

Gene, Gele und Gifte

Molekulare Methoden zum Nachweis mykotoxinbildender Schimmelpilze

Rolf Geisen (Karlsruhe)

Pflanzliche Lebensmittel sind besonders anfällig gegenüber dem Verderb durch Pilze. Viele dieser Pilze sind in der Lage, giftige Sekundärmetaboliten – Mykotoxine – zu bilden. Man schätzt, dass 20 % der pflanzlichen Produkte mit Mykotoxinen kontaminiert sind, also Kontakt mit mykotoxinbildenden Pilzen hatten. Zur Abschätzung der Qualität eines pflanzlichen Lebensmittels ist daher die Kenntnis des mykologischen Status, das heißt die Kenntnis über das Vorkommen bestimmter Schimmelpilzarten im Lebensmittel, von großer Bedeutung.

und die Auswertung kann auch von Personen ohne taxonomische Kenntnisse durchgeführt werden.

PRINZIP DER PCR

Bei der PCR handelt es sich um ein indirektes Nachweisverfahren: Nicht der Schimmelpilz selbst, sondern ein spezifischer Teil seines Erbmaterials, der DNA (Desoxyribonucleinsäure), wird nachgewiesen. In der PCR-Reaktion wird mit Hilfe der Taq-Polymerase, eines Enzyms, das zur Synthese von DNA benötigt wird, ein bestimmter DNA-Bereich vermehrt. Welcher DNA-Bereich das ist, wird durch zwei Oligonukleotide oder Primer festgelegt. Die Primer fungieren für das Enzym quasi als Andockstellen, an denen es mit der DNA-Vermehrung beginnt. Die Abbildung 1 zeigt ein Schema der Reaktion.

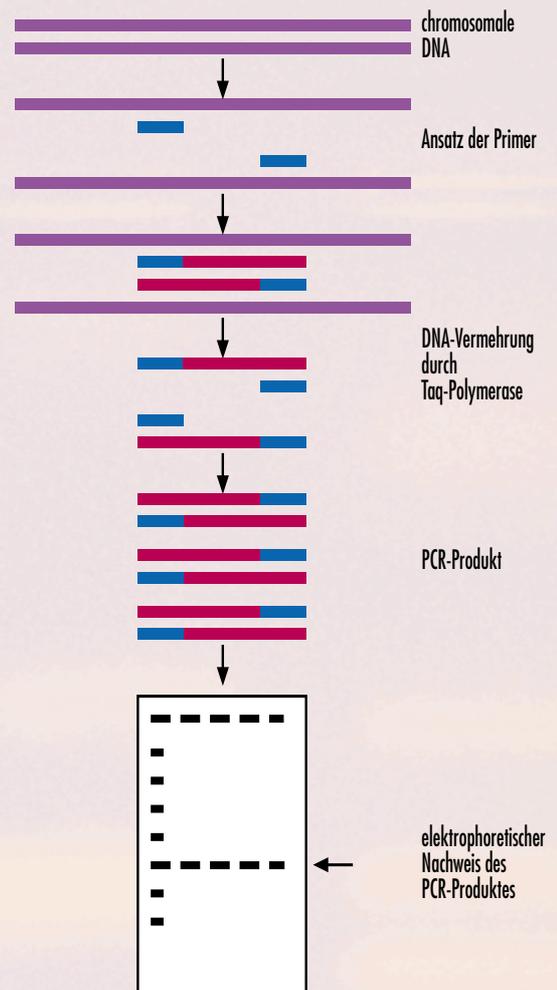
Da die Reaktion exponentiell verläuft, liegen die entsprechenden DNA-Bereiche schon nach wenigen Stunden in millionenfacher Kopie vor. Das PCR-Produkt kann anschließend durch Gel-Elektrophorese oder andere Methoden nachgewiesen werden.

Üblicherweise erfolgt die Bestimmung von Pilzen in Lebensmitteln mit mikrobiologischen Methoden: Die Proben werden auf Nährmedien ausplattiert, für mehrere Tage inkubiert und die erhaltenen Kolonien ausgewertet. Dieses Verfahren ist naturgemäß sehr zeitaufwendig und erfordert Kenntnisse in der Taxonomie von Pilzen. In der Regel vergehen bis zum Erhalt des Ergebnisses mehrere Tage.

