

Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben A/05/12
Ihr Zeichen: M 2-7606.2-525

**„Einsatz von transgenem Mais (MON810) bei Milchkühen:
Abbau, Transfer sowie potentielle Interaktionen von DNA
und Bt-Protein im Rind“**

Heinrich H.D. Meyer¹, Hubert Spiekers², Frieder Schwarz³, Patrick Gürtler¹, Vijay Paul¹, Kerstin Steinke^{2,3}, Wolfgang Preißinger², Christiane Albrecht^{1,4}, Steffi Wiedemann¹

¹ Lehrstuhl für Physiologie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TUM

² Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft, Bayr. Landesanstalt für
Landwirtschaft (LfL), Grub

³ Lehrstuhl für Tierernährung, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TUM

⁴ aktuelle Adresse: Institut für Biochemie und Molekulare Medizin, Universität Bern

Korrespondenz an

Prof. Dr. Heinrich H.D. Meyer
Lehrstuhl für Physiologie
Technische Universität München
Weihenstephaner Berg 3
85354 Freising/Germany
Tel. +49 (0) 8161 71 3508
FAX: +49 (0) 8161 71 4204
physio@wzw.tum.de
<http://www.wzw.tum.de/fml/physio/>

Inhalte

Einleitung und Ausgangssituation

Ziele der Studie

Maisanbau und -konservierung

25-monatige Fütterungsstudie mit Milchkühen

Fütterung und Nährstoffäquivalenz

Milchleistung

Stoffwechselfparameter, Tiergesundheit und Fruchtbarkeit

Fazit der 25-monatigen Fütterungsstudie mit Milchkühen

Neue Entwicklungen in der Analytik

Entwicklung und Validierung sensitiver Verfahren für cry1Ab-DNA

Entwicklung und Validierung sensitiver Verfahren für Cry1Ab-Protein

Metabolisierung von rekombinanter DNA und Cry1Ab-Protein in der Milchkuh

Befunde zum Lebensmittel Milch

Geschwindigkeit des Cry1Ab-Protein Abbau in der Verdauung

Resümee und Schlussfolgerungen

Anlagen - Bisherige Publikationen und Manuskripte aus dem Projekt

Einleitung und Ausgangssituation

Bis 2004 waren in der wissenschaftlichen Primärliteratur nur Kurzzeitstudien über wenige Wochen bzw. wenige Monate zum Einsatz von gentechnisch verändertem Mais MON810 bekannt. Es bestand grundsätzlicher Klärungsbedarf, ob bei einer langfristigen Fütterung Auswirkungen bei Lebensmittel liefernden Tieren auftreten können.

Die vergleichenden Studien, die als Originalarbeiten in referierten Journalen publiziert waren, bezogen sich vorrangig auf die Prüfung der Nährstoffäquivalenz und auf Leistungsdaten, wie Milchproduktion oder Wachstum, sowie auf die Tiergesundheit. Bezüglich des Abbaus transgener Komponenten stand die rekombinante DNA im Vordergrund, und es zeigte sich, dass beim Abbau nicht transgener DNA-Bereiche und rekombinanter DNA keine Unterschiede bestehen. Demgegenüber existierten weniger solide Daten zum Abbau des Cry1Ab-Proteins, dem Protein, das als Fraßschutz gegen den Maiszünsler in den Zellen des transgenen Mais direkt produziert wird. Mais der Sorte MON810 ist resistent gegen den Maiszünsler. Dies wurde durch die Integration des *cry1Ab*-Gens in das Maisgenom erreicht, was die Maispflanze dazu befähigt, das insektizid wirkende Cry1Ab-Protein zu produzieren.

Das aktive Cry1Ab-Protein bindet an Rezeptoren auf dem Mikrovillisaum des Darmepithels der Maiszünslerlarven. Das Cry1Ab-Protein perforiert die Epithelmembran und infolge eines erhöhten Kationenaustausches zwischen Darminhalt und Epithelzellen kommt es zu einem gestörten elektrischen Potential und einer Beeinträchtigung des Ionen- und pH-Gradienten. Die Epithelzellen quellen bis zum Platzen durch den erhöhten osmotischen Druck. Der Darminhalt gelangt in die Hämolymphe und die Larve verendet nach wenigen Stunden.

