



Gentechnisch veränderte Lebensmittel und Allergien – ein Update

Gentechnisch veränderte Lebensmittel sind Lebensmittel, die aus gentechnisch veränderten Organismen (GVO; Pflanzen, Tieren, Pilzen oder Mikroorganismen), hergestellt werden, daraus bestehen oder diese enthalten. Anders als Lebensmittel aus konventionellen Organismen, deren Verzehr aus Erfahrung als sicher gilt, dürfen sie in der Europäischen Union (EU) und vielen anderen Ländern erst auf den Markt gebracht werden, wenn die Organismen, aus denen sie hergestellt wurden, ein Zulassungsverfahren mit Sicherheitsprüfung durchlaufen haben. In der EU ist das Inverkehrbringen von GVO und daraus hergestellter Lebens- und Futtermittel durch die Verordnung (EG) 1829/2003 und die Freisetzung bzw. der Anbau von gentechnisch verändertem Saatgut durch die Richtlinie 2001/18/EG geregelt [1, 2]. In diesem Rahmen hatte das wissenschaftliche Gremium für gentechnisch veränderte Organismen (GMO-Panel) der European Food Safety Authority (EFSA) im Jahr 2011 die aktuell gültige Leitlinie zur Risikobewertung von Lebens- und Futtermitteln aus gentechnisch veränderten (GV) Pflanzen veröffentlicht, in welcher auch die Anforderungen an die Bewertung der Allergenität dieser Produkte beschrieben sind [3]. Ein Jahr zuvor hatte das Gremium in einer wissenschaftlichen Stellungnahme Aspekte von Lebensmittelallergien und Lebensmittelallergenen, die für die Bewertung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln eine Rolle spielen können, diskutiert und einen umfassenden Überblick über dafür geeignete wissenschaftliche Methoden gegeben bzw. deren Grenzen aufgezeigt [4].

Zurzeit werden die Leitlinien zur Bewertung der Allergenität von GVO und daraus hergestellten Produkten von einer Expertengruppe des GMO-Panels erneut überarbeitet, um die Bewertungsstrategien neuesten wissenschaftlichen Anforderungen anzupassen. Gleichzeitig etabliert die EFSA neue Strategien zur Einbindung von Interessengruppen in den Bearbeitungsprozess, um eine möglichst große Offenheit und Transparenz zu gewährleisten. Das GMO-Panel der EFSA hat in diesem Zusammenhang eine Pilot-Fokus-Gruppe von Vertretern aus EU-Mitgliedsstaaten und verschiedenen Interessengruppen eingerichtet, die die Aktualisierung der Leitlinien begleiten soll. Im Rahmen dieses Projekts fand am 17. Juni 2015 in Brüssel ein „Workshop on allergenicity assessment of GM plants“ statt, auf dem neue Entwicklungen in der Methodik der Allergenitätsbewertung gentechnisch veränderter Pflanzen und der von ihnen exprimierten Fremdproteine vorgestellt und diskutiert wurden. Da erst vor drei Jahren, kurz nach Verabschiedung der heute noch gültigen Leitlinie des GMO-Panels der EFSA, im Bundesgesundheitsblatt eine umfassende Darstellung der Allergenitätsbewertung gentechnisch veränderter Pflanzen und der in ihnen enthaltenen rekombinanten Proteine erschien [5], sollen an dieser Stelle vor allem das Bewertungsverfahren rekapituliert und im gegenwärtigen Aktualisierungsprozess nach sich abzeichnenden neuen Entwicklungen gesucht werden.

Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Pflanzen

GV-Pflanzen unterscheiden sich von ihren konventionellen Vorläufern meist durch die Expression rekombinanter Proteine, die von Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Sequenzen abgelesen werden, die in vitro aus dem Erbgut unterschiedlicher Organismen mithilfe gentechnischer Methoden konstruiert wurden. Auch wenn im Einzelfall Proteine nicht neu exprimiert, sondern manche Proteine auch in ihrer Expression unterdrückt werden, besteht das dafür notwendige Konstrukt in der Regel aus rekombinanter DNA. Da das gentechnische Konstrukt in das Erbgut von Pflanzen eingebettet ist, deren sichere Verwendung als Lebensmittel auf historischer Erfahrung beruht, folgt die Sicherheitsbewertung von GV-Pflanzen einem Konzept, das auf dem Vergleich der GV-Pflanze mit ihrer unmittelbaren Elternlinie bzw. einer genetisch sehr nahe verwandten Linie derselben Art – einer sogenannten nah-isogenen Vergleichsline – beruht (Konzept der substanzialen Äquivalenz) [6]. Dabei wird zunächst auf der Basis molekularbiologischer und bioinformatischer Analysen des Integrationsortes des rekombinanten Konstruktes in das Pflanzengenom kombiniert mit einer umfangreichen Inhaltsstoffanalyse festgestellt, ob die Zusammensetzung der GV-Pflanze unter Berücksichtigung der biologischen Variabilität der konventionellen Vergleichsline (bis auf die beabsichtigte Veränderung) vergleichbar ist, oder ob sich unbeabsichtigte Veränderungen in

