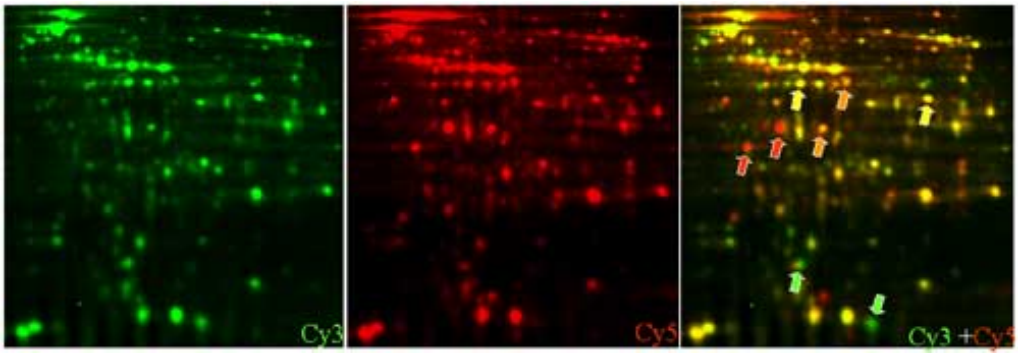
Michael Eckerstorfer, Frank Narendja, Rene Roschko, Andreas Heissenberger und Helmut Gaugitsch

Gutachten zum Stand und zu den Möglichkeiten des Einsatzes von OMICS-Technologien in der GVO-Bewertung



BfN-Skripten 313

2012

Gutachten zum Stand und zu den Möglichkeiten des Einsatzes von OMICS-Technologien in der GVO-Bewertung

Endbericht für den Werkvertrag Z 1.2-526/02-1/2 im Auftrag des Bundesamtes für Naturschutz, Bonn

Michael Eckerstorfer
Frank Narendja
Rene Roschko
Andreas Heissenberger
Helmut Gaugitsch

Titelbild: Beispiel für die Auswertung eines DIGE-Experiments (K. Lilley, Universität Cambridge)

Adresse der Autoren:

Dr. Michael Eckerstorfer
Dr. Frank Narendja
Rene Roschko
Dr. Andreas Heissenberger
Dr. Helmut Gaugitsch

Umweltbundesamt GmbH
Spittelauer Lände 5
1090 Wien/Österreich
www.umweltbundesamt.at

Fachbetreuer im BfN:

Dr. Thomas Meise — Fachgebiet II 3.3 „Bewertung gentechnisch veränderter Organismen, Vollzug GenTG“

Das Gutachten wurde im Frühjahr 2012 abgeschlossen.

Die Beiträge der Skripten werden aufgenommen in die Literaturdatenbank ***„DNL-online“*** (www.dnl-online.de).

BfN-Skripten sind nicht im Buchhandel erhältlich. Eine pdf-Version dieser Ausgabe kann unter http://www.bfn.de heruntergeladen werden.

Herausgeber: Bundesamt für Naturschutz
Konstantinstr. 110
53179 Bonn
Telefon: 0228/8491-0
Fax: 0228/8491-9999
URL: www.bfn.de

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie für die Beachtung privater Rechte Dritter.
Die in den Beiträgen geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

Nachdruck, auch in Auszügen, nur mit Genehmigung des BfN.

Druck: BMU-Druckerei

Gedruckt auf 100% Altpapier

ISBN 978-3-89624-049-1

Bonn - Bad Godesberg 2012

PERSPEKTIVEN FÜR UMWELT & GESELLSCHAFT umweltbundesamt

GUTACHTEN ZUM STAND UND ZU DEN MÖGLICHKEITEN DES EINSATZES VON OMICS-TECHNOLOGIEN IN DER GVO-BEWERTUNG

Michael Eckerstorfer
Frank Narendja
Rene Roschko
Andreas Heissenberger
Helmut Gaugitsch

ENDBERICHT FÜR DEN WERKVERTRAG Z 1.2-526/02-1/2 IM AUFTRAG DES BUNDESAMTES FÜR NATURSCHUTZ; BONN

Wien, im Dezember 2011

Titelfoto: Dr. Kathryn Lilley, Universität Cambridge

Adressen der Autoren:
Dr. Michael Eckerstorfer
Dr. Frank Narendja
Rene Roschko
Dr. Andreas Heissenberger
Dr. Helmut Gaugitsch

Umweltbundesamt GmbH
Spittelauer Lände 5
1090 Wien/Österreich
www.umweltbundesamt.at

Fachbetreuung BfN:
Dr. Thomas Meise Fachgebiet II 3.3 „Bewertung gentechnisch veränderter Organismen, Vollzug GenTG“
Das Gutachten wurde im Frühjahr 2012 abgeschlossen.

Die Beiträge der Skripten werden aufgenommen in die Literaturdatenbank „DNL-online“ (www.dnl-online.de).

Die Publikation kann im Internet unter: www.bfn.de/ abgerufen werden.

Die BfN-Skripten sind nicht im Buchhandel erhältlich.

Herausgeber: Bundesamt für Naturschutz

Konstantinstraße 110

D-53179 Bonn

Tel.: + 49 228/8491-0

Fax: + 49 228/8491-200

URL:http://www.bfn.de

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie für die Beachtung privater Rechte Dritter.
Die in den Beiträgen geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

Nachdruck, auch in Auszügen, nur mit Genehmigung des BfN.

Druck: BMU-Druckerei

Gedruckt auf 100% Altpapier

Bonn - Bad Godesberg 2012

Inhalt

SUMMARY **8**

ZUSAMMENFASSUNG **12**

1 EINLEITUNG **16**

1.1 Problemstellung 16

1.2 Vorgehensweise 19

2 GRUNDLAGEN UND ENTWICKLUNGSSTAND VON RELEVANTEN OMICS-TECHNOLOGIEN **21**

2.1 Was sind Genomics und Transkriptomics? 21

2.1.1 Sequenzanalysen (Genomics) 22

2.1.2 Transkriptomics 25

2.1.2.1 Microarray-Untersuchungen 25

2.1.2.2 RNA-Seq 27

2.1.3 Welche Ergebnisse liefern Genomics und Transkriptomics? 27

2.2 Was ist Proteomics? 29

2.2.1 Wie funktioniert Proteomics? 29

2.2.1.1 Anwendung von 2-dimensionaler Gelelektrophorese in Proteomics 30

2.2.1.2 Anwendung von massenspektrometrischen Methoden (MS) in Proteomics 32

2.2.2 Welche Ergebnisse liefert Proteomics? 37

2.3 Was ist Metabolomics? 38

2.3.1 Wie funktioniert Metabolomics? 39

2.3.1.1 Anwendung der Kernmagnetresonanz (nuclear magnetic resonance, NMR) in der Metabolomics 40

2.3.1.2 Anwendung von Massenspektrometrie (MS) in der Metabolomics 40

2.3.2 Welche Ergebnisse liefert Metabolomics? 42

3 BEISPIELE FÜR ANWENDUNGEN DER OMICS-TECHNIKEN **44**

3.1 Analyse der Genexpression mittels RNA-Seq 44

3.2 Analyse der Protein-Zusammensetzung mittels quantitativer Proteomics 45

3.3 Untersuchungen zur Wirkung von Umwelteinflüssen auf Pflanzen 46

3.4 Anwendung von OMICS-Technologien in der Sortenzüchtung 48

3.5 Toxicogenomics: OMICS-Technologien in Toxikologie und Ökotoxikologie 50

4 OMICS-TECHNOLOGIEN ALS WERKZEUGE DER RISIKOABSCHÄTZUNG VON GVP 52

4.1 Empfehlungen betreffend OMICS-Technologien in den Leitlinien zur Risikoabschätzung von GVP der EFSA 52

4.1.1 Allgemeine Leitlinien zur Risikoabschätzung von GVP 53

4.1.2 Empfehlungen zum Einsatz von OMICS-Technologien bei Tierfütterungsstudien in der Abschätzung der Lebensmittelsicherheit von GVO 55

4.1.3 Leitlinien zur Untersuchung der Allergenität von GVP, GV-Mikroorganismen und daraus hergestellten Produkten 55

4.2 Eignung von OMICS-Technologien zur Risikoabschätzung von GVP 56

4.2.1 Methodeneignung 57

4.2.2 Technische Machbarkeit und Verfügbarkeit 61

4.2.3 Verlässlichkeit (Reproduzierbarkeit und Genauigkeit), sowie Sensitivität und Spezifität der Methoden 63

4.2.4 Interpretation der Ergebnisse von OMICS-Untersuchungen 65

4.2.5 Standardisierung und Validierung 67

4.2.6 Vergleich von OMICS-Technologien mit aktuell bei der Risikoabschätzung von GVP angewendeten Methoden 69

4.2.7 Überlegungen für die konkrete Anwendung von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung von GVP 71

4.2.7.1 Erfahrungen mit der Untersuchung von GVP mittels OMICS-Technologien im Rahmen von wissenschaftlichen Studien 71

4.2.7.2 Möglicher Einsatz von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung von GVP 72

4.2.7.3 Einsatz von OMICS-Technologien bei der Risikoabschätzung des allergenen Potenzials von GVP 75

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN: 79

5.1 Methodische Aspekte für einen Einsatz in der Risikoabschätzung von GVP 79

5.2 Überlegungen zur möglichen Anwendung von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung und zum dafür notwendigen Forschungsbedarf 80

5.3 Leitlinien für den Einsatz von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung 82

6 LITERATUR 85

DANKSAGUNG 95

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: ÜBERSICHT DNA-SEQUENZIERTECHNOLOGIEN (MODIFIZIERT NACH MOROZOVA ET AL. 2008) 24

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: BEISPIEL EINES DNA-MICROARRAYS MIT CA. 38.000 SPOTS. 26
ABBILDUNG 2: ANALYTISCHES SCHEMA BEI DER 2-D-GELELEKTROPHORESE. 30
ABBILDUNG 3: BEISPIEL FÜR DIE AUSWERTUNG EINES DIGE-EXPERIMENTS. 32
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES MASSENSPEKTROMETERS. 33
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MS/MS KOPPLUNG, WIE SIE BEI DER MASSENSPEKTROMETRISCHEN DE-NOVO SEQUENZIERUNG VON PROTEINEN VERWENDET WIRD. 35

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADF – Acid Detergent Fiber

B / Bp – Basen(paare)

cDNA – komplementäre DNA (zu einer RNA Sequenz)

CE – Kapillarelektrophorese

CE-MS – Kapillarelektrophorese gekoppelt mit Massenspektrometrie

DIGE – Differenzielle 2D-Gelelektrophorese

DNA – Desoxyribonukleinsäure

ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay

EFSA – Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit

ESI – Electrospray ionisation

EST – expressed sequence tag

GC-MS – Gas Chromatography – Mass Spectrometry

GVO – Gentechnisch veränderter Organismus

GVP / GMP – Gentechnisch veränderte Pflanze / Genetically modified plant

IEF– Isoelektrische Fokussierung

ILSI – International Life Sciences Institute

iTRAQ – Isobaric tags for relative and absolute quantitation

LC – Flüssigchromatographie

LC-MS/MS – Liquid-Chromatographie-Massenspektometrie/Massenspektometrie

MALDI – Matrix-assisted laser desorption/ionization

MIAME/MIAPE – Minimum Information about a Microarray/Proteomics Experiment

mQTL – Metaboliten QTL

mRNA – messenger RNA

miRNA – Mikro RNA (mit regulatorischer Funktion)

MS – Massenspektrometrie

NDF – Neutral Detergent Fiber

NGS – Next Generation Sequenzing

NMR – Nuclear Magnetic Resonance

NRC – National Research Council

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development

ORF – Open Reading Frames

PTM – Post-translationale Modifikation

QTL – Quantitative Trait Locus

RNA – Ribonukleinsäure

RNAi – RNA-Interferenz

RNA-Seq – RNA-Sequenzierungsmethodik mit hoher Leistungsfähigkeit

UTR – Untranslated Region (untranslatierter Bereich)

SUMMARY

This study addresses the current and future potential of molecular profiling via OMICS-technologies in risk assessment of genetically modified plants (GMP). The presented analysis takes into account the requirement of existing EU legislation for a comprehensive assessment of intended and unintended effects of GMPs utilizing state-of-the-art methods. In the last years, the application of OMICS-technologies in basic and applied research has increased at a fast pace and with wide acclaim for the opportunities of such technologies. Concurrently, the question whether OMICS-technologies could play a significant role in risk assessment has been explored by scientists and risk assessors for nearly a decade. However, OMICS-technologies are not widely used in the risk assessment of GMP in the EU and other regulatory frameworks as yet.

Specifically, the question remains to be addressed how OMICS-technologies may be applied within the current framework of risk assessment. The slow process of evaluation and integration of these technologies could be an obstacle to further improvement of the available approches to risk assessment. The study at hand, therefore, addresses aspects which are considered important to further promote the application of OMICS-technologies in the risk assessment of GMPs: It reviews current development of relevant OMICS-technologies to provide a background for the discussion of their potential merits for risk assessment. The study also discusses requirements according to the existing guidance for risk assessment as to the application of OMICS-technologies. Last but not least, some considerations are presented concerning the practical implementation of specific applications in the near future, particularly addressing some apparent shortcomings of present approaches in risk assessment. The discussion also takes into account further research requirements for some potential applications of OMICS-technologies.

The review focuses on OMICS-technologies particularly relevant for risk assessment of GMPs, namely genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics. The aim is to indicate which kind of application may be feasible in risk assessment. Of particular interest are powerful applications that have been developed for use in applied plant research and plant breeding (e.g. marker assisted crop breeding). Further improvements of the respective technologies may be expected due to the ongoing development and enhancement of necessary equipment and methods for generating and analysing data.

The rapid progress in sequencing technologies, particularly the development of Next Generation Sequencing (NGS), sets a striking example for the pace of improvement in OMICS-technologies. NGS methods facilitate high throughput DNA-sequencing in genomics applications, as well as the profiling of transcribed RNAs by means of RNA-Seq-applications for transcriptomic analyses. These technologies can also be used for ge-

nome-wide comparisons of sequences derived from multiple individuals. Such technologies may open new avenues for application of sequence determination in the framework of risk assessment of GMPs. Of particular relevance for the risk assessment of GMPs are profiling methods for transcripts expressed in transgenic crops. RNA-Seq based transcriptomics applications offer the advantage that sequence-information for is determined individual transcripts in addition to the quantification of expression. In comparison to techniques which are currently used for characterization of specific transcripts (e.g. Northern Blots) and other profiling technologies (e.g. microarrays), such methods can also indicate which specific fusion proteins or other hybrid transcripts are expressed in a GMP.

Similarly relevant for application in risk assessment are recent developments in high-throughput technologies for the profiling of proteins and metabolites. These allow the identification and quantification of the target molecules in a single experiment. Such approaches combine the robustness of proven separation and detection methodology with inter-laboratory reproducibility for the assessment of large numbers of different molecules (proteins or metabolites). For certain applications of OMICS-analysis, i.e. untargeted profiling approaches, such features provide substantial advantages to previously available profiling approaches, e.g. two-dimensional protein gel electrophoresis. Limitations of these latter methods, e.g. higher operational efforts, higher technical variability, lower comparability across experiments, were frequently invoked as arguments to reject the applicability of OMICS-technologies. In addition to the untargeted profiling, proteomics- and metabolomics-technologies may also be applied in a more specific way to the quantitative analysis of specific groups of analytes, e.g. for the analysis of selected proteins by “Mass Western” proteomics techniques. These targeted and semi-targeted applications may be advantageous compared to current methods, e.g. Western Blot experiments, since they permit the assessment of a wider range of analytes simultaneously and are less laborious and less dependent on special reagents like specific antibodies which need to be raised individually against each target protein.

The second part of the study is evaluating the requirements of the existing EU guidance documents for the application of OMICS-technologies in the risk assessment of GMPs. Most of the relevant EFSA guidance documents underline that these technologies in principle are very appropriate for the assessment of unintended modifications present in GMPs. However, OMICS-technologies are currently only characterised as potential future applications and references to OMICS-technologies are too general to provide adequate guidance for applicants and risk assessors on the practical application of OMICS-technologies in a case-specific way.

Additionally, the available guidance documents disregard the crucial differences between the various types of application of OMICS-technologies and address the use of

these technologies in a non-targeted assessment of unintended modifications in GMPs. Particularly targeted and semi-targeted applications of OMICS-technologies are not considered specifically by the guidance documents of EFSA. However, the assessment of a specified set of relevant target substances could be the most promising form of application of OMICS-technologies in the near future. The study indicates that due to their characteristics such approaches may also be better suited to meet the requirements of risk assessment than currently employed methods.

Furthermore, the study tries to evaluate, whether current OMICS-methods fulfill the criteria given in the analysed guidance documents regarding OMICS-applications. Some of the criteria seem to be appropriate only for untargeted applications of OMICS-technologies. Specific criteria for targeted and semi-targeted use of OMICS-technologies are not provided, thus substantially limiting the usefulness of the existing guidance. Also a number of criteria that are regarded as a prerequisite for the use of OMICS-technologies, e.g. standardisation of methods and validation for sensitivity and reproducibility, are not equally required for other methods for the molecular characterization of GMPs which are routinely used in current risk assessments (e.g. Southern and Western Blot methods).

Applicability and availability of technology itself are not seen as major limiting factors, considering the rapid progress of technology development and dissemination of these techniques. In contrast, sampling and sample preparation issues are considered crucial factors that should be addressed in more detail. However such issues are not absolutely specific for OMICS-applications, but concern all available methods for molecular characterization to a certain degree. Particularly relevant for OMICS-technologies, which usually generate huge amounts of data, are aspects connected to data handling, analysis, and interpretation. Appropriate guidance needs to be established to address these aspects. Again, such concerns are not entirely specific for OMICS-technologies though they may be more relevant due to the more comprehensive approach of most OMICS-technologies compared to currently applied methods.

The lack of specificity of available guidance seems to be one of the major impediments to the practical implementation of OMICS-technologies. EFSA guidance should be more specific as to how, when, and in which combination the different OMICS-technologies should be applied. Also, specific guidance needs to be developed for analysis and interpretation of results, using methods of multivariate analysis of large and complex sets of output data. The existing guidance for statistical analysis needs to be supplemented to better address such issues and relevant expertise needs to be established at the authorities involved in GMP risk assessment. Availability of appropriate guidance regarding analysis of OMICS-data is considered crucial to ensure that the non-trivial interpretation of OMICS-datasets is approached in an appropriate way and verifiable conclusions

are drawn from the analytical results. This pertains in particular to the functional interpretation of data and the combined analysis of data generated by different OMICS-technologies.

Further research efforts will be needed to address the latter issue in order to fully exploit the potential of OMICS-technologies. Especially the application of OMICS-technologies for the assessment of unintended environmental effects still demands additional research efforts, e.g. to identify appropriate biomarkers and to establish concrete guidance to implement specific methods or combinations of methods for risk assessment. Additional research should underpin the appropriateness of specific biomarkers in the assessment of specific phenotypic characteristics. As mentioned above, the specific issues of sampling and sample preparation need further attention. Another issue for additional research is the evaluation of methods currently used for data analysis and their appropriateness for GMP risk assessment purposes.

However, with such improvements implemented, profiling-approaches based on OMICS-technologies could major shortcoming of the methods currently used for the comparative assessment of GMP composition. By enabling a more comprehensive and conclusive assessment of molecular changes in GMPs, they would be more appropriate than current methods to support the prediction of biologically relevant effects due to these changes.

The available applications of proteomics-based assessment of plant allergenes are considered a first significant step to implementation of OMICS-technologies in risk assessment of GMPs. This example also indicates that targeted use of OMICS-technologies can supplement existing methods in the overall risk assessment framework to address current limitations regarding the reliable quantification of plant allergens in GMPs. However, in spite of these develoments OMICS-technologies presently do not play a practical role in risk assessment of GMP in the EU and in other regulatory frameworks.

Reluctance to tackle the open issues concerning implementation of OMICS-technologies may negatively impact the further development of risk assessment of GMPs. While OMICS-technologies are successfully implemented in R&D activities of GMP development, results generated with these technologies would not be available for risk assessment. Thus, existing assessment uncertainties resulting from the limitations of currently used methods would not be addressed properly in the future.

ZUSAMMENFASSUNG

Seit mehreren Jahren wird die Frage diskutiert, ob und wie Methoden zur Erstellung von molekularen Profilen, sogenannte OMICS-Technologien, im Rahmen der Risikoabschätzung von GV-Pflanzen (GVP) sinnvoll eingesetzt werden können und sollen. Während verschiedene OMICS-Technologien mittlerweile in der Grundlagenforschung und in der angewandten Pflanzenforschung sehr breit und erfolgreich angewendet werden, spielen diese Techniken bei der Risikoabschätzung von GVP aktuell noch keine wesentliche Rolle.

Die fehlende praktische Berücksichtigung dieser Techniken in der Risikoabschätzung von GVP, sowohl seitens der Antragsteller als auch bei der Prüfung der Vollzugsbehörden, wird dem raschen Fortschritt in der Entwicklung und wissenschaftlichen Anwendung von OMICS-Technologien aber nicht gerecht. Diese Zurückhaltung führt möglicherweise dazu, dass Chancen für die konkrete Verbesserung der Aussagekraft der Risikoabschätzung von GVP nicht genutzt werden. Vor dem Hintergrund der bestehenden Verpflichtung, dass eine möglichst genaue und umfassende Risikoabschätzung der beabsichtigten und unbeabsichtigten Effekte von GVP vor ihrer Zulassung durchgeführt werden muss, ist es daher sinnvoll, das Potenzial und die Anwendbarkeit von OMICS-Technologien zum gegenwärtigen Stand neu zu evaluieren. Das vorliegende Gutachten beschäftigt sich mit mehreren Fragestellungen, die für eine solche Evaluierung relevant sind.

Wesentlich ist einerseits, welche Anwendungen der aktuelle Entwicklungsstand von OMICS-Technologien in Bezug auf die Risikoabschätzung von GVP erlaubt. Das Gutachten behandelt dazu die Frage der Leistungsfähigkeit von relevanten OMICS-Technologien, wie z. B. Genomics und Transcriptomics, Proteomics und Metabolomics. Hervorzuheben ist, dass bereits leistungsfähige OMICS-Systeme zur Untersuchung relevanter Fragestellungen in angewandter Forschung und Pflanzenzucht existieren. Die laufenden Entwicklungsanstrengungen lassen eine weitere Steigerung der Leistungsfähigkeit der Techniken erwarten, sowohl hinsichtlich Generierung von Daten als auch hinsichtlich ihrer Auswertung.

Ein Beispiel dafür ist der Fortschritt bei der Nukleinsäure-Sequenzierung, repräsentiert durch das Next Generation Sequencing (NGS) von DNA-Sequenzen im Rahmen von Genomics-Anwendungen und von RNA-Sequenzen im Rahmen von RNA-Seq-Transcriptomics-Anwendungen. Durch leistungsfähigere Technik ist die Neusequenzierung einzelner Genome nicht mehr der alleinige Fokus der Arbeiten. NGS wird häufig schon zur vergleichenden Analyse der Genom-Unterschiede bei verschiedenen Vertretern einer Spezies eingesetzt. Diese Leistungssteigerung kann auch neue Möglichkeiten für die Ausweitung der DNA-Sequenzanalyse bei der molekularen

Charakterisierung von GVP schaffen. Relevant für die Risikoabschätzung von GVP erscheint die Anwendung dieser Techniken für die Erstellung von Genexpressions-Profilen, wobei die Transkripte nicht nur hinsichtlich der Menge, sondern auch hinsichtlich ihrer Sequenz charakterisiert werden können. Das stellt im Hinblick auf die Charakterisierung der potenziellen Expression von Fusionsproteinen und dem Nachweis von Transkript-Varianten einen wesentlichen Vorteil dar verglichen mit herkömmlichen Methoden zum Nachweis von einzelnen Transkripten (mittels Northern Blots), sowie anderen verfügbaren Techniken der Transcriptomics (mittels Microarrays).

Ebenfalls relevant für die Bewertung der aktuellen OMICS-Technologien sind Fortschritte, die eine wesentliche Leistungssteigerung der Profilerstellung bei Proteinen und Metaboliten mit sich bringen. Moderne Hochdurchsatzverfahren (Hochleistungstrennverfahren kombiniert mit massenspektrometrischer Detektion von einzelnen Verbindungen) erlauben die Analyse und den Nachweis von größeren Zahlen verschiedener Einzelproteine, bzw. Metaboliten mit eindeutigen, teils sogar quantifizierten Ergebnissen mit hoher Reproduzierbarkeit. Einschränkungen bei schon länger verfügbaren, alternativen OMICS-Anwendungen, wie z. B. der 2-dimensionalen Protein-Gelelektrophorese, scheinen bei diesen weiterentwickelten Verfahren weniger relevant. Vor allem Nachteile wie hoher experimenteller Aufwand, hohe technische Variabilität bzw. schlechte Vergleichbarkeit verschiedener Datenquellen, die als Argumente gegen einen Einsatz von Analysenmethoden auf der Basis von der 2-dimensionaler Protein-Gelelektrophorese in der Risikoabschätzung von GVP genannt wurden, sind bei automatisierbaren Hochdurchsatzverfahren besser kontrollierbar.

Der zweite Teil des Gutachtens widmet sich den Vorgaben zur Anwendung von OMICS-Technologien in den bestehenden Leitlinien der EFSA für die Risikoabschätzung von GVP[1]. Im Vergleich mit Empfehlungen zu anderen Techniken, die im Rahmen der Risikoabschätzung eingesetzt werden können, sind die diesbezüglichen Hinweise in den Leitlinien nur sehr allgemein. OMICS-Technologien werden zwar seit 2004 grundsätzlich für besonders geeignet gehalten, um unbeabsichtigte Veränderungen von GVP zu untersuchen. Allerdings wird auch in den neueren Leitlinien (EFSA 2011) der Status von OMICS-Technologien weiterhin nur als „zukünftig interessante Technik“ beschrieben und die entsprechenden Hinweise sind zu wenig konkret formuliert, um eine praktische Anwendung im Rahmen der Risikoabschätzung von GVP in Zulassungsverfahren best-

[1] Eine Übersicht zu den existierenden Leitlinien der EFSA zur Risikoabschätzung von GVO ist zu finden unter: http://www.efsa.europa.eu/en/gmo/gmoguidance.htm.
Im Rahmen dieses Gutachtens wurden alle bis zum Jahresanfang 2011 publizierten Leitlinien-Dokumente berücksichtigt, als speziell relevant für diese Arbeit wurden folgende Leitlinien identifiziert: Leitlinien zur Risikoabschätzung von GVP im Hinblick auf Lebens- und Futtermittelsicherheit (EFSA 2004 & 2011), Leitlinien zur Rolle von Fütterungsstudien in der Risikoabschätzung von GVO (EFSA 2008), Leitlinien zur Risikoabschätzung der Allergenität von GVP, gentechnisch veränderten Mikroorganismen und daraus hergestellten Lebens- und Futtermitteln (EFSA 2010)

möglich zu unterstützen. Der wissenschaftliche Ausschuss der EFSA differenziert auch nicht zwischen den verschiedenen Formen der Anwendung von OMICS-Technologien bei der Risikoabschätzung von GVP, sondern bezieht sich hauptsächlich auf die mögliche Anwendung im Rahmen einer breiten Suche nach unbeabsichtigten Veränderungen in GVP. Der wesentlich einfacher umzusetzende zielgerichtete Einsatz (targeted & semi-targeted) wird in den allgemeinen Leitlinien der EFSA (EFSA 2004, 2011) nicht separat behandelt. Dieser zielgerichtete Ansatz, bei dem ein stark eingegrenztes Spektrum von besonders relevanten Inhaltsstoffen mittels Anwendung von OMICS-Technologien untersucht wird, ist aber kurzfristig die wahrscheinlich interessanteste Anwendungsform in der Risikoabschätzung von GVP. Bei solchen Anwendungen können OMICS-Technologien, verglichen mit derzeit angewendeten Verfahren, auch eine höhere Aussagekraft erzielen.

Das Gutachten behandelt auch die in den genannten Leitlinien der EFSA zur Risikoabschätzung von GVP enthaltenen Voraussetzungen für eine Verwendung von Anwendung von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung von GVP. Es hinterfragt einige der Kriterien, die bei OMICS-Technologien als Voraugesetzung für die Anwendung diskutiert werden (z. B. Standardisierung vor Verwendung, Validierung der Sensitivität und Verlässlichkeit), insbesondere da derartige Kriterien nicht routinemäßig bei anderen molekularen Methoden für die Charakterisierung von GVP (z. B. Southern und Western Blot, etc.) zur Qualitätssicherung vorausgesetzt werden. Die vorgeschlagenen Kriterien scheinen wiederum nur für die breit angelegte, nicht zielgerichtete Untersuchung unbeabsichtigter Veränderungen geeignet, weniger aber in Bezug auf die schon erwähnten zielgerichteten Anwendungen.

Die technische Machbarkeit und Verfügbarkeit des biochemisch-analytischen Teils von OMICS-Technologien stellen derzeit keinen entscheidenden limitierenden Faktor mehr dar. Allerdings bestehen hinsichtlich der Verwendung geeigneter Methoden für Probennahmen und Probenaufarbeitung noch offene Fragen. Desgleichen sind Fragen zur adäquaten Auswertung und Interpretation der Untersuchungsergebnisse für OMICS-Technologien besonders relevant. Für beide Problembereiche ist auch eine bessere Standardisierung der verwendeten Methoden nötig. Solche Fragestellungen sind allerdings nicht spezifisch für OMICS-Technologien, sie sind auch für die derzeit in der Risikoabschätzung von GVP angewendeten Methoden relevant. Der umfassendere Untersuchungsansatz von OMICS-Technologien stellt aber hinsichtlich einer zufriedenstellenden Lösung dieser Fragen höhere Herausforderungen. Hier scheinen weitere Anstrengungen in Bezug auf eine Verwendung von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung von GVP dringend nötig.

Eine entscheidende Schwäche in Bezug auf die Anwendung von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung von GVP stellen die derzeit zu allgemein formulierten Leit-

linien der EFSA dar. Diese differenzieren zu wenig zwischen verschiedenen möglichen Anwendungsformen und geben daher keine Anleitung, wann, wofür und in welcher Kombination OMICS-Technologien eingesetzt werden sollen. Ohne diese Konkretisierungen ist eine baldige Anwendung von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung von GVP nicht zu erwarten.

Für das schon angesprochene Problemfeld der Auswertung der Untersuchungsdaten mittels komplexer Methoden der multivariaten Statistik ist die Entwicklung von geeigneten Leitlinien dringend notwendig. Neben einer derartigen Ergänzung der existierenden Leitlinien für die statistische Behandlung von bestehenden Anwendungen ist der Aufbau entsprechender Expertise auf Seiten der RisikoabschätzerInnen erforderlich. Die Verfügbarkeit von entsprechenden Leitlinien für die Interpretation der Daten ist auch wichtig, um die Nachvollziehbarkeit der von den AnwenderInnen gezogenen Schlussfolgerungen bei derartigen nicht-trivialen Auswertungen sicherzustellen.

Forschungs- und Konkretisierungsbedarf besteht vor allem hinsichtlich der Zusammenführung von Ergebnissen verschiedener OMICS-Technologien, sowie hinsichtlich der funktionalen Interpretation der Daten. Hier sind noch weitere Anstrengungen nötig, um das entsprechende Potenzial von OMICS-Technologien besser nutzen zu können. Im Vergleich mit bestehenden Methoden der inhaltsstofflichen Charakterisierung von GVP, die auf eine sehr geringe Anzahl verschiedener Einzelkomponenten fokussiert, sind OMICS-Technologien aber imstande ein viel umfassenderes Bild der durch die gentechnische Modifikation bewirkten Veränderungen zu zeichnen. Bei geeigneter Anwendung kann so ein viel besserer Rückschluss auf die Relevanz der gentechnischen Veränderungen und die dadurch hervorgerufenen, biologisch relevanten Effekte hergestellt werden. Damit wäre auch eine viel bessere Aussagekraft bei der Risikoabschätzung erreichbar.

Die derzeitigen Ansätze zur Verwendung von Proteomics-Techniken zur Bestimmung von Allergenen stellen einen ersten, wichtigen Schritt auf dem Weg dar, das Potenzial von OMICS-Technologien auch in der Risikoabschätzung von GVP verstärkt zu nutzen. An diesem Beispiel ist auch zu sehen, dass eine zielgerichtete Anwendung von OMICS-Technologien eine gute Ergänzung bestehender Methoden darstellt und Schwächen der derzeit durchgeführten Risikoabschätzung ausgleichen kann, z. B. bei der raschen, verlässlichen und umfassenden Quantifizierung von Pflanzenallergenen.

Nachteilig wäre es, wenn auch in weiterer Zukunft OMICS-Technologien zwar in der Entwicklung und Charakterisierung von GVP immer breiter eingesetzt werden, entsprechende Ergebnisse aber nicht im Rahmen der Risikoabschätzung von GVP vorgelegt werden und evaluiert werden können. Damit bleiben Unsicherheiten in der Bewertung von GVP bestehen, die mit den heute angewendeten Methoden nicht zufriedenstellend untersucht werden können.

1 EINLEITUNG

1.1 Problemstellung

Seit der Entwicklung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) und dem Beginn der kommerziellen Anwendung von gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP) für landwirtschaftliche Zwecke wird der Frage nachgegangen, ob die Verwendung von GVO mögliche negative Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt mit sich bringt und mit welcher Methodik potenzielle negative Auswirkungen von GVOs am besten abgeschätzt und nachgewiesen werden können. Nach der EU-Richtlinie 2001/18/EG über die absichtliche Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) in die Umwelt müssen GVO vor der Freisetzung und dem Inverkehrbringen einer Bewertung hinsichtlich der möglichen Risiken für die menschliche Gesundheit, das Leben von Tieren und Pflanzen und die Natur und Umwelt unterzogen werden. Auch die Zulassung von gentechnisch veränderten Lebens- und Futtermitteln nach der Verordnung (EU) No. 1829/2003 erfolgt auf Basis einer umfassenden Risikoabschätzung ihrer möglichen Auswirkungen, mit einem besonderen Fokus auf der allfälligen Beeinträchtigung der Gesundheit von Menschen und Tieren. In der prinzipiellen Herangehensweise beruht die Risikoabschätzung auf einem Vergleich der spezifischen Eigenschaften eines GVO (bzw. einer GVP) und einem nicht gentechnisch veränderten, aber möglichst nahe verwandten Organismus und soll in umfassender Weise sowohl erwartbare als auch unbeabsichtigte Effekte berücksichtigen.