In Maiszünsler-Befallsregionen, zu denen auch niedrig liegende Maisanbauggebiete Bayerns gehören, kann der Anbau von Mais der Sorte MON810 den Einsatz klassischer Insektizide vermeiden.

Ziele der Studie

- Anbau, Produktion und Konservierung von isogenem und transgenem Mais mit äquivalenter Qualität
- Untersuchungen zu den langfristigen Auswirkungen des Einsatzes von gentechnisch verändertem Mais in der Milchviehfütterung
- Erfassung von Milchleistungsparametern, Stoffwechsel und Tiergesundheit
- Aufbau einer validen hoch-sensitiven Analytik für alle transgenen Komponenten gemäß der Kriterien der EU Kommissions Richtlinie 2002/657/EC
- Erfassung der Metabolisierung der „rekombinanten DNA“ und des „Cry1Ab-Proteins“
- Vergleichende Bewertung der produzierten Milch

Ein besonderer Schwerpunkt der Analytik sollte auf die Verbesserung der Nachweisgrenze aller rekombinanten Komponenten sowie auf die Zuverlässigkeit der Methodik gelegt werden.

Maisanbau und -konservierung

Der Anbau der isogenen Maislinie sowie der korrespondierenden transgenen Maislinie und die Futterkonservierung – mit der gesamten dazugehörigen Qualitätssicherung – erfolgte unter der Leitung der fachkundigen Wissenschaftler der Bayr. LfL an verschiedenen Standorten in Bayern. Dabei wurde beachtet, dass die Bedingungen für die Pflanzenentwicklung, wie Aussaat, Boden, Nährstoffversorgung, Erntezeitpunkt etc, für beide Maislinien jeweils äquivalent waren, um Ernten und Futter gleicher Qualität zu erhalten. Die Belastungen mit Mykotoxinen lagen unter den empfohlenen Orientierungswerten. Die Konservierung erfolgte als Silage, Miscobs und Körnermais.

Die eingesetzten Maisprodukte unterschieden sich ausschließlich im Vorhandensein bzw. Fehlen von Cry1Ab-Protein und der *cry1Ab*-DNA. Während der Silierung wurden Cry1Ab-Protein und *cry1Ab*-DNA stark abgebaut und der Eintrag transgener Komponenten in das Futter erfolgte zu einem wesentlichen Teil über Miscobs.

25-monatige Fütterungsstudie mit Milchkühen

Die Studie wurde mit 36 Milchkühen der Rasse bayrisches Fleckvieh an der LfL Versuchsstation Grub durchgeführt. Die Einteilung in zwei Gruppen erfolgte unter Berücksichtigung gleichen Alters, gleicher Milchleistung und guter Gesundheit.

Im Versuch wurden im Prinzip 2 Betriebe mit je 18 Kühen verglichen – das experimentelle Prozedere erfolgte unter gleichen Bedingungen, nur der Genotyp des Mais (iso- bzw. transgen) war unterschiedlich. Wegen Krankheit oder Unfruchtbarkeit abgehende Tiere wurden durch Jungkühe ersetzt. In beiden Gruppen wurden je 9 Tiere in den 25 Monaten ausgetauscht. In der Gesamtauswertung wurden jedoch alle Tiere und alle Datensätze berücksichtigt.

Fütterung und Nährstoffäquivalenz

Beginnend im Mai 2005 wurden die 36 Kühe mit Rationen mit maximal sinnvollem Anteil maisbasierter Futtermittel bedarfsgemäß gefüttert. Neben Strukturträgern (Grassilage, Stroh), Eiweißträgern plus Mineralfutter in gleicher Weise für alle Tiere, erhielten 18 Tiere ausschließlich isogenen Mais, und 18 Tiere erhielten nur transgenen Mais des Typs MON810. In Abhängigkeit vom Laktationsstadium wurden die Rationen bedarfsgemäß zusammen gestellt und der Maisanteil des Futters lieferte im Mittel etwa 2/3 der Gesamtenergie. Es wurde sichergestellt, dass beide Gruppen mit Futter gleicher Energie sowie auch sonst gleicher Qualität und Zusammensetzung versorgt wurden. Die Überprüfung von rekombinanter DNA und Cry1Ab-Protein in den Ausgangsfuttermitteln sowie in den Mischrationen bestätigte durchgehend die korrekte Handhabung der Futtermittel, und gewährleistete, dass nach allen Vermahlungen und Mischungserstellungen die jeweiligen Gruppen auch mit dem vorgesehenen Futter versorgt wurden. Bei einer durchschnittlichen täglichen Futteraufnahme von ca. 16 kg Trockenmasse an Grundration wurden von den Kühen der Gruppe, die mit transgenem Mais gefüttert wurde, täglich ca. 5,3 mg Cry1Ab-Protein aufgenommen – hinzu kamen kleinere Mengen aus dem bedarfsgemäß gefütterten Leistungsfutter.

