

Lehrstuhl für Physiologie
Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt
Technische Universität München

**Experimentelle Untersuchungen zur Degradation von DNA und
Cry1Ab Protein während der Futtermittelprozessierung und im
tierischen Organismus sowie zur Verbreitung von keimfähigem
transgenem Saatgut nach Magen-Darm-Passage**

Bodo Lutz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Angelika Schnieke, Ph.D. (Univ. of Edinburgh/UK)
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Heinrich H. D. Meyer
2. apl. Prof. Dr. Oswald Rottmann

Die Dissertation wurde am 06.04.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 20.06.2005 angenommen.

Vorwort

Die Fütterungsstudien mit Rindern und Wildtieren fanden im Zeitraum von 2001 bis 2005 statt. Die Studien mit laktierenden und nicht-laktierenden Rindern wurden an der Bayrischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Grub und mit fistulierten Rindern am Arbeitsbereich Tierernährung der Technischen Universität München, Freising durchgeführt. Die Fütterungsstudien mit Fasanen fanden an der Forschungsstation Thalhausen, mit Wildschweinen in Notzing und mit Damhirschen an der staatlichen Versuchseinrichtung Achselschwang statt. Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum vom Januar 2003 bis Januar 2005 am Lehrstuhl für Physiologie, Technischen Universität München, Freising unter Anleitung von Professor Dr. Dr. Heinrich H. D. Meyer und Dr. Christiane Albrecht durchgeführt.

Aus dieser Promotionsarbeit gingen folgende wissenschaftliche Publikationen hervor:

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

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

Lutz B, Wiedemann S, Albrecht C: Degradation of transgenic maize DNA and Cry1Ab protein in the course of the ensiling process. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (in press)

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

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

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	iii
1. EINFÜHRUNG	1
1.1 Mais (<i>Zea Mays</i>)	1
1.2 Maiszünsler (<i>Ostrinia nubilalis</i>)	1
1.3 Cry1Ab Protein	2
1.4 Grüne Gentechnik	3
1.5 Nichtzielorganismen	4
1.5.1 Wildschwein (<i>Sus scrofa</i>)	5
1.5.2 Fasan (<i>Phasianus colchicus</i>)	5
1.5.3 Damhirsch (<i>Dama dama</i>)	6
2. AUFGABENSTELLUNG	7
3. MATERIAL UND METHODEN	9
3.1 Futtermittel	9
3.2 Futtermittelprozessierung	10
3.2.1 Silierung	10
3.2.2 Mais-Kobs	11
3.3 Fütterungsstudien	12
3.3.1 Studien mit nicht-laktierenden Rindern	12
3.3.2 Studien mit laktierenden Rindern	12
3.3.3 Studien mit fistulierten Rindern	13
3.3.4 Wildschweinstudien	13
3.3.5 Fasanstudien	14
3.3.6 Damhirschstudien	15
3.4 DNA Analysen	15
3.4.1 DNA Extraktion	16
3.4.2 PCR und real-time PCR	16
3.4.3 Sequenzierung	18
3.5 Cry1Ab Protein Analysen	18
3.5.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	18
3.5.2 Immunoblot	18

3.6	Keimfähigkeitsprüfung von Mais- und Rapssaat	19
3.7	Statistik	20
4.	RESULTATE	22
4.1	Degradationsprozesse bei der Futtermittelprozessierung	22
4.1.1	Silierung	22
4.1.2	Mais-Kobs Herstellung	23
4.2	Rinderstudien	26
4.3	Wildschweinstudien	29
4.4	Fasanstudien	31
4.5	Damhirschstudie	32
5.	DISKUSSION	34
5.1	Nachweis pflanzenspezifischer und rekombinanter DNA	34
5.1.1	Methodik	34
5.1.2	DNA Analytik der Fütterungsstudien	35
5.2	Nachweis des Cry1Ab Proteins	39
5.2.1	Methodik	39
5.2.2	Cry1Ab Analytik im Futtermittel	41
5.2.3	Cry1Ab Analytik der Fütterungsstudien	41
5.3	Untersuchungen zur Saatverbreitung	44
5.3.1	Methodik	44
5.3.2	Keimfähigkeitsanalytik in den Fütterungsstudien	45
6.	SCHLUSSFOLGERUNG	47
7.	ZUSAMMENFASSUNG	50
8.	SUMMARY	52
9.	LITERATUR	54
	ANHANG	68
	DANKSAGUNG	68
	LEBENS LAUF	69
	PUBLIKATIONEN	71

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

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

1. EINFÜHRUNG

1.1 Mais (*Zea mays*)

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

Die Erntemengen von Mais können durch verschiedene Krankheiten, verursacht durch *Ustilago maydis* oder durch Pilze der Gattung *Fusarium*, stark reduziert werden. Als tierische Schädlinge sind neben *Agriotes* sp., *Oscinella frit*, *Rhopalosiphum maidis*, verschiedene Nematoden und *Ostrinia nubilalis* bekannt (Zscheischler et al. 1990).

1.2 Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*)

Ostrinia nubilalis stellt den wirtschaftlich bedeutendsten Maisschädling dar. Weltweit werden circa 7% der jährlichen Maisernte durch ihn vernichtet. Während in den USA bis zu drei Generationen auftreten, durchläuft er in Deutschland nur eine Generation pro Jahr. Als Lepidopteren Larve überwintert *Ostrinia nubilalis* in Ernterückständen und Stoppeln und verpuppt sich im Frühjahr. Nach dem Schlüpfen legen die Imagines 10-30 Eier in dachziegelartiger Anordnung an der Blattunterseite ab. Die Larven schlüpfen nach etwa einer Woche und fressen anfangs an den Blättern und Rispen, bevor sie sich in den Stengel bohren. Bis zum Herbst fressen sich die Larven im Stengel nach unten bis zum Wurzelbereich, wo sie überwintern. Auch der

Maiskolben kann befallen werden. Bei starkem Wind knicken die Maispflanzen und können nicht mehr geerntet werden. Die Fraßlöcher dienen u.a. Fusarien als Eintrittsstellen, welche die Maispflanze weiter schädigen. Die wirksame Bekämpfung von *Ostrinia nubilalis* ist mit synthetischen Pyrethroiden nur während der Zeit erfolgreich, in der sich *Ostrinia nubilalis* auf der Pflanzenoberfläche befindet. Der Einsatz von *Trichogramma brassicae*, die die Eier von *Ostrinia nubilalis* parasitieren, kommen im biologischen Landbau ebenso zum Einsatz wie Suspensionen von Sporen und parasporalen Kristallen von *Bacillus thuringiensis* (Bt), einem natürlich vorkommenden insektenpathogenen Bodenbakterium.

1.3 Cry1Ab Protein

Als Sporenbildner produziert *Bacillus thuringiensis* überdauerungsfähige Sporen und als Besonderheit zusätzlich sogenannte parasporale Proteinkristalle (crystal proteins). Diese sind biochemisch ein für Fraßinsekten giftiges δ -Endotoxin. Inzwischen sind circa 50 Cry-Proteine mit strukturellen und spezifischen Unterschieden für bestimmte Insekten bekannt. Damit das Pro-Toxin seine Wirkung entfalten kann, muss es innerhalb einer Insektenlarve durch ein basisches Darmmilieu aufgelöst werden. Durch proteolytische Spaltungen entsteht das biologisch aktive Toxin, das an Rezeptoren der Epithelzellmembranen im Mitteldarm der Insektenlarve bindet. Nach struktureller Änderung des Cry Proteins kommt es zuerst zur Porenbildung, anschließend zur Zellyse und zum Tod der Larve (Abb. 1; de Maagd et al. 2001). Die Varianten des Cry Proteins wirken spezifisch auf bestimmte Insektenarten (Cannon 1995). Das Erntegut von Pflanzen, die mit Bt-Produkten behandelt worden sind, stellt für die Konsumenten kein Risiko dar, da durch UV-Strahlen und Regenabwaschungen das Präparat schnell inaktiviert wird

(Behle et al. 1997). Um die Wirkungsweise der Cry Proteine zu verbessern, wurde Mais genetisch mit verschiedenen Konstrukten des *cry* Gens transformiert. Transgener Mais exprimiert ein synthetisches aktives Insektizid (z.B. Cry1Ab Protein) in den eigenen Zellen, so dass er gegen *Ostrinia nubilalis* resistent ist (Höfte & Whiteley 1989). Durch den Selbstschutz der Pflanze gegenüber seines Fraßfeindes kann der Einsatz von Insektiziden vermindert werden und damit ebenso Belastungen für die Umwelt und die Gesundheit des Menschen (Schuler et al. 1998).

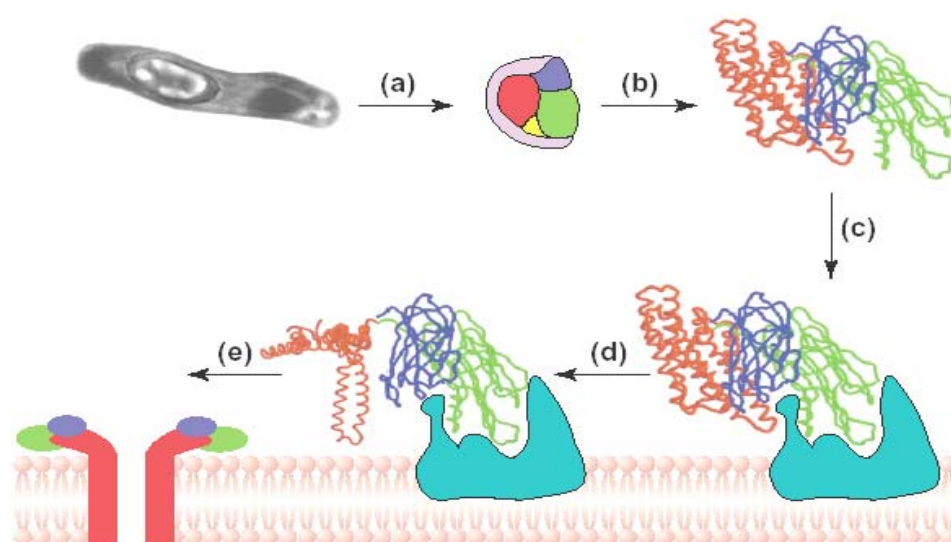


Abb. 1: Darstellung der Wirkungsweise des Cry Proteins.

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

1.4 Grüne Gentechnik

Seit ihrer ersten kommerziellen Freisetzung im Jahr 1996 in den USA werden transgene Pflanzen großflächig weltweit angebaut. Die Gesamtanbaufläche mit transgenen Pflanzen betrug im Jahr 2004 81,0 Millionen Hektar mit einem Anteil an

transgenem Mais von 19,3 Millionen Hektar (14% des weltweiten Maisanbaus) und 4,3 Millionen Hektar an transgenem Raps (James 2004). Die ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Metro Manila, Philippinen) schätzt den weltweiten Anbau von GV Pflanzen für das Jahr 2010 auf insgesamt 150 Millionen Hektar (James 2004). Die Grüne Gentechnik soll die Erträge in der Landwirtschaft steigern und u.a. einen Beitrag zur Lösung des Hungerproblems leisten. Bei der Grünen Gentechnik gibt es im Wesentlichen drei Anwendungsfelder: 1) die Erhöhung bestimmter qualitativen Eigenschaften von Pflanzen (z.B. Proteinanteil oder Vitamingehalt), 2) Enzyme und therapeutisch wirksame Stoffe kostengünstig herzustellen („molecular farming“) oder 3) agronomische Eigenschaften der Pflanze wie beispielsweise die Widerstandsfähigkeit gegen Schädlinge, Herbizide, Trockenheit oder Kälte zu verbessern. Im Zusammenhang mit dem Einsatz der grünen Gentechnik werden verschiedene ökologische Risiken diskutiert, wie zum einen die Verbreitung und Auskreuzung von Transgenen auf verwandte Kultur- oder Wildarten und zum anderen Konsequenzen auf Organismen, die nicht Ziel der transgenen Proteine der GV-Pflanze sind (Nichtzielorganismen).

1.5 Nichtzielorganismen

Eine Vielzahl von Tierarten konsumieren direkt oder indirekt GV Pflanzen. Der Anbau von gentechnisch modifiziertem Mais könnte sich auf einzelne Organismen über die Nahrungskette auswirken, obwohl sie nicht Ziel des exprimierten Insektizides sind. Mais wird als qualitativ hochwertiges Grundfuttermittel für eine bedarfsgerechte Nährstoffversorgung bei hochleistenden Milchkühen eingesetzt. Laktierende Kühe können täglich bis zu 8 kg Trockensubstanz (TS) Mais als energiereiches Futter bekommen. Während die Landwirte über die Art und Menge des Futtermittels

entscheiden können, konsumieren Wildtiere unkontrolliert die Pflanzen, die auf den Feldern angebaut werden. Von besonderem Interesse waren in dieser Gesamtstudie Wildschweine, Damhirsche und Fasane.

1.5.1 Wildschwein (*Sus scrofa*)

In vielen europäischen Ländern und den Vereinigten Staaten von Amerika stiegen die Wildschweinpopulationen in den vergangenen Jahrzehnten an (Geisser 1998; Hahn & Eisfeld 1998). Wildschweine leben in Rotten mit bis zu 30 Tieren, aber auch vornehmlich männliche Einzeltiere sind zu beobachten. Jede Gruppe hat ihr eigenes Territorium und ist sehr reviertreu. Wildschweine haben sich den modernen Agrarbedingungen bestens angepasst und lassen sich von menschlichen Aktivitäten kaum stören (Genov 1981; Geisser & Bürgin 1998). Beobachtungen in Deutschland ergaben, dass Wildschweine, die in Waldrandnähe leben, bis zu 50% ihrer nächtlichen Aktivitäten auf landwirtschaftlich genutzten Flächen verbringen (Hahn 2002). Ihre Nahrung besteht aus wenigstens einer energiereichen Pflanze wie Mais oder einer anderen angebauten Getreideart (Schley & Roper 2003). Im Herbst fressen sie z.B. ausgewachsene Pflanzen auf Maisfeldern während sie im Frühjahr frisch gesäte Maiskörner ausgraben (Mackin 1970; Schley & Roper 2003).

1.5.2 Fasan (*Phasianus colchicus*)

Fasane stammen ursprünglich aus Asien und sind in fast allen europäischen Ländern ebenso beheimatet wie in Amerika (Reinwald 1993; Giudice & Ratti 2001). Sie scharren und fressen neugesätes Saatgut sowie das Hypokotyl von jungen Pflanzen. Der Fasan bevorzugt Getreide, Mais, Rote Beete und Zuckerrüben. Sogar ältere Maispflanzen, welche schon das vierte von sechs Blattstadien erreicht haben werden

von Fasänen ausgerissen (Knight 1995). Bis zu 80% der Nahrung von erwachsenen Fasänen besteht aus Getreide aus landwirtschaftlichem Anbau, vor allem aus Ernterückständen.

1.5.3 Damhirsch (*Dama dama*)

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

2. AUFGABENSTELLUNG

Der Nachweis von rekombinanter DNA in Nahrungs- und Futtermitteln sowie Untersuchungen zum Verbleib in domestizierten Tieren wurden vom Lehrstuhl für Physiologie, Weihenstephan und der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL Braunschweig; Aulrich et al. 2004) sowie dem Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie der TUM, Freising (Hupfer et al. 1999) beschrieben. Das Vorkommen des Cry1Ab Protein im Boden und Auswirkungen verschiedener Cry Proteine auf Insekten und deren Predatoren wurden publiziert (Dutton et al. 2002, 2003; Hilbeck et al. 1998; Zwahlen et al. 2003). Informationen über die Aufnahme von transgenem Mais und den Verbleib von DNA und transgenem Protein in Wildtieren waren jedoch nicht verfügbar. Eine wichtige ökologische Fragestellung zum Anbau von gentechnisch modifizierten Pflanzen ist die Ausbreitung auf konventionell bebaute Felder und landwirtschaftlich unbebaute Biotope. Dazu wurden verschiedene Versuche zum Pollenflug und zur Auskreuzung durchgeführt (Ramsay et al. 1999; Squire et al. 1999; Eastham and Sweet 2002). Erkenntnisse über eine mögliche Verbreitung von keimfähigem rekombinanten Saatgut durch Wildtiere lagen nicht vor. Auch fehlten Studien zu zeitabhängigen Degradationsprozessen von rekombinanten Protein bei Maisfütterung in der Rinderhaltung.

Ziele der vorliegenden Dissertation „Experimentelle Untersuchungen zur Degradation von DNA und Cry1Ab Protein während der Futtermittelprozessierung und im tierischen Organismus sowie zur Verbreitung von keimfähigem transgenem Saatgut nach Magen-Darm-Passage“ waren: 1) Etablierung von Methoden zum Nachweis pflanzlicher und rekombinanter DNA und des rekombinanten Cry1Ab Proteins in Maispflanzen, im prozessierten Mais und in tierischen Geweben sowie Ingesta, 2) den Abbau von pflanzlicher und transgener DNA und transgenem Cry1Ab-Protein

während des Silierungsprozesses und der Herstellung von Mais-Kobs zu untersuchen, um die Menge an Cry1Ab Protein bei der Futteraufnahme zu bestimmen und 3) Untersuchungen zum Verbleib des Cry1Ab Proteins im Rind und zeitabhängiger Degradationsprozesse im bovinen Pansen durchzuführen. 4) In Wildtierstudien galt es den Abbau und Verbleib von Futter-DNA und rekombinantem Protein in Tieren, die unkontrolliert von transgenen Agrarpflanzen fressen und zur Verbreitung von Saatgut nach Magen-Darmpassage (Endozoochorie) im keimfähigen Zustand in Nichtzielbiotope beitragen könnten, anhand von drei Wildtierarten zu untersuchen. Von Nutztieren ausgehend wurden die Wildtierarten nach ihren Verdauungssystemen und der unmittelbaren Nahrungskette ausgewählt. Als Monogastrier wurde das Wildschwein, als Vertreter der Ruminantia der Damhirsch und als Hühnervogel der Fasan gewählt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Futtermittel

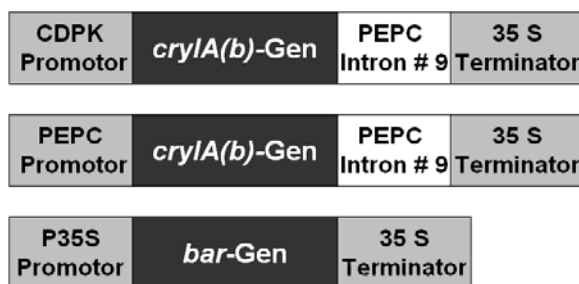
Die rekombinante (Navares, Bt176) und isogene (Antares) Maissorte (Syngenta International AG, Basel, Schweiz) bzw. TXP 138-F (zukünftige Bezeichnung DKC 3421-YG, MON810) und die korrespondierende nichttransformierte Hybridsorte DKC 3420 (Monsanto Company, St. Louis, USA) wurden auf Versuchsfeldern der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub angebaut und geerntet. Nach der Ernte wurde der Silomais gehäckselt und entweder siliert oder zu Mais-Kobs verarbeitet. Körnermais wurde, damit die Keimfähigkeit erhalten blieb, bei einer Temperatur von etwa 35°C getrocknet. Auf die Verwendung von Beizstoffen zur Konservierung der Körner wurde verzichtet. Isogenes Rapssaatgut wurde von Wagner & Sohn Ölsaatenverarbeitungs KG, Niederviehbach bezogen. Die rekombinante Maissorte Novelis (Event MON810, Monsanto) wurde uns mit freundlicher Genehmigung der Monsanto Agrar Deutschland GmbH durch das Ingenieurbüro für landwirtschaftliche Versuche, Schwarzach zur Verfügung gestellt.

Navares (Event 176) enthält zwei Kopien des synthetischen *cry1Ab* Gens (Abb. 2A). Die Genexpression unterliegt den Promotern der maisspezifischen Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) und kalzium-abhängigen Protein-Kinase (calcium-dependent protein kinase, CDPK) Genen. Die Maissorten Novelis und TXP 138-F enthalten jeweils eine Kopie des *cry1Ab* Gens unter der Regulation des CaMV eP-35S-Promoters (Abb. 2B). Der 35-S Promoter entstammt dem Blumenkohlmosaikvirus (Cauliflower Mosaic Virus, CaMV) und ist einer der stärksten Promoter für Expression in pflanzlichen Zellen. Maissorten mit dem Event 176 produzieren das Cry1Ab Protein in grünen Pflanzenabschnitten und

in Pollen, während Pflanzen mit dem Event MON810 dieses auch in den Maiskolben und Maiskörnern produzieren. In Navares (Event 176) beginnt die Expressionsrate auf hohem Niveau, sinkt jedoch nach dem Pollenflug stark ab. Novelis und TXP 138-F (Event MON810) produzieren das Cry1Ab Protein in gleichbleibenden Mengen während der gesamten Vegetationsperiode.

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

A Event 176



B Event MON810



Abb. 2: Darstellung der exprimierten DNA-Konstrukte (nach Matsuoka et al. 2002).

3.2 Futtermittelprozessierung

3.2.1 Silierung

Bei dieser Art der Konservierung wird gehäckselter oder kurzgeschnittener Mais in Fahrsilos, Hochsilos oder in Folie eingewickelten Großballen eingelagert. Nach der Befüllung wird das Silo luftdicht verschlossen, der Restsauerstoff wird durch aerobe Bakterien und Pilze verbraucht. Im Anschluss setzt die anaerobe Gärung durch Lactobacteriaceae ein. Hierbei wird die Stärke und die Glucose der Pflanzen zu Laktat metabolisiert und der pH-Wert der Silage auf einen Wert um 4,0 - 4,5

abgesenkt. Bei diesem sauren Milieu kommen die mikrobiellen Prozesse zum Stillstand und die Silage ist stabil.

Zur Herstellung der Silage für die Fütterungsstudien an Rindern und Wildtieren wurden die Maispflanzen auf eine durchschnittliche Größe von 1 cm gehäckselt und in Silageschläuche gepresst. Um die Degradationsvorgänge bei der Silierung zu untersuchen, wurde iso- und transgener Mais im Labormaßstab in Einmachgläsern (1 Liter) siliert. Jedes wurde mit etwa 400 g Maishäcksel maximal befüllt, so dass möglichst wenig Sauerstoff im Glas verblieb. Die Einmachgläser wurden im Dunkeln bei etwa 20°C gelagert und in periodischen Zeitabständen für Probenahmen geöffnet. Ein Teil der Maissilage aus jedem Glas wurde zu DNA und Cry1Ab Protein Analysen eingefroren, der andere Teil wurde dazu verwendet, den pH Wert zu bestimmen, um den Silierungsverlauf zu dokumentieren (Lutz et al. 2005 b).

3.2.2 Mais-Kobs

Die Herstellung von Mais-Kobs ist neben Silage eine weitere Methode zur Maiskonservierung. Dazu wird Maishäcksel bei einer Temperatur von etwa 80°C in großen Trommeln getrocknet und zu Pellets in Größen von etwa 18 mm gepresst. Durch das Trocknen wird der Feuchtigkeitsgehalt im Mais auf eine Trockensubstanz von ca. 92% reduziert, wodurch mikrobielle Abbauprozesse zum Erliegen kommen. Um die Aufnahmemenge an rekombinantem Cry1Ab Protein bei einer Fütterung mit transgenem Mais-Kobs kalkulieren zu können, wurde die Menge des Cry1Ab Proteins in Mais-Kobs, d.h. nach der thermischen Behandlung, mittels ELISA (Agdia Inc., Elkhart, USA) bestimmt. Weitere Parameter zur Energiebewertung und zur Bewertung der Futterqualität wurden für nicht-transformierten und transgenen Maishäcksel und Mais-Kobs ermittelt.

3.3 Fütterungsstudien

3.3.1 Studien mit nicht-laktierenden Rindern

Zwei Fütterungsstudien mit nicht-laktierenden Rindern wurden an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub durchgeführt. Dabei wurden je 22 Rinder im durchschnittlichen Alter von 4,4 bzw. 3,0 Jahren jeweils für vier Wochen mit isogenem (Antares) oder transgenem Mais (Navares) gefüttert. Die Futterrationen bestanden aus 88,5% Maissilage, 2% Gerstenstroh, 4,5% Weizen, 4,5% Rapsschrot und 0,5% Mineralfutter. Jedes Rind wurde pro Tag mit 19 kg Maissilage in einer Gesamtration von 21,5 kg gefüttert. Bei den Schlachtungen wurde Ingesta aus Pansen, Labmagen, Jejunum und Kolon und Epithelgewebe dieser Abschnitte sowie Jejunallymphknoten entnommen (Einspanier et al. 2004).

3.3.2 Studien mit laktierenden Rindern

Eine Fütterungsstudie mit sechs laktierenden Rindern im Alter von $3,5 \pm 1,2$ Jahren wurde an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub durchgeführt. Vier Rinder wurden täglich mit $27,5 \pm 1,5$ kg transgener (Navares) und zwei Tiere mit $23,0 \pm 2,0$ kg isogener (Antares) Maissilage gefüttert. Die Futterrationen enthielten weiter 3,0 kg Heu, 2,5 kg Futterkonzentrat und 0,17 kg Mineralfutter. Während der vierwöchigen Versuchsdauer wurden wöchentlich Blut- und Milchproben und bei der Schlachtung Proben von allen inneren Organen, Ingesta und Darmepithel verschiedener gastrointestinaler Abschnitte und Lymphknoten zur weiteren Analyse entnommen (Lutz et al. 2005 a).

3.3.3 Studien mit fistulierten Rindern

Um die Degradationsprozesse von Futter-DNA und rekombinantem Cry1Ab Protein im bovinen Pansen zu untersuchen, wurde eine *in situ* Studie mit pansenfistulierten Tieren am Arbeitsbereich Tierernährung der Technischen Universität München durchgeführt. Fünf nicht-laktierende Holstein-Friesian Kühe mit einem Gewicht von 650-750 kg wurden zweimal täglich (07.00 h und 16.00 h) mit 8 kg Maissilage, 0,8 kg Sojamehl und 50 g Mineralfutter (18% Calcium, 4% Phosphor, 8% Natrium, and 5% Magnesium) gefüttert. Wasser war ad libitum verfügbar. Nylonsäckchen aus weißem Monofilament wurden mit gemahlene iso- und transgenem Maishäcksel und Maissilage gefüllt und in drei Positionen für 0, 2, 4, 8, 16, 24 und 48 h im Pansen inkubiert (Abb. 3 & 4) (Wiedemann et al. 2005).



Abb. 3: Nylon-Säckchen gefüllt mit Maishäcksel und Maissilage

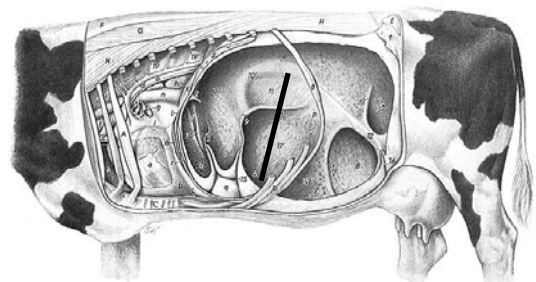


Abb. 4: Darstellung der Inkubationsposition im bovinen Pansen

3.3.4 Wildschweinstudien

Es wurden zwei Fütterungsstudien mit Wildschweinen von fünfwöchiger Dauer durchgeführt. Die erste Studie begann mit insgesamt sechs Tieren mit einem Lebendgewicht von 45-55 kg, wobei jeweils drei mit isogenem (Antares) bzw. transgenem (Navares) Mais gefüttert wurden. Die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme betrug 1,5 kg Grünmais, 0,25 kg Körnermais und 0,1 kg Rapssaat. In der

zweiten Studie wurden fünf Wildschweine mit transgenem und drei mit isogenem Mais gefüttert. Das Lebendgewicht der Tiere lag zwischen 35-40 kg und die durchschnittliche tägliche Futtermittelaufnahme bei 1,0 kg Maishäcksel, 0,25 kg Körnermais und 0,2 kg Rapssaat. In beiden Studien bekamen die Tiere geringe Mengen an Zusatzfutter in Form von Weizen, Kartoffeln und Mineralfutter. Das Futter und Wasser war ad libitum verfügbar. Während des Versuches wurden die Fäzes auf intaktes Saatgut untersucht. Nach der Schlachtung wurden Proben von sämtlichen inneren Organen, Blut, Ingesta, Darmepithel und Lymphknoten entnommen.

3.3.5 Fasanstudien

Es wurden insgesamt drei Fütterungsstudien mit Fasänen durchgeführt. Im ersten und zweiten Experiment wurden jeweils 15 Fasane im Alter von 12 Monaten in drei Gruppen mit isogenem und transgenem Körnermais sowie isogenem Rapssaat gefüttert. Die durchschnittliche tägliche Futtermittelaufnahme lag bei $48,7 \pm 3,2$ g transgenem Körnermais, $45,1 \pm 2,7$ g isogenem Körnermais bzw. $34,5 \pm 2,3$ g isogener Rapssaat. Im dritten Experiment wurden 12 Fasane ohne Grit aufgezogen, um zu untersuchen, ob bei Beeinträchtigung der Muskelmagentätigkeit intakte Körner ausgeschieden werden können. Im Alter von sechs Monaten wurden sie mit isogenen (Antares) und transgenen Maiskörnern der Sorte Novelis (Event MON810) und Navares (Event 176) gefüttert. Vor Verfütterung der Maiskörner wurde eine Fasangruppe mit isogenen Rapskörnern gefüttert, um deren Ausscheidung nach Magen-Darm-Passage zu untersuchen. Die durchschnittliche tägliche Futtermittelaufnahme war für Antares $34,5 \pm 0,9$ g, für Navares $32,6 \pm 1,7$ g, für Novelis $34,6 \pm 2,6$ g, für Raps $26,4 \pm 0,5$ g und für Mineralfutter $3,5 \pm 0,1$ g. Die Studien dauerten 33 Tage, 40 Tage und 37 Tage pro Fütterungsexperiment. Futter und

Wasser waren *ad libitum* erhältlich. Während der Fütterungsversuche wurden die Fäzes auf intaktes Saatgut untersucht. Nach der Schlachtung wurden Proben von sämtlichen inneren Organen, Blut, Ingesta, Darmepithel und der *Bursa fabricii* entnommen (Lutz et al. 2005 c).

3.3.6 Damhirschstudien

Ein Fütterungsversuch mit 11 Hirschkühen wurde am staatlichen Versuchsgut Achselschwang durchgeführt. Die Damhirsche wurden im Versuchsgehege gehalten, wobei 6 Damhirsche mit isogenem und 5 Damhirsche mit transgenem Mais gefüttert wurden. Das Futter bestand aus Maishäcksel, Körnermais und Rapssaat. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Nach einer zweiwöchigen Einfütterung wurden während der gesamten sechswöchigen Fütterungsperiode die Fäzes auf intakte Mais- und Rapssamen untersucht. Nach der Schlachtung wurden von allen Organen, Blut, Geweben und Inhalten des Gastrointestinaltrakt (GIT), Proben genommen.

3.4 DNA Analyse

Um die Degradation der DNA zu untersuchen wurden Fragmente des ubiquitär in hoher Kopienanzahl vorkommenden *rubisco* Gens (Chloroplasten-Untereinheit, 1431 bp), des mais-spezifischen *zein* Gens (558 bp) und des *invertase* Gens (4233 bp) sowie des rekombinanten *cry1Ab* Gens (1947 bp) analysiert. Das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (Rubisco) katalysiert die kovalente Bindung von gasförmigem Kohlendioxid in den Chloroplasten von grünen Pflanzen; das 10 kDa große Zein, ein Prolamin, kommt in den Samenkörnern des Mais vor. Bei

allen Proben zur Detektion des *cry1Ab* Gens mittels real-time PCR (qPCR), wurde auch das *invertase* Gen quantifiziert. Dies lässt Aussagen zu über die Anwesenheit von amplifizierbarer Mais-DNA und den Maisanteil in der extrahierten DNA. Invertase (β -Fruktofuranosidase) gehört zu den Disaccharidasen und ist in der hydrolytischen Spaltung von Disacchariden involviert.

3.4.1 DNA Extraktion

Die Zerkleinerung des Probenmaterials (100 mg) erfolgte mit dem FastPrep System (BIO101, Carlsbad, USA) unter Verwendung von 0,5 g - 1,2 g Green Matrix (5,5 m/s, 30 s). Mit Kühlpausen wurde der Vorgang wiederholt, bis das Probenmaterial ausreichend gemahlen war. Die DNA Extraktion erfolgte für pflanzliches Probenmaterial und Ingestaprobe mit 600 μ l C1 Lysepuffer (Nucleo Spin Plant Kit; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) für mindestens 30 min bei 60°C. Anschließend wurden die Proben für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert und der Überstand für die weitere DNA Reinigung verwendet. Tierisches Gewebe wurde mit 1 ml TriFast (PeqLab, Erlangen) unter Bewegung bei Raumtemperatur (RT) lysiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in 200 μ l Chloroform überführt, circa 10 s geschüttelt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 11.000 x g wurde die untere Phase für die DNA Reinigung verwendet. Die DNA Aufreinigung erfolgte nach den Vorschriften von Macherey & Nagel. Die resultierende DNA wurde in 40 μ l CE-Puffer (Nucleo Spin Plant Kit) eluiert. Die Konzentration der DNA Lösungen wurde durch die Messung bei 260nm im Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) in Einwegküvetten (Uvette, Eppendorf) gemessen (Lutz et al. 2005 c; Wiedemann et al. 2005).

3.4.2 PCR und real-time PCR

Für das *rubisco* Gen wurden anhand der Gensequenz Acc. Nr. X86563 (*Zea mays* Chloroplasten Genom) Primer für Fragmentlängen von 173 bp, 199 bp, 384 bp, 896 bp, 1197 bp, 1753 bp und 2521 bp unter Verwendung der Software „Primer 3“ (<http://frodo.wi.mit.edu>) generiert (Lutz et al. 2005). Die Sequenzen für die Primer zur Amplifikation von 199 bp *rubisco*- und 329 bp *zein* Gen-Fragmenten wurden von Einspanier et al. (2001) veröffentlicht. *Cry1Ab* Gen Fragmente von 211 bp und 420 bp wurden von Hupfer et al. (1998) bzw. Studer et al. (1997) publiziert. Für Fragmentlängen von 727 bp und 1423 bp wurden Primer anhand der Sequenz Acc. Nr. I41419 (*cry1Ab* Gen, US-Patent 5625136) generiert (Lutz et al. 2005 b,c).

Die Amplifikationen erfolgten in Tpersonal und TGradient Thermocyclern (Biometra GmbH, Göttingen). Der Reaktionsansatz bestand aus 150 ng DNA; 1x PCR Reaktions-Puffer (Abgene, Epsom, UK); 2,5 mM MgCl₂ (ABgene); 0,4 µM Primer (Metabion, Martinsried, Germany); 0,2 mM dNTPs (ABgene) und 0,5 Units Thermoprime Plus DNA Polymerase (ABgene). Der Mastermix für die Amplifikation der 1753 bp und 2521 bp Fragmente enthielt 3,5 mM MgCl₂ (ABgene). Als Positivkontrolle diente isolierte DNA aus Bt-Maisblättern und als Negativkontrolle für den *cry1Ab* Gen Nachweis DNA aus isogenen Maisblättern. Alle PCR Analysen wurden immer in zwei Ansätzen durchgeführt.

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

Als standardisierte Methode zum Nachweis von Fragmenten des *cry1Ab*- und *invertase* Gens wurde die real-time PCR Technik mit dem „LightCycler GMO Maize Quantification Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gemäß Hersteller-

anweisung angewandt (Lutz et al. 2005 c; Wiedemann et al. 2005). Isogene Maisproben dienten als Negativkontrollen für die *cry1Ab* Analysen. Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 15,0 µl enthielt 50 ng DNA, 11,0 µl H₂O, 2,0 µl LightCycler GMO Maize Detection Mix und 2,0 µl LightCycler GMO Maize Enzyme Master Mix.

3.4.3 Sequenzierung

Die PCR Produkte wurden sequenziert, um sicherzustellen, dass die richtigen Genabschnitte amplifiziert wurden. Die Sequenzierungen wurden von Medigenomix GmbH, Martinsried durchgeführt.

3.5 Cry1Ab Protein Analysen

3.5.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die quantitative Erfassung des Cry1Ab Proteins in den tierischen und pflanzlichen Proben erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (Agdia Inc.). Das Probenmaterial (200 mg) wurde mittels FastPrep-System (BIO101) unter Verwendung von 0,8 mg Green Matrix bei 6 m/s für 40 s gemahlen. Die Prozedur wurde wiederholt bis das Probenmaterial ausreichend zerkleinert war und danach wurde das Probenmaterial in 1000 µl Multi-Event Puffer (im Kit enthalten) gelöst. Für die Standardkurve wurde das Kontroll-Cry1Ab/1Ac Protein (im Kit enthalten) in Konzentrationen von 0,015, 0,03, 0,06, 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 und 1,6 ng/ml verwendet. Alle Standards und Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Die Messung der immunologischen Reaktion erfolgte mit einem SLT Spectra ELISA Reader (SLT Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim) (Lutz et al. 2005 a,b).

3.5.2 Immunoblot

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

3.6 Keimfähigkeitsprüfung für Mais- und Rapssaat

Vor Fütterungsbeginn wurde die Keimfähigkeit der Mais- und Rapskörner analysiert. Das Saatgut wurde unter optimalen Standardbedingungen nach den internationalen

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

Die Keimfähigkeitsprüfung für Mais- und Rapssaat zeigte für die isogene Maissorte (Antares) $74,5 \pm 3,7\%$ normal wachsende Keimlinge, $11,3 \pm 2,3\%$ abnormal wachsende Keimlinge und $14,3 \pm 3,3\%$ tote Samen. Die Prüfungen für transgenen Mais (Navares) resultierten in $79,3 \pm 5,6\%$ normal wachsenden Keimlingen, $10,1 \pm 3,6\%$ abnormal wachsenden Keimlingen und $10,6 \pm 2,7\%$ toten Samen. Raps zeigte $93,5 \pm 3,7\%$ normal wachsende Keimlinge, $4,5 \pm 2,8\%$ abnormal wachende Keimlinge und $2,3 \pm 1,9\%$ tote Samen.

Zur Berechnung der Samenanzahl wurde bei Raps ein Tausendkorngewicht (TKG) von 5 g und für Mais ein TKG von 280 g zugrunde gelegt (Lütke-Entrup und Oehmichen 2000).

3.7 Statistik

Zur Auswertung wurden die Versuchsergebnisse der Futteraufnahmemengen, DNA- und Cry1Ab Protein-Analysen der isogen und transgen gefütterten Tiere, sowie die Keimfähigkeit der isogenen und transgenen Maiskörner mittels t-Test unter Verwendung der Statistiksoftware SigmaStat (Version 3.0, SPSS Inc., Chicago, USA) miteinander verglichen.

4. RESULTATE

4.1 Degradationsprozesse bei der Futtermittelprozessierung

4.1.1 Silierung

Die quantitative Bestimmung des Cry1Ab Proteins erfolgte mittels ELISA und die Überprüfung, ob es sich dabei um das intakte Protein oder immunaktive Fragmente handelte, wurde mittels Immunoblot Assay durchgeführt (Lutz et al. 2005 b).

Die Ergebnisse des ELISA zeigten eine Abnahme des Cry1Ab Proteins im Verlauf des Silierungsprozesses. In den ersten 43 Stunden wurde keine signifikante Abnahme des Cry1Ab Proteinmenge gemessen. Im weiteren Verlauf der Silierung nahm die Menge rasch ab. Nach 61 Tagen war noch 23,6% vom Ausgangsgehalt messbar (Abb.5).

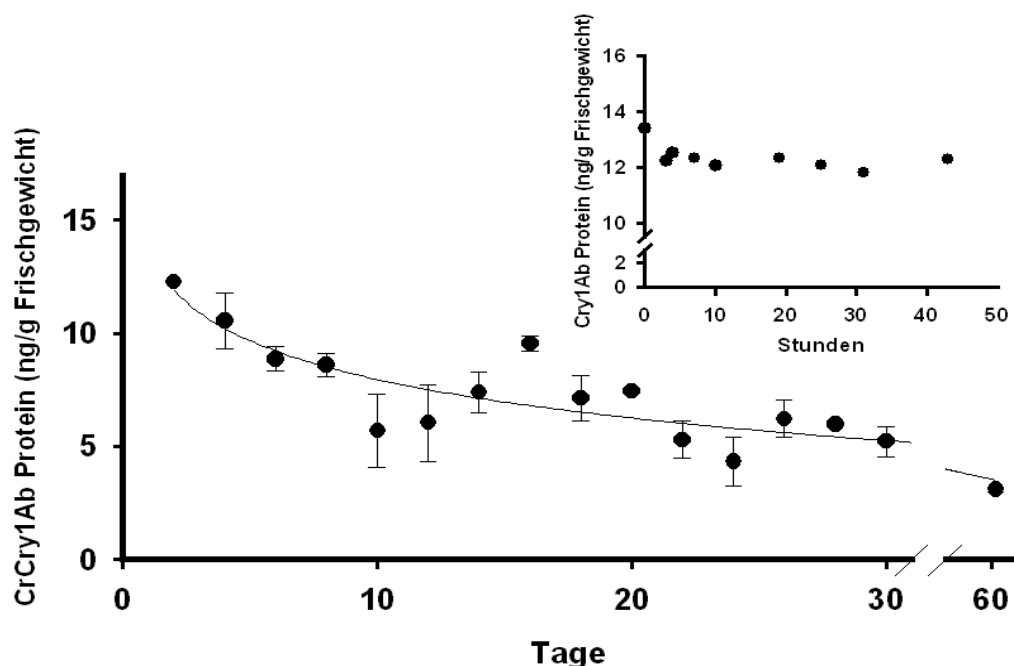


Abb.5: Messung des Cry1Ab Protein während der Silierung (Lutz et al. 2005 b).

