	8,2
Threonin	g/kg T	9,0	8,3	6,5	6,7
Tyrosin	g/kg T	8,4	7,8	6,5	6,3
Valin	g/kg T	10,6	10,2	8,8	8,7
Summe		197,8	190,7	169,6	168,1

¹ Tryptophan nicht analysiert, Tabellenwerte DLG (1991)

Die GfE (1987) empfiehlt in Futtermischungen für Mastschweine einen Mindestgehalt von 5 % Lysin im Futterprotein. Lysin ist, ohne zusätzliche Supplementierung in der eingesetzten Diät mit 70 % Maisanteil, die erste limitierende Aminosäure. Um die Deckung des Bedarfs und die Relation der Aminosäuren gemäß der Empfehlung der GfE zu erreichen, wurden die einzelnen Futtermischungen mit den in Tabelle 2 aufgeführten Aminosäuren ergänzt. Mais stellt mit einem Anteil von 70% in den Futtermischungen eine

nicht ausreichende Proteinquelle dar. Für eine bedarfsgerechte Versorgung mit Rohprotein in der Gesamtration wurden daher proteinreiche Futtermittel, wie Fischmehl und Kartoffeleiweiß eingesetzt. Die zugesetzte Menge an Tryptophan basierte auf der Differenz zur errechneten Bedarfdeckung in den Futtermischungen nach DLG-Futterwerttabellen (1991).

Die Gehalte zwischen den zu vergleichenden Futtermischungen sind ohne wesentliche Differenzen. Das Verhältnis (isogen vs. transgen) der limitierenden Aminosäuren (Lysin : (Methionin + Cystin) : Threonin : Tryptophan) von 1 : 0,61 : 0,70 : 0,20 vs. 1 : 0,62 : 0,66 : 0,20 in der Anfangsmast und 1 : 0,70 : 0,72 : 0,24 vs. 1 : 0,68 : 0,71 : 0,23 in der Endmast entspricht den Empfehlungen der GfE (1987). Ebenfalls entsprechend den Empfehlungen liegt der analysierte Gehalt von über 6 g Lysin / 100 g Futterprotein in der Anfangsmast bzw. von über 5g /100 g Futterprotein in der Endmast.

4.3 VERGLEICHENDE ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGISCHE BEWERTUNG

Die Verdaulichkeitsquotienten (VQ) für die Rohnährstoffe und der mit Hilfe des VQ errechnete Gehalt an Umsetzbarer Energie in den Futtermischungen, ermittelt in sechs Verdauungsversuchen, sind in Tabelle 12 dargestellt. In der 1. und 2. Periode der Verdauungsversuche waren alle zwölf Tiere in guter Verfassung. Lediglich in der dritten Periode verweigerte ein Schwein die Futteraufnahme und verlor dabei, ohne erkennbare äußere Symptome, an Lebendmasse. Aus diesem Grund wurde dieses Tier vom Versuch ausgeschlossen. In den einzelnen Perioden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den ermittelten Verdauungswerten der Rohnährstoffe und dem Gehalt an Umsetzbarer Energie von Futtermischungen mit isogenem oder transgenem Mais. Die vergleichsweise hohen Standardabweichungen bei den Verdauungswerten von Rohfaser und Rohfett dürften aus den geringen Gehalten (< 5 %) beider Rohnährstoffe in den Futtermischungen resultieren. Bei der Betrachtung des Verdauungsquotienten für Rohfett ist weiterhin entscheidend, dass nur ca. 50 % des Rohnährstoffes auf den Maisanteil in der Futtermischung zurückzuführen sind. Vom verbleibenden Rohfettanteil stellt mit ca. 50 % das zugesetzte Rapsöl die größte Fraktion dar, welches eine hohe Verdaulichkeit aufweist. Analog zu betrachten ist der Verdauungsquotient für Rohfaser, wobei ebenfalls ca. 50 % des Rohnährstoffs auf dem Maisanteil in der Futtermischung basieren. Im Vergleich mit

den berechneten Verdaulichkeitsquotienten (DLG 1991) für die eingesetzten Futtermischungen sind die mittleren Versuchsergebnisse für Rohfett und Rohfaser in guter Übereinstimmung. Aus oben erwähnten Gründen sollten die errechneten Standardabweichungen nicht überbewertet werden.

In den Futtermischungen basierte der Gehalt an N-freien Extraktstoffen in der Anfangsmast zu 80 % bzw. zu 85 % in der Endmast auf dem Maisanteil. Der Vergleich der mittleren Verdaulichkeitsquotienten zwischen den mit isogenem oder transgenem Mais gefütterten Gruppen zeigt eine hohe Übereinstimmung. Der Verdaulichkeitsquotient für N-freie Extraktstoffe in der Anfangs- und Endmast ist im Mittel mit 92 % und 93 % identisch mit den aus den DLG-Tabellenwerten (DLG 1991) errechneten Verdaulichkeitsquotienten.

Die mittleren Verdaulichkeitsquotienten für Rohprotein und Organische Masse zeigen bei den zu vergleichenden Gruppen nahezu identische Werte. Ebenso zeigt der Vergleich mit den aus den DLG-Tabellenwerten (DLG 1991) errechneten Verdaulichkeitsquotienten keine signifikanten Differenzen.

Der Gehalt an Umsetzbarer Energie wurde aus der Verdaulichkeit der Rohnährstoffe nach der Formel der GfE (1987) errechnet. Im Vergleich der einzelnen Perioden liegt der Gehalt an Umsetzbarer Energie zwischen beiden Gruppen bei einer minimalen Standardabweichung gleich hoch. Für die Anfangsmastmischungen wurde ein mittlerer Energiegehalt von 13,9 MJ/kg errechnet. Der mittlere Energiegehalt der Endmastmischung von 14,0 MJ/kg wurde in zwei Verdaulichkeitsversuchen, angelegt im Lateinischen Quadrat, ermittelt. Erwähnenswert ist, dass die Rohfaser lediglich ca. 1 % und das Fett ca. 10 % der Umsetzbaren Energie des Futters liefert. Die dargestellten Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von AULRICH et al. (2001), die in einem Stoffwechselforschungsversuch Futtermischungen mit 50 % Bt-Mais bzw. 50 % isogenem Mais an Schweine verabreichten. Auch diese Autoren ermittelten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mischungen mit isogenem und transgenem Mais (Verdaulichkeitsquotient der organischen Substanz: isogen vs. transgen: 95,9 vs. 92,5 %)

Tabelle 12 Verdaulichkeit der Rohnährstoffe und Gehalt an Umsetzbarer Energie

Periode	1 (Anfangsmast)		2 (Endmast)		3 (Endmast)		
	Mais	Isogen	Transgen	Isogen	Transgen	Isogen	Transgen
n		6	6	6	6	5	6
Organische Substanz	%	87,2 ±1,5	88,9 ±1,0	89,8 ±0,9	89,4 ±0,9	90,1 ±0,5	90,4 ±0,8
Rohprotein	%	83,3 ±2,8	86,2 ±1,6	85,7 ±2,2	85,0 ±1,9	85,8 ±1,3	87,1 ±1,5
Rohfett	%	67,9 ±7,7	72,3 ±4,5	73,5 ±6,5	67,4 ±4,1	77,2 ±3,7	73,6 ±4,5
Rohfaser	%	40,1 ±8,4	47,0 ±9,7	55,8 ±6,5	53,7 ±5,4	55,2 ±3,9	51,4 ±6,3
NfE	%	91,6 ±0,8	92,5 ±0,6	93,2 ±0,4	93,4 ±0,5	93,4 ±0,4	93,8 ±0,6
ME	MJ/kg ¹	13,8 ±0,3	14,0 ±0,2	14,0 ±0,2	13,9 ±0,2	14,1 ±0,1	14,1 ±0,1
	MJ/kg T	15,4 ±0,3	15,7 ±0,2	15,8 ±0,2	15,6 ±0,2	15,9 ±0,1	15,9 ±0,1

¹ Futtermischung

Die ermittelten Verdauungsquotienten sowie der Gehalt an Umsetzbarer Energie sind ohne signifikante Unterschiede zwischen beiden Maishybriden. Dies lässt die Aussage zu, dass beide Maishybriden als Futtermittel für Schweine ernährungsphysiologisch gleichwertig sind. Aus Sicht der Tierernährung besteht zwischen beiden Maishybriden substantielle Äquivalenz (OECD 1993). Die Feststellung der ernährungsphysiologischen Gleichwertigkeit beinhaltet in sich keine Sicherheitsprüfung gentechnisch veränderter Futtermittel. Vergleichende Untersuchungen können lediglich den Ausgangspunkt einer Sicherheitsprüfung darstellen, wenn die gentechnische Modifikation keine Ausprägung von wesentlichen Veränderungen der wertgebenden Inhaltsstoffe im Organismus zur Folge hat.

4.4 FÜTTERUNGSVERSUCH

4.4.1 MASTLEISTUNG

Im durchgeführten Mastversuch wurden die in Tabelle 2 gezeigten Futtermischungen eingesetzt. Die verabreichten Mischungen waren isonitrogen und isoenergetisch gestaltet (Tabelle 12). Im Zeitraum des Fütterungsversuches waren keine gesundheitlichen Störungen zu beobachten, mit Ausnahme von einem Tier. Ohne erkennbare äußere Symptome wies ein Tier der Bt-Gruppe im gesamten Versuch eine verminderte Futteraufnahme und eine geringe Wachstumsleistung (58 kg Lebendmasse am Ende des Versuches) auf. Die Daten dieses Tieres wurden nicht in die Auswertung aufgenommen.

Tabelle 13 Mittlere Futter- und Energieaufnahme, Lebendmassezunahme (LMZ) sowie Futter- und Energieaufwand während einer Mastdauer von 91 Tagen

Gruppe		Kontrolle	Bt
	n	12	35
LM Beginn	kg	23,5 ±3,0	23,9 ±3,0
Futteraufnahme	kg/Tag	1,95 ±0,15	1,94 ±0,15
Energieaufnahme	MJ ME/Tag	27,0 ±2,1	27,1 ±2,0
LM-Zunahme	g/Tag	815 ±93	804 ±63
Futteraufwand	kg/kg LMZ	2,41 ±0,17	2,41 ±0,15
Energieaufwand	MJ ME/kg LMZ	33,4 ±2,3	33,7 ±1,5
LM Ende	kg	97,6 ±9,0	97,2 ±7,2

Die Ergebnisse des Fütterungsversuches sind in Tabelle 13 dargestellt. Zusätzlich zeigt die Abbildung 9 die nahezu identische Entwicklung der mittleren Lebendmasse der Versuchstiere beider Gruppen im gesamten Versuchszeitraum. Der Vergleich der erfassten Leistungsparameter zwischen der Kontrollgruppe und der Bt-Gruppe ist ohne signifikante Unterschiede. Neben äquivalenten Rohnährstoffanteilen in den Körnern beider Maishybriden und der gleichen Rohnährstoffverdaulichkeit der jeweiligen Futtermischungen realisierten die Schweine beider Gruppen im Fütterungsversuch bei gleicher mittlerer Futteraufnahme (1,95 ±0,15 vs. 1,94 ±0,15 kg / Tag) eine äquivalente

Lebendmassezunahme von 815 ± 93 vs. 804 ± 63 g / Tag. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Ergebnissen von WEBER et al. (2000) überein, die ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Leistung nach der Verfütterung von isogenem oder transgenem Mais an Mastschweine feststellen konnten. Das Ergebnis der eigenen Untersuchung ist übereinstimmend mit den von CLARK und IPHARRAQUERRE (2001) und FLACHOWSKY und AULRICH (2001a) zusammengefassten Ergebnissen aus zahlreichen Untersuchungen bei anderen landwirtschaftlichen Nutztierarten.

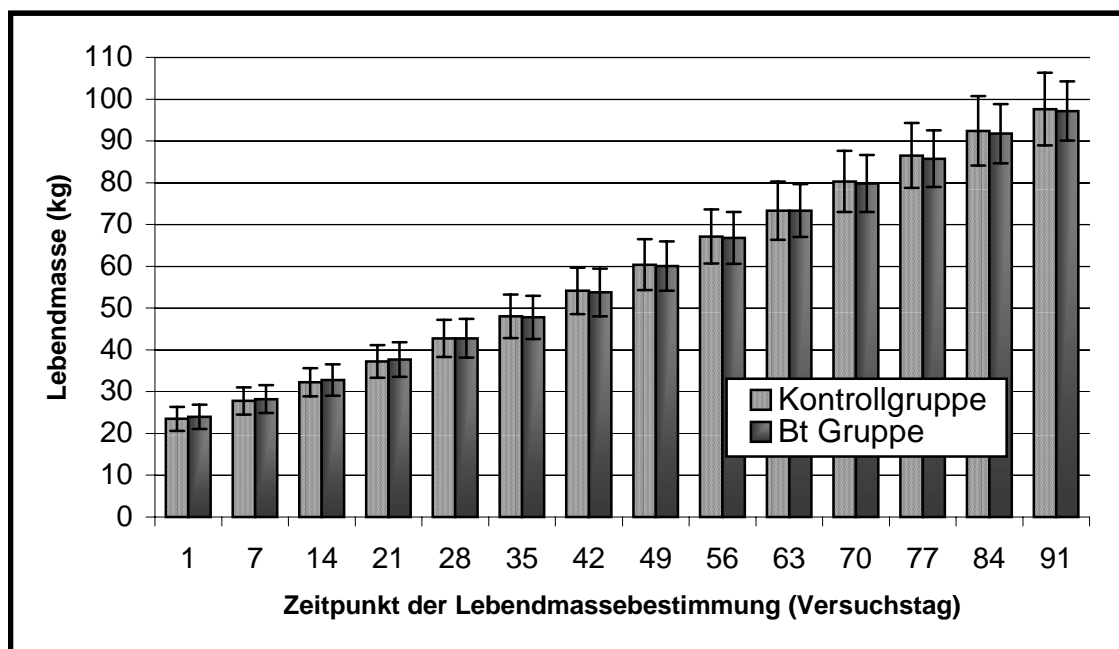


Abbildung 9 Die Entwicklung der mittleren Lebendmasse der Versuchstiere beider Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum, gemessen im Abstand von 7 Tagen

Im Mastversuch über einen praxisrelevanten Lebendmassebereich bestätigen die Leistungsparameter die bereits für die Roh Nährstoffverdaulichkeit postulierte substantielle Äquivalenz beider Maishybriden. Unerwartete Effekte resultierend aus der Verfütterung von gentechnisch verändertem Mais an Mastschweine, wurden nicht festgestellt.

In der Schweinemast existierten bei der Gegenüberstellung der Leistungsparameter Futteraufnahme, tägliche Lebendmassezunahme und Energieaufwand keine signifikanten Unterschiede nach der Verabreichung von Futtermischungen mit einem hohen Anteil an gentechnisch verändertem Bt-Mais im Vergleich zu Futtermischungen mit dem gleichen Maisanteil der isogenen Ausgangssorte. Die umfassende Betrachtung der chemisch-

analytischen Daten, der ernährungsphysiologischen Bewertung sowie der Resultate aus der Fütterungsstudie zeigen vergleichsweise aus Sicht der Tierernährung keine vor- oder nachteiligen Eigenschaften für die beiden untersuchten Maishybriden.