Während der Fütterungsperiode von insgesamt 25 Monaten wurden monatlich Proben von Blut, Milch und Exkreten sowie vom jeweiligen Futter genommen. Von den gemerzten Tieren, so wie am Ende der Studie von den geschlachteten Kühen, wurden zusätzlich Proben vom Magen-Darm-Trakt und von den inneren Organen gezogen.

Milchleistung

Über die gesamte Versuchszeit betrug die Milchleistung ohne die nicht erfasste Biestmilch 7.420 kg Milch je Kuh und Jahr in der isogen gefütterten Gruppe und 7.460 kg in der mit transgenen Maisprodukten gefütterten Gruppe.

In Zusammenschau mit der aufgeführten wissenschaftlichen Literatur ist festzuhalten, dass der Einsatz von Bt-Mais bei Gewährleistung gleicher Maisqualitäten zu keinen Differenzen in der Futteraufnahme und der tierischen Leistung führt. Die angenommene substanzielle Äquivalenz ist aus dieser Sicht somit als gegeben zu erachten.

Dies zeigte sich neben der Futteraufnahme und Milchleistung auch in den Daten zur Lebendmasse und zur Körperkondition. Niveau und Entwicklung waren vergleichbar für beide Tiergruppen. Die Tiere hatten eine für Fleckviehkühe passende Körperkondition und Rückenfettdicke. Insgesamt waren die Tiere beider Gruppen energetisch gut versorgt.

Stoffwechselparameter, Tiergesundheit und Fruchtbarkeit

Im Versuch lag ein Hauptaugenmerk auf der Erfassung eventueller Beeinträchtigungen von Gesundheit und Fruchtbarkeit durch die Verfütterung von Bt-Mais. Neben der Erfassung von Krankheitsdaten erfolgte daher eine intensive Untersuchung des Stoffwechselgeschehens über Untersuchungen in Blutplasma und Harn. Zur Beurteilung der Fruchtbarkeit wurden ergänzend die Gehalte an Progesteron in der Milch ermittelt.

Die zu prüfende Ausgangshypothese des Versuchs war, dass Bt-Mais über das Cry1Ab-Protein auf das Stoffwechselgeschehen und die Gesundheit einwirken kann. Unter den im Versuch vorliegenden Bedingungen war eine Beeinträchtigung von Stoffwechselgeschehen, Gesundheit und Fruchtbarkeit nicht ersichtlich. Es bestehen keine Hinweise auf Änderungen der Funktionen wesentlicher Organe, wie Magen-Darm-Trakt, Leber, Niere, Milchdrüse etc. Bezüglich der Häufigkeit von Einzelerkrankungen und der Fruchtbarkeit ergaben sich keine signifikanten Veränderungen; hier ist die beschränkte Aussage auf Grund der Tierzahlen zu beachten. Die Versorgung mit Makro- und Mikronährstoffen war bei beiden Tiergruppen als gut balanciert zu erachten

Fazit der 25-monatigen Fütterungsstudie mit Milchkühen

Mit dem vorliegenden Fütterungsversuch ist es gelungen, langfristig hohe Mengen an Bt-Mais unter vergleichbaren Bedingungen an gut leistende Milchkühe einzusetzen. Durch den Einsatz von Maiscobts und Maiskörnern in Ergänzung zur Maissilage war eine hohe Aufnahme an Cry1Ab-Protein und *cry1Ab*-DNA gewährleistet. Etwaige Beeinträchtigungen im Bereich der Futteraufnahme, der Milchleistung, des Stoffwechselgeschehens, der Gesundheit und der Fruchtbarkeit hätten sich somit zeigen können. Trotz der relativ hohen Aufnahme an Cry1Ab-Protein waren Veränderungen in der Bt-Maisgruppe unter den gewählten Bedingungen nicht ersichtlich.