Kleine Abb.: Proteinabbau in den ersten 43 Stunden der Silierung; Große Abb.: Messung des Cry1Ab Proteins von Tag 2 bis 30. Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei Doppelbestimmungen.

Die Immunoblot Analysen (Lutz et al. 2005 b) zeigten positive Signale für das intakte Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 60 kDa bis zum 8 Silierungstag (Abb.6).

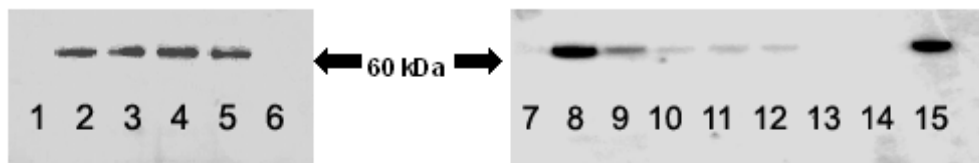


Abb.6: Immunoblotting des Cry1Ab Proteins in Maissilage (Bt176).

Abb. Links: 1= Antares; 2= Navares (0 h); 3= Navares (7 h); 4= Navares (12 h); 5= Navares (3 d); 6= Navares (12 d). Abb. Rechts: 7= Antares; 8= Navares (0 h); 9= Navares (2 d); 10= Navares (4 d); 11= Navares (6 d); 12= Navares (8 d); 13= Navares (12 d); 14= Navares (16 d); 15= Positivkontrolle (Cry1Ab/1Ac Protein, Agdia Inc.). Der Pfeil kennzeichnet die Cry1Ab Protein spezifische Größe von ca. 60 kDa.

4.1.2 Mais-Kobs Herstellung

Nach der Mais-Kobs Herstellung mit Novelis (Event MON810) wurden Proben genommen, um die Qualität und den Gehalt an Cry1Ab Protein zu untersuchen. Damit Mais-Kobs lagerfähig ist, muss der Feuchtigkeitsgehalt auf TS >90% reduziert werden. Die Bestimmung der Trockensubstanz vor und nach der Trocknung bei der Herstellung von transgenem Mais-Kobs (Event MON810) ergab für Grünmais $42,4 \pm 1,3\%$, für Körnermais $68,1 \pm 0,8\%$ und für Mais-Kobs $92,5 \pm 0,5\%$. Die Messung des Cry1Ab Proteins mittels ELISA (Agdia Inc.) ergab für Mais-Kobs eine Reduzierung auf circa 31% des Ausgangswertes (Abb.7). Der durch die thermische Behandlung hervorgerufene Abbau entspricht einer vergleichbaren Silierungsdauer von etwa sechs Wochen bei Bt176.

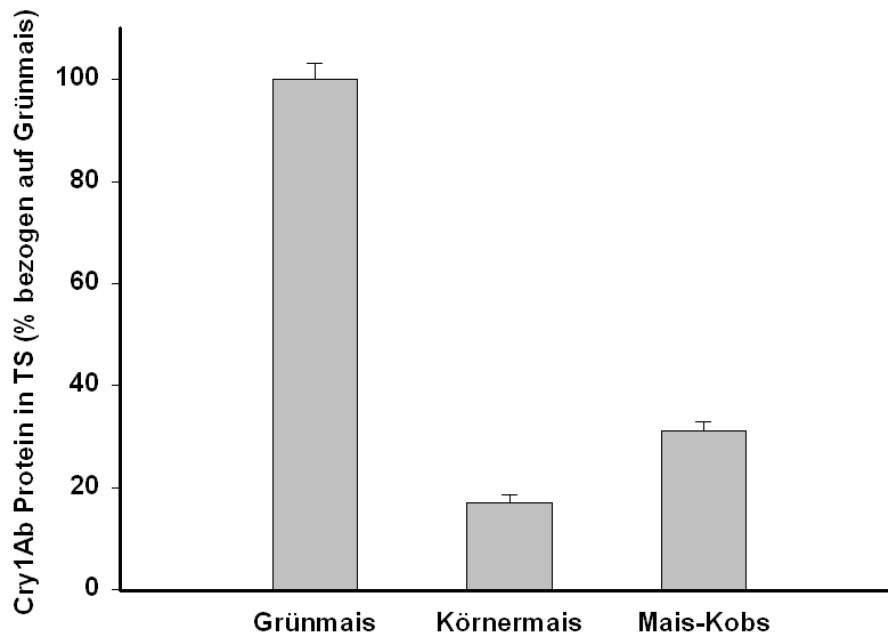


Abb.7: Cry1Ab Protein Abbau bei der Prozessierung von transgenem Mais zu Mais-Kobs (Event MON810). Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei Proben.

Die Auswertung des Immunoblots zeigte für Grünmais mit dem Event MON810 zwei Banden für immunoaktive Proteine mit Größen von ~ 60 kDa und ~ 36 kDa (Abb.8). Diese beiden Banden wurden auch im Mais-Kobs in abgeschwächter Form detektiert. Für Körnermais zeigte sich die Bande für immunoaktive Proteine mit einer Größe von ~ 62 kDa. Die Bande für das immunoaktive Cry1Ab Proteinfragment wurde im Körnermais nicht detektiert, was an der geringeren Menge von Cry1Ab Protein liegen kann. Im Gegensatz dazu wurden keine immunaktiven Fragmente beim Grünmais und in der Silage von Navares (Event 176) gefunden (Abb.6). Die mittels ELISA ermittelten Daten für den Mais mit dem Event MON810 müssen kritisch betrachtet werden, da die Auswertung des Immunoblots zeigt, dass nicht nur das vollständige Protein in einer Größe von ~ 60 kDa, sondern auch die immunoaktiven Fragmente mit in die Messung eingeflossen sind. Kreuzreaktionen mit mais-spezifischen Proteinen können ausgeschlossen werden, da keine Bande für den

Grünmais der korrespondierenden nicht transformierten Maissorte sichtbar war (Abb. 8).

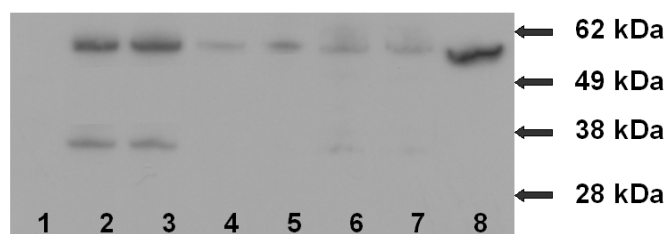


Abb.8: Immunoblotting des Cry1Ab Proteins im Mais-Kobs (MON810).

1: Grünmais isogen; 2,3: Grünmais transgen; 4,5: Körnermais transgen; 6,7: Mais-Kobs transgen; 8: Positivkontrolle (Cry1Ab/1Ac Protein, Agdia Inc.). Pfeile entsprechen Proteingrößen des Proteinstandards (SeeBlue Plus2, Invitrogen GmbH).

Die Verdauungsquotienten sowie der Gehalt an umsetzbarer Energie wurden an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Grub ermittelt und weichen bis auf den Rohproteingehalt zwischen DKC 3420 und TXP 138-F nur geringfügig voneinander ab (Tab.1).

Tab.1: Rohnährstoff und Gehalt an umsetzbarer Energie

	TXP 138-F			DKC 3420		
	Silomais	Mais-Kobs	Körnermais	Silomais	Mais-Kobs	Körnermais
Analysen (n)	1	3	1	1	3	1
Ernte - TS (%)	37,2	42,4	68,1	40,1	41,9	68,7
TS (% getrocknet)	-	92,6	92,8	-	92,7	89,8
Rohasche (g/kg TS)	26,0	27,0	13,0	26,0	29,0	14,0
Rohprotein (g/kg TS)	82,0	81,0	94,0	72,0	72,0	97,0
Rohfaser (g/kg TS)	195,0	163,0	19,0	190,0	174,0	20,0
NEL (MJ/kg TS)	6,70	6,33	8,42	6,71	6,31	8,41

Im transgenen Mais wurde der Rohproteingehalt mit 82,0 g/kg TS gemessen und in der nicht transformierten Variante mit 72,0 g/kg TS. Da diese Maissorte im Versuchsstadium ist und noch keine vergleichbaren Daten vorliegen, können hier keine Aussagen getroffen werden, ob die transgen von der nicht-transformierten Linie generell im Rohproteingehalt abweicht. Die Messungen des Rohproteingehalts von transgenem Mais (YieldGard, Monsanto) während einer Fütterungsstudie mit Schweinen zeigten keine signifikanten Unterschiede zur isogenen Maissorte (Weber et al. 2000). Die von Weber et al. (2000) gemessenen Werte für den Rohproteingehalt sind vergleichbar mit dem von TXP 138-F. Auch Clark and Ipharraguerre (2001) zeigten, dass die aktuell angepflanzten GV Mais und Sojassorten in ihrer Zusammensetzung und Verdaubarkeit mit ihren nicht-transformierten Hybridsorten vergleichbar waren.

4.2 Rinderstudien

Um Kenntnisse über den Verbleib des Cry1Ab Proteins nach Aufnahme durch Rinder zu erlangen, wurden die in den Fütterungsstudien mit Rindern entnommenen Fäzes- und Ingestaprobe aus verschiedenen GIT Abschnitten mittels ELISA untersucht. Analysen zur Ermittlung der immunoaktiven Proteingröße erfolgten mittels Immunoblot.

Der ELISA detektierte positive Signale für das Cry1Ab Protein in Ingesta und Fäzes von transgen gefütterten Rindern. In isogen gefütterten Tieren konnte das Cry1Ab Protein nicht detektiert werden, was Kreuzreaktionen mit körpereigenen Proteinen ausschließen lässt. Die Messwerte für das rekombinante Protein zeigten einen Anstieg im Verlauf der Darmpassage, was sich auf die Absorption von Wasser im Darm und der daraus folgenden Eindickung des Inhaltes zurückführen lassen könnte.

Für Fäzes waren die Messwerte am Detektionslimit des ELISA (Einspanier et al. 2004). Die Auswertungen der beiden Fütterungsstudien mit laktierenden Rindern (Studie A) und der Fütterungsstudie mit nicht-laktierenden Rindern (Studie B) zeigten vergleichbare Messwerte in den Darminhalten und Fäzes. Um zu überprüfen, ob die gemessenen Werte nur für intaktes Cry1Ab Protein gelten, wurden die gemessenen Proben mittels Immunoblot analysiert. Der immunologische Nachweis im Immunoblot zeigte jedoch, dass sich die Messwerte des ELISA aus immunoaktiven Fragmenten mit Molekulargewichten von etwa 17 und 34 kDa im Pansen und aus immunoaktiven Fragmenten von ~17 kDa in den Darmabschnitten zusammensetzten (Abb.9). Bereits in Pansenproben zeigte sich kein Signal für ein vollständiges Cry1Ab Protein (Lutz et al. 2005).

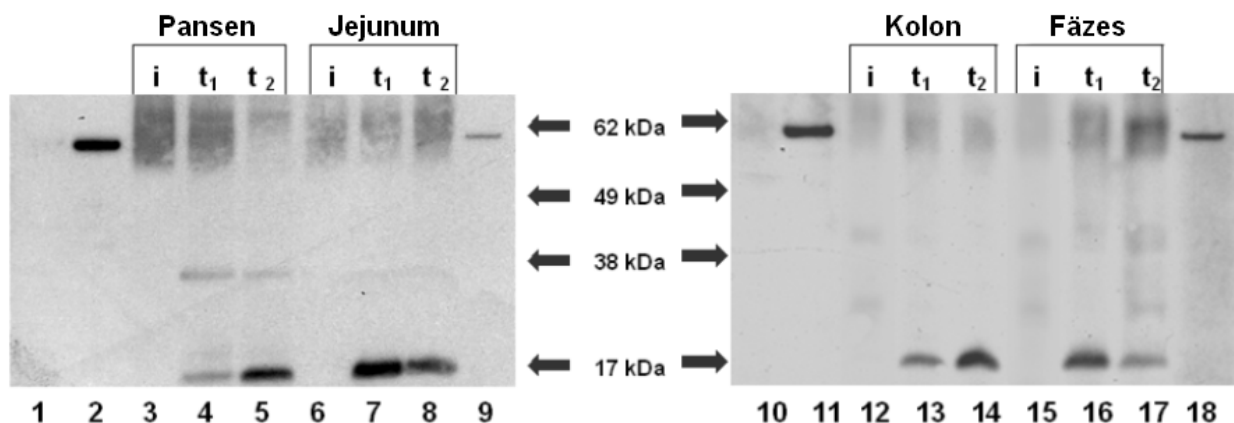


Abb.9: Immunoblot mit polyklonalen Antikörpern von Proben aus dem bovinen GIT.

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

Da in den beiden ersten Fütterungsstudien (A & B) das Probenmaterial erst nach der Schlachtung entnommen werden konnte, war es nicht möglich, Aussagen über zeitabhängige Abbauvorgänge treffen zu können. Aus diesem Grund wurde ein

weiterer Versuch mit fistulierten Rindern durchgeführt, mit dem es möglich war, den zeitlichen Verlauf der Cry1Ab Protein-Degradation zu untersuchen.

In diesem *in situ* Versuch mit pansenfistulierten Rindern wurden gemahlener iso- und transgener Mais in Nylonsäckchen für 0, 2, 4, 8, 16, 24 und 48 h im Pansen inkubiert. Die quantitative Bestimmung des Cry1Ab Proteins in transgenem Maishäcksel mittels ELISA ergab nach 2 h eine starke Abnahme auf circa 28% des Ausgangswertes; nach 48 h wurden noch 2,6 % gemessen. In der Maissilage war in der Ausgangsmenge relativ zu Maishäcksel lediglich circa 10% der Cry1Ab Proteinmenge vorhanden, d.h. während der Silierung wurden bis zum Versuchsbeginn circa 90% des Cry1Ab Proteins abgebaut. Nach 48 h konnten noch 10% des rekombinanten Proteins in Bezug auf die Ausgangssilage mittels ELISA quantifiziert werden (Abb.10).

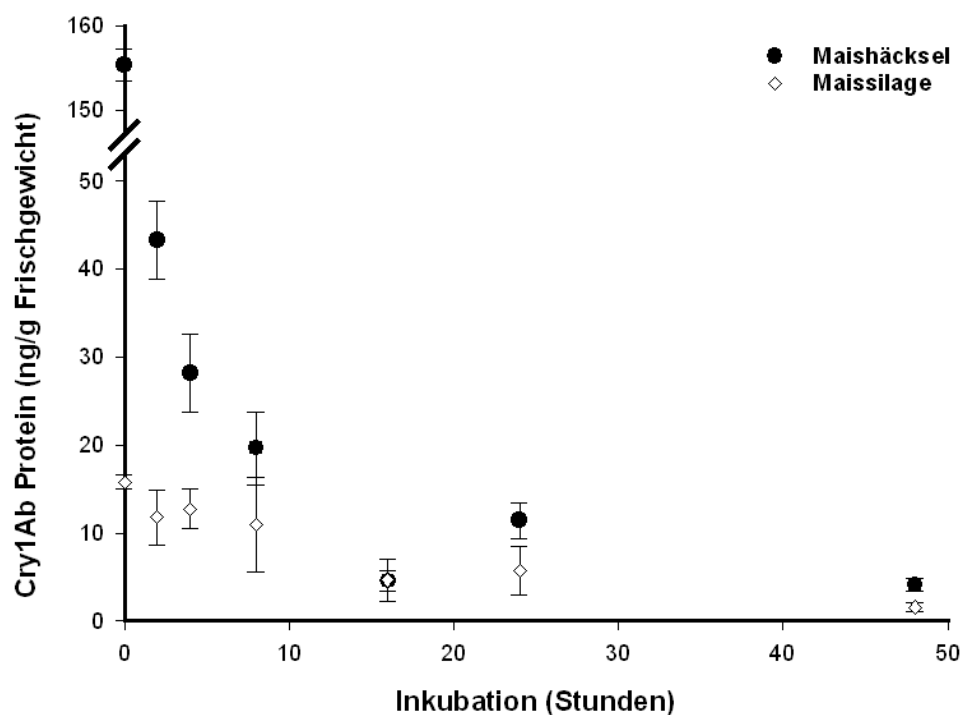


Abb.10: Messung des Cry1Ab Proteins im bovinen Pansen von fistulierten Rindern. Mittelwert \pm Standardabweichung von 5 Tieren (dorsaler und ventraler Durchschnittswert)

Um festzustellen, ob sich die verwendeten Antikörper des ELISA an immunoaktive Fragmente oder nur an das vollständige Cry1Ab Protein binden, wurden die gleichen Antikörper im Immunoblot verwendet. Das vollständige Cry1Ab Protein konnte für Maishäcksel nur in den ersten 8 h der Inkubation nachgewiesen werden; danach waren lediglich Fragmente mit einem Molekulargewicht von etwa 17 und 34 kDa detektierbar (Abb.11). Die Verdauung im Pansen bewirkte eine eindeutig messbare Degradation des Cry1Ab Proteins (Wiedemann et al. 2005).

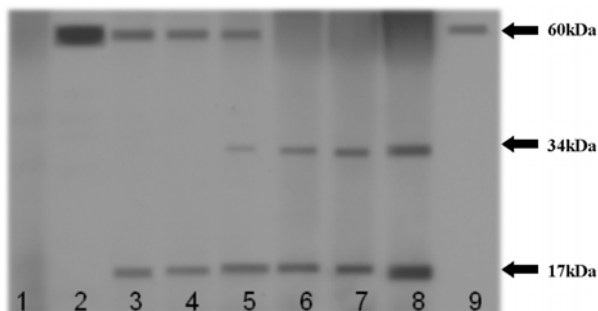


Abb.11: Immunoblotting der zeitabhängigen Degradation des Cry1Ab Proteins in Maishäckselproben. Die Pfeile zeigen die Proteingrößen des immunaktiven Proteins (~60 kDa) bzw. der Fragmente (~17 kDa; ~34 kDa). 1= Antares; 2= Navares (0 h); 3= Navares (2 h); 4= Navares (4 h); 5= Navares (8 h); 6= Navares (16 h); 7= Navares (24 h); 8= Navares (48 h); 9= Positivkontrolle (Cry1Ab/1Ac Protein, Agdia Inc.).

4.3 Wildschweinstudien

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

In DNA Analysen konnten in den Inhalten des GIT nur Fragmente mit einer Länge von 173 bp des *rubisco* Gens nachgewiesen werden. Längere Fragmente des *rubisco* Gens und Fragmente rekombinanter DNA waren nur in den Mageninhalten amplifizierbar (Tab.2).

Tab.2: Zusammenfassung der DNA-Fragmentlängen-Analyse in Ingestaprobe

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

„+“: positiver Nachweis des Zielgens; „-“: kein Nachweis des Zielgens.

Der „LightCycler GMO Maize Quantification Kit“ ermöglicht als standardisierte Methode den Nachweis von Fragmenten des *cry1Ab*- und *invertase* Gens. In 42,9% und 14,3% aller Proben aus Mageninhalten bzw. Jejunuminhalten konnten Fragmente des *cry1Ab* Gen, sowie in 28,6% aller Mageninhalte Fragmente des *invertase* Gens gefunden werden.

Die Cry1Ab Protein Analytik mittels ELISA ergab Signale für immunaktives Cry1Ab Protein in Höhen von $3,5 \pm 3,2$ ng/g, $0,67 \pm 0,11$ ng/g und $1,58 \pm 0,59$ ng/g in Ingestainhalten aus Magen, Kolon und Rektum (Abb.12). Der Immunoblot zeigte nur spezifische Banden für das Cry1Ab Protein (~60 kDa) in der Positivkontrolle (Proteinstandard) und transgenen Maisproben (Lutz et al. 2005 c).

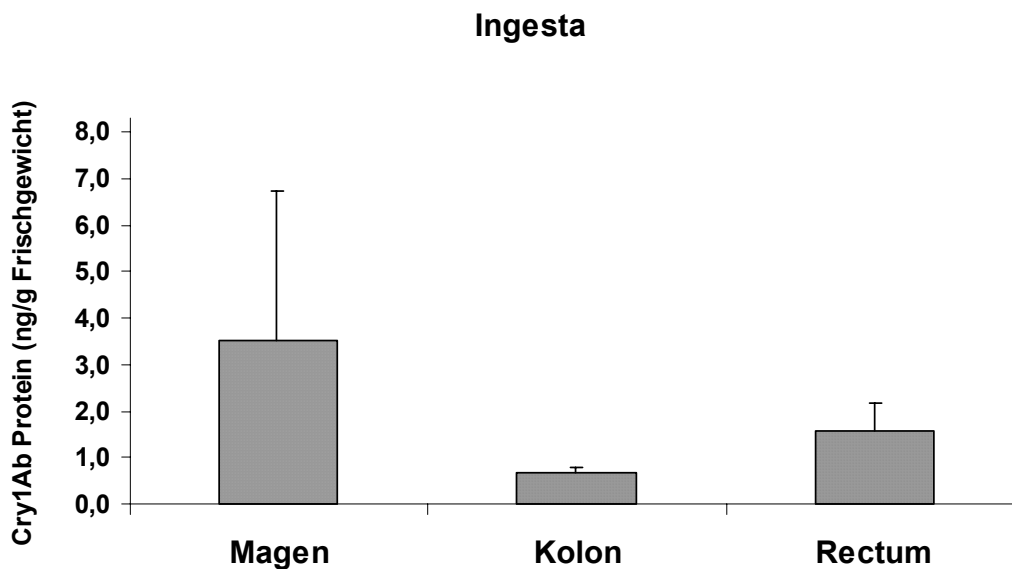


Abb.12: Zusammenfassung der Cry1Ab Protein Analytik mittels ELISA

4.4 Fasanstudien

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

Die DNA Analyse ergab, dass in allen Gewebe- und Ingestaprobe Fragmente des *rubisco* Gens (199 bp) im Gegensatz zum *zein* Gen (329 bp) nachweisbar sind. Mit der LightCycler Technik war es zudem möglich, in 40% (n=10) der untersuchten Muskelmageninhalte *invertase* Genfragmente zu detektieren. Fragmente des *cry1Ab* Gens waren weder mit der konventionellen PCR, noch mit der real-time PCR Methode detektierbar (Tab.3). Das Cry1Ab Protein konnte weder in Organen noch in GIT Inhalten mittels ELISA nachgewiesen werden (Lutz et al. 2005 c).

Tab.3: Zusammenfassung der in Fasanen detektierten Futter-DNA Fragmente

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

„++“: in > 50%, „+“: in ≤ 50 % der untersuchten Fasane detektiert. „-“: keine Detektion des Zielgens.

4.5 Damhirschstudien

In den Fäzes der Damhirsche konnten keine intakte Mais- bzw. Rapskörner gefunden werden. Durch den Kau- und Verdauungsprozess wurden die Körner offenbar vollständig aufgeschlossen und metabolisiert.

Mittels PCR konnten Fragmente des *rubisco* Gens von 199 bp in Ingesta- und Epithelproben des GIT und ebenso in verschiedenen Organen sowie Blut nachgewiesen werden. Die Detektion des *zein* Gens war in den GIT- und den Darm-epithelproben mit Ausnahme von Labmagen möglich. In Blut, Muskel und Milz waren die Ergebnisse negativ. Die Analysen zur Detektion von Fragmenten des *cry1Ab* Gens mit der PCR und real-time PCR Methode ergaben keinen Nachweis; das

maisspezifische *invertase* Gen konnte nur im Panseninhalt in einer geringen Anzahl von Proben detektiert werden (Tab.4).

Tab.4: Zusammenfassung der in Damhirschen detektierten Futter-DNA Fragmente..

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

„++“: 50%, „+“: ≤ 50%, der untersuchten Hirsche detektiert. „-“: keine Detektion des Zielgens.

In den untersuchten Ingesta-, Epithelgewebe- und Gewebeproben konnte das Cry1Ab Protein nicht detektiert werden. Möglicherweise war der Zeitabstand zwischen der letzten Fütterung mit transgenem Mais und der Schlachtung zu lange und das Cry1Ab Protein so degradiert, dass ein Nachweis nicht möglich war.

5. DISKUSSION

5.1 Pflanzenspezifische und rekombinante DNA

5.1.1 Methodik

Um rekombinate und maisspezifische DNA Fragmente nachzuweisen wurden verschiedene Primer designed, die es ermöglichten, Degradationsprozesse zu untersuchen. Die Identität der PCR Produkte wurde durch Sequenzierung nachgewiesen. Um auszuschließen, dass die zur Detektion von Abschnitten des *cry1Ab* Gens eingesetzten Primer pflanzen- oder tierspezifische DNA amplifizierten, wurde parallel immer entsprechendes Probenmaterial aus isogener Herkunft analysiert. Entsprechende Proben waren Negativkontrollen für den *cry1Ab* Gen Nachweis. Um eine Detektion von *rubisco* Genfragmenten aufgrund von Kontaminationen der Reagenzien auszuschließen, wurden Negativkontrollen mit H₂O und verschiedenen Puffern analysiert. Alle Negativkontrollen zeigten weder Banden noch Fluoreszenzsignale.

Als standardisierte Methode zur Detektion und Quantifizierung des *cry1Ab* und *invertase* Gens wurde die real-time PCR Technik mit dem kommerziell erhältlichen „LightCycler GMO Maize Quantification Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gemäß Herstellerangaben verwendet. In diesen Studien wurde die real-time PCR Technik zusätzlich zur konventionellen PCR angewandt, nachdem damit zuvor keine Fragmente des *cry1Ab* Gens zu detektieren waren. Über die Primersequenzen und die genaue Größe des Amplikons sind seitens des Herstellers keine Angaben verfügbar. Um die Möglichkeit einer Amplifikation von Nicht-Zielgenen auszuschließen, wurden Proben isogener Herkunft als Negativproben analysiert. Alle Negativproben waren für das *cry1Ab* Gen negativ und das maisspezifische *invertase* Gen konnte sowohl in iso- und transgenen Proben detektiert werden. Da es sich

sowohl im Falle des *cry1Ab* Gens als auch bei dem *invertase* Gen um einen single-copy Gennachweis handelt, ist die Detektionsrate gleichzusetzen. Die Analysen in den Fütterungsstudien mit Wildschweinen konnten Fragmente des *cry1Ab*- und des *invertase* Gens in GIT Inhalten nachweisen. In Proben aus den Fütterungsstudien mit Fasanen und Damhirschen war das *invertase* Gen nur in den Inhalten von Pansen und Labmagen, sowie Inhalten vom Muskelmagen in wenigen Fällen, nie aber das *cry1Ab* Gen detektierbar. Der Nachweis der beiden Genfragmente war immer nur am Anfang der Magen-Darm-Passage bei den Damhirschen und den Fasanen möglich. Im weiteren Verlauf der Magen-Darm-Passage waren die beiden Genfragmente nicht mehr detektierbar. Der Nachweis der beiden Genfragmente erfolgte demnach am Detektionslimit und deshalb konnte in diesen Fällen die Amplifikation der *invertase* und *cry1Ab* Gen-fragmente durchaus unterschiedlich sein. Die real-time PCR-Analysen für Pflanzenproben zeigten keine Unterschiede im Nachweis der beiden Genfragmente.

5.1.2 DNA Analytik der Fütterungsstudien

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

Ebenso wie in Rindern (Chowdhury et al. 2004) konnte in der Fütterungsstudie mit Damhirschen maisspezifische DNA in allen Abschnitten des GIT, im Blut und in verschiedenen Organen nachgewiesen werden. Dabei wurde ein Genabschnitt des *rubisco* Gens mit Größe von 199 bp amplifiziert. Das 329 bp große *zein* Fragments

konnte im Vergleich zu *rubisco* in einem geringeren Umfang nachgewiesen werden. Dies liegt vermutlich in der geringeren Kopienanzahl des *zein* Gens und der größeren Fragmentlänge begründet. Eine Detektion der rekombinanten und der maisspezifischen *invertase* DNA war auch in Panseninhalten nicht möglich. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den veröffentlichten Resultaten von Chowdhury et al. (2004). Nur in hoher Kopienzahl vorliegende kurze maisspezifische DNA-Bruchstücke des *rubisco* Gens konnten bei Rindern in Inhalten des Magen-Darm-Traktes, im Blut und in verschiedenen Organen nachgewiesen werden.

Die Fütterungsstudien mit Fasanen zeigten, dass maisspezifische DNA, im Gegensatz zur rekombinanten DNA, im GIT, Blut und in Organen detektiert werden konnte (Lutz et al. 2005 c). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die mit der Nahrung aufgenommene DNA zum Teil resistent gegenüber mechanischer, chemischer und enzymatischer Aktivitäten des GIT von Hühnervögeln ist und nicht vollständig degradiert wird. Fütterungsstudien mit Hühnern, gefüttert mit insekten-resistenten Mais kommen zu vergleichbaren Ergebnissen. Ein Nachweis von DNA aus dem Chloroplastengenom konnte im GIT, sowie in Blut und Organen von Hühnern nachgewiesen werden (Einspanier et al. 2001; Klotz et al 2002; Jennings et al. 2003 c). Rekombinante DNA konnte weder im Blut noch im Gewebe nachgewiesen werden.

In den Fütterungsstudien mit Wildschweinen konnten mittels PCR-Analytik DNA-Fragmente des *rubisco* Gens in Inhalten des GIT nachgewiesen werden. Die Detektion rekombinanter DNA-Fragmente war nur im Mageninhalt bis zu einer Größe von 727 bp möglich. Untersuchungen (Chowdhury et al. 2003 a,b) zum Abbau und Verbleib der nahrungsspezifischen DNA im Körper von Schweinen ergaben, dass DNA-Fragmente des *rubisco*- und *cry1Ab*-Gens in allen Abschnitten des GIT

gefunden werden können. Reuter & Aulrich (2003) gelang der Nachweis von maisspezifischer DNA (108 bp) im Blut und in verschiedenen inneren Organen, aber eine Detektion von rekombinanter DNA außerhalb des GIT war nicht möglich. Der positive Nachweis von Reuter & Aulrich (2003) von maisspezifischer DNA im Blut und Gewebe, im Gegensatz zu anderen Fütterungsstudien, liegt möglicherweise an der geringen Größe ihres nachgewiesenen DNA-Fragments. Phipps und Beever (2002) argumentieren, dass durch die Enzymaktivität und durch die sauren Bedingungen im Magen eine extensive Degradation von DNA aus der Nahrung stattfindet.

Es zeigte sich eine hohe Äquivalenz in der Nachweisbarkeit von Futter-DNA im Körper von Wildtieren im Vergleich zu Nutztierarten vergleichbarer Spezies. Ein Vergleich der Verdauungssysteme zeigt, dass die Verdauung von Futter-DNA beim Monogastrier effektiver ist als bei den Ruminantia und den Hühnervögeln. Bei den Schweinen war außerhalb des Magens kaum DNA nachweisbar, jedoch war eine Detektion von Futter-DNA außerhalb des GIT bei den Ruminantia und den Hühnervögeln möglich. Die Präsenz von DNA aus Nahrungs- und Futtermitteln ist aber nicht bedenklich, da hinreichend bekannt ist, dass DNA ohne ursprüngliche Funktionsumgebung keinerlei Wirkungen entfalten kann.

Alle Untersuchungen belegen übereinstimmend, dass durch Fütterung aufgenommene DNA während der Magen-Darm-Passage rapide in einzelne Bestandteile, die Nukleinsäuren, oder kleinere DNA-Fragmente abgebaut wird. Trotz bestehender Nachweise für den transintestinalen Übergang von Futter-DNA in den Organismus von Versuchstieren (Einspanier et al. 2001; Hohlweg & Dörfler 2001, Klotz et al. 2002; Lutz et al. 2005 c) sind die verantwortlichen Mechanismen bisher

noch ungeklärt. Denkbar ist ein Übergang von DNA aus der Nahrung über die M-Zellen der Peyerschen Plaques (Gebert et al. 1996; Owen 1999; Siebers & Finlay 1996).

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

Die Tatsache, dass mit der Nahrung aufgenommene DNA im GIT von Tieren nicht vollständig zu Nukleotiden abgebaut wird, zeigte Schubbert et al. (1994) in einem Modellversuch mit großen Mengen an M13mp18 Phagen DNA gefütterten Mäusen. In den Fäzes konnten DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 1692 bp und im Blut mit einer Größe von 967 bp 2 h nach Fütterung nachgewiesen werden. In einem weiteren Versuch (Schubbert et al. 1997) konnte die Phagen DNA mittels Fluorescence-in-situ-Hybridisierung (FISH) in Epithelzellen, in den Leukozyten der Peyerschen Plaques der Caecumwand, in Leberzellen sowie in B- und T-Zellen und Makrophagen der Milz nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass der

Transport von mit der Nahrung aufgenommener DNA durch die Darmwand und Peyerschen Plaques in das periphere Blutsystem und verschiedene Organe gelangt. Eine Übertragung von M13mp18 Phagen-DNA auf Föten konnte Schubert et al. (1998) nachweisen. Fragmente mit Größen bis zu 830 bp wurden in Organen von Föten und neugeborenen Mäusen mittels PCR und FISH detektiert, nachdem Mäuse während der ersten 14 Tage ihrer Trächtigkeit mit der M13mp18 Phagen DNA gefüttert wurden. Da Bruchstücke nicht überall im Fötus nachgewiesen wurde folgern Schubert et al. (1998), dass DNA zwar über die Plazentaschranke in den fötalen Organismus gelangen kann, jedoch nicht in die Keimbahn gelangt und daher nicht vererbt wird.

5.2. Nachweis des Cry1Ab Proteins

5.2.1 Methodik

Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit war der Nachweis des Cry1Ab Proteins sowohl im Futtermittel, als auch in Proben aus tierischer Herkunft. Für die Proteinanalysen wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA (Agdia Inc.) verwendet. Zur Etablierung des Cry1Ab Protein Nachweisverfahrens wurde isogenes Probenmaterial mit Cry1Ab/1Ac Proteinstandard (im ELISA-Kit enthalten) gespiked und die Wiederfindungsrate ermittelt. Dazu wurden Ingestaprobe aus dem Pansen von transgen gefütterten Tieren mit der Proteinmenge entsprechend der Standardkurve gespiked. Die Wiederfindung (\pm Standardabweichung) betrug $87,6 \pm 1,2\%$, $81,0 \pm 3,7\%$, $65,5 \pm 5,5\%$, $68,4 \pm 5,3\%$ und $79,7 \pm 1,6\%$ entsprechend 0,12, 0,25, 0,5, 1,0 und 1,6 ng. Aufgrund der hohen Standardabweichung für 0,06 ng ($71,7 \pm 53,0\%$) wurden Ergebnisse ab 0,06 ng als negativ bewertet. Um Kreuzreaktionen von tierischen, mikrobiellen und pflanzlichen Proteinen mit dem Cry1Ab Antikörper aus-

zuschließen wurde entsprechendes Probenmaterial von isogen gefütterten Tieren als Vergleichsprobe analysiert. Alle isogenen Futtermittel- und tierischen Proben zeigten keine Signale für die Präsenz des Cry1Ab Proteins. Der ELISA zeigte somit einen spezifischen Nachweis für das Cry1Ab Protein.

Da der ELISA keine Erkenntnisse darüber gibt, ob das intakte Protein, oder immunaktive Fragmente quantitativ bestimmt werden, wurde ein Immunoblot Assay mit den gleichen Antikörper wie im ELISA etabliert. Anhand einer Verdünnungsreihe mit nativen transgenen Maisblättern (Navares) wurde das Detektionslimit des Immunoblots bestimmt, das bei 50 mg (Frischgewicht) lag, was bei dieser Methodik einer Menge von circa 2 ng Cry1Ab Protein, gemäß ELISA Messung entsprach (Lutz et al. 2005 a).

Die Auswertungen der Immunoblots für nativen und prozessierten Mais mit Event 176 zeigten nur ein Signal mit einer Proteingröße von circa 60 kDa, während die Analysen der transgenen Maissorte TXP 138-F (Event MON810) im Nachweis von zwei immunaktiven Proteingrößen mit circa 60 und 36 kDa Größe resultierten. Nach Information der GM Database (www.agbios.com) ist der Nachweis von immunaktiven Proteinen mit 65, 60, 40 und 36 kDa für Protein aus dem Event 176 möglich. Zur Zeit sind keine Informationen verfügbar, ob in MON810 vergleichbare immunaktive Proteingrößen vorkommen. Der ELISA detektierte drei immunaktive Proteine in den Größen von circa 60, 34 und 17 kDa in den Ingestaprobe aus den Rinderversuchen bzw. Proben aus dem Panseninhalt aus dem Versuch mit pansenfistulierten Tiere. Da wir im nativen unprozessierten Mais bislang keine immunaktiven Fragmente detektiert hatten, wurde das Auffinden der Fragmente im bovinen Panseninhalt als

signifikanter Abbau des bovinen Verdauungsprozesses interpretiert. Zur Zeit kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei den detektierten Fragmenten mit circa 34 bzw. 36 kDa um das gleiche Fragment handelt.

Um die Bioaktivität der Cry1Ab Fragmente in Größen von circa 17, 34 und 36 kDa zu untersuchen, wäre ein Bioassay mit *Ostrinia nubilasis* Larven erforderlich. Jedoch waren die Proteinmengen der einzelnen Fragmentgrößen dafür zu gering.

5.2.2 Cry1Ab Analytik im Futtermittel

Bislang fehlten detaillierte Kenntnisse über Degradationsprozesse des Cry1Ab Proteins während der Futtermittelprozessierung zu Maissilage und Mais-Kobs. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass während der Silierung ein erheblicher Abbau des rekombinanten Proteins stattfindet und nach zwei Monaten nur noch circa 23% des Ausgangswertes detektiert werden konnte. Abbauprozesse bei der Herstellung von Mais-Kobs mit transgenem Mais (Event MON810) ergab eine Reduzierung auf circa 31% des Ausgangswertes (Grünmais).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass sich die Menge an rekombinantem Protein bei der Futtermittelprozessierung verringert. Somit ist die bei der Fütterung aufgenommene Menge an Cry1Ab Protein im Vergleich zu Grünmais bereits deutlich niedriger. Ein möglicher Einfluss des Cry1Ab Protein auf den tierischen Organismus wird mit fortlaufender Silierungsdauer reduziert.