4.4.2 SCHLACHTLEISTUNG

Die Schlachtleistung der Tiere der einzelnen Gruppen ist in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Dauer der Mastperiode in Tabelle 14 dargestellt. Aufgrund der ungleichen Mastdauer und der unterschiedlichen Nüchterungszeiten ist ein unmittelbarer Vergleich der Schlachtdaten nur bedingt möglich. Die unterschiedliche Mastdauer, die zwischen 97 und 115 Tagen betrug (siehe Abbildung 3), hatte erwartungsgemäß unterschiedliche Mastendgewichte zur Folge, die 103,4 kg nach 98 Tagen, 110,2 kg nach 105 Tagen, 113,0 kg nach 111 Tagen sowie 111,2 kg nach 114 Tagen betragen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Nüchterungszeiten in den Gruppen, die nach 98 bzw. 105 Tagen, 4 und 8 Stunden betragen, während die Nüchterungszeit der übrigen Tiere versuchsbedingt bei 12 Stunden lag (siehe Abbildung 3).

Das Ausschlagungsergebnis lag zwischen 77 und 79 % des Schlachtendgewichtes, wobei die Unterschiede auch zum Teil auf die unterschiedliche Nüchterungsdauer zurückzuführen sind. Bei den verschiedenen Organen und Geweben wurden hinsichtlich der Masse relativ zum warmen Schlachtkörper (HCW, 45 min p.m.) mit Ausnahme von Niere und Flomen keine Unterschiede festgestellt. Beim Flomen zeigten die Befunde die bekannte Tatsache, dass die Tiere mit steigender Mastdauer verstärkt Fett ansetzen.

Jedoch lässt die mittlere Lebendmasse der Kontrolltiere mit $103,4 \pm 8,3$ kg zum Schlachtzeitpunkt (98 d) im Vergleich mit der nahezu identischen mittleren Lebendmasse der Tiere der Bt-Gruppe (4 und 8 h) mit $103,6 \pm 7,4$ kg am 98 Versuchstag erwarten, dass zu einem einheitlichen Schlachtzeitpunkt die Schlachtdaten der Tiere beider Gruppen keine signifikanten Unterschiede aufweisen würden. Insgesamt betrug die mittlere Lebendmasse aller Versuchstiere ($n = 35$) der Bt-Gruppe $102,5 \pm 7,6$ kg am 98 Versuchstag.

Die veterinärmedizinische Lebendbeschau aller Versuchstiere vor der Schlachtung als auch die Tauglichkeitsuntersuchung der Schlachterzeugnisse wiesen keine einschränkenden Befunde für den menschlichen Verzehr auf. Darüber hinaus waren bei der Zerlegung jeweils einer kalten Schlachtkörperhälfte zur Gewinnung wertvoller Fleischteile (Rohlinge für die Herstellung von Schinkenspeck) sowie bei der anschließenden

Fleischwertsortierung keine Anomalien zu beobachten. Die in Tabelle 14 gezeigten Befunde sollten infolge der unterschiedlichen Schlachtmassen nicht überinterpretiert werden. Aus diesem Grund wird von einer weiteren Diskussion des Datenmaterials abgesehen.

Tabelle 14 Schlachtgewicht, Schlachtkörpergewicht und Organgewichte von Schweinen, gemästet mit Futtermischungen mit isogenem oder transgenem Mais bei einer unterschiedlichen Mastdauer

Futtermischung		Isogen		Transgen		
		Daten / Tage ¹	98	105	111	114
n			12	12	12	11
Schlachtgewicht	[kg]		103,4 ±8,3	110,2 ±7,1	113,0 ±8,0	111,2 ±8,4
HCW	[kg]		81,2 ±6,5	85,3 ±6,4	89,9 ±6,3	87,8 ±6,8
CCW ²	[g/kg] ³		978,6 ±79,8	969,1 ±73,6	975,6 ±71,4	969,6 ±74,0
Flomen	[g/kg] ³		12,2 ±2,0	15,0 ±5,5	13,3 ±3,4	17,9 ±5,9
Leber	[g/kg] ³		17,6 ±2,1	18,0 ±1,9	15,7 ±1,9	15,7 ±1,1
Herz	[g/kg] ³		4,2 ±0,6	4,1 ±0,4	4,5 ±0,5	4,4 ±0,5
Niere	[g/kg] ³		3,5 ±0,3	3,9 ±0,3	3,4 ±0,3	3,6 ±0,4

¹ Dauer des Fütterungsversuches (± 1 d)

² Masse beider gekühlten Schlachtkörperhälften (CCW)

³ g per kg HCW (Masse der beiden warmen Schlachtkörperhälften)

4.5 DNA-ANALYTIK

4.5.1 DNA-EXTRAKTION

Ausgangspunkt für die gesamte DNA-Analytik stellte die aus den Ingesta-, Organ- und Gewebeproben sowie die aus Mais und Futtermischungen isolierte DNA dar.

Das Ziel der angewandten DNA-Extraktion bestand in einer umfassenden Aufreinigung der im Probengewebe lokalisierten DNA. Die Problematik der Aufreinigung bestand in einer Trennung der vorliegenden DNA-Moleküle von anderen Zellbestandteilen wie z. B. Proteinen, Fett und Kohlenhydraten ohne dabei die DNA-Struktur völlig zu zerstören. In der Frischmasse von Gewebe liegt DNA an sich, als auch in Proportion zu beispielsweise Protein nur in geringen Konzentrationen vor. MARX et al. (1992) untersuchten die Konzentration an DNA und Protein in der Frischmasse (OM) verschiedener Organe und Gewebe von Schweinen im Alter zwischen 1 Tag und 1123 Tagen. Nach 180 Tagen lag die mittlere Konzentration (DNA vs. Protein in mg / g OM) in der Leber bei 3,7 vs. 184, in der linken Niere bei 5,2 vs. 179, in der Milz bei 9,0 vs. 137 sowie im Musculus longissimus dorsi bei 0,8 vs. 210. Der OM : DNA (Protein : DNA) -Quotient schwankte 180 Tage nach der Geburt in verschiedenen Geweben zwischen 273 (51) in der Leber, 192 (34) in der Niere, 98 (15) in der Milz sowie 1266 (273) im M. longissimus (MARX et al. 1992). Die, verglichen zu anderen Stoffen, geringe Konzentration an DNA in der Frischmasse von Organen und Geweben verdeutlicht den erforderlichen Maßstab für eine effektive Aufreinigung zum Erhalt weitestgehend reiner DNA für analytische Untersuchungen.

Bei der angewandten DNA-Extraktion band die DNA des zuvor mittels Lysepuffer aufgelösten Probematerials in der Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze an das Silikat-Material einer Säule. Nach mehreren Waschschritten zur Eliminierung verbleibender Nicht-DNA erfolgte die Überführung der DNA in ein definiertes Volumen Pufferlösung.

An der jeweils isolierten DNA erfolgte eine Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm als Maß für die Reinheit der Präparation. Das gemessene Absorptionsverhältnis ($A_{260/280}$) der isolierten DNA entspricht Werten zwischen 1,7 und 1,9. Diese Befunde lassen auf eine geringe Kontamination der extrahierten DNA mit anderen Zellbestandteilen, aber vornehmlich mit Proteinen schließen (WILFINGER et al. 1997).

Im Anschluss erfolgte eine Auftrennung der extrahierten DNA im Agarosegel. Anhand des mitgeführten DNA-Größenmarker im Agarosegel konnte die Molekülgröße der isolierten DNA stufenweise in einer Bandbreite zwischen ca. 21 kbp und 500 bp ermittelt werden. Ausgewählte repräsentative Ergebnisse von extrahierter elektrophoretisch aufgetrennter DNA aus Futtermischungen und Maisproben sind in der Abbildung 10 dargestellt. Neben der Extraktion von DNA aus mechanisch zerkleinerten Maiskörnern wurde DNA aus Maiskörnern extrahiert, die mit flüssigem Stickstoff im Mörser fein zermahlen wurden. Die Größe der extrahierten DNA von beiden unterschiedlich vorbehandelten Maisproben lag, wie auch die DNA aus den Proben der Futtermischungen, im Bereich von 21 kbp.

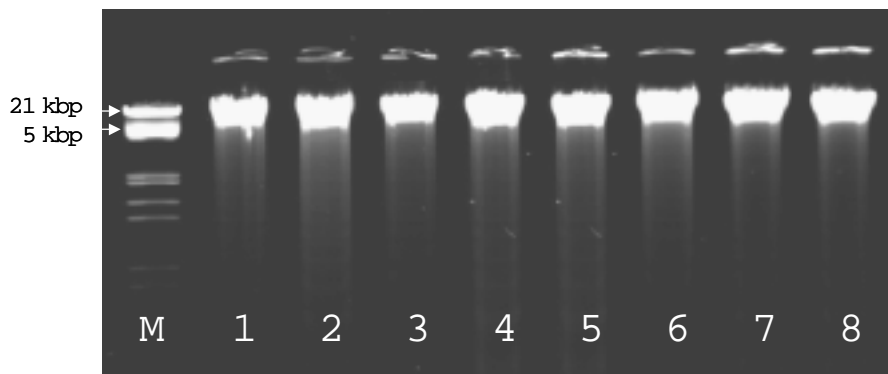


Abbildung 10 Extrahierte DNA aus Mais und Futtermischungen (isogen vs. transgen);
 Banden: **M** DNA-Größenmarker, **1 und 2** Mais, **3 und 4** Mais mit flüssigem
 Stickstoff behandelt, **5 und 6** Futtermischung der Anfangsmast, **7 und 8**
 Futtermischung der Endmast

Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Daten von FORBES et al. (1998) überein und zeigen, dass Pflanzen DNA nicht deutlich nachweisbar durch mechanisch einwirkende Mahlprozesse zerstört wird. Im Gegensatz zu der untersuchten Auswirkung von Wärmeenergie durch Temperaturen über 95°C (CHITER et al. 2000; FORBES et al. 1998) wurde durch Temperaturen von -196°C keine signifikant destruktive Einwirkung auf die Molekülgröße der extrahierten DNA nachgewiesen.

Exemplarisch zeigt die Abbildung 11 extrahierte DNA aus dem Inhalt des GIT. Die vergleichende Betrachtung extrahierter DNA entlang der physiologischen Segmente des GIT der Einzeltiere zeigte keine deutlichen Unterschiede, wie auch der Vergleich einzelner Segmente aus der Gesamtmenge der Versuchstiere. Der überwiegende Anteil der DNA

Moleküle wies eine Größe zwischen 21 kbp und 5 kbp auf, während der geringere Anteil der DNA im Bereich von 5 kbp bis 500 bp und kleiner nachweisbar war. Dies bedeutet, dass im Verdauungstrakt ein Pool von unterschiedlich großen DNA-Fragmenten auffindbar ist.

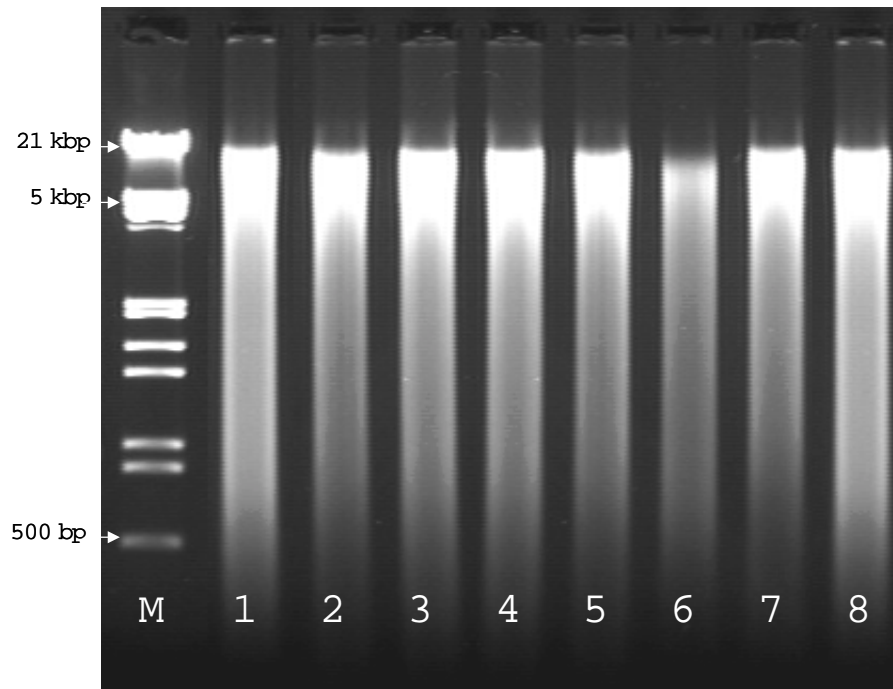


Abbildung 11 Extrahierte DNA aus Ingestaprobe: Banden; *M* DNA-Größenmarker, *1 und 2* Kontrollgruppe 4 und 8 h, *3 bis 8* Bt-Gruppe 4, 8, 12, 24, 48 und 72 h

Die gezeigten Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Aussagen von PHIPPS und BEEVER (2000), dass die Aktivität der Enzyme im GIT eine umfassende Fragmentierung der DNA in Futtermitteln zum Ergebnis hat. Die Ergebnisse der DNA-Extraktion zeigen allerdings, dass über das Futter aufgenommene DNA entlang des GIT partiell eine sichtbar kleinere Molekülgröße besitzt im Vergleich zur extrahierten DNA aus Mais und den Futtermischungen. Diese vergleichsweise kleinere Molekülgröße ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von SCHUBBERT et al. (1994). Die Autoren verfütterten isolierte Phagen M13 DNA mit einer Größe von 7250 bp an Mäuse, wobei nach der Passage des GIT in den Faeces der Tiere nur Fragmente mit einer maximalen Größe von 1700 bp der aufgenommenen DNA nachweisbar waren. Dies deutet daraufhin, dass die mechanischen und enzymatischen Prozesse lediglich eine unvollständige Fragmentierung der oral aufgenommenen DNA zur Folge haben.

In der Abbildung 12 ist exemplarisch extrahierte DNA aus Organen und Geweben dargestellt, deren Moleküle überwiegend eine Größe zwischen 21 kbp und 5 kbp aufweisen. Ein Vergleich der extrahierten DNA aus verschiedenen Organ- und Gewebeproben zeigte keine nennenswerten Unterschiede bei allen untersuchten Proben. Beachtenswert ist in den gleichverteilten Fraktionen der Organen- und Gewebeproben der geringe Anteil an DNA mit einer kleineren Molekülgröße als 5 kbp.

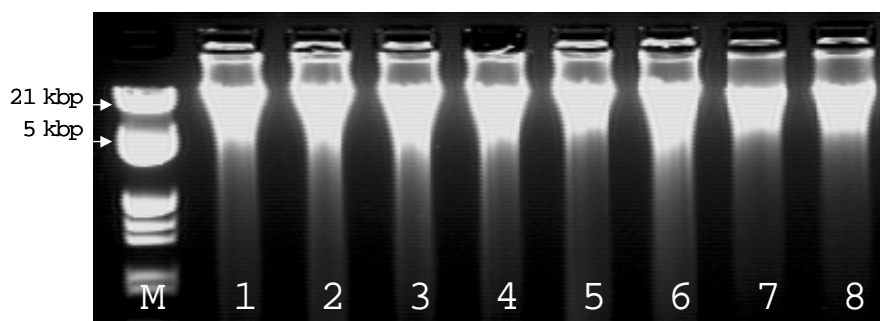


Abbildung 12 Extrahierte DNA aus Gewebeproben: Banden; *M* DNA-Größenmarker, *1 und 2* Kontrollgruppe 4 und 8 h, *3 bis 8* Bt-Gruppe 4, 8, 12, 24, 48 und 72 h

Eine übergreifende Betrachtung der elektrophoretisch aufgetrennten Mais- und Futter-DNA zeigt, dass unabhängig von der Maisquelle und vom Bearbeitungsgrad, Fragmente der vorhandenen DNA im visuellen Bereich mit nahezu identischer Größe zwischen 21 kbp und 5 kbp extrahiert wurden.