Die Tiere zeigten insgesamt eine gute Leistung, waren energetisch ausgefüttert und stoffwechselstabil. Auf Grund der beschränkten Tierzahl und dem erforderlichen Tieraustausch über die gewählte lange Versuchsdauer ergeben sich teils Unterschiede in den Leistungsdaten, die aus den kaum vermeidbaren Unterschieden zwischen Tiergruppen und der normalen Streuung im Versuch erklärbar sind. Für die eigentliche Versuchsfrage der Beeinträchtigung von Leistung, Gesundheit und Stoffwechsel sind diese jedoch von geringer Relevanz.

Der Versuch liefert einen guten Ansatz zur Beurteilung eines eventuellen Übergangs von Cry1Ab-Protein und *cry1Ab*-DNA in Milch sowie den Exkrementen, da über lange Zeit hohe Mengen mit dem Bt-Mais verfüttert werden konnten. Die Tiere wurden im Versuch gezielt nach Empfehlung versorgt. Wie sich eventuelle Stresssituationen, die über die aufgetretenen Erkrankungen hinausgehen oder sich durch massive Fehlversorgung ergeben, auswirken würden, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden.

Insgesamt passen sich die Daten gut in die bisherige Literatur ein. Für Bt-Mais MON810 wird die Hypothese der substanziellen Äquivalenz bestätigt. Nach umfangreicher Datenanalyse ergeben sich bislang keine Hinweise auf maßgebliche Unterschiede in Futtermittelverwertung, Milchleistung und Tiergesundheit.

Neue Entwicklungen in der Analytik

In früheren Fütterungsstudien lag der Schwerpunkt der Analytik auf der Erfassung der rekombinanten DNA. Ergänzend sollte in dieser Studie die Analytik für das Cry1Ab-Protein aufgebaut werden. Weitere Schwerpunkte sollten auf die Validierung

der Quantifizierungen sowie auf die Verbesserung der Nachweisgrenze und die Zuverlässigkeit der Methodik gelegt werden.

Entwicklung und Validierung sensitiver Verfahren für cry1Ab-DNA

Für Futtermittel, Blut, Exkrete und Milch wurden spezielle DNA-Extraktionsverfahren entwickelt. Hier ist zu betonen, dass die DNA-Isolierung jeweils aus dem Gesamtmaterial – also auch aus Vollmilch – erfolgte, um Verluste bei einer Vorfraktionierung zu vermeiden. Die quantitative Bestimmung der cry1Ab-DNA wurde mittels hoch-spezifischer sensitiver real-time qPCR durchgeführt. Die Gehaltsbestimmung erfolgte anhand von Eichkurven, die regelmäßige Identifizierung der Amplifikate über deren Schmelzkurven. Die Spezifität wurde weiterhin durch Gel-Elektrophorese und Resequenzierung der Amplicons gezeigt. Für Milch wurde eine zuverlässige Bestimmungsgrenze von 100 Kopien pro Mikroliter erreicht. Aus der bisherigen Literatur sind uns derart sensitive Bestimmungsgrenzen nicht bekannt.

Entwicklung und Validierung sensitiver Verfahren für Cry1Ab-Protein

Vor Beginn dieser Studie war uns aus der Literatur kein Immunoassay zur Detektion immunoaktiver Fragmente des Cry1Ab-Proteins in tierischen Geweben oder Flüssigkeiten bekannt, der nach den Kriterien der EU Kommissions Richtlinie 2002/657/EC validiert war.

Da gegenwärtig mit Immunoassays die besten Sensitivitäten für einzelne Proteine erreicht werden können, wurde ein sensitiver ELISA für die Detektion von Cry1Ab-Protein entwickelt und gemäß der Richtlinie validiert. Ein spezifischer Antikörper gegen das Cry1Ab-Protein wurde in Kaninchen generiert und maturiert. Mittels einer eigens entwickelten Immuno-Affinitäts-Chromatographie konnte nach Vorreinigung bei hoher Stringenz ein hoch-affiner sehr spezifischer Antikörper isoliert werden – als wesentliches Schlüsselreagenz für einen neuen ELISA mit einer absoluten Nachweisgrenze von 16 Attomol Cry1Ab-Protein.