Tab. 1 Übersicht über die in der EU zur Herstellung von Lebens- und Futtermitteln zugelassenen gentechnisch veränderten Pflanzen (aktualisiert nach [5] Stand: 07.11.2015)

Pflanzenart	Herbizid-toleranz	Insekten-resistenz	Herbizidtoleranz + Insektenresistenz	Weitere Eigenschaften	Amylopektin-Stärke
Mais	3	6	18	1 (Trockentoleranz)	
Baumwolle	5	3	2		
Raps	5 (davon zwei mit zusätzlicher männlicher Sterilität)				
Sojabohnen	7	1	2	2 (mit veränderten Inhaltsstoffen)	
Zuckerrüben	1				
Stärkekartoffel					1 ^a

^aBis zu einem Anteil von 0,9 % in Lebens- und Futtermitteln zugelassen

ihrer Zusammensetzung ergeben haben. Sofern Ersteres der Fall ist, steht im Fokus der weiteren Bewertung die neue Eigenschaft, also die Bewertung der ernährungsphysiologischen, toxischen und allergenen Eigenschaften des neuen Proteins bzw. der neuen Proteine.

Insgesamt werden zum Zweck der Sicherheitsbewertung:

- sowohl die Organismen, aus denen die einzelnen genetischen Sequenzen stammen, als auch die Empfänger-pflanze charakterisiert,
- die gentechnische Modifikation und Einbettung in das Empfänger-genom, ihre funktionellen Konsequenzen sowie ihre Stabilität beschrieben,
- die phänotypischen und agronomischen Eigenschaften der GV-Pflanze sowie
- die substanzielle Zusammensetzung in Relation zur konventionellen Vergleichslinie untersucht,
- die potenzielle Toxizität und Allergenität der neuen Genprodukte und der GV-Pflanze (ggf. auch von daraus abgeleiteten Produkten) durch anerkannte Testsysteme geprüft,
- der zu erwartende Verzehr und dessen Einfluss auf die Ernährung von Mensch und Tier abgeschätzt und
- Einflüsse auf die Verarbeitung und Lagerung der aus der GV-Pflanze hergestellten Produkte betrachtet.

Die erforderlichen Analysen und Studien werden vom Antragsteller durchgeführt, der die Informationen in einem strukturierten Antrag bereitstellt, der wiederum vom GMO-Panel der EFSA in Zusammenarbeit mit den zuständigen Bewer-

tungsbehörden der Mitgliedsstaaten geprüft wird.

Die Zulassung einer GV-Pflanze durch die EU-Kommission kann nur erfolgen, wenn das Ergebnis der Untersuchungen gezeigt hat, dass sich die aus den gentechnisch veränderten Pflanzen hergestellten Lebens- und Futtermittel – einschließlich des allergenen Potenzials – von den aus vergleichbaren konventionell gezüchteten Pflanzen hergestellten Erzeugnissen hinsichtlich der Lebensmittelsicherheit nicht wesentlich unterscheiden (siehe [Tab. 1](#)).

Strategien der Allergenitätsbewertung

Als Allergie wird ein pathologischer Zustand bezeichnet, in dem durch eine Immunreaktion auf eine spezifische Substanz, die in Individuen, die durch bestimmte genetische Dispositionen und Umwelteinflüsse gegen die Substanz sensibilisiert sind, klinische Symptome bis hin zum Tod verursachen können. Dabei hängen die Häufigkeit und die Schwere der Symptome sowohl von der Disposition des Individuums als auch von der Art und Menge des Auslösers ab.

Lebensmittelallergien können durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden, jedoch werden die meisten von ihnen durch spezifische Antikörper der Immunglobulin-E-Klasse (IgE) gegen Proteine, die mit den Lebensmitteln verzehrt werden, verursacht. Der Verlauf der Erkrankung spielt sich in zwei Phasen ab, die zeitlich weit auseinanderliegen können. In der ersten Phase, der Sensibilisierungsphase, bildet der Körper nach Allergenkontakt die spezifischen IgE-

Antikörper, die an das jeweilige Allergen binden können und selbst von Rezeptoren auf Effektorzellen, z. B. Mastzellen und Granulozyten, gebunden werden. In dieser Phase treten keine Symptome auf, aber das betroffene Individuum ist nun gegen das Allergen sensibilisiert.

Durch erneuten Allergenkontakt wird die zweite Phase ausgelöst, in der die Antikörper, die sich auf der Oberfläche der Effektorzellen befinden, das Allergen binden und die Zellen zur Ausschüttung von Histaminen und anderen Effektmediatoren veranlassen, die die typischen Symptome der allergischen Reaktion verursachen.