Seit der Einführung dieses EU-Rechtsrahmens arbeiten die zuständigen Behörden der Mitgliedsstaaten gemeinsam mit den auf EU-Ebene in Zulassungsverfahren für GVO involvierten Institutionen, insbesondere der EU-Kommission und der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), an der Erarbeitung von Regelungen und Leitlinien für die Durchführung der notwendigen Risikoabschätzung. Von besonderer Relevanz sind in diesem Zusammenhang die von der EFSA und dem wissenschaftlichen Ausschuss der EFSA für GVO erstellten Leitlinien zu allgemeinen und speziellen Aspekten der Risikoabschätzung von GVO. Diese Leitliniendokumente sollen auf der Basis der gesetzlichen Vorgaben Details zu den Prinzipien und der Vorgangsweise für die Risikoabschätzung seitens AntragstellerInnen und zuständiger Behörden festlegen. Die Leitlinien geben darüber hinaus Anleitung, welche für die Risikoabschätzung notwendigen Informationen vorgelegt und welche Methoden angewendet werden sollen. Eine wesentliche Grundlage für die Risikoabschätzung ist die möglichst genaue Charakterisierung der genetischen Veränderungen, die bei der Herstellung eines bestimmten GVO (d. h. eines Events) in beabsichtigter oder unbeabsichtigter Weise aufgetreten sind, sowie die Beschreibung der dadurch hervorgerufenen Veränderungen in der inhaltsstofflichen Zusammensetzung und in den phänotypischen Merkmalen eines GVO bzw. einer GVP (siehe z. B. EFSA 2004 & 2011, EFSA 2010). Dieses Gutachten beschäftigt sich mit der Frage, ob und wie

Methoden zur Erstellung von molekularen Profilen mit Hilfe von sogenannten OMICS-Technologien für die genannten Zwecke eingesetzt werden können bzw. sollen.

Mit dem Ausdruck OMICS-Technologien wird eine Vielzahl von verschiedenen biochemischen Analysemethoden bezeichnet, die dazu dienen, die in einer Probe vorhandenen Moleküle einer bestimmten Substanzklasse (z. B. DNA-Sequenzen, RNA-Transkripte, Proteine, Stoffwechselprodukte, etc.) möglichst umfassend zu charakterisieren. Die einzelnen OMICS-Technologien werden dabei nach der jeweiligen Substanzklasse benannt. Die für das vorliegende Gutachten bedeutsamsten OMICS-Technologien sind: Genomics, Transkriptomics, Proteomics sowie Metabolomics.

Die Frage des Einsatzes derartiger OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung von GVP wird auch auf der EU-Ebene schon seit längerem diskutiert (siehe z. B. Kuiper et al. 2003), die verschiedenen existierenden Leitlinien der EFSA zur Risikoabschätzung von GVP enthalten aber nur sehr vage Hinweise auf eine zukünftige Anwendung in der Risikoabschätzung von GVP. Sowohl das kürzlich publizierte Konsensuspapier der OECD zur molekularen Charakterisierung von GVP (OECD 2010) als auch die unten genannten EFSA-Leitlinien weisen jedoch ausdrücklich auf das Potenzial von OMICS-Technologien als zusätzliche Methoden hin, um die Breite und Aussagekraft der durchgeführten Risikoabschätzung von GVP zu erhöhen; vor allem hinsichtlich unbeabsichtigter Veränderungen bei GVP. Derartige Aussagen finden sich in den allgemeinen Leitlinien der EFSA zur Risikoabschätzung von GVP im Hinblick auf Lebens- und Futtermittelsicherheit, bzw. Umwelteffekte (EFSA 2004 & 2011) und in den spezifischen Dokumenten zur Rolle von Fütterungsstudien in der Risikoabschätzung von GVO (EFSA 2008) und zur Risikoabschätzung der Allergenität von GVP, gentechnisch veränderten Mikroorganismen und daraus hergestellten Lebens- und Futtermitteln (EFSA 2010).

Die EFSA-Leitliniendokumente differenzieren zwischen der Beurteilung von beabsichtigten Veränderungen bei GVP sowie dem Nachweis und der Charakterisierung von unbeabsichtigten Veränderungen bzw. Effekten. Die Risikoabschätzung in Bezug auf die erstgenannte Fragestellung ist im Allgemeinen leichter und vor allem zielgerichteter durchführbar als die Untersuchung von unbeabsichtigten Veränderungen. Es werden dafür hauptsächlich Untersuchungen vorgeschlagen, die spezifisch auf die eingebrachten transgenen Elemente abzielen. Dazu zählen ins Genom der GVP integrierte transgene DNA-Sequenzen und deren Produkte, z. B. die von Transgenen abgelesenen RNAs und die in den GVP gebildeten transgenen Proteine, sowie die in Folge der genetischen Modifikation gebildeten Stoffwechselprodukte. Eine andere Situation liegt bei der Charakterisierung von unbeabsichtigten Veränderungen vor, die bedingt durch die genetische Modifikation in GVP auftreten können. Sogenannte unbeabsichtigte Veränderungen können auf unterschiedlichen Ebenen (z. B. des Genoms, des Transkriptoms, des Proteoms, Interactoms bzw. des Metaboloms) auftreten oder wirksam werden (siehe z. B. Moch 2006). Auch der-

artige Veränderungen sollen bei der Risikoabschätzung mit hoher Sicherheit erfasst und untersucht werden (z. B. EFSA 2004 & 2010). Unbeabsichtigte Veränderungen treten bei gentechnischen Modikationen relativ häufig auf (siehe z. B. Cellini et al. 2004); sie stellen damit eine systematische Herausforderung für die Entwicklung von GVP für die kommerzielle Nutzung und die Risikoabschätzung solcher GVP dar (Cellini et al. 2004, Heinemann et al. 2011). Sie lassen sich in „vorhersagbare unerwartete Effekte“ und „unvorhersagbare unerwartete Effekte“ einteilen[2], wobei derzeit fraglich bleibt, ob „unvorhersagbare, unerwartete Effekte“ mit der notwendigen Sicherheit und Genauigkeit bei den Untersuchungen erkannt werden können.

Für die Umweltrisikoabschätzung ist weiterhin relevant, dass nur wenige der Zusammenhänge zwischen der Wirkung von Umwelteinflüssen und dem Auftreten von unbeabsichtigten Effekten in GVP bisher bekannt sind bzw. erklärt werden können. Vor allem über mögliche Unterschiede zwischen dem Verhalten von GVP unter kontrollierten Bedingungen, z. B. in Glashäusern, und dem Verhalten unter Freilandbedingungen existieren in der Literatur nur wenige Anhaltspunkte. Die Relevanz solcher Effekte belegen z. B. im Jahr 2010 publizierte Daten zu mehreren GV-Weizenlinien, die in unabhängigen Transformationsexperimenten mit einem gleichartigen transgenen Konstrukt zur Vermittlung von Pilzresistenz versehen wurden (Zeller et al. 2010). Für diese transgenen Weizenlinien wurde festgestellt, dass sie sich unerwarteterweise signifikant in Eigenschaften (Transgenexpression, Pilzresistenz, Fitness, düngerabhängiges Wachstum, etc.) unterschieden, die nicht im Zusammenhang mit der eingeführten Eigenschaft stehen. Bei der umfassenden Risikoabschätzung von GVP im Rahmen der europäischen Vorschriften sollaber das Auftreten von unerwarteten Effekten bei verschiedenen Umweltbedingungen erfasst und bewertet werden können.

Wie schon angemerkt stellen molekulare Profilerstellungsmethoden (OMICS-Technologien) aufgrund ihrer Charakteristika prinzipiell einen besonders geeigneten Ansatz für die nicht auf bestimmte Inhaltsstoffe von GVP fokussierte Untersuchung von Unterschieden zwischen GVP und nicht gentechnisch veränderten Vergleichslinien dar (Kuiper et al. 2003, Cellini et. al 2004). Dass der Einsatz dieser Techniken als zusätzliche Methodik die bestehende Verfahren sinnvoll ergänzen kann, wurde auch auf der Basis von konkreten Forschungsergebnissen angeregt (z. B. Zolla et al. 2008).

Wesentlich für diese Überlegungen ist auch der Umstand, dass in den letzten Jahren in der Weiterentwicklung der diesbezüglichen Techniken sowie hinsichtlich des Einsatzes in der Grundlagenforschung, sowie der angewandten Wissenschaft eine besonders rasche

[2] Sogenannte „vorhersagbare unerwartete Effekte“ gehen zwar über die gewünschte Veränderung in GVP hinaus; ihr Auftreten ist aber mit dem gegenwärtigen Wissenstand plausibel zu erklären und sie sind einer hypothesengelenkten Untersuchung besser zugänglich als sogenannte „unvorhersagbare unerwartete Effekte“, für die zum Zeitpunkt der Risikoabschätzung keine Wirkungshypothesen vorliegen (Cellini et al. 2004).

Entwicklung stattgefunden hat. Vor diesem aktuellen Hintergrund muss auch neu diskutiert und bewertet werden, ob die Argumente, die gegen einen verstärkten Einsatz in OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung angeführt wurden und werden, weiterhin noch stichhaltig sind. Insbesondere muss in Anbetracht der erheblich gestiegenen Erfahrungswerte mit dem breiteren Einsatz von OMICS-Technologien für bestehende und neue Einsatzgebiete auch bewertet werden, bei welchen spezifischen Fragestellungen in der Risikoabschätzung die Verwendung dieser Methoden angezeigt erscheint (Heinemann et al. 2011). Für die Diskussion ist deshalb der aktuelle Entwicklungsstand der diesbezüglichen Techniken von Interesse. Darüber hinaus ist wichtig festzustellen, welche Voraussetzungen für eine breitere Anwendung in der Risikoabschätzung mittlerweile gegeben sind (z. B. spezifische Eignung, Verfügbarkeit, Vergleichbarkeit, Standardisierung, Vorteile gegenüber bestehenden Ansätzen, etc.). Wichtig ist es auch aufzuzeigen, welche Problemfelder bei einem Einsatz von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung von GVP weiterhin bestehen und welcher zusätzliche Forschungs- und Entwicklungsbedarf für einen derartigen Einsatz noch gegeben ist.

Im Rahmen des vorliegenden Gutachtens soll ein Beitrag zu dieser notwendigen Diskussion geliefert werden, indem eine Übersicht zum Entwicklungsstand von OMICS-Technologien gegeben wird und für die Risikoabschätzung von GVP spezifisch relevante Einsatzmöglichkeiten diskutiert werden.

1.2 Vorgehensweise

Das Gutachten gibt im ersten Teil einen Überblick über relevante OMICS-Technologien, sowie über den derzeitigen Entwicklungsstand bei diesen Methoden und illustriert die Anwendungsmöglichkeiten der verschiedenen Verfahren anhand von Beispielen.

Für diese Darstellung wurde eine Literaturrecherche durchgeführt und durch weiterführende Informationen aus Interviews mit Experten (welche aktiv mit der Entwicklung und Anwendung solcher Techniken befasst sind) ergänzt. Bei der Auswahl der ExpertInnen wurde darauf Wert gelegt, sowohl Personen aus der Grundlagenforschung und Methodenentwicklung zu interviewen, als auch die Einschätzung von ExpertInnen aus dem Analytik-Dienstleistungsbereich hinsichtlich der praktischen Umsetzbarkeit und Kostenabschätzung der verschiedenen Technologien einfließen zu lassen. Die Interviews wurden mündlich in offener Form geführt. Es wurde ein vorab erstellter Interviewleitfaden verwendet. In den Interviews sollte einerseits die derzeitige Situation bei der Anwendung der genannten Methoden erfasst werden, andererseits sollten sie Hinweise darauf geben, wie die zukünftige Entwicklung auf dem Gebiet abgeschätzt werden kann und welche Voraussetzungen für eine standardisierte Anwendung gegeben sind. Wo zutreffend wurden auch Fragen zu möglichen Kosten derartiger Analysen erörtert, z. B. mit Analytik-

dienstleistern. Neben den Interviews zu methodisch-analytischen Fragestellungen wurden auch Interviews mit ExpertInnen zu Fragen der Interpretation derartiger Daten und der Umsetzung bei der Risikoabschätzung von GVOs geführt. Hier lag der Schwerpunkt der Fragestellung auf den Möglichkeiten der Implementierung solcher Analysen in die bestehenden Leitlinien.

Weiterhin wird dargestellt, welche Rolle OMICS-Technologien bei der Charakterisierung und Risikoabschätzung von gentechnisch veränderten Organismen in Zukunft spielen können. Das betrifft einerseits die Frage, inwieweit der Äquivalenzvergleich zwischen bestimmten GVOs und (nicht gentechnisch veränderten) Vergleichslinien durch Anwendung solcher Methoden ergänzt werden könnte und andererseits, inwieweit die Anwendung dieser Methoden eine bessere Abschätzung sogenannter „unintendend side effects“ von gentechnischen Veränderungen zulässt. Für die Diskussion der möglichen zukünftigen Bedeutung von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung wurden als Grundlage Informationen aus folgenden Quellen genutzt:

- Beispielen zu Anwendungsmöglichkeiten für OMICS-Technologien in der Pflanzenforschung anhand der verfügbaren wissenschaftlichen Literatur, darunter z. B. Untersuchungen mittels OMICS-Technologien betreffend Auswirkungen von Umweltbedingungen auf Zusammensetzung und Stoffwechselvorgänge von Pflanzen.
- In der wissenschaftlichen Literatur dokumentierte Untersuchungen von gentechnisch veränderten Pflanzen mit Hilfe von OMICS-Technologien.
- Aussagen von Fachexperten in Bezug auf die zukünftige Rolle von OMICS-Technologien einerseits aus den im Rahmen des Gutachtens geführten Interviews sowie aus Publikationen zum Thema.

Im Speziellen soll diskutiert werden, inwieweit entsprechende Methoden bereits genügend weit entwickelt und etabliert sind, um sie im Rahmen der Risikoabschätzung von GVP sinnvoll einsetzen zu können und welche Potenziale OMICS-Technologien als zusätzliche Methodik für die Risikoabschätzung von GVP haben.

Wegen ihrer wesentlichen Bedeutung für die innerhalb der EU praktizierte Risikoabschätzung werden insbesondere auch die bestehenden Leitlinien der EFSA dahingehend untersucht, welche konkreten Empfehlungen sie für den praktischen Einsatz von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung geben. Die Analyse der hinsichtlich der Fragestellung relevanten EFSA-Leitlinien erlaubt auch die Identifikation von derzeitigen Schwachstellen betreffend Anwendung von OMICS-Technologien, sowie das Aufzeigen von Verbesserungsmöglichkeiten.

2 GRUNDLAGEN UND ENTWICKLUNGSSTAND VON RELEVANTEN OMICS-TECHNOLOGIEN

2.1 Was sind Genomics und Transkriptomics?

Genomics beschäftigt sich mit der Gesamtheit der genetischen Information eines Organismus. In erster Linie wird darunter zwar oft die Entschlüsselung der Genomsequenz eines Organismus verstanden, entscheidend ist aber die weiterführende bioinformatische Analyse der Sequenzdaten und welche Rückschlüsse auf die Funktion des Organismus gemacht werden können. Durch die aktuellen Entwicklungen in der Sequenziertechnik ist die Zahl jener Organismen, für die vollständige Genom-Daten vorliegen, in den letzten Jahren sprunghaft angestiegen. Derartige Sequenzdaten bilden die Grundlage für die systematische Analyse funktionaler Zusammenhänge eines Organismus. Sie bilden auch die Grundlage für Untersuchungen der regulatorischen Zusammenhänge der Genaktivität mittels Transkriptionsanalyse und liefern die nötigen Informationen (abgeleitete Proteinsequenz), die für viele Proteom-Analysen notwendig sind.

Während sich Proteine oder Stoffwechselprodukte in Abhängigkeit von physiologischen Bedingungen rasch in Menge und Zusammensetzung ändern können, stellt die DNA in einer Zelle im Vergleich dazu ein verhältnismäßig statisches System dar. Die DNA-Sequenz ist in den verschiedenen Zellen eines Organismus identisch und verändert sich nur langsam (Mutationen, Deletionen, Methylierung). Je nachdem, welche Gene aber aktiv sind, unterscheiden sich die Zellen in ihrer Funktion (verschiedene Zelltypen) und ihrem physiologischen Status grundlegend. Die Aktivität von Genen (Transkription) wird vor allem durch die Analyse der exprimierten messenger RNA (mRNA) gemessen. Die Funktion einer Zelle bzw. eines Organismus wird durch das komplexe Zusammenwirken vieler Gene gesteuert. Lange Zeit war es nur möglich, die Regulierung einzelner oder nur sehr weniger Gene parallel zu untersuchen, wodurch sich nur ein unvollständiges Bild der regulatorischen Zusammenhänge darstellen ließ. Die Entwicklung von sogenannten DNA-Microarrays (oder DNA-Chips) hat die Analyse von tausenden Genen gleichzeitig möglich gemacht. Damit ist es auch möglich, ein Expressionsprofil aller (bekannten) Gene eines Organismus zu erstellen. Die Gesamtheit aller Transkripte wird in Analogie zum Genom als Transkriptom bezeichnet. In den 1980er und 1990er Jahren erhoffte man sich noch ein umfassendes Verständnis der Funktion der Gene allein durch die Kenntnis ihrer DNA-Sequenz und ihrer Expression. Aber schon bald zeigte sich, dass nur ein Teil der physiologischen Vorgänge einer Zelle auf trankriptionaler Ebene reguliert wird. Laut Experteneinschätzung erfolgt nur 20 - 30 % der Regulation in einer Zelle über die Steuerung der Genaktivität. Ein weitaus größerer Teil der Regulationsmechanismen erfolgt auf der Ebene der Proteinaktivität. Durch diese Erkenntnis rückte vor allem die Protein-Analyse wieder verstärkt in den Fokus der wissenschaftlichen Forschung.

2.1.1 Sequenzanalysen (Genomics)

Obwohl die von Frederick Sanger und Kollegen (Sanger et al. 1977) entwickelte Methode der Didesoxy-Sequenzierung für viele Jahre Standard in der Sequenziertechnologie war und auch das menschliche Genom noch mit dieser Methode entschlüssel wurde, soll im folgenden Kapitel der Fokus auf sogenannte „high-throughput"-Sequenzierung (z. B. Next Generation Sequenzierung", NGS) gelegt werden. Die Sequenzierleistung dieser neuen Technologien übersteigt die der Sanger-Methode um das 1.000- bis 10.000-fache. Damit ist das Sequenzieren von Genomen auch für Einzellabore möglich. Die meisten Technologien (außer SOLiD) basieren auf dem Mechanismus der DNA-Strang-Synthese durch eine DNAPolymerase. Die zu sequenzierende DNA dient dabei als Vorlage für eine DNA-Polymerase, um einen komplementären Strang zu synthetisieren, wobei die Abfolge des Einbaus der verschiedenen Nukleotide (G, A, T, C) durch verschiedene Mechanismen (Fluoreszenz, pH-Shift) detektiert wird. Durch Fortschritte in der Materialtechnik konnten in den letzten Jahren die Reaktionszonen extrem miniaturisiert werden, wodurch eine massive Parallelisierung der Reaktionen und damit Sequenzierleistungen von 3 Gigabasen/Analyse (SOLiD System von ABI, im Vergleich: menschliches Genom 3,2 Gb) ermöglicht werden. Dabei unterscheidet man generell Techniken, die kurze Sequenzen generieren mit entsprechend massiver Parallelisierung (z. B. Illumina System mit Leselängen von ca. 36 Basenpaaren und bis zu 50 Millionen Reaktionen gleichzeitig) und Methoden mit längeren Leselängen bis zu 400 Basenpaaren, dafür aber weniger parallelen Reaktion (z. B. 454-Pyrosequenzieung/Roche mit 1 - 2 Millionen Reaktionen).

Die verschiedenen Technologien bieten entsprechend der unterschiedlichen Applikationen Vor- und Nachteile. Längere Leselängen haben den Vorteil, dass die Parameter für die Assemblierung der Einzelsequenzen zu zusammenhängenden Stücken („contigs") restriktiver gesetzt werden können und damit eine höhere Qualität der Sequenz erreicht werden kann. In der Expressions-Analyse können auch längere Transkripte mit einer einzelnen Reaktion erfasst werden, was ebenfalls verlässlichere Daten liefert. Entsprechend sind solche Methoden für die *de-novo* Sequenzierung von höheren Organismen und cDNA Analysen zu bevorzugen. Die immense Sequenzierleistung der Techniken mit kürzeren Leselängen eignet sich hingegen hervorragend für die Resequenzierung von Genomen, bei denen man nicht mehr auf eine komplexe Assemblierung der Einzelsequenzen angewiesen ist. Die Aussicht, das gesamte menschliche Genom mit verhältnismäßig geringem finanziellen Aufwand zu sequenzieren, hat zu Anstrengungen geführt, in den nächsten 10 Jahren tausende menschliche Genome zu sequenzieren[3] und damit neuartige Einblicke in die Bedeutung und die Auswirkungen genetischer Variationen zu erhalten.

[3] http://www.1000genomes.org

Nachstehend sollen die zurzeit relevantesten am Markt befindlichen Systeme in ihren Grundzügen dargestellt werden. Da die Arbeitsschritte im Einzelnen komplex sind, wird hier nur eine vereinfachte Darstellung der Methoden gegeben:

- 454/Pyrosequencing (Roche)

Genomische DNA wird in Fragmente von 500 - 800 bp zerlegt. Anschließend werden sogenannte Linker (kurze DNA-Moleküle mit bekannter Sequenz) an diese Bruchstücke ligiert. Über eine Bindungsstelle im Linker wird nun ein einzelnes DNA-Molekül an ein Mikrokügelchen gebunden. Durch einen speziellen Amplifikationsschritt wird das DNA-Molekül vervielfältigt, so dass das Kügelchen jetzt eine Vielzahl identischer DNA-Moleküle aufweist, wobei jedes Kügelchen nur eine bestimmte Art von DNA trägt. Die Kügelchen werden jetzt in den Vertiefungen (Ø 29 µm) einer Picotiter-Platte fixiert (1 Kügelchen/Vertiefung) und die eigentliche Sequenzierungsreaktion durchgeführt. Eine derartige Picotiter-Platte trägt bis zu 3,4 Millionen Vertiefungen. Die Platte wird nun nacheinander immer wieder mit den einzelnen Nukleotiden überspült. Das DNA-Molekül wird sequenziert, indem der komplementäre Strang synthetisiert wird. Jedes Mal, wenn ein Nukleotid (A, T, C, oder G) eingebaut wird, wird das dabei freiwerdende Pyrophosphat in ein Lichtsignal umgewandelt und von einer CCD-Kamera detektiert. So kann aus der Abfolge der Lichtblitze in den einzelnen Vertiefungen die Sequenz der darin fixierten DNA-Bruchstücke ermittelt werden. Die durchschnittliche Leselänge beträgt ca. 400 Basenpaare bei einer Sequenzierleistung von 400 Mb pro Lauf (Stangier und Hegele 2011) und einer Analysendauer von ca. 4 - 10 Stunden.

- Illumina/Solexa

Die hier angewandte Technik basiert auf einem ähnlichen, wenn auch im Detail unterschiedlichen System. Die genomische DNA wird auch in diesem Fall in Fragmente von mehreren hundert Basenpaaren zerlegt. Anschließend wird wiederum ein Linker an diese Bruchstücke ligiert. Die DNA-Moleküle werden nun an komplementäre Linker (Anker-Linker) auf der Reaktionsplatte gebunden und wiederum durch einen speziellen Amplifikationsschritt vervielfältigt. So entsteht ein Cluster von identischen DNA-Molekülen an einer definierten Position auf der Platte. Bis zu 50 Millionen Cluster können auf einer Platte generiert werden. Die Platte wird nun mit allen 4 Nukleotiden überspült, wobei aber jedes Nukleotid (A, T, C, G) mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Das entsprechende Nukleotid wird nun in den komplementären Strang eingebaut. Ein im Nukleotid eingebauter Syntheseblocker stoppt die Reaktion und die Fluoreszenz(farbe) in jedem Cluster wird gemessen. Anschließend wird der Syntheseblocker in einem Waschschritt wieder entfernt und ein neuer Zyklus beginnt. So wird durch die Abfolge der detektierten Fluoreszenzfarben die Sequenz in jedem DNA-Cluster bestimmt. Bei dieser Methode werden zwar nur ca. 36 bp lange Sequenzen generiert, aber bei bis zu 50 Millionen Clustern

ergibt sich eine Gesamtsequenz von > 1 Milliarde Basen (Gb) pro Analyse. Eine Analyse dauert etwa 2 - 3 Tage.

- SOLiD (ABI)

Die Probenvorbereitung ist ähnlich der 454-Technologie. Linker werden an das zu sequenzierende DNA-Fragment ligiert, an ein Mikrokügelchen angeheftet und mit PCR vervielfältigt. Die Mikrokügelchen werden auf einer speziellen Glasoberfläche immobilisiert. Die Sequenzierungsreaktion startet durch das Anlagern eines zum Linker komplementären Oligonukleotids. Im Gegensatz zu anderen Sequenziertechniken erfolgt die Bestimmung der DNA-Sequenz in diesem Fall aber nicht durch eine Polymerisationsreaktion, sondern durch das weitere Anlagern spezieller fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide, die Teile der gesuchten Sequenz (2 Basenpaare) aufweisen. Durch das wiederholte Anlagern von verschiedenen Untersuchungssonden werden immer 2 Basenpaare der zu sequenzierenden DNA bestimmt. Auf diese Weise werden Sequenzen von ca. 35 Basenpaaren ermittelt. Eine Analyse dauert etwa 6 Tage und liefert im Durchschnitt 3 Gb Sequenz.

Tabelle 1: Übersicht DNA-Sequenziertechnologien (modifiziert nach Morozova et al. 2008)

Technologie	Methode	Leselänge	Basenpaare / Lauf	Zeit/Lauf	Unternehmen, Website
Automatisierter Sanger Sequenzierer ABI3730xl	Synthese in Anwesenheit von “dye terminators“	Bis zu 900 bp	96 kb	3 Std.	Applied Biosystems www.appliedbiosystems.com
454/Roche FLX System	Pyrosequencing	200-300 bp	80–120 Mb	4 Std.	Roche Applied Science www.roche- applied-science.com
Illumina/ Solexa	Synthese in Anwesenheit von reversiblen “dye terminators“	30-40 bp	1 Gb	2,5 Tage	Illumina, Inc. www.illumina.com
ABI/SOLiD	Massive parallel Sequenzierung durch Ligation	35 bp	1–3 Gb	6 Tage	Applied Biosystems www.appliedbiosystems.com

Ein neues System der Fa. Pacific Biosciences[4], das zurzeit auf den Markt kommt, zählt zu den vielversprechendsten Neuerungen in der Sequenziertechnologie. Der große Vorteil dieser neuen Methode sind Leselängen bis zu 1.000 Basenpaare, was entscheidende Vorteile für viele Applikationen hat (siehe oben).

2.1.2 Transkriptomics

2.1.2.1 Microarray-Untersuchungen

Für die genomweite Expressionsanalyse wurden in den letzten Jahren vor allem DNA-Microarrays eingesetzt. Bis vor kurzem war diese Technologie noch „state of the art“ und es wurden für die wichtigsten Modellorganismen (Maus, Drosophila, Mensch) DNA-Microarrays mit bis zu 80.000 Genen entwickelt[5].

Im Nachfolgenden soll kurz das Prinzip einer DNA-Microarray-Analyse erläutert werden.

DNA-Microarrays dienen dazu, die mRNA-Menge bestimmter Gene und damit ihre Aktivität zu messen. Es gibt hauptsächlich zwei verschiedene Arten von DNA-Microarrays, einerseits solche, bei denen cDNA (*complementary DNA*, DNA die mittels des Enzyms reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert wird) oder Fragmente von PCR-Produkten die von mRNA abgeleitet sind auf das Trägermaterial gedruckt werden ("Spotted Microarrays" vergleichbar mit dem Aufbringen eines Tintentröpfchen bei einem Tintenstrahldrucker) und solche, die auf synthetisch hergestellten Oligonukleotiden beruhen ("Oligonukleotide Microarrays"). Diese DNA-Fragmente dienen als Sonden, die an definierte Positionen eines Rasters, z. B. auf Glasträger, aufgebracht werden. Mit modernen Spot-Techniken können bis zu 1 Million DNA-Punkte auf der Größe eines Mikroskop-Objektträgers platziert und so mehrere tausend Gene gleichzeitig und in entsprechenden Replikaten analysiert werden. Jeder Spot enthält nur eine spezifische DNA-Sequenz.

Zunächst wird mRNA aus der zu untersuchenden Probe extrahiert und diese mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (bei Transkriptionsanalysen wird die RNA zuvor in cDNA umgeschrieben). Bei der Hybridisierung binden die markierten einzelsträngigen cDNA-Stücke aus der Probe an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array. Nach Abwaschen der nicht gebundenen cDNA Stücke wird das Fluoreszenzsignal an jeder Position des DNA-Microarrays detektiert. Da die Identität der Gene durch die Position auf dem Array definiert ist, kann so festgestellt werden, welche Nukleinsäuren (z. B. mRNAs) in der Probe vorhanden waren bzw. welche Gene aktiv sind. Bei einer differenziellen Expressionsanalyse wird mRNA aus unterschiedlichen Versuchsbedingungen mit unterschiedlichen Fluores-

[4] www.pacificbiosciences.com

[5] siehe z B. www.genomics.agilent.com

zenzfarbstoffen (z. B. Cy3 und Cy5) markiert. Die markierten cDNAs werden gemischt und auf den Array hybridisiert. In der Auswertung werden die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe zumeist farblich kodiert (z. B. Cy3: grün, Cy5: rot). Je nachdem, ob ein bestimmtes Gen unter den gegebenen Versuchsbedingungen auf oder ab reguliert ist, verschiebt sich der Anteil an roten oder grünen Fluoreszenzsignalen. Bei unveränderter Expression erscheint der betreffende Spot in gelber Farbe wegen der gleichen Anteile von roten und grünen Signalen (Abb. 1). So können Unterschiede in der Genaktivität unter verschiedenen physiologischen oder genetischen Bedingungen analysiert werden. Durch die gleichzeitige Analyse vieler (unter Umständen) aller Gene eines Organismus kann so ein Bild der funktionellen Zusammenhänge und gegenseitigen Beeinflussungen erhalten werden.

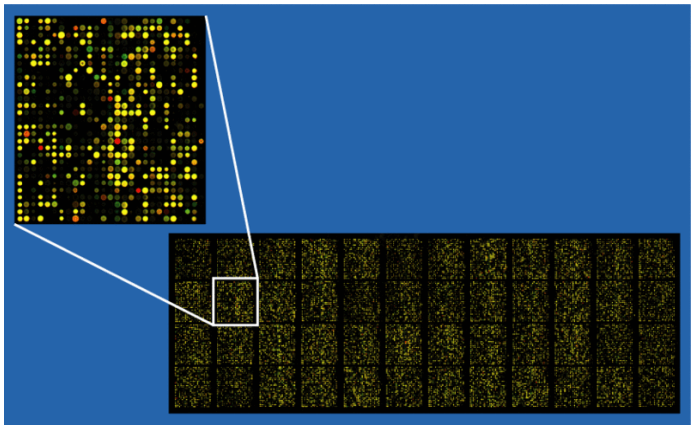


Abbildung 1: Beispiel eines DNA-Microarrays mit ca. 38.000 Spots.
Im vergrößerten Ausschnitt sind einzelne Spots zu erkennen. Jeder Spot entspricht einem spezifischen Gen. Unterschiedlich regulierte Gene sind durch eine Farbverschiebung von gelb zu entweder rot (Versuchsbedingung 1) oder grün (Versuchsbedingung 2) zu erkennen. (Bildquelle:
http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Microarray2.gif&filetimestamp=20070128215715)

In den letzten Jahren wurden für eine Vielzahl von Organismen kommerzielle Microarrays entwickelt. Neben klassischen Modellorganismen wie Hefe, Maus oder Drosophila sind auch DNA-Microarrays für viele Kulturpflanzen verfügbar (z. B. Mais, Soja, Reis, Weizen usw.). Neben cDNA-basierten Arrays wurden in den letzten Jahren sogenannte „Tiling"-Arrays entwickelt, die das gesamte Genom eines Organismus in zumeist überlappenden Fragmenten beinhalten. Diese „Tiling"- Arrays werden ebenfalls für Transkriptom-Analysen eingesetzt, aber auch für Untersuchungen der Chromatinstruktur und dessen Veränderungen in Abhängigkeit der Genaktivitäten da sie im Gegensatz zu cDNA-Arrays neben den kodierenden Sequenzen auch sämtliche regulatorischen Bereiche beinhalten.

Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass auch sehr schwach exprimierte Gene, die unter Umständen auf einem cDNA-Array nicht verlässlich repräsentiert sind, so ebenfalls erfasst werden.

2.1.2.2 RNA-Seq

Durch die neuesten Entwicklungen bei „Next Generation Sequencing“ (NGS) werden aber zunehmend Sequenzierungsmethoden bei Expressionsstudien angewandt. Für die Transkriptom-Analyse auf Basis von NGS hat sich in der wissenschaftlichen Literatur auch die Bezeichnung RNA-Seq etabliert. Dabei wird die mRNA wiederum in cDNA umgeschrieben und diese dann mit den zuvor beschriebenen Next Generation Sequencing-Methoden sequenziert. RNA-Seq hat gegenüber der Microarray-Technologie einige entscheidende Vorteile (Wang et al. 2009). So sind Arrays an die Verfügbarkeit von bereits bestehenden Sequenzdaten gebunden, während RNA-Seq auch die Charakterisierung von noch unbekannten Transkripten erlaubt. Da RNA-Seq die genaue Sequenz des Transkripts ermittelt, können auch unterschiedliche RNA-Isoformen bestimmt und damit ein umfassenderes Bild von z. B. Allel-Expressionen und alternativen Splice-Produkten erhalten werden. Der Konzentrationsbereich, innerhalb dessen die Menge eines bestimmten Transkripts bestimmt werden kann, hat bei RNA-Seq einen Umfang von 3 - 4 Größenordnungen verglichen mit ca. 2 Größenordnungen bei Microarrays. Damit erlaubt RNA-Seq eine deutlich bessere quantitative Bestimmung von schwach exprimierten Genen (Marioni et al. 2008). Weiter zeichnen sich sequenzbasierte Analysen durch eine bessere statistische Robustheit und weniger aufwändige Vorgaben für die experimentelle Standardisierung aus (Morozova et al. 2008). Laut Expertenmeinung werden bereits 50 % aller Expressionsstudien mit RNA-Seq durchgeführt. Die Aussicht, durch den Einsatz von reverser Transkriptase anstatt von DNA-Polymerase RNA-Moleküle direkt zu sequenzieren, würde eine weitere Verbesserung bei Expressionsstudien bedeuten. Mögliche systematische Fehlerursachen, z. B. durch die bei anderen Methoden notwendigen Klonierungsschritte, können dadurch in Zukunft noch weiter reduziert werden.