Der unterste Messbereich dieses Assays in komplexen Matrices liegt bei Futtermitteln, Exkreten und Blut im unteren ppb-Bereich (Nanogramm pro Gramm) und für Milch war der Test noch um eine Größenordnung sensitiver mit Werten unterhalb des ppb-Bereiches. Der CC α betrug 0,25 ng/mL und der CC β lag bei 0,4

ng/mL Milch. Die Wiederfindungsrate für Cry1Ab-Protein betrug durchschnittlich 97%.

Definitionen gemäß EU Kommissions Richtlinie 2002/657/EC:

CC α = decision limit = Entscheidungsgrenze

CC β = detection capability = Nachweisvermögen (Bestimmungsgrenze)

Metabolisierung von rekombinanter DNA und Cry1Ab-Protein in der Milchkuh

In allen Futtermittelproben der mit transgenem Mais erstellten Rationen wurde *cry1Ab*-DNA und Cry1Ab-Protein nachgewiesen und in geringerer Konzentration in den entsprechenden Fäcesproben. Untersuchungen mittels „western-blot“ von Proben des Darminhalts geschlachteter Kühe sowie von Fäcesproben zeigten, dass beim Abbau von Cry1Ab-Protein ein Fragment etwa des halben Molekulargewichtes als Zwischenprodukt auftritt.

Nach Verfütterung von MON810-Mais ergaben sich aus der Analyse von keiner der insgesamt 450 Blutproben Hinweise auf den Transfer von *cry1Ab*-DNA oder Cry1Ab-Protein in das Blut bzw. in den Organismus der Kuh.

In fast allen Urinproben waren *cry1Ab*-DNA und Cry1Ab-Protein ebenfalls nicht nachweisbar; einige wenige schwach positive Befunde im Urin sind durch Kontamination mit Kot bei der Probennahme erklärbar.

Befunde zum Lebensmittel Milch

Aus der Untersuchung der insgesamt 900 Milchproben beider Gruppen ergaben sich keine Hinweise auf den Transfer von *cry1Ab*-DNA oder Cry1Ab-Protein in die Milch. Milch von Kühen nach Verfütterung von isogenem Mais oder transgenem Mais ist zu keinem Zeitpunkt unterscheidbar – auch nicht mit der gegenwärtig besten Technologie.

Geschwindigkeit des Cry1Ab-Protein Abbaus bei der Verdauung in der Milchkuh

In einer kleinen separaten Studie wurde die Konzentration bzw. die Verdaulichkeit des Cry1Ab-Proteins im Vergleich zum Gesamtprotein erfasst. Die Untersuchungen zeigten, dass der Anteil des Cry1Ab-Proteins im Futter am höchsten (9,4 Mikrogramm Cry1Ab-Protein pro Gramm Gesamtprotein der Mischration) und in den Fäcesproben der Anteil etwa halbiert war (4,2 Mikrogramm Cry1Ab-Protein pro Gramm unverdautes Gesamtprotein).

Resümee und Schlussfolgerungen

In dieser Studie wurden von den 36 Tieren insgesamt ca. 30 000 Einzelbefunde zu den Themenkomplexen Fütterung, Nährstoffäquivalenz, Milchleistung, Stoffwechsel, Tiergesundheit und Fruchtbarkeit erhoben. Hinzu kommen ca. 8 000 Einzelbefunde zu den Themenkomplexen Metabolisierung von *cry1Ab*-DNA und Cry1Ab-Protein. Die Bewertungen von MON810 basieren somit auf der Gegenüberstellung von jeweils ca. 19 000 Einzelbefunden, die pro Fütterungsgruppe erhoben wurden.

Die Analytik zur Metabolisierung von *cry1Ab*-DNA und Cry1Ab-Protein wurde wesentlich verbessert bzw. völlig neu entwickelt und in hochrangigen, streng referierten wissenschaftlichen Journalen publiziert. Die Qualität der Daten ist damit als außerordentlich solide zu erachten.