Da nahezu alle bekannten Allergene Proteine sind, stehen im Fokus der Allergenitätsbewertung von GV-Pflanzen die in ihnen exprimierten rekombinanten Proteine. Diese müssen sowohl hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die IgE-Neubildung zu veranlassen (Sensibilisierung), als auch hinsichtlich ihrer Fähigkeit, mit bereits vorhandenen IgE-Antikörpern reagieren zu können (Auslösung von Kreuzreaktivität durch IgE-Antikörper gegen strukturähnliche Proteine), bewertet werden. Darüber hinaus sind rekombinante Proteine aus GV-Pflanzen nicht nur Kandidaten für die Auslösung von Nahrungsmittelallergien, sondern kommen prinzipiell über die Pollenbildung auch als Auslöser von Atemwegsallergien in Frage.

Die Allergenität ist keine inhärente Eigenschaft eines Proteins, die vollständig vorhersehbar ist. Sie zeigt sich erst in der Interaktion mit dem genetisch und individualhistorisch vorgeprägten Immunsystem eines Individuums. Die verfügbaren Untersuchungsmethoden zur Bewertung der Allergenität eines Proteins bilden daher in der Regel nur ausgewählte Aspekte der komplexen allergischen Reaktion ab. Auch liefern die Methoden zur Bewertung der Sensibilisierungsfähigkeit eines Proteins nur unzureichende Informationen. Das GMO-Panel der EFSA empfiehlt daher für jede GV-Pflanze eine Gesamtbewertung aller Informationen (weight of evidence approach), die über die exprimierten rekombinanten Proteine zur Verfügung stehen [3]. Dabei soll zunächst festgestellt werden, ob die Pflanze selbst als Auslöser von Al-

lergien bekannt ist. Ist das nicht der Fall, kann die Bewertung auf die beabsichtigt exprimierten neuen Proteine fokussiert werden (siehe **Tab. 2**), wobei in jedem Fall auch die Eigenschaften putativer Proteine und Peptide, die sich ggf. aus den oben erwähnten bioinformatischen Analysen des Integrationsortes des rekombinanten Konstruktes in das Pflanzengenom ergeben haben, einbezogen werden müssen.

Handelt es sich bei der GV-Pflanze jedoch um eine Pflanzenart, die bereits in konventioneller Form als Lebensmittelallergen bekannt ist, wie z. B. die Sojabohne, dann ist zusätzlich die Allergenität der kompletten Pflanze zu prüfen. In diesem Zusammenhang wird festgestellt, ob sich durch die gentechnische Modifikation das endogene Allergenmuster und die IgE-Reaktivität im Vergleich zur konventionellen Pflanze verändert haben.

In die aktuell noch gültigen Leitlinie des GMO-Panels zur Sicherheitsbewertung von GV-Pflanzen wurden gegenüber den Vorläuferdokumenten zwei Aspekte in die Allergenitätsbewertung aufgenommen. Wenn die rekombinanten Proteine aus Weizen, Roggen, Gerste oder Hafer stammen, sind sie auf Ähnlichkeiten mit Gliadin- und Gluteninproteinen, die für die Auslösung von Zöliakie (einer T-Zell-vermittelten glutensensitiven Enteropathie) bei dafür sensitiven Personen verantwortlich sind, zu prüfen. Zum anderen sind die rekombinanten Proteine auch hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Immunreaktion in einer Weise zu verstärken, wie es für Adjuvantien typisch ist, zu bewerten.

Methodische Grundlagen der Allergenitätsbewertung – Stand und neue Aspekte

Bioinformatische Methoden

Die für die Bewertung erforderlichen bioinformatischen Studien beruhen vor allem auf dem Vergleich und der Analyse von Protein- bzw. DNA-Sequenzen. Die verwendeten Algorithmen (FASTA oder BLAST) liefern Informationen über den Grad der Ähnlichkeit des untersuchten Proteins mit bereits bekannten Allergenen [7], die sich in

Bundesgesundheitsbl DOI 10.1007/s00103-016-2362-3
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

B. Niemann · A. Pötting · A. Braeuning · A. Lampen

Gentechnisch veränderte Lebensmittel und Allergien – ein Update

Zusammenfassung

Das Inverkehrbringen gentechnisch veränderter Pflanzen als Lebens- und Futtermittel in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union (EU) bedarf einer Genehmigung der Europäischen Kommission. Der Genehmigung geht eine Sicherheitsbewertung nach Leitlinien der Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde EFSA voraus. Wesentlicher Bestandteil der Sicherheitsbewertung ist die Bewertung der Allergenität von gentechnisch veränderten Pflanzen sowie der von ihnen gebildeten neuen Proteine. Gegenwärtig werden die Leitlinien zur Bewertung der Allergenität überarbeitet. Dazu wurde in Brüssel am 17. Juni 2015 eine

Arbeitssitzung von Experten durchgeführt, auf der methodische Verbesserungen in der Bewertung zöliakieauslösender Eigenschaften von Proteinen sowie die Verwendung komplexer Modelle für den In-vitro-Verdau von Proteinen diskutiert wurden. Mithilfe solcher Methoden kann eine Verfeinerung des bestehenden bewährten Systems zur Allergenitätsbewertung von gentechnisch veränderten Pflanzen erfolgen.