Aufgrund einer einheitlichen Probenbehandlung während der DNA-Extraktion kann davon ausgegangen werden, dass die Tiere in beiden Versuchsgruppen des Mastversuches als auch die Tiere im Verdauungsversuch Futtermischungen mit nahezu gleicher DNA-Molekülgröße aufnahmen. Die Ergebnisse der extrahierten DNA aus den verschiedenen Abschnitten des GIT von den Tieren beider Gruppen des Mastversuches weisen ein identisches Muster auf. Jedoch findet unabhängig von der Maisquelle im Futter eine Degradierung der DNA im GIT statt. Dieses zeigt sich in den Ingestaproben (Abbildung 11) von beiden Gruppen mit deutlich sichtbaren bis zu 10 % kleineren DNA-Fragmenten im Vergleich zur Fragmentgröße der Futter-DNA (Abbildung 10).

Die aus den Gewebeproben extrahierte DNA weist im wesentlichen eine Molekülgröße zwischen 21 kbp und 5 kbp auf, ohne Unterschiede zwischen den Tieren beider Gruppen aus dem Mastversuch.

Insgesamt weisen die Vergleichsproben von beiden Maishybriden, den aus ihnen hergestellten Futtermischungen sowie die bei der Schlachtung von Tieren beider Gruppen gewonnenen Proben bei der Betrachtung der extrahierten DNA keine signifikanten Unterschiede auf. Für eine detaillierte Untersuchung von sequenziellen Unterschieden durch sensitivere Nachweisverfahren lagen somit Vergleichsproben mit gleicher Molekülgröße vor.

4.5.2 POLYMERASE-KETTENREAKTION

Mit der Polymerase-Kettenreaktion steht ein Methode zur Verfügung, um selbst kleinste spezifische DNA-Fragmente in geringsten Konzentrationen so zu vervielfältigen, dass über weitere molekularbiologische Methoden eine sichere Evaluierung von DNA-Fragmenten aus dem Probenursprung möglich ist. Rein rechnerisch entstehen aus einem als Matrize vorliegenden Molekül nach 39 Zyklen in der PCR 274.877.906.944 Kopien mit identischer Basenfolge der Zielsequenz des ausgewählten DNA-Abschnittes.

Zur exponentiellen Vervielfältigung (Amplifikation) charakteristischer Genfragmente unter der Verwendung von fünf spezifischen Primerpaaren und der Methode der PCR wurde die extrahierte DNA von 432 Organ- und Gewebeproben, 333 Ingestaprobe aus dem GIT, 12 Schinkenspeckproben sowie Maisproben und Futtermischungen untersucht. Parallel zu elektrophoretisch getrennten DNA-Größenmarkern wurden die amplifizierten Genfragmente visualisiert und dokumentiert. Die Einschränkung der angewandten Methode besteht darin, dass die Ergebnisse nur eine qualitative "ja" oder "nein" Aussage zulassen. Diese beruhen wiederum auf der Annahme, dass die untersuchten DNA-Moleküle innerhalb aller Prozessstufen von der Ausgangscharge über die entnommene Probenmenge bis hin zur eingesetzten Probenmenge als Matrix für eine Amplifikation gleichverteilt vorliegen. Der Vorteil der Methode wiederum liegt in der Detektierbarkeit bereits kleinster Molekülmengen.

Im Vorfeld der Untersuchungen fand eine Anpassung der aus der Literatur entnommenen Methoden und Primersysteme an die institutseigenen Analysengeräte statt. Unter Verwendung einer standardisierten Maisprobe (Fluka Referenzmais) wurden zunächst die Primer (Plant 1-F/R, Ivr 1-F/R, Cry 03/04, Rub 01/02) mit einer pflanzlichen Zielsequenz getestet. Im Test fand anhand der Gradientenfunktion des Thermocyclers die Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur für diese Primersysteme im verwendeten Gerät statt.

Mit dem Einsatz verschiedener Polymerasen sowie durch Variierung der Anzahl von Zyklen wurde im Vergleich das optimale Produkt bzw. Zyklenanzahl für die Kettenreaktion bestimmt. Mit der Erstellung eines Standardprotokolls für die PCR waren die Vorarbeiten für die Untersuchung der Proben abgeschlossen.

4.5.2.1 MAIS UND FUTTERMISCHUNGEN

Die DNA aus Mais und Futtermischungen wurde auf die Amplifizierbarkeit von Fragmenten aus dem Rubisco-Gen, dem Invertase-Gen, dem Chloroplasten-Gen und dem synthetischen Bt-Gen untersucht. Die Ergebnisse der untersuchten isogenen und transgenen Maisproben, sowie der eingesetzten Futtermischungen sind in Tabelle 15 dargestellt. Mit Ausnahme vom Bt-Gen wurden aus der extrahierten DNA beider Maishybriden und der aus ihnen hergestellten Futtermischungen mais- und pflanzenspezifische Fragmente amplifiziert. Die gentechnische Veränderung (Bt-Gen) wurde nur im Bt-Mais und in Futtermischungen mit Bt-Mais nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine konsequente Trennung beider Maischargen auf allen Prozessebenen von der Ernte bis zur Herstellung der Futtermischungen sowie zu keinem Zeitpunkt während des Versuches eine Verschleppung des Bt-Maises in die isogenen Futtermischungen stattfand.

Beachtenswert bleibt bei einer Betrachtung der Amplifizierbarkeit der einzelnen Gen-Fragmente deren theoretischer Anteil in den Futtermischungen. Speziell das Rubisco-Gen-Fragment codiert Teile der Informationen für die Ribulose-biphosphat-carboxylase universell für Pflanzen. Für die Vervielfältigung des Rubisco-Gen-Fragmentes lag durch den zusätzlichen Anteil von pflanzlichen Komponenten in den Futtermischungen prozentual mehr Material als für den Nachweis von maisspezifischen Gen-Fragmenten vor. Somit stand prinzipiell neben einem Maisanteil von 70 % zusätzlich durch den gemeinsamen Anteil von Erbsen und Weizenkleie mit 15,25 % in den Diäten der Anfangsmast bzw. von 22,05 % in der Endmast ein höherer Anteil von Komponenten mit dem Rubisco-Gen als Matrix zur Verfügung.

Tabelle 15 Amplifizierbarkeit einzelner Gen-Fragmente in isogenem und transgenem Mais und in den eingesetzten maishaltigen Futtermischungen

Primer	Fragmentgröße	isogen		transgen	
		Mais	Futter ¹	Mais	Futter ¹
Rub01/02	140 bp	—————	positiv	—————	
IVR1F/R	224 bp	—————	positiv	—————	
Plant1F/R	532 bp	—————	positiv	—————	
Cry03/04	211 bp	— negativ —		— positiv —	

¹Anfangs- und Endmastfuttermischungen mit 70 % isogenem oder transgenem Mais

Die Signalintensität der amplifizierten und visualisierten Genfragmente im Agarosegel lag jedoch im Bereich der Mais- und Futtermittelproben für alle pflanzlichen und maisspezifischen Nachweissysteme auf gleich hohem Niveau. Lediglich der Nachweis der gentechnischen Veränderung erbrachte eine Differenzierung zwischen isogenem und transgenem Mais sowie der aus beiden Maishybriden hergestellten Futtermischungen. Während die Proben auf isogener Basis keine amplifizierten Signale enthielten, wiesen alle auf transgenem Mais basierenden Proben charakteristische Fragmente der gentechnischen Veränderung auf. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Befunden von AESCHBACHER et al. (2002); EINSPANIER et al. (2001); HOHLWEG und DOERFLER (2001) und KLOTZ et al. (2002) überein.

4.5.2.2 INGESTA

Für den Nachweis einer zeitabhängigen Persistenz von aus dem Futter stammenden DNA-Fragmenten wurden die 48 Versuchstiere in 8 Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten geschlachtet (Abbildung 3). Jeweils 6 Tiere wurden 4, 8, 12, 24, 48 und 72 h nach Aufnahme der letzten Bt-maishaltigen Futtermischung der Schlachtung zugeführt. Dagegen entsprach die Nüchternungszeit von jeweils 6 Tieren der Kontrollgruppe lediglich einer Dauer von 4 und 8 Stunden. Die mit Bt-Mais gefütterten Tiere mit dem Schlachtzeitpunkt 24, 48 und 72 h erhielten bis 12 h vor der Schlachtung eine maisfreie Futtermischung, bei einer Substitution des Maisanteils durch Gerste und Weizen. Nach der DNA-Extraktion der im Schlachtprozess gewonnenen Proben folgte die Untersuchung auf die Amplifizierbarkeit spezifischer DNA-Fragmente.

Die DNA von Ingestaprobe aus sieben Abschnitten des Gastrointestinaltraktes (GIT) der Versuchstiere wurde auf die Amplifizierbarkeit der Gen-Fragmente des Rubisco-Gens (Rub01/02), des maisspezifischen Invertase-Gens (IVR1F/R), des Chloroplasten-Gens (Plant1F/R) sowie das für die gentechnische Modifikation spezifischen Bt-Gens untersucht. Unabhängig vom Zeitpunkt der Schlachtung war das Fragment aus dem Rubisco-Gen in allen untersuchten Ingestaprobe nachweisbar. Eine Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Schlachtung wurde nur für die Nachweissysteme Cry03/04, IVR1F/R und Plant1F/R festgestellt.

Das Bt-Gen-Fragment mit 211 bp wurde in 100 Ingestaprobe der Tiere der Bt-Gruppe mit dem Schlachtzeitpunkt 4, 8, 12 und 24 h nach Fütterung der letzten maishaltigen Diät nachgewiesen (Abbildung 13). In Ingestaprobe 48 Stunden nach letzter Maisaufnahme wurde im Dünndarm eines Tieres und im Rectum eines anderen Tieres das Bt-Gen-Fragment nachgewiesen. In allen Proben von Tieren der Kontrollgruppe sowie der Bt-Gruppe 72 h nach Absetzen der maishaltigen Diät konnte das Bt-Gen-Fragment nicht vervielfältigt werden. Zusammengefasst sind die Ergebnisse in Tabelle 16 dargestellt.

Ingesamt kann aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass Fragmente der gentechnischen Modifikation bis zu 48 Stunden nach der letzten Fütterung einer maishaltigen Diät im Verdauungstrakt von Schweinen persistieren können.



Abbildung 13 Amplifizierte Bt-Gen-Fragmente im Darminhalt des Rectums; Banden: **M** DNA-Größenmarker, **1** Negative Kontrolle, **2** Positive Kontrolle, **3 und 4** Kontrollgruppe 4 und 8 h, **5 bis 10** Bt-Gruppe 4, 8, 12, 24, 48 und 72 h

Tabelle 16 Amplifiziertes DNA-Fragment der gentechnischen Veränderung im Bt-Mais in Ingestaprobe aus unterschiedlichen Abschnitten des Magendarmtraktes von Schweinen der Bt-Gruppen (n = 6) mit verschiedenen Schlachtzeitpunkten nach der letzten Fütterung einer (Bt) maishaltigen Diät

	Zeit ¹	Magen	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon	Rectum	Summe
	4	6	5	6	4	6	5	6	38
	8	6	1	2 ²	4	5	3	6	27
Bt-Gruppe	12	4	4	0	0 ²	6	6	3	23
	24	2	2	0	0	0	3	1	8
	48	0	1	1	1	0	0	1	4
	72	0	0	0	0	0	0	0	0

¹ Entspricht dem Zeitraum zwischen der letzten Fütterung einer maishaltigen Diät und der Schlachtung (h)

² Im Jejunum von einem Schwein und im Ileum von zwei Schweinen lag keine analysierbare Ingestaprobe vor

Die PCR-Produkte amplifiziert mit dem Primerpaar Plant1F/R (Chloroplasten-Gen-Fragment, Abbildung 14) bestätigen die Ergebnisse für den zeitabhängigen Nachweis der Bt-Gen-Fragmente im GIT. Bei den nach 4, 8, 12 und 24 h geschlachteten Tieren wurde in den Ingestapoben aus dem Rectum ein Produkt mit der maisspezifischen Größe von 532 bp amplifiziert. In einer Probe vom Inhalt des Rectum (24 h) wurde parallel zum Maisfragment (532 bp, Abbildung 14) ein Produkt mit der für Gerste spezifischen Größe von 642 bp vervielfältigt. In den Gruppen mit dem Schlachtzeitpunkt 48 und 72 h wurde nur das gerstespezifische Fragment mit 642 bp amplifiziert (Abbildung 14).



Abbildung 14 Amplifizierte Chloroplasten-Gen-Fragmente im Darminhalt des Rectums; Banden: **M** DNA-Größenmarker, **1** Negative Kontrolle, **2** Positive Kontrolle, **3 und 4** Kontrollgruppe 4 und 8 h, **5 bis 10** Bt-Gruppe 4, 8, 12, 24, 48 und 72 h

Im letzten Darmabschnitt des Verdauungstraktes war es noch möglich, Fragmente des Chloroplasten-Gens mit für Mais und Gerste spezifischer Größe nachzuweisen. Der Nachweis artenspezifischer DNA-Fragmente mit Hilfe der PCR und in Verbindung mit selektiven Primersystemen stellt eine praktische Methode zur Bestimmung der Verweildauer von Nahrungskomponenten im Magendarmtrakt dar.

Weiterhin wurde ein Nachweissystem für das maisspezifische Invertase-Gen-Fragment mit einer Größe von 226 bp im Inhalt des Caecum der Versuchstiere angewandt. Über den Zeitraum bis zu 24 Stunden nach Erhalt der letzten maishaltigen Futtermischung konnte das Invertase-Fragment im ersten Dickdarmabschnitt der Tiere beider Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Demgegenüber war ein Nachweis im Caecum bei den Tieren der Gruppe 48 h und 72 h nicht möglich.

Die gezeigten Ergebnisse für das Bt-Gen-Fragment stehen im Gegensatz zu den Aussagen von KLOTZ et al. (2002). Den Autoren war nach einmaliger Gabe einer Futtermischung mit einem Bt-Maisanteil von 50% zum Zeitpunkt 2, 4, 6, 8 und 12 Stunden vor der

Schlachtung kein Nachweis eines Bt-Gen-Fragmentes im Inhalt des Magens sowie in 3 Abschnitten des Dünndarms möglich. Diese Ergebnisse stehen besonders im Vergleich zu den makroskopischen Befunden des Mageninhaltes der eigenen zum Zeitpunkt 4 und 8 Stunden geschlachteten Tiere in Frage. Aufgenommene Nahrung kann mehr als 8 Stunden im Magen von Schweinen verweilen (HABERER 1997; RATTAY 1998). Dies stimmt gut mit den eigenen Beobachtungen des Mageninhaltes überein, da zumindest bis zu 8 Stunden nach der Fütterung der Magen der Tiere in der Mehrzahl prall gefüllt war und zusätzlich deutlich maisgelbe Futtermittelbestandteile zu erkennen waren. Mit 1 kg erhielten die Tiere in den Untersuchungen von KLOTZ et al. (2002) jedoch ca. 0,8 kg weniger Futter vor der Schlachtung als die zu gleichen Zeitpunkten geschlachteten Tiere beider Gruppen im eigenem Versuch. Die nicht vorhandenen Bt-Gen-Fragmente würden neben unbekanntem Ursachen nur eine sehr rasche Darmpassage besonders zwischen 2 und 8 Stunden bei den Untersuchungen von KLOTZ et al. (2002) vermuten lassen. Weitere vergleichbare Untersuchungen zum DNA-Abbau beim Schwein waren bis zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht bekannt. Trotz des unterschiedlichen Aufbaus und Funktionalität des Verdauungssystems zeigten Untersuchungen am Wiederkäuer ebenfalls eine längere Verweildauer von Gen-Fragmenten im GIT. DUGGAN et al. (2003) erbrachten den Nachweis des Bt-Gens mit dem Primersystem Cry03/04 am pansenfistuliertem Schaf 60 Stunden nach der Verfütterung von Körnermais.