Moderne molekularbiologische Methoden, wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), liefern dagegen das Ergebnis innerhalb von Stunden



Abb. 1: Schema der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Das zwischen den Primern lokalisierte DNA-Fragment wird durch die Taq-Polymerase neu gebildet. Nach dem ersten Reaktionszyklus können die Primer auch an den kopierten PCR-Fragmenten ansetzen, was zu einer logarithmischen Vermehrung des PCR-Produktes führt.



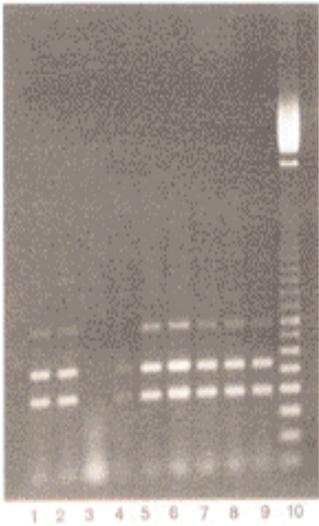


Abb. 2: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte verschiedener *A. flavus*, *A. parasiticus* und *A. versicolor* Stämme auf einem Agarose-Gel. Die Spuren 6 - 9 zeigen die PCR-Produkte von aflatoxinbildenden *A. flavus*- und *A. parasiticus*-Stämmen. Die Spuren 3 - 5 gehören zu *A. flavus*-Stämmen, die kein Aflatoxin produzieren, wobei der Stamm in Spur 5 trotzdem die drei fraglichen Gene aufweist. Die Spuren 1 und 2 zeigen die Ergebnisse von *A. versicolor*-Stämmen. Beide Stämme sind *Sterigmatocystin*-bildner, besitzen also die Gene zur Bildung von *Sterigmatocystin*, eines direkten Vorläufers von Aflatoxin. Spur 10: Größenstandard.

Voraussetzung für die Entwicklung einer diagnostischen PCR ist die Identifizierung spezifischer DNA-Sequenzen, die nur in dem fraglichen Organismus vorkommen. Für mykotoxinbildende Schimmelpilze bieten sich die Gene an, die für die Mykotoxinbildung verantwortlich sind.

Bisher sind nur wenige Biosynthesewege von Mykotoxinen näher untersucht worden. Die Biosynthesewege, von denen am meisten bekannt ist, sind die der Aflatoxine und der Trichothecene. Für aflatoxinbildende und trichothecenbildende Pilze wurden daher die ersten diagnostischen PCR-Methoden beschrieben. Am Beispiel von aflatoxinbildenden *Aspergillus*-Stämmen wird im Folgenden die Entwicklung und Anwendung eines diagnostischen

PCR-Systems zum Nachweis und zur Quantifizierung aufgezeigt.

PCR-NACHWEIS VON AFLATOXINBILDNERN

Die Aflatoxine sind die giftigsten Mykotoxine, die man kennt. Sie gelten als kanzerogen und schädigen vor allem die Leber. Aflatoxine werden hauptsächlich von den Schimmelpilzen *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* gebildet. Die Synthese der Giftstoffe erfolgt auch schon dann, wenn noch kein sichtbares Wachstum des Pilzes beobachtet werden kann.

Die Aflatoxine werden in einem Fettsäurebiosynthese-ähnlichen Stoffwechselweg gebildet. Insgesamt sind circa 20 Reaktionen notwendig, um vom Ausgangsprodukt Malonyl-CoA zum Aflatoxin zu gelangen. Viele der Gene des Biosynthesewegs sind inzwischen genauer un-