Schlüsselwörter

Lebensmittel · Sicherheitsbewertung · Allergenität · Gentechnik · Gentechnisch veränderte Pflanzen

Genetically modified food and allergies – an update

Abstract

Approval by the European Commission is mandatory for placing genetically modified plants as food or feed on the market in member states of the European Union (EU). The approval is preceded by a safety assessment based on the guidance of the European Food Safety Authority EFSA. The assessment of allergenicity of genetically modified plants and their newly expressed proteins is an integral part of this assessment process. Guidance documents for the assessment of allergenicity are currently under revision. For this purpose, an expert workshop was conducted in Brussels on

June 17, 2015. There, methodological improvements for the assessment of coeliac disease-causing properties of proteins, as well as the use of complex models for *in vitro* digestion of proteins were discussed. Using such techniques a refinement of the current, proven system of allergenicity assessment of genetically modified plants can be achieved.

Keywords

Food · Safety assessment · Allergenicity · Genetic engineering · Genetically modified plants

Kombination mit Ergebnissen aus weiter unten erwähnten biochemischen In-vitro-Analysen als Hinweise für eine mögliche Kreuzreaktion des Proteins mit vorhandenen IgE-Antikörpern sowie als schwacher Indikator für ein mögliches Sensibilisierungsvermögen interpretieren lassen. Die Proteinsequenzen bekannter Allergene, sowie auch die üblichen notwendigen Werkzeuge zur Sequenzanalyse, werden z. B. in der FARRP (Food Allergy Research and Resource Program)-Allergen-Protein-Datenbank „Allergen-online“ bereitgestellt (<http://www.allergenonline.com>). Wenn im Zuge dieser Analysen in Abschnitten von jeweils mindestens 80 Aminosäuren Übereinstimmungen

von mindestens 35 % zwischen einem rekombinanten Protein und einem Allergen gefunden werden, kann von einer möglichen Kreuzreaktion ausgegangen werden.

Ein bioinformatischer Sequenzvergleich mit bekannten Allergenen auf Basis aktueller Datenbanken wird für die Bewertung jedes rekombinanten Proteins verlangt. Die unabsichtlich entstandenen kodierenden Sequenzen für putative Peptide, die möglicherweise bei DNA-Sequenzanalysen des Integrationsortes des rekombinanten Konstruktes in das Pflanzengenom identifiziert wurden, sind jedoch in der Regel kürzer. In diesen Fällen ist der Sequenzvergleich daher auf die Identifizierung von acht aufein-

Tab. 2 Übersicht über die in den zugelassenen gentechnisch veränderten Pflanzen exprimierten neuen Proteine. (Aktualisiert nach [5] Stand: 07.11.2015)

Phänotyp/ Funktion	Protein	Gen		Spenderorganismus
Insektenresistenz	Delta-Endotoxine	<i>cry1Ab</i>	<i>cry2Ab2</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
		<i>cry1Ab2</i>	<i>cry3 A</i>	
		<i>cry1 A.105</i>	<i>cry3Bb1</i>	
		<i>cry1Ac</i>	<i>cry34Ab1</i>	
		<i>cry1 F</i>	<i>cry35Ab1</i>	
Herbizidtoleranz	5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-synthase (PC4 EPSPS)	<i>cp4epsps</i>		<i>Agrobacterium sp. Stamm CP4</i>
		<i>mepsps</i>		<i>Zea mays</i>
Herbizidtoleranz	Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT)	<i>pat</i>		<i>Streptomyces viridochromogenes</i>
		<i>bar</i>		<i>S. hygrosopicus</i>
Herbizidtoleranz	Glyphosat-Oxidoreduktase (GOX)	<i>gox</i>		<i>Achromobacter sp. Stamm LBAA</i>
Herbizidtoleranz	Glyphosat-Acetyltransferase (GAT4621)	<i>gat4621</i>		<i>Bacillus licheniformis</i>
Herbizidtoleranz	Acetohydroxyazidsynthase (mutiert)	<i>csr1-2</i>		<i>Arabidopsis thaliana</i>
Herbizidtoleranz	Dicamba Monooxygenase	<i>dmo</i>		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Trockenresistenz	Kälteschockprotein B	<i>cspB</i>		<i>Bacillus subtilis</i>
Selektionsmarker	Neomycin-Phosphotransferase (NPTII)	<i>nptII</i>		<i>Escherichia coli</i>
Selektionsmarker	Phosphomannose-Isomerase (PMI)	<i>pmi</i>		<i>E. coli</i>
Stoffwechsel	Delta-6-Desaturase	<i>pj.d6 d</i>		<i>Primula juliae</i>
Stoffwechsel	Delta-15-Desaturase	<i>nc.fad3</i>		<i>Neurospora crassa</i>
Ribonuklease	Barnase	<i>Barnase</i>		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Ribonuklease-Inhibitor	Barstar	<i>Barstar</i>		<i>B. amyloliquefaciens</i>

anderfolgenden, mit dem Vergleichsprotein identischen Aminosäuren gerichtet, die auf mögliche IgE-Bindungsepitope schließen lassen. Neben dem Sequenzvergleich werden bioinformatische Analysen auch zur Identifizierung von Bereichen, in denen Proteine modifiziert werden können, verwendet. So können z. B. potenzielle Glykosylierungsstellen identifiziert werden.