5.2.3 Cry1Ab Protein Analytik der Fütterungsstudien

Studien zu Degradationsprozessen des transgenen Cry1Ab Proteins im Verdauungstrakt von Rindern waren Bestandteil dieser Untersuchungen. Die Resultate zeigten,

dass eine rasche Degradation des Cry1Ab Proteins im Pansen stattfindet, da sich schon nach kürzester Zeit lediglich immunoaktive Fragmente und nicht das vollständige Protein nachweisen ließen (Lutz et al. 2005 a; Wiedemann et al. 2005). Es ist unwahrscheinlich, dass intaktes funktionsfähiges Cry1Ab Protein aus dem Pansen in nachfolgende Darmabschnitte gelangt. Es konnte auch in keinem Gewebe außerhalb des Magen-Darm-Trakts immunoaktives Cry1Ab Protein nachgewiesen werden (Lutz et al. 2005 a; Chowdhury et al. 2003 a). Eine Verbreitung des intakten Cry1Ab Proteins durch Mist und Gülle von transgen gefütterten Rindern auf Felder und damit in die Umwelt kann nahezu ausgeschlossen werden. Zur Zeit liegen keine Erkenntnisse vor, dass die durch die Verdauungsprozesse im bovinen Pansens resultierenden immunoaktiven Fragmente des Cry1Ab Proteins biologisch aktiv sind. Die Wirkung von biologisch aktivem Cry Protein unterschiedlicher Größe wurde in einer Studie von Haider et al. (1986) beschrieben. Sie zeigten, dass die Insektenspezifität von *Bacillus thuringiensis* var. Colmeri, Serotyp 21 abhängig davon ist, in welcher Magenflüssigkeit das Pro-Toxin in das aktive Cry1Ab Protein umgesetzt wurde. Sie konnten nachweisen, dass aus der Prozessierung des nativen δ -Endotoxin (130 kDa) in Magenflüssigkeit von *Pieris brassicae* Larven ein 55 kDa Protein resultiert, welches nur toxisch auf Lepidopteren Zelllinien wirkt. Die Magenflüssigkeit der *Aedes aegypti* Larven erzeugt ein 52 kDa großes Protein mit toxischer Wirkung auf Mosquito Zelllinien und nur einer Lepidopteren Zelllinie (*Spodoptera frugiperda*). Auswirkungen der nachgewiesenen Fragmente des Cry1Ab Proteins in Größen von circa 17 kDa und 34 kDa können somit nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Positive Signale, die auf eine Präsenz des Cry1Ab Proteins schließen lassen, wurden in den Inhalten von Magen, Kolon und Rektum von Wildschweinen mittels

ELISA gemessen. Im Immunoblot konnten keine signifikanten Banden für ein vollständiges Cry1Ab Protein detektiert werden. Die Ergebnisse aus dem Fütterungsversuch mit Wildschweinen sind vergleichbar mit Studien von Chowdhury et al. (2003 a). Sie konnten Signale für das Cry1Ab Protein in Inhalten verschiedener GIT Abschnitte von mit Bt-11 gefütterten Schweinen detektieren und ein Immunoblot zeigte eine schwache Bande für das Cry1Ab Protein aus Mageninhalten. Weder in Gewebeproben von Wildschweinen (dieser Studie) noch von domestizierten Schweinen (Chowdhury et al. 2003 a) war das Cry1Ab Protein detektierbar. Basierend auf den Ergebnissen dieser beiden Studien ist zu vermuten, dass kein oder nur eine geringe Menge immunaktives Cry1Ab Protein den GIT beim Wild- und Hausschwein verlässt und dass es keine nennenswerten Unterschiede im Abbauverhalten in dieser Spezies gibt. Auswirkungen durch das Ausbringen von Cry1Ab Protein durch Mist und Gülle auf Bodenorganismen können nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Untersuchungen zu Auswirkungen von transgenem Mais auf die mikrobielle Bodenökologie wurden von der FAL Braunschweig durchgeführt. Sie zeigten, dass das durch Wurzelreste der abgeernteten transgenen Maispflanzen in Böden gelangte Cry1Ab Protein in geringen Mengen eine Vegetationsperiode überdauern können und eine Anreicherung in Böden bei Monokulturen möglich ist (Baumgarte & Tebbe 2004). Die ermittelten Cry1Ab Proteinmengen waren unterhalb der Wirkungsschwelle für die Zielorganismen. Die Ausbringung von zusätzlichen Cry1Ab Protein durch Mist und Gülle müsste in diesem Zusammenhang untersucht werden. Informationen darüber, ob es sich um das funktionsfähige Cry1Ab Protein oder um immunoaktive Fragmente handelt, liegen zur Zeit nicht vor.

Die Fütterungsstudien mit Fasanen und die anschließenden Analysen ergaben keine Nachweise für die Präsenz des Cry1Ab Protein in irgendeinem Abschnitt des GIT bzw. Gewebe. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit denen aus einer Fütterungsstudie mit Hühnern von Jennings et al. (2003 c), wo weder das Cry1Ab Protein, noch immunoaktive Fragmente mittels kompetitiven Immunoassay nachgewiesen werden konnten. Es zeigte sich, dass das Cry1Ab Protein rasch unter simulierten Magenbedingungen abgebaut wurde und damit die Cry1Ab Proteinmenge im weiteren Verlauf der Magen-Darm-Passage sehr gering ist. Eine Beeinträchtigung der Gesundheit von Hühnervögeln durch die Aufnahme von transgenen Maiskörnern kann demnach fast ausgeschlossen werden.

5.3 Saatgutverbreitung

5.3.1 Methodik

Um das Risiko für eine Verbreitung durch Wildtiere abschätzen zu können, wurde in den Fütterungsstudien mit Wildschweinen und Fasanen die Ausscheidung von keimfähigem Saatgut untersucht.

Diese Studien wurden gemäß zertifizierten Untersuchungsverfahren nach international anerkannten Regeln der „International Seed Testing Association“ durchgeführt. Vor Fütterungsbeginn wurde die Keimfähigkeit des Saatguts bestimmt um sicherzustellen, dass durch die leichte Trocknung der Maiskörner bei circa 35°C die Keimfähigkeit nicht beeinträchtigt wurde. Während der Fütterungsphasen wurden die gesamten Fäzes auf intakte Mais- und Rapskörner untersucht.

5.3.2 Keimfähigkeitsanalytik in den Fütterungsstudien

Die Untersuchungen zeigten, dass Fasane kein keimfähiges Saatgut und Wildschweine nur geringe Mengen keimfähiges Saatgut ausscheiden. Die Schäden durch das Kauen der Nahrung und der Aufenthalt im Magen lässt die Keimfähigkeit von Maiskörnern stark absinken. Bei Verkürzung der Kauphase während der Nahrungsaufnahme durch Störungen und einer geringeren Verweildauer der Maiskörner im Magen durch Krankheiten, könnten vermehrt keimfähige Maiskörner ausgeschieden werden.

Eine Studie von Heinken et al. (2005) zur Ausbreitung von Gefäßpflanzen durch Rehe, Dam- und Rothirsche sowie Wildschweine und kam zum Ergebnis, dass zahlreiche Pflanzenarten in zum Teil erheblichen Mengen durch Kot (Endozoochorie) sowie durch Anheftung an die Oberfläche der Tiere (Epizoochorie) verbreitet werden können. In den Losungen von Damhirschen konnten 42 und in den von Wildschweinen 76 Samenarten nachgewiesen werden. Während die Herbivoren überwiegend Samen krautiger Arten ausbreiten (Schmidt et al. 2003) wurden beim Wildschwein relativ hohe Samenanteile von Offenland- und auch Kulturpflanzen gefunden (Hahn 2002). Von den Herbivoren wurden fast ausschließlich sehr kleine Samen (< 1 mg) ausgebreitet; nur Wildschweine schießen größere Samen (> 1 mg) aus (Klotz et al. 2002). Für die Erfassung der Epizoochorie wurden in unseren Studien keine Untersuchungen durchgeführt. Studien zeigten jedoch, dass beim Reh 46, beim Rothirsch 18 und beim Wildschwein 65 Pflanzenarten im Fell und an den Hufen zu finden sind (Heinken & Raudnitschka 2002). Mit Ausnahme von sehr großen und glatten Früchten können Diasporen fast aller Pflanzenarten epizoochor ausgebreitet werden (Heinken 2005).

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass *Zea mays* als empfindlich für geringe Temperaturen gilt. Die Keimung beginnt bei Temperaturen über 10°C und das Temperaturoptimum liegt für Mais bei 25°C (Hoffmann et al. 1985). In Europa wäre demnach eine Verbreitung nur nach der Saatausbringung durch den Landwirt denkbar. Ein Auskreuzen von *Zea mays* und die Weitergabe rekombinanten Erbgutes mit Wildpflanzen konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Mais behält Rapssamen seine Keimfähigkeit bis zu fünf Jahren, manchmal sogar länger. Finden Rapssamen gute Umweltbedingungen ist ein Wachstum des Samens nicht ausgeschlossen (Pekrun et al. 1998). Eine Auskreuzung von Raps mit wildlebenden verwandten Arten ist durchaus möglich. Konnte in diesen Wildtierstudien auch kein intakter Rapssamen gefunden werden, ist jedoch unter bestimmten Bedingungen, z.B. Erkrankungen, eine Ausscheidung nicht auszuschließen.

Mit der Haftungsregelung für Schäden und Beeinträchtigungen, die durch die Nutzung von GVOs entstehen können, gilt, dass im Falle von GVO-Auskreuzungen oder Vermischungen in Verbindung mit wirtschaftlichen Nachteilen, der Geschädigte beim Verursacher Entschädigung verlangen kann. Landwirte, die GV-Pflanzen anbauen, müssen für die Mehrkosten, die sich aus den Regeln zur "guten fachlichen Praxis" ergeben, selbst aufkommen. Das bedeutet, dass der Landwirt finanziell für Folgen aus einer Verbreitung von Saatgut durch Tiere aufkommen und ggf. Maßnahmen dagegen, z. B. Einzäunung der Felder, selbst tragen müsste.

6. SCHLUSSFOLGERUNG

Mit der täglichen Nahrung wird pflanzliche und tierische DNA aufgenommen. Die DNA wurde beim Monogastrier effektiv abgebaut während bei den Ruminantia und Hühnervögeln noch kleine Fragmente der maisspezifischen *rubisco* DNA detektierbar waren (Abb.13).

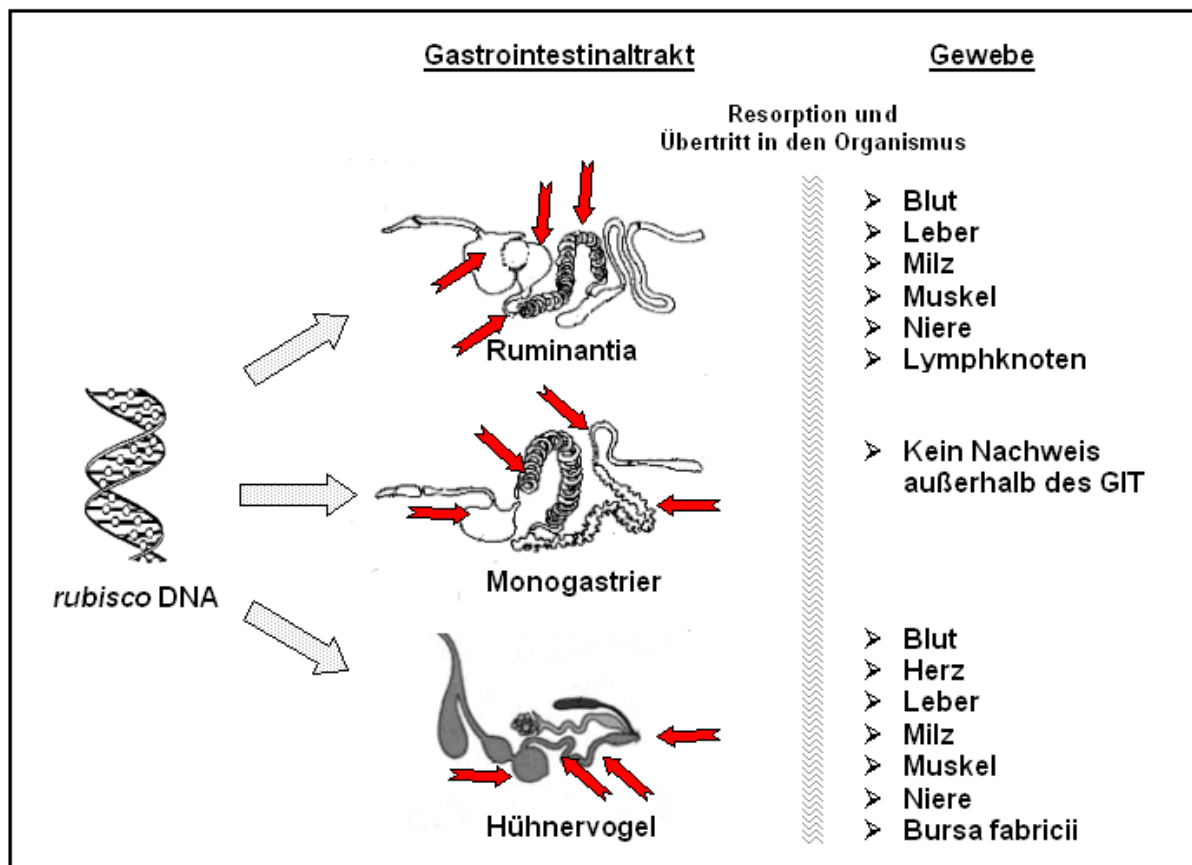


Abb.13: Zusammenfassung zum Nachweis der *rubisco* DNA in Wildtierarten mit verschiedenen Verdauungssystemen. Die Pfeile geben die Regionen des GIT und Gewebe an, in denen Fragmente des *rubisco* Gens detektiert wurden.

Es konnten keine Unterschiede im Abbau von rekombinanten Genen im Vergleich zu pflanzenspezifischer DNA im Verdauungsprozess festgestellt werden; die rekombinante *cry1Ab* DNA wurde in allen Verdauungssystemen effektiv abgebaut. Der Nachweis von Fragmenten des *rubisco* Gens im Gegensatz zum rekombinanten *cry1Ab* Gens ist durch die höhere Kopienzahl pro Zelle möglich. Bei vergleichbaren

Abbauprozessen ist das *cry1Ab* Gen bereits degradiert, während sich noch größere Fragmente des *rubisco* Gens detektieren lassen. Nur in Mageninhalten der Wildschweine konnten Fragmente des *cry1Ab* Gens detektiert werden (Abb.14).

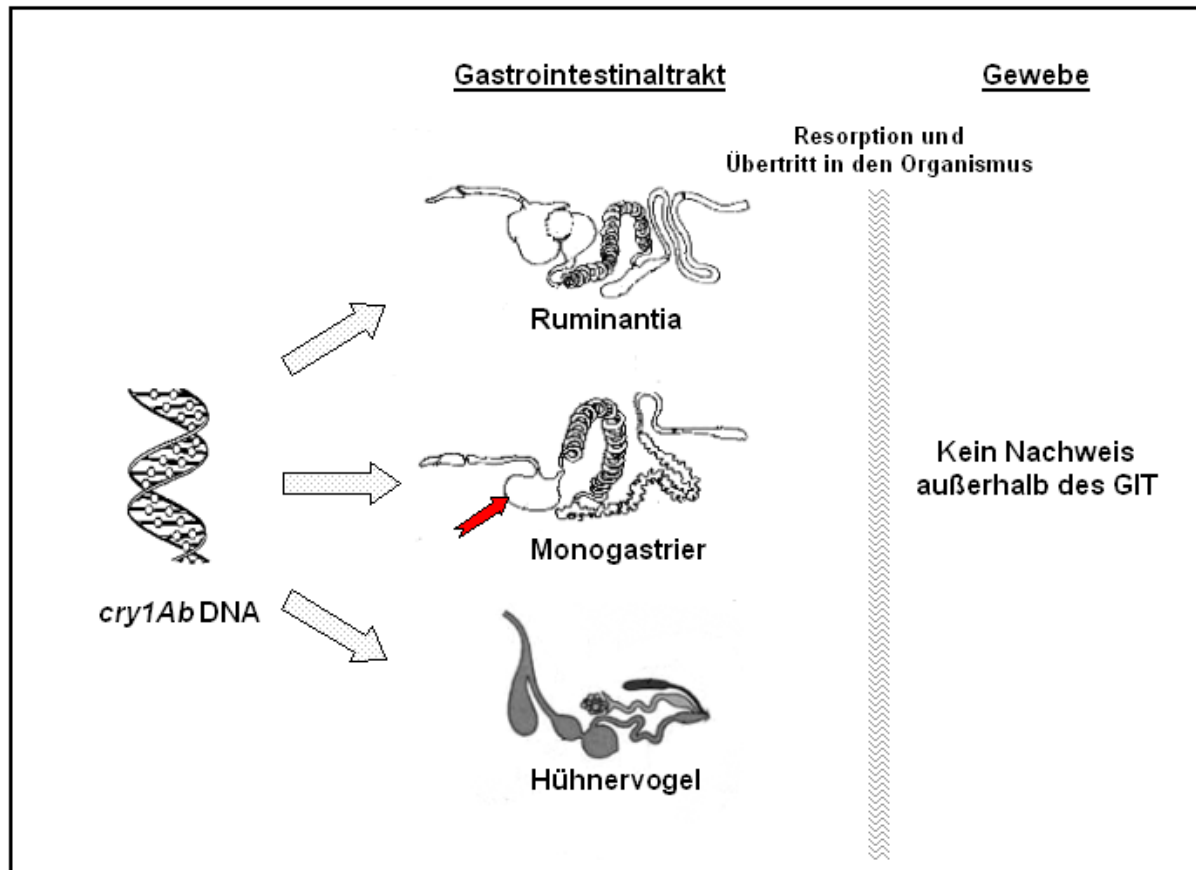


Abb.14: Zusammenfassung zum Nachweis der rekombinaten *cry1Ab* DNA in Wildtierarten mit verschiedenen Verdauungssystemen. Der Pfeil gibt die Regionen des GIT an, in denen Fragmente des *cry1Ab* Gens detektiert wurden.

Das in transgenen Pflanzen exprimierte Cry1Ab Protein wird schnell und effektiv im Verlauf der Magen-Darm-Passage abgebaut. In Hühnervögeln wurde das Cry1Ab Protein überhaupt nicht, in den Ruminantia im Pansen und im Monogastrier in verschiedenen GIT Abschnitten detektiert (Abb.15). Derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnissen nach zu schließen, ist keine Beeinträchtigung der Gesundheit von transgen gefütterten Tieren bzw. Wildtieren, die unkontrolliert transgene Pflanzen

fressen, anzunehmen. Bislang fehlen Langzeitfütterungsstudien, welche mögliche Auswirkungen von insektiziden Proteinen aus Pflanzen auf Tiere untersuchen. Zur Zeit gelten mögliche nachteilige Auswirkungen auf die Gesundheit des Tieres als nicht wahrscheinlich und auch das Risiko einer unkontrollierten Verbreitung von Saatgut durch Tiere erscheint gering.

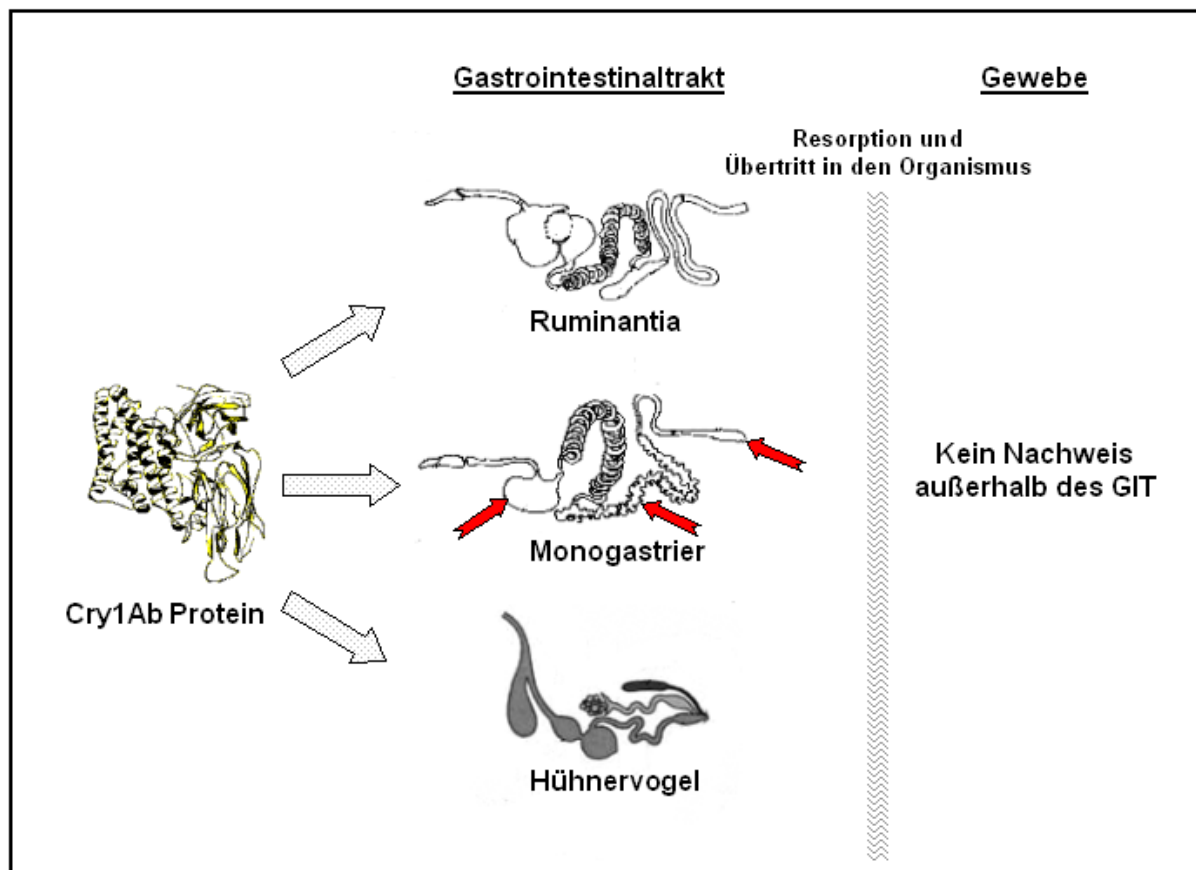


Abb.15: Zusammenfassung zum Cry1Ab Protein Nachweis in Wildtierarten mit verschiedenen Verdauungssystemen. Die Pfeile geben die Abschnitte des GIT an, in denen das Cry1Ab Protein detektiert wurde.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Bislang waren weder Informationen über die zeitabhängige Degradation des rekombinanten Cry1Ab Proteins während der Maissilierung, noch bei der Prozessierung zu Mais-Kobs erhältlich. Es konnte gezeigt werden, dass das Cry1Ab Protein im Verlauf der Silierung zunehmend abgebaut wird. Die Proteinanalysen für die Mais-Kobs Prozessierung zeigen einen durch die thermische Behandlung hervorgerufenen Abbau auf circa 31% des Ausgangswertes, bezogen auf den unbehandelten Grünmais.

Um Erkenntnisse über den Verbleib von maisspezifischer und rekombinanter DNA zu erhalten, wurden Studien zu Abbauprozessen in Wildschweinen, Fasanen und Damhirschen durchgeführt. Ein Nachweis von maisspezifischer DNA war in verschiedenen Abschnitten des GIT bei allen, eine Detektion des rekombinanten *cry1Ab* Gens nur im GIT von Wildschweinen möglich. Es zeigten sich Unterschiede in der Nachweisbarkeit von mit der Nahrung aufgenommener DNA abhängig vom jeweiligen Verdauungssystem. Im Monogastrier wird die DNA sehr effektiv abgebaut und konnte außerhalb des GIT nicht detektiert werden, während dies bei den Ruminantia und Hühnervögeln in verschiedenen Organen möglich war.

In zeitabhängigen Cry1Ab Protein Abbaustudien konnte gezeigt werden, dass im bovinen Pansen das intakte Cry1Ab Protein (~60 kDa) in zwei Fragmente (~34 kDa, ~17 kDa) degradiert wird. Im Verlauf der Darmpassage war das ~34 kDa Fragment nicht mehr detektierbar. Im Wildschwein konnten Signale für das rekombinante Protein in Inhalten des Magens, Kolons und Rektums nachgewiesen werden. In Hühnervögeln wird das Cry1Ab Protein durch die Verdauung vollständig abgebaut. Zusammenfassend kann ein Abbau des Cry1Ab Proteins in allen Verdauungs-

systemen gezeigt werden und eine Ausscheidung des intakten Cry1Ab Protein nach Magen-Darm-Passage ist wenig wahrscheinlich.

Die Untersuchungen zur unkontrollierten Verbreitung von Saatgut zeigte, dass bei Wildschweinen die Möglichkeit besteht, dass intakte keimfähige Maiskörner ausgeschieden werden können. Bei den Fasanen konnte kein intaktes Saatgut nach Magen-Darm-Passage gefunden werden.

8. SUMMARY

No data were available about time-dependent degradation of the recombinant Cry1Ab protein in the course of processing maize to silage and maize-cobs. These topics together with the fragmentation of maize specific and recombinant DNA are investigated in this thesis. It has been shown that the ensiling process markedly reduces the presence of the full size Cry1Ab protein (~60 kDa). Analyses during the processing of fresh maize to maize-cobs showed a reduction of Cry1Ab protein up to 31% of the initial value caused by the thermal treatment.

To obtain knowledge about the fate of maize specific and recombinant DNA, degradation processes in wild pigs, pheasants and deer were investigated. While maize specific DNA could be found in the GIT of all species, investigated fragments of the recombinant *cry1Ab* gene were only detectable in the GIT of wild pigs. Comparing the distinct digestion systems, differences in the traceability of feed ingested DNA were shown. In contrast to ruminants and fowl-like birds no foreign DNA was detectable in monogastric species outside the GIT.

Studying the time-dependent degradation of Cry1Ab protein in the bovine rumen, immunoblotting showed specific fragments of ~17 kDa and ~34 kDa size. During and after the intestinal passage the ~34 kDa protein fragment was not detectable any more. Using a sensitive ELISA signals of the recombinant protein were measured in ingesta samples of stomach, colon and rectum of wild pigs, while in pheasants the Cry1Ab protein was completely digested.

In conclusion, due to an effective mastication and digestion process the possibility of an uncontrolled dispersal of germinable maize and rapeseed by wild boar and pheasant is extremely low. While in feces of wild pigs germinable maize seeds could

be excreted, no intact maize seeds and rapeseed in feces of pheasants were detectable.

9. LITERATUR

Andow, D.A. und A. Hilbeck. 2004. Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. *BioScience* 54: 637-649.

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

Aumaitre, A., K. Aulrich, A. Chesson, G. Flachowsky und G. Piva. 2002. New feeds from genetically modified plants – substantial equivalence, nutritional equivalence, digestibility, and safety for animals and the food chain. *Livestock Production Science* 74: 223-238.

Badosa, E., C. Moreno und E. Montesinos. 2004. Lack of detection of ampicillin resistance gene transfer from Bt176 transgenic corn to culturable bacteria under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 169-178.

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

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

Bolivar F., R. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach und H.L. Hynes. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles: a multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-110.

Bratton, S.P. 1975. The effect of the European wild boar, *Sus scrofa*, on Gray Beech Forest in the Great Smoky mountains. *Ecology* 56: 1356-1366.

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

Champolivier, J., J. Gasquez und A. Messéan. 1999. Crop management of transgenic rapeseed: Risk assessment of gene flow. In New horizons for an old crop. Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.

Chesson, A. und G. Flachowski. 2003. Transgenic plants in poultry nutrition. World's Poultry Science Journal 59: 201-207.

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

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

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

Chowdhury, E.H., N. Shimada, H. Murata, O. Mikami, P. Sultana, S. Miyazaki, M. Yoshioka, N. Yamanaka, N. Hirai und Y. Nakajima. 2003 c. Detection of Cry1Ab protein in GI contents but not visceral organs of genetically modifies Bt11-fed calves. Veterinary and Human Toxicology 45: 72-75.

Clark, J.H. und I.R. Ipharraguerre. 2001. Livestock performance: feeding biotech crops. *Journal of Dairy Science* 86: 708-715.

Clements, M.J.; Campbell, K.W.; Maragos, C.M.; Pilcher, C.; Headrick, J.M.; Pataky, J.K. und White, D.G.: Influence of Cry1Ab protein and hybrid genotype on Fumonisin contamination and Fusarium ear rot of corn crop. *Science* 2003, 43, 1283-1293

Daenicke, R., D. Gädeken und K. Aulrich. 1999. Einsatz von Silomais herkömmlicher Sorten und der gentechnisch veränderten Bt Hybriden in der Rinderfütterung - Mastrinder - Tagungsband des. 12, Maiskolloquiums am 27./28.03.1999 in Wittenberg . 40-42.

Daenicke, R., K. Aulrich und G. Flachowsky. 1999. GMO in animal feedstuffs: Nutritional properties of Bt-maize unaffected. *Mais*, September 1999 :135-137.

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

De Vries, J. und W. Wackernagel. 2002. Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99: 2094-2099.

Dörfler, W. 2000. Foreign DNA in mammalian systems. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. 181 S.

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

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

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

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

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

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

Faust, M. und L. Miller. 1997. Study finds no Bt in milk. Iowa State University integrated crop management newsletter IC-478 (Special Livestock Edition): 1

Flachowsky, G. und K. Aulrich. 2001. Nutritional assessment of feeds from genetically modified organism. *Journal of Animal and Feed Science* 10 (Suppl. 1):181-194.

Flachowsky, G. und K. Aulrich. 1999. Tierernährung und gentechnisch veränderte Organismen (GVO), *Landbauforschung Volkenrode*, 49:13-20.

Flachowsky, G., K. Aulrich, H. Böhme, und R. Daenicke. 2000. GMO in animal nutrition: results of experiments at our Institute. Proceedings of the 6th International Feed Production Conference. Piacenza, Italy November 2000. Food Safety: Current situation and perspectives in the European Community. Editors, G. Piva und F. Masoero: 291-307.

Flachowsky, G., K. Aulrich R. Daenicke, H. Böhme. 1999. Gentechnisch veränderte Produkte (GVO) in der Tierernährung. LAF Information Lectures from the conferences. Vol.7 (1999) No. 2: 96-115.

Folmer, J.D., R.J. Grant, C.T. Milton und J.F. Beck. 2000. Effect of Bt corn silage on short-term lactational performance and ruminal fermentation in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 83: 1182-1187. Abstract 272.

Galinat, W.C. 1988. The origin of corn. In: *Corn and corn improvement*. *Agronomy* 18: 3-27.

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

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

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

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

Gill, S.S., E.A. Cowles und P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology* 37: 615-636.

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

Goodmann, M.M. 1965. The history and origin of maize. *North Carolina Agriculture Experimental Station Technical Bulletin* 170.

Goulding, M.J., G. Smith und S.J. Baker. 1998. Current status and potential impact of wild boar (*Sus scrofa*) in the English countryside: a risk assessment. Report to the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central Science Laboratory, York

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Hupfer C., H. Hotzel, K. Sachse, F. Moreano, und K.-H. Engel. 2000. PCR-based quantitation of genetically modified Bt-maize: single-competitive versus dual-competitive approach. *European Food Research and Technology* 212: 95-99.

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

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

James, C. 2004. Preview: Global status of commercialised biotech/GM crops: 2004. ISAAA: Ithaca, NY, USA. ISAAA Briefs 32.

Janinhoff A. 1997. Mais: Zahlen und Fakten. *Mais* 25: 137-139.

Jennings, J.C., D.C. Kolwyck, S.B. Kays, A.J. Whetsell, J.B. Surber, G.L. Cromwell, R.P. Lirette, und K.C. Glenn. 2003 a. Determining whether transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein are detectable in muscle from swine fed Roundup Ready soybean meal. *Journal of Animal Science* 81: 1447-1455.

Jennings, J.C., A.J. Whetsell, N.R. Nicholas, B.M. Sweeney, M.B. Klaften, S.B. Kays, G.F. Hartnell, R.P. Lirette und K.C. Glenn. 2003 b. Determining whether transgenic or endogenous plant DNA is detectable in dairy milk or beef organs. *Bulletin 383/2003 of the International Dairy Federation*: 41-46.

Jennings, J.C., L.D. Albee, D.C. Kolwyck, J.B. Suber, M.L. Taylor, G.F. Hartnell, R.P. Lirette und K.C. Glenn. 2003. Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard Corn borer corn. *Poultry Science* 82: 371-380.

Kerlan, M.C., A.M. Chevre, F. Eber, J. Botterman und W. DeGreef. 1991. Risk assessment of gene transfer from transgenic rapeseed to wild species in optimal conditions. In *Proceedings of GCIRC 8th International Rapeseed Congress*, pp. 1028 – 1033. Saskatoon, Canada.

Kharazmi, M., T. Bauer, W.P. Hammes und C. Hertel. 2003. Effect of food processing on the fate of DNA with regard to degradation and transformation capability in *Bacillus subtilis*. *Systematic and Applied Microbiology* 26: 495-501.

Kindinger, B. und C.L. Dewald. 1997. The reproductive versatility of eastern gamagrass. *Crop Science* 37: 1352-1360.

Kirchgessner, M. 1997. *Tierernährung*. 10. Aufl., Verlags Union Agrar, DIG-Verlags-GmbH, Frankfurt am Main. 582 S.

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

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

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

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

Krieg, A. 1986. *Bacillus thuringiensis*, ein mikrobielles Insektizid, Grundlagen und Anwendung. Acta Phytomedica 10, Beiheft zur Phytopathologischen Zeitung. Paul Parey, Berlin und Hamburg.

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

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

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

Lutz, B., S. Wiedemann und C. Albrecht. Degradation of transgenic Cry1Ab DNA and protein in maize during the ensiling process. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (in press; 2005 b).

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

Lutz B., C. Albrecht und H.H.D. Meyer. 2005 d. Transgener Mais als Futtermittel - Fragen der Produktsicherheit bei Fleisch und Milch. Deutsche Molkerei Zeitung 126: 30-33.

Mackin, R. 1970. Dynamics of damage caused by wild boar to different agricultural crops. Acta Theriologica 15: 447-458.

Mayer, J. und K. Rutzmoser. 1999. Einsatz von Silomais herkömmlicher Sorten und der gentechnisch veränderten Bt-Hybriden in der Rinderfütterung: - bei Milchkühen. Maiskolloquium 12: 36-39.

Matsuoka, T., H. Kuribara, K. Takubo, H. Akiyama, H. Miura, Y. Goda, Y. Kusakabe, K. Isskiki, M. Toyoda und A. Hino. 2002. Detection of Recombinant DNA Segments Introduced to Genetically Modified Maize (*Zea mays*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 2100 – 2109.

Mc Allan, A.B. 1980. The degradation of nucleic acids in, and the removal of breakdown products from the small intestines of steers. British Journal of Nutrition 44: 99-112.

Mc Allan, A.B. 1982. The fate of nucleic acids in ruminants. Proceedings of the Nutrition Society 41: 309-317.

Nielson, K.M., J.D. van Elsas und K. Smalla. 2000. Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 (pFG4DntpII) with transgenic plant DNA in soil microorganisms and effects of kanamycin on selection of transformants. Applied and Environmental Microbiology 66: 1237-1242.

Olsen, K.M. und J.C. Daly. 2000. Plant-toxin interactions in transgenic Bt Cotton and their effect on mortality of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Entomological Society of America 93 1293-1299.

Palm, C.J., K.K. Donegan, D. Harris und R.J. Seidler. 1994. Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki δ -endotoxin from transgenic plants. Molecular Ecology 3: 145-151.

Pekrun, C.P., J.W. Lutman und K. Baeumer. 1998. Research on volunteer rape. A review. Pflanzenbauwissenschaften 2: 84-90.

Phipps, R.H. und D.E. Beaver. 2000. New technology: Issues relating to the use of genetically modified crops. Journal of Animal and Feed Sciences 9: 543-561.

Phipps, R.H., E.R. Deaville und B.C. Maddison. 2003. Detection of transgenic and endogenous plant DNA in rumen fluid, duodenal digesta, milk, blood and feces of lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 86: 4070-4078.

Poms R.E., J. Glössl und H. Foissy. 2001. Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat. *European Food Research and Technology* 213: 361-365.

Poms R.E., W. Hochsteiner, K. Luger, J. Glössl und H. Foissy. 2003. Model Studies on the detectability of genetically modified feeds in milk. *Journal of Food Protection* 66: 304-310.

Prudhomme, M., V. Libante und J.P. Claverys. 2002. Homologous recombination at the border: insertion-deletions and the trapping of foreign DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99: 2100-2105.

Ramsay, G., C.E. Thompson, S.J. Neilson und G. Mackay. 1999. Honeybees as vectors of GM oilseed rape pollen. 1999 BCPC Symposium Proceedings No 72. *Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops*: 209-214.

Redenbaugh, K., T. Berner, D. Emlay, B. Frankos, W. Hiatt, C. Houck, M. Kramer, L. Malyj, B. Martineau, N. Rachman, L. Rudenko, R. Sanders, R. Sheehy, und R. Wixtrom. 1993. Regulatory issues for commercialization of tomatoes with an antisense polygalacturonase gene. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 29: 17-26.

Redenbaugh, K. und J. Lindemann. 1994. Safety determination of the kanr marker gene for use in tomato, cotton and oilseed rape. *Biosafety of Foods Derived by Modern Biotechnology. Proceedings Basel Forum on Biosafety 18 October 1994. Switzerland, BATS*: 23-34.

Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC *Official Journal L* 268 18/10/2003: 24-28

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

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

Reuter, T., K. Aulrich, A. Berk und G. Flachowsky. 2001. Nutritional evaluation of Bt-corn in pigs. *Journal of Animal Science* 79 (Suppl. 1): 260. Abstract 1073.

Sanderson, H.-Y.J.R. und W.A. Walker. 1994. Uptake, transport and metabolism of exogenous nucleosides in intestinal epithelial cell cultures. *Journal of Nutrition* 124: 1942-1949.

Saxena, D. und G Stotzky. 2001. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. *American Journal of Botany* 88: 1704-1706.

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

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

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

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

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

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

Steward Jr. N.C., M.D. Halfhill und S. Warwick. 2002. Gene flow ant its consequences: *Brassica napus* (canola, oilseed rape) to wild relatives. Gene flow workshop, The Ontario State University, March 2002: 106-112.

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

Theunis, W., R.M. Aguda, W.T. Cruz, C. Decock, M. Peferoen, B. Lambert, D.G. Bottrell, F.L. Gould, J.A. Litsinger und M.B. Cohen. 1998. *Bacillus thuringiensis* isolates from the Philippines: habitat distribution, δ -endotoxin diversity, and toxicity to rice stem borers (Lepidoptera: Pyralidae). Bulletin of Entomological Research 88: 335-342.

Vázquez-Padrón, R.I., J. Ganzáles-Cabrera, C. García-Tovar, L. Neri-Bazan, R. Lopéz-Revilla, M. Hernández, L. Moreno-Fierro und G.A. de la Riva. 2000. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. Biochemical and Biophysical Research Communications 271: 54-58.

Walschus, U., S. Witt und C. Wittmann. 2002. Development of monoclonal antibodies against Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* and their application in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of transgenic Bt-maize. Food and Agricultural Immunology 14, 231-240.

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

Wiedemann, S., B. Lutz, H. Kurtz, F. Schwarz und C. Albrecht. *In situ* study on the time-dependent degradation of recombinant maize DNA und protein in the bovine rumen. Journal of Animal Science (submitted; 2005)

Wilkes, H.G.1972. Maize und its wild relatives. Science 177: 1071-1077.

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

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

ANHANG

DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themengebietes möchte ich mich bei den Professoren Dr. Dr. H. H. D. Meyer und Dr. Dr. R. Einspanier bedanken sowie bei Dr. C. Albrecht für die Unterstützungen während der Promotion, insbesondere beim Erstellen der Publikationen und dieser Arbeit. Professor Dr. O. Rottmann, Professor F. Schwarz, PD Dr. R. Kühn, Dr. B. Killermann und J. Mayer danke ich für die fachliche und logistische Unterstützung. Im weiteren gilt mein Dank S. Wiedemann und A. Hodina für ihr hilfreiches Mitwirken an dieser Arbeit.

T. Stelzl, W. Schmidt, C. Fochtmann, I. Celler und M. Partsch sowie allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Physiologie sei Dank für ihr Engagement, ihre Unterstützung und die Vermittlung ihres methodischen Wissens. M. Schmidt (Versuchstation Thalhausen), C. Gerschlager (Fachgebiet für Wildbiologie und Wildtiermanagement), S. Mosch (Institut für Pflanzenbau & Pflanzenzüchtung, LfL Freising), A. Lange und D. Nöbel (Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft, LfL Grub) möchte ich für tatkräftige Unterstützung während der Wildtierstudien danken. Bei H. Kurtz vom Arbeitsbereich Tierernährung möchte mich für die Einweisung zum Umgang mit fistulierten Rindern und Durchführung des *in situ* Versuches bedanken.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Physiologie möchte ich für das gute Arbeitsklima herzlich danken.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 18. Februar 1966
Geburtsort: Werneck
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1972 – 1978 Volksschule Hassfurt
1978 – 1982 Staatliche Realschule Hassfurt
Mittlere Reife
1982 – 1985 Fachoberschule Schweinfurt
Fachhochschulreife
1992 – 1993 Gymnasium Vechta
Hochschulzugangsberechtigung

Studium

09/1995 – 07/1997 Staatlich geprüfter Umweltschutztechniker
Technikerschule Bremen
04/1998 – 10/2001 Studium der Biologie, Diplom
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
Diplomarbeit:
Genetische Präpositions-faktoren bei HIV-Infektion und AIDS
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg,
Ludwig-Maximilians-Universität München
Labor für Medizinische Genetik, Martinsried

Promotion

01/2003 – 06/2005 Lehrstuhl für Physiologie, Technische Universität München, Freising

Projektmitarbeit

Spore-forming sulphate reducers closely related to the genus *Sporomusa* dominate the culturable fraction in the sediments of an oligotrophic lake

AG Paläomikrobiologie, Institut für Chemie und Biologie des Meeres, Oldenburg

Characterization of bacteria and their activities in up to 120.000 year old sapropels of the eastern Mediterranean Sea

AG Paläomikrobiologie, Institut für Chemie und Biologie des Meeres, Oldenburg

Untersuchung von mikrobiellen Gemeinschaften aus der östlichen Nordsee, dem Skagerrak und dem Kattegatt

Forschungsinstitut und Naturkundemuseum Senckenberg, Wilhelmshaven

Eliminierung von Tumorzellen durch C1D-vermittelte Apoptose

Rubicon AG cancer-care-company, München

Eigene Publikationen

Marquardt J, **Lutz B**, Wans S, Riel E, Krummbein W: The gene family coding for the light-harvesting polypeptides of photosystem I of the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Photosynthesis Research* 68, 121-130 (2001)

Bogner J, **Lutz B**, Klein H-G, Troendle U, Goebel F-D: Association of highly antiretroviral therapy failure with chemokine receptor 5 wild type. *HIV Medicine* 5, 264-272 (2004)

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

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

Lutz B, Albrecht C, Meyer H.H.D: Transgene Futtermittel – Einfluss auf Milch? Eine wissenschaftliche Bewertung. *Deutsche Molkerei Zeitung* 126, 30-33 (2005)

Lutz B, Wiedemann S, Albrecht C: Degradation of transgenic maize DNA and Cry1Ab protein in the course of the ensiling process. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (in press)

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

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

PUBLIKATIONSBEITRAG

Einspanier, R., **B. Lutz**, S. Rief, O. Bereziene, W. Schwarz, J. Mayer.

Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize.

European Food Research and Technology 218: 269-273 (2004)

Ralf Einspanier · Bodo Lutz · Stefanie Rief ·
Oksana Berezina · Vladimir Zverlov ·
Wolfgang Schwarz · Johann Mayer

Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize

Received: 7 October 2003 / Published online: 12 December 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract The aim of this study was to trace selected nucleic acid and protein components of isogene versus Bt transgene maize within the bovine gastrointestinal tract (GIT). After feeding 22 cattle for 4 weeks with Bt176 maize, different plant genes and the recombinant protein CryIAb were quantified during digestion. Furthermore, a first initial characterization of rumen bacteria was approached, using 16rDNA gene sequencing comparing isogene- against transgene-fed animals. Ingesta samples of different GIT sections (rumen, abomasum, jejunum, colon) were analysed for chloroplast, maize invertase, zein and Bt toxin (CryIAb) gene fragments using quantitative real-time PCR. First, the initial gene dose of these maize genes was detected in maize silage. During digestion, a significant reduction of high-to-medium abundant plant gene fragments was shown depending on the dwell-time and the initial gene copy number. Immunoreactive CryIAb protein was quantified by ELISA in intestinal samples indicating a significant loss of that protein. Remarkable amounts of Bt toxin were found in all contents of the GIT and the protein was still present in faeces. For the first time, the influence of CryIAb transgene maize on rumen bacterial microflora was investigated compared to isogene material through analysis of 497 individual bacterial 16S rDNA sequences. In

principle, specific bacterial leader-species could be identified in all bovine rumen extracts, but no significant influence of Bt176 maize feed was found on the composition of the microbial population. This investigation provides supplementing data to further evaluate the fate of novel recombinant material originating from transgene feed or food within the mammalian GIT.

Keywords Bt maize · Cattle · Intestinal tract · CryIAb protein · Plant DNA

Introduction

Genetically modified organisms (GMOs) such as insect-resistant Bt maize have been introduced in the food and feed market. Meanwhile the necessity of elucidating food and feed composition, origin and potential genetic modifications of such novel components has led to numerous research activities to prevent any risk to consumers. Based on the European novel food and feed regulation, a threshold of 0.9% transgene material within food and feed has been defined to require labelling of the concerned product. Most scientific effort has therefore focused on supplying technologies for quantifying recombinant material within food material [1]. However, the biological or physiological effects of transgene feed on target animals are difficult to study and have rarely been reported. As long as only sparse information about the fate of GMO during gastrointestinal passage of the farm animal is available, such experiments have to deal with highly complex circumstances. As proven in recent studies, the conventional opinion assuming the complete degradation of food or feed DNA into mononucleotides during digestion needs to be revised. Feed DNA fragments of about 200 bp have been shown to attain the bovine blood cells [2, 3], and even larger fractions of foreign DNA were found in rodent cells after feeding [4, 5, 6, 7]. For a well-founded risk-estimation, detailed information about the fate and influence of recombinant molecules (DNA and protein) during their passage

R. Einspanier (✉)
Institute of Veterinary Biochemistry,
Free University of Berlin,
Oertzenweg 19b, 14163 Berlin, Germany
e-mail: einspani@zedat.fu-berlin.de
Tel.: +49-30-83-86-2575

B. Lutz · S. Rief
Institute of Physiology, TUM, Freising, Germany

O. Berezina
Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Russia, Russia

V. Zverlov · W. Schwarz
Institute of Microbiology, TUM, Freising, Germany

J. Mayer
Bavarian State Research Center for Agriculture, Poing, Germany

through the gastrointestinal tract (GIT) should be made available. Furthermore, knowledge of the endogenous degradation of foreign genetic material is the prerequisite to estimating a potential horizontal gene flow from feed towards e.g. microorganisms in the intestinal tract. The main focus of this study was on the fate of feed material during passage through different sections of the bovine GIT. Real-time PCR serves as the main analytical method for detection and quantification of GMOs in food as recommended earlier [8, 9] and was introduced here to quantify absolutely plant and transgene DNA within the cattle GIT. Plant genes with varying genomic copy numbers have been used as candidates to trace the concentration-dependent survival during ruminant digestion. In parallel, the recombinant CryIAb protein was quantified during the experiments to determine the degradation of a recombinant protein during digestion. In the last part of this study a first comparison and characterization of the bacterial microflora from the rumen of cows fed with silage of isogene or Bt176 transgene maize was performed, introducing a random genetic typing using 16S rDNA PCR, construction of gene libraries, sequencing and a phylogenetic evaluation. The aim was to monitor the possibility of either a foreign gene transfer from transgenic maize to rumen bacteria, or a change in the bacterial population. Therefore, this study elucidates the presence and concentration of plant DNA and transgene molecules from ingestion to excretion in cattle, as well as investigating for the first time the rumen bacterial population, screening for probable GM-feed-induced events.

Material and methods

Animals and diets. Two different breeds of corn (isogene: Antares, transgene: Navares, Syngenta) were planted, grown and processed to silage. Authentic samples were taken at harvest (hackled corn) as well as from silage. The isogene material was always processed first to avoid any cross-contamination. During a 4-week feeding experiment 22 cows were treated as follows: 11 animals were fed

with the isogene Antares and the remainder (11) with silage of the transgene counterpart Navares. The daily diet contained 88.5% corn-silage, 2% barley-straw, 4.5% wheat, 4.5% rape-bruised grain extract and 0.5% mineral feed. Each cow was fed 19 kg of corn-silage in a total feed ration of 21.5 kg per day. After the feeding period, the cows were slaughtered and samples taken from different parts of the GIT: juices of rumen, abomasum, jejunum and colon, as well as intestinal epithelium were quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C until further analysis. Blood and faeces samples were taken frequently during the whole experiment.

CryIAb protein measurement. The Bt-CryIAb/1Ac-ELISA (Agdia, Elkhart, Ind., USA) was carried out according to the manufacturer's instructions. Frozen samples (0.2 g) were ground using the FastPrep-System (Bio101, Carlsbad, Calif., USA) with 1.0 g of Green Bulk Matrix (6 m/s, 40 s) and finally dissolved in 1 ml MEB extraction buffer. For standards, a commercial control Bt-protein was introduced as follows: 0.015, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 and 1.6 ng/ml. All samples were measured in duplicate showing an intra assay variation of 6.3% and an inter assay variation of 10.4% ($n=8$). The total protein content of each sample was determined using the bicinchoninic acid assay as described in [10].

DNA isolation. DNA was isolated from the different sample materials either for detection of feed gene fragments or for construction of the bacterial 16S gene library as follows.

Samples of feed (100 mg), ingesta or bovine tissue were extracted using a combined method introducing the FastPrep (FP120) shaker (Q-Biogene, Heidelberg, Germany) with lysing matrix (Q-Biogene) and 600 μL of nucleospin lysis buffer for 40 s (level 5.5) followed by the Nucleospin plant extraction kit protocol (Macherey & Nagel, Düren, Germany). The 16S rDNA libraries were constructed using DNA templates isolated from rumen contents with the Nucleospin Plant Kit, which was tested and found most suitable in preceding experiments yielding unfragmented DNA. The quantity and quality of the resulting DNA was measured by photometric determination at OD 260/280.

PCR analysis. Amplification of specific gene fragments using conventional PCR (Amp-R, 16S rDNA) was carried out as described previously [2].

For quantifying specific plant genes, a real-time cycler (Light-Cycler, Roche, Mannheim, Germany) was used: the SybrGreen technique as described elsewhere [11]. In brief, the Fast Start SybrGreen Master Mix (Roche; 10 μL total volume) was used to amplify 90 ng or 60 ng of sample DNA as indicated: initial denaturation at 95°C for 10 min, 45 cycles of amplification at 95°C for 15 s, annealing 10 s (for plant 2, 60°C ; invertase (ivr)1, 65°C ; zein, 60°C ; CryIAb, 58°C), and elongation at 72°C for

Table 1 Primers used for PCR amplification and detection of specific genes. SMT Specific melting temperature during real-time PCR

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Product/ modification	Quotation EMBL Acc. Nr.	SMT ($^{\circ}\text{C}$)
Plant 2	plant 2 for plant 2 rev	GGA AGC TGT TCT AAC GAA TCG CTC GAA AAC AAT GAA TTG AAG G	199 bp	[2]	74
Invertase	ivr1 for ivr1 rev	CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC C GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C	226 bp	[17] U161231	93
Zein	zein for zein rev	AGT GCG ACC CAT ATT CCA G GAC ATT GTG GCA TCA TVA TTT	275 bp	[18] M235371	88
CryIAb	cry 03 cry 04 176 FL 176 LC	CTC TCG CCG TTC ATG TCC GT GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT GGG GTG TAG CCG GTC TCG ATG C-X X-TCG CCG CCC AGC ACC TCC AC	211 bp	[19]	
16S rDNA	616V 630R	AGA GTT TGA TYM TGG CTC CAK AAA GGA GGT GAT CC	1,490 bp	[20]	
AmpR	Ap1 Ap2	TAT TCA ACA TTT CCG TGT CGC TTT CGT TCA TCC ATA GTT GCC	810 bp	AF427133	

25 s. Finally, a melting curve analysis was performed (95 °C/5 sec, 60 °C/10 s with continuous heating until 99 °C) verifying the specificity of PCR products. Dilutions of known concentrations of corresponding purified PCR fragments served as external standard curves. The resulting PCR products were sequenced to confirm authenticity (Table 1).

16S rDNA clone libraries. Primer pair 616V and 630R was used with the “puReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads” (Amersham) under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 20 cycles of denaturation at 94 °C for 20 s, annealing at 50 °C for 30 s, and elongation at 72 °C for 2.5 min (Table 1). The obtained fragments of about 1,490 bp were ligated to TA-cloning vectors (Invitrogen, USA) to construct gene libraries. A total of 576 clones were isolated from four libraries and sequenced commercially (MediGenomics, Munich, Germany).

Statistical analysis. The Mann-Whitney U-test was performed to compare the quantity of specific gene detection (plant 2, zein, ivr, CryIAb) in any material comparing iso- and transgene with each other as well as quantities in different sections of the GIT. Values are presented as means ± standard error, SEM at different levels of significance (*P*). All reference sequences obtained from the GenBank database were aligned and the artificial phylogenetic tree was created using the ARB program package (<http://www.arb-home.de/>) developed at the Institute for Microbiology, TUM.

Results and discussion

Quantification of maize DNA in fresh and ensilaged material

To assess the fate of plant DNA during feed processing and digestion, various genes were quantified in material provided from isogene or transgene hackled maize directly after harvest, 4-week-old silage and ingesta of cattle. Marker genes with different copy numbers were selected to elucidate the effect of various initial gene doses: a chloroplast-specific amplicon (plant 2) with high copy number (>1,000 copies/cell [12]), ivr and zein with medium-abundant copy numbers and CryIAb representing a proposed single copy gene. Absolute quantities of such genes were initially measured in fresh compared with ensilaged maize through real-time PCR and statistically evaluated. The concentrations of specific plant DNAs decreased remarkably during the ensiling process to 1.3–3% of the starting material, supporting previous findings [13]. The final DNA concentration decreased more rapidly when correlated with the starting copy number of the investigated gene (plant 2, 30.98 fg:0.98 fg per 60 ng total DNA; ivr, 1.76 fg:0.04 fg per 60 ng total DNA; zein: 0.6 fg:0.008 fg per 60 ng total DNA). No quantitative difference of these maize genes was observed between the isogene and transgene group. The single copy gene CryIAb, representing the genetic modification of Bt176 maize, was also present in silage (CryIAb 1.97 fg in fresh:0.06 fg in silage per 60 ng total DNA). However, AmpR DNA could not always be reliably quantified in transgene silage material because of unspecificity of the amplicon (inherent melting curves). Due to varying numbers of plastids within each plant cell, the absolute amount of chloroplast-specific fragments appeared some-

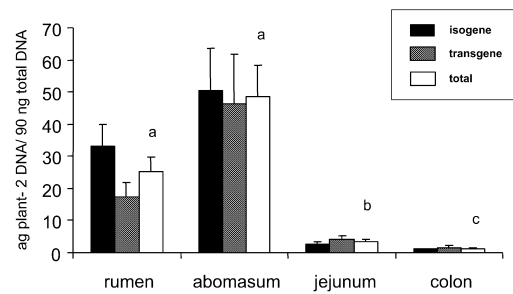


Fig. 1 Degradation of ubiquitous plant chloroplast DNA in intestinal juice of cattle. Different letters (*a*, *b*, *c*) indicate significant differences between the columns ($P < 0.05$)

what lower than expected indicating a varying predictability of final foreign gene doses within animal products.

Quantification of plant genes in the GIT of cows

The amount of plant 2 DNA fragments in rumen ingesta and abomasum ingesta was significantly higher than that in chyme of jejunum or colon (Fig. 1, $P < 0.001$). Thus, in the last section of the GIT (colon), significantly lower plant 2 DNA was detectable. No statistically significant differences between the isogene- and transgene-maize-fed group was observed. Reliable quantification of any chloroplast DNA fragments in faeces was not possible due to reaching the detection limit and the generation somehow of unspecific amplicons. Similar problems arose while attempting the quantification of low copy (ivr, zein) or single copy (CryIAb, AmpR) genes and did not lead to utilizable results. These findings correspond well with earlier published data [3, 14, 15], showing that only chloroplast DNA, but not recombinant low copy genes were detectable in the GIT of pigs. Summarized, a detection of high-copy genes in ingesta of different sections of herbivore GIT is possible, whereas we were not able to reliably quantify low-abundant genes in the GIT of cows using real-time PCR.

To monitor the presence of Bt176 maize-derived recombinant ampicillin resistance (AmpR) DNA in rumen samples referring to a possible horizontal gene transfer, an AmpR-specific 810 bp fragment was used in a conventional PCR setup. However, trace amounts of that antibiotic resistant gene present in the transgenic Bt construct were amplified from all rumen samples, including samples from the isogene-fed cows and from total DNA of isogenic maize silage (Fig. 2). This surprising result was repeatedly observed with a number of variations in experimental conditions and controls. It could be shown that all amplified AmpR sequences were identical within the sequencing error rate with the ubiquitous AmpR gene, which is present in the majority of the cloning vectors. A contamination during the extraction or PCR set-up can be excluded due to negative controls. Further experiments must take into account such

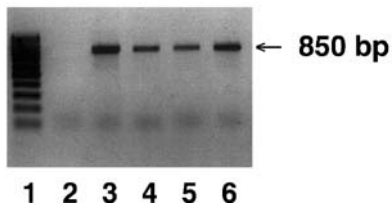


Fig. 2 Detection of AmpR gene fragments in different samples by PCR. 1 100 bp DNA ladder, 2 control without DNA, 3 rumen juice DNA from animals fed Bt176, 4 rumen juice DNA from animals fed isogene maize, 5 isogene maize silage DNA, 6 transgene maize silage DNA. Inverted image, 42 PCR cycles

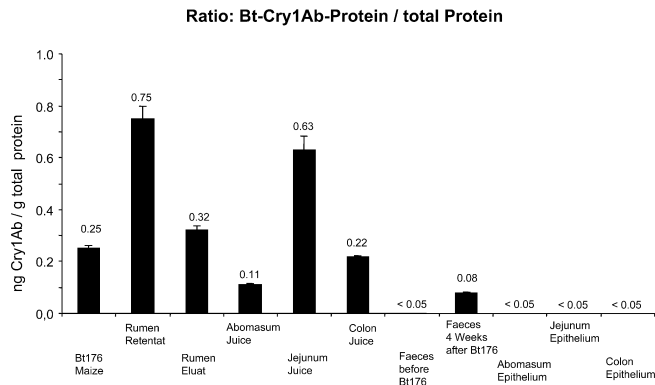


Fig. 3 Quantification of immunoreactive CryIAb protein during the intestinal passage in Bt176 maize-fed cattle. Numbers over the bars indicate the absolute CryIAb protein concentration

a probable general distribution of AmpR genes through e.g. using PCR primers specific for regions flanking the AmpR construct in the transgene plant genome to verify the forage plant origin of the resulting amplicon. However, the unreliable detection of even high-copy genes (plant 2) in bovine faeces may indicate a very low risk of spreading probably functional recombinant genes into the environment.

CryIAb protein in the GIT of Bt maize fed cattle

Immunoreactive CryIAb protein could be detected in different concentrations only in the intestinal juice of the transgene-fed cattle (Fig. 3). However, in the extensively washed intestinal epithelia the CryIAb protein was not detectable, in agreement with a recently published observation [16]. All faeces samples investigated were found somewhat positive for immunoreactive Bt toxin, but near the detection limit of the assay. Corresponding samples from isogene-fed cattle were always found to be negative; therefore any antibody cross-reactivity toward animal, microbial or plant components can be excluded. Approximately 4.3 ng CryIAb protein/g rumen sample (=0.75 ng/g total protein) was found. Calculating the total amount of the daily maize intake, an absolute amount of about 21–148 mg of immunopositive CryIAb protein can

still be expected in the rumen after a routine Bt176 maize feeding. It cannot be excluded that the conformation of the inactive recombinant CryIAb protein may resist a rapid decomposition of its relevant immunological recognition sites. During the passage of the ingesta through the different sections of the GIT the CryIAb protein concentration was astonishingly rising, probably due to water elimination. In faeces, the immunoreactive Bt toxin concentration was still about 0.08 ng/g total protein, calling into question the complete degradation of that protein during the bovine digestion process. Therefore, a potential distribution of Bt protein fragments on fields may be feasible considering the routine spreading of manure in e.g. dairy farms, and should be addressed in future studies. Any remaining biological effect of the digested Bt toxin can only be the subject of speculation.

Generation and identification of bacterial 16S rDNA libraries from cattle rumen

Bacterial 16S fragments of about 1,490 bp were used for the construction of specific gene libraries either from isogene- or transgene-fed cattle. A total of 497 sequences (273 isogene and 224 transgene), obtained from a PCR-amplified clone library of four individual animals (two isogene, two transgene), were analysed in detail. Each single sequence was screened for the most-related known 16S rRNA members in two databases (Genbank and ARB). Although an exact 16S rDNA sequence correspondence with a defined species was found for none of the obtained sequences, nearest relatives with defined species name were identified in the phylogenetic tree of ARB. In general, species definition requires sequence similarities greater than 98%, but most of the new sequences had a value below this with a most-related defined species. Therefore a classification of “artificial taxonomic groups” (ATG) was constructed. Only 28 sequences from our libraries could be assigned within the 98% rule to a defined “species”. This reflects the great diversity of the microbiota in the rumen of cows.

Since for a majority of the sequences the similarity was too low to allocate them with a reasonable degree of confidence to the corresponding taxa, a phylogenetic analysis was performed to clarify their taxonomic position. The artificial phylogenetic tree of microorganisms from both libraries, and differences in rumen microflora composition between rumen contents from cattle fed either isogene or transgene maize are shown in Fig. 4. The majority of the homologous sequences derived from unidentified, uncultured rumen bacteria, giving an impression of their unlimited variability. All bacteria usually prevalent in rumen were also found to be prevalent in our data sets. Finally, no statistically significant differences between transgenic and isogenic rumen samples were observed. This observation does not indicate for any remarkable effect of Bt transgene maize silage on the rumen bacterial population in cattle fed for a month. To elucidate the potential risk of a horizontal gene transfer from genetically modified plants into non-target organisms, e.g. rumen microbes, will not be easy even if highly sophisticated methods are introduced. Taking into ac-

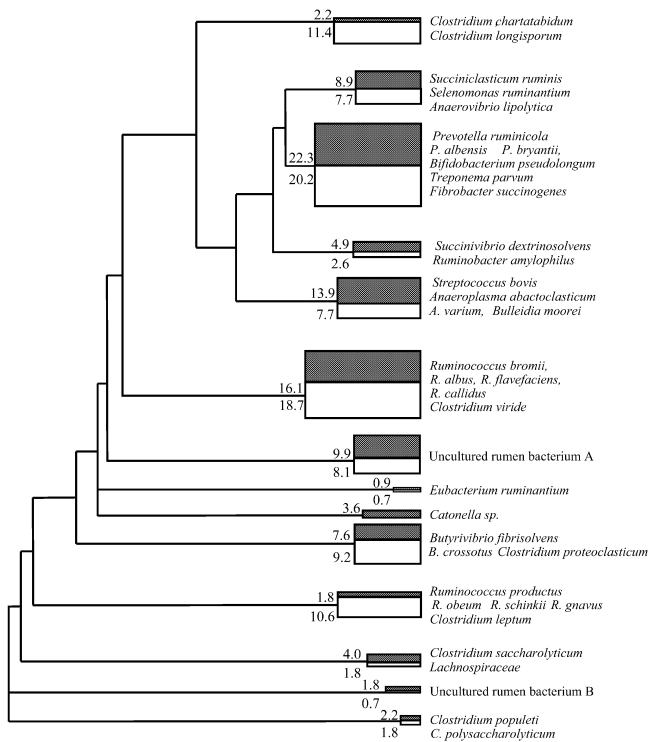


Fig. 4 Species comparison of the bacterial rumen population identified using 16S rDNA sequences. Similarity tree of 16S rDNA sequences obtained from bovine rumen DNA. The sequences were grouped by relatedness to known reference sequences [artificial taxonomic groups (ATGs)]; the relative depth of the branching is indicated at the left border of the box. The width of the boxes indicates the relative number of sequences contained: grey box transgene-fed cows, open box isogene-fed cows. Reference strains of these ATGs are named

count our results, the widespread ampicillin resistance (AmpR) gene will not serve as a suitable target gene for that purpose.

To conclude, depending on the initial copy number of foreign feed genes ingested, DNA will rapidly be degraded within the more caudal bovine intestinal organs. Gene fragments of high-abundant plant genes were not found in bovine faeces. However, the fate of the recombinant CryIAb protein is somewhat different: remarkable concentrations are not only present in all GIT samples, but traces are still found in faeces. Significant differences in the rumen microbiota population between isogene- and transgene-fed cows could not be distinguished after a 4-week feeding period. If searching for the AmpR gene, it must be recognized that natural or even recombinant bacteria containing such genes may be ubiquitous in many environments and will override the specific signal expected from the Bt176 maize. To date, no specific biological risks of feeding

transgene Bt176 maize to cattle have been discovered in short-term experiments, either for the animals or the consumers health when using such transgene-derived cattle products.

Acknowledgement This study was supported by the BMBF project 01K0-31P2614. The authors gratefully acknowledge the skilful assistance and help of Stefanie Schiebe, Tamara Steltzl, Inge Celler (Freising), Rutzmoser and Steinberger (Grub).

References

- van Duijn GJ, van Biert R, Bleeker-Marcelis H, van Boeijen I, Ada AJ, Jhakrie S, Hessing M (2002) JAOAC Int 85:787–791
- Einspanier R, Klotz A, Kraft J, Aulrich K, Poser R, Schwägele F, Jahreis G, Flachowsky G (2001) Eur Food Res Technol 212:129–134
- Klotz A, Mayer J, Einspanier R (2002) Eur Food Res Technol 214:271–275
- Doerfler W, Schubbert R (1998) Wien Klin Wochenschr 110:40–44
- Schubbert R, Renz D, Schmitz B, Doerfler W (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:961–966
- Doerfler W, Schubbert R, Heller H, Kämmer C, Hilger-Eversheim K, Knoblauch M, Remus R (1997) Tibtech 15:297–301
- Doerfler W (2000) Foreign DNA in mammalian systems. Wiley-VCH, Weinheim, New York
- Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H, Van Den Eede G (2002) Eur Food Res Technol 214:3–26
- Vaitilingom M, Pijnenburg H, Gendre F, Brignon P (1999) J Agric Food Chem 47:5261–5266
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Anal Biochem 150:76–85
- Klaften M, Whetsell A, Webster J, Grewal R, Fedyk E, Einspanier R, Jennings J, Lirette R, Glenn K (2004) Development of PCR methods to detect plant DNA in animal tissue. In: Bhalgat MM, Ridley W P, Felsot A S, Seiber J N (eds) Agricultural biotechnology: challenges and prospects. ACS Symposium Series 866, American Chemical Society, Washington D.C., pp 83–99
- Bendich AJ (1987) BioEssays 6:279–282
- Hupfer C, Meyer J, Hotzel H, Sachse K, Engel K-H (1999) Eur Food Res Technol 209:301–304
- Chiter A, Forbes M, Blair GE (2000) FEBS Lett 481:164–168
- Aumaitre A, Aulrich K, Chesson A, Flachowsky G, Piva G (2002) Livestock Prod Sci 74:223–238
- Chowdhury EH, Shimada N, Murata H, Mikami O, Sultana P, Miyazaki S, Yoshioka M, Yamanaka N, Hirai N, Nakajima Y (2003) Vet Hum Toxicol 45:72–75
- Ehlers B, Strauch E, Goltz M, Kubsch D, Wagner H, Maidhof H, Bendiek J, Appel B, Buhk H-J (1997) Bundesgesundheitsblatt 40:118–121
- Studer E, Dahinden I, Lüthy J, Hübner P (1997) Mitt Geb Lebensmittelunters Hyg 88:515–524
- Hupfer C, Hotzel H, Sachse K, Engel K-H (1998) Z Lebensm Unters Forsch A 206:203–207
- Loy A, Lehner A, Lee N, Adamczyk J, Meier H, Ernst J, Schleifer KH, Wagner M (2002) Appl Environ Microbiol 68:5064–81

PUBLIKATIONSBEITRAG

Lutz, B., S. Wiedemann, R. Einspanier, J. Mayer und C. Albrecht.

Degradation of Cry1Ab-protein from genetically modified maize in the bovine gastrointestinal tract.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:1453-1456 (2005 a)

Degradation of Cry1Ab Protein from Genetically Modified Maize in the Bovine Gastrointestinal Tract

BODO LUTZ,[†] STEFFI WIEDEMANN,[†] RALF EINSPIANIER,[§] JOHANN MAYER,[#] AND
 CHRISTIANE ALBRECHT^{*,†}

Physiology Weihenstephan, Technical University Munich, Weihenstephaner Berg 3,
 D-85350 Freising, Germany; Institute of Veterinary Biochemistry, Free University of Berlin,
 Oertzenweg 19b, D-14163 Berlin, Germany; and Bavarian State Research Center for Agriculture,
 Prof.-Dürnwächter-Platz 1, D-85586 Poing, Germany

Immunoblotting assays using commercial antibodies were established to investigate the unexpected persistence of the immunoactive Cry1Ab protein in the bovine gastrointestinal tract (GIT) previously suggested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Samples of two different feeding experiments in cattle were analyzed with both ELISA and immunoblotting methods. Whereas results obtained by ELISA suggested that the concentration of the Cry1Ab protein increased during the GIT passage, the immunoblotting assays revealed a significant degradation of the protein in the bovine GIT. Samples showing a positive signal in the ELISA consisted of fragmented Cry1Ab protein of approximately 17 and 34 kDa size. Two independent sets of gastrointestinal samples revealed the apparent discrepancy between the results obtained by ELISA and immunoblotting, suggesting that the antibody used in the ELISA reacts with fragmented yet immunoactive epitopes of the Cry1Ab protein. It was concluded that Cry1Ab protein is degraded during digestion in cattle. To avoid misinterpretation, samples tested positive for Cry1Ab protein by ELISA should be reassessed by another technique.

KEYWORDS: ELISA; Cry1Ab protein; genetically modified plants; feed analysis; feeding experiments; immunoblotting; digestion

INTRODUCTION

The recent regulation 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of the European Union on genetically modified food and feed comprised the traceability and labeling of genetically modified organisms (GMO) as well as the survey of food and feed products produced from GMO (1). The implementation of these aspects in European law and the further planned licensing of GMO food and feed by the European Community have provoked a strong public discussion about the pros and cons of genetically modified plants, especially with regard to their safety for the consumer. Genetically modified plants such as maize will increasingly be used not only as nutritional components or feed source for farm animals but also for human consumption (2). Bt-maize has been genetically modified to express an insecticidal crystal protein called a Cry protein (for example, Cry1Ab protein) from *Bacillus thuringiensis* (3). The modified plant produces this larvicidal toxin against lepidopteran pests, especially the European corn

borer (*Ostrinia nubilalis*). Recently, case studies investigating the fate of plant DNA (4–8) and Cry1Ab protein (9, 10) in farm animals and rodents were reported. These studies revealed an apparent persistence of the Cry1Ab protein immunoactivity in the bovine gastrointestinal tract (GIT). Analyses performed with a commercially available enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) suggested that Cry1Ab protein accumulated in the course of the GIT passage. As no traces of Cry1Ab protein in animals fed isogenic maize were detected, potential cross-reaction of the monoclonal antibody used in the ELISA was ruled out. However, it cannot be excluded that the signals detected with the ELISA technique represented an immunoreaction between the monoclonal antibody and fragmented, yet still immunoactive parts of the Cry1Ab protein. Thus, data based only on ELISA measurement could result in an overestimation of the full-length Cry1Ab protein.

To examine this hypothesis, immunoblotting assays with polyclonal and monoclonal antibodies against epitopes of the Cry1Ab protein were developed. Two independent sets of GIT samples (gastrointestinal contents of rumen, jejunum, and colon) as well as feces, collected from two different feeding experiments, were analyzed both with ELISA and with the immunoblotting technique.

* Corresponding author (e-mail christiane.albrecht@wzw.tum.de; telephone +49 8161 71 3994; fax +49 8161 71 4421).

[†] Technical University Munich.

[§] Free University of Berlin.

[#] Bavarian State Research Center for Agriculture.

MATERIALS AND METHODS

Feeding Studies. Isogenic maize (Antares) and transgenic maize (Navares) (Syngenta International AG, Basel, Switzerland) were planted and grown on experimental fields of the Bavarian State Research Center for Agriculture (Grub, Germany). The harvested plants were chopped (average size of ~1 cm) and processed to maize silage. Feeding experiment A consisted of six lactating cows (3.5 ± 1.2 years old), kept under standard conditions and fed with either isogenic or transgenic Bt176 maize silage. Feed consumed per day consisted of 23.0 ± 2.0 kg of isogenic maize or 27.5 ± 1.5 kg of transgenic maize and 3.0 kg of hay, 2.5 kg of concentrated feed, and 0.17 kg of additional cattle feed.

Feeding experiment B has been described in detail elsewhere (10). Briefly, 11 cows (4.4 ± 2.9 years old) in each group were fed with silage either from genetically modified maize (Navares) or from the isogenic line (Antares) for 4 weeks. The daily diet contained 88.5% maize silage, 2% barley straw, 4.5% wheat, 4.5% rape-bruised grain extract, and 0.5% mineral feed. Each cow was fed with 19 kg of maize silage in a total fed ration of 21.5 kg per day.

All animals were in good health. The samples of rumen, jejunum, and colon content were taken immediately after slaughter, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

Cry1Ab Protein Measurement (ELISA). Determination of the Cry1Ab protein was carried out by using a commercially available ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Agdia Inc., Elkhart, IN). To pulverize the samples, 0.2 g of material was ground using the FastPrep system (BIO101, Carlsbad, CA) with 0.8 g of Green Matrix at 6 m/s for 40 s. The procedure was repeated until the sample was pulverized; the finally obtained powder was dissolved in 1000 μL of multivalent buffer (MEB, provided in the kit). The control Cry protein, provided by the supplier, was diluted and used in the following concentrations to create a standard curve: 0.015, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, and 1.6 ng/mL. The results were expressed as Cry1Ab protein (nanograms) per gram of wet sample.

Immunoblotting (Western Blotting). The samples were prepared as described above (Cry1Ab Protein Measurement), except that PBS (pH 7.4) with protease inhibitors (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used as extraction buffer; 17.75 μL of extracted protein, 1.0 μL of 1,4-dithiothreitol (1 mM; Merck KGaA), and 6.25 μL of SDS sample buffer (4 \times) were applied to SDS-PAGE in a 4–12% gradient Bis-Tris gel (NuPage, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). 2-Morpholino-ethanesulfonic acid was used as running buffer. After separation, the polypeptides were transferred onto a nitrocellulose membrane (pore size = 0.45 μm ; Schleicher & Schuell BioScience, Keene, NH). The membranes were blocked with TBS–Tween 20 buffer (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.6; 1% Tween 20) + 1% (w/v) nonfat dried milk overnight at 4°C ; subsequently, the membranes were incubated for 60 min in TBS–Tween 20 buffer supplemented either with a monoclonal mouse anti-Cry1Ab/1Ac (final concentration = 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or with the same polyclonal rabbit anti-Bt-Cry1Ab/1Ac antibody (final concentration = 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Agdia Inc.) which was applied in the ELISA kit. The membranes were washed four times with casein solution and incubated for 30 min in secondary antibody solution (biotinylated anti-rabbit IgG and biotinylated anti-mouse IgG in casein solution, respectively; final concentrations = 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After three additional washing steps with casein solution for 10 min, membranes were incubated in Vectastain ABC-AmP reagent (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) for 10 min. Membranes were washed three more times (casein solution, 10 min) and incubated for 5 min with chemiluminescent substrate (DuoLuX, Vector Laboratories, Inc.). Following two final washing steps (0.1 M Tris, pH 9.3, 5 min), the membranes were exposed to a chemiluminescent detection film (Roche, Mannheim, Germany) for 15 min. All washing and incubation steps were performed at room temperature unless indicated otherwise.

RESULTS

ELISA. To ascertain the accuracy of the Cry1Ab ELISA measurements, rumen contents from animals fed isogenic maize were spiked corresponding to the standard curve (mentioned

Table 1. ELISA Measurements (Nanograms of Cry1Ab Protein per Gram of Wet Sample) in Rumen, Jejunum, Colon, and Feces of Feeding Experiments A and B

expt	rumen	jejunum	colon	feces
A	5.1 ± 1.0	1.4 ± 0.8	3.8 ± 1.3	4.4 ± 1.4
B	4.3 ± 0.9	2.1 ± 1.3	2.5 ± 1.1	2.8 ± 1.1

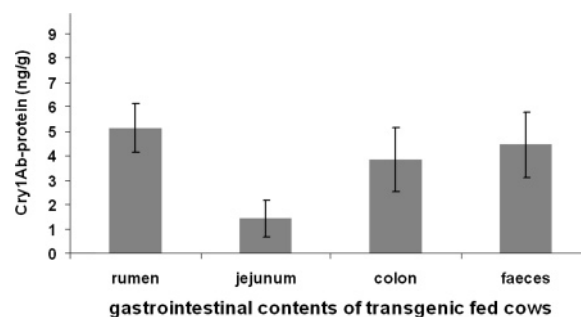


Figure 1. Results obtained by ELISA performed with samples of feeding experiment A. All samples were determined in duplicates. Error bars represent standard deviation (SD).

above) with 1.6, 1.0, 0.5, 0.25, 0.12, and 0.06 ng of Cry protein standard (included in the ELISA kit). The levels detected were 79.7 ± 1.6 , 68.4 ± 5.3 , 65.5 ± 5.5 , 81.0 ± 3.7 , 87.6 ± 1.2 , and $71.7 \pm 53.0\%$ (recovery value \pm SD) of 1.6, 1.0, 0.5, 0.25, 0.12, and 0.06 ng, respectively. Due to the high SD of 0.06 (71.7 \pm 53.0%) results below a corresponding value of 0.12 ng were regarded as unreliable and were excluded from the analysis.

To rule out cross-reactivity of the antibody used in the ELISA with other proteins of animal, bacterial, and plant origin, samples of animals fed isogenic maize were analyzed in parallel. All isogenic samples were negative. Both sets of GIT samples yielded similar results by ELISA (Table 1). In feeding experiment A, 5.1 ± 1.0 , 1.4 ± 0.8 , 3.8 ± 1.3 , and 4.4 ± 1.3 ng of Cry1Ab protein per gram of wet sample were detected in rumen, jejunum, colon, and feces, respectively (Figure 1). This compared well with the ELISA results obtained from feeding experiment B (4.3 ± 0.9 , 2.1 ± 1.3 , 2.5 ± 1.1 , and 2.8 ± 1.1 ng) in rumen, jejunum, colon, and feces, respectively, published by Einspanier et al. (10). Both data sets suggested that the concentration of Cry1Ab protein was apparently increasing during the GIT passage due to the reduced moisture content in the lower parts of the GIT.

Immunoblotting. To determine the fragment size of the Cry1Ab protein detected by ELISA, that is to assess a potential fragmentation of the Cry1Ab protein, an immunoblotting assay was developed. For evaluation and validation purposes, samples with decreasing amounts of Cry1Ab protein, isolated from fresh plant material of transgenic maize (Navares) as described above, were loaded on a BIS-Tris gel (Figure 2). The detection limit corresponded to 50 mg (fresh weight) of transgenic maize (Navares), equivalent to ~2.0 ng of Cry1Ab protein (according to ELISA concentration measurements).

The same GIT samples analyzed by ELISA were tested by immunoblotting. Cry1Ab protein was not detectable in any isogenic (i) sample for feeding experiment A (Figure 3) or for feeding experiment B (data not shown). Using the polyclonal antibody the samples of rumen contents showed bands at approximately 34 and 17 kDa (Figure 3A,C). All other samples (jejunum, colon, feces) displayed only the band at 17 kDa (Figure 3A,B). The smear at ~60 kDa observed in bovine GIT samples of both isogenic and transgenic maize fed animals (Figure 3A,B) is presumably due to unspecific binding of the

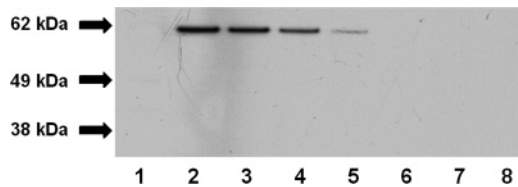


Figure 2. Detection limit of the immunoblotting assay using the polyclonal antibody in a serial dilution of Cry1Ab protein extracted from fresh GM maize plant material (Navares): (lane 1) Antares; (lane 2) Navares (200 mg, ~100%); (lane 3) Navares (75%); (lane 4) Navares (50%); (lane 5) Navares (25%); (lane 6) Navares (10%); (lane 7) Navares (1%); (lane 8) Navares (0.1%); arrows indicate the sizes of the molecular weight standard.