2.1.3 Welche Ergebnisse liefern Genomics und Transkriptomics?

Bei der Anwendung von Next Generation Sequencing richtet sich die Auswahl des geeigneten Verfahrens zumeist danach, ob ein noch unbekanntes Genom sequenziert werden soll (*de-novo* Sequenzierung) oder ob auf der Basis einer bestehenden Sequenz wissenschaftliche Fragestellungen im Zusammenhang mit Einzelnukleotid-Polymorphismen, Allel-Varianten etc. untersucht werden sollen (Resequenzierung). Wie bereits erwähnt erlauben bei der *de-novo* Sequenzierung längere Leselängen eine leichtere und genauere Assemblierung der Einzelsequenzen und auch bei der RNA-Seq ist die längere Sequenzinformation für die Identifizierung von Splicing-Positionen von Vor-

teil. Bei der Resequenzierung von Genomen können geringere Leselängen durch eine entsprechend größere Sequenzierleistung (und damit eine höhere sequenzmäßige Abdeckung) ausgeglichen werden. Bei RNA-Seq bietet die größere Abdeckung eine statistisch bessere Abschätzung der Häufigkeit einer bestimmten mRNA. Oftmals wird aus technischen aber auch ökonomischen Gründen bei Sequenzierungen eine Mischung aus beiden Technologien angewendet.

Ein entscheidender Faktor bei der Analyse eines Genoms stellt die Verarbeitung der entstehenden Daten dar. NGS-Experimente generieren eine unglaubliche Datenmenge, deren Speicherung und vor allem Analyse eine große Herausforderung darstellt. So generiert z. B. ein einzelner Lauf der 454 GS FLX beispielweise 15 GB an Rohdaten, ein Illumina Lauf 1 TB und eine SOLiD Plattform bis zu 15 TB. Dabei handelt es sich primär um die Bilddaten der CCD-Kameras, die in einem nächsten Schritt in Sequenzdaten umgewandelt werden (base calling). Anschließend müssen die Einzelsequenzen zu größeren, zusammenhängenden Sequenzen (contigs) und schließlich zum gesamten Genom assembliert werden. Um eine zuverlässige Assemblierung mit kurzen Leselängen zu erreichen, sollte eine entsprechende Sequenzabdeckung (50 - 60-fach) gegeben sein (Voelkerding et al. 2009). In einer vergleichenden Studie über Einzelnukleotid-Variationen in Hefe konnte mit allen getesteten Sequenziertechnologien (454, Illumina und SOLiD) eine ausreichende Genauigkeit schon bei einer Sequenzabdeckung von ≥ 15 erzielt werden (Smith et al. 2008).

Die enormen Datenmengen stellen hohe Anforderungen an die verwendeten Algorithmen, da eine Vielzahl von biologischen und technischen Fehlerquellen zu berücksichtigen sind. Es existiert eine Vielzahl von entsprechender Software, die durch die stetig steigende Rechnerleistung auch mit immer aufwändigeren Algorithmen operieren können, wodurch die Qualität der gelieferten Sequenzdaten stetig zunimmt. Hier wird nach Ansicht der interviewten ExpertInnen in den nächsten Jahren neben der eigentlichen Sequenziertechnologie noch Potenzial für substanzielle Fortschritte gesehen.
Trotz dieser ständigen Verbesserung der technischen Leistungsfähigkeit muss darauf hingewiesen werden, dass auch weiterhin eine fundierte Auswertung durch Wissenschaftler mit Kenntnissen in Bioinformatik notwendig ist. Nur so kann beurteilt werden, welche Daten von biologischer Relevanz sind und wie diese im Kontext zu anderen Ergebnissen zu bewerten sind.

Durch die rasante Entwicklung auf diesem Gebiet kann mit einer weiteren deutlichen Reduktion bei den Kosten von Next Generation Sequencing gerechnet werden. Als Richtwerte für das Resequenzieren eines Pflanzengenoms mit 25-facher Abdeckung bzw. einer entsprechenden RNA-Seq-Analyse können zurzeit laut Expertenauskunft ca. 2.000 - 3.000 €/Probe veranschlagt werden. Unter der Annahme von 2 unterschiedlichen Konditionen (z. B. GVO vs. Nicht-GVO) und 3 biologischen Replikaten ergeben sich Gesamtkosten von

12.000 - 18.000 € und eine Bearbeitungsdauer von 4 - 6 Wochen für eine derartige Analyse. Ein experimenteller Ansatz mit Array-Technologie (sofern ein für den Zielorganismus entsprechender Microarray verfügbar ist) würde unter den angenommenen Konditionen ca. 2 Wochen benötigen. Die geschätzten Gesamtkosten würden sich im Bereich von ca. 4.000 € bewegen.

2.2 Was ist Proteomics?

In Analogie zum Begriff des Genoms, das die Gesamtheit der genetischen Information in Form der DNA repräsentiert, wurde in den späten 1990er Jahren der Begriff der Proteoms geprägt. Ähnlich wie das Genom stellt das Proteom die Gesamtheit der Proteine einer Zelle bzw. eines Organismus dar. Fundamental unterschiedlich zum verhältnismäßig statischen Genom stellt das Proteom aber ein hoch dynamisches System dar. Abhängig vom physiologischen Zustand einer Zelle, ihrem Differenzierungsgrad oder ihrer Entwicklungsstufe, sind unterschiedliche Gene in einer Zelle aktiv und bestimmen so das individuelle Proteinmuster. Darüber hinaus wird die Variabilität des Proteoms durch physiologische Mechanismen wie differenzielles Splicen der mRNA und eine Vielzahl von nachträglichen Modifikationen der Proteine (posttranslationale Modifikationen, PTMs) immens vergrößert. Es wird geschätzt, dass im menschlichen Genom 30.000 - 40.000 Gene existieren, die grundsätzlich für Proteine kodieren, bedingt aber durch die erwähnten Variationsmöglichkeiten wird davon ausgegangen, dass bis zu 2.000.000 Protein-Varianten in einer Zelle existieren (Cho 2007). Das bedeutet, dass man es in der Proteomforschung im Vergleich mit der Genomforschung mit einem ungleich komplexeren System zu tun hat.

2.2.1 Wie funktioniert Proteomics?

Wesentliche Arbeitsschritte bei der Proteom-Analyse sind die Auftrennung der Proteine, ihre Identifizierung und Quantifizierung mit Hilfe geeigneter Verfahren. Durch den Umstand, dass die Proteomforschung in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt ist, hat sich auch die Analytik, die in diesem Fachgebiet zur Anwendung kommt, substanziell weiterentwickelt. Ganz grundsätzlich kann bei den Techniken, die bei der Analyse des Proteoms zur Anwendung kommen, zwischen Gel-basierten Methoden und Gel-freien Techniken unterschieden werden. Die Proteom-Analyse mittels 2-D-Gelelektrophorese war in den letzten Jahrzehnten die am häufigsten angewendete Methode. Fortschritte in der Applikation von massenspektrometrischen Techniken haben dazu geführt, dass diese Technik zunehmend zum bevorzugten Standard wird. Eine zuverlässige Identifizierung von Einzelproteinen im femtomol-Bereich (100 femtomol eines 60 kDa Proteins entsprechen ca. 6 ng Protein) ist bereits möglich (Cho 2007). Mit den zu erwartenden Weiterentwicklungen und vor allem der Möglichkeit zur Au-

tomatisierung werden massenspektrometrischen Techniken in Zukunft noch weiter an Bedeutung gewinnen.

2.2.1.1 Anwendung von 2-dimensionaler Gelelektrophorese in Proteomics

Bei der 2-dimensionalen Gelelektrophorese (2-D-Gelelektrophorese) werden Proteine im ersten Schritt entsprechen ihrer charakteristischen Ladungsverteilung (d. h. entsprechend dem isoelektrischen Punkt) und im zweiten Schritt gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (O'Farrell 1975). Dadurch ist es möglich, auch komplexe Proteingemische aufzutrennen.

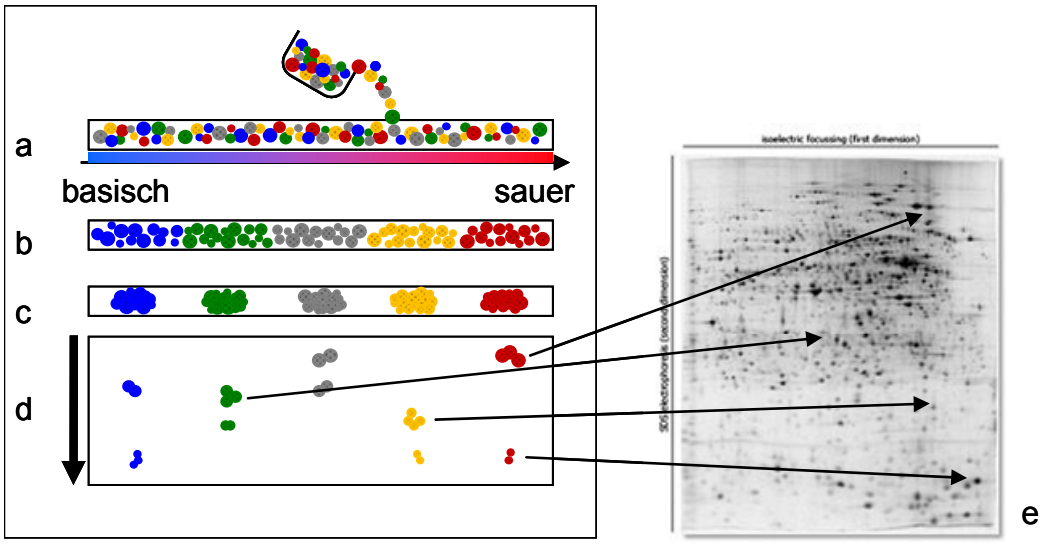


Abbildung 2: Analytisches Schema bei der 2-D-Gelelektrophorese.

1. Trenndimension: Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wird das Proteingemisch auf ein Trägergel aufgetragen, in dem zuvor ein pH-Gradient etabliert wurde (Abb.2 a). Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die verschiedenen Proteine in jenen pH-Wert Bereich ihres, bei dem das Protein nach außen neutral ist (isoelektrischen Punkts) (Abb.2 b). Da alle Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt konzentriert werden, spricht man auch von einer „Fokussierung“ (Abb.2 c).
2. Trenndimension: Der Gelstreifen mit den fokussierten Proteinen wird dann auf ein SDS-Gel aufgebracht und die Proteine in einem elektrischen Feld, diesmal aber gemäß ihrem Molekulargewicht, aufgetrennt (Abb. 2 d). Anschließend werden die Proteine im Gel durch verschiedene Färbemethoden sichtbar gemacht und das Protein-Muster optisch ausgewertet (Abb.2 e Bildquelle: http://de.wikipedia.org/wiki/2D-Gelelektrophorese). Jeder Fleck („Spot“) entspricht dabei einem bestimmten Protein. (Bildquelle: Umweltbundesamt GmbH, http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b2/2D-Gel.jpg)

Ziel ist es, Unterschiede im Proteinmuster zwischen den verschiedenen experimentellen Bedingungen zu finden (differenzieller Ansatz) oder aber das gesamte Proteom bzw. Proteomausschnitten zu identifizieren (systemischer Ansatz) und so funktionelle Zusammenhänge zu den experimentellen Bedingungen bzw. zur Funktionsweise eines Organismus herzustellen.

Bei der Verwendung einer Standardanalyse können zwischen 500 und 2.000 Proteine unterschieden werden, auf sogenannten „Giant“ Gelen ist die Unterscheidung von bis zu 10.000 Proteinen möglich (Cho 2007, ExpertInnenmeinung). Wie viele Proteine detektiert und voneinander unterschieden werden können, hängt auch von der Färbetechnik, mit denen die Proteine sichtbar gemacht werden, ab. Die verschiedenen Färbetechniken unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sensitivität, den Kosten und ihrer Eigenschaft, ob die Farbintensität direkt proportional zur Proteinmenge im Gel ist.

Die größte technische Herausforderung bei der 2-D-Gelelektrophorese stellt die Reproduzierbarkeit der Gel-Läufe dar. In Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen bilden sich unterschiedliche pH-Gradienten aus, die zu jeweils unterschiedlichen Proteinmustern führen. Da die Proteine in einem 2-D-Gel vor allem durch ihre Position im Gel definiert werden, kann eine solche Variabilität in der Fokussierung zu einer Fehlinterpretation bezüglich des Vorhandenseins eines Proteins unter verschiedenen Versuchsbedingungen führen. Hier hat die Entwicklung von sogenannten immobilisierten pH-Gradienten eine entscheidende technische Verbesserung gebracht. Die pH-Gradienten werden von den Herstellerfirmen durch ein spezielles Verfahren an genau definierten Positionen im Trägergel stabilisiert, wodurch eine homogenere Fokussierung erreicht wird. Eine weitere technische Verbesserung hat der Einsatz von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy2, Cy3, Cy5) bei der differenzieller 2-D-Gelelektrophorese (DIGE) gebracht (Ünlü et al. 2005). Bei diesem Verfahren werden die Proteinextrakte aus den unterschiedlichen Versuchsbedingungen vor dem Gel-Lauf mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und dann gemeinsam auf einem 2-D-Gel analysiert – dadurch ist die Auftrennung der Proteine keiner laufspezifischen Schwankung unterworfen. Welches Protein aus welcher Versuchsbedingung stammt, kann durch die unterschiedlichen Farbstoffe unterschieden werden (Abb. 3). Werden die Bilder der verschiedenen Farbstoffe übereinander gelegt, können Veränderungen der Proteinzusammensetzung (qualitativ oder quantitativ) im Verhältnis zu den Versuchsbedingungen leicht an Hand der Farbzuordnung identifiziert werden.

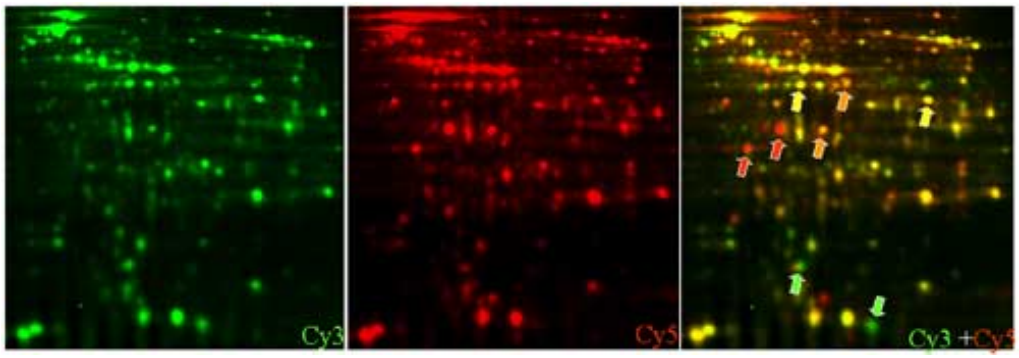


Abbildung 3: Beispiel für die Auswertung eines DIGE-Experiments.
Es werden separate Bilder des Gels im Fluoreszenzbereich von Cy3 (grün) und Cy5 (rot) gemacht. Anschließend werden die Bilder elektronisch übereinandergelegt. Proteine die in beiden Versuchsbedingungen in gleicher Menge vorhanden sind, erscheinen gelb, jene Proteine, die nur in einer der Versuchsbedingungen vorhanden sind, entweder rot oder grün (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Kathryn Lilley, Universität Cambridge).

Das DIGE-Verfahren ist zwar durch die geringe Zahl an Fluoreszenzfarbstoffen (zurzeit 2 - 3 Farbstoffe), die aus praktischen Gründen eingesetzt werden können, limitiert, eignet sich aber ausgezeichnet für konkrete wissenschaftliche Fragestellungen (z. B. Abgleich der Proteinmuster von GVO vs. Nicht-GVO).
Eine weiterführende Charakterisierung der Proteine erfolgt zumeist durch das Isolieren eines Protein-Spots aus dem Gelmaterial (dieser enthält für gewöhnlich nur ein bestimmtes Protein) und anschließender Identifizierung des Proteins mit Hilfe massenspektrometrischer Verfahren, wie sie im nächsten Abschnitt näher behandelt werden.

Sind die Proteine einmal identifiziert und ihre Position im 2-D-Gel definiert, können virtuelle „Mastergele“ erstellt werden, die ähnlich einer Landkarte, bei neuen Experimenten zur Identifizierung der gefundenen Proteine herangezogen werden können. Der Vergleich der 2-D-Gele mit dem Mastergel erfolgt zumeist mit Hilfe spezieller Bildabgleich-Software, da die Komplexizität der Proteinmuster eine visuelle Auswertung kaum mehr erlaubt.

2.2.1.2 Anwendung von massenspektrometrischen Methoden (MS) in Proteomics

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, um die Molekülmasse von ionisierten Teilchen zu bestimmen. Dazu muss die zu untersuchende Substanz zuerst in die Gasphase überführt und ionisiert werden. Die ionisierten Teilchen werden in einem elektrischem Feld beschleunigt und der Teilchenstrahl dann in einem Magnetfeld abgelenkt und nach seinem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) aufgetrennt (Abb.4). Massenspektrometrie kommt schon seit vielen Jahrzehnten in vielen Bereichen der physikalisch-chemischen Analytik

zum Einsatz. So wurde z. B. das erste funktionierende Massenspektrometer bereits 1919 gebaut. In den letzten Jahren wurde dieses Verfahren auf die Anforderungen der Proteinchemie adaptiert und stellt zurzeit das leistungsfähigste Werkzeug zur Proteom-Analyse dar.

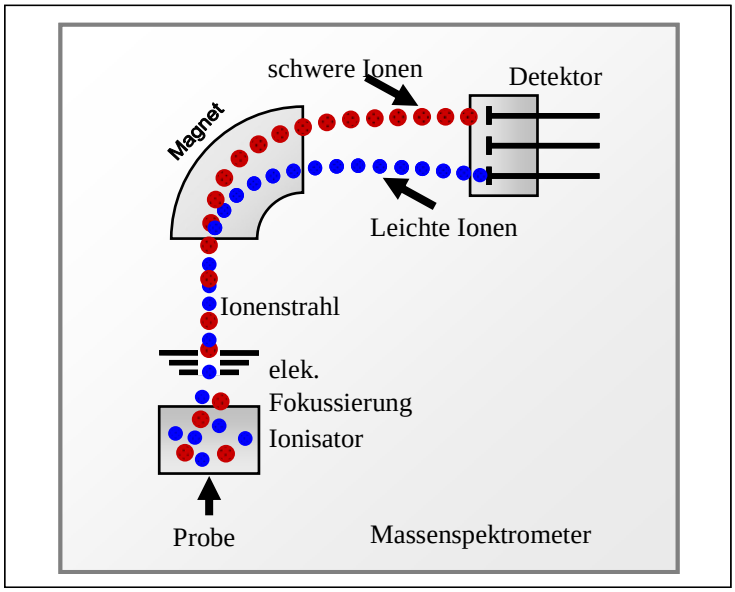


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Massenspektrometers.
Die Probe wird in die Gasphase überführt, ionisiert und der Ionenstrahl auf ein Magnet gelenkt. Entsprechend der Masse und der Ladung der Ionen werden diese unterschiedlich stark abgelenkt und von einer Detektoreinheit registriert. (Bildquelle: Umweltbundesamt GmbH)

Je nach Anwendungsbereich gibt es verschiedene Technologien zur Ionisierung des Probenmaterials. In der Proteinanalyse hat sich in den letzten Jahren die sogenannte „electrospray ionisation“ (ESI) als Standard durchgesetzt, daneben kommt aber auch die Methode des „matrix-assisted laser desorption/ionization“ (MALDI) zum Einsatz. Beide Methoden gelten als verhältnismäßig schonende Ionisierungsverfahren und sind daher gut für den Einsatz bei Biomolekülen geeignet. Bei der nachfolgenden Trennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) gibt es eine Vielzahl von Methoden und technischen Spezifikationen, weshalb in dieser Studie nur begrenzt auf die verschiedenen Typen von Massenspektrometern, Trennverfahren und Detektionssystemen eingegangen werden kann.

Der Arbeitsbereich eines Massenspektrometers liegt im Bereich bis ca. 4.000 Da (bei einfacher Ionisierung). Da sich das Molekulargewicht von Proteinen im Bereich von 10.000 bis 150.000 Da bewegt, ist es für eine genauere Bestimmung der Masse notwendig, die Proteine zu fragmentieren. Dies wird zumeist durch eine gezielte Spaltung des Proteins mittels einer Endopeptidase (z. B. Trypsin) erreicht. Je nach Aminosäuresequenz des Pro-

teins entstehen durchschnittlich 10 Peptide in einem Massenbereich, der mittels MS analysiert werden kann.
Da das Proteom eine hohe Komplexizität aufweist und die Zahl der gleichzeitig zu analysierenden Moleküle durch die Proteinfragmentierung noch weiter erhöht wird, ist es notwendig, zusätzliche Trennverfahren der eigentlichen MS-Analyse vorzuschalten. Die zurzeit am häufigsten eingesetzten Trennverfahren sind die 2-D-Gelelektrophorese und Flüssigchromatographie oder Kapillarelektophorese.

Bei der Verwendung der 2-D-Gelelektrophorese werden einzelne Protein-Spots isoliert, mit einer Protease in definierte Bruchstücke zerlegt und anschließend die Massen der entstandenen Peptide mittels MS bestimmt (Peptidmassen-Fingerprint). Die Identifizierung des Proteins bzw. der Peptide erfolgt anschließend durch den Vergleich der gefundenen Massen (Massen-Muster) gegen eine Datenbank mit den Massen-Muster bekannter Proteine/Peptide. Trotz möglicher Automatisierung der Probenbehandlung nach der 2-D-Gelelektrophorese können mit diesem Verfahren immer nur eine begrenzte Anzahl von Protein-Spots analysiert werden.

Deutliche Vorteile bieten hier die sogenannten Gel-freien Verfahren, bei denen vor der Massenbestimmung ein Trennschritt in Form von Flüssigchromatographie (LC) bzw. Kapillarelektophorese (CE) vorgeschaltet ist. Mit diesen Verfahren können auch komplexere Peptidmischungen untersucht werden. Durch den chromatographischen Schritt werden die einzelnen Peptide voneinander getrennt und können nacheinander direkt mittels MS analysiert werden.
Als Trennverfahren kommt am häufigsten Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („high performance liquid chromatography“, HPLC) zum Einsatz. HPLC und MS bilden hier eine analytische Einheit, die direkt miteinander gekoppelt sind. Die entstehenden Daten können an eine Datenbank weitergeleitet und ausgewertet werden. Ein weiterer Vorteil dieser Gelfreien Verfahren ist die Möglichkeit der vollständigen Automatisierung. Ein Nachteil des Peptidmassen-Fingerprints stellt jedoch die Abhängigkeit der Proteinidentifizierung von der Verfügbarkeit entsprechender Daten bereits bekannter Peptidmassen und deren Zuordnung zu Proteinen dar.

Moderne massenspektrometrische Verfahren lassen aber auch eine Analyse der Proteine bis auf die Ebene der Aminosäuresequenz zu (*de-novo* Aminosäure-Sequenzierung). Möglich macht das vor allem der Einsatz von hochauflösenden Massespektrometern. Bei einer solchen Versuchsanordnung werden zwei Massenspektrometer im Tandem hintereinander geschaltet (z. B. LC-MS/MS). Im ersten Massespektrometer werden die Peptide ionisiert und gemäß ihrer Masse aufgetrennt. Nun werden einzelne Peptide selektiert und in das zweite Massespektrometer weitergeleitet. Durch einen neuerlichen Energieimpuls wird das Peptid weiter fragmentiert/ionisiert und nochmals aufgetrennt. Da sich die Masse eines Moleküls in einem hochauflösenden Massespektrometer sehr genau bestimmen

lässt, kann aus den entstandenen Fragmenten schlussendlich die Aminosäuresequenz der Fragmente und damit des Peptids abgeleitet werden (Abb. 5). Derartige Versuchsanordnungen können vollständig automatisiert werden. Die Analyse eines Proteinextrakts läuft vollautomatisch über mehrere Tage.

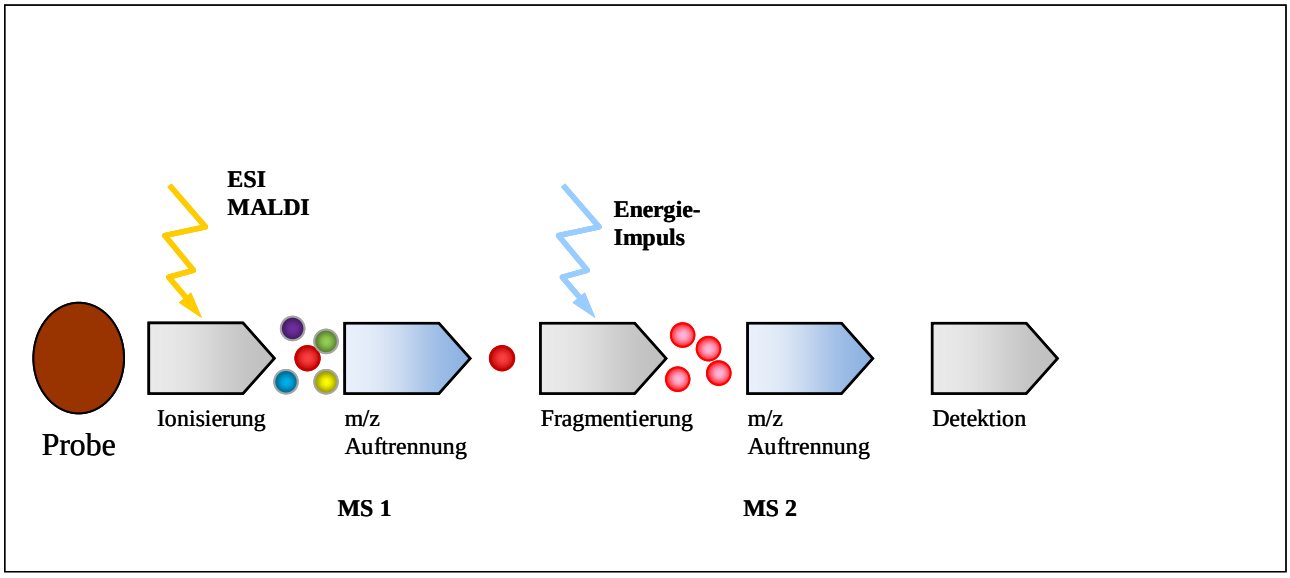


Abbildung 5: Schematische Darstellung der MS/MS Kopplung, wie sie bei der massenspektrometrischen de-novo Sequenzierung von Proteinen verwendet wird.
Im ersten MS-Schritt werden die Peptide aufgetrennt. Ein Peptid wird ausgewählt und im zweiten MS-Schritt durch einen Energieimpuls weiter fragmentiert. Aus der Masse der resultierenden Fragmente kann die Aminosäuresequenz des Proteins abgeleitet werden. (Bildquelle: Umweltbundesamt GmbH)

Neben der Frage, aus welchen Proteinen sich ein Proteom aufbaut, ist die Bestimmung der mengenmäßigen Veränderungen in Abhängigkeit von den physiologischen Bedingungen essenziell für das Verständnis der funktionalen Zusammenhänge in einem Organismus. Die vergleichende Analyse verschiedener Versuchsbedingungen, gekoppelt mit quantitativen Aussagen über die Veränderungen eines Proteoms, ist vor allem durch Methoden der differenziellen Probenmarkierung möglich. Dabei werden die Proteine aus den verschiedenen Versuchsbedingungen mit unterschiedlich schweren stabilen Isotopen markiert (Gygi et al. 1999, Ong et al. 2002). Bei der anschliessenden Analyse mittels MS können die Proteine auf Grund ihrer Massenunterschiede der jeweiligen Versuchsbedingung zugeordnet und die relativen Mengenverhältnisse zueinander bestimmt werden. Im Folgenden ist die Markierung mittels iTRAQ genauer beschrieben, da dieses Verfahren die zurzeit präzisesten Ergebnisse bei der Proteom-Analyse liefert.

„Isobaric tags for relative and absolute quantitation“ (iTRAQ) (Ross et al. 2004) enthalten eine reaktive Gruppe, die mit Aminogruppen der Proteine (Lysin, Arginin, N-Terminus) re-

agieren können. Gekoppelt ist die reaktive Gruppe des iTRAQ über ein Spacer-Molekül mit einem Reporter-Molekül definierter Masse (z. B. 114, 115, 116, 117 Da). Die Massen der Spacer sind so gestaltet, dass sie die unterschiedlichen Massen der Reporter ausgleichen und damit bewirken, dass die Bruttomolekulargewichte der iTRAQs gleich sind (isobare Marker). Bei einem iTRAQ-Experiment werden die Proteinextrakte der verschiedenen Versuchsbedingungen mit unterschiedlichen iTRAQs markiert und mit Protease verdaut. Anschließend werden gleiche Peptidmengen aus den verschiedenen Versuchsbedingungen miteinander gemischt und mittels leistungsfähiger Tandem-MS (LC-MS/MS) analysiert. Da die Massen der verschiedenen iTRAQ-Markierungen gleich sind, entsteht bei der ersten massenspektrometrischen Auftrennung nur ein Peak pro Peptid. Wird dieses Peptid im zweiten massenspektrometrischen Schritt weiter fragmentiert, werden die Reporter-Moleküle abgespalten und gemäß ihrer Masse aufgetrennt und detektiert. Das Verhältnis der verschiedenen Reportermoleküle zueinander entspricht dem Verhältnis der Proteine unter den verschiedenen Versuchsbedingungen. Gleichzeitig erfolgt bei diesem zweiten massenspektrometrischen Schritt die Bestimmung der Aminosäure-Sequenz des Peptids, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Zurzeit können Reporter-Moleküle mit bis zu 8 verschiedenen Massen routinemäßig eingesetzt werden, was bedeutet, dass bis zu 8 verschiedene Versuchsbedingungen oder biologische Replikate gleichzeitig analysiert werden können. Die iTRAQ-Technik gilt als das zurzeit leistungsfähigste System zur quantitativen Analyse bei Proteom-Experimenten.

Als analytisch-methodische Herausforderung ist der Umstand zu sehen, dass in höheren Organismen wie z. B. bei Pflanzen unterschiedliche Organe (Wurzel, Blätter Samenanlagen) unterschiedliche Genexpressionsmuster zeigen. Damit existiert in höheren Organismen nicht nur „ein“ Proteom. Bei der praktisch-experimentellen Durchführung von pflanlichen Proteom-Analysen wird daher oft nur ein Teilbereich eines Organismus (z. B. einzelner Organe oder gar Organellen) analysiert.
Eine weitere Herausforderung bei der Analyse des gesamten Proteoms liegt in den unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Proteine in einer Zelle. Während Strukturproteine in hoher Konzentration vorliegen, kann die Anzahl spezieller Regulatorproteine oft nur wenige Moleküle/Zelle betragen. Der Unterschied zwischen „high abundance“-Proteinen und „low abundance“-Proteinen kann laut Expertenaussage einen Faktor von 10^7 bis 10^{10} betragen (siehe auch Cho 2007). Eine gleichzeitige analytische Darstellung aller Proteine ist bei solchen Konzentrationsunterschieden mit keiner der heutigen Messmethoden zu erreichen. Der dynamische Bereich (Konzentrationsbereich, in dem das Messgerät verlässliche Werte liefert) umfasst zurzeit für gewöhnlich 3 - 4 Zehnerpotenzen. Hier ist aber durch ständige Verbesserungen in der Gerätetechnik mit einer deutlichen Erweiterung der Sensitivität in den nächsten Jahren zu rechnen.

Neben der Weiterentwicklung der Massenspektrometer selbst wird aber nach Expertenmeinung vor allem die Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Bioinformatik zu essenziellen Verbesserungen in der Proteom-Analytik führen. Durch absehbare Steigerungen der Rechnerleistungen können in Zukunft die vor allem bei MS-basierten Methoden generierten großen Datenmengen (eine Messung liefert mehrere GB Daten) mit immer besseren Algorithmen ausgewertet werden.

2.2.2 Welche Ergebnisse liefert Proteomics?

Der Vorteil der 2-D-Gelelektrophorese liegt im verhältnismäßig geringen apparativen Aufwand und den damit verbundenen Kosten sowie der Möglichkeit der quantitativen Analyse der Proteine (zumindest für Proteine mit hoher und mittlerer Abundanz). Kombiniert mit der Analyse einzelner Protein-Spots mittels MS-Methoden stellt die 2-D-Gelelektrophorese immer noch eine attraktive Methode in der Proteomforschung dar. Der große Nachteil des 2-D-Verfahrens ist die verhältnismäßig geringe Zahl an Proteinen, die mit dieser Methode analysiert werden kann (durchschnittlich 500 - 2.000). Darüberhinaus stellt die Analyse von Proteinen mit besonderen chemischen Eigenschaften (z. B. sehr basische oder sehr saure Proteine) eine spezielle analytische Herausforderung dar. Derartige Proteine werden in einer üblichen 2-D-Gelelektrophorese nicht erfasst, wodurch sich die Repräsentativität einer derartigen Proteom-Analyse weiter reduziert. Die detektierten Proteine auf einem 2-D-Gel stellen damit nur einen begrenzten Ausschnitt aus dem gesamten Proteom dar und man muss davon ausgehen, dass viele subtile Veränderungen im Proteinmuster damit nicht erfasst werden. Im Hinblick auf eine bessere Abschätzung der Unterschiede im Proteom von GVOs würde aber auch die 2-D-Gelelektrophorese eine deutliche Verbesserung zu den bis jetzt angewendeten Verfahren bedeuten.

Ein iTRAQ Experiment liefert Informationen darüber, welche Proteine (mittels Peptid/AS-Identifizierung) eine quantitative Veränderung (quantitative Bestimmung mittels Reporter-Ionen) unter den gegebenen Versuchsbedingungen erfahren. Mit Hilfe einer entsprechenden bioinformatischen Auswertung kann so eine Liste jener Proteine erstellt werden, die für eine bestimmte wissenschaftliche Fragestellung relevant sind. Mit leistungsfähigen MS-Ansätzen können zurzeit bei einer einzelnen Analyse bis zu 6.000 Proteine identifiziert und quantifiziert werden, wobei laut ExpertInnenmeinung bereits in naher Zukunft 10.000 möglich sein werden. Wie bei jedem Experiment müssen die wissenschaftlichen Ergebnisse durch Wiederholungen bestätigt und statistisch abgesichert werden. Für die Wiederholungen des gesamten biologischen Experiments (biologische Replikate) ist es in weiterer Folge nicht unbedingt notwendig, die technisch aufwändige und kostspielige Analytik via iTRAQ und hochauflösender Massenspektrometrie zu wiederholen. Da die für die wissenschaftliche Fragestellung relevanten Proteine bzw. Peptide jetzt bekannt sind, ist es ausreichend, die Ergebnisse mit Hilfe weniger auf-

wändiger MS-Verfahren (z. B. Triple Quadrupol MS) zu evaluieren. Es werden bei dieser Analyse nur mehr gezielt jene Peptide gesucht und quantifiziert, die von speziellem Interesse sind.