Bioinformatische Analysen zur Identifikation von Sequenzähnlichkeiten sind zurzeit das einzige Instrument, das für die Bewertung der Ähnlichkeit rekombinanter Proteine mit gliadin- und glutenähnlichen Proteinen sowie bekannten Adjuvantien eingesetzt wird. Auf dem „Workshop on allergenicity assessment of GM plants“ am 17. Juni 2015 in Brüssel bildeten Entwicklungen, die die Vorher-

sage von zöliakieauslösenden Proteineigenschaften verbessern können, daher einen Schwerpunkt. Vorgestellt wurde eine Reihe toxischer T-Zell-Peptide aus Weizengliadinen, die nach Modifikation durch die Gewebstransaminase und partiellem Abbau in der Darmmukosa Bindungspartner für HLA-DQ2/DQ8-Moleküle antigenpräsentierter Zellen sein können [8]. Diese Peptide, deren Entstehung auch von der Spezifität der Transaminase für bestimmte Prolinmuster in der Sequenz von Gluteninen und Gliadinen abhängt, sind für die Entstehung der T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen die Darmmukosa, die die Zöliakie kennzeichnet, entscheidend [9]. Aus diesen Informationen entwickelte bioinformatische Algorithmen konnten erfolgreich zur Vorhersage der Bildung

toxischer Peptide aus Roggen-, Gerste- und Hafer-Gliadinen getestet werden.

Weiterhin wurde die Entwicklung eines neuen Algorithmus vorgestellt, der auf der Basis von 68 zöliakieinduzierenden Proteinen die Identifizierung einer möglichen Bildung toxischer Peptide aus Vergleichsproteinen erlaubt und der bereits in das Arsenal der FARRP-Datenbanken implementiert wurde. Einer Aufnahme dieses erweiterten bioinformatischen Vorhersagewerkzeuges in die zu aktualisierende Leitlinie stünde damit nichts entgegen.

Angesprochen wurde auch die Frage, ob Produkte aus Hafer, die von vielen Zöliakiepatienten vertragen werden, zu den zöliakieauslösenden Lebensmitteln gezählt werden müssen oder nicht. Da sich durchaus Einzelfälle finden, in denen Produkte aus Hafer Zöliakiesymptome verursachen, lassen sich diesbezüglich noch keine eindeutigen Schlussfolgerungen ziehen [10].

In-vitro-Methoden zur biochemischen und immunologischen Charakterisierung einzelner Proteine

Allergene Proteine gehören unterschiedlichen Proteinklassen an. So wurden hydrolytische und nichthydrolytische Enzyme, Enzyminhibitoren, regulatorische Proteine, Lipidtransferproteine, Stressproteine und Speicherproteine als Allergene identifiziert. Bei der Mehrheit der bekannten Allergene handelt es sich um relativ kleine Proteine (10–70 kDa), die gut löslich und häufig glykosyliert sind [11, 12]. Darüber hinaus weisen sie häufig eine relativ große Stabilität gegenüber Verdauungsenzymen, die sich im sauren Milieu des Magens, aber auch im Darm befinden, auf [12]. Strukturell sind Allergene zwar nicht von anderen Antigenen unterscheidbar, trotzdem tragen Informationen und Untersuchungen zur Struktur und Funktion, zum Molekulargewicht und zu den physikochemischen Eigenschaften sowie zur Konzentration des Proteins in den als Lebensmittel genutzten Pflanzenteilen zum Vergleich mit typischen Lebensmittelallergenen bei.

Die biochemische Charakterisierung rekombinanter Proteine erfolgt in der Regel mittels Gelelektrophorese und Western-Blotting-Technik, wobei für den Glykosylierungsnachweis Lektine anstelle von spezifischen Antikörpern gegen das Protein verwendet werden. MALDI-TOF- und LC-ESI-Massenspektroskopie sowie Sequenzierung der N- und C-Termini der Proteine geben Aufschluss über mögliche, beispielsweise durch die Reinigung verursachte Veränderungen der Aminosäuresequenz oder über chemische Modifikationen am Protein wie z. B. Deamidierung oder Sulfoxidation. Wenn in den In-vitro-Studien ein Protein verwendet wird, das bakteriell produziert wurde, muss über die oben genannten Techniken auch nachgewiesen werden, dass dieses Protein mit dem in Pflanzen exprimierten Protein identisch ist.