Die Ergebnisse der DNA-Extraktion sowie der Nachweis durch die PCR zeigen, dass sowohl größere DNA-Moleküle (21 kbp) als auch spezifische DNA-Fragmente der Nahrung mit bis zu 642 bp im gesamten Magen-Darm-Trakt persistieren können. Diese Persistenz lässt auch einen engen Kontakt der DNA-Moleküle zur Darmbarriere als Eintrittspforte in den Organismus vermuten. Trotz bestehender Nachweise für den transintestinalen Übergang von "Fremd"-DNA in den Organismus von Versuchstieren (AESCHBACHER et al. 2002; EINSPANIER et al. 2001; HOHLWEG und DOERFLER 2001; KLOTZ et al. 2002; SCHUBBERT et al. 1997; TONY et al. 2003) sind die dafür verantwortlichen Mechanismen bisher noch ungeklärt. Jedoch ist aufgrund der in mehreren Übersichtsarbeiten dargestellten Ergebnisse (GEBERT et al. 1996; OWEN 1999; SIEBERS und FINLAY 1996) ein Übergang von "Fremd"-DNA über die M-Zellen der Peyerschen Platten denkbar (siehe Punkt 2.3.2 Seite 12).

4.5.2.3 ORGANE UND GEWEBE

In Anlehnung an den Nachweis von spezifischen DNA-Fragmenten in Organen und Geweben bei den Tierspezies Rind und Huhn sowie bei Mäusen wurden Körperproben von Schweinen untersucht. Die Entwicklung der tierindividuellen Lebendmasse basierte im Mastversuch bei 36 Schweinen auf der bedarfsgerechten Fütterung von Diäten mit 70 % Bt-Maisanteil gegenüber 12 Schweinen, welche Diäten mit 70 % isogenem Mais erhielten (Tabelle 2). Die Probengewinnung erfolgte von den am Ende des Mastversuches geschlachteten Schweinen (Abbildung 3). Im Verlauf der Schlachtung wurden von allen 48 weiblichen Tieren die Organ- und Gewebeproben Blut, Fortpflanzungsorgan, Leber, Lymphknoten, Milz, Muskel (M. gluteus maximus, M long. dorsi, M. trapezius) sowie die Nieren gewonnen.

Im Folgeschritt fand eine Extraktion der DNA aus allen Proben statt. Die in Lösung befindliche DNA kann Inhibitoren für den Nachweis von Gen-Fragmenten in der PCR enthalten. Als Folge könnten falsch-negative Ergebnisse beobachtet werden. Um eine Kontamination der Proben mit Inhibitoren der PCR auszuschließen, fand mit Hilfe des Primerpaares SW01/02 eine Kontrollreaktion statt. Die Grundlage der Kontrollreaktion bestand im Nachweis eines schweinespezifischen DNA-Moleküls, dessen Erbinformationen in jedem Fall der genomischen DNA von Schweinen angehören. Aus allen untersuchten Proben konnte das Gen-Fragment aus dem Wachstumshormon mit einer Größe von 108 bp vervielfältigt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die extrahierte DNA keine Inhibitoren für die PCR aufweist und somit falsch-negative Ergebnisse auf dieser Basis ausgeschlossen sind.

Von 36 Tieren, die Futtermischungen mit gentechnisch verändertem Mais erhielten, wurde mit den beschriebenen Methoden in der extrahierten DNA von 324 untersuchten Organ- und Gewebeproben das Bt-Gen-Fragment nicht nachgewiesen. Anhand der Ergebnisse der jeweils mitgeführten Kontrollreaktionen zeigte sich jedoch, dass die Vervielfältigung des Bt-Gen-Fragmentes im verwendeten Mastermix bei Zugabe äquivalenter Volumina an extrahierter DNA-Lösung aus dem Referenzmais positiv bzw. bei Substitution durch Wasser negativ war. Für die Gewebeproben von den 12 Tieren der Kontrollgruppe wurde das Primersystem zum Nachweis des Bt-Gens nicht eingesetzt. Dies begründet sich im Ausbleiben positiver Amplifikate in den eingesetzten Futtermischungen sowie im isogenem Mais.

Die Ergebnisse für den negativen Nachweis transgener Genfragmente sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von EINSPANIER et al. (2001), AESCHBACHER et al. (2002) und KLOTZ et al. (2002). Die Autoren wiesen nach der Verfütterung von Bt-Mais an verschiedene Nutztierarten keine Fragmente aus der gentechnischen Veränderung in den untersuchten Organ- und Gewebeproben der Tiere nach.

Im folgenden Schritt wurde der Nachweis der in den Ingestaprobe persistierenden Fragmente des Chloroplasten-Gens mit einer Größe von über 500 Basenpaaren in den Gewebeprobe angestrebt. Dieser Versuch erwies sich ebenfalls als negativ, da eine Amplifikation in keiner der untersuchten Proben nachweisbar war.

Für das Ausbleiben positiver Nachweise für das Bt-Gen- bzw. das Chloroplasten-Gen-Fragment im Gewebe liegen aufgrund der Persistenz der Fragmente in den Ingestaprobe zwei Vermutungen nahe. Zum einem stellt das Bt-Gen einen lediglich einmalig codierten DNA-Abschnitt im Maisgenom dar, während das Chloroplasten-Gen als Multicopy-Gen vorliegt. Unter der Annahme eines transgenen DNA-Überganges zeigt sich die Nachweisgrenze für die angewandte Methode. Demgegenüber lässt sich für das häufiger vorliegende Chloroplasten-Gen-Fragment vermuten, dass es aufgrund seiner Molekülgröße (>500 bp) nicht in der Lage ist, die Darmbarriere zu überwinden.

Mit dem Primerpaar Rub01/02 stand ein weiteres Nachweissystem zur Verfügung, jedoch mit deutlich geringerer Produktgröße (140 bp). Ähnlich dem Chloroplasten-Gen liegt das Rubisco-Gen ebenfalls als Multikopie-Gen vor und konnte in den Ingestaprobe stets nachgewiesen werden. Der Nachweis des Rubisco-Gen-Fragmentes war positiv in 33 % von insgesamt 432 untersuchten Organ- und Gewebeprobe von 48 Tieren, dargestellt in Tabelle 17 und Abbildung 15. Sonderfälle stellten zwei Tiere der mit Bt-Mais gefütterten Gruppe dar, deren untersuchte Proben ausnahmslos keine amplifizierbaren Rubisco-Gen-Fragmente aufwiesen. Im Vergleich der Anzahl positiver Nachweisergebnisse zwischen den Tieren mit verschiedenen Schlachtzeitpunkten wurden keine wesentlichen Unterschiede festgestellt. Eine vergleichende Betrachtung der Anzahl amplifizierter Rubisco-Gen-Fragmente zwischen den Organ- und Gewebeprobe zeigt, dass in den Tertiärfollikeln der Eierstöcke mit 30 positiven Ergebnissen in 48 Proben die höchste Nachweisquote ermittelt wurde. Eine mögliche Ursache könnte die intensive Durchblutung der Eierstöcke während der Reifung der Follikel darstellen.

Weiterhin könnten die positiven Befunde von pflanzlichen Gen-Fragmenten in den mesenterialen Lymphknoten am Dünndarm darauf hindeuten, dass fremde DNA über die Peyerschen Platten des GALT (gut associated lymphoid tissue) die Darmschranke überwindet und in den Organismus gelangen.

Ausgehend von den Lymphknoten wäre eine Verteilung der „Fremd“-DNA über den Brust-Milch-Gang (Ductus thoracicus) in das Blutgefäßsystem möglich. Ein DNA-Transfer über das lymphatische System stünde unter der Voraussetzung, dass die aufgenommene „Fremd“-DNA keine Immunantwort, verbunden mit einer vollständigen Phagozytose, erzeugt. Dieser hypothetische Mechanismus ist in guter Übereinstimmung mit den zusammengefassten Ergebnissen von GEBERT et al. (1996); OWEN (1999) und SIEBERS und FINLAY (1996). Zugleich verstärken die eigenen Befunde den vermuteten Mechanismus des DNA-Übergangs über das GALT von SCHUBBERT et al. (1998).

Die Hypothese von SCHUBBERT et al. (1998) kann jedoch anhand der untersuchten Parameter nicht abgesichert werden, da ebenfalls eine Anflutung von fremder DNA über die zuführenden Blutgefäße in die Lymphknoten denkbar ist.

Der Grund für das ungleichmäßige Verteilungsmuster positiver Signale kann im Rahmen dieser Arbeit, verbunden mit der geringen Anzahl an Literaturbefunden, nicht schlüssig diskutiert werden. Jedoch deuten die eigenen Ergebnisse in Verbindung mit den Daten von RAZZAQUE et al. (1981) darauf hin, dass möglicherweise die Bausteine der DNA-Moleküle dem Energie- und/oder Erhaltungstoffwechsel der verschiedenen Organe und Gewebe zugeführt und in Form von Grundbausteinen über die Entsorgungswege der Niere abgeführt werden (^{14}C markierte Atome des Zuckerskelettes der DNA im Harn, RAZZAQUE et al. 1981). Möglicherweise erfolgt die bisher noch nicht untersuchte Anflutung bzw. der Metabolismus von die Darmwand passierender "Fremd"-DNA quantitativ verschieden in den untersuchten Organen und Geweben. Dies könnte einen Erklärungsansatz für das ungleichmäßige Verteilungsmuster in den analysierten Proben darstellen. Ungeklärt bleibt auch die Ursache für das Ausbleiben jeglicher positiver Signale in den untersuchten Organen und Geweben von 2 Versuchstieren. Möglicherweise existieren für den Mechanismus des DNA-Transfers innerhalb einer Spezies auch tierindividuelle Unterschiede, die einen Übergang von "Fremd"-DNA blockieren.

Insgesamt steht der Nachweis von Pflanzen-Gen-Fragmenten in Organ- und Gewebeproben der untersuchten Schweine im Widerspruch zu den Ergebnissen und zur Schlussfolgerung von KLOTZ et al. (2002), dass ein Übergang von DNA aus der Nahrung durch die Darmwandbarriere bei Schweinen sehr unwahrscheinlich ist.

Kleine pflanzliche DNA-Fragmente aus dem Futtermittel passieren die Darmbarriere und waren in verschiedenen Organen und Geweben nachweisbar. Die Passage von DNA-Fragmenten findet unabhängig von der Futterquelle im Organismus von Schweinen, die mit transgenem oder isogenem Mais gefüttert wurden, statt.

DNA-Fragmente der gentechnischen Veränderung (Bt-Gen) sowie Fragmente größer als 140 bp waren unter Verwendung der beschriebenen Methoden nicht in den Organen und Geweben der untersuchten Mastschweine nachweisbar.

Anhand der Molekülgröße der eigenen positiven und negativen Nachweisergebnisse von Pflanzen-Gen-Fragmenten kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die maximale Molekülgröße für einen Übergang von DNA-Fragmenten aus der Nahrung durch die Darmwandbarriere von Schweinen im Bereich größer als 140 bp und kleiner 532 bp liegt.

Diese Annahme reiht sich bei einer tierartübergreifenden Betrachtung gut in die Ergebnisse positiver Nachweise in Organen und Geweben nach der Aufnahme von Nahrung mit natürlich fixierter DNA mit 337 bp bei Mäusen (HOHLWEG und DOERFLER 2001), 226 bp bei Broilern (AESCHBACHER et al. 2002) und 199 bp bei Rindern und Hühnern (EINSPANIER et al. 2001; TONY et al. 2003) ein.

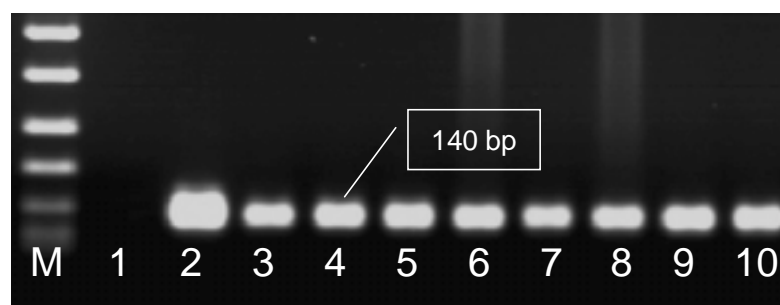


Abbildung 15 Amplifizierte Rubisco-Gen-Fragmente im Gewebe; Banden: *M* DNA-Größenmarker, *1* Negative Kontrolle, *2* Positive Kontrolle, *3 und 4* Kontrollgruppe 4 und 8 h, *5 bis 10* Bt-Gruppe 4, 8, 12, 24, 48 und 72 h

Tabelle 17 Amplifiziertes DNA-Fragment aus dem Rubisco-Gen (140 bp) in unterschiedlichen Organen und Geweben aus den Versuchsgruppen (n = 6) mit verschiedenen Schlachtzeitpunkten nach der letzten Fütterung einer maishaltigen Diät

	Zeit ¹	Blut	Leber	Lymph- knoten	Milz	Niere	M. gluteus maximus	M. long. dorsi	M. trapezius	Ovarien	Summe	
Kontrollgruppe	4	3	4	2	1	1	1	3	1	4	20	
	8	2	4	3	0	0	2	3	2	6	22	
Bt-Gruppe	4	0	4	0	2	4	4	4	1	3	22	
	8	0	1	0	0	2	2	1	1	5	12	
	12	2	2	0	0	4	3	4	1	2	18	
	24	1	2	2	0	0	1	3	3	4	16	
	48	0	4	1	1	3	2	3	4	0	2	19
	72	0	5	0	0	0	0	4	2	4	15	
	Summe		8	26	8	6	13	16	26	11	30	

¹ Entspricht dem Zeitraum zwischen der letzten Fütterung einer maishaltigen Diät und der Schlachtung (h)

4.5.2.4 ROHE FLEISCHERZEUGNISSE

Aus den positiven Befunden in verschiedenen Organen und Geweben der Versuchstiere erweiterte sich die Fragestellung auf den Verbleib von „Fremd“-DNA in einem verarbeiteten tierischen Lebensmittel. Um das Schicksal nachgewiesener "Fremd"-DNA im Muskel weiter in einem Fleischerzeugnis zu verfolgen, fand die Verarbeitung von Hüftstücken ausgewählter Versuchstiere zu Rohschinken statt.

Von zwölf Hüftstücken verschiedener Tiere der Kontrollgruppe (4 und 8 h) und der Bt-Gruppe (4, 8, 12, 24 und 48 h) wurde Schinkenspeck hergestellt. Ausgewählte Hüftstücke stammten von Tieren, in deren Muskelproben (Musculus gluteus maximus) das Rubisco-Gen-Fragment nachgewiesen wurde. Um Kontaminationen zwischen Einzelstücken auszuschließen, wurde für jedes Einzelstück ein separater Herstellungsprozess unter gleichen Bedingungen gewählt. Aus diesem Grund limitierte sich die Produktion auf zwölf Einzelstücke.