Ähnlich wie bereits beim Kapitel Genomics diskutiert, bildet die Auswertung der Daten einen essenziellen Teil der Analyse. Die Messdaten müssen auf Basis verlässlicher Softwareprogramme ausgewertet und die Ergebnisse unter Umständen über einen Abgleich mit Datenbanken abgesichert werden. Vor allem muss aber eine fundierte bioinformatische Beurteilung der Ergebnisse erfolgen, um die Relevanz der Ergebnisse einschätzen zu können. Nach Einschätzung von ExpertInnen ist die Datenauswertung und Interpretation zumeist arbeitsintensiver als die apparative Analyse.

Die möglichen Kosten für eine Proteom-Analyse hängen von der konkreten Fragestellung und den angewandten Methoden ab. Im Zuge der für diese Studie geführten ExpertInneninterviews wurde für eine umfassende Analyse (5.000 Proteine) unter Verwendung von iTRAQ-Quantifizierung und modernster, hochauflösender Massenspektrometrie ein Zeitrahmen von 4 - 6 Monaten und Kosten von 50.000 - 80.000,- € veranschlagt. Für eine Validierung der Proteom-Daten mittels biologischer Replikate und einer auf die interessanten Kandidatenproteine eingeschränkte Triple Quadrupole MS muss mit weiteren Kosten von 5.000,- € pro biologischem Replikat gerechnet werden.

2.3 Was ist Metabolomics?

Als Metabolom wird die Gesamtheit der Metaboliten (Stoffwechselprodukte) einer Zelle bzw. eines Organismus bezeichnet. Abgeleitet ist dieser Terminus wiederum vom Konzept des Genoms, das die Gesamtheit der genetischen Information darstellt. Ähnlich wie bei der Proteomics wird die Erforschung der Metaboliten in ihrer Gesamtheit und deren Beziehungen zueinander als Metabolomics bezeichnet. Im Gegensatz zum Genom, jedoch vergleichbar dem Proteom, handelt es sich dabei um ein sehr dynamisches System, das sich in Abhängigkeit der Soffwechselbedingungen innerhalb sehr kurzer Zeit (u. U. in Sekunden) verändern kann. Veränderungen im Metabolom geben unmittelbaren Aufschluss über die Auswirkungen von genetisch- und umweltbedingten Einflüssen. Bei den untersuchten Metaboliten handelt es sich zumeist um kleine Moleküle, wie z. B. Zucker, Aminosäuren, Vitamine, Hormone und sekundäre Stoffwechselprodukte. Höhermolekulare Stoffe wie Zellulose oder Stärke stehen üblicherweise nicht im primären Fokus von Metabolom-Analysen. Dies ist zum Teil durch eine gewisse technische Limitierung in der Analytik gegeben, da sich der Messbereich vieler MS-Methoden in der Metabolomics im Bereich bis 2.000 Da bewegt, diese Polysaccharide aber Molekulargewichte von mehreren Tausend Da aufweisen. Darüber hinaus gibt es spezielle Fragestellungen, die sich z. B. mit der speziellen Modifizierung von Proteinen beschäftigen, z. B. der Glycosilierung von

Proteinen (Zaia 2010). Die Analyse bestimmter Stoffklassen, wie z. B. von Lipiden hat sich sogar zu eigenständigen Forschungsgebieten (Lipidomics) entwickelt (Watson 2006).
Die Zahl an Metaboliten in einem Organismus kann nur grob geschätzt werden. Die „Human Metabolome Database"[6] beispielsweise listet zurzeit mehr als 7.900 bekannte Metaboliten auf, während man bei Pflanzen von bis zu 25.000 ausgehen kann (Hegemann 2010).

In Gegensatz zu Proteinen, die sich in ihrer grundsätzlichen chemischen Struktur gleichen, gehören Metaboliten zu den unterschiedlichsten Stoffklassen mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Das stellt besondere Herausforderungen an die Analytik dar. Im Folgenden sollen die wichtigsten Methoden in der Metabolomics kurz beschrieben werden. Da es aber entsprechend eine Vielzahl von Methoden und technischen Spezifikationen gibt, kann in dieser Studie nur begrenzt auf die verschiedenen Typen von Trennverfahren, Spektrometern und Detektionssystemen eingegangen werden.

2.3.1 Wie funktioniert Metabolomics?

Auf Grund der Verschiedenartigkeit der zu untersuchenden Substanzen und wegen der unter Umständen sehr raschen stofflichen Umwandlung, spielt die Probenaufbereitung bei der Metabolom-Analyse eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund müssen bei der Probenaufbereitung einige spezielle Anforderungen erfüllt sein:

- Der Metabolismus eines Organismus muss im Moment der Probennahme gestoppt werden, um den physiologischen Zustand, der für das Experiment interessant ist, zu fixieren.
- Eine nachträgliche stoffliche Umwandlung der Metabolite beim Zellaufschluss (z. B. durch Oxidation mit Luftsauerstoff oder freigesetzte Enzyme) muss verhindert werden.
- Es muss eine möglichst vollständige Extraktion der betreffenden Metabolite sichergestellt werden, wenn quantitative Aussagen getroffen werden sollen.

Entsprechend der Löslichkeit der verschiedenen Metabolite werden Proben mit verschiedenen Lösungsmitteln (polare oder organische Lösungsmittel) extrahiert, um eine vollständiges Bild der Metabolitenzusammensetzung und deren Mengen zu erhalten. Umgekehrt kann aber auch eine gezielte Extraktion, mit der nur bestimmte Stoffklassen erfasst werden, durchgeführt werden (targeted approach).

[6] www.hmdb.ca

Bei der nachfolgenden Identifizierung und Quantifizierung der Metaboliten kommen vor allem massenspektrometrische Verfahren und Kernmagnetresonanz (nuclear magnetic resonanc, NMR) zum Einsatz.

2.3.1.1 Anwendung der Kernmagnetresonanz (nuclear magnetic resonance, NMR) in der Metabolomics

Die NMR-Technik zählt zu den wichtigsten Methoden zur Strukturanalyse von chemischen Verbindungen, insbesondere organischer Moleküle, da diese häufig Kerne der magnetisch aktiven Elemente Wasserstoff, Kohlenstoff, Sauerstoff und Phosphor enthalten. Entsprechend findet NMR auch in der Metabolom-Analyse Anwendung.

Da die physikalischen Grundlagen der Kernmagnetresonanz komplex sind, wird an dieser Stelle auf die genaue Funktionsweise der NMR nicht näher eingegangen. Methodische Details von entsprechenden Metabolomics-Experimenten im Rahmen der Pflanzenforschung werden in der aktuellen Fachliteratur genauer beschrieben (Weckwerth 2007, Hardy & Hall 2011).
Ein Vorteil der NMR ist, dass direkte Informationen über die Struktur der untersuchten Substanz gewonnen werden können und die Signalstärke direkt proportional der Substanzmenge ist und so quantitative Aussagen gemacht werden können. Die Sensitivität von NMR ist jedoch um Dimensionen geringer als bei der Massenspektrometrie. Es sind Substanzmengen im mg und µg-Bereich für die Messung notwendig. Weiter kann nur eine geringe Anzahl von Substanzen gleichzeitig analysiert werden. Aus diesem Grund liefern NMR-Analysen zwar in einzelnen Fällen wichtige Daten, sind aber für einen Hochdurchsatz („high-throughput“–Ansatz), wie er in einer Metabolom-Analyse angestrebt wird, nur sehr bedingt geeignet.

2.3.1.2 Anwendung von Massenspektrometrie (MS) in der Metabolomics

Neben NMR werden in der Metabolom-Forschung vor allem MS-Verfahren eingesetzt. In Kapitel 2.2.1.2 wurden bereits die wesentlichen technischen Aspekte der Massenspektrometrie erläutert. Auf Grund der bereits erwähnten chemischen Diversität der verschiedenen Metaboliten werden MS-Verfahren in der Metabolom-Analytik in Kombination mit verschiedenen vorgeschalteten Trenn- und Ionisierungsverfahren eingesetzt. Neben der bereits erwähnten Flüssigkeitschromatographie (LC-MS bzw. Tandem LC x LC-MS) kommen Kapillarelektrophorese (CE-MS) und bei der Untersuchung von flüchtigen, thermostabilen Metaboliten Gas-chromatographische Methoden (GC-MS) zum Einsatz (Hegeman 2010). Jede dieser Techniken bietet für gewisse Substanzklassen Vorteile,

weshalb für eine umfassende Analyse möglichst vieler Metaboliten oft die Kombination verschiedener analytischer Methoden notwendig ist.

Eines der größten Probleme in der Metabolom-Forschung stellt die Identifizierung der gefundenen Metaboliten dar. Die Identifizierung erfolgt üblicherweise durch den direkten Vergleich des ermittelten Massenspektrums mit dem Spektrum eines definierten Vergleichsstandards. In vielen Fällen ist das aber nicht möglich, da viele Metaboliten noch gar nicht bekannt sind (nach ExpertInnenschätzung sind 50 - 60% aller Metaboliten nicht charakterisiert) und es daher keine entsprechenden Referenzsubstanzen gibt. Spektren von Substanzen, die schon einmal bestimmt wurden, werden in Web-basierten Spektral-Datenbanken gesammelt und stehen für Vergleiche zu Verfügung[7]. Der Vergleich ist aber stark von der Reproduzierbarkeit der Spektren und damit von der Standardisierung der analytischen Methodik abhängig. Während die Übereinstimmung von z. B. GC-MS oder NMR-Spektren in verschiedenen Laboren und verschiedenen Geräten verhältnismäßig konsistent ist, können bei LC-MS Verfahren große Unterschiede auftreten und die Identifizierung erschweren.

Eine mögliche Alternative zu Spektral-Datenbanken stellt der Einsatz von hochauflösender Massenspektrometrie dar. Wie schon im Kapitel Proteomics dargestellt, können mit diesen Verfahren die Massen der untersuchten Moleküle sehr genau bestimmt werden. Über die genaue Summenformel lässt sich laut ExpertInnen die Substanz gut identifizieren. Größere Moleküle, bei denen die Summenformel keine eindeutige Zuordnung erlaubt, können in einem weiteren MS-Schritt (Tandem-MS/MS) weiter fragmentiert und aus der Information der Fragmente die Ursprungssubstanz bestimmt werden. In Kombination mit Flüssigchromatographie, die eine leistungsfähige Auftrennung der einzelnen Substanzen erlaubt, können laut ExpertInnenaussage auch Ansätze zur Analyse komplexer Metaboliten-Fraktionen durchgeführt werden. So konnten z. B. bei einem speziellen Ansatz der Isotopenmarkierung mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie die exakten Summenformeln von mehr als 1.000 Metaboliten aus *Arabidopsis thaliana* bestimmt werden. Dabei handelt es sich um „metabolic fingerprinting“ Experimente, bei denen die Metaboliten ohne vorgeschaltete Trennverfahren mittels MS analysiert wurden (Giavalisco et al. 2008). Eine vollständige Identifizierung aller Metaboliten ist aber laut ExpertInnenmeinung auch mit hochauflösender Massenspektrometrie zurzeit nicht möglich.

Eine besondere Herausforderung stellt weiter die Quantifizierung der gefundenen Metaboliten dar. Eine Quantifizierung erfolgt in der Regel durch Bildung einer Kalibrationskurve mit verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden (Rein-) Substanz. Da viele Meta-

[7] METLIN Database http://metlin.scripps.edu/, NIST http://www.nist.gov/srd/onlinelist.cfm, Golm Metabolite Database http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/

boliten nicht bekannt sind, und es daher auch keine Referenzsubstanzen gibt, ist eine absolute Quantifizierung in vielen Fällen nicht möglich. Dem gegenüber gibt es die Möglichkeit, durch Markierung der Metabolite mit stabilen Isotopen (^{13}C, ^{15}N) eine relative Quantifizierung der Metaboliten unter verschiedenen Versuchsbedingungen durchzuführen. Pflanzen können in Anwesenheit von z. B. $^{13}CO_2$ oder $^{15}NO_3$ kultiviert werden, um die Metabolite mit schweren Isotopen zu markieren („metabolic labeling“, siehe auch Hegeman 2010). Die Vergleichsprobe wird mit „normalen“ Isotopen markiert. In der anschließenden Analyse können die relativen Mengenunterschiede eines Metaboliten zwischen den beiden gewählten Versuchsbedingungen bestimmt werden.

Eine weitere Herausforderung bei der Metabolom-Analyse ist der breite Konzentrationsbereich der verschiedenen Metabolite in der Zelle. Ähnlich wie in der Proteom-Analytik kann zurzeit keine der verfügbaren Technologien den gesamten dynamischen Konzentrationsbereich abdecken. Es sind daher nur sequenzielle Ansätze mit verschiedenen Methoden und Probenextraktionen möglich. Die kontinuierlichen technischen Verbesserungen ermöglichen aber z. B. eine immer bessere Auftrennung der Peaks im vorgeschalteten LC-Verfahren, kombiniert mit immer größeren Sensitivitäten der MS-Geräte, wodurch laut ExpertInnenaussage eine Erfassung auch von sehr gering konzentrierten Stoffwechselprodukten möglich ist.

2.3.2 Welche Ergebnisse liefert Metabolomics?

Die grundlegende Intention einer Metabolom-Analyse ist die umfassende Darstellung aller Metaboliten eines Organismus. Dies stellt jedoch hohe Anforderungen an die verwendeten analytischen Methoden dar, weil Metabolite aus chemischer Sicht mannigfaltig sind und in einem weiten Konzentrationsbereich vorliegen. Es werden daher oft sequenzielle Analyseansätze gewählt, um zu einer Aussage über das Metabolom zu kommen. Dabei kann z. B. bei den zu untersuchenden Stoffklassen eine Einschränkung getroffen und nur eine Auswahl von Metaboliten, z. B. solche, die sich etwa in ihren chemischen Eigenschaften ähneln, näher untersucht werden, oder die Einschränkung erfolgt über die Fokussierung auf bestimmte Merkmale oder Unterschiede in den Proben. Eine solche Fokussierung kann z. B. mit Hilfe eines sogenannten „metabolic fingerprinting“ erfolgen. Ziel des „metabolic fingerprinting“ ist nicht die Identifizierung aller Metaboliten, sondern von Unterschieden im Metabolitenmuster verschiedener Proben. Diese Veränderungen können dann in Relation zu den gewählten Versuchsbedingungen gesetzt werden. Dieser Ansatz findet oft bei medizinischen Fragestellungen Anwendung, bei denen das Auftreten bestimmter Metabolitenmuster mit pathologischen Befunden korreliert werden soll. Mit „metabolic fingerprinting“ können so bestimmte Metabolitengruppen definiert werden, die in einen nächsten Schritt näher untersucht werden können.
Die genauere Charakterisierung bestimmter Metabolitengruppen wird als „metabolic profi-

ling“ bezeichnet. Dabei wird versucht, die betreffenden Substanzen zu identifizieren und soweit wie möglich zu quantifizieren.

Eine Standardisierung der Metabolom-Analytik ist durch die Vielzahl an analytischen Methoden, die für eine umfassende Darstellung möglichst vieler Metaboliten eingesetzt werden, schwierig zu erreichen. Mit GC-MS werden bereits gute Vergleichbarkeiten zwischen verschiedenen Gerätetypen und Laboren erreicht. Dies ist laut ExpertInnenmeinung nicht zuletzt auf die zunehmende Anwendung der Leitlinien des MPI-Golm zurückzuführen[8]. Durch die zunehmende Nutzung von Spektral-Datenbanken kann auch bei NMR-Analysen eine zunehmende Übereinstimmung bei der Interpretation der Spektren erzielt werden (Hegeman 2010). Die Daten aus LC-MS- und MS/MS-Analysen zeigen dagegen eine große Variabilität, wodurch die Potenziale der Spektral-Datenbanken noch nicht effizient genutzt werden können (Hegeman 2010). Zwar ist auch für diese Verfahren eine Harmonisierung der Messparameter denkbar, zurzeit ist aber eine derartige Standardisierung nicht absehbar.

Für eine Standardisierung der Untersuchungsmethode ist aber noch ein weiterer Punkt von entscheidender Bedeutung: wie bereits dargelegt, ist das Metabolom ein dynamisches System, das sehr schnell auf Umwelteinflüsse reagiert. Der physiologische Zustand des Probenmaterials zum Zeitpunkt der Probenaufarbeitung hat daher erheblichen Einfluss auf die Messergebnisse (Morgenthal et al. 2006). Weiterhin inkludiert jedes Extraktionsverfahren mehrere Arbeitsschritte, wobei auch kleine Unterschiede in der Durchführung solcher Arbeitsschritte in verschiedenen Laboren das Messergebnis beeinflussen können. Hier müssten sehr klare Vorgaben für die Handhabung des Probenmaterials und der anschließenden Extraktion der Metaboliten definiert werden, um eine Vergleichbarkeit der Resultate zu gewährleisten.

Die Kosten für eine Metabolom-Analyse können, wie bereits zuvor bei den Kapiteln Genomics und Proteomics dargelegt, nur grob angegeben werden und sind besonders von den angewendeten Verfahren abhängig. Nach ExpertInneneinschätzung kann bei Anwendung eines zweistufigen Verfahrens, bestehend aus einem „metabolic fingerprinting“ zur Charakterisierung möglicher Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchsbedingungen und einer anschließenden Identifizierung der relevanten Metaboliten mittels „metabolic profiling“, für den ersten Schritt mit Kosten im Bereich von 4.000 - 5.000,- € und einem zeitlichen Rahmen von 3 - 4 Wochen gerechnet werden. Für das „metabolic profiling“ sind weitere 6 Wochen und ein zusätzlicher finanzieller Rahmen von 10.000,- € nötig.

[8] siehe Golm Metabolite Database http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/

3 BEISPIELE FÜR ANWENDUNGEN DER OMICS-TECHNIKEN

OMICS-Techniken haben im letzten Jahrzehnt immens zum Verständnis biologischer Systeme beigetragen. Die Zahl der Organismen, mit vollständig sequenziertem Genom wächst täglich und phänotypische Merkmale werden zunehmend mit kombinierten Ansätzen wie Transkriptomics und Metabolomics charakterisiert. Die Anwendung von Metabolomics-Techniken hat z. B. in der Pflanzenzüchtung zu neuen Wegen bei der Verbesserung der Ertragseigenschaften geführt (Fernie und Schauer 2009).

Im Folgenden sollen einige Beispiele für die Anwendung von verschiedeneren OMICS-Techniken bei der Beantwortung von biologischen Fragestellungen aufgezeigt werden.

3.1 Analyse der Genexpression mittels RNA-Seq

Selbst wenn die gesamte Genomsequenz eines Organismus bekannt ist, besteht eine der größten Herausforderungen in der Erkennung der Gene bzw. der Intron/Exon-Übergänge sowie der regulatorischen Elemente. Diese Informationen sind entscheidend für das Verständnis der funktionellen Zusammenhänge der zellulären Prozesse. Viele dieser Informationen können auf Basis dessen ermittelt werden, was über Genstrukturen bekannt ist (z. B. open reading frames, ORFs). Kurze Exons, nicht translatierte Regionen (untranslated regions, UTRs) und Sequenzen, die nicht für Proteine kodieren (z.B: funktionelle RNAs) werden aber damit meist nur unzureichend erfasst. Da bestimmte RNAs aber wichtige, teils auch regulatorische Funktion ausüben (z. B. RNAi, …) ist eine eingehende Analyse der in GVP transkribierten RNAs relevant für die Risikoabschätzung von GVP. Eine Möglichkeit die Genomsequenz mit den transkribierten Sequenzen abzugleichen besteht in der Analyse der Transkripte. Mit Hilfe von sogenannten „expressed sequence tag“ (EST) oder cDNA-Sequenzierung können stark exprimierte Transkripte charakterisiert werden; schwach exprimierte mRNAs werden aber zumeist nicht erfasst. Mit DNA-Microarrays können auch schwächer expremierte Gene detektiert werden. Sie liefern aber keine spezifischen Informationen zu regulatorischen Sequenzen (z. B. UTRs), Exon/Intron-Übergängen und können natürlich nur jene Sequenzen detektieren, die auf den Array gespottet wurden. Eine Alternative zu den etablierten Methoden bildet das bereits beschriebene RNA-Seq auf Basis von Next Generation Sequencing Techniken. Nagalakshmi und Kollegen (Nagalakshmi et al. 2008) beschreiben die Anwendung von RNA-Seq für die Darstellung einer umfassenden Transkriptom-Karte des Hefe-Genoms. Es konnte gezeigt werden, dass der Großteil (74.5 %) der Gen-Sequenzen im Hefe-Genom tatsächlich transkribiert werden. Es wurde darüberhinaus eine umfassende Auflistung der 5′ UTR and 3′ UTR Übergänge erstellt und dabei viele der bekannten Introns bestätigt, wobei aber auch gezeigt wurde, dass etliche der vorhergesagten Introns nicht genutzt werden. Die erhaltenen Daten legen die Existenz alternativer Start-Codons nahe, wobei bei 35 Genen

der tatsächliche Start upstream des ursprünglich vorhergesagten Starts liegt, das entsprechende Protein damit also größer ist als anfänglich vermutet. Es wurden viele überlappende Gene gefunden, sowie eine unerwartet hohe Heterogenität bei den 3′ Enden von Genen. Darüberhinaus wurden auch neue Transkripte entdeckt, die mit anderen Methoden bisher nicht identifiziert werden konnten. Die Daten dieses Experiments zeigen, dass das Hefegenom weitaus komplexer strukturiert ist als bisher angenommen wurde. Durch die Verfügbarkeit einer Vielzahl von Microarray-Daten bei Hefe konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Genauigkeit der RNA-Seq Methode vergleichbar mit der von Microarrays ist, wobei der dynamische Bereich bei RNA-Seq weitaus größer ist (8.000-fach im Vergleich zu 60-fach bei Microarrays). Die Arbeit von Nagalakshmi und Kollegen (Nagalakshmi et al. 2008) zeigt exemplarisch, welches analytische Potenzial RNA-Seq für die Transkriptom-Analyse hat.

3.2 Analyse der Protein-Zusammensetzung mittels quantitativer Proteomics

Durch die technischen Entwicklungen, wie sie im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurden, konnte in den letzten Jahren einige wichtige Fortschritte in der Proteom-Analyse von Pflanzen erzielt werden (Jorrin et al. 2007). Trotz dieser Fortschritte liegt aber die vollständige Erfassung und die Tiefe der vorhandenen Daten noch weit hinter anderen state of the art Proteom-Analysen zurück, z. B. bei Drosophila (Brunner 2007). Bei einer Großstudie des gesamten *Arabidopsis thaliana*-Proteoms aus dem Jahr 2005 (Giavalisco et al. 2005), durchgeführt mittels 2-D Gelelektrophorese und anschliesender MS-basierter Protein-Identifizierung, konnten 2943 Spots identifiziert und in Folge 663 verschiedene Gene zugeordnet werden. Verglichen mit den rund 27.000 Genen, die in *Arabidopsis* vermutlich für Proteine kodieren, ist das aber eine geringe analytische Abdeckung („coverage“). In einer ähnlichen Studie konnten Wienkoop und Kollegen mit einem kombinierten Ansatz von Tandem-LC und anschließender Massenspektrometrie 1032 Proteine identifizieren (Wienkoop et al. 2004).

In einer anderen groß angelegten Proteom-Studie mit *A. thaliana* wurde der Fokus auf das Blatt-Proteom gelenkt und damit versucht, die Diversität der Protein-Expression in den verschiedenen Organen zu reduzieren und so zu differenzierteren Erkenntnissen zu kommen. Weiterhin wurden verschiedene analytische Methoden angewendet (LC x LC-MS/MS und 1D-Gelelektrophorese kombiniert mit LC-MS/MS). Alles zusammen konnte mit diesem Ansatz 2342 verschiedene Proteine identifiziert werden (Lee et al. 2007).
Die umfangreichste Pflanzenproteom-Analyse wurde ebenfalls an *A. thaliana* durchgeführt (Baerenfaller et al. 2008). Bei dieser Studie wurde eine umfassende organspezifische Proteom-Karte erstellt, die Protein-Daten einer Vielzahl von Pflanzenorganen (Wurzeln, Blättern, Keimblättern, Samen, Schoten, Blüten, Knospen) beinhaltet. Die AutorInnen konnten

13.029 spezifische Proteine (auf der Basis von 86.456 Peptiden) identifizieren; dies entspricht ungefähr 50 % der vermuteten Proteine von *A. thaliana*. Die bioinformatische Analyse der organspezifischen Protein-Daten erlaubte die Identifizierung organspezifischer Biomarker (Proteine die nur in einem Organ vorkommen), den Abgleich zwischen Transkription und tatsächlicher Proteinhäufigkeit und revidierte eine größere Zahl von falsch vorhergesagten Genstrukturen. Darüberhinaus konnte ein Set von 4.105 proteotypischen Peptiden (Peptide die für ein bestimmtes Protein charakteristisch sind) definiert werden, mit deren Hilfe in Zukunft gezielte quantitative Proteinuntersuchungen in verschiedenden Pflanzenorganen ermöglicht werden (targeted quantitative proteomics).

Eine integrierte Vorgangsweise zur Analyse von (Pflanzen-) Proteomen wird in einer aktuellen Publikation von Weckwerth (2011b) beschrieben: Bei solchen Ansätzen wird einerseits ein nicht-zielgerichteter Proteomics-Ansatz („shotgun proteomics“, ähnlich wie oben beschrieben) verwendet. Dieser Ansatz basiert auf der Auftrennung von proteolytisch fragmentierten Proteinen mittels hochauflösender Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der massensspektrometischer Analyse. Diese Methode erlaubt die Analyse einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen mit einer hohen Identifikationsrate und relativer Quantifizierung bei einem hohen Probendurchsatz. Kombiniert wird dieser Ansatz mit einer gezielten Analyse und Quantifizierung von ausgewählten Protein-Sets, wobei die Auswahl auf den Ergebnissen des ungezielten Analyseschritts beruht. Durch die Ähnlichkeiten zur Untersuchung einzelner Proteine mittels Western Blot wird dieser Analysenteil auch als „Mass Western“ bezeichnet, wobei wesentliche Vorteile im Vergleich mit klassischen Western Blot bestehen. Es werden keine aufwändig zu erzeugenden Antikörper benötigt, Proteine mit hoher Homologie können unterschieden werden und bei einem hohen Probendurchsatz können bei einzelnen Analysedurchläufen viele Proteine (ca. 100) gleichzeitig analysiert werden. Damit können die Teilkomponenten ganzer Stoffwechselwege, wie z. B. der Glykolyse, des Zitronensäurezyklus, etc., parallel erfasst werden.
Davon abgeleitete Aussagen über das Proteom können weiters mit Untersuchungsergebnissen aus Metabolomics-Analysen (und der darauf beruhenden Untersuchung von Stoffwechselströmen) kombiniert werden, wie bei der Untersuchung der Photosyntheseabläufe und Biomasseproduktion in einzelligen Grünalgen (*Chlamydomonas reinhardtii*) gezeigt werden konnte (Übersicht und weiterführende Literatur in: Weckwerth 2011b).

3.3 Untersuchungen zur Wirkung von Umwelteinflüssen auf Pflanzen

Dass die Metabolom-Analyse bei Pflanzen breite Anwendungsbereiche bietet, zeigt die wachsende Zahl von wissenschaftlichen Publikationen. Neben Fragestellungen in der Grundlagenforschung werden aber zunehmend auch anwendungsorientierte Probleme, wie Qualitätsparameter bei Getreide oder Sortenzüchtung mittels Metabolomics bearbeitet

(Hall 2006). Die Frage der Resistenz von (vor allem landwirtschaftlich relevanten) Pflanzen gegenüber extremen Umweltbedingungen ist ebenfalls ein zentrales Thema in diesem Zusammenhang. Welche physiologischen Veränderungen dabei ablaufen, sind entscheidende Fragen, wenn man die Mechanismen verstehen will, mit denen die Pflanze auf derartige Umweltveränderungen reagiert.

Im Folgenden werden aus der Fülle der vorhandenen Beispiele einige spezifische Anwendungen genauer vorgestellt, deren Ergebnisse zeigen, dass durch die Verwendung von OMICS-Technologien ein besseres Verständnis von Umweltwirkungen auf Pflanzen gewonnen werden kann, als mit anderen Forschungsansätzen.

Hirai und Kollegen (Hirai et al. 2004, Hirai et al. 2005) haben die Veränderungen in der Metaboliten-Zusammensetzung bei *Arabidopsis*-Pflanzen unter Schwefel- und Stickstoff-Stress mit Hilfe von hochauflösender Massenspektrometrie untersucht. Dabei fanden sie eine Vielzahl von signifikanten Veränderungen - unter anderem im Glukosinolat-Metabolismus. Glukosinolat ist ein schwefelhaltiger Metabolit der zur Abwehr von Fressfeinden dienen, indem er die Pflanze ungenießbar macht. Damit reduziert sich aber auch die Qualität der Pflanze als Nahrungsmittel. Andererseits ist Schwefel als einer der wichtigsten Makronährstoffe für ein optimales Pflanzenwachstum und damit für hohe Erträge notwendig. Durch das bessere Verständnis der Schwefel-Stoffwechselwege könnte so bei nahrungsrelevanten Pflanzen z. B. Verbesserungen der Qualität (durch die Reduktion des Glukosinolat-Gehalts) bei gleichzeitiger Sicherung des Erneertrags (durch die ausreichende Versorgung mit dem Makronährstoff Schwefel) erzielt werden.

Ein anderes aktuelles Beispiel sind Untersuchungen an verschiedenen Gerstesorten bezüglich deren Resistenz gegen erhöhte Salzkonzentrationen. Mit Hilfe von Metabolom-Analysen wurden jene Klassen an Metaboliten identifiziert, die in einer salztoleranten Sorte verändert sind. Es handelt sich dabei vor allem um Zuckerverbindungen. Der molekulare Mechanismus, der dieser Salztoleranz zu Grunde liegt, ist aber noch nicht aufgeklärt. Von den Kenntnissen der entsprechenden Stoffwechselwege erhofft man sich aber mehr über die der Toleranz zugrunde liegenden zellulären Mechanismen zu erfahren (Widodo et al. 2009).

Ein Beispiel wie Metabolom-Analysen zum besseren Verständnis der funktionellen Zusammenhänge bei der Pathogen-Pflanzen Interaktion eingesetzt wurden, bieten die Arbeiten von Hahlbrock und Kollegen (Hagemeier et al. 2001; Tan et al. 2004, Bednarek et al., 2005,). Mit Hilfe von Metabolom-Analysen wurden die Veränderungen der Indol- und Phenylpropanoid-Metabolite nach Infektion von *Arabidopsis*-Pflanzen durch den phytopatogenen Pilz *Pythium sylvaticum* untersucht. Indol- und Phenylpropanoid-Komponenten spielen bei der Pathogenabwehr in Pflanzen eine wichtige Rolle indem sie die Bildung von Lignin und Subarin-Komponenten, die zur mechanischen Abwehr von Pathogenen dienen, beeinflussen. In den angeführten Arbeiten wurden mittels Metabolomics alle bisher bekannten

Indol- und Phenylpropanoid Komponenten erfasst und charakterisiert. Dabei zeigte sich eine unterschiedliche Metabolitenverteilung bei Blattorganen und Wurzeln. Die Ergebnisse demonstrieren, wie unterschiedlich einzelne Pflanzenteile auf Umwelteinflüsse reagieren. Dieses differenzierte Reagieren kann mit Hilfe von Metabolom-Anaysen sehr gut dargestellt werden.

Die Verwendung einer umfassenden Metabolom-Analyse hat auch zur Erfassung von bisher nicht berücksichtigten Substanzen im Wurzelgewebe geführt Der Nachweis von „raphanusamic acid“ zusammen mit genetischen Befunden aus entsprechenden *Arabidopsis*-Mutanten legt einen alternativen Biosyntheseweg der antipathogen wirkende Substanz Camalexin nahe. Da das Vorhandensein von „raphanusamic acid“ in den bisherigen Untersuchungen nicht berücksichtigt wurde, muss der bisher abgeleitete Weg für die Synthese von Camalexin revidiert werden. Dieses Beispiel demonstriert, wie der breitere analytische Ansatz einer Metabolom-Analyse zu einem besseren Verständnis über die physiologischen Veränderungen eines Organismus in Abhängigkeit von geänderten Umwelteinflüssen führt.

Andere Beispiele für die Analyse von Umwelteinflüssen auf Pflanzen werden von Okazaki und Saito (2011) analysiert. Hervorgehoben wird von diesen Autoren auch die Bedeutung der Anwendung von OMICS-Technologien zur Identifikation von Biomarkern für phänotypische Merkmale, die auch relevant für die Risikoabschätzung von GVP sind, wie z. B. Anfälligkeit gegenüber Krankheiten und Schädlingen. Von Relevanz für mögliche Anwendungen in der Risikoabschätzung von GVP ist auch, dass die Verwendung solcher Biomarker für Screening-Untersuchungen nicht die eindeutige Identifikation von allen Verbindungen voraussetzt, die bei den eingesetzten Metabolomics-Untersuchungen erfasst werden.

3.4 Anwendung von OMICS-Technologien in der Sortenzüchtung

Eine landwirtschaftlich orientierte Anwendung für OMICS-Technologien ist deren Einsatz in der Sortenzüchtung (Dixon et al. 2006). Seit vielen Jahren werden Techniken wie Marker-gestützte Züchtung verstärkt zur Verbesserung der Pflanzeneigenschaften angewendet, vor allem im Hinblick auf quantitative Pflanzenmerkmale wie Biomasse, Korngröße oder Ertrag. Diese sogenannten „quantitative trait loci“ (QTL) sind Regionen auf den Chromosomen, die mit bestimmten quantitativen Pflanzenmerkmalen in Verbindung gebracht werden. Ein aktueller Forschungsbericht beleuchtet die Details dieser Anwendungen (Brumlop und Finkh 2011). Für die Analyse der mit den QTLs assoziierten genetischen Marker kommen zunehmend Genomics-Methoden zum Einsatz. Neben den genannten „klassischen“ QTLs sind aber auch Eigenschaften wie Geruch und Geschmack für landwirtschaftliche Nutzpflanzen von großem Interesse. Diese werden oft als „Meta-

boliten QTLs“ (mQTL) bezeichnet (Fernie und Schauer 2009). So wurden z. B. wichtige Geruchskomponenten von Tomaten in einer Metabolom-Analyse untersucht und ca. 100 entsprechende mQTL identifiziert (Tieman et al. 2006a). In einer nachfolgenden Studie wurden zwei dieser Geruchskomponenten in einer Kombination von erweiterter Metaboliten-Analyse und genetischer Analysen näher charakterisiert und der Stoffwechselweg dieser wichtigen Aromastoffe aufgeklärt (Tieman et al. 2006b).