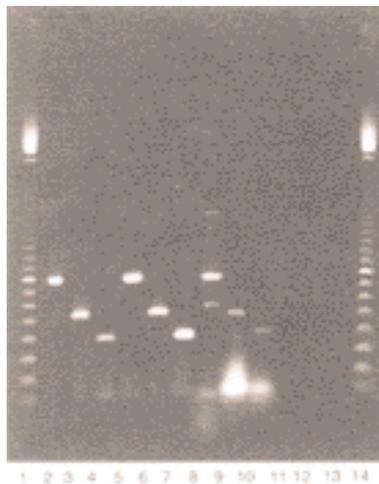


Abb. 3: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in verschiedenen pflanzlichen Produkten, die mit einem aflatoxinogenen *A. flavus* Stamm infiziert waren. Spuren 2 - 4: PCR-Produkte der drei Zielgene einer Kontrollreaktion (*A. flavus* DNA wurde einer aufgearbeiteten Probe zugesetzt); Spuren 5 - 7: DNA aus infiziertem Feigen; Spuren 8 - 10: DNA aus infiziertem Weizen; Spuren 11 - 13: DNA aus nicht infiziertem Feigen als negative Kontrolle. Spuren 1 und 14: Größenstandards.



tersucht und ihre Sequenz ist bekannt. Die Gene sind in einem so genannten Gencluster lokalisiert, das heißt alle Gene befinden sich im Genom in räumlicher Nähe zueinander. Als Zielsequenzen für die PCR-Reaktion wurden von uns drei Gene ausgewählt, die jeweils am Anfang, in der Mitte und am Ende dieses Genclusters lokalisiert sind. Diese Anordnung der Zielsequenzen hat den Vorteil, dass ein Verlust von Genen im geeigneten Fall mittels der PCR nachgewiesen werden kann. Weiterhin wird durch die drei Gene die Spezifität der Reaktion erhöht.

Sind Aflatoxinbildner in einer Probe vorhanden, so erhält man nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte ein Gel mit charakteristischen Triplet-Mustern. Abbildung 2 zeigt dies beispielhaft auf. Anhand dieser Abbildung wird auch der Unterschied deutlich zwischen *A. flavus*-Stämmen, die kein Aflatoxin bilden (Spuren 3 und 4) und solchen, die Aflatoxin bilden (Spuren 6-9). Aflatoxin-negative Stämme zeigen häufig kein vollständiges Tripletmuster. Es kommen aber auch Fälle vor, in denen ein Tripletmuster zwar er-

scheint, die Gene also vorhanden sind, aber dennoch kein Aflatoxin gebildet wird (Spur 5). Umgekehrt kann man aber sicher davon ausgehen, dass Proben, die das Triplett-Muster nicht zeigen, auch keine Aflatoxine bilden.

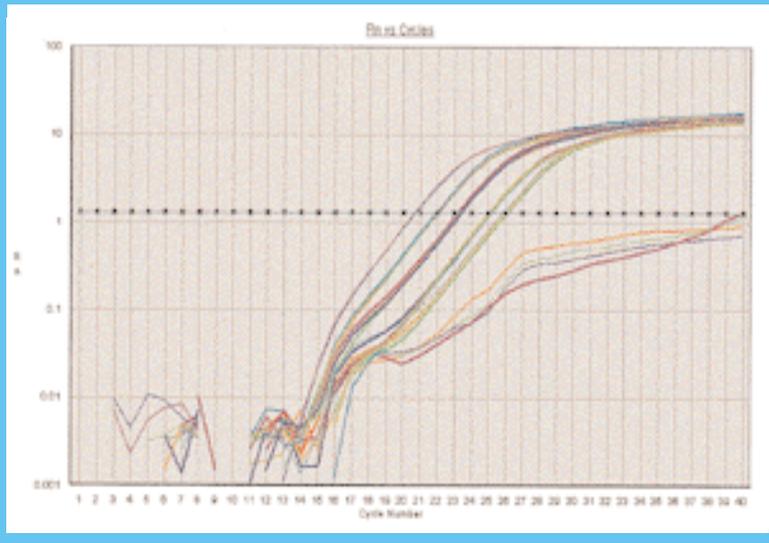
Eine Besonderheit sind noch die Sterigmatocystinbildner wie *Aspergillus versicolor*. Das für den Menschen weniger giftige Sterigmatocystin ist eine direkte Vorstufe in der Biosynthese des Aflatoxins. Da die entsprechenden Gene für die Bildung des Aflatoxins und des Sterigmatocystins in den jeweiligen Pilzarten sehr ähnlich sind, erhält man auch mit Sterigmatocystinbildnern ein positives Ergebnis (Spuren 1 und 2).