Im Vergleich zur extrahierten DNA aus frischem Muskelgewebe weist die extrahierte DNA von allen Schinkenspeckstücken eine starke Degradierung auf. Die Moleküle der DNA wiesen eine Größe zwischen 21 kbp bis 500 bp und kleiner auf (Abbildung 16).

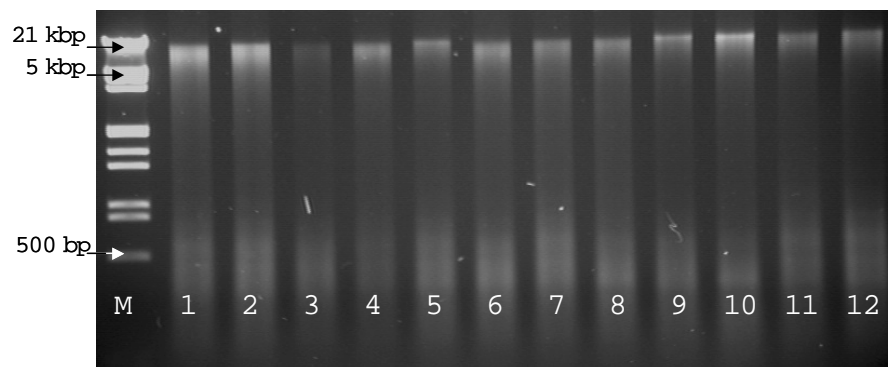


Abbildung 16 Extrahierte DNA aus Schinkenspeckproben; Banden: **M** DNA-Größenmarker, **1** Kontrollgruppe 4 h **2 und 3** Kontrollgruppe 8 h, **4** Kontrollgruppe 4 h **5 bis 6** Bt-Gruppe 4 und 8 h, **7 und 8** Bt-Gruppe 12 h, **9** Bt-Gruppe 24 h, **10 bis 12** Bt-Gruppe 48 h

Trotz der verstärkten Degradierung der DNA im Muskelgewebe der Fleischerzeugnisse konnten mit der PCR in 6 Proben schwache, aber deutliche Rubisco-Fragmente amplifiziert und visualisiert werden. Von den verbleibenden 6 Proben zeigten 2 Proben

kein Signal und 4 Proben lediglich sehr schwache Signale (Abbildung 17). Der Ursprung der reduzierten Signalstärke der visualisierten PCR-Produkte im Gel liegt möglicherweise in einer minimalen Menge an amplifizierbarer DNA. Dies könnte auf Abbauprozesse in Gegenwart von Mikroorganismen (LÜCKE 1986; MOLINA et al. 1989) im Verlauf der Reifung zurückgeführt werden und steht in guter Übereinstimmung mit den dargestellten Ergebnissen der DNA-Extraktion. Zudem kann aufgrund des niedrigen Verarbeitungsgrades von rohen Fleischerzeugnissen eine Degradierung der DNA durch physikalische Einflüsse wie z. B. Druck oder Wärmeenergie ausgeschlossen werden.

Damit konnte gezeigt werden, dass die über den Weg der aufgenommenen Nahrung ins Muskelfleisch gelangten pflanzlichen DNA-Fragmente auch noch in rohen Fleischerzeugnissen mit einem niedrigen technologischen Bearbeitungsgrad nachweisbar sind, wobei die amplifizierten Fragmente im Bereich der Nachweisgrenze liegen.

Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit dem Nachweis von DNA-Fragmenten in verarbeiteten pflanzlichen Lebensmitteln (BROLL et al. 1998; HUPFER et al. 1998b; VANHOEF et al. 1998; WAIBLINGER et al. 1999).

Da andere als das Rubisco-Gen-Fragment im Muskelgewebe der Versuchstiere nicht nachgewiesen werden konnten, wurde von einer PCR mit den Primersystemen für das Bt-Gen, das Invertase-Gen sowie das Chloroplasten-Gen abgesehen.

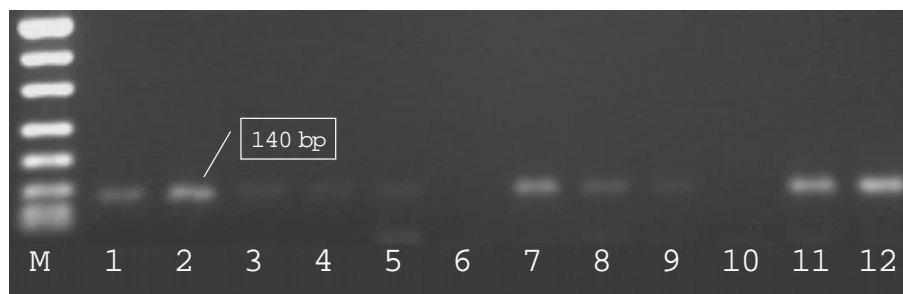


Abbildung 17 PCR-Produkte aus der DNA der Schinkenspeckproben; Banden: **M** DNA-Größenmarker, **1** Kontrollgruppe 4 h **2 und 3** Kontrollgruppe 8 h, **4** Kontrollgruppe 4 h **5 bis 6** Bt-Gruppe 4 und 8 h, **7 und 8** Bt-Gruppe 12 h, **9** Bt-Gruppe 24 h, **10 bis 12** Bt-Gruppe 48 h

4.5.3 VERIFIZIERUNG DER PCR-PRODUKTE

Zur Bestätigung und Identifikation amplifizierter PCR Produkte stehen im wesentlichen 3 unterschiedliche Nachweissysteme zur Verfügung. Die Identität der PCR Produkte kann durch Sequenzierung, Southern Blotting sowie durch Restriktionsanalyse nachgewiesen werden.

Beim Restriktionsverdau schneidet ein Enzym die im Reaktionsgemisch vorliegenden DNA-Fragmente sequenzspezifisch zwischen definierten Basenpaarungen (siehe Abbildung 8). Für die Verifizierung wurden anhand der zu amplifizierenden Zielsequenz geeignete Restriktionsenzyme ausgewählt. Die bevorzugte Auswahl lag bei Enzymen, welche die PCR-Produkte in zwei Fragmente von unterschiedlicher Größe mit glatten Enden schnitt. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass eine Identifizierung der beiden erzeugten Fragmente bei der Visualisierung im Agarosegel anhand des mitgeführten Größenmarkers möglich war. So liegen beispielsweise für das Enzym *AluI* im Rubisco-Gen-Fragment (140 bp) 4 Schnittstellen vor. In diesem Bereich wären jedoch die Grenzen für die Anwendung von Agarosegelen bei einer ausreichenden Trennschärfe erreicht. Alternativ höhere Trennschärfen weisen in solchen Fällen Gele mit ca. 5 % Polyacrylamid auf.

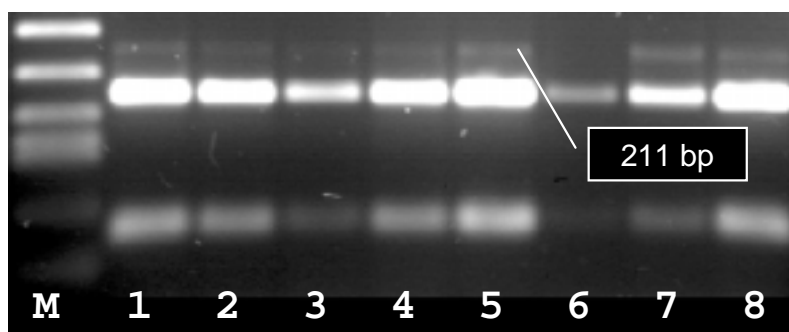


Abbildung 18 Restriktionsanalyse der amplifizierten Bt-Gen-Fragmente; Banden: *M* DNA-Größenmarker, *1 bis 8* Ingestaprobent der Bt-Gruppe

In der vorliegenden Arbeit wurde die Identität der Sequenz der amplifizierten DNA Fragmente primär durch Restriktionsanalyse bestätigt. Die amplifizierten Bt-Gen Fragmente (211 bp) wurden durch das Enzym *HaeIII* in zwei Fragmente mit einer Größe von 162 bp und 49 bp geteilt (Abbildung 18). Die amplifizierten Rubisco Gen Fragmente

(140 bp) wurden durch das Enzym *RsaI* in zwei Fragmente mit einer Größe von 86 bp und 54 bp geteilt (Abbildung 19). Zur Bestätigung der mit den Primer Plant1F/R amplifizierten Produkte wurde das Enzym *AluI* verwendet. Das maisspezifische Fragment mit einer Größe von 532 bp wurde in Fragmente mit 339 bp und 192 bp geteilt. Das aus Gerste amplifizierte Fragment (642 bp) teilte sich in zwei Fragmente mit 453 bp und 189 bp (Abbildung 20). Mit den vorliegenden Ergebnissen der Restriktionsanalyse konnte die Identität der amplifizierten Gen-Fragmente bestätigt werden. Für eine detailliertere Darstellung sind zusätzlich im Anhang in den Abbildung 23 und Abbildung 24 die Sequenzen der Fragmente für Mais (532 bp) sowie für Rubisco (140 bp) mit der Lage der Primer und den Restriktionsschnittstellen dargestellt.

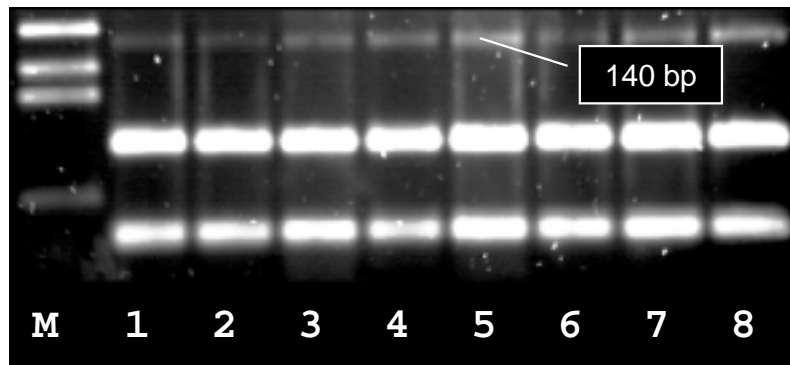


Abbildung 19 Restriktionsanalyse der amplifizierten Rubisco-Gen-Fragmente; Banden: **M** DNA-Größenmarker, **1 und 2** Kontrollgruppe 4 und 8 h, **3 bis 8** Bt-Gruppe 4 bis 72 h

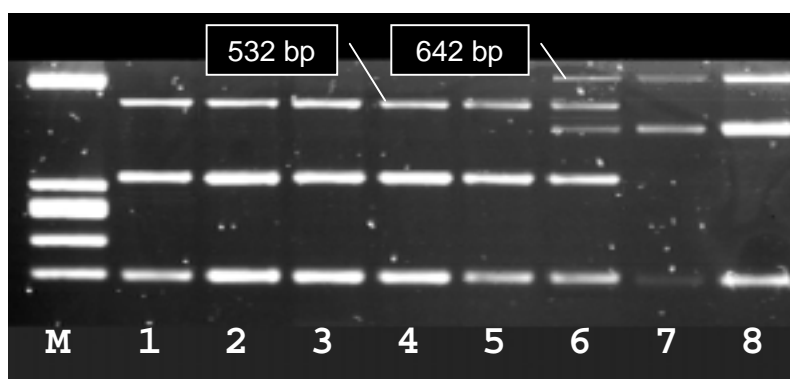


Abbildung 20 Restriktionsanalyse der amplifizierten Chloroplasten-Gen-Fragmente; Banden: **M** DNA-Größenmarker, **1 und 2** Kontrollgruppe 4 und 8 h, **3 bis 8** Bt-Gruppe 4 bis 72 h

Für eine weitere Absicherung der Identität der amplifizierten Gen-Fragmente wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Hierzu fand eine Auftrennung der amplifizierten Produkte sowie eines mitgeführten Größenmarkers mittels Gelelektrophorese entsprechend der Größe statt. Im folgenden Schritt wurden die Amplifikate auf einer Membran fixiert, um später durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachzuweisen. Abbildung 21 zeigt stellvertretend für alle Nachweise die mittels P-Imager visualisierten Rubisco-Gen-Fragmente einer Analyse. Parallel zum Rubisco-Gen konnte auch die Identität der amplifizierten Bt-Gen-Fragmente bestätigt werden.

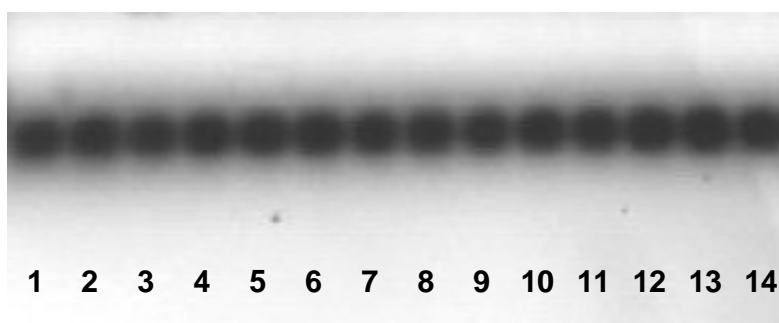


Abbildung 21 Identifizierung spezifischer Rubisco-Gen-Fragmente durch Southern Blot Analyse; Banden: **1**: Blut, **2-4** Muskelproben, **5** Eierstock, **6** Leber, **7** Milz, **8** Niere, **9** Lymphknoten, **10 und 11** Ingestaprobe, **12** Maisprobe, **13 und 14** Futtermittelproben

4.5.4 NACHWEISGRENZE

Für eine weitere Verifizierung der erzielten Ergebnisse aus der PCR wurde die Nachweisgrenze für die angewandte Methode bestimmt. Die Bestimmung erfolgte an der extrahierten DNA des Referenzmaispulverses (Fluka) mit einem Anteil von 2 % Bt-Mais. Nach photometrischer Bestimmung des DNA-Gehaltes wurde die extrahierte DNA in dekadischen Verdünnungsreihen als Matrix in gleich bleibenden Volumina in der PCR eingesetzt.

Die Nachweisgrenze für eine deutliche Visualisierung amplifizierter Gen-Fragmente ist in Abbildung 22 dargestellt. Die gemessene Absorptionsrate (A_{260}) entspricht einem Gehalt von 80 ng/ μ l DNA in der extrahierten DNA-Stammlösung. Das Bt-Gen Fragment wurde in Verdünnungen bis zu 0,1 % entsprechend einem Gehalt von 80 pg/ μ l extrahierter DNA

nachgewiesen. Dies stimmt gut mit der beschriebenen Nachweisgrenze von HUPFER et al. (1998b) für das Bt-Gen-Fragment mit dem Primer Cry03/04 überein.

Das Rubisco-Gen-Fragment wurde in Verdünnungen bis zu 0,001 % entsprechend einem Gehalt von 0,8 pg/μl extrahierter DNA des Referenz-Maises nachgewiesen.