Von Varshney et al. (2009) werden die möglichen Anwendungen von Next Generation Sequencing Technologien in der Züchtung und Züchtungsforschung genauer beschrieben. Angewendet werden die NGS-Technologien sowohl bei wesentlichen Kulturpflanzen, wie z. B. bei Mais und Weizen, als auch bei global derzeit unterrepäsentierten Kulturarten mit teils wichtiger regionaler Bedeutung für die Zukunft, sogenannten orphan crops (siehe z. B. Hiremath et al. 2011) und Modellpflanzen, wie *Arabidopsis*. NGS-Methoden können dabei sowohl bei Arbeiten mit genetisch gut charakterisierten Arten sinnvoll eingesetzt werden, als auch bei Zuchtprogrammen mit genetisch schlecht untersuchten Arten, für die nur wenige mit anderen Methoden entwickelte Züchtungs-Marker bekannt sind.

Verschiedene NGS-Anwendungen zur Sequenzuntersuchung, Charakterisierung von Sequenzvariationen und Mutationen, sowie zur Charakterisierung der Expression werden dabei benutzt. Ziele dieser Anwendung sind die genauere Charakterisierung von Referenz-Genotypen, sowie die Analyse von genetischen Unterschieden bei verschiedenen Elternlinien für die Zucht, innerhalb von Wildpopulationen und bei verwandten, wildlebenden Arten. Mit den Methoden können auch genetische Unterschiede in verschiedenen Pflanzengeweben untersucht werden, sowie Unterschiede, die auf epigenetischen Modifikationen beruhen. Die Ergebnisse sind einerseits wertvoll um die Genomstruktur und ihre Dynamik bei der Fortpflanzung zu untersuchen und andereseits um die Identifikation von genetischen Markern zu unterstützen. Mit NGS-Methoden identifizierte und charakterisierte Marker können in vielfältiger Weise für die Züchtung eingesetzt werden: im Rahmen der Marker-gestützten Züchtung zur Beschleunigung von Zuchtprogrammen, zur Charakterisierung von züchtungsrelevanten QTLs und Expressions-QTLs, sowie zur molekularen Analyse von komplexen Züchtungsvorhaben, wie der Einkreuzung von spezifischen Genomsegmenten aus wildlebenden Populationen oder verwandten Arten (Varshney et al. 2009).

In Deutschland fördert das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) zusammen mit privatwirtschaftlichen Unternehmen unter dem Namen „GABI“ innovative Projekte der angewandten und zukunftsorientierten Pflanzenforschung[9]. Es werden eine Reihe von Projekten im Rahmen des GABI-Future Programms gefördert, die sowohl für die Pflanzenzüchtung, als auch für die Anwendung von OMICS-Techniken bei der Unter-

[9] Siehe: http://www.gabi.de/home.php ; http://www.gabipd.org/

suchung der Wirkung von Umwelteinflüssen auf Pflanzen (siehe Kap. 3.3) relevant sind. Es werden dabei einerseits Projekte im Bereich Grundlagenforschung zur Entwicklung von innovativen Ansätzen in der Pflanzengenomforschung verfolgt. Andererseits sollen in einzelnen Projekten auch Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung an Modellsystemen (z. B. *Arabidopsis thaliana*) bei landwirtschaftlich bedeutenden Kulturpflanzen (z. B. Raps) nutzbar gemacht werden, sowie Vorhaben umgesetzt werden, deren Ziel die Entwicklung marktfähiger Produkte ist. Für den Zugriff auf Primärdaten von OMICS-Untersuchungen, die im Rahmen von GABI-Projekten erstellt wurden, dient eine im Projektverbund entwickelte Datenbank – GABI-PD (Riaño-Pachón et al. 2009). Die Datenbank unterstützt die Integration von komplexen Daten aus verschiedenen Methodenanwendungen (z. B. Genomics, Transcriptomics, Proteomics und Metabolomics), und stellt Werkzeuge zur Sammlung und Aufbereitung von OMICS-Daten zur Verfügung mit dem Ziel die Analyse und Visualisierung von Ergebnissen von OMICS-Untersuchungen aus dem Projektverbund zu unterstützen.

3.5 Toxicogenomics: OMICS-Technologien in Toxikologie und Ökotoxikologie

Einen Anwendungsbereich für OMICS-Technologien, der direkt mit Aufgaben der Risikoabschätzung verknüpft ist, stellt das Gebiet der „Toxicogenomics“ dar. Darunter versteht man die Anwendung verschiedener molekularer Profilierungstechniken (z. B. Transcriptomics, Proteomics und Metabolomics) bei toxikologischen Fragestellungen in der wissenschaftlichen Forschung, aber auch für die Risikoabschätzung im regulatorischen Bereich (NRC 2007), konkret mit drei unterschiedlichen Zielsetzungen: einerseits zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen verschiedenen Umwelteinflüssen und der genetisch bedingten Empfindlichkeit gegenüber diesen Stressoren, andererseits um geeignete Biomarker für toxische Wirkungen bzw. für die Exposition gegenüber toxischen Substanzen zu identifizieren, sowie drittens um die molekularen Mechanismen der toxischen Wirkung aufzuklären (Waters und Fostel 2004). Die Identifikation von bestimmten Genen/Proteinen bzw. Metaboliten mit Indikatorfunktion für typische toxikologische Wirkungen (Biomarker) erlaubt auch Anwendungen zur prädiktiven Analyse von Substanzen auf spezifische toxikologische Eigenschaften (NRC 2007, Pennie et al. 2004).

Wesentlich für die genannten Fragestellungen ist die Kombination von Toxicogenomics-Resultaten mit klassischen toxikologischen Ansätzen, welche die bestmögliche Verankerung von molekularen Profilen in bekannten phänotypischen Zusammenhängen erlaubt (Waters und Fostel 2004). Hervorgehoben wird das Potenzial von Toxicogenomics-Anwendungen in Ergänzung zu anderen Risikoabschätzungsansätzen, z. B. die Möglichkeit zur Generierung von aussagekräftigen Ergebnissen aus in vitro-Studien und damit die Möglichkeit Tierstudien auf ein unbedingt erforderliches Minimum zu reduzieren, sowie zur

Stärkung der Aussagekraft von Risikoabschätzungen. Ausagen eines Konsensusberichts des nationalen Forschungsrates der USA (NRC 2007) zufolge können Toxicogenomics-Anwendungen z. B. die Abschätzung von Dosis-Wirkungszusammenhängen und die Abschätzung der Wirkung geringer Substanzdosen verbessern. Weiters erlauben sie eine bessere Extrapolation von Ergebnissen über Artgrenzen hinweg und eine bessere Abschätzung von synergistischen Wirkungen sowie von toxikologischen Auswirkungen auf die Entwicklung von Lebewesen. Das ist insofern von Interesse als ähnliche Herausforderungen auch bei der Risikoabschätzung von GVOs zu bewältigen sind. Auch andere Rahmenbedingungen sind ähnlich wie bei der Anwendung von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung von GVP: der in den letzten Jahren stark angestiegene Umfang publizierter Ergebnisse, die Verfügbarkeit von besseren Möglichkeiten zum Austausch von Daten und ihrer Interpretation und die laufenden Anstrengungen zur Validierung der verfügbaren Methoden (Pettit et al. 2010).

Während der NRC-Bericht spezifisch auf die Anwendung von Toxicogenomics zur Untersuchung der Effekte von Umweltchemikalien und Pharmazeutika auf die menschliche Gesundheit fokussiert (NRC 2007), werden auch ökotoxikologische Anwendungen der entsprechenden Methoden entwickelt. In diesem Zusammenhang befasst sich z. B. eine Arbeitsgruppe auf OECD-Ebene mit der praktischen Implementierung des Einsatzes von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung der Wirkung von Chemikalien auf aquatische Nicht-Modell-Organismen (Van Aggelen et al. 2010).

4 OMICS-TECHNOLOGIEN ALS WERKZEUGE DER RISIKOABSCHÄTZUNG VON GVP

Die Risikoabschätzung von GVP soll nach dem in der EU geltenden Gesetzesrahmen eine möglichst umfassende Identifikation und Evaluierung aller möglichen negativen Effekte auf die Gesundheit von Mensch und Tieren sowie die Umwelt gewährleisten. Der erste Schritt der Risikoabschätzung, die Identifizierung von Gefährdungspotenzialen („Hazard Identification“) ist entscheidend dafür, welche potenziellen Auswirkungen von GVP in den nachfolgenden Schritten näher untersucht werden. Eine möglichst umfassende Charakterisierung der beabsichtigten und unbeabsichtigten Effekte der gentechnischen Veränderungen in einer GVP ist wie einleitend erwähnt die Grundlage für diesen ersten Schritt der Risikoabschätzung. Eine wesentliche Fragestellung in diesem Zusammenhang ist, ob die derzeit angewandten Ansätze zur Charakterisierung von GVP umfassend und sensitiv genug sind, um der angesprochenen Zielsetzung gerecht zu werden. Insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung neuer Eigenschaften bei GVP, wie z. B. Stresstoleranz gegenüber abiotischen Einflüssen, oder die Entwicklung von inhaltsstofflich veränderten GVP, bei denen die derzeitigen Ansätze der vergleichenden Beurteilung an ihre Grenzen stoßen, ist diese Frage zu stellen (Heinemann et al. 2011). Für dieses Gutachten ist vor allem interessant, welchen Beitrag OMICS-Technologien für Zwecke der Risikoabschätzung von GVP leisten können angesichts der Fortschritte in der Entwicklung der OMICS-Technologien (siehe Kapitel 2) sowie des immer breiteren Einsatzes in Gebieten der angewandten Pflanzenforschung, die unmittelbaren Bezug zur Risikoabschätzung von GVP haben (für weitere Verweise siehe z. B. Davies et al. 2010). Wesentlich ist zu hinterfragen, welche bestehenden Lücken der Risikoabschätzung von GVP mittels des Einsatzes von OMICS-Technologien geschlossen werden können, ohne die Risikoabschätzung mit irrelevanten Daten zu überfrachten (Heinemann et al. 2011).

4.1 Empfehlungen betreffend OMICS-Technologien in den Leitlinien zur Risikoabschätzung von GVP der EFSA

Einen wichtigen Anhaltspunkt für die Art, wie OMICS-Technologien integriert werden sollen, geben die bestehenden Empfehlungen zur Durchführung der Risikoabschätzung von GVP in der EU, insbesondere die Leitlinien der EFSA für die Risikoabschätzung. [10]

[10] Eine Übersicht zu den existierenden Leitlinien der EFSA zur Risikoabschätzung von GVO ist zu finden unter: http://www.efsa.europa.eu/en/gmo/gmoguidance.htm.
Im Rahmen dieses Gutachtens wurden alle bis zum Jahresanfang 2011 publizierten Leitlinien-Dokumente berücksichtigt, als speziell relevant für diese Arbeit wurden folgende Leitlinien identifiziert: Leitlinien zur Risikoabschätzung von GVP im Hinblick auf Lebens- und Futtermittelsicherheit (EFSA 2004 & 2011), Leitlinien zur Rolle von Fütterungsstudien in der Risikoabschätzung von GVO (EFSA 2008), Leitlinien zur Risikoabschätzung der Allergenität von GVP, gentechnisch veränderten Mikroorganismen und daraus hergestellten Lebens- und Futtermitteln (EFSA 2010)

Im Folgenden wird daher ein Abriss gegeben, welche Aussagen zu dieser Problemstellung in relevanten EFSA-Leitlinien gefunden werden können.

Eine mögliche Anwendung von OMICS-Technologien für die Risikoabschätzung von GVP wird, wie in der Einleitung erwähnt, schon länger diskutiert (siehe z. B. Weckwerth 2004) auch seitens ExpertInnen, die als Mitglieder des zuständigen wissenschaftlichen Ausschusses der EFSA in die GVO-Risikoabschätzung auf EU-Ebene eingebunden sind (Kuiper et al. 2003, Kärenlämpi & Lehesranta 2006). Auch in den von der EFSA entwickelten Leitliniendokumenten für die Risikoabschätzung wird auf das Potenzial von OMICS-Technologien hingewiesen. Sie werden generell als zusätzliche Methoden bezeichnet, die in einer fallspezifischen Weise eingesetzt werden können, um die Breite und Aussagekraft der durchgeführten Risikoabschätzung von GVP zu erhöhen. Im Fokus steht dabei vor allem die bessere und umfassendere Analyse von möglichen unbeabsichtigten Veränderungen von GVP. Solche Aussagen finden sich beispielsweise in den allgemeinen Leitlinien zur Risikoabschätzung von GVP im Hinblick auf Lebens- und Futtermittelsicherheit (EFSA 2004 & 2011) und in den spezifischen Dokumenten zur Rolle von Fütterungsstudien in der Risikoabschätzung von GVO (EFSA 2008) und zur Risikoabschätzung der Allergenität von GVP, gentechnisch veränderten Mikroorganismen und daraus hergestellten Lebens- und Futtermitteln (EFSA 2010). Die Aussagen, die in diesen Leitlinien in Bezug auf die Anwendung von OMICS-Technologien gemacht werden, sollen im Folgenden analysiert werden.

4.1.1 Allgemeine Leitlinien zur Risikoabschätzung von GVP

Schon in den 2004 publizierten Leitlinien zur Risikoabschätzung von GVP und daraus hergestellten Lebens- und Futtermitteln wird auf die Bedeutung der vergleichenden Analyse (comparative assessment) hingewiesen und der Zusammenhang mit der Anwendung von OMICS-Technologien hergestellt[11]. Dabei werden die molekulare, agronomische und morphologische Charakteristika, sowie die chemische Zusammensetzung von GVP und geeigneten Vergleichslinien (d. h. nicht gentechnisch modifizierten Pflanzen, die einen weitgehend ähnlichen genetischen Hintergrund aufweisen wie die betreffende GVP) vergleichend untersucht (EFSA 2004). Die Bedeutung dieses Ansatzes wird besonders in Bezug auf die Untersuchung von unbeabsichtigten Veränderungen in GVP unterstrichen, wobei für die routinemäßige Untersuchung solcher Veränderungen z. B. zielgerichtete Analysen eines kleinen Sets von ausgewählten einzelnen Inhaltsstoffen empfohlen werden. Der mögliche Einsatz von Profilerstellungs-Technologien, wie Transcriptomics,

[11] EFSA (2004), Kap. II/6, p. 16: “To increase the chances of detecting unintended effects due to the genetic modification of organisms, profiling technologies such as transcriptomics, proteomics and metabolomics, have the potential to extend the breadth of comparative analyses.”

Proteomics und Metabolomics, wird in diesem Dokument als zukünftig sinnvolle Ergänzung von bestehenden Ansätzen bewertet: Daten, die mit OMICS-Technologien generiert werden, sollen den Leitlinien zufolge Resultate anderer Untersuchungen ergänzen und bestätigen. Die grundsätzliche Eignung der Techniken wird anerkannt, vor allem in Bezug auf die Risikoabschätzung von GVP mit inhaltsstofflichen Veränderungen, die durch Modifikation von zellulären Stoffwechselwegen bewirkt werden[12]. Als weiteres Anwendungsfeld wird die Untersuchung von Allergenen in GVPs genannt in Ergänzung zu immunologischen Methoden[13]. Weiterer Evaluierungsbedarf wird hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität der Methoden gesehen[14].

In der 2011 publizierten überarbeiteten Fassung des EFSA-Leitliniendokuments (EFSA 2011) werden die beschriebenen Ansätze bekräftigt, die Hinweise auf die Anwendung sind allerdings nicht wesentlich konkreter als in den Leitlinien zur Risikoabschätzung von GVP aus 2004. Es wird allerdings darauf hingewiesen, dass OMICS-Technologien eingesetzt werden können, um Studien zur Toxizität von GVP-Produkten zu ergänzen, die nach den relevanten OECD- und EU-Richtlinien durchgeführt werden[15]. Es fehlt allerdings eine konkrete Aussage, bei welchen spezifischen Fragestellungen solche Methoden den Leitlinien zufolge verwendet werden sollten. Konkreter ist der Hinweis auf die generelle Empfehlung zur Verwendung von Proteomics-Methoden zur Untersuchung des allergenen Potenzials von GVP im Zusammenspiel mit serologischen Tests[16].

---

[12] EFSA (2004), Kap. II/6, p. 16: “The utility and applicability of these technologies in the detection of altered gene and protein expression and metabolite composition in GM plants has been under scrutiny in specific research projects … and the applicability of metabolomic techniques, such as gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and liquid chromatography (*e.g.* HPLC) coupled to nuclear magnetic resonance (NMR), for the simultaneous analysis of a broad variety of metabolites in GM plants and their conventional counterparts has been demonstrated. These non-targeted approaches may be of particular relevance for GM food crops with specific metabolic pathways modified e.g. those leading to enhanced nutritional profiles, obtained through the insertion of single or multiple genes.”

[13] EFSA (2004), Kap. III/D/7.9.2, p. 32: “Development of modern analytical tools including profiling techniques (see Section II, 6) is encouraged in association with human and animal serum or cell-based assays. These are certainly promising and efficient tools which could be used to detect new proteins or peptide fragments with allergenic potential in whole GM crops and in (processed) GM foods.”

[14] EFSA (2004), Kap. II/6, p. 16: “Further exploration of profiling approaches is needed with respect to the evaluation of specificity and sensitivity. Profiling methods are not aimed at replacing conventional analyses but may be useful to confirm and supplement other data.”

[15] EFSA (2011), Kap. 3.1.4.1, p. 22: “Internationally agreed test methods described by the OECD or by the European Commission should be used for toxicity testing. Test protocols may need to be adapted for the toxicological testing of GM plants and derived food and feed. Any adaptation of these protocols, or use of any methods that differ from these protocols, should be explained and justified. Furthermore, new methods (e.g gene expression, profiling, metabolomics, etc.) may complement standard methods to address specific issues.”

[16] EFSA (2011), Kap. 3.1.5.2, p. 28: “The approach should be applied on a case-by-case basis depending on the available information on the allergenic potential of the recipient organism. It is generally performed by analytical methodologies such as proteomics in association with the use of allergic human sera as probes.”

4.1.2 Empfehlungen zum Einsatz von OMICS-Technologien bei Tierfütterungsstudien in der Abschätzung der Lebensmittelsicherheit von GVO

Der Bericht des wissenschaftlichen Ausschusses der EFSA zum Einsatz von Tierfütterungsstudien in der Abschätzung der Lebensmittelsicherheit von GVO (EFSA 2008) kommt zu dem Schluss, dass die Integration von OMICS-Technologien in die Versuchsansätze, z. B. 90-Tage-Fütterungsstudien, eine Erhöhung der Aussagekraft dieser Tests zur Folge haben kann[17]. Insbesonders der Ansatz zum Einsatz von OMICS-Technologien zur Identifizierung von (Ernährungs-) Effekten auf Säugetierzellen („Toxicogenomics", siehe Kap. 3.5) wird unterstrichen[18]. Die Empfehlung ist allerdings mit dem Hinweis versehen, dass vor einer Routineanwendung noch weitere Standardisierungen und Erfahrungswerte hinsichtlich der Interpretation von Ergebnissen notwendig sind. Die Möglichkeiten des Einsatzes von OMICS-Technologien zur Charakterisierung von unbeabsichtigten Effekten auf die inhaltsstoffliche Zusammensetzung von GVP werden auch in diesem Dokument als vielversprechend eingeschätzt[19], allerdings mit dem Hinweis auf die dafür noch erforderliche Validierung. Außerdem wird die Entwicklung standardisierter Protokolle für den Routineeinsatz angeregt[20].

4.1.3 Leitlinien zur Untersuchung der Allergenität von GVP, GV-Mikroorganismen und daraus hergestellten Produkten

Konkretere Hinweise für den Einsatz von OMICS-Technologien gibt die 2010 publizierte Leitlinie zur Untersuchung der Allergenität von GVP, GV-Mikroorganismen und daraus hergestellten Produkten (EFSA 2010). Die diesbezüglichen Empfehlungen beruhen auf einer Analyse, die als Anhang 5 des Dokuments enthalten ist (Annex 5: „Analytical and profiling technology/in vitro protein analysis and proteomics methods for the allergenicity assessment of the whole GM plant").

---

[17] EFSA (2008), p. S5: "It can be anticipated that in the future the predictive value of a 90-day rodent feeding studies used for the safety assessment of whole food and feed will be enhanced by the integration of new technologies like transcriptomics, proteomics and metabolomics into the experimental risk assessment approach."

[18] EFSA (2008), Kap. 3.2.4., p. S30: "Recent developments in molecular biology and analytical chemistry have provided new opportunities to evaluate the effect of chemicals in food and diet on mammalian cells at various integration levels (e.g. RNA, protein, metabolite). Transcriptomics (transcript profiling), proteomics (protein profiling using among others 2D-gel electrophoresis and MS) and metabolomics (metabolite profiling using techniques such as LC–MS, GC–MS, NMR) are technologies, which facilitate a non-targeted approach and permit the measurement of thousands of variables simultaneously. These ''omics" technologies applied to toxicology, also referred to as toxicogenomics, are currently in their infancy, but provide an opportunity to better understand the mechanism of action of chemicals and contribute to the development of alternatives to animal testing."

[19] EFSA (2008), Kap. 6.8, p. S56: "Regarding the analytical detection of unintended effects, profiling technologies such as transcriptomics, proteomics and metabolomics are promising tools, which will broaden the spectrum of detectable compounds and supplement current targeted analytical approaches."

[20] EFSA (2008), p. S61: "Further validation of these technologies and experience with their interpretation of data will be needed and standardisation of experimental procedures etc is recommended, before they can be utilised in routine safety assessment of food and feed derived from GM plants."

Die Leitlinie hält fest, dass die qualitative und quantitative Analyse von Proteinen mit allergenem Potenzial in GVP in Form einer vergleichenden Untersuchung mit dem Vorkommen von Allergenen in nicht gentechnisch veränderten Pflanzen erfolgen sollte. Aus diesem Grund empfiehlt das Dokument, dass Antragsteller qualitative und quantitative Daten zum Vorkommen von Schlüsselallergenen („key allergens“) im Rahmen der vergleichenden Untersuchung einsetzen.

OMICS-Technologien, insbesondere Methoden mit hohem Probendurchsatz werden als Alternativen zu Techniken diskutiert, die auf dem immunchemischen Nachweis von Allergenen beruhen. OMICS-Technologien werden darüber hinaus als geeignete Methodik zum Nachweis von post-translationalen Modifikationen (PTMs) von neu in der GVP exprimierten Proteinen angeführt. Dieser Nachweis von PTMs ist aus zwei Gründen erforderlich. Zum einen dient er dazu, das allergene Potenzial von neuartigen Proteinen in GVP abzuschätzen. Zum anderen ist er Teil des Vergleichs des pflanzlich expremierten Proteins mit dem bakteriell produzierten Protein, welches häufig – da leichter zu produzieren - an Stelle des pflanzlichen Proteins für Tests verwendet wird. Damit Tests mit dem bakteriellen Protein als Ersatzstoff akzeptiert werden können, soll seine Gleichwertigkeit mit dem Originalstoff, dem pflanzlichen Protein dargelegt werden, und mögliche post-translationele Modifikationen sind dabei ein Kriterium

Das Potenzial von OMICS-Technologien kann nach den Leitlinien zufolge genutzt werden, um die natürliche Variabilität in Art und Menge der auftretenden Allergene in verschiedenen Pflanzensorten, bzw. ihren Geweben zu verschiedenen Zeitpunkten und unter verschiedenen Umwelteinflüssen zu bestimmen. Als relevant für die Entscheidung über die Sinnhaftigkeit der Anwendung von OMICS-Technologien werden folgende Punkte dargestellt:

- Sensitivität, Spezifität und technische Machbarkeit der Untersuchungen.
- Vor- bzw. Nachteile der OMICS-Technologien in Bezug auf die Interpretation von Untersuchungssergebnissen (im Vergleich mit Daten, die mittels gezielten Untersuchungen von GVP mittels serologischer Methoden generiert werden können).

4.2 Eignung von OMICS-Technologien zur Risikoabschätzung von GVP

OMICS-Technologien werden bislang nur vereinzelt im Rahmen der Risikoabschätzung von GVP in der EU eingesetzt. Wie oben angeführt unterstreichen die Leitlinien der EFSA aber das Potenzial solcher Ansätze in einer fallspezifischen Art und Weise. Die in den Leitlinien angeführten Voraussetzungen für einen solchen fallspezifischen Einsatz sollen im Folgenden näher beleuchtet werden, um zu untersuchen, ob der gegenwärtige Entwicklungsstand bei OMICS-Technologien diesen Voraussetzungen gerecht wird. Diese Diskussion soll auch Fragestellungen aufzeigen, die noch weiter bearbeitet werden müs-

sen und Anregungen geben, in welchen Anwendungsfeldern das Potenzial von OMICS-Technologien in nächster Zukunft genutzt werden sollte.

Wie oben dargestellt bewerten die angeführten EFSA-Leitlinien folgende Punkte als relevant für eine fallspezifische Anwendung von OMICS-Technologien:

- Methodeneignung
- Technische Machbarkeit und Verfügbarkeit
- Verlässlichkeit (Reproduzierbarkeit und Genauigkeit), sowie Sensitivität und Spezifität der Methoden
- Interpretation der Ergebnisse
- Standardisierung und Validierung

Diese Punkte sollen in den folgenden Kapiteln auf Basis des derzeitigen Wissenstandes und im Vergleich mit bei der Risikoabschätzung von GVP akzeptierten Methoden beleuchtet werden.

4.2.1 Methodeneignung

Die grundsätzliche Eignung von OMICS-Technologien für die Untersuchung der in bestimmten GVP eingeführten Modifikationen wurde, wie oben erwähnt, schon mit der Publikation der allgemeinen Leitlinien der EFSA zur Risikoabschätzung von GVP festgehalten. Speziell in Bezug auf die Untersuchung von unbeabsichtigten Veränderungen, die in den meisten Fällen nicht zielgerichtet zustande kommen und daher in Bezug auf Ausmaß und Effekt schwer zu detektieren sind, liegen die prinzipiellen Vorteile von Profiling-Techniken auf der Hand. Das wird auch übereinstimmend in Publikationen vermerkt, die OMICS-Technologien im Rahmen von Untersuchungen von GVP auf Veränderungen der inhaltsstofflichen Zusammensetzung verwenden (Kusano et al. 2011; Zolla et al. 2008). Diese Aussagen werden unabhängig von Untersuchungsergebnissen getroffen, d. h. unabhängig davon, ob unbeabsichtigte Änderungen nachgewiesen wurden oder nicht. Die Arbeit von Kusano et al. (2011) qualifiziert OMICS-Technologien, ob ihrer Eigenschaften sogar als „natürliche Wahl“ für die umfassende Untersuchung von GVP, und hebt besonders die Anwendung von Metabolomics-Ansätzen in diesem Zusammenhang hervor: Die breit angelegte Analyse von niedrigmolekularen Pflanzeninhaltsstoffen kann demnach eine hohe Aussagekraft auch für die Abschätzung von phänotypischen Merkmalen und insbesondere in Bezug auf die Charakterisierung wichtiger ernährungsphysiologischer bzw. toxikologischer Eigenschaften haben (Kusano et al. 2011).

Einzubeziehen in die Überlegung ist außerdem der rapide Fortschritt der bei der Entwicklung und der Anwendung von OMICS-Technologien insgesamt seit der Publikation der EFSA-Leitlinien (2004) gemacht wurde: Die Einschätzung, dass OMICS-Technologien be-

sonders zukunftsträchtig sein könnten, hat sich nach Einschätzung mancher ExpertInnen im allgemeinen Kontext in einem ungeahnten Ausmaß bestätigt. Hall z. B. weist darauf hin, dass sich das Gebiet der Pflanzen-Metabolomics in der letzten Dekade von einem theoretischen Konzept hin zu einer weit geschätzten und auch angewendeten Technologie entwickelt hat (Hall 2011). Wie von Pionieren des Forschungsfeldes vorhergesagt, hat der allgemeine Fortschritt natürlich auch für die breitere Anwendbarkeit in der Risikoabschätzung von GVP erhebliche Relevanz (Weckwerth 2004). Das gilt für viele Faktoren, die wesentlich für die Anwendung der OMICS-Technologien sind, wie z. B.:

- die Verfügbarkeit der Technologie,
- die mit der Anwendung verbundenen Kosten,
- die technischen Eckdaten zur Leistungsfähigkeit
  (z. B. Probendurchsatz und Analysedauer, Spektrum erfassbarer Substanzen, Sensitivität der Detektion),
- sowie die Möglichkeiten der Interpretation
  (Identifikation erfasster Verbindungen, Quantifizierbarkeit, Auswertbarkeit der Resultate und Korrelation mit relevanten phänotypischen Merkmalen).

Relevant für die Frage der Eignung von OMICS-Technologien für die Risikoabschätzung von GVP ist ferner die Charakterisierung der Art ihres Einsatzes. Seitens vieler ExpertInnen wird angemerkt, dass dabei ein wesentlicher Unterschied besteht zwischen folgenden Anwendungstypen (vgl. z. B. Heinemann et al. 2011): Einerseits zwischen den mehr oder weniger zielgerichteten Anwendungen (sogenanntes „targeted“ oder „semi-targeted profiling“) zur Analyse einer eingeschränkten, gezielt ausgewählten Gruppe von Zielmolekülen und andererseits dem ungerichteten, nicht spezifisch auf bestimmte Zielsubstanz-fokussierten Einsatz von OMICS-Technologien (auch „untargeted profiling“ genannt). Mit dem ungerichteten Einsatz sollen prinzipiell alle in einer GVP-Probe vorkommenden Vertreter einer Substanzklasse erfasst werden (d. h. alle Gene eines Genoms, alle vorkommenden Transkripte im Rahmen von Transkriptomics, alle Proteine bzw. Stoffwechselprodukte im Rahmen von Proteomics und Metabolomics). Aufgrund der jeweiligen technischen Einschränkungen (siehe Kap. 2) kann dieses Ziel nur annähernd erreicht werden.

Zielgerichtete Ansätze sind dabei konzeptionell mit spezifischeren Nachweismethoden, die bereits jetzt routinemäßig eingesetzt werden verwandt: dazu zählen z. B. Southern bzw. Northern Blots zum Nachweis bestimmter DNA bzw. RNA-Sequenzen, sowie der Nachweis von Protein-Epitopen mittels Western Blots. Der Vorzug der Fokussierung auf bestimmte Zielsubstanzen (und ihrer Derivate, soweit nachweisbar) ist es, kleine Änderungen bei Substanzen erfassen zu können, die eine hohe Aussagekraft in Bezug auf relevante Eigenschaften für die Risikoabschätzung von GVP aufweisen (Heinemann et al. 2011). Die zu analysierende Datenmenge ist bei solchen Analysen geringer, die Inter-

pretation (auch im Hinblick auf statistische Analysen wie sie z. B. bei der quantitativen Mengenbestimmung von ausgewählten Leitsubstanzen angewendet werden) leichter durchzuführen. Für die Aussagekraft der Untersuchungen ist entscheidend, welchen Indikatorwert die ausgewählten Testsubstanzen in Bezug auf die Gesamtheit der Veränderungen in GVP und ihrer Effekte besitzen. Während dieser bei Analysen von transgenen Komponenten (inserierte transgene DNA-Sequenzen, transgene Genprodukte, identifizierbare modifikationsspezifische Fusionsproteine) grundsätzlich gegeben ist, ist die Aussagekraft hinsichtlich vieler anderer unbeabsichtigter Veränderungen sehr begrenzt.

Zielgerichtete Ansätze sind durch ihre Fokussierung auf spezifische Analyten „blind" gegenüber anderen, möglicherweise ebenfalls relevanten Änderungen in GVP, die mit einer ungerichteten Analysenstrategie erfasst werden können. Diese ungerichteten Ansätze entsprechen im eigentlichen Sinn der Definition von OMICS-Technologien (Hall 2011). Je nach Analysentiefe werden ungerichtete Ansätze als Fingerprinting bzw. Profiling bezeichnet. Die beiden Ansätze unterscheiden sich insofern, als beim Fingerprinting wiedererkennbare und vergleichbare Muster chemischer Zusammensetzung einer bestimmten Probe erstellt werden, während beim Profiling die bei der Analyse gefundenen Substanzen soweit möglich auch identifiziert werden sollen (Hall 2011). Heinemann und KollegInnen (2011) merken in Bezug auf die Aussagekraft dieser Ansätze kritisch an, dass bei solchen Analysen oft sehr große Datenmengen generiert werden, die spezifische Aussagekraft vieler Daten in Bezug auf risikorelevante Unterschiede zwischen GVPs und gentechnisch nicht veränderten Pflanzen aber nur gering ist (vgl. Davies 2010).

Wenn keine ausreichenden Grundlagen zur Abschätzung der Wirkungshypothese gentechnischer Veränderungen vorliegen können Fingerprinting-Ansätze trotzdem sehr relevant sein. Ergebnisse solcher Untersuchungen können für die Auswahl von weiteren gezielten Untersuchungen wertvolle Hinweise geben. Bei der Diskussion des Potenzials von OMICS-Technologien wird häufig ignoriert, dass diese Ansätze speziell für derartige Voruntersuchungen geeignet sind, auch wenn sie nicht als eigenständige Elemente der Risikoabschätzung von GVP eingesetzt werden.

Eine strikte Unterscheidung von OMICS-Anwendungen in gerichtete bzw. ungerichtete Ansätze ist im Licht der stattgefundenen Entwicklungen aber immer schwerer zu treffen (vgl. Hall 2011). So wurden einerseits OMICS-Ansätze entwickelt, die auf größere für bestimmte Zwecke besonders geeignete Substanzgruppen fokussiert sind, innerhalb dieser Gruppe aber eine umfassende Analyse von Einzelkomponenten erlauben. Z. B. deckt Lipidomics als Teil von Metabolomics spezifisch die breitgefächerte Gruppe von Lipiden und verwandten Substanzen ab (Lessire et al. 2009, in Hall 2011).