Die Stabilität der neuen Proteine gegenüber proteolytischen Enzymen wird in validierten Testsystemen mit künstlichem Magensaft und künstlichem Darmsaft geprüft. Dabei werden die Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten und die Dauer des Kontakts des Proteins mit den jeweiligen Verdauungsmilieus in vitro nachgestellt [13]. Nach jedem Verdauungsabschnitt wird anhand von Proben, die in definierten zeitlichen Abständen entnommen werden, das Abbauverhalten des Proteins mittels Gelelektrophorese und ggf. auch Western Blotting überprüft.

Sofern die Quelle eines rekombinanten Proteins als allergieauslösender Organismus bekannt ist, muss die Allergenität des Proteins in einem IgE-Bindungsassay überprüft werden. Dazu eignen sich Verfahren wie Radio-Allergo-Sorbent-Tests (RAST), Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) und Immunoblots mit Seren von Allergikern mit gut charakterisierter und klinisch manifestierter Reaktion auf den allergenen Organismus. IgE-Bindungsstudien sind ebenfalls erforderlich, wenn die bioinformatischen Analysen Hinweise auf die Ähnlichkeit des rekombinanten Proteins mit einem bekannten Allergen erbracht haben. In diesem Fall müssen Seren von Allergikern gegen die dem Protein ähnlichen Allergene verwendet

werden. Jedes Serum sollte individuell getestet werden, und es müssen geeignete Negativkontrollen mitgeführt werden.

Die Entwicklung und Standardisierung zellbasierter In-vitro-Tests und In-vivo-Tests an Modelltieren werden als Ergänzung des derzeit verfügbaren Methodenspektrums zur Allergenitätsbewertung neu exprimierter Proteine empfohlen. Validierte Studienprotokolle liegen hierzu jedoch bisher nicht vor.

Die verwendeten In-vitro-Methoden zur Verdaubarkeit der Proteine bilden die Realität nur teilweise ab [14]. So sind die gastrointestinalen Enzyme in den artifiziellen Systemen gegenüber dem rekombinanten Protein in großem Überschuss vorhanden, da sich keine weiteren Nahrungsbestandteile im System befinden. Auch steigt der pH-Wert des Magens in vivo durch die verzehrte Nahrung in Abhängigkeit von den verzehrten Mengen und ihrer Zusammensetzung an. Weiterhin sind individuelle Unterschiede im Verdauungsgeschehen, die durch verschiedene Entwicklungsstadien (z. B. Kinder) oder pathologische Bedingungen (z. B. die Einnahme von magensäurehemmenden Medikamenten) verursacht werden, mit den verwendeten Modellen ebenso wenig erfassbar wie Effekte der Lebensmittelmatrix, mit der das rekombinante Protein verzehrt wird. So könnte die in vitro ermittelte Pepsinresistenz mancher Proteine durch einfaches Ausfällen im sauren Milieu verursacht sein und im Nahrungskontext gar nicht auftreten. Bisher ist daher noch unklar, ob die Pepsinresistenz eines Proteins tatsächlich auch eine Verdauungsresistenz widerspiegelt [15]. Die Diskussion der Grenzen der verwendeten Verdauungsmodelle, die gegenüber der Physiologie stark vereinfacht sind, sowie die Anforderungen an entwickelte Methoden des In-vitro-Verdaus bildeten daher einen weiteren Schwerpunkt auf dem „Workshop on allergenicity assessment of GM plants“. In diesem Zusammenhang wurden zum Teil hochkomplexe Modelle vorgestellt, die sowohl die mechanische Zerkleinerung der Nahrung als auch die Dynamik der Darmperistaltik mit abbilden. Geeignete In-vitro-Verdaumodelle sollen auch das Mischungs- und Fließverhalten des gastrointestinalen Trakts

(GIT), die dynamischen pH-Bedingungen und Enzymkonzentrationen entlang des GIT sowie den Abbau ganzer Lebensmittel und Mahlzeiten besser simulieren. Gleichzeitig sollen sie einfach zu handhaben, zwischen verschiedenen Laboratorien reproduzierbar und am menschlichen Verdauungsprozess validiert sein. Unter den vorgestellten Modellen erschien ein Modell, das zwischen 2011 und 2015 im internationalen Projekt INFOGEST entwickelt wurde [16], am ehesten geeignet, in zukünftige Leitlinien aufgenommen zu werden. Das statische Modell simuliert den Verdauungsprozess ganzer Lebensmittel von Mund bis zum Dünndarm. Die einzelnen Schritte wurden standardisiert und zwischen sieben Laboratorien validiert. Zur erleichterten Anwendung des Modells wurde eine Reihe von Videos produziert, die im Internet frei verfügbar sind.