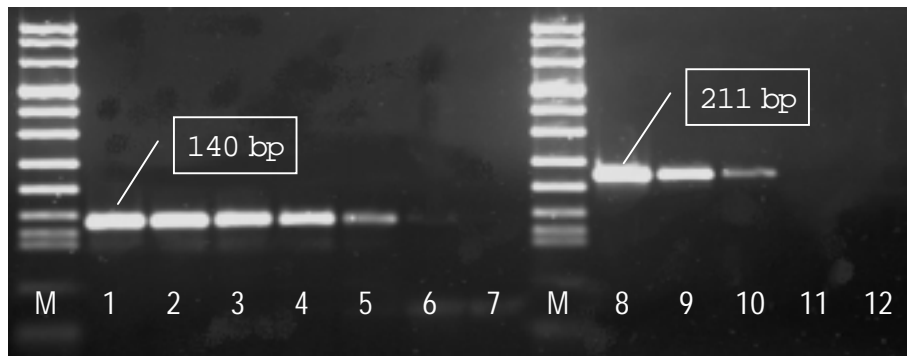


Abbildung 22 Nachweisgrenze der PCR bei der Amplifizierung von Pflanzen-DNA und transgener Mais-DNA in verdünnten Lösungen extrahierter DNA aus einer Mischung von isogenem und transgenem (2%) Mais unter Verwendung der Primer Rub 01/02 (Banden 1 bis 7) und Cry 03/04 (Banden 8 bis 12); Banden: *M*: DNA-Größenmarker, *1 und 8*: 8 ng/μL DNA-Matrix, *2 und 9*: 0,8 ng/μL DNA-Matrix, *3 und 10*: 0,08 ng/μL DNA-Matrix, *4 und 11*: 0,008 ng/μL DNA-Matrix, *5*: 0,0008 ng/μL DNA-Matrix, *6*: 0,00008 ng/μL DNA Matrix, *7 und 12*: negative Kontrolle ohne DNA-Matrix

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Aufgrund der stofflichen Äquivalenz der nutritiven Inhaltsstoffe der untersuchten isogenen und gentechnisch veränderten Maishybriden sind beim Einsatz in der Schweinemast lediglich indirekte Effekte durch evtl. unterschiedliche Mykotoxingehalte zu erwarten.

Der Nachweis artenspezifischer DNA-Fragmente mit Hilfe der PCR und in Verbindung mit selektiven Primersystemen stellt eine sensitive Methode zur Bestimmung der Verweildauer von Nahrungskomponenten im Magen-Darm-Trakt dar.

Die Aufnahme von fremder DNA aus der aufgenommenen Nahrung in den Organismus von Schweinen ist möglich. Eine Aufnahme von gentechnisch veränderter DNA fand jedoch nicht statt oder lag im Bereich unterhalb der beschriebenen Nachweisgrenze.

Technologische Verarbeitungsprozesse bei der Herstellung von rohen Fleischerzeugnissen zeigen keinen deutlichen Einfluss auf die nachweislich im Ausgangsmaterial Muskelgewebe vorhandenen pflanzlichen DNA-Fragmente.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Vergleichende Untersuchungen zur ernährungsphysiologischen Bewertung von isogenem und transgenem (Bt) Mais und zum Verbleib von „Fremd“-DNA im Gastrointestinaltrakt und in ausgewählten Organen und Geweben des Schweines sowie in einem rohen Fleischerzeugnis

Der Einsatz neuer Technologien resultiert in der menschlichen Gesellschaft meist in einer Kontroverse. Die gentechnische Modifikation von landwirtschaftlichen Nutzpflanzen stellt in diesem Zusammenhang keine Ausnahme dar. Mit dem Einsatz von gentechnisch veränderten Pflanzen in der Human- und Tierernährung entwickelte sich die Frage nach der Sicherheit von gentechnisch veränderten Pflanzen für Mensch, Tier und Umwelt zu einer kontrovers geführten Diskussion auf öffentlicher und wissenschaftlicher Ebene. Die Kontroverse über transgene landwirtschaftliche Nutzpflanzen und dabei speziell Bt-Mais ist eng verbunden mit einer weitreichenden Meinungsverschiedenheit über die ökonomischen, ökologischen und sozialen Konsequenzen.

Unter Berücksichtigung dieser Situation wurden umfangreiche Untersuchungen zur ernährungsphysiologischen Wertung von Futtermitteln aus gentechnisch veränderten Pflanzen aufgenommen. Die Fragestellung der vorliegenden Dissertation ordnet sich in die Gesamthematik ein. Im Einzelnen wurden mit Bt-Mais die folgenden Themen bearbeitet:

- I. Chemisch-analytische Untersuchung von isogenem und transgenem Mais,
- II. Untersuchungen zur ernährungsphysiologischen Bewertung der Maishybriden bei Schweinen,
- III. Mastleistung von Schweinen gefüttert mit Diäten mit hohen Anteilen an isogenem oder transgenem Mais,
- IV. Schicksal der mit der Nahrung aufgenommenen „Fremd“-DNA im Körper von Schweinen.

zu I. Mit Hilfe von chemisch-analytischen Untersuchungen wurden in Bt-Mais parallel zur isogener Ausgangslinie wichtige Inhaltsstoffe ermittelt. Die Untersuchung der chemischen Zusammensetzung der beiden Hybriden ergab keine signifikanten Unterschiede in den Rohnährstoff- (Bsp. Rohprotein 11,59 vs. 11,06 %), Aminosäuren-, Fettsäuren- und Mineralstoffgehalten als auch für Stärke, Zucker und Nicht-Stärke-Polysaccharide. Beide Maishybriden sind in ihrer stofflichen Zusammensetzung substanziell Äquivalent.

zu II. Beide Maishybriden wurden jeweils zu 70% in bedarfdeckende Futtermischungen (FM) für Schweine eingemischt. Die ernährungsphysiologische Wertigkeit der FM wurde im Verdauungsversuch mit 12 männlichen, kastrierten Schweinen untersucht. Die Tiere wurden nach Bestimmung ihrer Lebendmasse in zwei Gruppen mit 6 Schweinen eingeteilt. Mit jeder Gruppe wurden 3 Verdauungsversuche durchgeführt. Die Verdaulichkeit der Rohnährstoffe beider Maishybriden (Rohprotein $85,8 \pm 2,3$ vs. $86,1 \pm 1,8$ % und NfE $92,8 \pm 0,6$ vs. $93,2 \pm 0,6$ in T) unterschied sich ebenso wie der Energiegehalt ($15,7 \pm 0,2$ vs. $15,8 \pm 0,2$ % MJ/kg T) nicht signifikant.

zu III. Im langfristigen Fütterungsversuch bestand das Ziel, Leistungsparameter im Verlauf und am Ende der Mastperiode nach Aufnahme von Futtermischungen mit isogenem oder transgenem Mais zu vergleichen. Für den Mastversuch wurden 48 weibliche Schweine eingesetzt. Die Schweine wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Für 36 Tiere enthielt die FM 70 % transgenen Mais, die verbliebenen 12 Tiere erhielten die FM mit 70 % der isogenen Ausgangssorte. Im Mastversuch zeigte sich, dass die Verfütterung von gentechnisch verändertem Bt-Mais im Vergleich zum isogenem Mais über einen Zeitraum von 91 Tagen zu einer identischen Leistung führt. Die Tiere der Gruppen realisierten eine mittlere tägliche Lebendmassezunahme (LMZ) von 815 ± 93 vs. 804 ± 63 g/d bei einem Futteraufwand von $2,41 \pm 0,17$ vs. $2,41 \pm 0,15$ kg/kg LMZ (isogen vs. transgen). Aus Sicht der Tierernährung konnten für beide Maishybriden keine vor- oder nachteiligen Eigenschaften für den Einsatz in der Schweinemast ermittelt werden.

zu IV. In Untersuchungen an Rindern und Geflügel wurden pflanzliche DNA-Bruchstücke aus der Nahrung in verschiedenen Organen und Geweben nachgewiesen. Demgegenüber fand kein Nachweis transgener DNA-Fragmente nach der Verabreichung von gentechnisch veränderten Pflanzen im Tierkörper außerhalb des Magen-Darmtraktes statt. Im eigenen Versuch sollte das Schicksal von fremder DNA aus der Nahrung im Organismus von Schweinen verfolgt werden. Der Verbleib und die Passage von Fremd-DNA wurde an 48 Versuchstieren gefüttert mit Diäten mit 70 % isogenem (n = 12) bzw. transgenem (n = 36) Mais untersucht. Die mit transgenem Mais gemästeten Tiere wurden in 6 Gruppen mit jeweils 6 Tieren zum Zeitpunkt 4, 8, 12, 24, 48 und 72 h nach der letzten Fütterung einer maishaltigen Diät geschlachtet. Lediglich die zum Zeitpunkt 24, 48 und 72 h geschlachteten Tiere erhielten bis zur Schlachtung eine maisfreie, durch Gerste und Weizen substituierte Diät. Bei den Tieren der beiden Kontrollgruppen (n = 6) erfolgte die Schlachtung 4 und 8 h nach der letzten Fütterung. Die extrahierte DNA von Ingesta- und

Gewebeprobe wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion auf die Anwesenheit pflanzlicher und transgener Gen-Fragmente untersucht.

Transgene Gen-Fragmente konnten bis zu 48 h nach der letzten Fütterung einer Bt-maishaltigen Diät in Ingestaprobe nachgewiesen werden.

Weiterhin passieren kleine pflanzliche DNA-Fragmente aus dem Futtermittel die Darmbarriere und sind in tierischen Geweben sowie später noch in rohen Fleischerzeugnissen nachweisbar. Nicht nachweisbar waren im Gewebe DNA-Fragmente der gentechnischen Veränderung. Die Passage von pflanzlichen DNA-Fragmenten fand unabhängig von der Futtermittelquelle in den Organismus von Schweinen, die mit transgenem oder isogenem Mais gefüttert wurden, statt.

Die stoffliche Äquivalenz und eine gleiche ernährungsphysiologische Wertigkeit der untersuchten isogenen und gentechnisch veränderten Maishybriden lassen Unterschiede beim Einsatz in der Schweinemast nicht erwarten.

Parallel zu anderen Tierarten ist die Aufnahme von DNA-Bruchstücken aus der Nahrung in den Organismus von Schweinen möglich. DNA-Fragmente der gentechnischen Veränderung wurden nicht aufgenommen oder lagen im Bereich unterhalb der Nachweisgrenze.

Zur Bestimmung der Verweildauer von Nahrungskomponenten im Magen-Darm-Trakt stellt die Polymerase-Kettenreaktion in Verbindung mit selektiven Primersystemen eine sensitive Methode dar.

7 SUMMARY

Comprehensive investigations on chemical composition and nutritional evaluation of parental and transgenic (Bt) maize in pigs as well as the fate of feed ingested “foreign”-DNA in pig bodies and raw meat products thereof

The establishment of any new technology affecting the “physiological needs” and “safety needs” of humans, is likely to result in controversy. The genetic modification of agricultural crops is no exception and their use in human and animal nutrition have raised questions about the safety of genetically modified organisms for humans, animals and the environment. Especially the development of Bt transgenic plants, has engendered a wide range of opinions concerning the economic value, and ecological, food safety and social consequences of their introduction.

Depending on this situation comprehensive investigations were initiated on genetically engineered plants and their nutritive value as feedstuff. The objective of the present study was to investigate the following questions:

- I Composition of parental and transgenic (Bt) maize seeds,
- II Digestibility and nutritional value of both maize lines in pigs,
- III Grower-finisher performance of pigs fed with diets rich in parental or transgenic maize
- IV Fate of foreign-DNA-fragments in pig bodies

The first study was to determine the composition and the nutritional value of parental and transgenic maize seeds fed to pigs. Both (parental and transgenic) maize lines were analyzed for crude nutrients, starch, sugar, non-starch polysaccharides, amino acids, fatty acids, as well as for selected minerals. Furthermore, four complete diets were mixed and were analyzed for the same nutrients and some selected ingredients. The diets contained 70 % maize to attain a high effect level. To evaluate the feeding value of one variety of genetically modified maize (transgenic) compared to the feeding value of the unmodified maize (parental) line, a balance study with twelve pigs was designed. Three collecting periods were used for each maize line each with six animals. All measured parameters were virtually the same (e.g. crude protein 11.59% vs. 11.06% in DM), especially the digestibility of crude protein ($85.8 \pm 2.3\%$ vs. $86.1 \pm 1.8\%$), the amount of Nitrogen-free-extract ($92.8 \pm 0.6\%$ vs. $93.2 \pm 0.6\%$) and the metabolizable energy ($15.7 \pm 0.2\%$ vs. $15.8 \pm$

0.2% MJ/kg DM) for both maize lines. Compared to the parental line, the chemical composition and digestibility of crude nutrients and energy content were not significantly affected by the genetic modification of maize. Therefore, from the view of a nutritional assessment, the genetically modified maize can be regarded as substantially equivalent to the parental maize line.

At second a grower finisher performance trial with forty-eight pigs was designed to compare the growth performance of pigs fed diets containing either transgenic or its parental maize line. During the experiment, the pigs were fed with a grower and a finisher diet both containing 70% maize which showed that they contained similar ME values and digestibility of crude nutrients. The pigs with an initial live weight of 23.9 ± 3.0 kg were allotted to single boxes. During a 91 days growing period the pigs of both groups recorded equal performance in daily weight gain 815 ± 93 vs. 804 ± 64 g/d depending on equal amounts of feed intake 1.95 ± 0.15 vs. 1.94 ± 0.15 kg/d (parental vs. transgenic). The results confirm equal performance among growing-finishing pigs fed parental or genetically modified maize containing diets.

In the third study the passage and fate of ingested DNA in 48 pigs fed with diets containing (n=12) parental or (n=36) transgenic (Bt) maize were examined. Animals fed transgenic maize were slaughtered in groups (n=6) 4, 8, 12, 24, 48 and 72 h after feeding the last maize-containing diet. Those slaughtered at up to 12 h received no further feed, while those held for longer prior to slaughter received a diet in which maize was replaced by barley and wheat. Control animals were slaughtered at 4 and 8 h. DNA extracted from tissues and gut contents was examined by PCR for the presence of plant DNA and for any transgenic material. Recombinant DNA was detectable in the intestinal contents up to 48 h after the last feeding of a diet containing the transgenic maize. PCR amplification of plant gene spacers produced fragments of different sizes, dependent on feed source. The feed source of rectum samples depended on individual passage rate in the groups and their restriction analysis showed grain species-specific patterns. Recombinant or maize-specific DNA was not detectable in tissue samples of pigs. In contrast, plant DNA fragments were detectable in the investigated pig tissues as well as in raw meat products thereof.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aeschbacher, K., Meile, L., Messikommer, R., Wenk, C. (2002). Influence of genetically modified maize on performance and product quality of chickens. *Proc.Soc.Nutr.Physiol.* **11**, 196.
- Allan, C. H., Mendrick, D. L., Trier, J. S. (1993). Rat intestinal M cells contain acidic endosomal-lysosomal compartments and express class II major histocompatibility complex determinants. *Gastroenterology* **104**, 698-708.
- Allen, G. E. (2000). The reception of Mendelism in the United States, 1900-1930. *C R.Acad.Sci III* **323**, 1081-1088.
- Aulrich, K., Böhme, H., Daenicke, R., Halle, I., Flachowsky, G. (2001). Genetically modified feeds in animal nutrition 1st communication: *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn in poultry, pig and ruminant nutrition. *Arch.Anim.Nutr.* **54**, 183-195.
- Aumaitre, A., Aulrich, K., Chesson, A., Flachowsky, G., Piva, G. (2002). New feeds from genetically modified plants: substantial equivalence, nutritional equivalence, digestibility, and safety for animals and the food chain. *Livest.Prod.Sci.* **74**, 223-238.
- Bakan, B., Melcion, D., Richard-Molard, D., Cahagnier, B. (2002). Fungal growth and fusarium mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *J.Agric.Food Chem.* **50**, 728-731.
- Beever, D. E., Mueller-Harvey, I. (2000). Improving the nutritional value of agricultural crops for farm livestock: opportunities with conventional and novel technologies. *Proc.6th Int.Feed Prod.Conf.Piacenza, 27./28.11.2000* 253-272.