Nach 25-monatigem Einsatz in der Milchviehfütterung ergibt sich eine Äquivalenz des Futterwertes von isogenem Mais und transgenem Mais des Typs MON810. Stoffwechsel, Tiergesundheit und Leistung sind nicht beeinflusst.

Die Bewertungen der Cry1Ab-Protein Metabolisierung kennzeichnen keine spezifische Persistenz sondern eine schnelle Abbaubarkeit im Verdauungssystem analog zu anderen Proteinen. Der Anteil an unverdaulichem Gesamtprotein ist eher höher als der Anteil an unverdaulichem Cry1Ab-Protein.

Auch bei hoher Beprobungsintensität und extrem sensitiver Nachweisgrenze bis in den ppt-Bereich (Picogramm pro Milliliter) existieren keinerlei Hinweise auf einen

Transfer transgener Komponenten in das Lebensmittel Milch. Milch von Kühen nach Verfütterung von isogenem Mais oder transgenem Mais ist zu keinem Zeitpunkt unterscheidbar.

Acknowledgement

Gefördert wurde das Vorhaben durch die Bayrische Milchwirtschaft und das Bayrische Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten.

Die beteiligten Mitarbeiter, Bachelor- und Masterstudenten, Praktikanten, Gäste und Diplomanden an der TUM und an der LfL haben dieses Projekt stets mit großem Interesse sachlich und fachlich begleitet, engagiert diskutiert und mit zum Erfolg geführt.

Die Ergebnisse wurden auf etlichen wissenschaftlichen Veranstaltungen im In- und Ausland präsentiert und von Kollegen mit Ideen bereichert.

Bei Allen, die zum Gelingen des Projektes beigetragen haben, bedanken wir uns sehr.

Weihenstephan, den 24. März 2009

Heinrich H.D. Meyer

Hubert Spiekers

Frieder J. Schwarz

Anlagen –

Bisherige Publikationen und Manuskripte aus dem Projekt

Anlage 1

Spiekers H., Meyer H.H.D., Schwarz F.J., Steinke K., Preißinger W., Albrecht C., Gürtler P., Paul V., Wiedemann S.: Auswirkungen eines langfristigen Einsatzes von gentechnisch verändertem Mais (MON810) in der Milchviehfütterung auf Leistungs- und Stoffwechselfparameter – Versuchsbericht – Teil: Fütterungsversuch. (2009) Manuskript

Anlage 2

Steinke K., Paul V., Gürtler P., Preißinger W., Wiedemann S., Albrecht C., Spiekers H., Meyer H.H.D., Schwarz F.J.: Effects of long-term feeding of genetically modified maize (Bt-maize, MON810) to dairy cows on performance and metabolic parameters. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology 18 (2009) 110

Anlage 3

Guertler P., Paul V., Albrecht C., Meyer H.H.D.: Sensitive and highly specific quantitative real-time PCR and ELISA for recording a potential transfer of novel DNA and Cry1Ab protein from feed into bovine milk. Analytical and Bioanalytical Chemistry 393 (2009) 1629-1638

Anlage 4

Gürtler P., Paul V., Steinke K., Preißinger W., Wiedemann S., Albrecht C., Spiekers H., Schwarz F.J., Meyer H.H.D.: Investigations on the potential transfer of recombinant DNA and Cry1Ab protein from feed into milk, blood, feces and urine of cows fed genetically modified maize. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology 18 (2009) 111

Anlage 5

Paul V., Steinke K., Meyer H.H.D.: Development and validation of a sensitive enzyme immunoassay for surveillance of Cry1Ab toxin in bovine blood plasma of cows fed Bt-maize (MON810). Analytica Chimica Acta 607 (2008) 106-113

Anlage 6

Guertler P., Paul V., Steinke K., Wiedemann S., Preißinger W., Albrecht C., Spiekens H., Schwarz F.J., Meyer H.H.D.: Long-term feeding of genetically modified maize (MON810) – fate of *cry1Ab* DNA and novel protein during the metabolism of the dairy cow (2009) Manuscript

Anlage 7

Paul V., Guertler P., Wiedemann S., Meyer H.H.D.: Degradation of *cry1Ab* protein from genetically modified maize (MON810) in relation to total protein in dairy cow digestion (2009) Manuscript