Methoden zur Bewertung eines veränderten Gehalts endogener Allergene

Bei Pflanzen mit bekanntem allergieauslösendem Potenzial stellt sich die Frage, ob durch die Integration rekombinanter DNA in das Genom bzw. durch die Expression rekombinanter Proteine, die selbst keine Allergene sind, eine unbeabsichtigte Veränderung der Expression endogener Allergene erzeugt wurde. Überprüfen lässt sich das durch einen qualitativen und quantitativen Vergleich des endogenen Allergenmusters der GV-Pflanze mit dem der Ausgangspflanze. Dazu eignet sich zum einen eine zweidimensionale Gelelektrophorese zur Separierung der aus der GV-Pflanze und der Ausgangspflanze extrahierten Proteine, gefolgt von Immunoblots mit Serumproben von Allergikern, die nachgewiesenermaßen auf Produkte aus der jeweiligen Ausgangspflanze, beispielsweise Sojabohnen, allergisch reagieren. Angesichts nur begrenzt verfügbarer humaner Seren wird ein Vorabscreening mit Seren von Tieren empfohlen, die mit den in der vergleichenden Analyse identifizierten relevanten endogenen Allergenen experimentell sensibilisiert wurden. Auch hier eignen sich ELISA-Techniken mit Serumproben von Allergikern für einen

Vergleich der IgE-Reaktivität einer GV-Pflanze mit der Vergleichspflanze. Neben dem Immunoblotting sind nach 2-D-Elektrophorese auch massenspektrometrische Methoden zur Identifizierung der Allergene anwendbar.

Die Bewertung veränderter Allergenmuster in GV-Pflanzen wird durch natürliche Schwankungen in der Biosynthese von Proteinen, die zu deutlichen Unterschieden im Expressionsniveau der Allergene führen kann, sowie durch die hohe Variabilität der allergischen Reaktion der betroffenen Individuen erschwert. Es existieren bisher nur wenig Daten über die natürliche Variabilität der Allergenexpression in konventionellen Nutzpflanzen, die von schwankenden klimatischen Bedingungen, unterschiedlichen Nährstoffangeboten sowie durch parasitischen oder abiotischen Stress beeinflusst wird. Diese Kenntnis ist jedoch Grundlage des vergleichenden Bewertungsansatzes, nach dem auf der Basis der Variabilität von konventionellen Vergleichspflanzen Identitäts- und Äquivalenzkriterien für die Bewertung der GV-Pflanze abgeleitet werden [17]. Bereits in der Scientific Opinion des GMO-Panels der EFSA [4] wurde daher die Entwicklung von Omics-Methoden, die ein Profiling der Allergenexpression erlauben, diskutiert. Auf dem „Workshop on allergenicity assessment of GM plants“ bildete diese Fragestellung einen dritten Schwerpunkt, der anhand von Erfahrungen mit der Quantifizierung von Sojabohnenallergenen diskutiert wurde. Die Firma Monsanto hat Expressionsdaten, die mittels Allergen-ELISA erhoben wurden, für acht Sojabohnenallergene, die von 624 Sojabohnensamen aus 41 Varietäten über fünf Jahre von 26 unterschiedlichen Standorten aus den USA und Südamerika gesammelt wurden, hinsichtlich der biologischen Variabilität ausgewertet. Dabei zeigten sich große Schwankungen (5- bis 40-fach, abhängig vom Allergen) der Allergenkonzentration, wobei Umweltbedingungen und Genotyp als stärkste Einflussfaktoren identifiziert wurden.

Auf dem oben genannten Workshop wurde zusätzlich die Frage gestellt, ob GV-Pflanzen auch hinsichtlich ihres Potenzials zur Auslösung von nicht-IgE-

vermittelten Lebensmittelunverträglichkeiten, wie z. B. der eosinophilen Ösophagitis, des nahrungspoteininduzierten Enterocolitisyndroms (FPIES) oder der Weizenhypersensitivität, geprüft werden müssten. Für diese Erkrankungen lässt sich jedoch der Zusammenhang zwischen den Symptomen und konkreten Lebensmitteln nicht immer herstellen, weshalb es an klaren Bewertungskriterien mangelt.

Im Kontext der Betrachtung endogener Allergene in GV-Pflanzen kann außerdem über die erste klinische Prüfung einer allergenreduzierten GV-Pflanze berichtet werden. In der Apfelsorte Elstar wurde mittels RNAi-Technologie die Expression des Allergens Mal D 1.02 unterdrückt und die so entwickelte GV-Linie an 21 Apfelallergikern getestet. Der Verzehr von Apfelstückchen aus den Früchten der GV-Linie führte im Vergleich zur Elternlinie bei den untersuchten Probanden zu signifikant weniger klinischen Symptomen [18].

Fazit

In Bezug auf die Allergenitätsbewertung zeichneten sich auf dem Workshop methodische Verbesserungen für die Bewertung zöliakieauslösender Eigenschaften von Proteinen sowie ein Trend zu realistischeren Verdaumodellen ab. Mit der Pilot-Fokus-Gruppe aus Vertretern von Mitgliedsstaaten und Interessengruppen bindet die EFSA vor allem die Nutzer in die Aktualisierung der Empfehlungen zur Allergenitätsbewertung von GV-Pflanzen und der in ihnen exprimierten rekombinanten Proteine ein. Dadurch soll die Leitlinienaktualisierung an Transparenz gewinnen und benutzerfreundlich gestaltet werden. Da mit diesem Vorgehen kommunikatives Neuland betreten wird, bleibt abzuwarten, inwieweit sich die Arbeit der Fokusgruppe auch inhaltlich widerspiegeln wird.