Auch die Unterscheidung zwischen Fingerprinting und Profiling wird durch den technischen Fortschritt zunehmend aufgehoben. Einerseits werden beide Ansätze oft kombiniert und ein ungerichtetes, breit angelegtes Fingerprinting als erster Schritt einer Untersuchung

(„Screening“) einem gerichteten Profiling von Substanz-Untergruppen vorgeschaltet. Außerdem erlauben die verfügbaren Technologien mittlerweile eine Kombination von hoher Leistung (insbesonders Probenumfang und –durchsatz), sowie robuster Auswertung (insbesondere Identifikation von vielen detektierten Komponenten als integraler Teil der Analyse, basierend auf methodenspezifischen Datenbanken zur Substanzerkennung). Das Ergebnis ist daher eine Kombination aus chemischen Signaturen von strukturell nicht identifizierten Substanzen und einem für die Interpretation wesentlichen Set identifizierbarer Moleküle, z. B. niedrigmolekularer Metabolite (Hall 2011). Wie seit einiger Zeit bereits diskutiert (Weckwerth 2004), sind solche Daten relevant in Bezug auf die Erfordernisse der Risikoabschätzung von GVP und erlauben bei geeigneter Herangehensweise auch eine detailliertere Analyse der verschiedenen für ein Untersuchungsergebnis bestimmenden Einflussgrößen (beabsichtigte/unbeabsichtigte Effekte durch die gentechnische Veränderung, Einfluß des genetischen Hintergrunds – d. h. der Genotyp-abhängigen Variation, Variation aufgrund von Umweltbedingungen).

Die Eignung der OMICS-Technologien muss in Abhängigkeit von der jeweiligen Anwendung beurteilt werden. Folgende Anwendungen scheinen in diesem Zusammenhang relevant:

- Der Einsatz für die nicht-zielgerichtete Untersuchung von unbeabsichtigten Veränderungen in der Zusammensetzung und im Metabolitenhaushalt:
  Diese Analysen würden in Ergänzung zu bestehenden Untersuchungsansätzen implementiert und zielen auf die möglichst umfassende Untersuchung von unbeabsichtigten Veränderungen in GVPs ab. Die Ergebnisse sind von Relevanz für die weitere Ausgestaltung der Risikoabschätzung von GVPs, d. h. zur weiteren Untersuchung, welche Effekte durch die gefundenen Veränderungen bewirkt werden können. Für den Nachweis, dass substanzielle Veränderungen durch die gentechnische Veränderung bewirkt wurden, ist ein genaues Verständnis der kausalen Auswirkungen auf molekularer Ebene nicht unbedingt nötig.
- Der zielgerichtete Einsatz für die eingeschränkte Analyse einer überschaubaren Auswahl bestimmter Komponenten und ihrer Derivate:
  Diese Anwendung ist am besten mit der Untersuchung von Inhaltsstoffen nach OECD-Empfehlungen vergleichbar, allerdings ist die Auswahl der Zielkomponenten im Regelfall durch eine Risikohypothese geleitet (Information über funktionelle Wirkungen eines Transgens bzw. Eigenschaften der parentalen Pflanze, wie Vorhandensein von Proteinen mit allergener Wirkung, Vorhandensein bestimmter Metabolite bei Stressresistenz oder Fitnessvorteilen). Gefundene Veränderungen können im Regelfall aufgrund des vorhandenen Wissens über den Wirkungszusammenhang weiter untersucht werden.

- Die Analyse der Wirkungen der transgenen Veränderungen im jeweiligen genetischen Hintergrund und unter bestimmten Umweltbedingungen. Diese Untersuchungen dienen dazu, Hinweise auf die Effekte von Veränderungen in GVP im Kontext des gesamten biochemischen Funktionszusammenhangs zu erhalten.
  Die Schwierigkeit in diesem Fall ist die Unterscheidung zwischen Abweichungen, die biologische Relevanz haben und solchen, die aufgrund zufälliger Variation zustande kommen. Solche Schwankungen treten auch bei Nicht-GVP durch Unterschiede im genetischen Hintergrund und aufgrund von Umwelteinflüssen auf und sind daher nicht notwendigerweise als klarer Effekt der gentechnisch eingeführten Veränderungen zu werten.

4.2.2 Technische Machbarkeit und Verfügbarkeit

Wie in Kap. 2 vorgestellt, hat sich in Bezug auf die technischen Grundlagen von allen relevanten OMICS-Anwendungen in den letzten 10 Jahren eine geradezu explosive Entwicklung abgespielt, die von einer rapiden Ausweitung der Aussagekraft der Methoden, bei einer gleichzeitigen Reduktion der verbundenen Analysekosten gekennzeichnet war. Auch im direkten Vergleich mit herkömmlichen Untersuchungsmethoden stellt der Faktor „technische Machbarkeit“ nach übereinstimmender ExpertInnenmeinung keine entscheidende Barriere mehr dar, weitere Fortschritte in den nächsten Jahren gelten als wahrscheinlich angesichts des derzeitigen Interesses der Wissenschaft und der Forschungsförderung im Hinblick auf OMICS-Technologien.

Entsprechende Arbeiten über Entwicklungen in den verschiedenen Anwendungen von OMICS-Technologien, z. B. bei Transcriptomics (z. B. Wilhelm & Landry 2009), Proteomics (z. B. Thelen & Peck 2007; Lee et al. 2010) und Metabolomics (z. B. Hardy & Hall 2011) stellen den aktuellen Stand der Technik dar. Sie belegen, dass der Trend hin zu universell einsetzbaren Technologien verläuft, die keinen hohen spezifischen Entwicklungsaufwand für bestimmte Anwendungen (z. B. Herstellung spezifischer Microarrays für die TranskriptionsAnalyse in verschiedenen Pflanzenarten) oder hohen Standardisierungsbedarf (wie Vergleichbarkeit 2-D-Gelanalyse von Proteinen) mit sich bringen. Auch die Anwendbarkeit von spezifischen Ansätzen zur Detektion von modifizierten Proteinspezies in verschiedenen Gebieten der Pflanzenforschung ist dokumentiert (Ytterberg & Yensen 2010) und Ansätze für eine funktionale Analyse im Rahmen derartiger Untersuchungen wurden beschrieben (Hoehenwarter et al. 2011). Auch die verstärkte Integration der einzelnen Techniken für die funktionelle Analyse der Stoffwechselregulation hat Fortschritte gemacht (siehe z. B. Fernie & Keurentjes 2011, Fukushima et al. 2009) und wird als wesentlich für die funktionelle Interpretation von genomischen Daten eines Organismus angesehen (Weckwerth 2011a).

Während eine wirklich vollständige Analyse aller Genprodukte und Metaboliten in Pflanzen bzw. GVP nicht im Fokus des derzeit oder in Zukunft Erreichbaren liegt, soll gewährleistet sein, dass für einen bestimmten Anwendungszweck wesentliche Zellkomponenten mit der gewählten Methodik verlässlich nachgewiesen werden können. Der gegenwärtige Wissenstand erlaubt es zu bestimmen, welche wesentlichen, aber nur in niedrigen Konzentrationen vorhandenen Komponenten bei jeweiligen Analysen aus technischen Gründen unterrepräsentiert sind und daher mit verfügbaren OMICS-Technologien nicht sinnvoll untersucht werden können. Draper et al. (2011) beschreiben beispielsweise die entsprechenden Limitierungen hinsichtlich der Analyse von Pflanzenhormonen mittels Metabolomics-Methoden.

Nicht unterschätzt werden sollten allerdings Arbeiten, die notwendig sind, um die bestehenden technischen Möglichkeiten, z. B. von Metabolomics-Analysen, in verschiedenen Gebieten wie der Risikoabschätzung von GVP praxisgerecht zu machen (Hall 2011). Diese Arbeiten umfassen die Entwicklung geeigneter Untersuchungsprotokolle für die gesamte Analyse- und Auswertungskette, die Generierung von Vergleichsdaten und von Leitlinien für die Implementation und Interpretation der Methoden und ihrer Ergebnisse.

Aktuell vorhandene offene Fragen im Hinblick auf technische Machbarkeit und Verfügbarkeit betreffen beispielsweise die folgenden Bereiche:

- Herstellung geeigneten Probenmaterials für den vollständigen, unverzerrten Nachweis von bestimmten Substanzklassen, wobei spezielle Herausforderungen beim Umgang mit rasch fluktuierenden und/oder labilen Probenbestandteilen (viele Metaboliten, manche Proteine und RNAs) bewältigt werden müssen:
  Z. B. Verhinderung von Verzerrungen bei Probennahme und Probenaufarbeitung, die zur Abreicherung oder zum Fehlen von bestimmten Verbindungsarten führt, bzw. die relevante technische Variabilität von Einzelkomponenten zur Folge hat; Entwicklung geeigneter Anreicherungsmethoden für ausgewählte Klassen von Zielsubstanzen, wie z. B. post-translational modifizierte Proteine, um die Gesamtheit der Substanzklasse inklusive der niedrig konzentrierten Komponenten erfassen zu können.
- Sicherstellung einer geeigneten Analysentiefe:
  Z. B. Nachweistiefe bei schwach exprimierten RNAs, Nachweis von Proteinen und Metaboliten mit niedriger Konzentration im Untersuchungsmaterial.
- Identifizierung von in den Experimenten nachgewiesenen Substanzen:
  Insbesondere Identifizierung von allen mittels Proteomics detektierten Proteinen, und den für die Beschreibung wesentlicher Stoffwechselwege relevanten Metaboliten im Rahmen der Anwendung von Metabolomics.

- Zuverlässige Quantifizierungsmethoden bei Ansätzen die Mengenvergleiche einschließen, wobei die Qualitätsparameter der verwendeten Methoden transparent und akzeptabel sein müssen.

Die Verfügbarkeit von OMICS-Technologien ist mittlerweile weit über den Bereich der wissenschaftlichen Methodenentwicklung hinaus gestiegen. Die Methoden und die notwendigen Instrumentarien sind damit einem weiten Bereich der Grundlagen- und anwendungsorientierten Forschung zugänglich und werden auch in steigendem Ausmaß angewendet. Das betrifft insbesondere Anwendungsfelder, mit denen Entwickler von GVP ebenfalls systematisch befasst sind, wie z. B. moderne Pflanzenzüchtung und Sortenentwicklung.

Hinsichtlich Verfügbarkeit der Methoden ist auch anzumerken, dass bei der Herstellung und Risikoabschätzung von GVP teilweise bereits heute Techniken mit ähnlichem instrumentellem Aufwand wie bestimmte OMICS-Technologien, als Standardmethodik angewendet werden, z. B. moderne Sequenzierverfahren. Zu berücksichtigen ist ebenfalls, dass für die vergleichende Analyse von Inhaltsstoffen vielfach kommerzielle Analyseanbieter mit der Durchführung geeigneter Untersuchungen beauftragt werden. Eine ebensolche Möglichkeit besteht auch für die Anwendung von OMICS-Technologien. Auch bei diesen sind geeignete Anbieter von Analysendienstleitungen vorhanden, die eine technisch kompetente Durchführung derartiger Untersuchungen gewährleisten können. Basierend auf Aussagen von ExpertInnen kann gesagt werden, dass die Kosten für den Einsatz von OMICS-Technologien nicht mehr prohibitiv hoch sind, vor allem nicht in Anbetracht der Gesamtkosten für ein Zulassungsverfahren von GVP.

4.2.3 Verlässlichkeit (Reproduzierbarkeit und Genauigkeit), sowie Sensitivität und Spezifität der Methoden

Wie oben und in Kap. 2 beschrieben bauen die derzeit für OMICS-Technologien verwendeten Techniken auf lange erprobten Verfahren auf, wie enzymatische Sequenziertechniken, oder massenspektometrische Nachweisverfahren in Kombination mit Hochleistungstrennverfahren (Gaschromatographie oder Flüssigchromatographie) für organische Moleküle. Diese Methoden sind mindestens ebenso lange oder länger eingeführt, wie andere bei der Risikoabschätzung von GVP empfohlene bzw. praktizierte Methoden oder sie stellen eine weitere Anwendung anerkannter Methoden in einem erweiterten Kontext dar (z. B. RNA-Seq im Rahmen von Transkriptomics-Untersuchungen). Wie von Heinemann und KollegInnen (2011) unterstrichen, wurden die oben genannten Methoden hinsichtlich ihrer Verlässlichkeit besser und länger untersucht als andere in der Risikoabschätzung von GVP verwendete Methoden (beispielsweise Bioinformatik-Analysen zur Evaluierung der Toxizität und Allergenität).

Eine wesentliche Weiterentwicklung hat hinsichtlich des Probendurchsatzes, der Möglichkeiten für Quantifizierbarkeit, und auch der Sensitivität der Analysen stattgefunden (siehe auch Kap. 2), sowie hinsichtlich der Möglichkeiten für vergleichende parallele Analysen verschiedener Probemischungen (z. B. Proben aus GVP und nicht-modifizierten Pflanzen), parallel und vergleichend zu analysieren, z. B. mittels DIGE oder differenziellen iTRAQ-Proteom-Analysen. Auf diese Weise werden Ergebnisse ohne zusätzliche technische Variationsquellen generiert. Aber auch andere Ansätze werden von ExpertInnen als genügend robust und ausgereift eingeschätzt, um sie in der Risikoabschätzung von potenziellen unbeabsichtigten Veränderungen bei GVP verwenden zu können (z. B. Hoekenga 2008).

Ein wesentlicher Faktor hinsichtlich der technischen Variabilität der Analysen liegt bei der Probennahme und Probenvorbereitung, z. B. der Extraktion von Proteinen, bzw. anderer Substanzklassen für die Analyse. Die eingesetzten Methoden sollten im Hinblick auf die Notwendigkeiten der Analyse optimiert werden und reproduzierbar geeignete Ausbeuten an Zielsubstanzen gewährleisten, ohne eine Verzerrung des zugrundeliegenden Komponentengemisches zu bewirken. Solcherart optimierte Methoden sind in Teilbereichen, z. B. Proteinextraktion aus Samenmaterial (Sojabohnen), entwickelt und in der Literatur publiziert (Lee et al. 2010). Nach ExpertInnenmeinung ist dieser Schritt in Anbetracht der geringeren technischen Variation durch die Analytik entscheidend dafür, dass die technische Variabilität für die gesamte Prozesskette (Probennahme bis Analysenergebnis) in einem vertretbaren Ausmaß bleibt und kleiner ist als bei Alternativmethoden (2-D-Gelanalyse, immunologische Nachweisverfahren).

Als Fazit von vielen für die Risikoabschätzung von GVP relevanten, in der wissenschaftlichen Literatur publizierten Untersuchungen wird festgehalten, dass die OMICS-Technologien, die auch in diesem Gutachten beschrieben werden, sowohl als robust (reproduzierbar und akkurat) als auch sensitiv genug für den jeweiligen Anwendungszweck bezeichnet werden können (siehe z. B. Kusano et al 2011; Houston et al. 2011). In Bezug auf Ansätze, die eine Quantifizierung der Komponenten erlauben, wird eine ausreichende Sensitivität auch von AutorInnen, die eine Anwendung von OMICS-Technologien sehr skeptisch sehen, unterstrichen (Doerrer et al. 2010). Eine weitere Steigerung der Sensitivität der Methoden für Zwecke der Risikoabschätzung von GVP wird nicht als notwendig, sondern eher sogar als nachteilig angesehen.

Zusätzlich sind diese Methoden für hohen Durchsatz ausgelegt, was die rasche Analyse vieler einzelner Komponenten ermöglicht. Tatsächlich kann mit geeigneten Untersuchungsdesigns der Abdeckungsgrad der untersuchten Molekülklassen sehr hoch liegen. So können z. B. Datensets erzeugt werden, die bis zu 60% des Gesamtproteoms abdecken (nach: Weckwerth 2011). Mit geeigneten Kombinationen von Techniken kann auch eine gute Abdeckung des relevanten Metabolitenspektrums bei Metabolomics-Studien er-

reicht werden (Kusano et al. 2011), wie der Vergleich mit dem Inventar einer verfügbaren Metaboliten-Datenbank (in diesem Fall: LycoCyc-Datenbank für Tomaten-Metaboliten) belegt.

4.2.4 Interpretation der Ergebnisse von OMICS-Untersuchungen

OMICS-Technologien stellen erhebliche Anforderungen an die Interpretation der Versuchsresultate, hervorgerufen durch die hohen Datenmengen, die bei breitangelegten Analysen generiert werden. Eine aktuelle Einschätzung besagt, dass für eine routinemäßige Verwendung von OMICS-Technologien weitere Fortschritte in Bezug auf die Interpretation der Messdaten wesentlicher sind als die Verbesserung der analytischen Techniken (Hall 2011).

Eine Expertise in multivarianter statistischer Analyse von komplexen und umfangreichen Datensätzen ist eine Grundvoraussetzung für die korrekte Auswertung der Ergebnisse, aber nicht zuletzt auch schon für die adäquate Versuchsplanung. Die verwendeten Software-Werkzeuge und die für die Datenanalyse eingesetzten Verfahren sind entscheidend für die Herausforderung, brauchbare und nachvollziehbare Aussagen von den riesigen Datenmengen ableiten zu können die z. B. mit Metabolomic-Experimenten erzeugt werden (Fiehn et al 2011; Redestig et al. 2011).

Die Gefahr bei der Anwendung von OMICS-Technologien ist, dass aus einer Vielzahl von Daten keine relevante Schlussfolgerungen im Hinblick auf die Risikoabschätzung von GVP gezogen werden können und der zusätzliche Aufwand zu nicht verwertbaren Ergebnissen führt (Doerrer et al. 2010).

Die Datenanalyse ist aber im Hinblick auf die Risikoabschätzung von GVP ein wesentliches Hilfsmittel, bestimmte typische Muster in den Daten erkennen zu können, die beispielsweise eindeutig mit einer erwarteten oder unbeabsichtigten Veränderung in GVP assoziiert sind. Wenn sich die Analyse auf quantifizierte Ergebnisse stützt und/oder die als relevant erkannten Komponenten identifiziert werden können, dann ist die Möglichkeit zur funktionalen Aufklärung der gefundenen Veränderungen gegeben. Beispiele dafür stellen die Anwendung zur Untersuchung der Effekte von posttranslationalen Protein-Modifikationen von Proteinen auf die dynamische Regulation von verschiedener physiologischer Zustände dar (Hoehenwarter et al. 2011), oder von Weckwerth vorgeschlagener Ansatz der auf der systematischen Zusammenführung von verfügbaren genomischen Information und Daten von OMICS-Untersuchungen, z. B. aus Metabolomics-Experimenten, basiert, um die funktionale Interpretation von genomischen Daten zu ermöglichen. Das Ziel dabei ist, die dynamischen Stoffwechselprozesse und die von den Stoffwechselvorgängen beeinflussten phänotypischen Eigenschaften einer Pflanze bestmöglichst beschreiben bzw. vorhersagen zu können (Weckwerth 2011a).

Für die Analyse können, wie bei Metabolomics-Ansätzen üblich, Daten aus verschiedenartigen Untersuchungsmethoden zusammengeführt werden. Üblich ist eine Kombination aus GC-MS und LC-MS-Methoden (vgl. z. B. Okazaki & Saito 2011, Kusano et al. 2011), um die Metabolitenzusammensetzung möglichst weitgehend und unverzerrt abzudecken.

Höhere Aussagekraft haben Experimente, die eine breit angelegte Analyse („discovery-Phase“) mit eingeschränkter Quantifizierungsmöglichkeit und Detailuntersuchungen („targeted-Phase“) zur genaueren Untersuchung bestimmter Komponenten oder Teile von komplexen Stoffwechselnetzwerken kombinieren (Weckwerth 2011a).

Die verschiedenen Verfahren der Datenanalyse repräsentieren unterschiedliche Interpretationsmöglichkeiten (vgl. Kusano et al. 2011):

- Ansätze, die einen Vergleich von OMICS-Daten von GVP mit der durch Umwelt- oder genotypische Einflüsse hervorgerufenen Variationsbreite erlauben. Diese Ansätze entsprechen einer im Umfang erweiterten vergleichenden Inhaltsanalyse, wie sie derzeit ohne Einbeziehung von OMICS-Technologien durchgeführt wird. Geeignete Baseline-Daten sind notwendig für den Vergleich.
- Daneben können mittels komplexer multivarianter Verfahren der statistischen Analyse (z. B. Principial Component Analysis, Independent Component Analysis) die hauptverantwortlichen Komponenten für die festgestellten Unterschiede identifiziert werden. Mittels solcher Auswertungsmethoden und dem Vergleich unter verschiedenen Umweltbedingungen können Veränderungsmuster identifiziert werden, die mit dem Vorhandensein von beabsichtigten transgenen Merkmalen im Zusammenhang stehen und mit unbeabsichtigten Veränderungen in GVP, die unabhängig vom primären transgenen Merkmal auftreten. Je nach Wissensstand über die Funktion der betroffenen Komponenten können damit Voraussagen in Bezug auf mögliche phenotypische Auswirkungen getroffen werden.
- Gezielte Anwendungen von OMICS-Technologien, z. B. zur Quantifizierung von Proteinen mit allergener Wirkung, stellen keine so hohen Ansprüche an die statistische Auswertung der Ergebnisse. Signifikante Veränderung bei einzelnen Komponenten sind aber auch hier nicht gleichzusetzen mit der Realisierung negativer Effekte, sondern bedürfen einer Abklärung hinsichtlich ihrer Relevanz, z. B. durch immunologische Tests.

Generell ist die Eignung von OMICS-Anwendungen für die Risikoabschätzung von GVP am besten gegeben, wenn ihre Ergebnisse eine klare Interpretation darüber zulassen, , ob eine bestimmte Veränderung der Zusammensetzung zu unerwünschten negativen Auswirkungen führen kann. Eine derartige Interpretation setzt aber ein gutes Wissen um die molekularen Zusammenhänge voraus, z. B. die gute Kenntnis der funktionellen Auswirkungen von (bestimmten) Zusammensetzungsänderungen. Eine solche spezifische

Interpretation ist im Rahmen der zielgerichteten Untersuchung einzelner ausgewählter Parameter leichter möglich, als bei der nicht-zielgerichteten Anwendung von OMICS-Anwendungen. Deswegen wird die rasche Anwendung von OMICS-Techniken in der Risikoabschätzung speziell für den erstgenannten Bereich vorgeschlagen (vgl. Heinemann et al. 2011).

Zu bedenken ist bei diesen Überlegungen allerdings, dass OMICS-Anwendungen oftmals gekoppelt mit spezifischen Tests eingesetzt werden können und dabei die Aussagekaft und Zielgenauigkeit der spezifischen Analysen erheblich steigern können. Ein Beispiel dafür stellt die Koppelung der Quantifizierung von Allergenen mittels Proteomics mit der Untersuchung des spezifischen Allergenität von identifizierten Kandidatenproteinen durch serologische Tests dar. Damit kann eine Abschätzung der unerwünschten Auswirkung der erhöhten Konzentration eines untersuchten Proteins durch die Bestimmung der allergenen Immunreaktion belegt werden.

Gleichfalls zu bedenken ist allerdings auch der Umstand, das verschiedene bei der Risikoabschätzung von GVP durchgeführte Untersuchungen, wie die Bestimmung einzelner inhaltsstofflicher Parameter im Zuge der vergleichenden Analyse, keine spezifische Aussagen im Hinblick auf eine bestimmte Funktionalität oder einen bestimmten negativen Effekt erlauben. Diese Ansätze haben den zusätzlichen Nachteil, dass sie wegen der geringen Analysentiefe keine weiteren Rückschlüsse auf die biologische Relevanz von signifikanten Konzentrationsveränderungen erlauben. OMICS-Anwendungen die (Teile von) Stoffwechselvorgänge(n) in ihrere Gesamtheit besser erfassen, können hier bessere Hinweise auf die Relevanz oder die Nicht-Relevanz von Analysedaten geben.

4.2.5 Standardisierung und Validierung

Eine gründliche Standardisierung und Validierung der OMICS-Technologien wird von Kritikern des raschen Einsatzes dieser Methoden als unbedingte Voraussetzung für die Aufnahme ins Repertoire der Methodik zur Risikoabschätzung von GVP gefordert (Doerrer 2010). Die notwendige Standardisierung von OMICS-Technologien wird als große Herausforderung bezüglich der Kosten und der Verfügbarkeit der Methodik für die Validierung gesehen. Metabolomics-Anwendungen werden in Bezug auf die mögliche Standardisierbarkeit besser beurteilt als andere OMICS-Technologien (Transcriptomics mittels Microarrays und Proteomics mittels 2-D Gelelektrophorese). Allerdings wird für eine Anwendbarkeit die Verfügbarkeit einer robusten und akkuraten Datenbank zur Quantifizierung der natürlichen Variationsbreite von Metaboliten (z. B. ILSI crop composition data base – Ridley et al. 2004 nach: Doerrer et al. 2010; Alba et al. 2010) vorausgesetzt. Diese Datenbank ist allerdings erst im Aufbau begriffen und eine zukünftige Anwendbarbeit ist davon abhängig, inwieweit Unternehmen, die GVP entwickeln, entsprechende Daten zur Verfügung stellen.

Da die verfügbaren Leitlinien nur sehr vage Aussagen in Bezug auf die mögliche Anwendung von OMICS-Technologien machen, kann diese Position eine Anwendung dieser Techniken für die Risikoabschätzung von GVP unterbinden. Sie wird mit der Fokussierung auf die ungerichtete, umfassende Quantifizierung von Inhaltsstoffen auch den verschiedenen möglichen Anwendungsbereichen (gerichtete versus ungerichtete Anwendung, Quantifizierung von Inhaltsstoffen versus qualitativer Hinweis auf unbeabsichtigte Veränderungen) nicht gerecht (vgl. Heinemann et al. 2011).

Doerrer und KollegInnen (2010) gehen außerdem davon aus, dass jede für die Zulassungsprüfung von biotechnologisch hergestellten Lebensmitteln (bzw. von GVP) eingesetzte Methode den formulierten Ansprüchen gerecht wird und hinsichtlich Genauigkeit und Reproduzierbarkeit validiert ist. Dieser Anspruch wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt bei weitem nicht eingelöst, vor allem nicht von Verfahren, die zur Untersuchung von anderen als toxikologischen Endpunkten dienen.

Die notwendige Diskussion über Standardisierung muss daher in einer weitaus differenzierteren Art geführt werden, um nicht möglicherweise brauchbare Methoden und Ansätze in einer wissenschaftlich nicht gerechtfertigten Weise von der Verwendung auszuschließen. Der Einsatz von OMICS-Technologien, um Hinweise auf das Auftreten von unbeabsichtigten Veränderungen zu gewinnen, braucht als Voraussetzung keine mit standardisierten Methoden erstellte, umfassende Datenbank. Wesentlich für diese Anwendungen sind die problemadäquate Planung, Durchführung und Interpretation der Experimente (Hoekenga 2008).

Wesentlich ist auch die ausreichende Transparenz bezüglich der Durchführung der Experimente - zur Sicherstellung ihrer Nachvollziehbarkeit und als Anhaltspunkt beim angestrebten Vergleich von Daten aus verschiedenen Laboratorien. „Minimale Dokumentationsstandards“ („minimum reporting standards“) wurden bereits für alle in diesem Gutachten behandelten OMICS-Teilbereiche erarbeitet und publiziert: MIAME- und MIAPE-Standards für Microarray-Experimente und Proteomics-Anwendungen (siehe weiterführende Referenzen in: Hoekenga 2008), sowie „Minimum reporting standards“ für Metabolomics-Anwendungen in der Pflanzenforschung (Fiehn et al. 2007). Es ist vorgesehen, dass sich Datenbanken, die Ergebnisse von OMICS-Untersuchungen enthalten, an diesen Standards orientieren, sowie Erfordernisse der Qualitätssicherung berücksichtigen (Fiehn et al. 2008).

Für *Arabidopsis* wurde vor kurzem eine Internetplattform zur Vernetzung der Ressourcen und zur Darstellung von Ergebnissen aus Proteomics-Studien eingerichtet: MASCP Gator[21] (Joshi et al. 2011).

[21] verfügbar unter: **http://gator.masc-proteomics.org/**

Ein nachvollziehbares Vorgehen, vor allem auch hinsichtlich der Probennahme, ist für alle diskutierten OMICS-Technologien notwendig. Wesentlich ist dies aber besonders dann, wenn das analysierte System großen Schwankungen in Abhängigkeit von unterschiedlichen (Umwelt-) Bedingungen unterworfen ist, bzw. die zu analysierenden Komponenten nicht stabil sind. Der pflanzliche Metabolismus ist ein gutes Beispiel für ein derartiges, rasch fluktuierendes System, das besondere Anforderungen an die Durchführung und Dokumentation der Probennahme und -bearbeitung stellt, wie eine Untersuchung von *Arabidopsis*-Pflanzen unter verschiedenen Umweltbedingungen belegt (Morgenthal et al. 2006).

Darüber hinaus wurden einige Vergleichsuntersuchungen mit mehreren teilnehmenden Labors zur Evaluierung der technischen und anwenderspezifischen Variation bei verschiedenen für Metabolomics relevanten Methoden durchgeführt (Übersicht in: Hall 2011). Die Ergebnisse dieser Tests werden als vielversprechend im Hinblick auf zukünftigen Datenaustausch und –vergleich zwischen verschiedenen Laboratorien eingeschätzt (Hall 2011).

Validierung ist dann unabdingbar, wenn Ergebnisse von OMICS-Technologien als Indikatoren für potenzielle Effekte, d. h. als Endpunkte bei der Risikoabschätzung dienen sollen (z. B. Öko-Toxicogenomics bei aquatischen Nicht-Modell-Organismen, siehe auch Kap. 3.5) und nicht nur als zusätzliche Methoden mit dem Ziel, Anhaltspunkte für die weitere gezielte Untersuchung von möglichen unbeabsichtigten Effekten auszumachen.

4.2.6 Vergleich von OMICS-Technologien mit aktuell bei der Risikoabschätzung von GVP angewendeten Methoden

Für eine Evaluierung der Eignung von OMICS-Technologien für die Risikoabschätzung von GVP ist es auch notwendig die Vorbehalte gegen den Einsatz von OMICS-Anwendungen mit den diesbezuglichen Eigenschaften der aktuell bei der Risikoabschätzung von GVP verwendeten Methoden zu vergleichen. Dabei ist festzustellen, dass bei vielen Methoden, die derzeit im Rahmen der molekularen Charakterisierung routinemäßig angewendet werden, Schwachstellen im Hinblick auf standardisierte Durchführung, Sensitivität und Robustheit, sowie der Aussagekraft für die Risikoabschätzung bestehen. Beispiele für solche Schwächen sind im Folgenden aufgeführt.

So wird z. B. bei molekularbiologischen Nachweisverfahren, wie dem Southern Blot zum Nachweis von integrierten transgenen DNA-Sequenzen oder bei immunologischen Nachweisverfahren von Proteinen die systematische Untersuchung der Sensitivität und die Dokumentation der Methode nicht in vergleichbarer Weise wie bei OMICS-Technologien als Anwendungskriterium gefordert bzw. nachgewiesen. In vielen Fällen fehlen wesentliche Informationen, um die Sensitivität der verwendeten Methoden beispielsweise zum Nach-

weis von partiellen oder rearrangierten Zielsequenzen, beurteilen zu können (vgl. Heinemann et al. 2011).

Eine systematische Untersuchung der Sensitivität der Detektion von Zielproteinen in GVP durch Antikörper, die gegen z. B. in Bakterien produzierte, transgene Proteine erzeugt wurden, wird zumeist nicht durchgeführt. Ebenso wenig wird in vielen Fällen die Sensitivität der Detektion von posttranslational modifizierten Komponenten genau charakterisiert.

Bei der Untersuchung von einzelnen Inhaltsstoffen im Rahmen der vergleichenden Analyse kommen zumeist Methoden zum Einsatz, die hinsichtlich Robustheit und Sensitivität gut geeignet sind. Für viele der Parameter sind allerdings keine Wirkungshypothesen vorhanden, welche Änderung eine schädliche Auswirkung hat. Es wird bei der Risikoabschätzung angenommen, dass Schwankungen innerhalb von Refenzbereichen keine biologische Relevanz besitzen, ohne dass dies im Einzelfall genau belegt ist. Insgesamt ist auch die Anzahl der untersuchten Einzelsubstanzen zu gering, um umfassend die Frage beantworten zu können, ob und welche unbeabsichtigten Änderungen stattgefunden haben. Weiterhin fehlen konkrete Hinweise, ob die einzelnen untersuchten Parameter eine Indikatorfunktion für Veränderungen mit Umweltrelevanz besitzen.

Im Rahmen der vergleichenden Untersuchung von GVP werden darüber hinaus teils nur Summenanalyten, wie Gesamtprotein, -fett, -kohlehydrat, ADF, NDF, Asche bestimmt. Diese Summenanalyten geben nicht darüber Aufschluss, welche unbeabsichtigten Änderungen bei einzelnen Inhaltsstoffen innerhalb der untersuchten Klasse stattgefunden haben. Summenanalyten erlauben auch keine spezifische Aussage hinsichtlich der biologischen Relevanz von Änderungen in der stofflichen Zusammensetzung unter dem Einfluss von verschiedenen Umweltbedingungen. Eine Relevanz wird nur dann vermutet, wenn die Änderungen in der Summe signifikant groß sind und konsistent unter einer Reihe von Testbedingungen auftreten. Wie die eingangs zitierte Arbeit von Zeller und KollegInnen (2010) belegt, kann nicht angenommen werden, dass alle relevanten unbeabsichtigten Effekte, die in GVP auftreten können, diesem Schema gehorchen. Eine spezifischere Analyse mittels OMICS-Technologien, die Einzelkomponenten solcher Summenfaktoren und ihr Verhalten unter verschiedenen Umweltbedingungen genauer beschreiben kann, wäre dem gegenwärtigen Ansatz in Bezug auf ihre Aussagekraft überlegen.

Von der zuständigen Arbeitsgruppe der OECD wird gegenwärtig im Rahmen der laufenden Überarbeitung von OECD-Konsensus-Dokumenten zu Eigenschaften von einzelnen Kulturpflanzen, wie Sojabohnen, diskutiert, ob das das Spektrum der bei der Risikoabschätzung zu untersuchenden Substanzen erweitert werden soll: konkret wird diskutiert, alle Komponenten zu untersuchen, deren allergenes Potenzial bekannt ist und bei denen daher eine eindeutige Risikohypothese gegeben ist. Die Quantifizierung von solchen, in Sojasamen enthaltenen Proteinen kann mittels verfügbarer Proteomics-Methoden erfolgen (z. B. Houston et al. 2011). Sie wäre also ein Anwendungsbeispiel für die unterstützende

Integration von OMICS-Technologien im Rahmen eines zielgerichteten Untersuchungsansatzes.