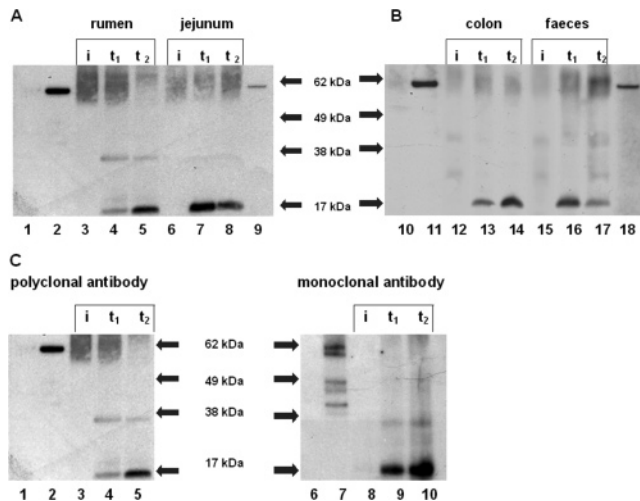


Figure 3. Immunoblotting of samples from bovine gastrointestinal contents (feeding experiment A): (A, B) polyclonal antibody [(lane 1) Antares; (lane 2) Navares; (lanes 3–5) rumen; (lanes 6–8) jejunum; (lane 9) positive control; (lane 10) Antares; (lane 11) Navares; (lanes 12–14) colon; (lanes 15–17) feces; (lane 18) positive control]; (C) comparison of polyclonal and monoclonal antibody in rumen samples [(lanes 1–5) polyclonal antibody; (lanes 6–10) monoclonal antibody; (lanes 1, 6) Antares; (lanes 2, 7) Navares; (lanes 3–5, 8–10) rumen content]; i, samples from a cow fed isogenic maize (feeding experiment A); t, samples of two cows fed transgenic maize (feeding experiment A); positive control, Cry protein provided in the ELISA kit. Arrows indicate the sizes of the molecular weight standard.

polyclonal antibody to other bovine proteins present in the protein extract. Plant extracts of fresh Navares leaves (Figures 2 and 3, lanes 2 and 11) did not show any unspecific binding or smear. To test whether the antibody used in the ELISA kit displayed a similar pattern, new membranes with the same samples were prepared and exposed to the monoclonal antibody. The fragmentation pattern in rumen samples was very similar (Figure 3C). However, it has to be noted that the sample of Navares plant material (lane 7) showed more bands when using the monoclonal antibody as compared to the polyclonal antibody (lane 2). Immunoblotting analyses with samples of feeding experiment B revealed similar results (data not shown). The positive control represents the Cry protein provided with the ELISA kit.

DISCUSSION

The ELISA technique is widely used for screening of the Cry1Ab/1Ac protein, to determine the expression levels of Cry protein or to track the persistence and the amount of the insecticidal Cry protein in different environments (12–15). In addition to the Cry1Ab protein from maize, the content or

concentration of the Cry1Ac protein in potatoes and cotton is measured in different kinds of samples, for example animal tissues, plants, and soil. Previously we reported the detection of Cry1Ab protein immunoactivity in bovine gastrointestinal contents using a commercial ELISA kit (10). To verify the Cry1Ab protein measurements obtained with the ELISA, we evaluated an immunoblotting assay with a polyclonal antibody. This provided information with respect to the size of the reactive protein and the appearance of potential degradation products in the bovine GIT samples. Intriguingly, in all samples analyzed the full-length Cry1Ab protein (60 kDa) was absent or at least below the detection limit of the immunoblotting assay. Only fragments of approximately 34 and 17 kDa size were found, suggesting that the antibody used in the ELISA recognized fragmented yet immunoactive parts of the Cry1Ab protein. To investigate this hypothesis, we tested the monoclonal antibody in immunoblotting. Western blotting with the monoclonal antibody confirmed the previous results obtained with the polyclonal antibody, suggesting significant protein degradation due to physiological processes such as proteolysis by bovine proteases, rumen bacterial decomposition, and the pH in the bovine GIT.

For transgenic maize event Bt176 different transgene products sized 36, 40, and 60 kDa have been reported, potentially indicating that in-plant metabolic processing is occurring or that multiple products are being produced (16).

Chowdhury et al. found the full-length Cry1Ab protein within Bt11 maize in different parts of the GIT of calves and pigs (9, 17) using ELISA and immunoblotting technique, whereas in our study only fragmented Cry1Ab protein was detected. The authors (9, 17) suggested that only a trace amount of Cry1Ab protein survived passage through the GIT but was not transferred to liver, spleen, kidney, lymph nodes, or muscles. Discrepancies between the findings of the study of Chowdhury et al. and this investigation could be related to differences in the metabolism of calves and adult lactating cows or the distinct expression levels of the Cry1Ab protein in Bt11 and Bt176 maize. However, previous studies from our laboratories (data not published) or others (9, 17) did not reveal any presence of Cry1Ab protein in tissue samples.

The finding that only small-sized fragments of the Cry1Ab protein were detected throughout the GIT and the feces has also a major impact on environmental concerns. Additional release of full-length Cry1Ab protein (60 kDa) caused by the output of liquid manure of Bt176-fed animals on fields can be almost ruled out. Moreover, a potential effect of fragmented Cry1Ab protein on the epithelial tissue of the bovine GIT and on other organisms cannot be excluded but is less likely.

Haider et al. reported that the insect specificity of *B. thuringiensis* var. *colmeri*, serotype 21, was altered depending on the digestive fluids the crystal endotoxin was processed in (18). They showed that processing of the native crystal δ -endotoxin (130 kDa) by gut enzymes of *Pieris brassicae* larvae yielded a 55 kDa protein that was toxic to only lepidopteran cell lines, whereas gut extracts of the dipteran (*Aedes aegypti*) larvae resulted in a 52 kDa fragment that was toxic to all mosquito cell lines but only one lepidopteran cell line (*Spodoptera frugiperda*). Experiments investigating a possible bioactivity of 17 and 34 kDa Cry1Ab protein fragments are lacking. However, this should be investigated as a separate matter.

ELISA is a method widely used for screening purposes with a high throughput capacity that allows rapid, preliminary testing and is easy to handle. However, it is not a suitable method for

drawing definitive conclusions, as it does not provide information on the chemical structure. To comply with legal requirements according to the Commission of the European Communities (93/256/EEC), an identifying analytical procedure consists of a suitable combination of cleanup, chromatographic separation, and spectrometric or immunochemical detection (19). The data provided in this paper indicate that results on Cry1Ab protein content based solely on ELISA measurements have to be interpreted carefully. It cannot be ruled out, yet is unlikely, that the signals obtained by ELISA measurements in our studies are restricted to bovine GIT samples due to very specific conditions regarding rumen bacterial composition and pH changes. However, to ensure adequate measurements and to confirm the presence of the full-length Cry1Ab protein, the use of an alternative method, for example immunoblotting or a bioassay with susceptible insect species, is advisable.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Tamara Stelzl, Inge Celler, Christine Fochtmann, and Robert Gossmann for technical assistance. We are indebted to the staff of the Bavarian State Research Center for Agriculture for organization, logistics, and technical assistance during the feeding experiments.

LITERATURE CITED

- (1) Regulation (EC) 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. *Off. J. Eur. Communities* **2003**, L 268, 24–28.
- (2) International Service for the acquisition of agri-biotech applications SEAsia Center and CAB International: Crop Biotech Update, Special Edition 14, January 2004; Global Status of Commercialized Transgenic Crops 2003; <http://www.biotechknowledge.com>.
- (3) Novartis Seeds AG. Genetically modified plant: maize protecting itself against cornborers—BT-176 MAIZE. **1994**, 1–11.
- (4) Klotz, A.; Mayer, J.; Einspanier, R. Degradation and possible carry over of feed DNA monitored in pigs and poultry. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 214, 271–275.
- (5) Schubbert, R.; Lettmann, C. M.; Doerfler, W. Ingested foreign DNA persists in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol. Gen. Genet.* **1994**, 242, 495–504.
- (6) Schubbert, R.; Renz, D.; Schmitz, B.; Doerfler, W. Foreign (M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, 94, 961–966.
- (7) Doerfler, W. Uptake of foreign DNA from the environment: the gastrointestinal tract and the placenta as portals of entry. In *Foreign DNA in Mammalian Systems*; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany, 2000; Chapter 11, pp 147–157.
- (8) Einspanier, R.; Klotz, A.; Kraft, J.; Aulrich, K.; Poser, R.; Schwägele, F.; Jahreis, G.; Flachowsky, G. The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, 212, 129–134.
- (9) Chowdhury, E. H.; Shimada, N.; Murata, H.; Mikami, O.; Sultana, P.; Miyazaki, S.; Yoshioka, M.; Yamanaka, N.; Hirai, N.; Nakajima, Y. Detection of Cry1Ab protein in gastrointestinal contents but not visceral organs of genetically modified Bt11-fed calves. *Vet. Hum. Toxicol.* **2003**, 45, 71–75.
- (10) Einspanier, R.; Lutz, B.; Rief, S.; Berezina, O.; Zverlov, V.; Schwarz, W.; Mayer, J. Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgenic maize. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, 218, 269–273.
- (11) Clements, M. J.; Campbell, K. W.; Maragos, C. M.; Pilcher, C.; Headrick, J. M.; Pataky, J. K.; White, D. G. Influence of Cry1Ab protein and hybrid genotype on fumonisin contamination and *Fusarium* ear rot of corn crop. *Science* **2003**, 43, 1283–1293.
- (12) Palm, C. J.; Donegan, K. K.; Harris, D.; Seidler, R. J. Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin from transgenic plants. *Mol. Ecol.* **1994**, 3, 145–151.
- (13) Theunis, W.; Aguda, R. M.; Cruz, W. T.; Decock, C.; Peferoen, M.; Lambert, B.; Bottrell, D. G.; Gould, F. L.; Litsinger, J. A.; Cohen, M. B. *Bacillus thuringiensis* isolates from the Philippines: habitat distribution, δ -endotoxin diversity, and toxicity to rice stem borers (Lepidoptera: Pyralidae). *Bull. Entomol. Res.* **1998**, 88, 335–342.
- (14) Olsen, K. M.; Daly, J. C. Plant–toxin interactions in transgenic Bt cotton and their effect on mortality of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomol. Soc. Am.* **2000**, 93, 1293–1299.
- (15) Zwahlen, C.; Hilbeck, A.; Gugerli P.; Nentwig, W. Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the fields. *Mol. Ecol.* **2003**, 12, 765–775.
- (16) Andow, D. A.; Hilbeck A. Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. *BioScience* **2004**, 54, 637–649.
- (17) Chowdhury, E. H.; Kuribara, H.; Hino, A.; Sultana, P.; Mikami, O.; Shimada, N.; Guruge, K. S.; Saito, M.; Nakajima, Y. Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *J. Anim. Sci.* **2003**, 81, 2546–2551.
- (18) Haider, M. Z.; Knowles, B. H.; Ellar, D. J. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *Eur. J. Biochem.* **1986**, 156, 531–540.
- (19) Commission Decision of 14 April 1993 (93/256/EEC). *Off. J. Eur. Communities* **1993**, L 118, 64–74.

Received for review May 17, 2004. Revised manuscript received November 12, 2004. Accepted November 15, 2004. This study was supported by the German Federal Ministry of Research and Technology (BMBF Grant 0312631D) and the Federal Agency for Nature Conservation (BfN Grant 20767432).

JF049222X

PUBLIKATIONSBEITRAG

Lutz, B., S. Wiedemann und C. Albrecht.

Degradation of transgenic Cry1Ab DNA and protein in maize during the ensiling process.

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (in press; 2005 b)

ORIGINAL ARTICLE

Degradation of transgenic Cry1Ab DNA and protein in Bt-176 maize during the ensiling process

B. Lutz, S. Wiedemann and C. Albrecht

Department of Physiology Weihenstephan, Technical University Munich, Weihenstephaner Berg 3, Freising, Germany

Correspondence

Christiane Albrecht, Physiology
 Weihenstephan, Technical University Munich,
 Weihenstephaner Berg 3, D-85354 Freising,
 Germany. Tel: +49 8161 71 3994;
 Fax: +49 9161 71 4421;
 E-mail: christiane.albrecht@wzw.tum.de

Received: 15 September 2004;

Accepted: 16 May 2005

Summary

Maize silage is commonly used as feed for farm animals. The aim of this study was to monitor the time-dependent degradation of non-recombinant chloroplast DNA (exemplified by the *rubisco* gene) in comparison with the recombinant *cry1Ab* gene in the course of the ensiling process. In parallel, the Cry1Ab protein content and fragment sizes were determined. Fragments of the *rubisco* (173, 896, 1197, 1753 and 2521 bp) and of the *cry1Ab* gene (211, 420, 727 and 1423 bp) were selected to investigate the DNA degradation process. The detection of the Cry1Ab protein was performed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting. *Rubisco* gene fragments of 173 bp were still detectable after 61 days, while fragments of 1197 and 2521 bp were detectable up to 30 days and on the first day only respectively. Polymerase chain reaction (PCR) analyses revealed that fragments of the *cry1Ab* gene with sizes of 211 and 420 bp were detectable up to 61 days, fragments with sizes of 727 and 1423 bp, 30 and 6 days respectively. The ELISA showed a decrease of the Cry1Ab protein in maize silage during the ensiling process. No significant degradation was observed during the first 43 h. Thereafter, a sharp decrease was measured. Even after 61 days $23.6 \pm 0.9\%$ of the initial Cry1Ab protein was still detectable. Immunoblotting confirmed the results of the ELISA showing a positive signal of approximately 60 kDa size for 8 days of ensiling; no further immunoactive fragments were detectable by immunoblotting. In conclusion, the ensiling process markedly decreases the presence of long functional *cry1Ab* gene fragments and full size Cry1Ab protein.

Introduction

Maize is one of the most important crops worldwide. Popular not only for food, it is also widely used to produce forage. Like a variety of other plants, for example genetically modified soybean and Bt-cotton, maize has been genetically modified (GM) to control insect pathogens. The estimated global area of GM crops for 2004 was 81.0 million hectares, including approximately 19.3 million hectares of transgenic maize (James, 2004). The GM Bt176-maize results in a higher efficiency for controlling the European corn

borer (*Ostrinia nubilalis*) than conventional or biological insecticides. Maize like event176 incorporates a truncated form of the *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* (Bt); the expression is controlled by the maize-specific PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase) promoter and by the CDPK (calcium-dependent protein kinase) promoter (Agbios Crop Database, 2004).

Studies investigating the fate of transgenic DNA in non-target organisms showed a degradation of DNA in the gastrointestinal tract (GIT) of cows and pigs (Chowdhury et al., 2003a,b; Einspanier et al., 2004).

	J	P	N	5	7	1	B	Dispatch: 6.6.05	Journal: JPN	CE: Kavi
	Journal Name			Manuscript No.				Author Received:	No. of pages: 8	PE: Ravisankar

However, no traces of foreign DNA have been detected in tissue samples of cattle fed with transgenic maize (Einspanier et al., 2001). In addition, a potential transfer of recombinant DNA to intestinal and food-associated bacteria was assumed (Hertel et al., 1998) but has never been detected to date. However, under laboratory conditions, it was shown that DNA from GM plants can be transferred to bacteria if there are homologous sequences in the DNA of recipient cells are present (de Vries et al., 2001; de Vries and Wackernagel, 1998). Similarly to recombinant DNA, the fate and persistence of the Cry1Ab protein (event176) in non-target organisms (Chowdhury et al., 2003a,b) and in fields were investigated (Zwahlen et al., 2003). Previous investigations in our own laboratories showed a degradation of the Cry1Ab protein in the bovine GIT (Lutz et al., 2005). However, no information about the way and rate of the degradation of Cry1Ab protein in the course of the ensiling process is available to date.

The aim of this study was to monitor the time-dependent fragmentation of the *rubisco* gene (chloroplast DNA) and recombinant *cry1Ab* as well as the Cry1Ab protein content of Bt-176 maize silage in the course of the ensiling process. Basic knowledge about these parameters are crucial for the risk assessment of a potential DNA transfer, e.g., into rumen bacteria of cattle and effects of the Cry1Ab protein with regard to animal health being fed with silage originating from GM plants.

Materials and Methods

Isogenic (Antares) and transgenic (Navares) maize (Syngenta International AG, Basel, Switzerland) were planted and grown on experimental fields of the Bavarian State Research Center for Agriculture (Poing-Grub, Germany). To minimise differences based on varying environmental conditions, Antares and Navares were cultured in close distance (approximately 1 km). At harvest, the maize plants were chopped (average size 1 cm) and proceeded to silage. To perform the ensiling process on a small scale for laboratory purposes, preserving jars were filled with approximately 400 g chopped maize up to the maximum capacity, pressed thoroughly and closed in an air-tight manner. Respiration of the plant materials and consumption of oxygen by aerobic micro-organisms achieved oxygen deficiency. The preserving jars were stored in the dark at a temperature of approximately 20 °C. At periodical intervals, two preserving jars of each maize line (Antares, Navares) were opened, samples for DNA and protein

analyses were taken and immediately frozen at -20 °C. In parallel, pH measurements were performed.

pH-Measurement

For pH measurement, the upper layer (approx. 5 cm ~ 100 g) of silage in the preserving jars was removed and the remaining silage was mixed well. To 50 g silage, 500 ml H₂O was added and incubated overnight. To avoid changes caused by microbial activities, Thimerosal (final concentration 0.002‰; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was added. The pH was measured using a pH-meter (WTW, Weilheim, Germany).

DNA fragment analyses

DNA isolation

Frozen silage samples (100 mg) were ground using the FastPrep-System (BIO101, Carlsbad, NM, USA) with 0.5 g Green Matrix (5.5 m/s, 30 s) and finally dissolved in 600 µl lysis buffer (C1, Macherey-Nagel GmbH, KG, Düren, Germany). After an incubation period of at least 30 min at 60 °C, the samples were centrifuged 1 min at 11.000 × *g*. DNA purification was performed using the Nucleo Spin Plant Kit (Macherey-Nagel GmbH, KG, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA was finally eluted with 40 µl CE-buffer (Nucleo Spin Plant Kit); concentrations and integrity of the extracted DNA were determined by measuring the UV absorption at 260 nm and absorption ratios of 260/280 nm respectively.

Oligonucleotide primers

All primer used for the PCR amplification of *rubisco* the and *cry1Ab* gene are listed in Table 1a. Identification and fragment sizes are indicated in the name. The *rubisco* gene primer pairs were designed to amplify five fragments (173, 896, 1197, 1753 and 2521 bp) referring to the GenBank Accession No. X86563 (*Zea mays* complete chloroplast genome). The sequences of the primer pairs for cry1Ab fragments of 211 and 420 bp have been published elsewhere (Studer et al., 1997; Hupfer et al., 1998). For fragment sizes of 727 and 1423 bp, primers were designed referring to GenBank Accession No. I41419 (*cry1Ab* gene from patent US 5625136). Primer design was performed using the computer software PRIMER-3 (freely available at <http://www.wi.mit.edu>).

Table 1 Oligonucleotide sequences and PCR cycling conditions

Name	Sequence				
(A)					
Cry 211F	5'-CTC TCG CCG TTC ATG TCC GT-3'				
Cry 211R	5'-GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT-3'				
Cry 420F	5'-CGG CCC CGA GTT CAC CTT-3'				
Cry 420R	5'-CTG CTG GGG ATG TTG TTG-3'				
Cry 727F/1423F	5'-ACG AGT GCA TCC CCT ACA AC-3'				
Cry 727R	5'-TAG TTG GGG AAC AGG CTC AC-3'				
Cry 1423R	5'-AGG TTG GTG CTC TTG GTC AG-3'				
Rub 173F	5'-AGC TAA TCG TGT GGC TTT AGA AGC C-3'				
Rub 173R	5'-TGG TAT CCA TCG CTT TGA AAC CA-3				
Rub 896F	5'-AGG TAA GTT AGA AGG GGA ACG C-3'				
Rub 896R	5'-TGT ATG TCC CAG AAT AGG TCC C-3'				
Rub 1197F/1753F	5'-GGC CTA CTT CTT CAC ATT CAC C-3'				
Rub 1197R	5'-CAT TCT CAT CGC CTT TCT ATC C-3'				
Rub 1753R	5'-AAA CTC GCT ATA GTC GGC TAC G-3'				
Rub 2521F	5'-AAC TCA CAA CCA TTT ATG CGC-3'				
Rub 2521R	5'-ATG CGA CGT TTT ATT CCA GG-3'				
Target gene	Fragment length	Initial denaturation	Amplification steps	Cycles	Final extension
(B)					
<i>cry1Ab</i>	211 bp	94 °C, 3 min	94 °C 30 s; 63 °C 30 s; 72 °C 30 s	35	72 °C, 2 min
	420 bp	94 °C, 3 min	94 °C 30 s; 56 °C 30 s; 72 °C 30 s	35	72 °C, 2 min
	727 bp	94 °C, 5 min	94 °C 30 s; 56 °C 30 s; 72 °C 30 s	35	72 °C, 5 min
	1423 bp	94 °C, 5 min	94 °C 45 s; 56 °C 45 s; 72 °C 45 s	40	72 °C, 5 min
<i>rubisco</i>	173 bp	94 °C, 3 min	94 °C 30 s; 60 °C 30 s; 72 °C 30 s	35	72 °C, 5 min
	896 bp	94 °C, 5 min	94 °C 45 s; 58 °C 45 s; 72 °C 45 s	40	72 °C, 5 min
	1197 bp	94 °C, 5 min	94 °C 45 s; 58 °C 45 s; 72 °C 45 s	40	72 °C, 5 min
	1753 bp	94 °C, 5 min	94 °C 45 s; 58 °C 45 s; 72 °C 45 s	40	72 °C, 5 min
	2521 bp	94 °C, 5 min	94 °C 60 s; 64 °C 60 s; 72 °C 60 s	40	72 °C, 10 min

Polymerase chain reaction

All amplification reactions were carried out on a gradient thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). The reaction volume consisted of 150 ng DNA; 1x PCR reaction buffer (ABgene, Epsom, UK); 2.5 mM MgCl₂ (ABgene); 0.4 μM primers (Metabion, Martinsried, Germany); 0.2 mM dNTPs (ABgene) and 0.5 units Thermoprime Plus DNA Polymerase (ABgene). The master mixes for the 1753 and 2521 bp amplification included 3.5 mM MgCl₂. Cycling conditions are listed in Table 1b. The positive control represents DNA isolated from transgenic maize leaves. DNA extracted from isogenic maize leaves served as negative control for *cry1Ab* gene analyses. All PCR analyses for the *rubisco* and *cry1Ab* gene were performed at least twice.

Agarose gel electrophoresis

A total of 15.0 μl of each amplification reaction was separated on 1.8% agarose gel stained with ethidium bromide and visualised using an UV transillumina-

tor. The gels were digitised using a video documentation system (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex 1, France).

Sequencing

The PCR products were commercially sequenced to confirm nucleotide sequence identity (MediGenomics, Munich, Germany).

Cry1Ab protein measurement (ELISA)

Estimation of the Cry1Ab protein was carried out using a commercially available ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Agdia, Elkhart, IN, USA). To pulverise the samples, 0.2 g material was ground using the FastPrep-System (BIO101, Carlsbad, NM, USA) with 0.8 g Green Matrix at 6 m/s for 40 s. The procedure was repeated until the sample was pulverised; the finally obtained powder was dissolved in 1000 μl Multi-Event Buffer (MEB, provided in the kit). The control Cry protein, provided by the supplier, was diluted and used in follow-

ing concentrations to create a standard curve: 0.015, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 and 1.6 ng/ml. The results were expressed as Cry1Ab protein (ng) per g wet sample. All samples were measured in duplicates.

Immunoblotting (Western blotting)

The samples were prepared as described above (Cry1Ab protein measurement), except that PBS (pH 7.4) with protease inhibitors (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used as extraction buffer. A quantity of 17.75 μ l of extracted protein, 1.0 μ l 1,4-dithiothreitol (1 mM; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and 6.25 μ l SDS sample buffer (4 \times) were applied to SDS-PAGE on a 4–12% gradient Bis–Tris gel (NuPage, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). 2-Morpholinoethanesulfonic acid was used as running buffer. After separation, the polypeptides were transferred onto a nitro-cellulose membrane (pore size 0.45 μ m; Schleicher & Schuell BioScience, Keene, NH, USA). The membranes were blocked with TBS-Tween20-Buffer (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl pH 7.6; 1% Tween20) + 1% (w/v) Non-fat Dried Milk overnight at 4 °C; subsequently, the membranes were incubated for 60 min in TBS-Tween20-Buffer supplemented with a polyclonal rabbit anti-Cry1Ab/1Ac antibody (final concentration 5 μ g/ml; Agdia). The membranes were washed four times with casein solution and incubated for 30 min in secondary antibody solution (biotinylated antirabbit IgG in casein solution; final concentration 1.5 μ g/ml). After three additional washing steps with casein solution for 10 min, membranes were incubated in Vectastain ABC-AmP Reagent (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 10 min. Membranes were washed three more times (casein solution, 10 min) and incubated for 5 min with chemiluminescent substrate (DuoLuX, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Following two final washing steps (0.1 M Tris, pH 9.3, 5 min), the membranes were exposed to a chemiluminescent detection film (Roche, Mannheim, Germany) for 15 min. All washing and incubation steps were performed at room temperature unless indicated otherwise. Isogenic maize (Antares) was used as negative control; Cry1Ab/1Ac protein included in the ELISA kit served as positive control.

Results

pH in the course of the ensiling process

Monitoring of the pH-value during the course of the ensiling process served as an indicator of the

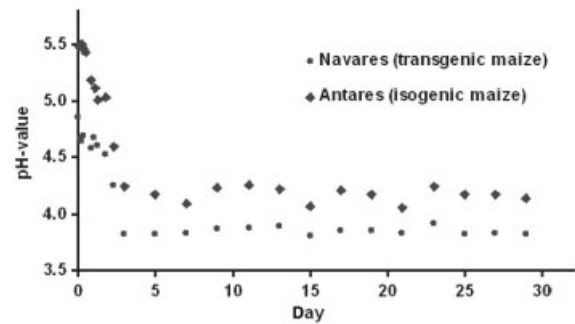


Fig. 1 pH of isogenic (Antares) and transgenic (Navares) maize silage in the course of the ensiling process.

progress and the quality of the fermentation reaction, in which enteric and lactic acid bacteria are involved. At the beginning of the ensiling process, the pH of Antares was 5.5, declined after 2 to days 4.2 and reached the steady state after 6 days with a final pH of approximately 4.1 (Fig. 1). Navares started with a pH value of 4.8 at the beginning of the fermentation process and reached a final pH of 3.8 after 2 days (Fig. 1).

DNA fragment length analyses

Rubisco DNA with sizes of 173 bp was detectable in all samples (Fig. 2a, upper panel). After 30 days, DNA fragments with sizes of 1197 bp were not detectable anywhere (Fig. 2a, middle panel). Polymerase chain reaction amplifications of the *rubisco* gene with 2521 bp were only possible in samples of the initial 24 h (Fig. 2a, lower panel). Fragment length analyses of 896 bp and 1753 were identical to 1197 bp and 2521, respectively, thus the figures are not shown.

DNA fragments of the *cry1Ab* gene with sizes of 211 and 420 bp were detectable up to 61 days, 727 and 1423 bp fragments were found up to 30 and 6 days respectively. Representative gel images of PCR analyses with different fragment sizes of the *cry1Ab* gene are shown in Fig. 2b. The maximally detectable fragment length of the *rubisco* and *cry1Ab* genes is summarised in Fig. 2c.

Cry1Ab protein degradation

Cry1Ab protein was analysed using ELISA and immunoblotting technique. No significant degradation of immunoactive Cry1Ab protein was observed during the initial 43 h (Fig. 3a/inset). Thereafter, a marked decrease of the Cry1Ab signal was measured

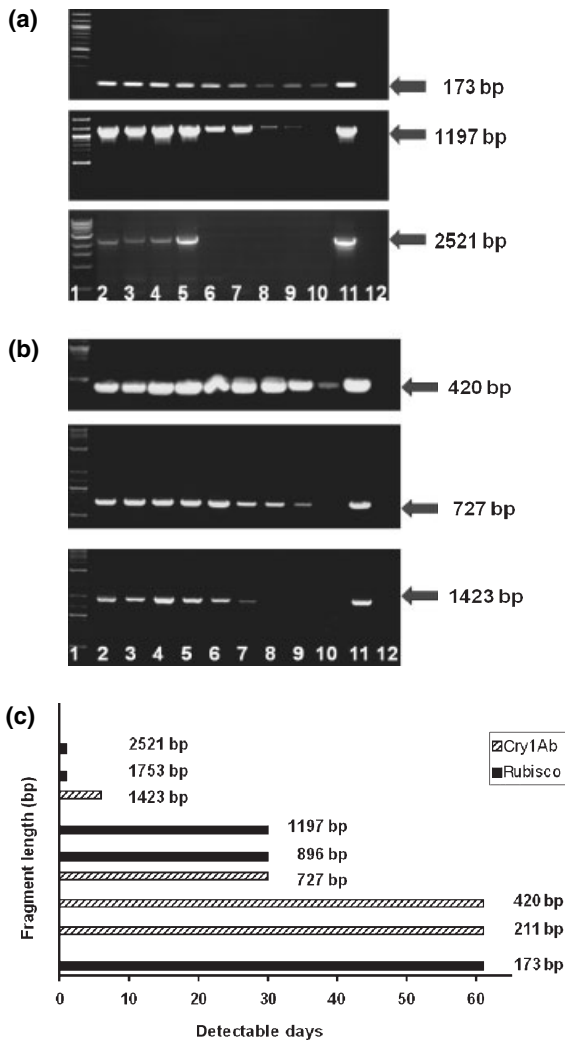


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of representative PCR products. (a) *rubisco* gene. Primer pairs for detection of 173, 1197 and 2521 bp were used. Fragment length analyses of 896 bp and 1753 bp were identical to 1197 bp and 2521 bp respectively. Lanes 1–12: 1 = marker, 2 = 0 h, 3 = 4 h, 4 = 10 h, 5 = 1 day, 6 = 2 days, 7 = 6 days, 8 = 14 days, 9 = 30 days, 10 = 61 days, 11 = positive control (transgenic maize leaves), 12 = negative control (H₂O). (b) *cry1Ab* gene. Primer pairs for detection of 420, 727 and 1423 bp were used. Fragment analyses of 211 bp were identical to 420 bp. Lanes 1–12: 1 = marker, 2 = 0 h, 3 = 4 h, 4 = 10 h, 5 = 1 day, 6 = 2 days, 7 = 6 days, 8 = 14 days, 9 = 30 days, 10 = 61 days, 11 = Antares, 12 = positive control (transgenic maize leaves), 13 = negative control (H₂O). Arrows indicate the size of the PCR amplification products. Shown are the maximally detectable fragment sizes. (c) Summary of the maximally detectable fragment length of the *rubisco* and *cry1Ab* gene.

(Fig. 3a). After 20 and 61 days, $56 \pm 0.2\%$ (7.4 ± 0.02 ng/g) and $23.5 \pm 0.9\%$ (3.1 ± 0.12 ng/g), respectively, of the initial immunoreactive Cry1Ab protein (13.2 ± 0.2 ng/g) were still detectable.

In order to get information about the time course and potential degradation or fragmentation of the Cry1Ab protein, an immunoblotting technique using a commercial polyclonal Cry1Ab antibody was established. The detection limit of the immunoblotting assay was determined in a serial dilution experiment and corresponded to 50 mg (fresh weight) of transgenic maize (Navares), equivalent to approximately 2.0 ng Cry1Ab protein according to ELISA concentration measurements (Lutz et al., 2005).

Immunoblotting confirmed the results of the ELISA. No differences in the intensity of the bands could be detected for the samples of the first 2 days (Fig. 3b left panel). In contrast, in samples which were subjected to the ensiling process for longer than 2 days degradation of the Cry1Ab protein was clearly visible. A faint band for the full size protein still occurred after 8 days whereas no immunoreactive Cry1Ab protein could be observed after 12 days. No additional bands were detected.

Discussion

To our knowledge, this is the first study investigating the degradation of the Cry1Ab protein combined with detailed fragment analyses of chloroplast and recombinant DNA during the ensiling process. This study was accomplished to estimate the likelihood of an *in vivo* uptake of functional and recombinant DNA into micro-organisms of farm animals and to assess a potential activity of the full size Cry1Ab protein.

A variety of primers were used to amplify fragments of the high copy *rubisco* gene in sizes of 173, 896, 1197, 1753 and 2521 bp. The 173 bp *rubisco* fragment was detected in all samples of the experimental period. In contrast, higher-sized products of 1197 and 2521 bp were only detectable up to 30 days and 24 h. In order to compare the detectability and time-dependent degradation of high copy *rubisco* gene with the single copy *Bt* gene, *cry1Ab* gene fragments of 211, 420, 727 and 1423 bp were analysed.

Similarly to the 173 bp *rubisco* fragment, 211 and 420 bp *cry1Ab* fragments were detected in all samples of the experimental period. Fragments of the *cry1Ab* gene with sizes of 727 bp were amplifiable over the same period of time as the 896 and 1197 bp *rubisco* fragments, while the 1423 bp *cry1Ab* fragment was only detectable up to 6 days. The 1753 and 2521 bp *rubisco* fragments could only be amplified up to 24 h. Although having a higher copy number and therefore suggesting a higher

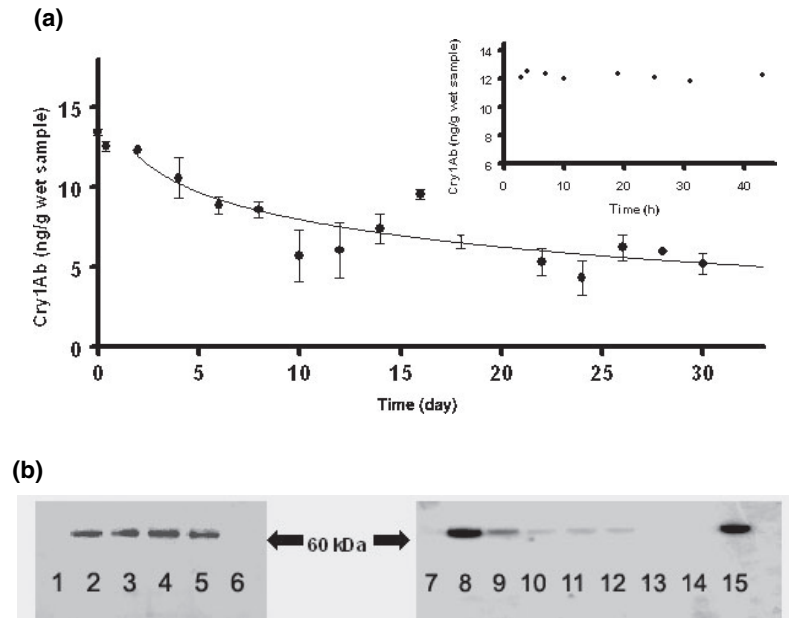


Fig. 3 Immunoactivity of the Cry1Ab protein. (a) Measurements of the Cry1Ab protein using ELISA from day 2 to day 30; Inset: Degradation of the Cry1Ab protein within the initial 43 h. (b) Immunoblotting of Cry1Ab protein in silage samples. The arrow indicates the Cry1Ab protein-specific size of approximately 60 kDa. (Left panel) Lanes 1–6: 1 = Antares; 2 = Navares (0 h); 3 = Navares (7 h); 4 = Navares (12 h); 5 = Navares (3 days); 6 = Navares (12 days); (Right panel) Lanes 7–15; 7 = Antares; 8 = Navares (0 h); 9 = Navares (2 days); 10 = Navares (4 days); 11 = Navares (6 days); 12 = Navares (8 days); 13 = Navares (12 days); 14 = Navares (16 days); 15 = positive control (Cry-protein provided in the ELISA Kit).

probability of detection, the *rubisco* gene showed a similar degradation pattern as the *cry1Ab* gene. The results of this study are comparable with those of Aulrich et al. (2004), where DNA-degradation in isogenic and transgenic corn was investigated and Huffer et al. (1999), where fragments of the *invertase* gene and *cry1Ab* gene in maize silage were analysed. All studies showed a degradation of plant and recombinant DNA during the ensiling process.

DNA degradation processes during ensiling are common consequences of the mechanical treatment and the concomitant disruption of cell walls and membranes. Furthermore, low pH conditions in the silage, endogenous nucleases of the plant and/or exogenous nucleases of the microflora are contributing factors to DNA degradation. However, during the first 24 h of the ensiling process, the DNA fragments obtained are theoretically still long enough representing a full sized gene. For example, the size of the pro-karyotic *bla* gene encoding a β -lactamase which confers resistance to ampicillin is 861 bp (Bolivar et al., 1977).

Important in this context are several studies showing transformations by which bacteria can acquire foreign DNA (Nielson et al., 2000; Kay et al., 2002; de Vries and Wackernagel, 2002). Kharazmi et al. (2003a) showed by marker rescue transformation that plasmid and chromosomal DNA of bacteria as well as DNA of transgenic potatoes were transferred to bacteria under laboratory conditions. An *in vivo* transfer has not been detected under experimental

conditions but cannot be excluded as the hypothetical transformation rate of transgenic DNA to *B. subtilis* was calculated to be equal to 8.5×10^{-19} and 1.2×10^{-27} for homologous and non-homologous recombination respectively (Kharazmi et al., 2003b). However, hereby it has to be considered that foreign DNA fragments have to be rescued by homologous recombination or, as demonstrated for *Streptococcus pneumoniae*, by homology-directed illegitimate recombination during transformation (Prudhomme et al., 2002).

In parallel to the detection of DNA degradation with PCR techniques, the present study also monitored the degradation of the Cry1Ab protein in the silage samples using immunoblotting techniques. Using ELISA, no significant degradation of the Cry1Ab protein during the first 43 h was observed. Thereafter, a clear reduction of the Cry1Ab content was found. To exclude that the ELISA detected only immunoactive fragments, as previously shown in samples of bovine rumen and GIT content (Lutz et al., 2005), an immunoblotting method using a polyclonal antibody was applied. The immunoblotting showed a time-dependent decreasing signal intensity for the full size Cry1Ab protein (60 kDa). In contrast to earlier studies testing bovine GIT samples, no smaller immunoactive fragments were detected.

The distinct degradation pattern of the Cry1Ab protein in different environments such as bovine rumen on one side and silage on the other side

could be associated with the differing physiological and biochemical conditions involved in the degradation process. One important factor herein is the pH value. In the rumen of cattle, the physiological pH value ranges between 5.5 and 6.5 while in maize silage values of approximately 4.0 are found due to the production of lactic acid in the anaerobic fermentation process.

In addition, the diversity in the composition of the microbial community in both environments could contribute to the differences found. In relation to the predominantly strictly anaerobic bacteria in the bovine rumen, with the main purpose of digestion of whole plant material including protein, the lactic acid bacteria in silage ferment mainly the water-soluble carbohydrates. In the course of the ensiling process, the bacterial population changes. Starting with a variable mixed population, the steadily declining pH value results in a selection and survival of only lactic acid tolerable bacteria. Accordingly, a rapid decrease of the Cry1Ab protein was mainly observed after 43 h. As in the acidic and anaerobic environment, most protein consuming bacteria are supposed to be erased and, after the consumption of the supply of carbohydrates even the lactic acid tolerable bacteria do not survive, the degradation process of the protein is reduced. This might suggest that the Cry1Ab protein degradation rate in the silage is dependent both of the low pH value and of the bacterial composition. Though our results indicate that significant degradation of the Cry1Ab protein during the ensiling process occurs, it was apparently possible to detect the immunoactive Cry1Ab protein with ELISA and immunoblotting technique in different parts of the GIT after feeding silage to cattle and pigs (Chowdhury et al., 2003a,b). However, independent of the degradation pattern of the Cry1Ab protein, there is no indication for an interaction between the Cry1Ab protein and the bovine rumen or epithelia cells of the GIT of cattle and pigs; solely Cry3Ac pro-toxin was shown to bind to surface proteins in the mouse small intestine (Fares and El-Sayed, 1998; Vasquez-Padron et al., 2000).

In summary, a degradation process of DNA and Cry1Ab protein is detectable during the ensiling process. Up to 8 days of ensiling, approximately 65% of the full size Cry1Ab protein is ingested by domestic animals fed GM maize. After 61 days only approximately 23% of the initial ELISA signal was measurable and only DNA fragments with sizes of 420 bp were detectable. In conclusion, the ensiling process markedly reduces the presence of long *cry1Ab* gene fragments and full size Cry1Ab protein.

Acknowledgements

This study was supported by the German Federal Ministry of Research and Technology (BMBF grant No. 0312631D) and the Federal Agency for Nature Conservation (BfN grant No. 20767432). We thank Tamara Stelzl, Inge Celler, and Bastian Weiss for technical assistance. We are indebted to the staff of the Bavarian State Research Center for Agriculture, Grub for organisation, logistics and technical assistance during the maize cultivation.