Der Zuwachs an Genehmigungsentscheidungen für gentechnisch veränderte Mais-, Baumwoll-, Soja-, Raps-, Zuckerrüben- und Kartoffelsorten in der Europäischen Union ist gegenüber dem Stand vor drei Jahren [5] überschaubar geblieben (siehe [Tab. 1](#)). Unter den gen-

technischen Modifikationen dominieren weiterhin die Herbizidtoleranz und integrierter Insektenschutz. Daher mussten auch nur wenige neue Proteine bezüglich ihrer Allergenität bewertet werden (siehe [Tab. 2](#)). In der Gesamtbewertung der durchgeführten Untersuchungen gab es nur einen Fall, in dem sich Hinweise auf die erhöhte Allergenität der jeweiligen GV-Pflanze gegenüber der konventionellen Vergleichslinie ergeben hatten. Dabei handelte es sich um einen Mais, der eine hitzetolerante alpha-Amylase besaß, die aus drei Genen unterschiedlicher Bakterienstämme der Gattung *Thermococcales* zusammengesetzt war. In dem Enzym wurde eine Identität von acht Aminosäuren mit dem Per a 3-Allergen einer amerikanischen Schabenart (*Periplaneta americana*) identifiziert, weshalb das GMO-Panel der EFSA auf Unsicherheiten bezüglich der Sensibilisierungsfähigkeit des Proteins schloss [19]. Der Mais wurde von der EU-Kommission daher nicht zugelassen.

Korrespondenzadresse

Dr. B. Niemann

Abt. Lebensmittelsicherheit, Bundesinstitut für Risikobewertung
Max-Dohrn-Str. 8–10, 10589 Berlin,
Deutschland
Birgit.niemann@bfr.bund.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. B. Niemann, A. Pötting, A. Braeuning und A. Lampen geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine von den Autoren durchgeführten Studien an Menschen oder Tieren.

Literatur

1. Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel. Amtsbl Europ Union L 268:1–23
2. Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates. Amtsbl Europ Union L 106:1
3. EFSA (2011) Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. EFSA J 9:2150

-
4. EFSA (2010) Scientific opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed. EFSA J 8:1700
 5. Schauzu M, Pötting A, Rubin D, Lampen A (2012) Allergenitätsbewertung von Lebensmitteln aus gentechnisch veränderten Pflanzen. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 55:402–407
 6. Kuiper HA, Kleter GA, Noteborn HP, Kok EJ (2002) Substantial equivalence—an appropriate paradigm for the safety assessment of genetically modified foods? Toxicology 181–182:427–431
 7. Mirsky HP, Cressman RF Jr, Ladics GS (2013) Comparative assessment of multiple criteria for the in silico prediction of cross-reactivity of proteins to known allergens. Regul Toxicol Pharmacol 67:232–239
 8. Sollid LM, Qiao SW, Anderson RP, Gianfrani C, Koning F (2012) Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. Immunogenetics 64:455–460
 9. Vader LW, Ru A de, Wal Y van der et al (2002) Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. J Exp Med 195:643–649
 10. Comino I, Moreno ML de, Sousa C (2015) Role of oats in celiac disease. World J Gastroenterol 21:11825–11831
 11. Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T (2015) Common food allergens and their IgE-binding epitopes. Allergol Int 64:332–343
 12. Lehrer SB, Horner WE, Reese G (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. Crit Rev Food Sci Nutr 36:553–564
 13. Fu TJ, Abbott UR, Hatzos C (2002) Digestibility of food allergens and non-allergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid – a comparative study. J Agric Food Chem 50:7154–7160
 14. Wickham M, Faulks R, Mills C (2009) In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. Mol Nutr Food Res 53:952–958
 15. Bøgh KL, Madsen CB (2016) Food allergens: is there a correlation between stability to digestion and allergenicity? Crit Rev Food Sci Nutr : doi:10.1080/10408398.2013.779569
 16. Minekus M, Alming M, Alvito P et al (2014) A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. Food Funct 5:1113–1124
 17. Fernandez A, Mills EN, Lovik M et al (2013) Endogenous allergens and compositional analysis in the allergenicity assessment of genetically modified plants. Food Chem Toxicol 62:1–6
 18. Dubois AE, Pagliarini G, Brouwer RM et al (2015) First successful reduction of clinical allergenicity of food by genetic modification: Mal d 1-silenced apples cause fewer allergy symptoms than the wild-type cultivar. Allergy 70:1406–1412
 19. EFSA (2013) Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-UK-2006-34) for the placing on the market of genetically modified maize 3272 with a thermotolerant alpha-amylase, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Syngenta Crop Protection AG, EFSA J 11:3252