4.2.7 Überlegungen für die konkrete Anwendung von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung von GVP

4.2.7.1 Erfahrungen mit der Untersuchung von GVP mittels OMICS-Technologien im Rahmen von wissenschaftlichen Studien

In einer Reihe von Fällen wurden bereits OMICS-Technologien zur Charakterisierung von GVP im Vergleich mit Nicht-GV-Pflanzen verwendet. Diese Beispiele können zur Evaluierung der Möglichkeiten einer Anwendung im Rahmen der Risikoabschätzung von GVP herangezogen werden.

Eine aktuelle Übersicht findet sich z. B. bei Ricroch et al. (2011), die 44 Studien beschreiben, die GVP mit oder ohne beabsichtigte Modifikationen in endogenen Stoffwechselwegen untersuchen. Neben Studien über *Arabidopsis* als wesentlichem Modellorganismus werden Untersuchungen bei Mais, Gerste, Erbse, Reis, Sojabohne, Weizen, Kohl, Wein sowie Kartoffeln und Tomaten beschrieben. In den verschiedenen Studien wurden häufig einzelne OMICS-Technologien oder seltener eine Kombination mehrerer OMICS-Technologien angewendet.

In Bezug auf die Evaluierung der Studienergebnisse wird festgehalten, dass viele AutorInnen die breite Abdeckung verschiedener Komponenten bei der Analyse als klaren Vorteil der OMICS-Technologien ansahen. Allerdings wurden zumeist nur einzelne OMICS-Technologien verwendet, deshalb kann über ein Zusammenspiel der Techniken bei der Untersuchung von GVP derzeit noch nicht viel ausgesagt werden (Ricroch et al. 2011). Obwohl die Analysen „ungerichtet“ erfolgten, wird festgehalten, dass sehr wohl ein sogenannter technischer Fehler festzustellen war, d. h. eine Beeinflussung des Ergebnisses durch Einschränkungen bei der technischen Analytik und Auswertung. Ricroch et al. (2011) merken die fehlende Übereinstimmung in methodischen Ansätzen und Vorgangsweisen kritisch an. Auch die Art der Auswahl bestimmter OMICS-Technologien für die jeweilige Untersuchung wird von ihnen als nicht konsistent bezeichnet. Generell wurden inhaltsstofflich veränderte GVP häufiger mittels Metabolomics-Studien untersucht als andere GVPs. Für die Evaluierung der Allergenität wurden vornehmlich Proteomics-Methoden (2-D-Gelelektrophorese und MS-basierte Methoden) angewendet und diese Untersuchungen teils mit immunologischen Tests kombiniert.

Die StudienautorInnen merken an, dass für eine umfassende Evaluierung noch die Erfahrung fehlt: grundsätzlich betonen sie, dass die stärksten Variationen bei vielen Studien beim Vergleich mit Referenzlinien mit unterschiedlichem genetischen Background auf-

traten, bzw. durch Umwelteinfüsse ausgelöst wurden. Hingewiesen wird auf auf zum Teil widersprüchliche Ergebnisse z. B. bei Studien, die ähnliche Maislinien untersuchen (Coll et al. 2010; Zolla 2008).

Während in etlichen Studien Unterschiede zwischen GVP und Kontroll-Linie gefunden wurden, die mit den primären transgenen Merkmalen der untersuchten GVP verknüpft waren, traten bei anderen Untersuchungen Unterschiede zutage, die nicht mit dem beabsichtigten gentechnisch erzeugten Merkmal der betreffenden GVP korreliert waren. Z. B. beschreibt eine kürzlich erschienene Studie von Kusano et al. (2011) derartige Änderungen, die auf unbeabsichtigte Effekte der gentechnischen Modifikation zurückgeführt werden.

Unterschiede, die bei den Untersuchungen mittels OMICS-Technologien auftraten, sollten nach Ricroch und KollegInnen (2011) unter Einbeziehung konventioneller Testverfahren weiter analysiert werden. Wesentlich ist jedenfalls die gute Abklärung der spezifischen Aussagekraft von konkreten OMICS-Ansätzen, die eine genaue Evaluierung der derzeit in der angewandten Forschung gemachten Erfahrungen voraussetzt (siehe dazu z. B. Weckwerth 2011b). Die Diskrepanz zwischen einzelnen OMICS-Ergebnissen und parallel festgestellten phenotypischen Effekten belegt die Notwendigkeit, dass molekulare Methoden im Rahmen der Risikoabschätzung von GVP mit anderen Untersuchungsansätzen kombiniert werden, wenn die Indikatoreignung von bestimmten OMICS-Daten nicht schlüssig belegt ist.

4.2.7.2 Möglicher Einsatz von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung von GVP

Der rasche, routinemäßige Einsatz von OMICS-Technologien für die Risikoabschätzung wird derzeit noch von ExpertInnen und seitens der Antragsteller für GVP-Zulassungen sehr kritisch eingeschätzt (Chassy 2010). Ein Teil dieser Kritik beruht auf der Einschätzung, dass der ungezielte Einsatz von OMICS-Methoden für den Nachweis der substanziellen Äquivalenz von GVP nicht grundsätzlich besser geeignet ist als die Anwendung von klassischen Verfahren. Eine solche Einschätzung läßt allerdings außer Betracht dass das Ziel der vergleichenden Untersuchung von GVP und nicht-modifizierten, genetisch eng verwandten Vergleichslinien nicht darin besteht, um substanzielle Äquivalenz als einen eigenen Endpunkt der Risikoabschätzung nachzuweisen, sondern dass solche Untersuchungen möglicherweise vorhandene Risikopotenziale für die weitere Abklärung identifizieren sollen (z. B. EFSA 2004, 2011). Der Ansatz eines möglichst breit angelegten, aber notwendigerweise unvollständigen mengenmäßigen Vergleichs vieler, teils unidentifizierter Einzelsubstanzen zwischen verschiedenen Pflanzenlinien, wie er in vielen Studien präsentiert wird (z. B. Catchpole et al. 2005, siehe auch vorangehendes Kap.

4.2.7.1), greift damit zu kurz. Das belegt auch der von Hommel (2010) dokumentierte Umstand, dass das Metaboliten-Profil einer inhaltsstofflich modifizierten Kartoffel-Linie nur geringfügige Änderungen zeigte (Catchpole et al. 2005), während im Feldtest allerdings signifikante Veränderungen in phänotypischen Nicht-Ziel-Merkmalen nachgewiesen werden konnten (Roppel 2007).

Um das Potenzial von OMICS-Technologien besser einschätzen zu können und Empfehlungen über den zukünftigen Einsatz in der Risikoabschätzung geben zu können, müssen die Ziele der Risikoabschätzung fallspezifisch berücksichtigt werden. (vgl. Heinemann et al. 2011). Je nach Problemstellung könnten OMICS-Technologien dann in jeweils geeigneter Weise eingesetzt werden, z. B. als umfassende Analyse in Bezug auf molekulare Hinweise auf unbeabsichtigte Veränderungen, als Voranalyse zur Auswahl von Komponenten, die genauer auf mögliche negative Wirkungen untersucht werden sollen, oder eine zielgerichtete Anwendung, wie zur Analyse von definierten Gruppen (strukturell verwandter) Einzelmolekülen (z. B Lipide, posttranslational modifizierter Proteine) bzw. von Verbindungen aus relevanten Stoffwechselwegen.

Während der Einsatz von OMICS-Technologien zum Nachweis von unbeabsichtigten molekularen Veränderungen für die praktische Umsetzung noch erhebliche Anstrengungen erfordern wird, finden sich auch Beispiele für Anwendungen mit einem kurzfristigeren Potenzial zur praktischen Umsetzung:

<u>Einsatz von Transcriptomics zum Nachweis der erwarteten und unerwarteten Expression von (transgenen) Sequenzen in GVP:</u>
Während die beabsichtigte Expression von Transgenen in der derzeit durchgeführten Risikoabschätzung ermittelt wird, werden im Regelfall die Auswirkungen der gentechnischen Modifikation auf die Transkription von neugebildeten Hybridgenen (d. h. durch die Insertion von transgenen Sequenzen gebildeten „neuen“ offenen Leserahmen, sogenannte „fusion proteins“) nicht empirisch untersucht. Nur in wenigen Fällen wurde die Transkription von bestimmten „fusion proteins“ mittels Einzelnachweis (Northern Blot) bestimmt.
Mittels der Transkriptomics-Anwendung RNA-Seq kann in einem Experiment die Quantifizierung einer großen Menge an Transkripten gleichzeitig erfolgen, wobei zusätzlich spezifische Sequenzdaten ermittelt werden. Dadurch können in GVP neben den erwartbaren auch unerwartete Transkripte identifiziert werden, was mit konventionellen Analysetechniken nicht ohne Weiteres möglich ist. Ziel dieses Ansatzes ist einerseits die Analyse, inwieweit die gentechnische Modifikation die globale Transkriptionssteuerung in GVP beeinflusst und andererseits der Nachweis, welche möglicherweise unerwünschten Transkripte (z. B. Hybridtranskripte, Transkripte, die durch alternatives Splicing entstehen) in einem bestimmten GVP tatsächlich gebildet werden (siehe van Dijk et al 2010). Solche Daten wären gut geeignet, die durch bioinformatische Methoden gemachten Voraussagen über die Expression von „fusion proteins“ empirisch zu stützen.

Auch gezielt eingesetzte Proteomics-Anwendungen, wie der von Weckwerth (2011c) beschriebene „Mass Western"-Ansatz erlauben den Nachweis der unbeabsichtigten Expression von ausgewählten Proteinen in GVPs, welcher nicht mit dem hohen Aufwand klassischer, antikörperbasierter Untersuchungen verbunden ist.
Unter der Voraussetzung, dass eine Verpflichtung besteht, empirische Expressionsdaten für die oben genannten Fragestellungen bei der Antragstellung vorzulegen, ist eine kurzfristige technische Umsetzung möglich.

Einsatz von OMICS-Technologien als Vorscreening zur Identifikation von ausgewählten Metaboliten, die für die Risikoabschätzung von bestimmten Kulturarten x Transgen-Kombinationen relevant sind:
Als geeignete Indikatoren für Veränderungen im Proteom oder Metabolom, deren Auswirkungen im Rahmen der Risikoabschätzung weiter untersucht werden sollen, werden üblicherweise auf Basis des bestehenden Wissens für bestimmte Kulturarten definiert. Üblicherweise werden Standardsets von wenigen spezifischen Einzel- bzw Summenparameter angewendet, die z. B. in den relevanten OECD-Konsensus-Dokumenten vorgeschlagen werden[22]. Die Anwendung verschiedener OMICS-Technologien kann dem gegenüber dazu benutzt werden, fallspezifisch geeignete Indikatoren in Voruntersuchungen zu identifizieren, basierend auf einem Vergleich zwischen GVP und Kontroll-Linie, die unter relevanten Umweltbedingungen kultiviert werden. .
Beispiele dafür wären, wie von Okazaki und Saito (2011) erwähnt, durch OMICS-Methoden identifizierbare Biomarker im Hinblick auf Krankheits- und Schädlingsanfälligkeit (für Beispiele siehe: Allwood et all. 2008). Ein anderes Beispiel ist die Nutzung von OMICS-Daten betreffend der vermehrten Bildung von Vorläufersubstanzen als Hinweis auf die weiterführende Untersuchung der Bildung bestimmter Glukoalkaloide in einer gentechnisch modifizierten Kartoffellinie (Catchpole et al. 2005). In einem anderen von Hirai (2009) beschriebenen Beispiel für eine solche Vorgangsweise wurde Transcriptomics (im speziellen Fall durch Verwendung von DNA-Microarrays) zur Identifikation von gleichartig regulierten Genen benutzt. Die Auswirkung der verstärkten Expression dieser koexprimierten Gene kann dann gezielt weiter untersucht werden.
Es können für solche Anwendungen unterschiedliche Methoden verwendet werden, sie müssen allerdings eine geeignete Abdeckung des in Frage kommenden Zellinventars aufweisen und zur Identifikation der Kandidatensubstanzen geeignet sein.
Die Umsetzung solcher Ansätze kann mit methodenspezifischem Weiterentwicklungsbedarf verbunden sein und sie würde eine Verpflichtung an den Antragsteller erfordern, dass die Untersuchungsparameter fallspezifisch ausgewählt werden müssen.

[22] zu finden unter: http://www.oecd.org/document/39/0,3746,en_2649_34385_46805223_1_1_1_1,00.html

Einsatz von OMICS-Techniken zur Untersuchung ausgewählter Substanzgruppen:
Eine Anwendung für die OMICS-Techniken gut geeignet sind ist die gleichzeitige Analyse von Gruppen von Inhaltsstoffen. Hypothesengelenkt könnten Proteomics- bzw. Metabolomics-Anwendungen einerseits zur Untersuchung von relevanten Substanzgruppen in GVP mit einer beabsichtigten Änderung in ihrer stofflichen Zusammensetzung genutzt werden. Solche Untersuchungen könnten andererseits auch für die Risikoabschätzung wertvoll sein, zur weiteren Abklärung von signifikanten Veränderungen bei einzelnen Parametern der vergleichenden Untersuchung. Üblicherweise werden solche signifikanten Änderungen nicht weiter untersucht, wenn sie nicht systematisch über Teststandorte und –zeitpunkte hinweg auftreten. Auf den/die auffälligen Parameter/n fokussierte OMICS-Untersuchungen könnten gerade bei Summenparametern wie Aminosäuregehalte, bzw. Fettsäuregehalte als Mittel für Nachuntersuchungen herangezogen werden. Damit könnte die Frage, ob die signifikanten Änderungen biologisch relevant sind, besser als derzeit beantwortet werden. In vielen Fällen bestehen schon experimentell gut entwickelte Anwendungen für einen raschen Einsatz solcher Anwendungen, es fehlt jedoch die Vorgabe solche Untersuchungen durchzuführen.
Ein weiteres Beispiel für derartige Ansätze ist der Einsatz von Transkriptomics-Methoden zur Untersuchung des Vorkommens von (funktionellen) RNAs (z. B. RNAi, miRNA, …) in GVP. Vor dem Hintergrund des verfügbaren Wissens um die eminente Bedeutung von funktionalen RNAs für die Steuerung von Entwicklungs- und stoffwechselprozessen sollte diesem Punkt eine größere Aufmerksamkeit gewidmet werden und die Risikoabschätzung nicht nur auf Proteine sowie andere Stoffwechselprodukte beschränkt werden.
Ein Beispiel für eine weitere konkrete Anwendung - die Verwendung von OMICS-Technologien bei der Risikoabschätzung des allergenen Potenzials von GVP - soll im folgenden Kapitel ausführlicher behandelt werden.

4.2.7.3 Einsatz von OMICS-Technologien bei der Risikoabschätzung des allergenen Potenzials von GVP

Im Rahmen der Risikoabschätzung von GVP soll untersucht werden, ob es durch die gentechnische Modifikation zu einer Beeinflussung der Expression von allergenen Proteinen in der modifizierten Pflanze kommt (Davies 2005). Dabei sollen sowohl qualitative als auch quantitative Änderungen im Allergenprofil erfasst werden. In diesem Rahmen muss einerseits die mögliche allergene Wirkung von bestimmten Transgenen untersucht werden, z. B. ob transgene Saatspeicherproteine ein allergenes Potenzial haben bzw. nach Expression in GVP aufgrund veränderter Modifizierung im Zielorganismus, z. B. durch veränderte Glykosilierung ein solches Potenzial entwickeln könnten (vgl. Prescott et al. 2005). Ebenso relevant für die Risikoabschätzung ist die unbeabsichtigte Steigerung der Expression von Allergenen oder ihrer Isoformen, die natürlicherweise in der veränderten

Pflanzenart vorkommen, bzw. mengenmäßige Veränderungen bei den Isoformen derartiger Allergene (EFSA 2010). Derartige Änderungen konnten durch Proteomics-Analysen nachgewiesen werden (z. B. Lehesranta et al. 2005, Chen et al. 2009).

Eine Schwierigkeit für die Risikoabschätzung bei GVP liegt darin, dass die Zusammensetzung von Allergenen auch natürlicherweise schwanken kann bedingt durch unterschiedliche genetische Hintergründe und Unterschiede in den Umweltbedingungen, denen die betreffenden Pflanzen ausgesetzt sind (Natarajan et al. 2009; Barros et al. 2010).

Wesentlich für die Risikoabschätzung möglicher allergener Wirkungen ist, dass üblicherweise nur eine geringe Zahl von Proteinen, die in einer Pflanzenart vorkommen, ein relevantes allergenes Potenzial aufweist (EFSA 2010). Allerdings werden im Rahmen der derzeit durchgeführten Risikoabschätzung diese Allergene nicht systematisch untersucht. Eine auf Allergene fokussierte Profilerstellung durch Proteomics, die den derzeitigen Untersuchungsumfang erweitert, kann daher eine Verbesserung der Aussagekraft der Risikoabschätzung zur Folge haben. Es handelt sich dabei aber um eine spezifische Anwendung von OMICS-Technologien, die sich im Ansatz wesentlich von einer umfassenden, nicht auf bestimmte Proteine fokussierten Analyse des Gesamtproteoms unterscheidet. Der Einsatz von Proteomics-Methoden zur Charakterisierung des allergenen Potenzials muss daher auch spezifisch bewertet werden.

Die EFSA berücksichtigt in ihrer Diskussion der relevanten Analysemethoden zum Nachweis von Allergenen in GVP mehrere verschiedene Ansätze (EFSA 2010):

- Nachweis einzelner Allergene durch immunologische Tests:
  Immunologischer Nachweis von Allergenen mittels ELISA oder Immunoblots (Western Blot bzw. 2-D Immunoblots) unter Verwendung von Seren, die eine Reihe wichtiger Allergene detektieren.
- Proteinanalyse mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese und verschiedenen Detektionsverfahren:
  Vergleichende Analyse verschiedener Proben (z. B. GVP und nicht-GVP) mittels DIGE (siehe Kap. 2.2.1.1) oder Nachweis einzelner Proteine durch nachgeschaltete massenspektrometrische Detektion.
- Proteomics (Protein-Profiling) mittels gelfreier Trennung und nachgeschalteter massenspektrometrischer Detektion:
  Für die Auftrennung der Proteinproben, in denen Allergene nachgewiesen werden sollen, werden Flüssigchromatographie, Kapillarelektrophorese, differenzielle Protein-Arrays, sowie Immunanreicherung bestimmter Allergene berücksichtigt. Für die Detektion wird hauptsächlich der nachgeschaltete Einsatz von Massenspektrometrie in Betracht gezogen, der auch in gekoppelter Form durchführbar ist und sowohl einen quantitativen Nachweis als auch bei bestimmten Systemen eine Identifikation von Allergenen anhand von Sequenzdaten erlaubt.

In seinen Schlussfolgerungen unterstreicht das EFSA-Leitliniendokument einerseits den Wert von immunologischen Nachweismethoden von Allergenen wegen ihrer klinischen Relevanz. Es wird allerdings auf die bekannten Einschränkungen dieser Methoden verwiesen, die relevant in Bezug auf die Risikoabschätzung bei GVP sind: Immunologische Verfahren hängen von der Verfügbarkeit und Vergleichbarkeit klinischer, humaner Seren ab. Außerdem können Inhibierungseffekte in Abhängigkeit von der Serumkonzentration den Nachweis stören. Sensible Immuntests wie z. B. ELISA, sind meist selektiv für bestimmte Allergene und nicht gut geeignet, um Allergen-Isoformen zu detektieren. 2-D-Immunoblots können Allergene, die nur in geringen Mengen enthalten sind, schlecht nachweisen und haben im Vergleich mit anderen immunologischen Methoden, wie ELISA-Tests, einen hohen Serumverbrauch; sie sind also für den Routineeinsatz wenig geeignet.

Andererseits verweist das Leitliniendokument auf das hohe Potenzial von Proteomics-Methoden als in vitro-Ansatz, der nicht den genannten Einschränkungen von immunologischen Methoden unterliegt. Allerdings sind die meisten Proteomics-Methoden nicht allergenspezifisch. Bei der 2-dimensionalen Gelelektrophorese sind außerdem nicht alle Proteine uneingeschränkt darstellbar; sie ist zudem zeitaufwändig und schlecht reproduzierbar. Der nachgeschaltete, einzelne Nachweis von Proteinen durch MS ist arbeitsaufwändig, in der Regel nicht quantitativ und nicht für hohen Probendurchsatz geeignet.

Nicht-gelbasierte Methoden unterliegen, wie im Weiteren ausgeführt wird, nicht den eben angeführten Beschränkungen. Sie sind allerdings beim Nachweis von einzelnen Proteinen auf die Verfügbarkeit von Sequenzinformationen angewiesen, die im Dokument als nicht hinreichend bezeichnet wird.

Die Entwicklung und Anwendung geeigneter Proteomics-Ansätze zur Untersuchung von Allergenen im Pflanzenmaterial ist in der jüngeren Literatur ausführlich beschrieben (Thelen et al. 2009). Beispielsweise wurden derartige Methoden erfolgreich eingesetzt, um Schwankungen in der Allergen-Zusammensetzung von Pollenmaterial verschiedener Herkunft zu untersuchen (Erler et al. 2011). Dabei kamen sowohl gelbasierte ein- und 2-dimensionale Trennverfahren zum Einsatz, als auch immunologische bzw. MS-basierte Detektionsverfahren. Obwohl die Zielsetzung auf den Nachweis von Unterschieden in der Zusammensetzung von Pollenextrakten ausgerichtet war, die für die Verwendung in der humanen Immuntherapie vorgesehen sind, kann der Ansatz als relevantes Beispiel für die Allergencharakterisierung bei der Risikoabschätzung bei GVP gesehen werden. Besonders relevant sind auch Arbeiten zur Charakterisierung und Quantifizierung von allen wichtigen Allergenen in nicht-gentechnisch veränderten Pflanzen, z. B. verschiedenen Sojalinien (Houston et al. 2011) und der Untersuchung von Allergenen in Mehl und Backprodukten, die eine Vielzahl von Lebensmittelallergenen enthalten (Heick et al. 2011). Diese Arbeiten liefern wesentliche Grundlagen für eine Anwendung nicht-gelbasierter

Proteomics-Ansätze zur Allergencharakterisierung in GVP. Sie belegen, dass diese Methoden eine verlässliche Quantifizierung der Ziel-Allergene erlauben (Stevenson et al. 2009, Houston et al. 2011) und bei Vorliegen einer komplexen Probenmatrix höhere Sensitivitäten erreichen als ELISA-basierte Nachweissysteme (Heick et al. 2011). Diese Untersuchungen zeigen aber auch die Wichtigkeit von geeigneten Methoden zur Probenvorbereitung auf, um die technische Variation der Analysekette möglichst gering zu halten: Solcherart optimierte Methoden erlauben im Vergleich zu alternativen Ansätzen eine Analyse von vielen Allergenen, die alle in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten sind, mit hoher Sensitivität. Zudem verbinden sie die Vorteile von verringerten Kosten, hoher Reproduzierbarkeit, sind einfacher als andere Methoden durchzuführen und geeignet für einen hohen Probendurchsatz (Lee et al. 2010).

Proteomics-Methoden könnten in der Risikoabschätzung bei GVP eingesetzt werden, um in Kombination mit anderen Ansätze eine bessere Aussagekraft der Ergebnisse zu ermöglichen: Z. B. als Methodik zum umfassenderen Nachweis der enthaltenen Allergene (Art, Isoformen, Modifizierung) sowie ihrer Mengen bei der vergleichenden Inhaltsstoffanalyse. Diese Ergebnisse wären ein guter Ausgangspunkt, um zielgerichteter als bisher eine funktionelle Untersuchung des Allergenpotenzials mit immunologischen Methoden zu ermöglichen.

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN:

Auf Basis der im vorliegenden Gutachten durchgeführten Analyse der aktuellen Methodik von OMICS-Technologien und der Möglichkeiten und Voraussetzungen ihres Einsatzes in der Risikoabschätzung von GVP lassen sich Schlussfolgerungen hinsichtlich der folgenden drei Bereiche ableiten:

- Methodische Aspekte, die wesentlich sind für einen zukünftigen Einsatz in der Risikoabschätzung von GVP.
- Überlegungen hinsichtlich der Einsatzgebiete sowie des Forschungsbedarfs für eine mögliche Anwendung von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung von GVP.
- (Weiter-) Entwicklung von Leitlinien für die Risikoabschätzung, die eine praktikable Anwendung bestmöglich unterstützen.

5.1 Methodische Aspekte für einen Einsatz in der Risikoabschätzung von GVP

Wie in der Literatur breit dokumentiert ist, existieren bereits leistungsfähige OMICS-Systeme zur Untersuchung von relevanten Fragestellungen in der (ökologischen) Forschung und für Anwendungen in angewandter Forschung, speziell auch in der Pflanzenzucht. Aktuell sind Systeme in Entwicklung, die ein weiteres wesentliches Potenzial für Leistungssteigerung aufweisen, insbesondere im Hinblick auf gesteigerten Probendurchsatz und Genauigkeit/Umfang der Analysen. Für viele Anwendungen bedeuten Weiterentwicklungen auch geringere Kosten und einen verringerter Zeitaufwand im Vergleich zu älteren OMICS-Technologien, bzw. verglichen mit alternativen Untersuchungsansätzen.

Die Verfügbarkeit von OMICS-Technologien ist nicht mehr beschränkt auf AnwenderInnen, die auf das OMICS-Gebiet spezialisiert sind. Entsprechende Analysen werden von ServicedienstleisterInnen angeboten und sind damit auch für Problemstellungen, die einen kurzzeitigen, auf konkret umrissene Fragestellungen der Risikoabschätzung von GVP gerichteten Einsatz erfordern, verfügbar. Die Kosten moderner, leistungsfähiger Ansätze sind zudem nicht prohibitiv für eine Anwendung, verglichen mit den Kosten von verfügbaren Alternativmethoden.

In Bezug auf die einzelnen OMICS-Technologien kann Folgendes ausgesagt werden:

- Die breitere Verfügbarkeit moderner Methoden des Next Generation Sequencing (NGS) führt auch in angewandten Feldern der Pflanzenforschung zu einer vermehrten Anwendung der NGS-Sequenzanalyse auf DNA-Ebene. Das kann eine breitere Anwendung der DNA-Sequenzierung im Bereich der Risikoabschätzung von GVP über den derzeit praktizierten Rahmen hinaus unterstützen. Die in der Risikoabschätzung von GVP derzeit vorgelegten Sequenzdaten beziehen sich

hauptsächlich auf transgene Inserts die für die beabsichtigten Funktionen relevant sind sowie die unmittelbar angrenzenden genomischen Bereiche. Damit wird das derzeitige Potenzial von Sequenzdaten für die Analyse von unbeabsichtigten Veränderungen aber bei weitem nicht ausgeschöpft. Im Rahmen von Transkriptomics-Anwendungen kann NGS in Form des RNA-Seq eine geeignete Alternative zu älteren Verfahren bieten, z. B. zur Benutzung von spezifischen Microarrays. Mittels RNA-Seq können auch sehr schwach exprimierte Transkripte nachgewiesen und wie im Kapitel 4.2.6.2 beschrieben auch gleichzeitig spezifische Sequenzdaten ermittelt werden. Die Kosten hängen dabei von der gewünschten Sensitivität ab.

- Für Proteomics-Analysen wurden bis vor kurzem hauptsächlich Methoden eingesetzt, die auf der 2-dimensionalen Gelelektrophorese beruhen. Auch Untersuchungen bei GVP haben solche Ansätze bereits benutzt (Zolla et al. 2008; Chen et al. 2009, für Übersicht siehe Ricroch et al. 2011). Daneben wurden über die letzten Jahre alternative Verfahren entwickelt, die auf MS-Methoden basieren. Diese Methoden erlauben einen erheblich größeren Analyseumfang (10fach gößere analysierbare Proteinanzahl), sowie ermöglichen bessere Automatisierbarkeit und höheren Probendurchsatz. Solche gelfreien Verfahren sind auch für die gezielte Analyse bestimmter Peptide/Proteine gut geeignet, z. B. zum Nachweis und zur Quantifizierung von Allergenen.
- Bei Metabolomics-Analysen sind die Herausforderungen schwieriger zu lösen, insbesondere ist die Probenvorbereitung aufwändiger und die verschiedenen Arten von Metaboliten können nicht mit einer einzelnen Methode analysiert werden. Zur Identifizierung von einzelnen Komponenten sind aufwändigere technische Lösungen (akkurate Massenbestimmung), Zugang zu Spektraldatenbanken und die Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen notwendig.

5.2 Überlegungen zur möglichen Anwendung von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung und zum dafür notwendigen Forschungsbedarf

Anwendung von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung

OMICS-Technologien zum Nachweis von komplexen Reaktionsmustern auf der molekularen Ebene in Abhängigkeit von Umweltbedingungen werden derzeit vor allem im wissenschaftlichen Bereich und der Grundlagenforschung intensiv genutzt. Die Anwendungen von OMICS-Technologien zur funktionalen Analyse der Änderungen in der Zusammensetzung bzw. im Stoffwechsel von GVP bzw. nicht gentechnisch veränderten Pflanzen sollten besser hinsichtlich der Frage evaluiert werden, ob und wie OMICS-Technologien im Rahmen der Risikoabschätzung von GVP sinnvoll genutzt werden können. Das sollte fallspezifisch für verschiedene Anwendungsmöglichkeiten (siehe z. B. Kap. 4.2.7.2) durchgeführt werden, um einen raschen Einsatz von sinnvollen Anwendungen zu gewährleisten.

Eine wesentliche Fragestellung betrifft das Zusammenspiel verschiedener OMICS-Technologien in Bezug auf die Risikoabschätzung von GVP. Ungeachtet der methodischen und technischen Herausforderungen muss aber festgehalten werden, dass OMICS-Untersuchungen komplexe Zusammenhänge besser abbilden können als die derzeit routinemäßig durchgeführten Inhaltsstoffanalysen, die nur ausgewählte Stoffe untersuchen. Während signifikante Änderungen bei diesen einzelnen Inhaltsstoffen meist nicht hinsichtlich ihrer biologischen Relevanz direkt interpretiert werden können, haben OMICS-Daten, in dieser Hinsicht ein größeres Potenzial, da sie die zellulären Regulationsprozesse vielfältiger abbilden können.

Forschungsbedarf hinsichtlich der möglichen Anwendung von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung

Wie im Gutachten schon bemerkt besteht allgemein noch ein erheblicher Forschungsbedarf, insbesondere im Hinblick auf das Design des Untersuchungsansatzes, sowie die Datenanalyse und Interpretation der Ergebnisse von OMICS-Unersuchungen. Die integrierte Anwendung von OMICS-Technologien erlaubt zwar im Unterschied zu derzeit angewandten Untersuchungen die bessere funktionale Deutung von molekularen Vorgängen (Weckwerth 2011a). Um molekulare Profile für die Risikoabschätzung nutzen zu können, sind allerdings noch zusätzliche Anstrengungen in der Grundlagenforschung erforderlich, um das optimale Zusammenwirken der einzelnen Methoden und die zusammenfassende Interpretation ihrer Ergebnisse zu gewährleisten. Ebenfalls besser untersucht werden müssen die Einflüsse von Umweltbedingungen auf die Ergebnisse von OMICS-Analysen – da insbesondere Metabolomics-Analysen Einzelsituationen aus einem hochdynamischen Geschehen erfassen und dementsprechend sensibel gegenüber Änderungen der Versuchsbedingungen sind. Für die Anwendung in der Risikoabschätzung muss jedenfalls konkreter untersucht werden, welche Daten und Untersuchungsansätze (Probematerial, Probenahmezeitpunkt, Probenaufarbeitung) für bestimmte Fragestellungen im Rahmen der Risikoabschätzung geeignet sind. Dadurch kann sichergestellt werden, dass die im Zulassungsverfahren vorgelegten Daten ausreichend aussagekräftig sind. Auch um bestimmte Untersuchungsdaten in geeigneter Weise miteinander vergleichen zu können, ist ein umfassenderes Wissen über den Einfluss von verschiedenen Umweltbedingungen auf Ergebnisse von OMICS-Untersuchungen notwendig. Solche Erkenntnisse sind eine wesentliche Hilfe für Zulassungsbehörden herauszufinden, ob Testergebnisse vorgelegt werden, die mit dem richtigen Pflanzenmaterial (z. B. Entwicklungsstadium, Gewebetyp) zu einem geeigneten Zeitpunkt ermittelt wurden. Eine weitere Herausforderung für die Forschung stellt die Entwicklung von Indikatoren für OMICS-Untersuchungen im Rahmen der Risikoabschätzung dar, die in geeigneter Weise Veränderungen im Genom, Proteom oder Metabolom mit unerwünschten phänotypischen Veränderungen korrelieren. Der noch notwendige Forschungsaufwand ist bei ver-

schiedenartigen Anwendungen unterschiedlich groß, die größten zusätzlichen Anstrengungen sind dabei sicher in Bezug auf die umfassende Abschätzung von unbeabsichtigten Veränderungen mittels molekularer Techniken notwendig. Insbesondere zur Identifikation geeigneter Biomarker für diese Art von Tests bedarf es noch umfassender phänolgischer Untersuchungen, deren die Ergebnisse in die Entwicklung von konkreten Leitlinien einfließen sollten. Ein erheblicher Forschungsbedarf besteht insbesondere auch bei der Fragestellung, welche Biomarker als Indikatoren für die (unbeabsichtigte) Beeinflussung von Steuerungsvorgängen in GVP dienen können. In diesem Zusammenhang muss z. B. die Bedeutung von funktionalen RNAs (z. B. RNAi, miR NA, …) näher untersucht werden.

Bewertungsunsicherheiten hinsichtlich der Indikatoreignung von Untersuchungsparametern bestehen nicht nur bei OMICS-Methoden, sondern auch bei den derzeit im Rahmen der vergleichenden Untersuchung von GVO und nicht-modifizierten Vergleichslinien angewendeten molekularen Methoden. Wie schon in vorangehenden Kapiteln erwähnt, ist bei diesen Ansätzen die konkrete Aussagekraft der untersuchten Parameter sehr gering. Diese geringe Indikatoreignung beruht in diesem Fall aber weniger auf fehlenden Untersuchungsergebnissen, sondern auf der grunsätzlich geringen Aussagekraft solcher Ansätze.