References

- Agbios Crop Database, 2004: *Essential Biosafety*, 2nd edn. Merrickville, Ontario (Canada) <http://www.essentialbiosafety.info>.
- Aulrich, K.; Pahlow, G.; Flachowsky, G., 2004: Influence of ensiling on the DNA-degradation in isogenic and transgenic corn. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* **13**, 112-???.
- Bolivar, F.; Rodriguez, R. L.; Betlach, M. C.; Boyer, H. W., 1977: Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* **2**, 75-???
- Chowdhury, E. H.; Shimada, N.; Murata, H.; Mikami, O.; Sultana, P.; Miyazaki, S.; Yoshioka, M.; Yamanaka, N.; Hirai, N.; Nakajima, Y., 2003a: Detection of Cry1Ab protein in gastrointestinal contents but not visceral organs of genetically modified Bt11-fed calves. *Veterinary and Human Toxicology* **45**, 71.
- Chowdhury, E. H.; Kuribara, H.; Hino, A.; Sultana, P.; Mikami, O.; Shimada, N.; Guruge, K. S.; Saito, M.; Nakajima, Y., 2003b: Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *Journal of Animal Science* **81**, 2546.
- de Vries, J.; Wackernagel, W., 1998: Detection of nptII (Kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Molecular and General Genetics : MGG* **257**, 606.
- de Vries, J.; Wackernagel, W., 2002: Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 2094.
- de Vries, J.; Meier, P.; Wackernagel, W., 2001: The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiology Letters* **195**, 211.
- 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 collaborative case-study investigating cattle and chicken fed

- recombinant plant material. *European Food Research and Technology* **212**, 129.
- Einspanier, R.; Lutz, B.; Rief, S.; Berezina, O.; Zverlov, V.; Schwarz, W.; Mayer, J., 2004: Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgenic maize. *European Food Research and Technology* **218**, 269.
- Fares, N. H.; El-Sayed, A. K., 1998: Fine structural changes in the ileum of mice fed on delta-endotoxin-treated potatoes and transgenic potatoes. *Natural Toxins* **6**, 219.
- Hertel, C.; Probst, A. J.; Cavadini, C.; Meding, E.; Hammes, W. P., 1998: Safety assessment of genetically modified microorganisms applied in meat fermentations. *Systematic and Applied Microbiology* **18**, 469.
- Hupfer, C.; Hotzel, H.; Sachse, K.; Engel, K. H., 1998: Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt-maize by polymerase chain reaction. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **206**, 203.
- Hupfer, C.; Mayer, J.; Hotzel, H.; Sachse, K.; Engel, K. H., 1999: The effect of ensiling on PCR-based detection of genetically modified Bt maize. *European Food and Research Technology* **209**, 301.
- James, C., 2004: Preview: global status of commercialised transgenic crops: 2004. *ISAAA Briefs* **32**, 1.
- Kay, E.; Vogel, T. M.; Bertolla, F.; Nalin, R.; Simonet, P., 2002: In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **25**, 3345.
- Kharazimi, M.; Sczesny, S.; Blaut, M.; Hammes, W. P.; Hertel, C., 2003a: Marker rescue studies of the transfer of recombinant DNA to *Streptococcus gordonii* in vitro, in foods and gnotobiotic rats. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 6121.
- Kharazmi, M.; Bauer, T.; Hammes, W. P.; Hertel, C., 2003b: Effect of food processing on the fate of DNA with regard to degradation and transformation capability in *Bacillus subtilis*. *Systematic and Applied Microbiology* **26**, 495.
- Lutz, B.; Wiedemann, S.; Albrecht, C., 2005: Degradation of Cry1Ab-protein from genetically modified maize in the bovine gastrointestinal tract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Web Release Date: February 8, 2005.
- Nielson, K. M.; van Elsas, J. D.; Smalla, K., 2000: Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 (pFG4AntpII) with transgenic plant DNA in soil microorganisms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1237.
- Prudhomme, M.; Libante, V.; Claverys, J. P., 2002: Homologous recombination at the border: insertion-deletions and the trapping of foreign DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **19**, 2100.
- Studer, E.; Dahinden, I.; Lüthy, J.; Hübner, P., 1997: Detection of the genetically engineered Maximizer-maize using the polymerase chain reaction (PCR). *Mitt. Gebiete. Lebensm. Hyg.* **88**, 515.
- Vasquez-Padron, R. I.; Gonzales-Cabrera, J.; Garcia-Tovar, C.; Neri-Bazan, L.; Lopez-Revilla, R.; Hernandez, M.; Moreno-Fierro, L., de la Riva, G. A., 2000: Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. Kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271**, 54.
- Zwahlen, C.; Hilbeck, A.; Gugerli, P.; Nentwig, W., 2003: Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the fields. *Molecular Ecology* **12**, 765.

PUBLIKATIONSBEITRAG

Lutz, B., C. Albrecht, R. Kühn, O. Rottmann, B. Killermann, R. Einspanier und H.H.D. Meyer.

Fate of transgenic maize and rapeseed in non-targeting wildlife: Intake, degradation of DNA and protein, and endozoochory by wild pigs (*Sus scrofa*) and pheasants (*Phasianus colchicus*)

Wildlife Biology (eingereicht; 2005 c)

Fate of transgenic maize and rapeseed in non-targeting wildlife: Intake, degradation of DNA and protein, and endozoochory by wild pigs (*Sus scrofa*) and pheasants (*Phasianus colchicus*)

Lutz B¹, Albrecht C¹, Kuehn R², Rottmann O³, Killermann B⁴, Einspanier R^{1,5} and Meyer HHD¹

¹ Physiology Weihenstephan, Technical University Munich, Weihenstephaner Berg 3, D-85354 Freising, Germany

² Wildlife Biology and Wildlife Management Unit, Technical University Munich, Am Hochanger 13, D-85354 Freising, Germany

³ Livestock Biotechnology, Technical University Munich, Hochfeldweg 1, D-85354 Freising, Germany

⁴ Bavarian State Research Center for Agriculture, Lange Point 6, D-85354 Freising, Germany

⁵ New address: Institute of Veterinary Biochemistry, Free University Berlin, Oertzenweg 19b, D-14163 Berlin, Germany

Words: 6164

Tables: 2

Figures: 2

Running title: Feeding wild pigs and pheasants with GM maize

Corresponding author:

Heinrich H.D. Meyer
E-mail: physio@wzw.tum.de
Phone: +49 8161 71 3508
Fax: +49 8161 71 4204

Key words: Cry1Ab protein . Genetically modified plants . Bt-maize . Rapeseed . Endozoochory . Wildlife .

Abstract

Feeding experiments with wild pigs and pheasants were carried out to investigate the fate of recombinant DNA and its products of protein in wild pig and pheasant digestion and dispersal of germinable maize seed and rapeseed (endozoochory). A diet of rapeseed and isogenic and transgenic maize expressing Cry1Ab protein against the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) was fed. The degradability of ingested transgenic plant DNA and recombinant Cry1Ab protein in wild pigs and pheasants was studied using polymerase chain reaction (PCR) and immunodiagnostic techniques. It is shown that chloroplast-specific DNA fragments were detectable by PCR in several tissues of pheasants and in gastrointestinal contents of wild pigs. Recombinant DNA was detectable in gastric contents of wild pigs but no recombinant DNA could be detected in pheasant samples. Using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) positive signals of immunoactive Cry1Ab protein were detectable in samples of the gastrointestinal content of wild pigs, whereas no signals were found in pheasant samples. No viable rapeseed was found in feces of wild pigs and neither intact maize kernels nor rapeseed were detectable in feces of pheasants. Investigations regarding a possible dispersal of germinable seeds by wild pigs or pheasants predict a minor likelihood as rarely maize seeds pass the gastrointestinal tract of wild pigs in a still germinable status.

Introduction

Since their commercial release in 1996, genetically modified (GM) plants are grown on a large-scale worldwide. In 2004 a total of 81.0 million hectares of GM crop, thereof 19.3 million hectares maize and 4.3 million hectares rapeseed, were planted world wide (James, 2004). The main GM maize variants as well as transgenic insect resistance rapeseed have been modified to express the Cry1Ab protein originating from *Bacillus thuringiensis* (Champolivier et al., 1999) targeting the pest insect, *Ostrinia nubilalis* (Höfte and Whiteley, 1989).

Public organizations as well as private companies carried out manifold investigations concerning genetically modified plants (e.g. Vazquez-Padrón et al., 2000; Zwahlen et al., 2003; Phipps et al., 2003). However, cultivation of transgenic plants raises still several questions in the environmental and agricultural context. No or little information is available about the impact on fauna, especially on wildlife feeding on transgenic plants. Intake and dispersal of transgenic DNA, its products of protein and germinable seeds onto fields planted with isogenic plants and surrounding biotopes by wild animals might be possible. This study aimed to tackle these topics performing feeding experiments with wild pigs and pheasants.

In many European countries the populations of wild pigs increased during the past decades (Geisser, 1998; Eisfeld & Hahn, 1998). The populations established in Australia, North America and islands such as New Zealand result from introductions by man (Bratton, 1975; Goulding et al., 1998). Wild pigs are well adapted to the modern agricultural structures, and thrive even in areas highly influenced by human activity (Genov, 1981; Geisser & Bürgin, 1998). The diet of the omnivorous wild pigs consist predominantly of vegetable and only secondarily of animal feed. In autumn, they consume maize plants in fields, in spring they root out the maize seeds (Mackin, 1970; Schley & Roper, 2003). Observations showed that

wild sows living at the edge of a forest spend 50% of their nightly activity in cultivated fields (Hahn, 2002).

Pheasants originate from Asia and occur almost in all European countries as well as in North America (Reinwald, 1993; Giudice & Ratti, 2001). The diet of adult pheasants consists of up to 80% of grains of cultivated species, usually provided by maize and grain wasted in the harvest process. They unearth and feed on newly sowed seeds as well as the hypocotyl of young plants, and quite old maize seedlings having reached the 4th to 6th leaf stage (Knight, 1995). Both wild pigs and pheasants can be potential circulators of maize and rapeseed kernels, making them interesting candidates to study the likelihood of a potential dispersal of germinable transgenic seeds.

In order to investigate the degradation of DNA during digestion in wild pigs and pheasants, fragments of the ubiquitous plant gene coding for the *rbcL* gene (rubisco large subunit, 1431 bp), the maize specific *zein* (558 bp) and *invertase* (4233 bp) genes as well as the transgenic *cry1Ab* gene (1947 bp) were analyzed. The rubisco enzyme catalyzes the carbon fixation reaction within the chloroplasts of each green plant whereas the 10 kDa zein protein belongs to a group of globular proteins found mainly in cereals. Invertase (α -fructofuranosidase) is involved in plant sucrose metabolism.

Results of feeding experiments with comparable farm animals, namely pigs and chicken, fed with transgenic maize were published recently (Chowdhury et al., 2003; Weber et al., 2000; Einspanier et al., 2001). Chowdhury et al. (2003) detected 242 bp fragments of the *zein* gene, 226 bp fragments of the *invertase* gene and 1028 bp fragments of the *rubisco* gene (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase) in the gastrointestinal (GI) contents of domestic pigs fed with transgenic and isogenic maize. Fragments of the recombinant *cry1Ab* gene (110 bp and 437 bp) were detected in the GI contents of pigs fed with recombinant Bt-11 maize

(Chowdhury et al., 2003). Neither corn intrinsic nor *cry1Ab* gene fragments were found in the peripheral blood by PCR. In GI contents ELISA indicated the presence of the Cry1Ab protein. Einspanier *et al.* (2001) amplified a 199 bp chloroplast-specific gene fragment in chicken tissues (muscle, liver, spleen, kidney). *Cry1Ab* gene specific constructs originating from recombinant Bt176 maize were not detectable in any of these poultry samples. To our knowledge no data are available about dispersal of germinable maize seed and rape seed through poultry or domestic pig dung because generally kernels are being fed in ground condition (Kirchgessner, 1997).

The aims of this study were to investigate varieties of ingestions of transgenic and isogenic corn by pheasants and wild pigs, the likelihood of uncontrolled dispersal (endozoochory) of maize seed and rapeseed and the fate of immunoactive Cry1Ab protein and foreign plant DNA *in vivo* in these animals.

Material and Methods

Animal diets

Isogenic (Antares) and transgenic (Navares, Bt176) maize (Syngenta International AG, Basel, Switzerland) were planted and grown on experimental fields of the Bavarian State Research Center for Agriculture in Poing, Germany. Commercially available rapeseed was provided by Wagner & Sohn ÖlsaatenverarbeitungsKG, Niederviehbach, Germany. The transgenic maize Novelis (MON810, Monsanto, St. Louis, USA) was provided by Monsanto Agrar Deutschland GmbH.

Navares (Bt176) contains two copies of a synthetic truncated *cry1Ab* gene under the regulation of a promoter derived from the maize phosphoenolpyruvate carboxylase gene and of a promoter from a maize calcium-dependent carboxylase gene. In Novelis (MON810) one copy of the *cry1Ab* gene is inserted under regulation of the cauliflower mosaic viral P-35S promoter. Navares does express the Cry1Ab protein in green parts of the plant and in pollen

whereas in Novelis the transgenic protein is found additionally in maize cobs. In Navares the expression rate of Cry1Ab protein starts at high levels but the concentration markedly decreases after pollen dispersal, whereas Novelis expresses the Cry1Ab protein during the whole vegetation period.

Feeding experiments with wild pigs

Two feeding experiments with wild pigs were carried out. The first experiment consists of 2 animals fed with isogenic (Antares) and 3 sows fed with transgenic (Navares) maize. The live weights of the wild pigs were between 45-55 kg. Antares and Navares were fed as fresh maize and kernels for five weeks. The average daily feed intake (ADFI) was 1.5 kg fresh maize, 0.25 kg maize kernels and 0.1 kg rapeseed.

In the second experiment five wild pigs were fed with transgenic and three with chopped isogenic maize and maize kernels. The live weights of the animals were between 35-40 kg. The ADFI of the transgenic fed animals was 1.0 kg Navares, 0.25 kg maize kernels and 0.1 kg rapeseed per day. The isogenic fed animals obtained a diet of 1.0 kg Antares, 0.25 kg maize kernels and 0.1 kg rapeseed per day.

Rapeseed was added to investigate a possible dispersal by wild pigs. In both experiments water and additional fodder (minor amounts of wheat and potatoes) were available ad libitum.

In addition protein-vitamin-mineral supplement was offered.

Feeding experiments with pheasants

A total of three feeding experiments including three groups each was performed. In experiments I & II, each group with 5 pheasants were fed with isogenic maize kernels (Antares), transgenic maize kernels (Navares) and rapeseed, respectively. All pheasants were

approximately 12 months old. The ADFI was 48.7 ± 3.2 g transgenic maize, 45.1 ± 2.7 g isogenic maize or 34.5 ± 2.3 g rapeseed, respectively.

Investigating the impact on indigestion of dispersal of maize seed and rapeseed, it was appropriate that in experiment III 12 pheasants grew up without grit in the gizzard. Before feeding isogenic and transgenic maize one group was fed with rapeseed. Each group consisted of four pheasants at an age of approximately six months. The pheasants were fed either with isogenic maize (Antares) or with the transgenic maize cultivars Navares or Novelis. The ADFI was 34.5 ± 0.9 g Antares, 34.6 ± 2.6 g Novelis, 32.6 ± 1.7 g Navares or 26.4 ± 0.5 g rapeseed, respectively. Each group obtained 28 g supplemental feed per day. The duration of the feeding experiments were 33, 40 and 37 days for experiment I, II, and III, respectively. Feed (maize or rapeseed, some fresh plant leaves) and water were available ad libitum.

To exclude the possibility of contamination between the isogenic and transgenic diets during the feeding studies, samples were subjected to DNA extraction and PCR techniques using the same primer pairs as for the animal samples.

All feeding experiments were done according to the guidelines of the Department of Physiology, Technical University Munich, in view of animal welfare.

Germination tests for maize seed and rapeseed

Prior to the feeding the germination potential of maize and rapeseed were examined. The seeds were tested under optimal standard conditions according to the International Rules for Seed testing (International Seed Testing Association, ISTA, Switzerland 2004). The tests of maize, which were performed with 4 x 100 pure seeds for each cultivar were carried out in sand at 20°C and 8 hours daylight. The tests of rapeseed with 4 x 100 pure seeds each were carried out in the Jacobsen germination apparatus at alternating temperatures, 8 hours daylight (30°C) and 16 hours darkness (20°C). Seedlings were evaluated after seven days, the

evaluation categories being “normal seedlings”, “abnormal seedlings”, “fresh” and “dead” seeds (according ISTA Rules).

The result of the germination test was calculated as the mean of 4 x 100 seed replicates. It is expressed as a percentage by number of “normal seedlings”. The percentage of “abnormal seedlings”, “fresh” and “dead” seeds was calculated accordingly.

The viability of the non-germinated “fresh” maize seeds was determined with the “Topographical Tetrazolium Test”, according to ISTA Rules. The seeds were cut longitudinally through the embryo and the endosperm and then incubated for 24 hours in 1% 2,3,5-Triphenyl-tetrazolium-chloride solution (w/v) at 30°C in darkness. In viable seeds the tissue of the essential structures stains completely. Viable seeds are defined as those that show the potential to produce “normal seedlings”.

Sampling procedure

During all feeding experiments the feces were collected and washed in a strainer to separate maize and rapeseed. After slaughter the rectum contents were scanned to find intact maize kernels and rapeseed. Immediately prior to germination tests, isolated seeds were cleaned with water and dried.

To exclude contaminations the isogenic fed groups were slaughtered prior to the animals fed with transgenic maize. Samples for DNA and protein analysis were taken from all visceral organs, GI contents and muscles. Samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analyses. Epithelial tissues were washed thoroughly with PBS buffer to remove ingesta. Additionally, the exterior tissues of intestine samples were discarded to avoid the amplification of DNA fragments from GI content.

DNA analysis

Tissue and ingesta samples were ground using the FastPrep-System (BIO101, Carlsbad, USA) and finally dissolved in 1000 µl TriFast (Peqlab, Erlangen, Germany). After an incubation period, phenol/chloroform extraction and precipitation with ethanol was followed. The purification was accomplished using the Nucleo Spin Plant Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA was finally eluted in CE-buffer (Nucleo Spin Plant Kit). Oligonucleotide primers used for PCR amplification of fragments of the *cry1Ab*, *rbcL* and *zein* genes were designed referring to GenBank Accession No. I41419 (*cry1Ab* gene from patent US 5625136), No. X86563 (*Zea mays* chloroplast genome) and No. U25674 (*Zea mays* 10 kDa *zein* gene), respectively.

All amplification reactions were carried out on a gradient thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). The reaction volume consisted of 150 ng DNA; 1x PCR reaction buffer (ABgene, Epsom, UK); 2.5 mM MgCl₂ (ABgene); 0.4 µM primer (Metabion, Martinsried, Germany); 0.2 mM dNTPs (ABgene) and 0.5 units Thermoprime Plus DNA Polymerase (ABgene). The master mixes for the 1753 bp and 2521 bp amplification included 3.5 mM MgCl₂. Primer sequences and cycling conditions are listed in Table 1. For agarose gel electrophoresis 10.0 µl of each amplification reaction were separated on 1.8% agarose gel stained with ethidium-bromide and visualized using an UV transilluminator. The gels were digitized using a video documentation system (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex 1, France); amplicons were isolated and commercially sequenced (MediGenomics, München, Germany).

The *cry1Ab* and *invertase* gene were analyzed using the "LightCycler GMO Maize Quantification Kit" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. The PCR amplifications were performed in a total volume of 15.0 µl, containing 50 ng DNA, 11.0 µl H₂O, 2.0 µl LightCycler GMO Maize Detection Mix and 2.0 µl LightCycler GMO Maize Enzyme Master Mix. Primer for *cry1Ab* and *invertase*

gene amplifications were included in the “LightCycler GMO Maize Quantification Kit”. For PCR analyses of *rbcL*, *zein* and *invertase* gene fragments, buffer and H₂O and for *cry1Ab* gene analyses, samples of isogenic fed animals and isogenic maize were used as negative control.

Cry1Ab protein analyses

Estimation of the Cry1Ab protein was carried out using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit according to the manufacturer’s instructions (Agdia Inc., Elkhart, USA). The control Cry protein, provided by the supplier, was diluted and used in following concentrations to create a standard curve: 0.015, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 and 1.6 ng/ml. The results were expressed as Cry1Ab protein (ng) per g wet sample. All samples were measured in duplicates.

To determine the fragment size of the Cry1Ab protein estimated by ELISA we applied an immunoblotting technique as described previously (Lutz et al., 2005). The samples were prepared as for the ELISA technique and were applied to SDS-PAGE on a 4-12% gradient Bis-Tris gel (NuPage, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). After separation and transfer onto a nitro-cellulose membrane Cry1Ab protein was detected using a polyclonal rabbit anti-Cry1Ab/1Ac antibody (final concentration 5 µg/ml; Agdia Inc., 60 min) followed by a secondary antibody solution (biotinylated anti-rabbit IgG in casein solution; final concentration 1.5 µg/ml, 30 min). For signal amplification membranes were incubated for 10 min in Vectastain ABC-AmP Reagent (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA). Isogenic maize served as negative control and Cry1Ab/1Ac protein included in the ELISA kit served as positive control. Excluding any cross-reactions, e.g. animal or intestinal bacteria proteins, samples of isogenic fed animal were used as control samples.

Statistical Analyses

The standard t-test method was used to compare the experimental results of DNA and Cry1Ab protein analyses of isogenic and transgenic fed animals as well as results of germination tests using SigmaStat statistical software (version 3.0, SPSS Inc., Chicago, USA).

Results

Germination tests

Prior to the feeding experiments germination tests with isogenic (Antares, n=8), transgenic maize (Navares, n=8) and rapeseed (n=16) were accomplished. These assays revealed a germination of $74.5 \pm 3.7\%$ normal seedlings, $11.3 \pm 2.3\%$ abnormal seedlings and $14.3 \pm 3.3\%$ dead seeds for Antares; $79.3 \pm 5.6\%$ normal seedlings, $10.1 \pm 3.6\%$ abnormal seedlings and $10.6 \pm 2.7\%$ dead seeds for Navares, and $93.5 \pm 3.7\%$ normal seedlings, $4.5 \pm 2.8\%$ abnormal seedlings and $2.3\% \pm 1.9\%$ dead seeds for rapeseed (classification was accomplished according to ISTA rules).

A total of 65 kg rapeseed ($\approx 13.0 \cdot 10^6$ seeds), 98 kg Antares ($\approx 0.35 \cdot 10^6$ seeds) and 114 kg Navares ($\approx 0.41 \cdot 10^6$ seeds) was fed in the wild pigs feeding studies but only 51 intact isogenic maize seeds and 37 intact transgenic maize seeds were isolated from feces during the feeding period and from rectum content after slaughter. The germination test resulted in one normal growing transgenic and one abnormal growing isogenic maize seedling. The viability test showed that the non-growing fresh maize seeds were in nonviable conditions. No intact rapeseed could be isolated from feces and rectum content; only fragments were detected.

In the feeding experiments with pheasants a total of 29.5 kg rapeseed ($\approx 5.9 \cdot 10^6$ seeds), 34.9 kg ($\approx 0.12 \cdot 10^6$ seeds) isogenic and 36.4 kg ($\approx 0.13 \cdot 10^6$ seeds) transgenic maize were fed, but no intact maize and rapeseed kernels were found in feces and GI contents scanned after

slaughter. In all gizzards, also from pheasants which grew up without grit, all seeds had been ground into small particles.

DNA analyses

PCR amplification of transgenic and isogenic diets revealed amplicons using *rbcL* primer pairs, but fragments of the *cryIAb* gene were amplified only in transgenic feed which excludes any contamination of isogenic maize with components of the transgenic cultivar.

Rubisco DNA fragments of 173 bp length were detectable in all ingesta samples of wild pigs (Fig. 1A, panel I, lane 2-5). *rbcL* gene fragments with amplicons up to 1753 bp were only generated from residual DNA extracted from samples of gastric content (Fig. 1A, panel I, panel II, panel III, lane 2). A *rbcL*-specific amplicon of the 2521 bp could not be detected in any of the samples except in the positive control (data not shown). DNA fragments of the *cryIAb* gene with sizes up to 727 bp could only be amplified in samples of gastric content (Fig. 1B, panel I and II, lane 2). Fragments of the *cryIAb* gene with sizes of 1423 bp could not be detected.

In all pheasant samples fragments of the *rbcL* gene (199 bp) and the *zein* gene (329 bp) could be amplified using conventional PCR. *rbcL* gene fragments were detectable in all tissues examined as well as in samples of the GI content. In contrast, the *zein* gene fragment was not found in feces and blood. In all investigated samples the detection rate of fragments of the *zein* gene were lower compared with the *rbcL* gene. Results of the different PCR analysis in pheasant samples are summarized in Tab. 2.

The “LightCycler GMO Maize Quantification Kit” allows the amplification and detection of an approximately 100 bp size fragment of the synthetic *cryIAb* gene together with the maize-specific *invertase* gene. Results obtained from sample material with crossing points greater than 36 for either the *cryIAb* or *invertase* gene were considered as negative.

The *cry1Ab* gene fragment was found in samples of stomach (n=3) and jejunum content (n=1) from transgenic fed (n=7) wild pigs. The *invertase* gene fragment was detectable in stomach content of wild pigs (n=2). All other samples were negative for both genes.

Analysis of the gizzard content samples of pheasants fed with transgenic maize (n=10) revealed an amplicon of the samples for *invertase* gene fragments whereas no fragments of the *cry1Ab* gene could be amplified in any pheasant sample. A summarization and comparison of the PCR results of the *rubisco* (*rbcL*) and *cry1Ab* gene of wild pigs and pheasants samples are shown in Fig. 2.

***Cry1Ab* protein analyses**

Cry1Ab protein was tested by ELISA and immunoblotting techniques. Immunoactive Cry1Ab protein was detectable in samples of gastric content (3.50 ± 3.23 ng/g), colon content (0.67 ± 0.11 ng/g) and rectum content (1.58 ± 0.59 ng/g) of transgenic fed wild pigs, respectively. The analysis of all pheasant samples yielded no positive signals of immunoactive Cry1Ab protein. In order to determine the fragment size of the Cry1Ab protein detected by ELISA, i. e. to assess a potential fragmentation of the Cry1Ab protein, the samples were tested in an immunoblotting assay. No Cry1Ab specific bands were detected which was founded in low Cry1Ab protein yields in the GIT content samples for immunoblotting analyses. Samples of transgenic maize and the positive control (Cry1Ab/1Ac protein included in the ELISA kit) showed specific bands as expected yielding a protein with the appropriate size of 60 kDa (data not shown).

Discussion

This study was done to test the potential impact of GM plant cultivation on wild animals and the dispersal of germinable seeds (endozoochory), genes and gene products.

No differences in the average daily feed intake of isogenic and transgenic fed wild pigs and pheasants were found. The results are in agreement with data summarized and published by Chesson and Flachowsky (2003) referring to various lines of insect resistant (*Bt*) and glyphosate-resistant maize in poultry nutrition. However, it has been previously shown that inserting synthetical genes can result in unpredictable effects. Saxena & Stotzky (2001) observed a higher content of lignin in all *Bt* corn hybrids as compared to their respective non-*Bt* isogenic line.

Analyses to study the endozoochory of germinable maize seed and rapeseeds by wild pigs showed that excreted maize seeds were hardly able to germinate. They retain their germination capacity only in extremely rare cases - obviously due to degradation by gastric acid and digestive enzymes. Because of the short retention time in the gastric there has not been induced dormancy. It should be noted different feeding behavior, minute pulverization of seeds or shorter digestion time in the GIT due to diarrhea might reflect in excretion of more germinable seeds. However, Heinken et al. (2005, 2002, 2001) investigated the dispersal of vascular plant diaspores (seeds and fruits) by wildlife, e.g. wild boar. It was shown that wild boar transported large amounts of various diaspores in the coats and hooves (epizoochory). In feces of wild pigs 76 vascular plant species, also of economic plants were found (Heinken et al., 2005; Hahn, 2002). Excrete seeds have necessarily sizes of more than 1 mg (Heinken et al., 2005).

Additionally it should be noted that *Zea mays* is known to be sensitive to low temperatures and is unable to tolerate frost (Lütke-Entrup & Oehmichen, 2000 a,b). The germination of maize seed starts with temperatures above 10°C and has its optimum temperature at 25°C (Hoffmann et al., 1985). After excretion, maize seeds are moist and macerated. If they get cold in this condition they cannot survive and therefore there is a minute probability that germinable maize seeds excreted by wild pigs survive in regions with low temperature.

However, in warmer regions survival cannot be excluded. In contrast to maize, rapeseed retain their germination capacity up to 5 years, sometimes even longer. If rapeseeds are placed in favorable environmental conditions, their germination capacity will be maintained and their development could be possible (Pekrun et al., 1998). A gene flow from GM canola (*Brassica napus*) to weedy relatives, such as *Brassica rapa* and *Raphanus raphanistrum*, was described by Steward et al. (2002). The assumed gene flow will be a very rare but extremely important event. Transgenic wild relatives with insect resistance conferred by Cry1Ac protein, would have no advantage and would therefore not constitute a special problem.

In our feeding experiments with pheasants no germinable maize seed and rapeseed were found in feces. The pheasants pulverize the maize kernels and rapeseed indicating negligible likelihood for a dispersal of maize kernels and rapeseed by pheasants.

The degradation of foreign DNA in the GIT of wild pigs was investigated to assess the fate of the recombinant *cry1Ab* gene. Due to a better detectability the *rbcl* gene was used as a model to analyze the degradation of ingested DNA.

Several fragments of the high copy maize chloroplast gene (*rbcl*) could be amplified. The data agree with results of studies performed with domestic pigs (Chowdhury et al., 2003). Similar DNA degradation patterns were found between domestic and wild pigs. However, while in our study the *cry1Ab* gene was detectable up to sizes of 727 bp in gastric content, Chowdhury et al. (2003) tested only *cry1Ab* amplicons of 110 bp which they found in contents of all parts of the GIT. Phipps & Beever (2000) concluded that the enzymatic activity of the gut ensures extensive degradation of nucleic acids contained in feed.

However, *rbcl* gene fragments were detectable in all kind of samples of isogenic and transgenic fed pheasants. Whereas fragments of the maize specific *zein* gene were not found in feces and blood. In contrast to the results obtained for the amplification of *rbcl* gene fragments, all samples (blood, tissue and GI content) gave negative results with *cry1Ab*

specific primers. These results are in agreement with data published by Einspanier et al. (2001) showing successfully PCR amplifications of chloroplast DNA (199 bp) in muscle, liver, spleen and kidney of chickens, but no amplicon for *cry1Ab* DNA fragments could be detected.

Our results indicate that feed ingested DNA is partially resistant to mechanical, chemical and enzymatic activities of the GIT of wild pigs and pheasants and is not completely degraded. Concerning feed passage no differences between isogenic and transgenic maize DNA were found. Small DNA fragments derived from plants can pass the gut epithelium and enter the blood, some organs and tissues of pheasants. At the jejunum and ileum, the proposed sites of absorption, the traceability of poorly digested or undigested material is increased (Whittow 2001). Any small polynucleotide DNA fragment that might enter the body and blood may be phagocytized by mononuclear leukocytes and further degraded by cellular enzymes and nucleases in different tissues (Doerfler, 2000).

Positive signals of the Cry1Ab protein in samples from stomach, colon and rectum of wild pigs were measured using ELISA. None of the isogenically fed wild pigs showed positive reaction to the Cry1Ab protein excluding any cross-reactions with maize-specific components. Immunoblotting yielded no significant bands of the Cry1Ab protein of approximately 60 kDa. The ELISA data are in agreement with studies published by Chowdhury et al. (2003) where the Cry1Ab protein in various GI contents of Bt11 fed pigs was measured and immunoblotting of gastric content samples resulted in a weak band of 65 kDa mass. In tissue samples of wild pigs (this study) as well as of domestic pigs (Chowdhury et al., 2003) no Cry1Ab protein was detectable.

We assume that no or only minute amounts of bioactive Cry1Ab protein will leave the GIT of wild pigs. There are no apparent differences in the degradability comparing studies with wild pigs (this study) and domestic pigs (Chowdhury et al., 2003). Any potential impact of the

Cry1Ab protein on mammalian cells would possibly be confined to epithelial cells of the GIT. Potential immunological reactions of epithelial cells caused by exposure to the Cry1Ab protein should be subject of further investigations.

All pheasant samples were negative for Cry1Ab as well. This compares well with the study of Jennings et al. (2003) where neither the Cry1Ab protein nor immunoreactive peptide fragments were detectable in the breast muscle from chicken fed transgenic Bt-grain. It was shown that the Cry1Ab protein was readily degraded under simulated gastric conditions suggesting that the existence of intact Cry1Ab protein was highly unlikely.

Conclusion

In wild pigs plant or recombinant DNA fragments could be amplified in ingesta samples but not in tissue samples, while in pheasants fragments of chloroplast and zein DNA in tissue samples and visceral organs were detectable. We assume that this deviation is due to different digestion systems allowing DNA fragments to permeate the GIT in some birds. However, transgenic and isogenic genes differ only in nucleotide sequences and it is unlikely that synthetic genes are inserted in the human or animal genome. With regard to the Cry1Ab protein, ELISA results suggest that the enzyme activities in the GIT of pheasants are more effective in degradation of the recombinant Cry1Ab protein as in the GIT of wild pigs. The possibility of an uncontrolled dispersal of germinable maize kernels and rapeseed is extremely low for both wild boar as well as pheasant caused by the effective mastication and digestion process.

Acknowledgements

This study was supported by the Federal Agency for Nature Conservation (BfN grant No. 20767432). We are indebted to T. Stelzl, I. Celler (TUM, Freising) and S. Mosch (Bavarian

State Research Center, Freising) for their assistance. We thank M. Schmidt and C. Gerschlager (TUM, Freising) for organization and logistics during the pheasant and wild pig experiments.

Literature Cited

Bratton, S.P. (1975) The effect of the European wild boar, *Sus scrofa*, on Gray Beech Forrest in the Great Smocky mountains. *Ecology*, **56**, 1356-1366.

Champolivier, J., Gasquez, J. & Messéan, A. (1999) Crop management of transgenic rapeseed: Risk assessment of gene flow. In New horizons for an old crop. *Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress*, Canberra, Australia.

Chesson, A. & Flachowski, G. (2003) Transgenic plants in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal*, **59**, 201-207.

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

Dörfler, W. (2000) *Foreign DNA in mammalian systems*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.

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

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

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

Geisser, H. & Bürgin, T. (1998) *Das Wildschwein*. Verlag Desertina, Chur, Switzerland.

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

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

Goulding, M.J., Smith, G. & Baker, S.J. (1998) Current status and potential impact of wild boar (*Sus scrofa*) in the English countryside: a risk assessment. *Report to the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food*. Central Science Laboratory, York

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

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

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

Heinken, T., Lees, R., Raudnitschka, D. & Runge, S. (2001). Epizoochorous dispersal of bryophyte stem fragments by roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boar (*Sus scrofa*). *Journal of Bryology* **23**, 293-300.

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

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

International Rules for Seed Testing (2004) The international Seed Testing Association (ISTA). CH-Switzerland. ISBN 3-906549-38-0.

James, C. (2004) Preview: Global status of commercialized biotech/GM crops: 2004. ISAAA: Ithaca, NY, USA. *ISAAA Briefs*, **32**.

Jennings, J.C., Albee, L.D., Kolwyck, D.C., Suber, J.B., Taylor, M.L., Hartnell, G.F., Lirette, R.P. & Glenn, K.C. (2003) Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard Corn borer corn. *Poultry Science*, **82**, 371-380.

Kirchgessner, M. (1997) *Tierernährung*. 10. Aufl., Verlags Union Agrar, DIG-Verlags-GmbH, Frankfurt am Main.

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

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

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

Lutz, B., Wiedemann, S., Einspanier, R., Mayer, J. & Albrecht, C. (2005) Degradation of Cry1Ab-protein from genetically modified maize in the bovine gastrointestinal tract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1454-1456.

Mackin, R. (1970) Dynamics of damage caused by wild boar to different agricultural crops. *Acta Theriologica*, **15**, 447-458.

Nielson, K.M., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 (pFG4DntpII) with transgenic plant DNA in soil microorganisms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 1237-1242.

Pekrun, C., Lutman, P.J.W. & Baeumer, K. (1998) Research on volunteer rape. A review. *Pflanzenbauwissenschaften*, **2**, 84-90.

Phipps, R.H. & Beever, D.E. (2000) New technology: Issues relating to the use of genetically modified crops. *Journal of Animal and Feed Sciences*, **9**, 543-561.

Phipps, R.H., Deaville, E.R. & Maddison, B.C. (2003) Detection of transgenic and endogenous plant DNA in rumen fluid, duodenal digesta, milk, blood and feces of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **86**, 4070-4078.

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

Saxena, D. & Stotzky, G. (2001) Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. *American Journal of Botany*, **88**, 1704-1706.

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

Steward Jr, N.C., Halfhill, M.D. & Warwick, S. (2002) *Gene flow and its consequences: Brassica napus (canola, oilseed rape) to wild relatives*. Gene flow workshop, The Ontario State University, March 2002: 106-112

Vázquez-Padrón, R.I., Ganzález-Cabrera, J., García-Tovar, C., Neri-Bazan, L., López-Revilla, R., Hernández, K., Moreno-Fierro, L. & de la Riva, G.A. (2000) Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **271**, 54-58.

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 University 2000 Swine Day Report.

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

Table 1: Oligonucleotide sequences and conditions for conventional PCR method

Target gene	fragment size	primer sequences	initial denaturation	amplification steps	cycles	final extension	
crg1Ab	211 bp	5'-CTC TCG CCG TTC ATG TCC GT-3' 5'-GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT-3'	94°C, 3 min	94°C 30s; 56°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 2 min	
	420 bp	5'-CGG CCC CGA GTT CAC CTT-3' 5'-CTG CTG GGG ATG TTG TTG-3'	94°C, 3 min	94°C 30s; 56°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 2 min	
	727 bp	5'-ACG AGT GCA TCC CCT ACA AC-3' 5'-TAG TTG GGG AAC AGG CTC AC-3'	94°C, 5 min	94°C 30s; 56°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 5 min	
	1423 bp	5'-ACG AGT GCA TCC CCT ACA AC-3' 5'-AGG TTG GTG CTC TTG GTC AG-3'	94°C, 5 min	94°C 45s; 56°C 45s; 72°C 45s	40	72°C, 5 min	
rbcL	173 bp	5'-AGC TAA TCG TGT GGC TTT AGA AGC C-3' 5'-TGG TAT CCA TCG CTT TGA AAC CA-3'	94°C, 3 min	94°C 30s; 60°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 5 min	
	199 bp	5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3' 5'-GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC-3'	94°C, 3 min	94°C 30s; 61°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 5 min	
	384 bp	5'-ATT GCA ATT CAA TTC GGC TC-3' 5'-TGT ATG TCC CAG AAT AGG TCC C-3'	94°C, 3 min	94°C 30s; 53°C 30s; 72°C 45s	35	72°C, 5 min	
	896 bp	5'-AGG TAA GTT AGA AGG GGA ACG C-3' 5'-TGT ATG TCC CAG AAT AGG TCC C-3'	94°C, 5 min	94°C 45s; 58°C 45s; 72°C 45s	40	72°C, 5 min	
	1197 bp	5'-GGC CTA CTT CTT CAC ATT CAC C-3' 5'-CAT TCT CAT CGC CTT TCT ATC C-3'	94°C, 5 min	94°C 45s; 58°C 45s; 72°C 45s	40	72°C, 5 min	
	1753 bp	5'-GGC CTA CTT CTT CAC ATT CAC C-3' 5'-AAA CTC GCT ATA GTC GGC TAC G-3'	94°C, 5 min	94°C 45s; 58°C 45s; 72°C 45s	40	72°C, 5 min	
	2521 bp	5'-AAC TCA CAA CCA TTT ATG CGC-3' 5'-ATG CGA CGT TTT ATT CCA GG-3'	94°C, 5 min	94°C 60s; 64°C 60s; 72°C 60s	40	72°C, 10 min	
	zein	329 bp	5'-TGC TTG CAT TGT ACG CTC CCT AGC-3' 5'-GTC GCA GAG ACA TTG TGG CAT-3'	94°C, 3 min	94°C 30s; 61°C 30s; 72°C 30s	40	72°C, 2 min
		18S	365 bp	5'-AAG TCT TTG GGT TCC GGG-3' 5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA-3'	94°C, 2 min	94°C 30s; 60°C 30s; 72°C 30s	25

Table 2: Summary of detected DNA fragments in pheasant samples.

Pheasant		<i>rubisco</i>	<i>zein</i>	<i>invertase</i>	<i>cry1Ab</i>
content	gizzard	+	+	+	-
	jejunum	+	+	-	-
	caecum	++	+	-	-
	feces	++	-	-	-
epithelial tissue	crop	+	+	-	-
	glandular stomach	+	+	-	-
	gizzard	++	+	-	-
	jejunum	++	+	-	-
	duodenum	++	+	-	-
	ileum	+	+	-	-
	caecum	++	+	-	-
tissue	blood	+	-	-	-
	heart	+	+	-	-
	muscle	+	+	-	-
	liver	+	+	-	-
	spleen	++	+	-	-
	bursa fabricii	+	+	-	-
	kidney	+	+	-	-

“++” indicates target gene detected in more than 50 %, “+”: less than 50 % of analyzed pheasants. “-“ indicates no amplification was observed. DNA fragment length: *rubisco* (*rbcl*) = 199 bp, *zein* = 329 bp; *cry1Ab* = 211 bp. qPCR analyses: *cry1Ab* and *invertase* gene fragments of approximately 100 bp.