- Berger, B., Aulrich, K., Fleck, G., Flachowsky, G. (2003). Influence of processing of isogenic and transgenic rapeseed on DNA-degradation. *Proc.Soc.Nutr.Physiol.* **12**, 108.
- Bienenstock, J., McDermott, M., Befus, D., O'Neill, M. (1978). A common mucosal immunologic system involving the bronchus, breast and bowel. *Adv.Exp.Med.Biol.* **107**, 53-59.
- BML. (2000). Orientation values for critical concentrations of deoxynivalenol and zearalenone in diets for pigs, ruminants and gallinaceous poultry. *VDM 27/00*, pp.2-3.
- Böhme, H., Aulrich, K., Daenicke, R., Flachowsky, G. (2001). Genetically modified feeds in animal nutrition 2nd communication: Glufosinate tolerant sugar beets (Roots and silage) and maize grains for ruminants and pigs. *Arch.Anim.Nutr.* **54**, 197-207.
- Brake, J., Vlachos, D. (1998). Evaluation of transgenic event 176 "Bt" corn in broiler chickens. *Poultry Science* **77**, 648-653.
- Brock, R. D. (1976). Prospects and perspectives in mutation breeding. *Basic Life Sci.* **8**, 117-132.
- Broll, H., Wagner, U., Spiegelberg, A., Zagon, J., Schauzu, M. (1998). Anwendung von Methoden zum Nachweis von gentechnisch veraenderten Sojabohnen und gentechnisch veraendertem Mais in im Handel befindlichen Lebensmitteln
Detection of genetically modified soya and maize in different processed foodstuff. *Bundesgesundheitsblatt* 560-562.
- Carson, R. L. (1962). Der andere Weg. In: Der stumme Frühling. Biederstein Verlag München. S. 273 - 326.

- Chakraborty, S., Chakraborty, N., Datta, A. (2000). Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 3724-3729.
- Chambers, P. A., Duggan, P. S., Heritage, J., Forbes, J. M. (2002). The fate of antibiotic resistance marker genes in transgenic plant feed material fed to chickens. *J.Antimicrob.Chemother.* **49**, 161-164.
- Chiter, A., Forbes, J. M., Blair, G. E. (2000). DNA stability in plant tissues: implications for the possible transfer of genes from genetically modified food. *FEBS Lett.* **481**, 164-168.
- Clark, A., Lehman, H. (2001). Assessment of GM crops in commercial agriculture. *J.Agric.Environ Ethics* **14**, 3-28.
- Clark, J. H., Ipharraquerre, I. R. (2001). Livestock performance: Feeding biotech crops. *J.Dairy Sci.* **84 (E. Suppl.)**, E9-E18.
- Commission of the European Communities. (2001). Proposal for a regulation of the European Parliament and of the Council on genetically modified food and feed (COM 2001-425 final).
- Cromwell, G. L., Lindemann, M. D., Randolph, J. H., Parker, G. R., Coffey, R. D., Laurent, K. M., Armstrong, C. L., Mikel, W. B., Stanisiewski, E. P., Hartnell, G. F. (2002). Soybean meal from roundup ready or conventional soybeans in diets for growing-finishing swine. *J.Anim.Sci.* **80**, 708-715.
- Daniell, H., Khan, M. S., Allison, L. (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* **7**, 84-91.

- DLG, Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft. (1991). DLG-Futterwerttabellen Schweine. 6. erw. u. völlig neu gestaltete Aufl. *DLG-Verlag Frankfurt (Main)*.
- Doerfler, W. (2000). Foreign DNA in mammalian systems. *Viley-VCM, Weinheim*.
- Dowd, P. F. (2000). Indirect reduction of ear molds and associated mycotoxins in *Bacillus thuringiensis* corn under controlled and open field conditions: utility and limitations. *J.Econ.Entomol.* **93**, 1669-1679.
- Duggan, P. S., Chambers, P. A., Heritage, J., Michael, Forbes J. (2003). Fate of genetically modified maize DNA in the oral cavity and rumen of sheep. *Br.J.Nutr.* **89**, 159-166.
- Duvick, J. (2001). Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environ.Health Perspect.* **109 Suppl 2**, 337-342.
- EC. (1997). Entscheidung der Kommission vom 23. Januar 1997 über das Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Mais (*Zea Mays* L.) mit der kombinierten Veränderung der Insektizidwirkung des Bt-Endotoxin-Gens und erhöhter Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinatammonium gemäß der Richtlinie 90/220/EWG des Rates, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 31/69.
- EC. (2001). Proposal for a regulation of the European Parliament and of the council on genetically modified food and feed.
- Ehlers, B., Strauch, E., Goltz, M., Kubsch, D., Wagner, H., Maidhof, H., Appel, B., Buhk, H.-J. (1997). Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. *Bundesgesundheitsblatt* 118-121.

- Einspanier, R., Klotz, A., Kraft, J., Aulrich, K., Poser, R., Schwägele, F., Jahreis, G., Flachowsky, G. (2001). The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborate case-study investigating cattle and chicken fed recombinat plant material. *Eur.Food Res.Technol.* **212**, 129-134.
- Ellis, W. C., Bleichner, K. L. (1969). Synthesis and digestion of nucleic acids in gastrointestinal tract of sheep. *J.Anim.Sci.* **29**, 157.
- Engelhardt, W. von, Breves, G. (2000). Physiologie der Haustiere. Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- Falk, M. C., Chassy, B. M., Harlander, S. K., Hoban, T. J., McGloughlin, M. N., Akhlaghi, A. R. (2002). Food biotechnology: benefits and concerns. *J.Nutr.* **132**, 1384-1390.
- Farries, F. E., Oslage, H. J. (1961). Zur Technik langfristiger Stoffwechselfersuche an wachsenden Schweinen. *J.Anim.Physiol.Anim.Nutr.* **16**, 11-19.
- Faust, M. A. (2002). New feeds from genetically modified plants: the US approach to safety for animals and the food chain. *Livest.Prod.Sci.* **74**, 254-239.
- Finucane, M. L. (2002). Mad cows, mad corn and mad communities: the role of socio-cultural factors in the perceived risk of genetically-modified food. *Proc.Nutr.Soc.* **61**, 31-37.
- Flachowsky, G., Aulrich, K. (2001a). Nutritional assessment of feeds from genetically modified organism (GMO). *J.Anim.Feed Sci.* **10(1)**, 181-194.
- Flachowsky, G., Aulrich, K. (2001b). Zum Einsatz gentechnisch veränderter Organismen (GVO) in der Tierernährung. *Übers.Tierernährg.* **29**, 45-79.

- Flachowsky, G., Jahreis, G. (1997). Fettsäureaufnahme des Menschen und Möglichkeiten der Beeinflussung durch die Tierernährung. *Fett/Lipid* **99**, 106-115.
- Forbes, J. M., Blair, G. E., Chiter, A., Perks, S. (1998). Effect of feed processing conditions on DNA fragmentation. *Scientific report no 376, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK*.
- Fu, H., Dooner, H. K. (9-7-2002). Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* **99**, 9573-9578.
- Gaines, A. M., Vallee, G. L., Rattliff, B. W. (2001). Swine digestible energy evaluations of Bt (MON810) and Roundup Ready[®] corn compared with commercial varieties. *J.Anim.Sci.Vol.79, Suppl.1/J.Dairy Sci.Vol.84, Suppl.1/Poult.Sci.Vol.80, Suppl.1/54th Annu.Rec.Meat Conf., Vol.II*, 109.
- Gassen, H. G., Hammes, W. P. (2001). Handbuch Gentechnologie und Lebensmittel. 5. Aktualisierung, Behrs Verlag, Hamburg.
- Gaut, B. S., Muse, S. V., Clark, W. D., Clegg, M. T. (1992). Relative rates of nucleotide substitution at the rbcL locus of monocotyledonous plants. *J.Mol.Evol.* **35**, 292-303.
- Gebert, A., Rothkotter, H. J., Pabst, R. (1994). Cytokeratin 18 is an M-cell marker in porcine Peyer's patches. *Cell Tissue Res.* **276**, 213-221.
- Gebert, A., Rothkotter, H. J., Pabst, R. (1996). M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int.Rev.Cytol.* **167**, 91-159.
- GfE, Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. (1987). Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere, Nr.4 Schweine. Ausschuß für Bedarfsnormen. *DLG-Verlag, Frankfurt (Main)*.

- Goloubinoff, P., Paabo, S., Wilson, A. C. (1993). Evolution of maize inferred from sequence diversity of an Adh2 gene segment from archaeological specimens. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**, 1997-2001.
- Haberer, B. (1997). Dissertation, Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Halle, I., Aulrich, K., Flachowsky, G. (1998). Einsatz von Maiskörnern der Sorte Cesar und des gentechnisch veränderten Bt-Hybriden in der Broilermast. *Proc.5.Tagung, Schweine- und Geflügelernährung, 01.-03.12.1998, Wittenberg, Tagungsband*, 265-271.
- Harlander, S. K. (2002). The evolution of modern agriculture and its future with biotechnology. *J.Am.Coll.Nutr.* **21**, 161S-165S.
- Heimbeck, W., Balschukat, D. (1996). *Die Aminosäuren-Zusammensetzung von Futtermitteln. [Aminodat 1.0] Degussa AG.*
- Hofte, H., Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol.Rev.* **53**, 242-255.
- Hohlweg, U., Doerfler, W. (2001). On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Mol.Gen.Genet.* **265**, 225-233.
- Holtorf, H., Guitton, M. C., Reski, R. (2002). Plant functional genomics. *Naturwissenschaften* **89**, 235-249.
- Hupfer, C., Engel, K.-H., Hotzel, H., Sachse, K. (1998a). Nachweis gentechnischer Veränderungen in LM aus transgenen Mais. *Lebensmittelchemie* **52**, 8-9.

- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K., Engel, K.-H. (1998b). Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by PCR. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.A* **206**, 203-207.
- James, C. (2002). Global review of commercialized transgenic crops: 2002. *ISAAA Briefs No.26: Preview. ISAAA: Ithaca, NY.*
- James, C., Krattiger, A. F. (1996). Global review of the field testing and commercialization of transgenic plants, 1986 to 1995: The first decade of crop biotechnology. *ISAAA Briefs No.1.ISAAA: Ithaca, NY.pp.31.*
- Jany, K. D., Kiener, C. (2002). Gentechnik und Lebensmittel. *Internist* **43**, 840-846.
- Jeroch, H., Drochner, W., Simon, O. (1999). Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere. Ulmer Verlag. Stuttgart.
- Klotz, A., Mayer, J., Einspanier, R. (2002). Degradation and possible carry over of feed DNA monitored in pigs and poultry. *Eur.Food Res.Technol.* **214(4)**, 271-275.
- Koziel, M. G., Beland, G. L., Bowman, C., Carozzi, N. B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPerson, K., Meghji, M. R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G. W., Wright, M., Evola, S. V. (1993). Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology* **11**, 194-200.
- Koziel, M. G., Desai, N., Lewis, K., Kramer, V. C., Warren, G. W., Evola, S., Crossland, L., Wright, M., Merlin, E., Launis, K., Rothstein, S. J., Bowman, C., Dawson, J., Dunder, E. M., Pace, G. M., Suttie, J. L. (1997). Synthetic DNA sequence having enhanced insecticidal activity in maize. *United States Patent Patent Number* **5625136**.

- Lai, J., Messing, J. (2002). Increasing maize seed methionine by mRNA stability. *Plant J.* **30**, 395-402.
- Lewin, R. (1998). Principles of human evolution. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Lücke, K-H. (1986). Mikrobiologische Vorgänge bei der Herstellung von Rohwurst und Rohschinken. *Fleischwirtschaft* **66 (3)**, 302-309.
- Makala, L. H., Haverson, K., Stokes, C. R., Bailey, M., Bland, P. W. (1998). Isolation and characterisation of pig Peyer's patch dendritic cells. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **61**, 67-81.
- Martin-Orue, S. M., O'Donnell, A. G., Arino, J., Netherwood, T., Gilbert, H. J., Mathers, J. C. (2002). Degradation of transgenic DNA from genetically modified soya and maize in human intestinal simulations. *Br.J.Nutr.* **87**, 533-542.
- Marx, D., Kolb, E., Salomon, F. V. (1992). Die Frischmasse sowie die Konzentration an DNA, RNA und Protein in verschiedenen Geweben von Schweinen unterschiedlichen Alters. *J.Vet.Med. A* **39**, 11-25.
- Maslow, A. H. (1987). Motivation and personality. 3rd Edition, Addison-Wesley Pub, New York.
- Matissek, R. (1998). Gentechnik im Lebensmittelbereich. Behr's Verlag, Hamburg.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M. M., Sanchez, G. J., Buckler, E., Doebley, J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S A* **99**, 6080-6084.
- McAllan, A. B. (1980). The degradation of nucleic acids in, and the removal of breakdown products from the small intestines of steers. *Br.J Nutr.* **44**, 99-112.

- McAllan, A. B. (1982). The fate of nucleic acids in ruminants. *Proc.Nutr.Soc.* **41**, 309-317.
- McAllan, A. B., Smith, R. H. (1969). Nucleic acid metabolism in the ruminant.
Determination of nucleic acids in digesta. *Br.J Nutr.* **23**, 671-682.
- McAllan, A. B., Smith, R. H. (1973a). Degradation of nucleic acid derivatives by rumen bacteria in vitro. *Br.J.Nutr.* **29**, 467-474.
- McAllan, A. B., Smith, R. H. (1973b). Degradation of nucleic acids in the rumen.
Br.J.Nutr. **29**, 331-345.
- Meyer, R., Candrian, U, Lüthy, J. (1994). Detection of pork in meat products by the polymerase chain reaktion. *J.AOAC International* **77 (3)**, 617-622.
- Molina, I., Silla, H., Flores, J., Monzo, J. L. (1989). Studie über die Keimflora in trocken gepökelttem Schinken. *Fleischwirtschaft* **69 (9)**, 1488-1490.
- Munkvold, G. P., Hellmich, R. L. (1999). Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. *Plant Dis.* **83**, 130-138.
- Naumann, C., Bassler, R. (1997). Die chemische Untersuchung von Futtermitteln.
Methodenbuch, Band III, VDLUFA-Verlag, Darmstadt.
- Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (1995). Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. 7. Auflage, Band II (Habermehl,K.-H.; Vollmerhaus,B.; Wilkens,H. Hrsg.)
Blackwell Wiss.-Verl., Berlin, Wien.
- Nikiforova, V., Kempa, S., Zeh, M., Maimann, S., Kreft, O., Casazza, A. P., Riedel, K., Tauberger, E., Hoefgen, R., Hesse, H. (2002). Engineering of cysteine and methionine biosynthesis in potato. *Amino.Acids* **22**, 259-278.

- OECD. (1993). Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology. Concepts and principles. Paris.
- Oota, H., Saitou, N., Matsushita, T., Ueda, S. (1999). Molecular genetic analysis of remains of a 2,000-year-old human population in China-and its relevance for the origin of the modern Japanese population. *Am.J.Hum.Genet.* **64**, 250-258.
- Owen, R. L. (1999). Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches--a personal and historical perspective. *Semin.Immunol.* **11**, 157-163.
- Owen, R. L., Apple, R. T., Bhalla, D. K. (1986). Morphometric and cytochemical analysis of lysosomes in rat Peyer's patch follicle epithelium: their reduction in volume fraction and acid phosphatase content in M cells compared to adjacent enterocytes. *Anat.Rec.* **216**, 521-527.
- Paabo, S., Gifford, J. A., Wilson, A. C. (1988). Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9775-9787.
- Phipps, R. H., Beever, D. E. (2000). New Technology: Issues relating to the use of genetically modified crops. *J.Anim.Feed Sci.* **9**, 543-561.
- Phipps, R. H., Park, J. R. (2002). Environmental benefits of genetically modified crops: Global and European perspectives on their ability to reduce pesticide use. *J.Anim.Feed Sci.* **11**, 1-18.
- Piva, G., Morlacchini, M., Pietri, A., Piva, A., Casadei, G. (2001a). Performance of weaned piglets fed insectprotected (MON 810) or near isogenic corn. *J Anim.Sci.79, Suppl.1, J.Dairy Sci.84, Suppl.1, Poult.Sci.80, Suppl.1, 54th Annu.Rec.Meat Conf., Vol.II*, 106.