Ebenfalls ein Gegenstand von weiterern Anforderungen hinsichtlich Forschung und Standardisierung sollten Fragen betreffend der geeigneten Probennahme und –aufbereitung sein, da die Ursache von wesentlichen Fehlerquellen für OMICS-Untersuchungen in diesen Bereichen liegt. Diese Fragen betreffen unter anderem die Probennahme und -aufarbeitung bei Analyten, die starken Fluktuationen unterworfen und/oder sehr labil sind (viele Metaboliten, manche Proteine und RNAs). Bei der Probenvorbereitung sollten für die Bedürfnisse der OMICS-Technologien optimierte Protokolle entwickelt und in Leitlinienform zur Anwendung empfohlen werden.

5.3 Leitlinien für den Einsatz von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung

Die bestehenden EFSA-Leitlinien diskutieren den Einsatz von OMICS-Technologien als Ergänzung zu bestehenden Abschätzungsmethoden. Allerdings enthalten die Leitlinien keine konkreten Hinweise, wann ein fallspezifischer Einsatz angezeigt ist. Bislang wurden OMICS-Daten noch nicht im Rahmen der GVP-Zulassung vorgelegt.

OMICS-Technologien können im Rahmen der Risikoabschätzung von GVP zu unterschiedlichen Zwecken, sowohl in zielgerichteter als auch sehr breiter Weise, eingesetzt werden. Diese verschiedenen Anwendungstypen sollten einzeln evaluiert werden, wobei Fragen geklärt werden müssen, die wesentlich für die Implementierung sind. Robustheit, Sensitivität und Spezifität sind ausreichend gegeben, der Vergleich mit Analyseverfahren,

die bei der Risikoabschätzung von GVP routinemäßig eingesetzt werden, zeigt, dass viele akzeptierte Methoden in Bezug auf diese Punkte größere Schwächen zeigen als OMICS-Technologien.

Die Interpretation von Analysenergebnissen ist ein entscheidender Punkt beim Einsatz von OMICS-Technologien in der Risikoabschätzung von GVP. Leitlinien, die angeben, wie OMICS-Ergebnisse sachgerecht ausgewertet werden sollen, sind dringend erforderlich. Das ist vor allem angezeigt angesichts der Datenmenge, die generiert wird und der komplexen Methoden, die für eine Auswertung angewendet werden müssen, insbesondere was die Anforderungen an die statistische Behandlung anbelangt.

Standardisierung und Validierung werden von KritikerInnen eines Einsatzes von OMICS-Technologien als unabdingbare Voraussetzung dargestellt. Das wird der vielfältigen Einsatzmöglichkeit von OMICS-Technologien nicht gerecht und ist außerdem nicht im Einklang mit der entsprechenden Situation bei anderen routinemäßig verwendeten Methoden. Für einen Einsatz als unterstützende Untersuchungsmethodik zur Identifizierung von potenziell nachteiligen Effekten, die weiterführend untersucht werden, sollte der Fokus auf Transparenz hinsichtlich der Planung, Durchführung und Auswertung solcher Untersuchungen gelegt werden, um die Nachvollziehbarkeit der Vorgangsweise und die Möglichkeit zur geeigneten Evaluierung der Daten sicherzustellen.

Dringend notwendig erscheint die Entwicklung konkreter Leitlinien dafür, wie bei der Integration von OMICS-Technologien als Werkzeuge in der Risikoabschätzung von GVP vorgegangen werden sollte. Die verfügbaren Leitlinien sind zu wenig konkret in Bezug auf alle wesentlichen Elemente, wie Versuchsplanung (und Auswahl von Vergleichslinien), Durchführung und vor allem Auswertung mittels sachgerechter statistischer Verfahren. Hier müsste die bestehende Expertise gesammelt werden, um eine praxistaugliche und konsistente Vorgangsweise vorzuschlagen, die für Schlussfolgerungen, welche auf OMICS-Experimenten basieren, die Nachvollziehbarkeit sicherstellt. Ein schwieriger aber wichtiger Punkt, um die praktische Anwendung zu ermöglichen, ist die Ermittlung von Indikatoren für mögliche negatives Umweltverhalten, bzw.die Festsetzung von Schwellenwerten für tolerierbare Veränderungen, wenn konkrete Kausalitäten nicht nachgewiesen werden konnten. Diese Festsetzung sollte unter Berücksichtigung des Vorsorgegedanken vorgenommen werden und sich auf wissenschaftlich fundierte Testergebnisse berufen.

Die Entwicklung von entsprechenden Leitlinien bzw. die Adptierung von bestehenden Leitlinien sollte die Erfahrungen die mit Anwendung von OMICS-Technologien in anderen Feldern, wie z. B. von Toxicogenomics-Anwendungen bestehen in die Überlegungen einbeziehen.

In Fällen, bei denen ein zielgerichteter Ansatz praktikabel erscheint, z. B. bei der Analyse von Allergenen mittels Proteomic-Methoden, sollten die verfügbaren Methoden zur ra-

schen Anwendung vorgeschlagen werden. Die Ergebnisse solcher Tests sollten auch dazu genutzt werden, um komplementäre Ansätze, z. B. Tests mittels immunologischer Methoden, zielsicherer gestalten und in ihrer Aussage ergänzen zu können.

Es sollte nicht außer acht gelassen werden, dass die bestehenden EFSA-Leitlinien OMICS-Technologien in ihrem derzeitigen Entwicklungsstand grundsätzlich als relevant in Bezug auf die Risikoabschätzung von GVP erachten. Deshalb sollte das bestehende Missverhältnis zwischen Anwendung von OMICS-Technologien in Forschung & Entwicklung von GVP einerseits sowie in der Risikoabschätzung andererseits so gering wie möglich zu halten, um nicht zusätzliche Bewertungsunsicherheiten hervorzurufen. OMICS-Technologien werden schon in beträchtlichem Umfang in der Entwicklung neuer Zuchtlinien von GVP und Nicht-GVP eingesetzt. Nachdem aber derzeit OMICS-Daten nicht bei Genehmigungsverfahren vorgelegt werden (müssen), kommen die gewonnenen Erkenntnisse bei der Risikoabschätzung bei GVP bislang nicht zum Tragen. Dieses Missverhältnis könnte in Anbetracht der Geschwindigkeit der Weiterentwicklung der Technologie in kommender Zeit noch zunehmen, womit sich gerade bei neueren GVP die Schlussforderungen der Risikoabschätzung nicht am aktuellen Stand des Wissens orientieren würden.

6 LITERATUR

ALBA,R., PHILLIPS,A., MACKIE,S., GILLIKIN,N., MAXWELL,C., BRUNE,P., RIDLEY,W., FITZPATRICK,J., LEVINE,M., AND HARRIS,S. (2010). Improvements to the International Life Sciences Institute Crop Composition Database. Journal of Food Composition and Analysis *23*, 741-748.

ALLWOOD,J.W., ELLIS,D.I., AND GOODACRE,R. (2008). Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions. Physiol Plant. *132 (2),*117-35.

BAERENFALLER,K., GROSSMANN,J., GROBEI,M.A., HULL,R., HIRSCH-HOFFMANN,M., YALOVSKY,S., ZIMMERMANN,P., GROSSNIKLAUS,U., GRUISSEM,W., AND BAGINSKY,S. (2008). Genome-scale proteomics reveals Arabidopsis thaliana gene models and proteome dynamics. Science *320 (5878)*, 938-41.

BARROS,E., LEZAR,S., ANTTONEN,M.J., VAN DIJK,J.P., ROHLIG,R.M., KOK,E.J. AND ENGEL,K.H., 2010. Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. Plant Biotechnology Journal, *8*, 436-51.

BEDNAREK,P., SCHNEIDER,B., SVATOS,A., OLDHAM,N.J., AND HAHLBROCK,K. (2005). Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in Arabidopsis roots. Plant Physiol. *138*, 1058-1070.

BRUMLOP,S. AND FINCKH, M.R. (2011). Applications and potentials of marker assisted selection (MAS) in plant breeding. BfN-Skripten 298, Bundesamt für Naturschutz, Bonn, http://www.bfn.de/fileadmin/MDB/documents/service/Skript_298.pdf

BRUNNER,E., AHRENS,C.H., MOHANTY,S., BAETSCHMANN,H., LOEVENICH,S., POTTHAST,F., DEUTSCH,E.W., PANSE,C., DE,L.U., RINNER,O., LEE,H., PEDRIOLI,P.G., MALMSTROM,J., KOEHLER,K., SCHRIMPF,S., KRIJGSVELD,J., KREGENOW,F., HECK,A.J., HAFEN,E., SCHLAPBACH,R., AND AEBERSOLD,R. (2007). A high-quality catalog of the Drosophila melanogaster proteome. Nat Biotechnol *25*, 576-583.

CATCHPOLE,G.S., BECKMANN,M., ENOT,D.P., MONDHE,M., ZYWICKI,B., TAYLOR,J., HARDY,N., SMITH,A., KING,R.D., KELL,D.B., FIEHN,O., AND DRAPER,J. (2005). Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 14458-14462.

CELLINI,F., CHESSON,A., COLQUHOUN,I., CONSTABLE,A., DAVIES,H.V., ENGEL,K.H., GATEHOUSE,A.M., KARENLAMPI,S., KOK,E.J., LEGUAY,J.J., LEHESRANTA,S., NOTEBORN,H.P., PEDERSEN,J., AND SMITH,M. (2004). Unintended effects and their detection in genetically modified crops. Food Chem. Toxicol *42*, 1089-1125.

CHASSY,B.M. (2010). Can -omics inform a food safety assessment? Regul Toxicol Pharmacol. *58*, S62-S70.

CHEN,H., BODULOVIC,G., HALL,P.J., MOORE,A., HIGGINS,T.J., DJORDJEVIC,M.A., AND ROLFE,B.G. (2009). Unintended changes in protein expression revealed by proteomic analysis of seeds from transgenic pea expressing a bean alpha-amylase inhibitor gene. Proteomics. *9*, 4406-4415.

CHO,W.C. (2007). Proteomics technologies and challenges. Genomics Proteomics. Bioinformatics. *5*, 77-85.

COLL,A., NADAL,A., COLLADO,R., CAPELLADES,G., KUBISTA,M., MESSEGUER,J., AND PLA,M. (2010). Natural variation explains most transcriptomic changes among maize plants of MON810 and comparable non-GM varieties subjected to two N-fertilization farming practices. Plant Mol. Biol *73*, 349-362.

DAVIES,H.V. (2005). GM organisms and the EU regulatory environment: allergenicity as a risk component. Proc Nutr. Soc. *64*, 481-486.

DAVIES,H.V., SHEPHERD,L.V., STEWART,D., FRANK,T., ROHLIG,R.M., AND ENGEL,K.H. (2010). Metabolome variability in crop plant species--when, where, how much and so what? Regul Toxicol Pharmacol. *58*, S54-S61.

DAVIES,H. (2010). A role for "omics" technologies in food safety assessment. Food Control *21*, 1601-1610.

DIXON,R.A., GANG,D.R., CHARLTON,A.J., FIEHN,O., KUIPER,H.A., REYNOLDS,T.L., TJEERDEMA,R.S., JEFFERY,E.H., GERMAN,J.B., RIDLEY,W.P., AND SEIBER,J.N. (2006). Applications of metabolomics in agriculture. J Agric. Food Chem. *54*, 8984-8994.

DOERRER,N., LADICS,G., MCCLAIN,S., HEROUET-GUICHENEY,C., POULSEN,L.K., PRIVALLE,L., AND STAGG,N. (2010). Evaluating biological variation in non-transgenic crops: executive summary from the ILSI Health and Environmental Sciences Institute workshop, November 16-17, 2009, Paris, France. Regul Toxicol Pharmacol. *58*, S2-S7.

DRAPER,J.H., RASMUSSEN, S. AND ZUBAIR, H. (2011) Metabolite analysis and metabolomics in the study of biotrophic interactions between plants and microbes. In: Hall, R.D. (ed.) Annual Plant Reviews, Biology of Plant Metabolomics. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. pp. 25–60.

EFSA (2004) Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed, the EFSA Journal *99*, 1-94.

EFSA (2008). Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. Food Chem. Toxicol *46 Suppl 1*, S2-70.

EFSA (2010): Scientific opinion of the EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed. EFSA Journal *8* (*7*): 1700.

EFSA (2011): Scientific opinion of the EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) on guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants, EFSA Journal *9 (5)*: 2150.

ERLER,A., HAWRANEK, T. KRUCKEMEIER, L., ASAM, C., EGGER, M., FERREIRA, F., AND BRIZA, P. (2011). Proteomic profiling of birch (Betula verrucosa) pollen extracts from different origins. Proteomics. *11* (*8),*1486-1498. doi: 10.1002/pmic.201000624.

FERNIE,A.R. AND SCHAUER,N. (2009). Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? Trends Genet *25*, 39-48.

FERNIE,A.R. AND KEURENTJES, J.J.B. (2011). Genetics, genomics and metabolomics. In: Hall, R.D. (ed.) Annual Plant Reviews, Biology of Plant Metabolomics. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. pp. 219–260.

FIEHN,O., WOHLGEMUTH,G., SCHOLZ,M., KIND,T., LEE,D.Y., LU,Y., MOON,S., AND NIKOLAU,B. (2008). Quality control for plant metabolomics: reporting MSI-compliant studies. Plant J *53*, 691-704.

FIEHN,O., SUMNER,L., RHEE,S., WARD,J., DICKERSON,J., LANGE,B., LANE,G., ROESSNER,U., LAST,R., AND NIKOLAU,B. (2007). Minimum reporting standards for plant biology context information in metabolomic studies. Metabolomics *3*, 195-201.

FIEHN,O., KIND, T. AND KUMAR BARUPAL, D. (2011). Data processing, metabolomic databas-es and pathway analysis. In: Hall, R.D. (ed.) Annual Plant Reviews, Biology of Plant Metabolomics. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. pp. 367–406.

FUKUSHIMA,A., KUSANO,M., REDESTIG,H., ARITA,M., AND SAITO,K. (2009). Integrated omics approaches in plant systems biology. Curr. Opin. Chem. Biol *13*, 532-538.

GIAVALISCO,P., NORDHOFF,E., KREITLER,T., KLOPPEL,K.D., LEHRACH,H., KLOSE,J., AND GOBOM,J. (2005). Proteome analysis of Arabidopsis thaliana by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry. Proteomics. *5*, 1902-1913.

GIAVALISCO,P., HUMMEL,J., LISEC,J., INOSTROZA,A.C., CATCHPOLE,G., AND WILLMITZER,L. (2008). High-resolution direct infusion-based mass spectrometry in combination with whole 13C metabolome isotope labeling allows unambiguous assignment of chemical sum formulas. Anal. Chem. *80*, 9417-9425.

GYGI,S.P., RIST,B., GERBER,S.A., TURECEK,F., GELB,M.H., AND AEBERSOLD,R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. Nat Biotechnol *17*, 994-999.

HAGEMEIER,J., SCHNEIDER,B., OLDHAM,N.J., AND HAHLBROCK,K. (2001). Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in Arabidopsis thaliana leaves infected with virulent or avirulent Pseudomonas syringae pathovar tomato strains. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 753-758.

HALL,R.D. (2006). Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. New Phytologist *169*, 453–468.

HALL,R.D. (2011). Plant Metabolomics in a Nutshell: Potential and Future Challenges. In: Annual Plant Reviews Volume *43*, Wiley-Blackwell), pp. 1-24.

HARDY,N.W. AND HALL, R.D. (2011). (eds.) Plant Metabolomics Methods. Humana Press, Totowa, USA.

HEGEMAN,A.D. (2010). Plant metabolomics--meeting the analytical challenges of comprehensive metabolite analysis. Brief. Funct. Genomics *9*, 139-148.

HEICK,J., FISCHER, M., KERBACH, S., TAMM, U., AND POPPING, B. (2011). Application of a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Detection of Seven Allergenic Foods in Flour and Bread and Comparison of the Method with Commercially Available ELISA Test Kits. Journal of AOAC International *94/4*, 1-9.

HEINEMANN,J.A., KURENBACH,B., AND QUIST,D. (2011). Molecular profiling - a tool for addressing emerging gaps in the comparative risk assessment of GMOs. Environ Int.

HIRAI,M.Y., YANO,M., GOODENOWE,D.B., KANAYA,S., KIMURA,T., AWAZUHARA,M., ARITA,M., FUJIWARA,T., AND SAITO,K. (2004). Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 10205-10210.

HIRAI,M.Y., KLEIN,M., FUJIKAWA,Y., YANO,M., GOODENOWE,D.B., YAMAZAKI,Y., KANAYA,S., NAKAMURA,Y., KITAYAMA,M., SUZUKI,H., SAKURAI,N., SHIBATA,D., TOKUHISA,J., REICHELT,M., GERSHENZON,J., PAPENBROCK,J., AND SAITO,K. (2005). Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in arabidopsis by integration of metabolomics and transcriptomics. J Biol Chem. *280*, 25590-25595.

HIREMATH,P.J., FARMER,A., CANNON,S.B., WOODWARD,J., KUDAPA,H., TUTEJA,R., KUMAR,A., BHANUPRAKASH,A., MULAOSMANOVIC,B., GUJARIA,N., KRISHNAMURTHY,L., GAUR,P.M., KAVIKISHOR,P.B., SHAH,T., SRINIVASAN,R., LOHSE,M., XIAO,Y., TOWN,C.D., COOK,D.R., MAY,G.D., AND VARSHNEY,R.K. (2011). Large-scale transcriptome analysis in chickpea (Cicer arietinum L.), an orphan legume crop of the semi-arid tropics of Asia and Africa. Plant Biotechnol J *9*, 922-931.

HOEHENWARTER,W., CHEN,Y., RECUENCO-MUNOZ,L., WIENKOOP,S., AND WECKWERTH,W. (2011). Functional analysis of proteins and protein species using shotgun proteomics and linear mathematics. Amino. Acids *41*, 329-341.

HOEKENGA,O.A. (2008). Using metabolomics to estimate unintended effects in transgenic crop plants: problems, promises, and opportunities. J Biomol. Tech. *19*, 159-166.

HOMMEL,B. (2010). Rückblick auf die mehrjährigen Feldversuche in Dahnsdorf (Land Brandenburg) zur Bewertung gentechnisch veränderter Kulturpflanzen für die Ziele des integrierten Pflanzenschutzes und der Koexistenz (Review of the field experiments in Dahnsdorf (German state Brandenburg) aiming at evaluation of genetically modified crops for the goals of integrated plant protection and for coexistence). Journal f. Kulturpflanzen *62/9*, 341–351.

HOUSTON,N.L., LEE,D.G., STEVENSON,S.E., LADICS,G.S., BANNON,G.A., MCCLAIN,S., PRIVALLE,L., STAGG,N., HEROUET-GUICHENEY,C., MACINTOSH,S.C., AND THELEN,J.J. (2011). Quantitation of soybean allergens using tandem mass spectrometry. J Proteome. Res *10*, 763-773.

JORRIN,J.V., MALDONADO,A.M., AND CASTILLEJO,M.A. (2007). Plant proteome analysis: a 2006 update. Proteomics. *7*, 2947-2962.

JOSHI,H.J., HIRSCH-HOFFMANN,M., BAERENFALLER,K., GRUISSEM,W., BAGINSKY,S., SCHMIDT,R., SCHULZE,W.X., SUN,Q., VAN WIJK,K.J., EGELHOFER,V., WIENKOOP,S., WECKWERTH,W., BRULEY,C., ROLLAND,N., TOYODA,T., NAKAGAMI,H., JONES,A.M., BRIGGS,S.P., CASTLEDEN,I., TANZ,S.K., MILLAR,A.H., AND HEAZLEWOOD,J.L. (2011). MASCP Gator: an aggregation portal for the visualization of Arabidopsis proteomics data. Plant Physiol. *155*, 259-270.

KÄRENLAMPI, S AND LEHESRANTA SJ. (2006). Proteomic Profiling and Unintended Effects in Genetically Modified Crops, ISB news report, January 2006, http://www.isb.vt.edu/news/2006/news06.jan.htm

KUIPER,H.A., KOK,E.J., AND ENGEL,K.H. (2003). Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment. Curr. Opin. Biotechnol *14*, 238-243.

KUSANO,M., REDESTIG,H., HIRAI,T., OIKAWA,A., MATSUDA,F., FUKUSHIMA,A., ARITA,M., WATANABE,S., YANO,M., HIWASA-TANASE,K., EZURA,H., AND SAITO,K. (2011). Covering chemical diversity of genetically-modified tomatoes using metabolomics for objective substantial equivalence assessment. PLoS One *6*, e16989.

LEE,D.G., HOUSTON,N.L., STEVENSON,S.E., LADICS,G.S., MCCLAIN,S., PRIVALLE,L., AND THELEN,J.J. (2010). Mass spectrometry analysis of soybean seed proteins: optimization of gel-free quantitative workflow. Anal. Methods *2*, 1577-1583.

LEE,J., GARRETT,W.M., AND COOPER,B. (2007). Shotgun proteomic analysis of Arabidopsis thaliana leaves. J Sep. Sci *30*, 2225-2230.

LEHESRANTA,S.J., DAVIES H.V., SHEPHERD L.V., NUNAN N., MCNICOL J.W., AURIOLA S., KOISTINEN K.M., SUOMALAINEN S., KOKKO H.I. AND KARENLAMPI S.O. (2005). Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines. Plant Physiology, *138*, 1690-1699.

LESSIRE,R., CAHOON,E., CHAPMAN,K., DYER,J., EASTMOND,P., AND HEINZ,E. (2009). Highlights of recent progress in plant lipid research. Plant Physiol. Biochem. *47*, 443-447.

MARIONI,J.C., MASON,C.E., MANE,S.M., STEPHENS,M., AND GILAD,Y. (2008). RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. Genome Res *18*, 1509-1517.

MOCH,K. (2006) Epigenetische Effekte bei transgenen Pflanzen: Auswirkungen auf die Risikobewertung. BfN-Skripten 187, 1–80;
http://www.bfn.de/fileadmin/MDB/documents/service/Skript187_gesamt.pdf

MORGENTHAL,K., WECKWERTH,W., AND STEUER,R. (2006). Metabolomic networks in plants: Transitions from pattern recognition to biological interpretation. Biosystems *83*, 108-117.

MOROZOVA,O. AND MARRA,M.A. (2008). Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. Genomics *92*, 255-264.

NAGALAKSHMI,U., WANG,Z., WAERN,K., SHOU,C., RAHA,D., GERSTEIN,M., AND SNYDER,M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. Science *320*, 1344-1349.

NATARAJAN,S.S., XU, C., CREGAN, P., CAPERNA, T.J., GARRETT, W.M. AND LUTHRIA D. (2009). Utility of proteomics techniques for assessing protein expression. Regulatory Toxicology and Pharmacology, *54*, S32-36.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL / COMMITTEE ON APPLICATIONS OF TOXICOGENOMIC TECHNOLOGIES TO PREDICTIVE TOXICOLOGY AND RISK ASSESSMENT (2007). Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology and Risk Assessment, National Academy Press, ISBN: 0-309-11299-0, **http://www.nap.edu/catalog/12037.html**

OECD (2010). Consensus Document on the Molecular Characterisation of Plants Derived from Modern Biotechnology. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 51 and Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 22, Organisation for Economic Co-operation and Development ENV/JM/MONO(2010)41.

O'FARRELL,P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem. *250*, 4007-4021.

OKAZAKI,Y. AND SAITO, K. (2011). Recent advances of metabolomics in plant biotechnology. Plant Biotechnol Rep., DOI 10.1007/s11816-011-0191-2

ONG,S.E., BLAGOEV,B., KRATCHMAROVA,I., KRISTENSEN,D.B., STEEN,H., PANDEY,A., AND MANN,M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. Mol. Cell Proteomics. *1*, 376-386.

PENNIE,W., PETTIT,S.D., AND LORD,P.G. (2004). Toxicogenomics in risk assessment: an overview of an HESI collaborative research program. Environ Health Perspect. *112*, 417-419.

PETTIT,S., DES ETAGES,S.A., MYLECRAINE,L., SNYDER,R., FOSTEL,J., DUNN,R.T., HAYMES,K., DUVAL,M., STEVENS,J., AFSHARI,C., AND VICKERS,A. (2010). Current and future applications of toxicogenomics: Results summary of a survey from the HESI Genomics State of Science Subcommittee. Environ Health Perspect. *118*, 992-997.

PRESCOTT,V.E., CAMPBELL, P.M., MOORE A., MATTES J., ROTHENBERG M.E., FOSTER P.S., HIGGINS T.J. AND HOGAN,S.P. (2005). Transgenic expression of bean alpha-amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, *53*, 9023-9030.

REDESTIG,H., SZYMANSKI, J., HIRAI, M.Y., SELBIG, J., WILLMITZER, L., NIKOLOSKI, Z., SAITO, K. (2011). Data integration, metabolic networks and systems biology. In: Hall, R.D. (ed.) An-nual Plant Reviews, Biology of Plant Metabolomics. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. pp. 261–316.

RIANO-PACHON,D.M., NAGEL,A., NEIGENFIND,J., WAGNER,R., BASEKOW,R., WEBER,E., MUELLER-ROEBER,B., DIEHL,S., AND KERSTEN,B. (2009). GabiPD: the GABI primary database--a plant integrative 'omics' database. Nucleic Acids Res *37*, D954-D959.

RICROCH,A.E., BERGE,J.B., AND KUNTZ,M. (2011). Evaluation of genetically engineered crops using transcriptomic, proteomic, and metabolomic profiling techniques. Plant Physiol. *155*, 1752-1761.

RIDLEY,W.P., SHILLITO,R.D., COATS,I., STEINER,H.Y.H., SHAWGO,M., PHILLIPS,A., DUSSOLD,P., AND KURTYKA,L. (2004). Development of the International Life Sciences Institute Crop Composition Database. Journal of Food Composition and Analysis *17*, 423-438.

ROPPEL,P. (2007). Untersuchungen zu phänologischen und phytomedizinisch relevanten Effekten einer gentechnischen Modifikation des Kohlenhydratmetabolismus in der Kartoffel (Solanum tuberosum L.). Diss. Univ. Gießen. urn:nbn:de:hebis:26-opus-52913, http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2008/5291/

ROSS,P.L., HUANG,Y.N., MARCHESE,J.N., WILLIAMSON,B., PARKER,K., HATTAN,S., KHAINOVSKI,N., PILLAI,S., DEY,S., DANIELS,S., PURKAYASTHA,S., JUHASZ,P., MARTIN,S., BARTLET-JONES,M., HE,F., JACOBSON,A., AND PAPPIN,D.J. (2004). Multiplexed protein quantita-

tion in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents. Mol. Cell Proteomics. *3*, 1154-1169.

SANGER,F., NICKLEN,S., AND COULSON,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A *74*, 5463-5467.

SMITH,D.R., QUINLAN,A.R., PECKHAM,H.E., MAKOWSKY,K., TAO,W., WOOLF,B., SHEN,L., DONAHUE,W.F., TUSNEEM,N., STROMBERG,M.P., STEWART,D.A., ZHANG,L., RANADE,S.S., WARNER,J.B., LEE,C.C., COLEMAN,B.E., ZHANG,Z., MCLAUGHLIN,S.F., MALEK,J.A., SORENSON,J.M., BLANCHARD,A.P., CHAPMAN,J., HILLMAN,D., CHEN,F., ROKHSAR,D.S., MCKERNAN,K.J., JEFFRIES,T.W., MARTH,G.T., AND RICHARDSON,P.M. (2008). Rapid whole-genome mutational profiling using next-generation sequencing technologies. Genome Res *18*, 1638-1642.

STEVENSON,S.E., CHU,Y., OZIAS-AKINS,P., AND THELEN,J.J. (2009). Validation of gel-free, label-free quantitative proteomics approaches: applications for seed allergen profiling. J Proteomics. *72*, 555-566.

TAN,J., BEDNAREK,P., LIU,J., SCHNEIDER,B., SVATOS,A., AND HAHLBROCK,K. (2004). Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected Arabidopsis thaliana roots and leaves. Phytochemistry. *65*, 691-699.

THELEN,J.J. AND PECK,S.C. (2007). Quantitative proteomics in plants: choices in abundance. Plant Cell *19*, 3339-3346.

THELEN,J.J. (2009). Proteomics tools and resources for investigating protein allergens in oilseeds. Regul Toxicol Pharmacol. *54*, S41-S45.

TIEMAN,D.M., ZEIGLER,M., SCHMELZ,E.A., TAYLOR,M.G., BLISS,P., KIRST,M., AND KLEE,H.J. (2006a). Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. J Exp Bot. *57*, 887-896.

TIEMAN,D., TAYLOR,M., SCHAUER,N., FERNIE,A.R., HANSON,A.D., AND KLEE,H.J. (2006b). Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 8287-8292.

UNLU,M., MORGAN,M.E., AND MINDEN,J.S. (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis. *18*, 2071-2077.

VAN DIJK,J.P., CANKAR,K., SCHEFFER,S.J., BEENEN,H.G., SHEPHERD,L.V., STEWART,D., DAVIES,H.V., WILKOCKSON,S.J., LEIFERT,C., GRUDEN,K., AND KOK,E.J. (2009). Transcriptome analysis of potato tubers--effects of different agricultural practices. J Agric. Food Chem. *57*, 1612-1623.

VAN AGGELEN,G., ANKLEY,G.T., BALDWIN,W.S., BEARDEN,D.W., BENSON,W.H., CHIPMAN,J.K., COLLETTE,T.W., CRAFT,J.A., DENSLOW,N.D., EMBRY,M.R., FALCIANI,F.,

GEORGE,S.G., HELBING,C.C., HOEKSTRA,P.F., IGUCHI,T., KAGAMI,Y., KATSIADAKI,I., KILLE,P., LIU,L., LORD,P.G., MCINTYRE,T., O'NEILL,A., OSACHOFF,H., PERKINS,E.J., SANTOS,E.M., SKIRROW,R.C., SNAPE,J.R., TYLER,C.R., VERSTEEG,D., VIANT,M.R., VOLZ,D.C., WILLIAMS,T.D., AND YU,L. (2010). Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements, and future outlook. Environ Health Perspect. *118*, 1-5.

VARSHNEY,R.K., NAYAK,S.N., MAY,G.D., AND JACKSON,S.A. (2009). Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. Trends Biotechnol *27*, 522-530.

VOELKERDING,K.V., DAMES,S.A., AND DURTSCHI,J.D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. Clin. Chem. *55*, 641-658.

WANG,Z., GERSTEIN,M., AND SNYDER,M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet *10*, 57-63.

WATERS,M.D. AND FOSTEL,J.M. (2004). Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. Nat Rev Genet *5*, 936-948.

WATSON,A.D. (2006). Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. J. Lipid Res. *47*, 2101–2111.

WECKWERTH,W. (2004). Biochemical profiling in plant systems: phenotypes beyond chemical equivalence. In: Nap, J.P.H., Atanassov, A., Stickema, W.J. (Eds.) Genomics for biosafety in plant biotechnology. IOS Press.

WECKWERTH,W. (ed.) (2007). Metabolomics: methods and protocols. Methods in Molecular Biology, Vol *358*. Humana Press, Totowa, USA.

WECKWERTH,W. (2010). Metabolomics: an integral technique in systems biology. Bioanalysis. *2*, 829-836.

WECKWERTH,W. (2011a). Unpredictability of metabolism-the key role of metabolomics science in combination with next-generation genome sequencing. Anal. Bioanal. Chem. *400*, 1967-1978.

WECKWERTH,W. (2011b). Green systems biology - From single genomes, proteomes and metabolomes to ecosystems research and biotechnology. J Proteomics. doi:10.1016/j.jprot.2011.07.010

WIDODO, PATTERSON,J.H., NEWBIGIN,E., TESTER,M., BACIC,A., AND ROESSNER,U. (2009). Metabolic responses to salt stress of barley (Hordeum vulgare L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. J Exp Bot. *60*, 4089-4103.

WIENKOOP,S., GLINSKI,M., TANAKA,N., TOLSTIKOV,V., FIEHN,O., AND WECKWERTH,W. (2004). Linking protein fractionation with multidimensional monolithic reversed-phase pep-

tide chromatography/mass spectrometry enhances protein identification from complex mixtures even in the presence of abundant proteins. Rapid. Commun. Mass Spectrom. *18*, 643-650.

WILHELM,B.T. AND LANDRY,J.R.. (2009). RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. Methods. *48 (3),*249-57.

YTTERBERG,A.J. AND JENSEN,O.N. (2010). Modification-specific proteomics in plant biology. J Proteomics. *73*, 2249-2266.

ZAIA,J. (2010). Mass spectrometry and glycomics. OMICS. *14*, 401-418.

ZELLER,S.L., KALININA,O., BRUNNER,S., KELLER,B., AND SCHMID,B. (2010). Transgene x environment interactions in genetically modified wheat. PLoS One *5*, e11405.

ZOLLA,L., RINALDUCCI,S., ANTONIOLI,P., AND RIGHETTI,P.G. (2008). Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications. J Proteome. Res *7*, 1850-1861.

DANKSAGUNG

Wir möchten uns bei allen Personen und Institutionen, die uns bei der Erarbeitung des Gutachtens freundlich unterstützt haben, sehr herzlich bedanken.

Für Auskünfte und Informationen im Rahmen der Recherchen zu dieser Studie möchten wir uns insbesondere bei den folgenden Experten bedanken: Ing. Karl Mechtler, Research Institute of Molecular Pathology (IMP) Wien, Dr. Nicolas Schauer, Metabolomic Discoveries GmbH Potsdam-Golm, Prof. Dr. Hans Peter Braun, Institut für Pflanzengenetik der Universität Hannover, DI Martin Radolf, Research Institute of Molecular Pathology (IMP) Wien, Andreas Sommer, Campus Science Support Facilities - Vienna Biocenter Wien, Prof. Wolfram Weckwerth, Department für Molekulare Systembiologie der Universität Wien, Prof. Jay Thelen, University of Missouri Columbia USA, Prof. Jack Heinemann, School of Biological Sciences, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand, Dr. Armin Spök, IFZ - Interuniversitäres Forschungszentrum für Technik, Arbeit und Kultur, Graz. Ungenannterweise danken wir auch allen Anderen, die uns mit Informationen und Literatur zum Thema unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt dem BfN als Auftraggeber, insbesondere dem BfN-Team, das die Gestaltung des Gutachtens in hilfreicher und umsichtiger Weise begleitet hat und die Arbeit am Gutachten durch zahllose wertvolle Anregungen und kritische Hinweise tatkräftig unterstützt hat. Stellvertretend möchten wir hier besonders Dr. Thomas Meise für seine Hilfe danken. Auch allen KollegInnen aus dem Umweltbundesamt Wien, die die Durchführung der Arbeiten unterstützt haben, sei herzlich gedankt.

Die Verantwortung für das Gutachten und die dort gezogenen Schlussfolgerungen, sowie für verbliebene Unzulänglichkeiten liegt selbstverständlich allein bei den Autoren.