NACHWEIS VON *A. FLAVUS* IN LEBENSMITTELN

Mit Hilfe dieser diagnostischen PCR-Reaktion kann *A. flavus* ohne Anreicherungskultur direkt aus der Lebensmittelprobe nachgewiesen werden. Die Template-DNA, also die DNA, die als Probe für die PCR-Reaktion dient, wird direkt aus dem Lebensmittel isoliert und in die Reaktion eingesetzt. Problematisch für die Reaktion können gewisse Lebensmittelbestandteile wie Proteine oder Lipide sein. Aus diesem Grund muss die Probenvorbereitung, das heißt die Isolierung der DNA, für jede Lebensmittelmatrix optimiert werden.

Wichtig für die Interpretation des Ergebnisses ist die Mitführung eines positiven Standards. In diesen Fällen ist das eine aufgearbeitete Probe, der Ziel-DNA zugesetzt wurde. Der Standard dokumentiert den Einfluss der Aufarbeitungsmethode auf die Reaktion. Nach unseren Erfahrungen können mit dieser Methode 10^3 – 10^4 Zellen direkt aus dem Lebensmittel nachgewiesen werden. Abbildung 3 zeigt den Nachweis von *A. flavus* aus zwei unterschiedlichen Lebensmittelmatrices (Feigen und Weizen). In dieser Abbildung

Abb. 4: Typische Reaktionskinetik einer 'Real-Time PCR'. Während der Reaktion wird in das gebildete PCR-Produkt ein fluoreszierender Farbstoff eingebaut und die Fluoreszenz gemessen. Je höher die Ausgangskopienzahl des nachzuweisenden DNA-Fragments ist, desto schneller wird ein Grenzwert überschritten. Durch den Vergleich mit einem Standard kann die Zahl der DNA-Kopien und damit die Zellzahl direkt bestimmt werden. In der gezeigten Reaktion wurde das Gen für das Enzym Norsolorinsäure-Reduktase mengenmäßig bestimmt.



sind die Einzelreaktionen für die drei Gene gezeigt.

QUANTIFIZIERUNG VON *A. FLAVUS*

Die bisher beschriebene Methode erlaubt nur die Unterscheidung, ob aflatoxinogene Pilze in einer Probe vorhanden sind oder nicht. Zur Beurteilung der Qualität einer Probe ist aber auch die Kenntnis über die Anzahl der mikrobiellen Zellen beziehungsweise der Biomasse des Pilzes von Bedeutung. Mit Hilfe eines speziellen PCR-Verfahrens, der so genannten „Real-Time PCR“, können Quantifizierungen durchgeführt werden. Als Ergebnis erhält man die Anzahl der Kopien des Zielgens, also eines für die Aflatoxinbildung verantwortlichen Gens, die naturgemäß von der Zellzahl des Pilzes abhängig ist.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass in das PCR-Produkt während der Reaktion ein fluoreszieren-

der Farbstoff eingebaut wird. Die ansteigende Fluoreszenz wird während der Reaktion gemessen. Je höher die Anfangskopienzahl einer DNA in einer Probe, das heißt je höher die Zellzahl des mykotoxinbildenden Pilzes, umso schneller steigt die Fluoreszenz. Abbildung 4 zeigt eine typische Reaktionskinetik. Durch Vergleich mit einem Standard kann direkt auf die Kopienzahl der Ziel-DNA und damit auf die Zellzahl in einer Probe geschlossen werden.

Die Möglichkeit der Quantifizierung mittels Real-Time PCR erhöht den Wert des geschilderten Verfahrens. Bei einer optimierten Probenaufarbeitung und der Verwendung einer positiven Kontrolle ist die Methode gut zur Abschätzung der Qualität eines pflanzlichen Produktes geeignet. ■

Priv.-Doz. Dr. Rolf Geisen, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Institut für Hygiene und Toxikologie, Haid und Neu-Str. 9, 76131 Karlsruhe