- Piva, G., Morlacchini, M., Pietri, A., Rossi, F., Prandini, A. (2001b). Growth performance of broilers fed insectprotected (MON 810) or near isogenic control corn. *J.Anim.Sci.79, Suppl.1, J.Dairy Sci.84, Suppl.1, Poult.Sci.80, Suppl.1, 54th Annu.Rec.Meet Conf., Vol.II*, 320.
- Poehlman, J. M. (1979). Genetics and plant breeding: mutation. In "Breeding Field Crops". 2nd Edition, AVI Publishing Company, Westport CT.
- Rattay, D. (1998). Dissertation, Physiologisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- Razzaque, M. A., Topps, J. H., Kay, R. N., Brockway, J. M. (1981). Metabolism of the nucleic acids of rumen bacteria by preruminant and ruminant lambs. *Br.J.Nutr.* **45**, 517-527.
- Rickwood, D., Hames, B. D. (1990). Gel electrophoresis of nucleic acids: A practical approach. *IRL Press, Washington D.C.*
- Roll-Hansen, N. (2000). Theory and practice: the impact of Mendelism on agriculture. *C.R.Acad.Sci.III* **323**, 1107-1116.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning (A laboratory manual). 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1-3.
- SAS. (1986). Users guide-statistics. *6th Edition.SAS-Institute Inc.Cary, North Carolina.*
- Schell, T. v., Mohr, H. (1995). Biotechnologie – Gentechnik eine Chance für neue Industrien. Springer Verlag.

- Schiemann, R. (1981). Methodische Richtlinien zur Durchführung von Verdauungsversuchen für die Futterwertschätzung. *Arch.Tierernährung* **31**, 1-13.
- Schubbert, R., Hohlweg, H., Renz, D., Doerfler, W. (1998). On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol.Gen.Genet.* **259**, 569-576.
- Schubbert, R., Lettmann, C., Doerfler, W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol.Gen.Genet.* **242**, 495-504.
- Schubbert, R., Renz, D., Schmitz, B., Doerfler, W. (1997). Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leucocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc.Natl.Aca.Sci.USA* **94**, 961-966.
- Schulte, E., Weber, K. (1989). Schnelle Herstellung der Fettsäurenmethylester aus Fetten mit Trimethylsulfoniumhydroxid oder Natriummethylat. *Fat Sci.Technol.* **91**, 181-183.
- Schürch, A. (1969). Die Verdaulichkeit der Nahrung bzw. Nahrungskomponenten. In *(Handbuch der Tierernährung 1.Band Allgemeine Grundlagen, W.Lenkkeit, K.Breirem und E.Crasemann, Hrsg.), Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin,* 272-292.
- Segel, H. (1976). Biochemical calculations. *John Wiley & Sons, New York.*
- Shaw, A. (2002). "It just goes against the grain." Public understandings of genetically modified (GM) food in the UK. *Public Underst.Sci.* **11**, 273-291.

- Shelton, A. M., Zhao, J. Z., Roush, R. T. (2002). Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of bt transgenic plants. *Annu.Rev.Entomol.* **47**, 845-881.
- Sidhu, R. S., Hammond, B. G., Fuchs, R. L., Mutz, J. N., Holden, L. R., George, B., Olson, T. (2000). Glyphosate-tolerant corn: The composition and feeding value of grain from glyphosate-tolerant corn is equivalent to that of conventional corn (*Zea mays* L.). *J.Agric.Food Chem.* **48**, 2305-2312.
- Siebers, A., Finlay, B. B. (1996). M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol.* **4**, 22-29.
- Silbernagel, S., Despopulus, A. (1991). Taschenatlas der Physiologie. 4., überarb. Aufl., Dt. Taschenbuch-Verl., Stuttgart, New York, München.
- Smith, B. D. (1996). The emergence of agriculture. Scientific American Library, New York.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* **98**, 503-517.
- Spencer, J. D., Allee, G. L., Sauber, T. E. (2000a). Growing-finishing performance and carcass characteristics of pigs fed normal and genetically modified low-phytate corn. *J.Anim.Sci.* **78**, 1529-1536.
- Spencer, J. D., Allee, G. L., Sauber, T. E. (2000b). Phosphorus bioavailability and digestibility of normal and genetically modified low-phytate corn for pigs. *J.Anim.Sci.* **78**, 675-681.
- Steinmetz, A., Gubbins, E. J., Bogorad, L. (1982). The anticodon of the maize chloroplast gene for tRNA Leu UAA is split by a large intron. *Nucleic Acids Res.* **10**, 3027-3037.

- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol.Biol.* **17**, 1105-1109.
- Taylor, S. L. (2002). Protein allergenicity assessment of foods produced through agricultural biotechnology. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **42**, 99-112.
- Theander, O., Aman, P., Westerlund, E., Graham, H. (2002). The uppsala method for rapid analysis of total dietary fiber. *In: Furda, I., Brine, C.J.(Eds.) New Developments in Dietary Fiber.Plenum Press, New York, 273-281.*
- Tony, M., Broll, H., Zagon, J., Halle, I., Farrok, F., Edris, B., Awadalla, S., Bögl, K., Schauzu, M., Flachowsky, G. (2002). Detection and impact of Bt 178 maize on broiler health and performance. *Proc.Soc.Nutr.Physiol.* **11**, 197.
- Tony, M., Butschke, A., Broll, H., Schauzu, M., Halle, I., Dänicke, S., Flachowsky, G. (2003). Fate of DNA from isogenic and transgenic (Bt 176) maize after feeding to broilers. *Proc.Soc.Nutr.Physiol.* **12**, 109.
- Valenta, H., Daenicke, S., Wolff, J. (2002). Vergleich einer HPLC- und einer ELISA-Methode zur Bestimmung von Deoxynivalenol in Mühlenstäuben, Kleien und Getreide. *VDLUFA-Kongreßband 2002* in press.
- Valenta, H., Oldenburg, E. (1995). Bestimmung von Zearalenon, α -Zearalenol und α -Zearalenol in Maissilage mit HPLC und GC/MS. *VDLUFA-Schriftreihe 40/1995* **107. VDLUFA-Kongreß, Garmisch-Partenkirchen**, 957-960.
- van Haver, E., de Schrijver, A., Devos, Y., Lievens, S., Renckens, S., Moens, W. (2003). Guidance notes for the safety assessment of genetically modified crops for food and feed use. Report of the belgian biosafety advisory council, scientific institute of public health. *Royal library of belgium deposit* N° D/2003/2505/16.

- Van Hoef, A. M. A., Kok, E. J., Bouw, E., Kuiper, H. A., Keijer, J. (1998). Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products. *Food Additives and Contaminants* **15**, 767-774.
- Vize, P. D., Wells, J. R. (1987). Isolation and characterization of the porcine growth hormone gene. *Gene* **55**, 339-344.
- Waiblinger, H. U., Wurz, A., Freyer, R., Pietsch, K. (1999). A method for the specific detection of genetically modified rapeseed in honey. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **95**, 44-48.
- Wang, R. L., Stec, A., Hey, J., Lukens, L., Doebley, J. (18-3-1999). The limits of selection during maize domestication. *Nature* **398**, 236-239.
- Weber, T. E., Richert, B. T., Kendall, D. C., Bowers, K. A., Herr, C. T. (2000). Grower-finisher performance and carcass characteristics of pigs fed genetically modified Bt-corn. *Purdue 2000 Swine Day Report* .
- WHO/FAO. (2000). Consideration of the elaboration of standards, guidelines or other principles for foods derived from biotechnology.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**, 474-481.
- Xu, J., Pemberton, G. H., Almira, E. C., McCarty, D. R., Koch, K. E. (1995). The *Ivr 1* gene for invertase in maize. *Plant Physiol.* **108**, 1293-1294.
- Zeh, M., Casazza, A. P., Kreft, O., Roessner, U., Bieberich, K., Willmitzer, L., Hoefgen, R., Hesse, H. (2001). Antisense inhibition of threonine synthase leads to high methionine content in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* **127**, 792-802.

9 ANHANG

1	taatgaattc	aatgattcaa	aaaaactaa	gagatggatt	aaattataca	aggaatcctg
61	gtttcaaaga	aaagtaaaat	ggggatatgg	cgaaatcggg	agacgctacg	gacttgattg
121	tattgagcct	tggtatggaa	acctgctaag	tggtaaactc	caaattcaga	gaaaccctgg
181	aatgaaaaat	gggcaatcct	gagccaaatc	cctttttga	aaaacaagtg	gttctcaaac
241	tagaacccaa	aggaaaagga	taggtgcaga	gactcaatgg	a agct gttct	aacgaatcga
301	agtaataacg	attaatcaca	gaaccatata	tataatatag	gttctttatt	ttatttttag
361	aatgaaatta	ggaatgatta	tgaaatagaa	aattcataat	ttttttttag	aattattgtg
421	aatctattcc	aatcaaataat	tgagtaatca	aatccttcaa	ttcattgttt	tcgagatctt
481	ttaattttaa	aaagtggatt	aatcggacga	ggataaagag	agagtcccat	tctacatgtc
541	aatactgaca	acaatgaaat	ttctagtaaa	aggaaaatcc	gtcgcacttta	taagtcgtga
601	gg gttcaagt	ccctctatcc	cc aaaccctc	ttttattccc		

Abbildung 23 Position der **Primer Plant1 F/R** sowie der enzymatischen Schnittstelle beim Restriktionsverdau (*AluI*) im maisspezifischen Fragment aus dem Chloroplasten-Gen


```

1 atgcaccac aaacagaaac taaagcaagt gttggattta aagctgggtg taaggattat
61 aaattgactt actacacccc ggagtacgaa accaaggata ctgatatctt ggcagcattc
121 cgagtaactc ctcagctcgg ggttccgctt gaagaagcag gagctgcagt agctgcggaa
181 tcttctactg gtacatggac aactgtttgg actgatggac ttaccagtct tgatcgttac
241 aaaggacgat gctatcacat cgagcccgtt cctggggacc cagatcaata t a t c t g t t a t
301 gtagcttata cattagacct attgaagag ggttctgtta ctaacatgtt t a c t t c c a t t
361 gtgggtaacg t a t t t g g t t t c a a a g c c t t a c g c g c t c t a c g t t t g g a g g a t c t a c g a a t t
421 cccctgctt attcaaaaac tttccaaggt ccgcctcacg gtatccaagt tgaaagggat
481 aagttgaaca agtacggtcg tcctttattg ggatgtacta ttaaccaaaa attgggatta
541 tccgcaaaaa attacggtag agcgtgttat gagtgtctac gcggtggact t g a t t t t a c c
601 aaagatgatg aaaacgtaaa ctcaacaacca tttatgctgct ggagagaccg t t t c g t c t t t
661 tgtgccgaag caatttataa agcacaagcc gaaactggtg aatcaaggg g c a t t a c t t g
721 aatgcgactg caggtacatg cgaagaaatg attaagagag ctgtatttgc a a g g g a a t t a
781 ggggttccta ttgtaatgca tgactactta acaggaggat tcaccgcaaa t a c t a c t t t g
841 tctcattatt gccgcgacaa cggcctactt cttcacattc accgagcaat g c a t g c a g t t
901 attgatagac agaaaaatca tggatgcat ttccgtgtat tagctaaagc a t t g c g t a t g
961 tcggggggag atcatatcca ctccgttaca gtagtaggta agttagaagg g g a a c g c g a a
1021 ataactttag gttttgttga tttattgctg gatgatttta ttgaaaaaga t c g t t c t c g c
1081 ggtatctttt t c a c t c a g g a c t g g g t a t c c a t g c c a g g t g t t a t a c c g g t g g c t t c t g g g
1141 ggtattcatg tttggcataat gccagctctg accgaaatct ttggagatga t t c c g t a t t a
1201 caatttgggtg gaggaacttt aggacatcct tggggaaatg cacctgggtc a g c a g c t a a t
1261 cgtgtggctt tagaagcctg tgtacaagct cgtaacgaag ggcgcgatct t g c t c g t g a a
1321 ggtaatgaaa ttatcaaagc agcttgcaaa tggagtgtctg aactagccgc a g c t t g t g a a
1381 atatggaagg agatcaaatt tgatggtttc aaagcgatgg ataccatata a

```

Abbildung 24 Position der **Primer Rub 01/02** sowie der enzymatischen Schnittstelle beim Restriktionsverdau (*RsaI*) im Chloroplasten *rbcL* Gen für Ribulose-bisphosphate-carboxylase im Mais

WISSENSCHAFTLICHE ENTWICKLUNG

von Tim Reuter

geboren 07.06.1970 in Rodewisch

- seit Jan. 2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover
- Sept. 2001 Erfolgreicher Abschluss der betreuten Diplomarbeit: „Einfluss der Verfütterung von gentechnisch veränderten Mais auf die Qualität von Schweinefleisch“ an der Hochschule Anhalt (FH)
- Dez. 2002 - Aug. 1999 Gastwissenschaftler am Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig, Betreuer: Prof. Dr. G. Flachowsky
- Apr. 1999 - Okt. 1994 Studium der Ökotrophologie an der Hochschule Anhalt (FH) Bernburg, Abschluss: Diplom oec.troph. (FH), Betreuer Prof. Dr. W. Schnäckel
- Dez. 1998 - Juli 1998 Business Management an der Southern Polytechnic State University Atlanta / USA
- Juli 1995 - Feb. 1995 Facility Management, Internationales Semester an der Fachhochschule Münster

Eidesstattliche Erklärung

Der Unterzeichnende versichert hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation: „Vergleichende Untersuchungen zur ernährungsphysiologischen Bewertung von isogenem und transgenem (Bt) Mais und zum Verbleib von „Fremd“-DNA im Gastrointestinaltrakt und in ausgewählten Organen und Geweben des Schweines sowie in einem rohen Fleischerzeugnis“ selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Die Arbeit lag bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner Prüfungsbehörde vor.

Halle an der Saale, 12. 06. 2003

Tim Reuter

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. G. Flachowsky für die Ermöglichung meiner Promotion, für die zielführenden und aufschlussreichen Diskussionen sowie für seine wertvolle Unterstützung zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Frau Dr. Karen Aulrich danke ich ganz herzlich für die allumfassende und richtungsweisende Betreuung während der gesamten Promotionszeit.

Suse danke ich einfach für alles.

Dr. A. Berk, Dr. H. Böhme und Dr. E. Schulz danke ich für die zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen.

Bei allen Mitarbeitern der Tierernährung, besonders aber bei Dirk und Heinz, möchte ich mich für die Durchführung vieler analytischer und tierexperimenteller Arbeiten bedanken.

Für die innige Freundschaft und für viele schöne Momente möchte ich mich bei meinen Eltern, bei Suse, Karen, Detlef und bei allen hier nicht namentlich erwähnten Freunden bedanken.