Figure Legends

Figure 1: Agarose gel electrophoresis of representative PCR products in wild pigs

A) *rubisco (rbcL)* gene. Primer pairs for detection of 173 bp, 896 bp, 1197 bp and 1753 bp were used. Lanes 1–12: 1= marker, 2= gastric content, 3= jejunum content, 4= colon content, 5= caecum content, 6= stomach septum, 7= jejunum septum, 8= colon septum, 9= caecum septum, 10= liver, 11= kidney, 12= spleen, 13= lymph node, 14= heart, 15= lung, 16= positive control (transgenic maize leaves), 17= negative control (H₂O).

B) *cry1Ab* gene. Primer pairs for detection of 420 bp and 727 bp were used. Lanes 1–6: 1= marker, 2= gastric content, 3= jejunum content, 4= colon content, 5= positive control (transgenic maize leaves), 6= negative control (isogenic maize leaves). Arrows indicate the size of the PCR amplification products. The maximally detectable fragment sizes are shown.

Figure 2: Summarization and comparison of PCR results of *rubisco (rbcL)* and *cry1Ab* gene fragments in GIT contents and organs of wild pigs and pheasants. Arrows indicate habitats of DNA fragments in GIT contents.

Figure 1

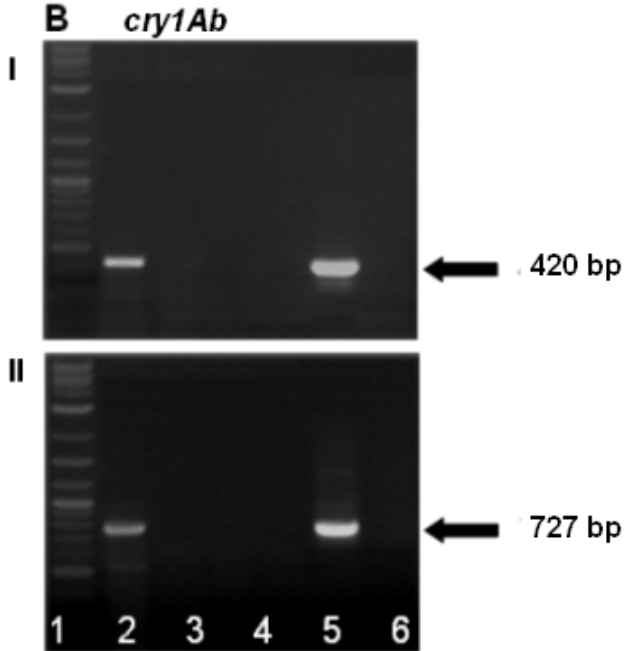
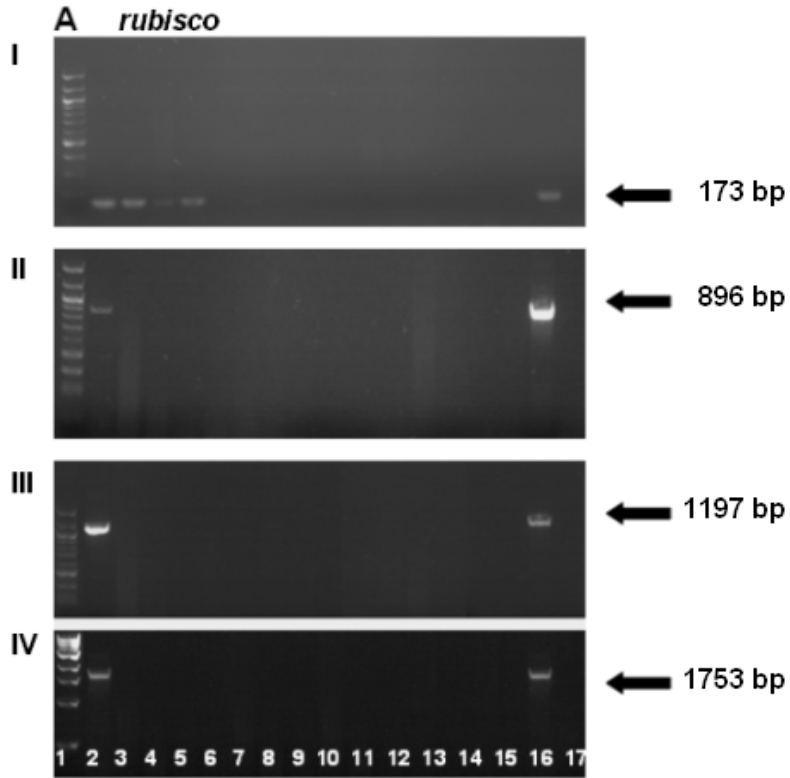
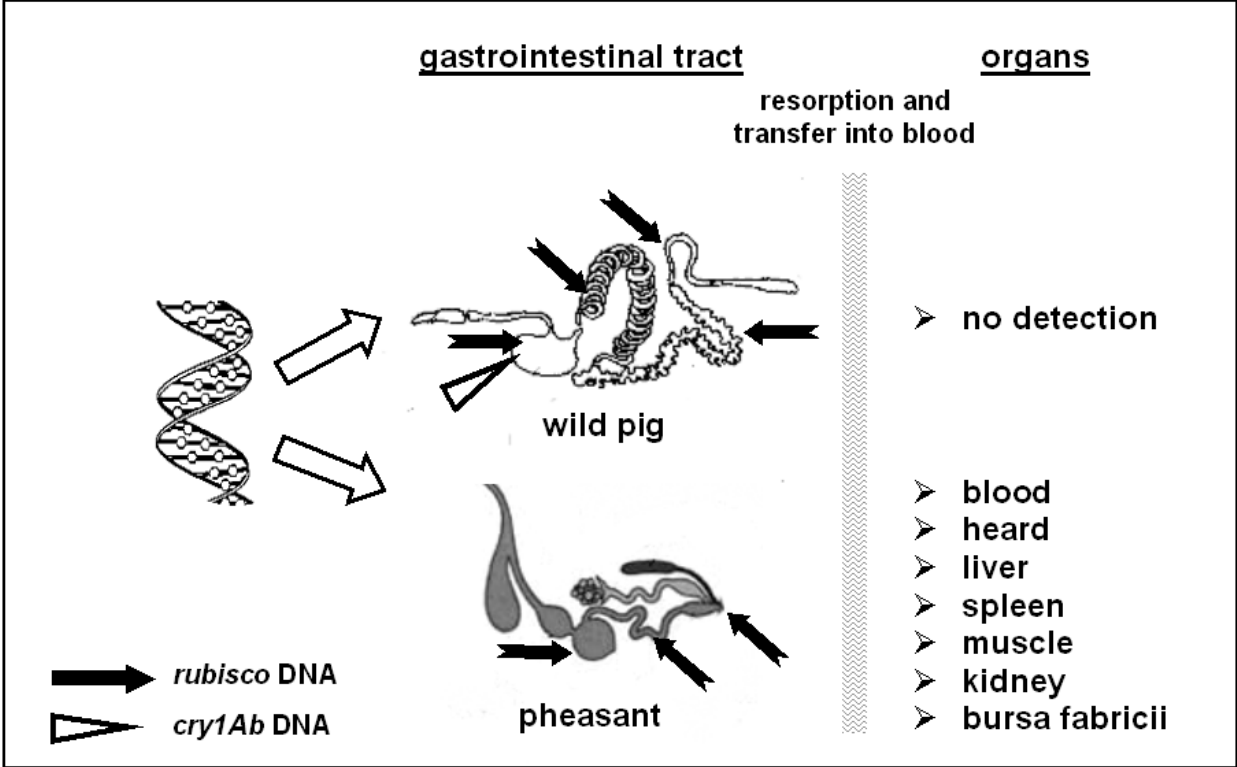


Figure 2



PUBLIKATIONSBEITRAG

Lutz B., C. Albrecht und H.H.D. Meyer.

Transgener Mais als Futtermittel - Fragen der Produktsicherheit bei Fleisch und Milch.

Deutsche Molkerei Zeitung 126: 30-33 (2005 d)



Foto: MIV

Transgene Futtermittel – Einfluss auf die Milchqualität?

Eine wissenschaftliche Bewertung

*Bodo Lutz, Dr. Christiane Albrecht, Prof. Dr. Heinrich H. D. Meyer,
Lehrstuhl für Physiologie, Technische Universität München-Weihenstephan*

Der Beitrag soll zu einer objektiven Auseinandersetzung mit dem Thema der Produktsicherheit von Milch nach der Verwendung von gentechnisch veränderten Futtermitteln beitragen.

In den vergangenen Jahren wurde in den Medien immer wieder über Fut- ter- und Lebensmittel aus gentechnisch veränderten Organismen (GVO) sowie über potentielle Auswirkungen auf die Qualität von Milch und Fleisch von Rindern durch die Fütterung von genetisch verändertem Soja und Mais berichtet. Manche Verbraucher zeigen sich verunsichert über Meldun-

gen, dass Bestandteile des pflanzlichen Erbgutes (Gene, DNA) nach der Aufnahme über den Weg der Verdauung in die Milch gelangen sollen.

Das Wort „Gen“ findet im modernen Sprachgebrauch in vielerlei Hinsicht seine Verwendung, wird aber zum Teil irreführend eingesetzt. Die DNS (Desoxy-Ribonuklein-Säure, DNS; engl. Deoxyribo-Nucleic-Acid,

DNA) bzw. Gene (DNA-Sequenzen, die als einzelne Einheiten für jeweils ein Protein kodieren), sind individuelle Bestandteile jedes bekannten Lebewesens und speichern sämtliche Erbinformationen. Auch chemisch betrachtet stellen die Bausteine der DNA für keine Lebensform eine Fremdstanz dar. Der Aufbau der DNA von Mensch, Tier, Pflanze und Mikroorga-

nismen ist analog, was einen beschränkten Transfer von gewünschten Eigenschaften von einem Organismus auf den anderen prinzipiell ermöglicht.

Als gentechnisch veränderte Organismen werden u.a. Pflanzen bezeichnet, deren Erbgut so verändert worden ist, wie es auf natürliche Weise durch Kreuzen und/oder durch natürliche Rekombination nicht möglich ist (Art. 2 Nr. 2 Freisetzungsrichtlinie RL 2001/18/EG). Bei der „Grünen Gentechnik“ gibt es im Wesentlichen drei Anwendungsfelder: a) die Veränderung der qualitativen Eigenschaften von Pflanzen (z. B. Proteinanteil oder Vitamingehalt erhöhen), b) Enzyme und therapeutisch wirksame Stoffe kostengünstig herzustellen („molecular farming“) oder c) die agronomischen Eigenschaften der Pflanze wie beispielsweise die Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegen Schädlinge, Herbizide, Trockenheit oder Kälte zu verbessern.

Seit dem ersten kommerziellen Anbau im Jahr 1996 werden transgene Pflanzen in vielen Ländern großflächig angebaut. Die weltweite Anbaufläche betrug im Jahr 2004 81,0 Millionen Hektar mit einem Anteil an transgenem Mais von 19,3 Millionen Hektar (14% des gesamten Maisanbaus) und 48,4 Millionen Hektar an transgenen Sojabohnen (James 2004). Weltweit wurde im vergangenen Jahr 56% des Sojaertrags mit GVO-Sorten erzeugt. Laut ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Metro Manila, Philippinen) wird der globale Anbau von GV-Pflanzen für das Jahr 2010 auf insgesamt 150 Millionen Hektar geschätzt (James 2004).

Durch die gentechnische Veränderung ist Soja resistent gegenüber Glyphosat enthaltenden Herbiziden. Glyphosat wirkt gegen fast alle Pflanzenarten toxisch und wird daher seit etwa 25 Jahren weltweit als sogenanntes Breitbandherbizid eingesetzt (z.B. zur Unkrautbekämpfung an Bahndämmen). Der Einsatz solcher Herbizide in Sojafeldern ist nun effektiver, da die unerwünschten Pflanzen absterben und das Soja nicht beeinträchtigt wird. Gentechnisch verändertes Soja gilt als gesundheitlich unbedenklich.

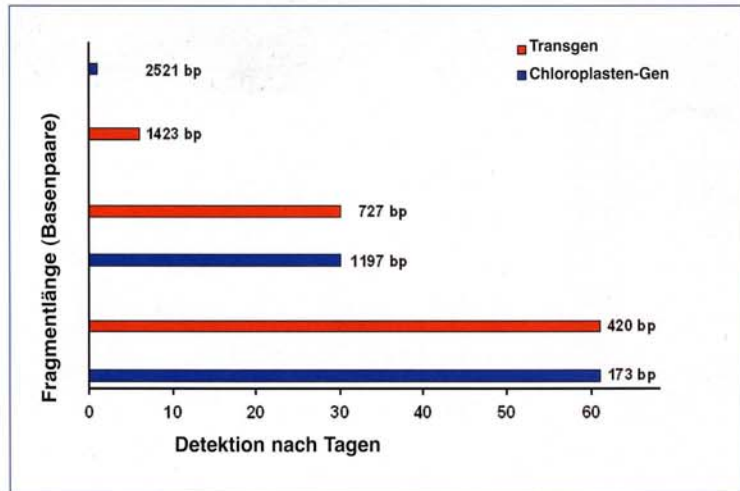


Abb. 1: Zusammenfassung der maximal nachweisbaren Fragmentlängen aus dem untersuchten Chloroplasten-Gen (*rubisco*-Gen) und aus dem Transgen (*cry1Ab*-Gen); nach Lutz et al. 2005b

Im Falle des transgenen Mais wurden Teile des Erbgutes eines natürlich vorkommenden insektenpathogenen Bodenbakteriums (*Bacillus thuringiensis*, Bt) in das Erbgut der Pflanze integriert, so dass die Pflanzen vor Fraßschäden durch Maiszünslerlarven (*Ostrinia nubilalis*) geschützt sind. Damit reduziert sich der Insektizideinsatz mit synthetischen Pyrethroiden. Im biologischen Landbau kommen Suspensionen von Sporen und parasporalen Kristallen von *Bacillus thuringiensis* zum Einsatz, was bedeutet, dass im ökologischen Anbau der gleiche Wirkstoff (Cry1Ab Protein) eingesetzt wird wie in der grünen Gentechnik.

Forschung

Um objektive Aussagen über die Auswirkungen auf die Lebensmittelqualität von Milch und Rindfleisch zu ermöglichen, wurden am Lehrstuhl für Physiologie, Weihenstephan, sensitive Nachweismethoden etabliert. Die Detektion von pflanzenspezifischer und transgener DNA erfolgte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Das insektizide Protein (Cry1Ab) wurde immunologisch mittels Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) quantitativ sowie mittels Immunoblot qualitativ analysiert. Studien zu Abbauprozessen während der Futtermittelprozessierung und Verdauung im

Tier während der Magen-Darm-Passage waren Bestandteil der Untersuchungen in Kooperation mit weiteren Forschungseinrichtungen.

Abbauprozesse im Futtermittel

Um die Aufnahmemenge an transgenem Cry1Ab-Protein von Rindern, gefüttert mit transgener Maissilage oder Mais-Kobs, kalkulieren zu können und die Qualität der aufgenommenen transgenen Mais-DNA zu beurteilen, wurden die Abbauprozesse während der Futtermittelprozessierung untersucht. Untersuchungen dazu wurden von den Forschungsgruppen der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL, Braunschweig; Aulrich et al. 2004), dem Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie der TUM-Weihenstephan (Hupfer et al. 1999) und unserem Lehrstuhl durchgeführt (Lutz et al. 2005a). In Maissilage wurden in zeitlichen Abständen maisspezifische Chloroplasten-DNA, die in hoher Kopienanzahl pro Pflanzenzelle vorkommt, und transgene (*cry1Ab*) DNA-Abschnitte, die nur in einer Kopie in das Pflanzengenom eingebracht wurde, untersucht. Außerdem wurde die Cry1Ab-Proteinmenge bestimmt. Die Ergebnisse zeigten eine eindeutige Degradation von pflanzenspezifischer und transgener DNA sowie einen signifi-

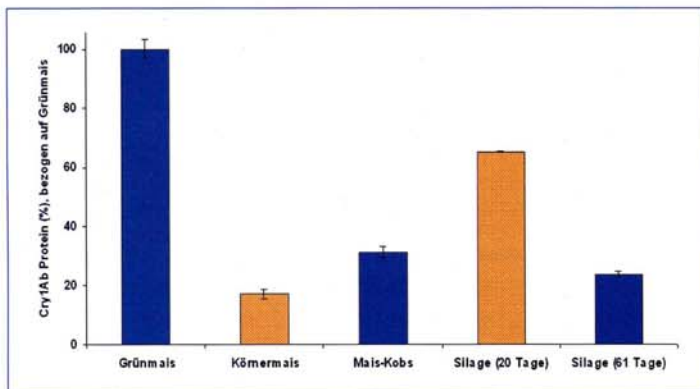


Abb. 2: Cry1Ab-Protein-Abbau bei Herstellung von transgenen Mais-Kobs (MON810) und transgener Maissilage (Bt176)

kanten Abbau des Cry1Ab-Proteins. Die nachweisbaren Längen der untersuchten Genabschnitte wurden mit zunehmender Silierungsdauer immer geringer. Nach 61 Tagen konnten nur Fragmente von geringer Größe nachgewiesen werden (Abb. 1). Die Bruchstücke stellen somit nur eine Aneinanderreihung von Nukleotidbausteinen dar, die sich, außer in der Sequenz, in keiner Weise von den Bruchstücken von tierischer bzw. jeder anderen DNA unterscheiden. Das Cry1Ab-Protein war nach 20 Tagen zu 56% und nach 61 Tagen zu 24% abgebaut.

Neben der Maissilage wurden auch Abbauprozesse bei der Herstellung von Mais-Kobs untersucht. Die Messung des Cry1Ab-Proteins ergab eine Reduzierung auf 31% des Ausgangswertes (Abb. 2). Der durch die thermische Behandlung hervorgerufene Abbau entspricht einer Silierungsdauer von etwa sechs Wochen.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass sich die Menge an Cry1Ab-Protein und Mais-DNA sich im Verlauf der Silierung und bei der Herstellung von Mais-Kobs verringert. Somit ist die bei der Fütterung aufgenommene Menge an Cry1Ab DNA und -protein bereits deutlich niedriger als vor der Futtermittelprozessierung.

Nachweis pflanzenspezifischer und transgener DNA

Die Verdauung von pflanzeigener und transgener DNA aus Maispflanzen wurde in mehreren Rinder-

studien untersucht (Chowdhury et al. 2003; Chowdhury et al. 2004; Einspanier et al. 2004; Phipps et al. 2003). Von besonderem Interesse war in allen Studien der Nachweis der transgenen Teile des Genoms, d.h. der Abschnitte, die dem Erbgut der Pflanze hinzugefügt wurde.

Alle Untersuchungen belegen übereinstimmend, dass durch Fütterung aufgenommene DNA während der Magen-Darm-Passage rapide in einzelne Bestandteile, die Nucleinsäuren, oder kleinere DNA-Fragmente abgebaut wird. In den Inhalten des vorderen Abschnittes des Verdauungstraktes lässt sich nach kurzer Zeit lediglich degradierte DNA nachweisen, da diese durch das Einwirken der Mikroflora im Pansen abgebaut wird. Nur in hoher Kopienzahl vorliegende kurze maisspezifische DNA-Fragmente von Chloroplasten konnten in Inhalten des Magen-Darm-Traktes, im Blut und in verschiedenen Organen nachgewiesen werden (Chowdhury et al. 2003).

Eine Übertragung von DNA aus dem Futtermittel in die Milch war ebenso Bestandteil von wissenschaftlichen Studien im In- und Ausland (Einspanier et al. 2001; Aumaitre et al. 2002; Faust und Miller 1997; Phipps et al. 2001, 2003; Poms et al. 2001, 2003). Alle Studien kamen zu dem Ergebnis, dass kleine Fragmente pflanzlicher DNA, die in hoher Kopienzahl in jeder Pflanzenzelle vorkommen, in schwachen Signalen in der Milch nachgewiesen werden können. Vermutet wird, dass DNA-Frag-

mente aus Nahrungs- und Futtermitteln über die Peyerschen Plaques im Darmepithel in das Blutssystem und anschließend zu Organen und in die Milch gelangen können (Abb. 3). Die immunoaktiven Zellen des Organismus, deren natürliche Aufgabe es ist körperfremde Bestandteile zu erkennen und abzubauen, sind offensichtlich auch für den Transfer der DNA innerhalb des Körpers verantwortlich. Es bleibt zu bedenken, dass die beschriebene Nachweisbarkeit von pflanzlicher DNA u. U. zum Teil auf die Übertragung von Pflanzenrestspuren bei der Milchgewinnung zurückzuführen sein könnte. Die analytische Nachweisbarkeit von Futter-DNA kennzeichnet die extreme Sensitivität moderner molekularbiologischer Verfahren. DNA im Lebensmittel ist aber nicht bedenklich, da hinreichend bekannt ist, dass DNA ohne ihre ursprüngliche Funktionsumgebung keinerlei Wirkungen entfalten kann.

In keiner wissenschaftlichen Studie konnte transgene DNA in Rindergewebe oder Milch nachgewiesen werden.

Nachweis des transgenen Cry1Ab-Proteins

Proteine sind die eigentlichen Funktionsträger in den Zellen bzw. Lebewesen. Über das Futter aufgenommene Proteine werden beim Säugetier gewöhnlich enzymatisch in immer kleinere Fragmente gespalten. Studien zu Degradationsprozessen des transgenen Cry1Ab-Proteins im Verdauungstrakt von Rindern war Bestandteil mehrerer wissenschaftlicher Untersuchungen, u.a. auch am Lehrstuhl für Physiologie, TUM-Weihenstephan (Lutz et al. 2005 b; Chowdhury et al. 2003; Einspanier et al. 2004). So konnten wir in eigenen Studien zeigen, dass eine rasche Degradation des funktionsfähigen Cry1Ab-Proteins im Pansen stattfindet, da schon nach kürzester Zeit lediglich immunoaktive Fragmente und nicht das vollständige Protein nachweisbar war. Es ist unwahrscheinlich, dass intaktes funktionsfähiges Cry1Ab-Protein aus dem Pansen in die nachfolgenden Darmabschnitte gelangt. Es

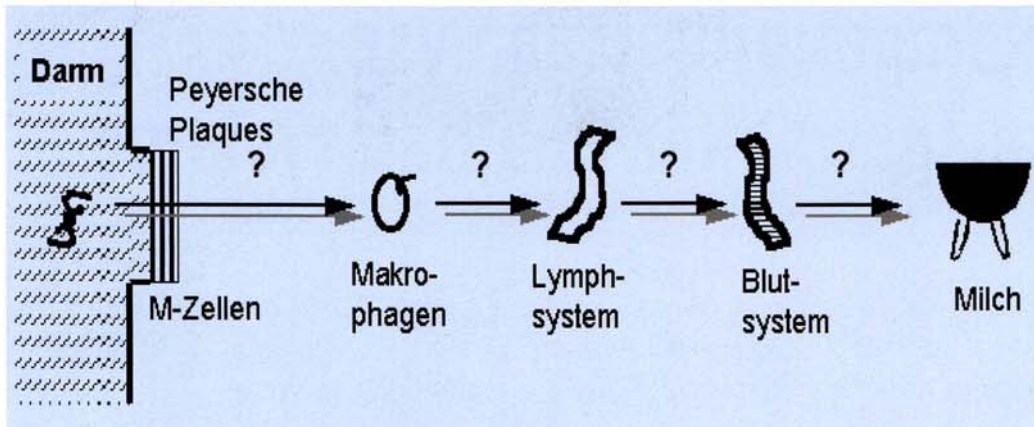


Abb. 3: Darstellung des potentiellen Resorptionsweges von Futter-DNA und des Übertritts in das Blutsystem bzw. in die Milch (nach Klotz und Einspanier 1998)

konnte auch in keinem Gewebe außerhalb des Magen-Darm-Trakts immunoaktives Cry1Ab-Protein nachgewiesen werden. Bislang liegen keine Erkenntnisse vor, dass das transgene Cry1Ab-Protein in die Milch gelangen könnte.

Schlussfolgerung

Mit der täglichen Nahrung wird pflanzliche und tierische DNA aufgenommen. Das zusätzlich in das Erbgut einer Pflanze inserierte Gen verhält sich im Verdauungsprozess genauso wie pflanzenspezifische DNA. Nach derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnissen gilt es als unumstritten, dass sich die Milch von transgen gefütterten Kühen nicht von der Milch unterscheidet, die von Tieren gewonnen wird, die mit entsprechenden nicht gentechnisch veränderten Futtermitteln gefüttert wurden. In wissenschaftlichen Fütterungsstudien nach international anerkanntem Standard konnten in Milch weder gentechnisch veränderte DNA noch daraus resultierendes Cry1Ab-Protein aus EU zugelassenem gentechnisch verändertem Soja bzw. Mais nachgewiesen werden. Eine mögliche Beeinträchtigung der Lebensmittel Fleisch und Milch von Rindern ist nach heutigem Stand der Wissenschaft nicht gegeben. Damit erscheint eine Kategorisierung von Molkereiprodukten im Zusammenhang mit der Fütterung transgener Futtermittel als nicht angemessen und führt lediglich zur Verunsicherung der Verbraucher.

Proteingröße	Maissilage	Pansen	Jejunum	Colon	Fäzes	Organe
60 kDa	+	-	-	-	-	-
34 kDa	-	+	-	-	-	-
17 kDa	-	+	+	+	+	-

Abb. 4: Zusammenfassung der Detektion immunoaktiver Cry1Ab-Fragmente mittels Immunoblotting. Das vollständige Cry1Ab-Protein (60 kDa) konnte nur in der Maissilage nachgewiesen werden; im Rind fanden sich lediglich immunoaktive Fragmente. „+“: positiver Nachweis, „-“: keine Nachweisbarkeit

Informationen zu Fragen und zur weiteren Forschung zu gentechnisch verändertem Mais in Nutztieren sind

am Lehrstuhl für Physiologie der Technischen Universität München unter www.wzw.tum/fml/physio zu finden.



PUBLIKATIONSBEITRAG

Wiedemann, S., **B. Lutz**, H. Kurtz, F. Schwarz und C. Albrecht.

In situ study on the time-dependent degradation of recombinant maize DNA und protein in the bovine rumen.

Journal of Animal Science (eingereicht; 2005)

***In situ* studies on the time-dependent degradation of recombinant corn DNA and protein
in the bovine rumen¹**

S. Wiedemann*, B. Lutz*, H. Kurtz⁺, F.J. Schwarz⁺, C. Albrecht^{*,2}

* Physiology Weihenstephan, Technical University Munich, Weihenstephaner Berg 3,
D-85354 Freising, Germany

⁺ Department of Animal Science, Division of Animal Nutrition, Technical University Munich,
Hochfeldweg 6, D-85350 Freising, Germany

¹ This study was supported by the German Federal Ministry of Research and Technology (BMBF grant No. 0312631D) and the Federal Agency for Nature Conservation (BfN grant No. 20767432). The authors thank Nina Leuschen, Arwen Hodina, Tamara Stelzl and Inge Celler for assistance. The work of the staff at the Department of Animal Science, Division of Animal Nutrition, Technical University Munich, Germany and at the Bavarian State Research Centre for Agriculture, Poing-Grub, Germany is gratefully acknowledged.

² Correspondence: (phone: +49 8161 71 3994; fax: +49 8161 71 4421; E-mail: christiane.albrecht@wzw.tum.de)

ABSTRACT

An *in situ* technique was adopted to investigate the time-dependent ruminal degradation of chloroplast compared with recombinant DNA of Bt176 corn using conventional and quantitative PCR assays. In parallel, the Cry1Ab protein content and fragment sizes were determined by ELISA and immunoblotting techniques. Triplicate nylon bags filled with 5 g of each substrate (whole plant isogenic, whole plant transgenic, ensiled isogenic and ensiled transgenic corn) were positioned within the rumen of five rumen cannulated non-lactating cows and incubated for 2, 4, 8, 16, 24 and 48 h. To investigate the DNA degradation process, PCR assays were developed to detect fragments of the endogenous highly abundant *rubisco* gene (173 bp, 896 bp, 1197 bp, 1753 bp) and of the recombinant *cry1Ab* gene (211 bp, 420 bp, 727 bp, 1423 bp). Short fragments of *rubisco* (<431 bp) and *cry1Ab* DNA (211 bp) were amplifiable in whole plant and ensiled corn samples incubated in the rumen for 48 h, whereas the traceability of larger fragments was dependent on previous processing of the sample (whole plant or ensiled corn), the length of the target sequence and concomitantly on the length of time incubated in the rumen. Quantification of *rubisco* and *cry1Ab* gene fragments applying real-time PCR assays revealed degradation to less than 20% of initial 0-h values within 2 h and less than 0.5% after 48 h of ruminal incubation. Analysis of Cry1Ab protein in whole plant corn using ELISA technique revealed a decrease to 28.0% of the initial value within 2 h and to 2.6% within 48h. The concentration of Cry1Ab protein of ensiled corn was only 10% that of whole plant corn. Ensiled corn Cry1Ab protein decreased to 10% of initial values after 48 h of ruminal incubation. Using immunoblotting technique the full-size Cry1Ab protein was only detectable up to 8 h; thereafter only fragments of approximately 17 and 34 kDa size were found. In conclusion, rumen digestion decreases the presence of functional *cry1Ab* gene fragments. It is unlikely that full-sized, functional Cry1Ab protein is present following 8 h of incubation in the rumen. Therefore, results based on

ELISA measurements should be interpreted carefully and verified by another detection method discriminating between the full-sized and fragmented Cry1Ab protein.

Key Words: Recombinant DNA, Recombinant protein, PCR, ELISA, Immunoblot, Cattle

Introduction

Genetic engineering has enabled the recombination of DNA in order to modify an organism or populations of organisms. The addition of foreign genes is used to create plants, such as transgenic corn and soybean that are capable of synthesizing novel proteins resulting in insect resistance and herbicide tolerance. Genetically modified Bt176 corn has been engineered to express the *cryIAb* gene, isolated from the naturally occurring soil bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt), to protect itself against the European corn borer. Since the release of those plants into the food and feed market, the public has expressed concerns about the effect and the digestive fate of recombinant DNA and proteins of genetically modified crop. Studies conducted with cows have illustrated that plant-derived and transgenic DNA and protein are degraded throughout the digestive tract (Chowdhury et al. 2004; Einspanier et al. 2004; Lutz et al. 2005b). However, because those studies did not consider the long mean retention time of food in the rumen of cows, additional data on the time-dependent degradation of plant DNA and the recombinant *cryIAb* gene as well as the Cry1Ab protein are crucial. In addition, knowledge about the degradation of transgenic DNA over time is necessary to estimate the likelihood of functional genes to transfer from feed to ruminal microorganisms. In the present study, we adopted a nylon bag technique (Ørskov and McDonald 1979; Flachowsky et al. 1988; Madsen and Hvelplund 1994) to analyze *in situ* degradation of the chloroplast - specific *rubisco* gene, the recombinant *cryIAb* gene and the Cry1Ab protein in the rumen of cows.

Material and Methods

Feeding Experiment

Five mature rumen cannulated non-lactating Holstein-Friesian cows (average BW 700 kg) were housed at the Department of Animal Science of the Technical University Munich, Germany. A diet of 13 kg/d isogenic corn silage (DM 39%), 0.8 kg/d soybean meal and 50 g/d mineral supplement (R-Lactol, Raiffeisen Kraftfutterwerke Sued GmbH, Wuerzburg, Germany) was fed 12 d before and during the experimental period. The diet was fed in two equal meals at 0700 and 1600 h. All animals had access to water ad libitum.

In Situ Experiments and Animal Performance

The study was performed according to the strict federal and international guidelines on animal experimentation. The experimental design was set up according to the requirements of the Bavarian State animal welfare committee.

Genetically modified Bt176 corn (Navares) and the non-Bt isolate (Antares; Syngenta International AG, Basel, Switzerland) were grown on adjacent experimental fields at the Bavarian State Research Centre for Agriculture (Poing-Grub, Germany) to minimize variation based on different environmental conditions. Following harvest the whole corn plants were chopped (particle size of approximately 1 cm) and either frozen to -20°C or ensiled. Subsequently, the following four substrates were used for the *in situ* experiment: whole plant isogenic (DM 53%; CP 90, crude fat 27 and NDF 178 g/kg DM), whole plant transgenic (DM 37.9%; CP 80, crude fat 28 and NDF 186 g/kg DM); ensiled isogenic (DM 51.7%; CP 90, crude fat 24 and NDF 183 g/kg DM) and ensiled transgenic corn (DM 36.3%; CP 84, crude fat 29 and NDF 182 g/kg DM). Samples were lyophilized and milled to pass through a 3 mm screen. Five grams of an individual sample was weighed into bags of precision woven nylon cloth (10 x 20 cm) with an aperture of $53 \pm 10 \mu\text{m}$ (BG1020; Bar Diamond Inc., Parma, USA). All nylon bags were sealed and connected to a 55 cm, coated flexible steel cable with

lacing cords. This plastic carrier was placed in the rumen and attached to the fistula's cap on a 40 cm nylon cord before the 0700 h feeding. To exclude the possibility of distinct degradation patterns of DNA and protein dependent on the sample's position on the carrier, triplicates of each variety were attached randomly to the carrier. After 2, 4, 8, 16, 24 and 48 h of incubation in the rumen the bags were quenched in iced water to stop the microbial activity and subsequently washed in a washing machine using a standard cold rinse cycle. The bags were then lightly squeezed to eliminate excess water and lyophilized. In order to estimate the initial DNA and protein concentration, bags containing either whole plant or ensiled isogenic or transgenic corn were washed and lyophilized without rumen incubation in duplicates.

To ascertain equal ruminal fermentation conditions in all cows we determined the pH values (pH meter, Schott, CG 842) and the ammonia content of rumen liquid collected from the ventral sac according to Voigt and Steeger (1967) before, 30, 60, 90, 150, 210 and 270 min after feeding. Furthermore, the ruminal volatile fatty acid (VFA) concentration was measured according to Geissler et al. (1976) in samples taken before and 210 min after feeding. Resulting values of pH, ammonia and VFA are shown in Table 1 and indicate comparable ruminal fermentation conditions in all animals.

Deoxyribonucleic Acid Extraction

Lyophilized and frozen samples (50 mg) of at least two different positions on the rumen placed carrier per time point and substrate (5 cows x 2 bags; n = 10) were processed. Using the bead-beating FastPrep technique (BIO101, Carlsbad, USA), 50 mg were repeatedly ground in conjunction with 0.8 g Matrix Green ceramic beads (BIO101) at 5.0 m/s for 40 sec. To improve DNA yield samples were refrozen in liquid nitrogen for 10 min before being reground. The resulting fine powder was dissolved in 600 µl lysis buffer (C1) and 10 µl RNase-A (both Nucleo Spin Plant Kit; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany), mixed thoroughly and incubated for at least 30 min at 60°C. All succeeding DNA purification steps were performed using a silica spin column following the manufacturer's

protocol. The DNA was finally eluted in 50-100 µl CE-buffer (Nucleo Spin Plant Kit) depending on the concentration.

Concentrations of DNA were determined by UV absorption at 260 nm and the DNA integrity was estimated by 260/280 UV absorption ratio.

Polymerase Chain Reaction (PCR) Analysis

Oligonucleotides. Primer sets used for PCR and the respective DNA fragments amplified are described in Table 2. Five primer pairs were designed to detect different fragment lengths (173, 430, 896, 1197 and 1753 bp) of the highly abundant chloroplast - specific *rubisco* gene (*Zea mays* complete chloroplast genome; GenBank Accession No. X86563). Four primer pairs were used to amplify fragments (210, 420, 727 and 1423 bp) of the transgenic construct in Bt176 (*cryIAb* gene from patent US 5625136; GenBank Accession No. I41419). Primers were designed using the computer software PRIMER-3 (freely available at www.wi.mit.edu).

PCR Conditions. All PCR reactions were performed in a PCR thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) and contained 150 ng DNA, 1x PCR reaction buffer (ABgene, Epsom, UK), 2.5 mM MgCl₂ (ABgene), 0.8 µM of both forward and reverse primer (Metabion, Martinsried, Germany), 4.0 mM dNTPs (ABgene) and 0.5 IU Thermoprime Plus DNA Polymerase (ABgene). The master mixes for amplification of the 1753 bp fragments included 3.5 mM MgCl₂. Cycling conditions are described in Table 3.

In case amplicons were obtained for one primer pair the respective next higher fragment length was attempted to be amplified. If a sample at a given time tested positive for a specific fragment, the subsequent time point was tested with the same primer pair.

All PCR assays included both positive and negative controls. As positive control DNA from Bt176 corn leaf tissue (Navares) was used. Negative controls for the *rubisco* and *cryIAb*

primer sets did not contain template DNA. Additional negative controls for the amplification of *cryIAb* fragments consisted of non-recombinant corn DNA (Antares).

Agarose Gel Electrophoresis. The PCR amplicons (15.0 µl) were electrophoresed at 100 V on a 1.5 - 2% (w/v) agarose gel and visualized using an UV transilluminator. The gels were digitized using a video documentation system (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex 1, France).

Sequencing. The PCR products were commercially sequenced to confirm nucleotide sequence identity (Medigenomix, Martinsried, Germany).

Relative Quantification of Rubisco and CryIAb DNA (Real-Time PCR)

Quantification of the *rubisco* and *cryIAb* gene was performed on at least duplicate samples of two different positions on the rumen placed carrier using the LightCycler instrument (Roche, Mannheim, Germany). *Rubisco* and the *cryIAb* gene concentrations of samples incubated in the rumen were expressed as a percentage of initial values.

For *rubisco* gene quantification, the reaction mixture (10 µl final volume) contained 50 ng of extracted DNA, 1 µl LightCycler DNA Master SYBR Green I (10x), 3 mM MgCl₂ (Roche) and 0.4 µM forward and reverse primer (*Rub173F* and *Rub173R*). Amplification involved one cycle at 95°C for 10 min for initial denaturation and 45 cycles of 95°C for 15 sec, 61°C for 10 sec and 72°C for 20 sec. Amplified products underwent melting curve analysis by slow heating with a 0.1°C/s increment from 65°C to 95°C with fluorescence collection at 0.1°C intervals after the last cycle to specify the integrity of amplification. Additionally the product size of all samples was verified by electrophoresis after the PCR run. Dilutions of purified cloned DNA were used to construct gene-specific calibration curves.

For relative quantification of genetically modified Bt176 corn, a commercially available Bt176 quantification kit (Roche) was used according to the manufacturer's instructions.

In addition to the *cryIAb* gene, a reference gene (corn *invertase*, provided in the kit) was measured and the ratio between the *cryIAb* and *invertase* gene was calculated to ensure unvarying degradation patterns of both genes. To exclude possible unspecific amplification for the *cryIAb* gene quantification, isogenic corn samples of all time points and substrates were also analyzed.

CryIAb Protein Analysis

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Estimation of the Cry1Ab protein was performed using a commercially available ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Agdia Inc., Elkhart, USA). Frozen whole plant or ensiled transgenic corn samples (20 mg) obtained from all animals at all time points and originating from at least two positions on the rumen placed plastic carrier (n = 10) were ground using the FastPrep homogenizing instrument with 0.8 g Matrix Green ceramic beads at 6 m/s for 40 s until the material was pulverized. The resulting powder was dissolved in 1 mL Multi-Event Buffer (provided in the kit). Dilutions of 0.015, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 and 1.6 ng/mL of a control Cry protein (provided in the kit) were used to create a standard curve. Results are expressed as Cry1Ab protein (ng) per g fresh weight. Samples of non-recombinant corn served as negative controls. All samples were measured at least in duplicates.

Immunoblotting. An immunoblotting technique (Lutz et al. 2005b) was used to determine the fragment size of the Cry1Ab protein detected by ELISA. Briefly, whole plant and ensiled transgenic corn samples were prepared as described for the ELISA assay, except that PBS (pH 7.4) with protease inhibitors (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used as extraction buffer. The SDS-PAGE conditions included a 4 to 12% gradient Bis-Tris gel

(NuPage, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany), 17.75 μ l of extracted protein, 1.0 μ l 1,4-Dithiothreitol (1 mM; Merck KGaA) and 6.25 μ l SDS sample buffer (4x). After separation and transfer onto a nitro-cellulose membrane Cry1Ab protein was detected using a polyclonal rabbit anti-Cry1Ab/1Ac antibody (Agdia Inc.; final concentration 5 μ g/mL, 60 min) followed by a secondary antibody solution (biotinylated anti-rabbit IgG in casein solution; final concentration 1.5 μ g/mL, 30 min). For signal amplification, membranes were incubated in Vectastain ABC-AmP Reagent (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA; 10 min). Signals were visualized by chemiluminescence (DuoLuX, Vector Laboratories, Inc.). Isogenic corn served as negative control; the sample without incubation time in the rumen (0 h) and Cry1Ab/1Ac protein included in the ELISA kit served as positive controls.

Statistical Analysis

PCR results for a specific time point were regarded as positive when more than 50% of all extracted DNA samples yielded amplicons of the correct size (bp) and identity (sequence analysis).

ELISA data were analyzed by using the MIXED procedure of SAS statistical software, version 8.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC). At 2 h the influence of ruminal position was tested for significance for the transgenic whole plant corn samples. The model included animal (n=5) and position (n=3) as class variables. Because degradation was not significantly influenced by position, the further evaluations were restricted to two ruminal positions. The model of the MIXED procedure included animal, incubation time, corn type and ruminal position as class variables. If the F-test of the MIXED procedure showed significant influences ($p < 0.05$) the differences were localized by the use of Duncan's multiple range test.

Results

PCR Analysis of Rubisco and CryIAb

Amplicons of the *rubisco* gene included fragment lengths of 173 bp and 430 bp in all samples of whole plant and ensiled corn (Figure 1). Fragments of 896 bp were found up to 24 h in whole plant samples, but could not be detected in any of the ensiled samples tested. *Rubisco* gene fragments of 1753 bp could be amplified up to 8 h post rumen incubation in whole plant corn. Analyzing all amplifiable fragments of the *rubisco* gene did not show a qualitative difference between isogenic and transgenic corn.

Fragments of the *cryIAb* gene with the size of 211 bp were found in all samples of whole plant and ensiled transgenic corn (Figure 2). The 420 bp fragment could be amplified in all samples of whole plant but only up to 8 h of ensiled corn. Fragment lengths of 727 bp and 1423 bp were detected in whole plant corn up to 16 and 4 h, respectively, but were not found in any sample of ensiled corn. A summary of all tested amplicons in whole plant and ensiled corn samples as well as a comparison between the *rubisco* and the *cryIAb* gene is shown in Figure 3.

Relative Quantification of Rubisco and CryIAb DNA (Real-Time PCR)

As demonstrated in Figure 4A and B, for transgenic whole plant and ensiled corn samples, no consistent difference in the degradation pattern between the positions was apparent. Therefore, DNA originating from the two different bags was extracted and pooled for quantification of *rubisco* and *cryIAb* gene fragments.

In addition, comparing the degradation of *rubisco* gene fragments between isogenic and transgenic corn samples during rumen incubation revealed no marked differences in whole plant (Figure 4C) or ensiled corn (Figure 4D). Less than 20% of the initial *rubisco* gene fragment was measured after 2 h of ruminal incubation both in isogenic and transgenic whole

plant corn. Values were less than 5% of initial by 4 h, with final values of less than 0.1% for Bt- and non-Bt corn by 48 h of ruminal incubation.

Initial values for the *rubisco* gene measured in ensiled plant samples were approximately 0.9% of initial values found in whole plant corn samples. A marked decrease to less than 6% of the initial values for both isogenic and transgenic corn after 4 h of incubation in the rumen was measured. Values dropped to less than 0.5% by 48 h of ruminal incubation.

Quantifying the *cryIAb* gene using real-time PCR (Figure 5) showed a sharp decrease during the first 4 h of incubation to less than 1% of the initial value for whole plant corn samples which ended up in final values of less than 0.5% after 48 h. Quantification of the *cryIAb* gene fragment in ensiled corn samples reached the detection limit of the commercial kit after 8 h of ruminal incubation and data are therefore not shown. Results after that time point were not reliably distinguishable from values of isogenic corn samples. However, the zero hour value of ensiled corn was only 0.62% of the initial value of whole plant transgenic corn. Comparing the degradation pattern of *rubisco* DNA (Figure 4) and *cryIAb* DNA (Figure 5) did not reveal obvious differences between both genes.

CryIAb Protein Analysis

Enzyme-linked immunosorbent assay. Because the results for the 2 h transgenic whole plant samples obtained from all three positions on the rumen carrier did not vary ($n = 15$; $P = 0.2$), only samples of two different positions on the carrier were examined for the remaining incubation time points (final $n = 120$; $P = 0.5$). After 2 h of rumen incubation a sharp decrease of the Cry1Ab signal to 27 ± 8.0 % (43.3 ± 12.46 ng/g fresh weight, average of all animals \pm SD) of the initial value (155.3 ng/g) was measured (Figure 6A). Amounts of protein diminished gradually to 18 ± 5.2 % (28.2 ± 9.31 ng/g) after 4 h and ended with final values of 2.6 ± 1.0 % (4.1 ± 1.52 ng/g) after 48 h.

The 0-h value of immunoactive Cry1Ab protein in ensiled corn was only approximately 10% (15.8 ng/g fresh weight) of initial whole plant corn values (153.3 ng/g). The signal for the Cry1Ab protein gradually diminished over the entire incubation period (48 h = 1.6 ± 0.4 ng/g).

Immunoblotting. Evaluation and validation of the immunoblotting assay was performed on fresh transgenic corn leaves and showed a detection limit of 50 mg (fresh weight) of transgenic corn, equivalent to approximately 2.0 ng Cry1Ab protein per gram fresh weight according to ELISA concentration measurement (Lutz et. al 2005a). The full-sized protein of 60 kDa could be detected up to 8 h in whole plant corn (Figure 6B). Bands of immunoactive fragments with the length of 17 kDa were observed after 2 h and increased thereafter. After 16 h of incubation bands of about 34 kDa appeared and intensified at later time points.

Bands for Cry1Ab protein were not detected in any of the ensiled corn samples (data not shown).

Discussion

The present *in situ* study was performed to analyze the time-dependent fragmentation and quantitative degradation of feed DNA and recombinant Cry1Ab protein..

To study precise degradation profiles an *in situ* technique using nylon bags was adopted. This method has been applied previously to investigate the ruminal degradability of feed from Bt- and non-Bt maize and revealed no effect of a genetic modification on the determined values (Aulrich et al., 2001; Donkin et al., 2003; Folmer et al., 2002). As compared to *in vitro* methods the *in situ* technique has the advantage that the feed sample is exposed to rumen liquor in an appropriate environment and the feed material is not extensively mixed with previous or later feed rations.

In our studies conventional PCR techniques using the highly abundant *rubisco* DNA as a marker gene provided comparable results to those using *cry1Ab* DNA. Only small fragments of the *rubisco* gene and the *cry1Ab* gene were amplifiable in samples of whole plant and ensiled corn. In ensiled corn samples fragments spanning the size of 896 bp for *rubisco* and 727 bp for *cry1Ab* could not even be detected in the 0-h samples. This parallels observations of Hupfer et al. (1999) and our own laboratories (Lutz et al. 2005a) in which only small DNA fragments persisted after 60 or 106 d of ensiling. Compared with ensiled corn, *rubisco* and *cry1Ab* gene segments of whole plant corn samples were detectable for longer periods of ruminal incubation. Fragments of DNA with comparable sizes to a potential functional bioactive gene, e.g., beta-lactamase (*bla*) introduced in Bt176 corn with a size of 861 bp (Acc.No. U03991), were detectable up to 16 h for *rubisco* (896 bp) and 24 h for *cry1Ab* (727 bp). However, Badosa et al. (2004) were unable to demonstrate a transfer of the *bla* gene from Bt176 to corn-associated bacteria under field conditions. Even under optimized laboratory conditions the transformation of highly competent bacteria with transgenic plant DNA extracts was only observed when highly homologous regions were present (Schluter et al. 1995; Nielsen et al. 1998; de Vries et al. 2001). Thus, we showed that feed DNA can

survive in ruminal fluid for a significant time, but functional activity of that DNA is unlikely to survive the exposure to that environment.

Our results regarding conventional PCR analysis differ from those of Phipps et al. (2003) and Chowdhury et al. (2004). Phipps et al. (2003) detected high - copy *rubisco* DNA only up to 1197 bp and single - copy transgenes of approximately 200 bp in rumen samples after feeding genetically modified soybean meal and ground genetically modified corn grains. However, in that study samples from various time points were bulked into single samples leading to a decrease in the detection of larger fragments. Chowdhury et al. (2004) showed no time-dependent fragmentation, but obtained similar amplicons in rumen samples after 5 and 18 h of feeding.

Real-time PCR results for *rubisco* and *cry1Ab* DNA confirmed those of conventional PCR showing decreasing amounts with increasing ruminal incubation time. After 4 h, less than 10% of the initial values for *rubisco* and *cry1Ab* genes were found in all substrates reflecting the rapid microbial and enzymatic digestion of DNA in ruminal fluid (Duggan et al. 2000). This agrees with findings of Einspanier et al. (2004) who found a significant decrease in the amount of chloroplast DNA following gastric digestion.

However, it should be noted that generally with real-time PCR only small DNA fragments are analyzed (in our case < 174 bp of plant and transgenic DNA). As shown by conventional PCR those lengths were still detectable after 48 h even in ensiled corn samples whereas longer fragment lengths could not be amplified by 48 h of ruminal incubation. Therefore the results obtained by quantitative PCR do not provide evidence for the persistence of potential full-sized functional genes during the ruminal fermentation process.

Analyzing the Cry1Ab protein in ensiled and whole plant transgenic corn by ELISA showed a continual decrease of the immunoactive signal with advancing ruminal incubation time. The initial value of ensiled corn samples constituted only 10% of those of whole plant corn demonstrating a degradation of recombinant protein during the ensiling process. Our

own investigations revealed a clear decrease of Cry1Ab protein during the ensiling process, probably due to low pH conditions and microbial activity (Lutz et al. 2005a).

To the best of our knowledge there are no data available on the exact time-dependent degradation kinetics of rumen-incubated recombinant protein. However, Chowdhury et al. (2003) and Lutz et al. (2005b) noted a marked decrease in the content of Cry1Ab protein following ruminal digestion .

Using immunoblotting showed in contrast to our recently acquired *in vivo* data, where rumen samples were taken after slaughtering and no full-size protein was found (Lutz et al. 2005b), the full-size protein (60 kDa) up to 8 h. Moreover, specific fragments of 17 kDa and 34 kDa were detected which were previously described by Lutz et al. (2005b) in gastrointestinal samples. Chowdhury et al.(2003) did not report detection of these smaller fragments, which could be due to the use of different antibodies or a different fragmentation pattern of Bt176 corn compared with Bt11 corn which was evaluated by those authors. In summary, the results obtained by immunoblotting confirm that ELISA measurements require careful interpretation since currently used commercially available antibodies obviously also bind to immunoactive fragments whose potential activity has yet to be investigated.

Using PCR, ELISA, and immunoblotting techniques, we demonstrated that digestion of corn in the rumen of cows results in extensive time-dependant degradation and fragmentation of recombinant DNA and protein from Bt-corn. It is unlikely that immunoactive protein fragments exhibit activity, but the potential bioactivity of Cry1Ab protein fragments warrants further investigation.

Literature Cited

- Aulrich, K., H. Bohme, R. Daenicke, I. Halle, and G. Flachowsky. 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.
- Badosa, E., C. Moreno, and E. Montesinos. 2004. Lack of detection of ampicillin resistance gene transfer from Bt176 transgenic corn to culturable bacteria under field conditions. *FEMS Microbiol. Eco.* 48:169-178.
- Chowdhury, E. H., O. Mikami, H. Murata, P. Sultana, N. Shimada, M. Yoshioka, K. S. Guruge, S. Yamamoto, S. Miyazaki, N. Yamanaka, and Y. Nakajima. 2004. Fate of maize intrinsic and recombinant genes in calves fed genetically modified maize Bt11. *J. Food Prot.* 67:365-370.
- Chowdhury, E. H., N. Shimada, H. Murata, O. Mikami, P. Sultana, S. Miyazaki, M. Yoshioka, N. Yamanaka, N. Hirai, and Y. Nakajima. 2003. Detection of Cry1Ab protein in gastrointestinal contents but not visceral organs of genetically modified Bt11-fed calves. *Vet. Hum. Toxicol.* 45:72-75.
- de Vries, J., P. Meier, and W. Wackernagel. 2001. The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 195:211-215.
- Donkin, S. S., J. C. Velez, A. K. Totten, E. P. Stanisiewski, and G. F. Hartnell. 2003. Effects of feeding silage and grain from glyphosate-tolerant or insect-protected corn hybrids on feed intake, ruminal digestion, and milk production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86:1780-1788.
- Duggan, P. S., P. A. Chambers, J. Heritage, and J. M. Forbes. 2000. Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of

- DNA in ovine saliva, ovine rumen fluid and silage effluent. *FEMS Microbiol.Lett.* 191:71-77.
- Einspanier, R., B. Lutz, S. Rief, O. Berezina, V. Zverlov, W. Schwarz, and J. Mayer. 2004. Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize. *Eur. Food Res. Technol.* 218:269-273.
- Flachowsky, G., M. Schneider, W. I. Ochrimenko, G. H. Richter, and H.-J. Löhnert. 1988. Methodische Hinweise zur Anwendung der Nylonbeutel-Technik beim Wiederkäuer. Schriftenreihe der Lehrgangseinrichtung für Fütterungsberatung Jena-Jemderoda 11:20-26.
- Folmer, J. D., R. J. Grant, C. T. Milton, and J. Beck. 2002. Utilization of Bt corn residues by grazing beef steers and Bt corn silage and grain by growing beef cattle and lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 80:1352-1361.
- Geissler, C., M. Hoffmann, and B. Hickel. 1976. Ein Beitrag zur gaschromatischen Bestimmung flüchtiger Fettsäuren. *Arch. Anim. Nutr.* 26:123-129.
- Hupfer, C., H. Hotzel, K. Sachse, and K. H. Engel. 1998. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Food Res. Technol.* 206:203-207.
- Hupfer, C., J. Mayer, H. Hotzel, K. Sachse, and K. H. Engel. 1999. The effect of ensiling on PCR-based detection of genetically modified Bt maize. *Eur. Food Res. Technol.* 209:301-304.
- Lutz, B., S. Wiedemann, and C. Albrecht. 2005a. Degradation of transgenic Cry1Ab DNA and protein in Bt-176 maize during the ensiling process. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* (In press)
- Lutz, B., Wiedemann, S., Einspanier, R., Mayer, J., Albrecht, C. 2005b. Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize in the bovine gastrointestinal tract. *J. Agric. Food Chem.* 53:1453-1456

- Madsen, J. and T. Hvelplund. 1994. Prediction of in situ protein degradability in the rumen. Results of an European ringtest. *Livest. Prod. Sci.* 39:201-212.
- Nielsen, K. M., A. M. Bones, K. Smalla, and J. D. van Elsas. 1998. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria--a rare event? *FEMS Microbiol. Rev.* 22:79-103.
- Ørskov, E. R. and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci. Camb.* 92:499-503.
- Phillip, L. E., J. G. Buchanan-Smith, and W. L. Grovum. 1980. Effect of ensiling whole plant corn on voluntary intake, rumen fermentation, retention time and rate of digestion in steers. *J. Anim. Sci.* 51:1003-1010.
- Phipps, R. H., E. R. Deaville, and B. C. Maddison. 2003. Detection of transgenic and endogenous plant DNA in rumen fluid, duodenal digesta, milk, blood, and feces of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:4070-4078.
- Schluter, K., J. Futterer, and I. Potrykus. 1995. Horizontal gene-transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia-Chrysanthemi*) occurs, if at all, at an extremely-low-frequency. *Bio-Technology* 13:1094-1098.
- Studer, E., I. Dahinden, J. Lüthy, and P. Hübner. 1997. Nachweis des gentechnisch veränderten 'Maximizer'-Mais mittels der Polymerase-Kettenreaktion. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 88:515.
- Voigt, J. and H. Steeger. 1967. Zur quantitativen Bestimmung von Ammoniak, Harnstoff und Ketonkörpern in biologischem Material mit Hilfe modifizierter Mikrodiffusionsgefäße. *Arch. Anim. Nutr.* 17:289-293 .

Table 1: pH, NH₃ and volatile fatty acid concentrations of the rumen

	Cow 1	Cow 2	Cow 3	Cow 4	Cow 5
pH ¹	6.9 ± 0.2	6.8 ± 0.2	6.7 ± 0.3	6.7 ± 0.3	6.8 ± 0.2
NH ₃ (mg/100 mL) ²	7.8 ± 4.5	8.5 ± 5.4	8.3 ± 3.6	6.6 ± 4.4	8.0 ± 3.0
VFA (mmol/L) ³					
acetic acid	49.1 ± 1.2	52.5 ± 3.5	60.0 ± 0.0	50.0 ± 2.3	50.9 ± 1.2
propionic acid	14.8 ± 0.0	11.5 ± 1.0	13.5 ± 0.0	12.5 ± 0.0	12.5 ± 0.0
butyric acid	10.2 ± 0.0	9.6 ± 0.8	14.8 ± 0.0	10.2 ± 0.0	10.2 ± 0.0
C2:C3	3.3 : 1	4.6 : 1	4.4 : 1	4.1 : 1	4.2 : 1

¹ means ± SD of measurement before and 30, 60, 90, 150, 210 and 270 min after feeding

² means ± SD of measurement before and 30, 60, 90, 150, 210 and 270 min after feeding

³ means ± SD of measurement before and 210 min after feeding

Table 2: Primers, targets and amplicons sizes for PCR analysis of *rubisco* and *cryIAb*

DNA

Primer name	Primer sequence	Target	Amplicon size	Reference
Cry03	5'-CTC TCG CCG TTC ATG TCC GT-3'	<i>cryIAb</i>	211 bp	Hupfer et al. (1998)
Cry04	5'-GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT-3'			
Cry1A1	5'-CGG CCC CGA GTT CAC CTT-3'	<i>cryIAb</i>	420 bp	Studer et al. (1997)
Cry1A2	5'-CTG CTG GGG ATG TTG TTG-3'			
cry for	5'-ACG AGT GCA TCC CCT ACA AC-3'	<i>cryIAb</i>	727 bp	this study
cry 727 rev	5'-TAG TTG GGG AAC AGG CTC AC-3'			
cry 1423 rev	5'-AGG TTG GTG CTC TTG GTC AG-3'	<i>cryIAb</i>	1423 bp ¹	this study
Rub 173F	5'-AGC TAA TCG TGT GGC TTT AGA AGC C-3'	<i>rubisco</i>	173 bp	this study
Rub 173R	5'-TGG TAT CCA TCG CTT TGA AAC CA-3'			
Rub 898F	5'-AGG TAA GTT AGA AGG GGA ACG C-3'	<i>rubisco</i>	430 bp ²	this study
Rub 896R	5'-TGT ATG TCC CAG AAT AGG TCC C-3'	<i>rubisco</i>	896 bp ³	this study
Rub 1197F/1753F	5'-GGC CTA CTT CTT CAC ATT CAC C-3'	<i>rubisco</i>	1197 bp	this study
Rub 1197R	5'-CAT TCT CAT CGC CTT TCT ATC C-3'			
Rub 1753R	5'-AAA CTC GCT ATA GTC GGC TAC G-3'	<i>rubisco</i>	1753 bp ⁴	this study

¹ with forward primer cry for² with reverse primer Rub173R³ with forward primer Rub896F⁴ with forward primer Rub1197/1753R

Table 3: Cycling conditions for PCR analysis of *rubisco* and *cryIAb* DNA

Target	Fragment length	Denaturation	Amplification steps	Cycles	Final extension
<i>cryIAb</i>	211 bp	94°C, 3 min	94°C 30s; 63°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 2 min
	420 bp	94°C, 3 min	94°C 30s; 56°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 2 min
	727 bp	94°C, 5 min	94°C 30s; 56°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 5 min
	1423 bp	94°C, 5 min	94°C 45s; 56°C 45s; 72°C 45s	40	72°C, 5 min
<i>Rubisco</i>	173 bp	94°C, 3 min	94°C 30s; 60°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 5 min
	430 bp	94°C, 3 min	94°C 30s; 60°C 30s; 72°C 30s	35	72°C, 5 min
	896 bp	94°C, 5 min	94°C 45s; 58°C 45s; 72°C 45s	40	72°C, 5 min
	1197 bp	94°C, 5 min	94°C 45s; 58°C 45s; 72°C 45s	40	72°C, 5 min
	1753 bp	94°C, 5 min	94°C 45s; 58°C 45s; 72°C 45s	40	72°C, 5 min

Figure 1

Rubisco gene fragments

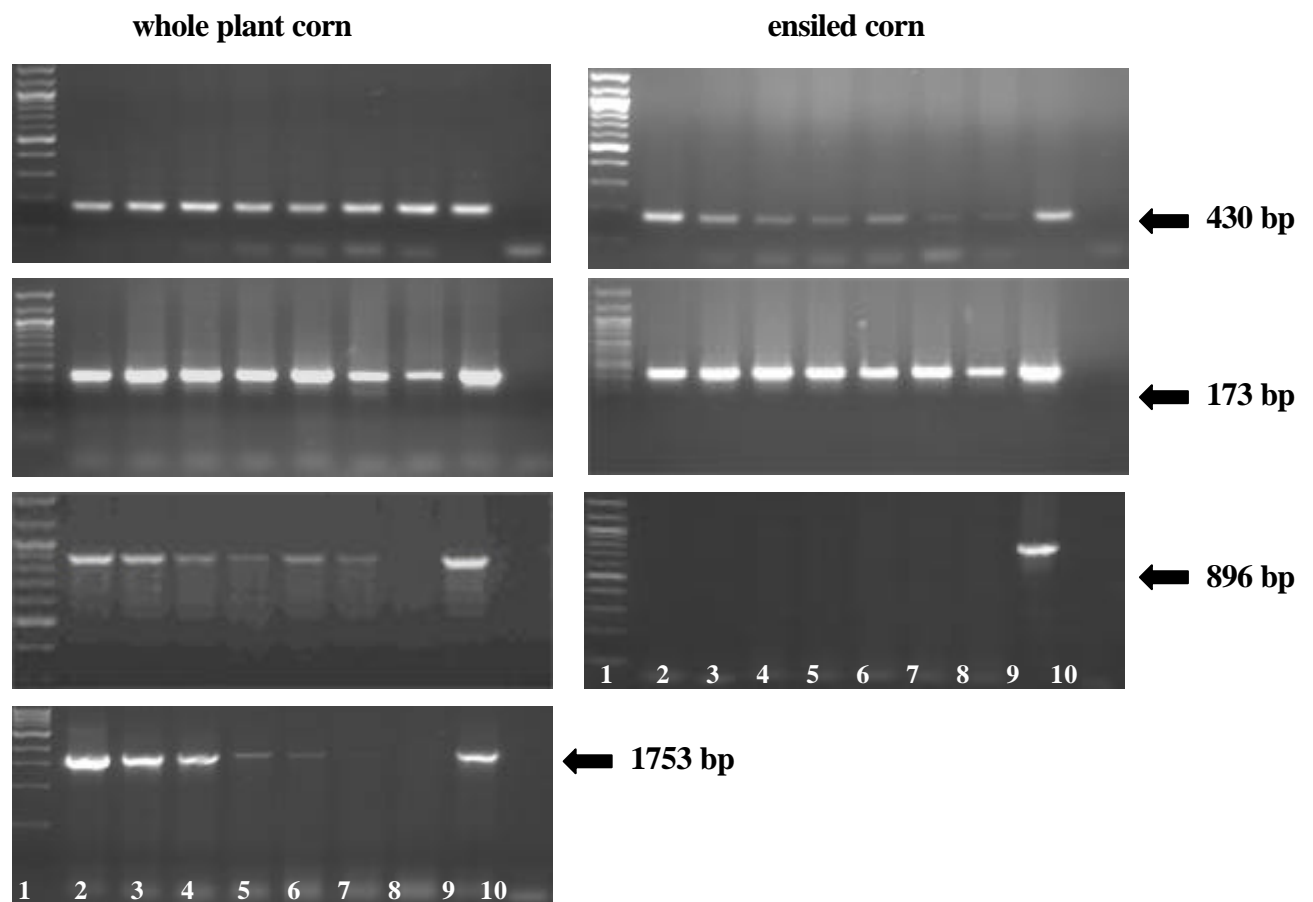


Figure 1: PCR amplification and agarose gel electrophoresis of *rubisco* DNA

Primer pairs for detection of 173 bp, 430 bp, 896 bp and 1753 bp were used.

Lanes 1–10: 1= marker, 2= 0 h, 3= 2 h, 4= 4 h, 5= 8 h, 6= 16 h, 7= 24 h, 8= 48 h, 9= positive control (transgenic corn leaves), 10= negative control (H₂O).

Figure 2

CryIAb gene fragments

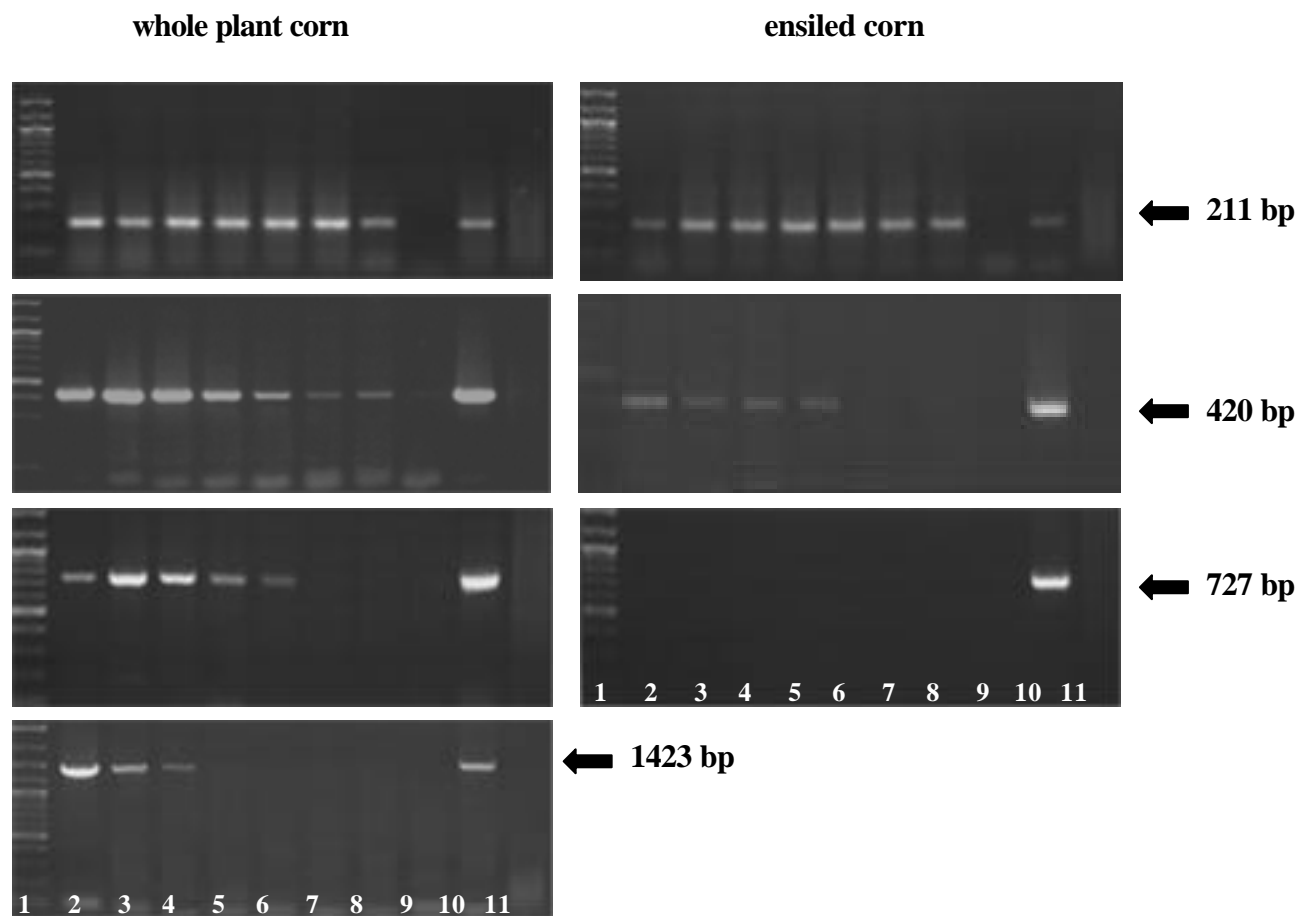


Figure 2: PCR amplification and agarose gel electrophoresis of *cryIAb* DNA

Primer pairs for detection of 211 bp, 420 bp and 727 bp were used.

Lanes 1–11: 1= marker, 2= 0 h, 3= 2 h, 4= 4 h, 5= 8 h, 6= 16 h, 7= 24 h, 8= 48 h, 9= negative control (isogenic corn leaves) 10= positive control (transgenic corn leaves), 11= negative control (H₂O).

Figure 3

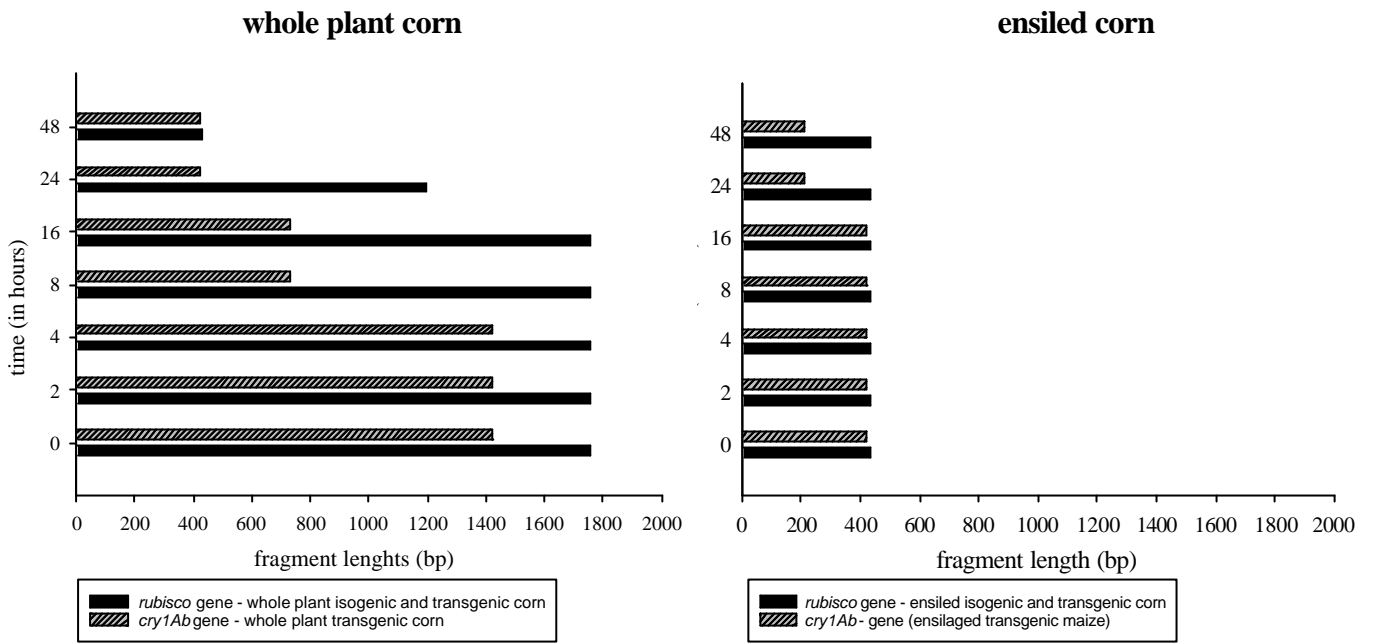


Figure 3: Comparison of the maximally detectable fragment sizes of *rubisco* and *cry1Ab* by conventional PCR

Figure 4

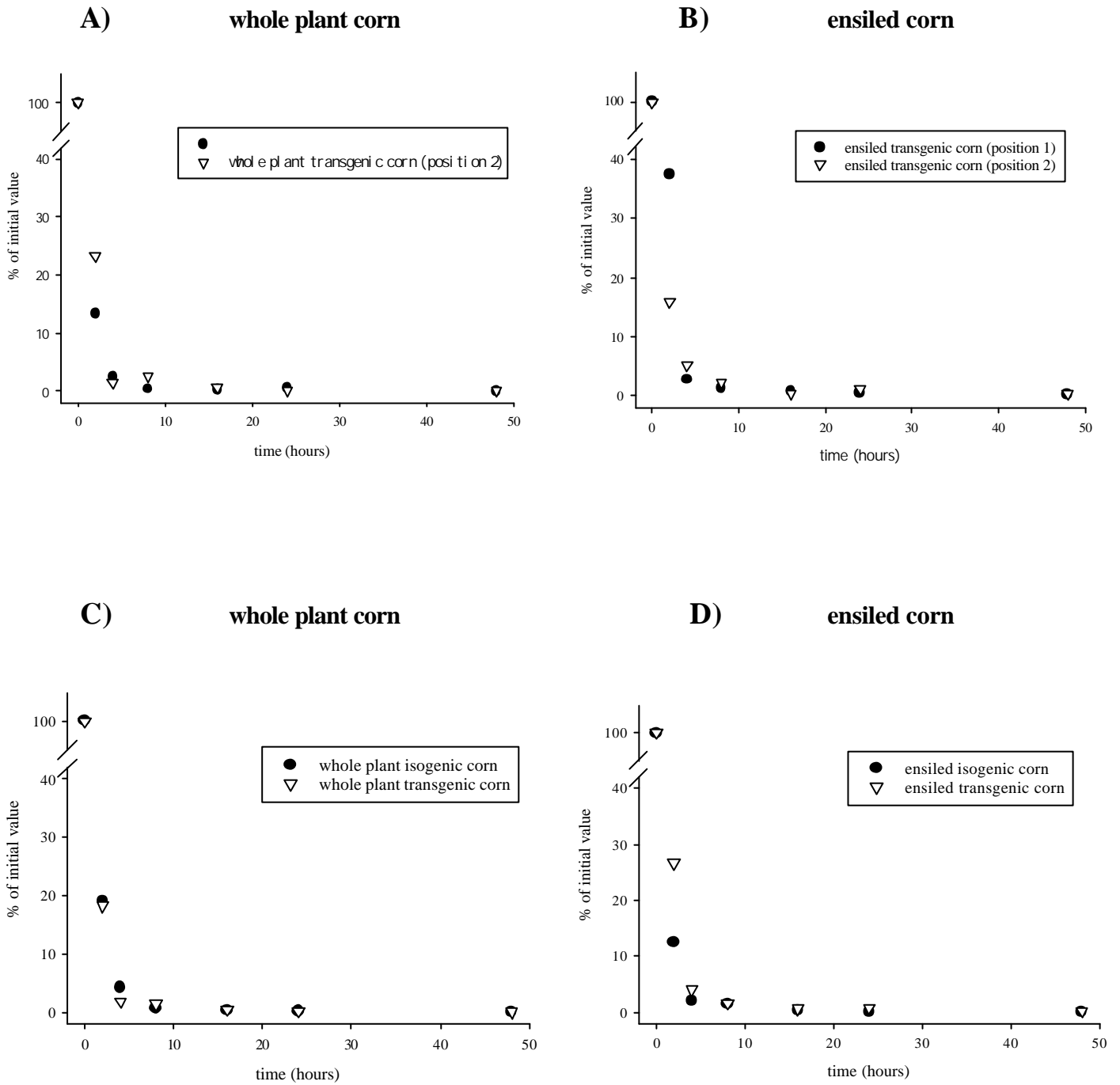


Figure 4: Real-time quantification of *rubisco* DNA (LightCycler instrument)

A) and B) Comparison between samples originating from different positions on the rumen placed carrier; one representative animal

C) and D) Comparison between samples of isogenic and transgenic corn; one representative animal

Figure 5

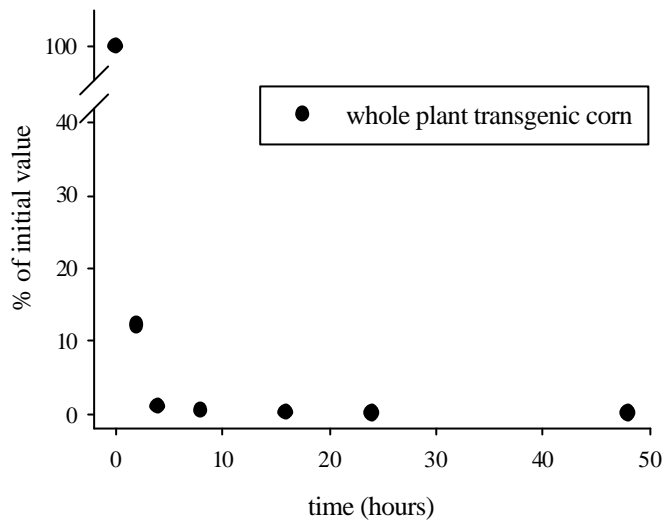
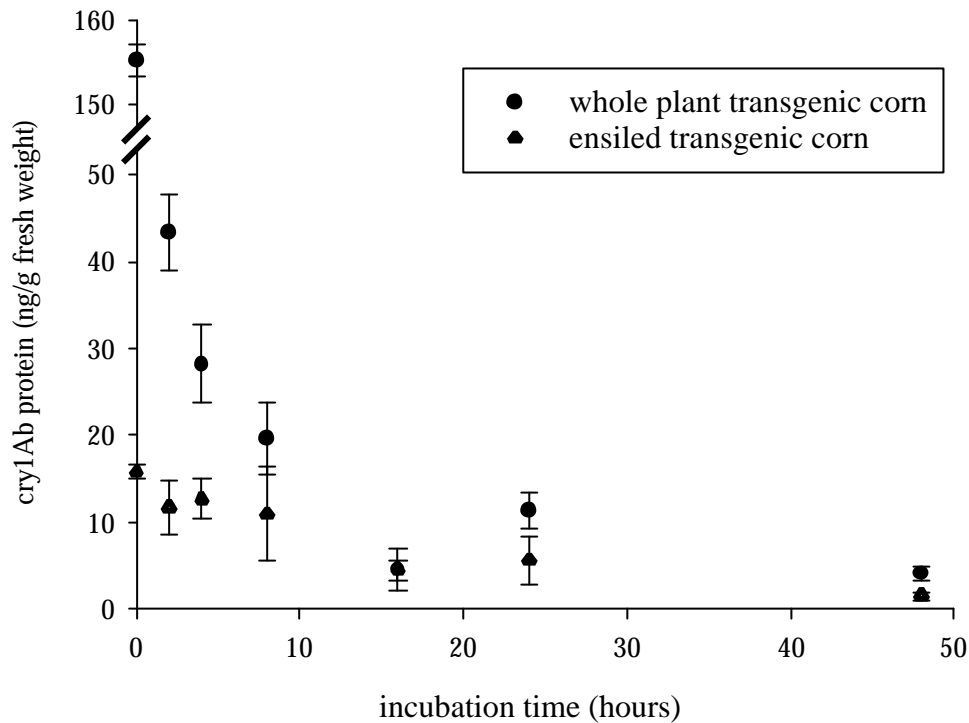


Figure 5: Real-time quantification of *cry1Ab* DNA in whole plant corn samples; one representative animal; mean of two different sample positions on the rumen placed carrier

Figure 6

A) ELISA – whole plant and ensiled corn



B) Immunoblotting – whole plant corn

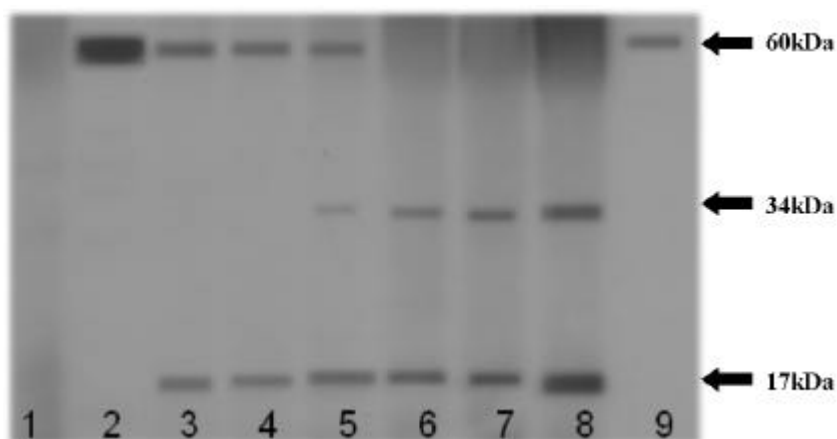


Figure 6: Immunoactivity of the Cry1Ab protein

A) ELISA measurements of Cry1Ab protein in whole plant and ensiled corn after incubation in the bovine rumen; mean \pm SD of 5 animals (samples of two different positions)

B) Immunoblotting of the time-dependent degradation of Cry1Ab protein. The arrows indicate the Cry1Ab protein specific size of approximately 60 kDa.

Lane 1= Antares; lane 2-9= Navares; 2= 0 h; 3= 2 h; 4= 4 h; 5= 8 h; 6= 16 h; 7= 24 h; 8= 48 h; 9= positive control (Cry1Ab/1Ac protein included in the ELISA kit)