

Helserisikovurdering av Cry-proteiners adjuvanseffekter.

Uttalelse fra Faggruppe 3 i Vitenskapskomiteen for mattrygghet

Dato: 25.04.2012
Dok. nr.: 11-313-3
ISBN: 978-82-8259-055-6

VKM Report 2012: 15



Bidragstere

Den som utfører arbeid for VKM, enten som oppnevnte medlemmer eller på ad hoc-basis, gjør dette i kraft av sin egen vitenskapelige kompetanse og ikke som representanter for den institusjon han/hun arbeider ved. Forvaltningslovens habilitetsregler gjelder for alt arbeid i VKM-regi.

Vurdert av

Prosjektgruppe: Audun H. Nerland, Martinius Løvik (FHI), Per Brandtzæg, Kåre M. Nielsen og Askild Lorentz Holck. Rapporten fra prosjekt-gruppen er vurdert og godkjent av:

Faggruppe for genmodifiserte organismer (FG 3):

Audun H. Nerland (leder), Åshild Andreassen, Per Brandtzæg, Askild Lorentz Holck, Olavi Junttila, Heidi Sjursen Konestabo, Richard Meadow, Kåre Magne Nielsen, Hilde-Gunn Hoen-Sorteberg og Rose Vikse.

Koordinator(er) fra sekretariatet:

Arne Mikalsen

Merethe Aasmo Finne

Terje Haraldsen

Innholdsfortegnelse

Bidragstere	2
Innholdsfortegnelse	3
1 Bakgrunn	4
2 Oppdrag fra mattilsynet	5
3 Vurdering av risikoen for adjuvanseffekter av Cry-proteiner	6
3.1 Fareidentifisering	6
3.2 Farekarakterisering	16
3.3 eksponeringsvurdering	17
3.4 Risikovurdering	21
4 Konklusjon	22
Referanser	24

1 Bakgrunn

Det har vært knyttet bekymring til hvorvidt genmodifiserte planter kan uttrykke allergener og føre til økt forekomst av allergi i befolkningen (Goodman et al. 2008). Tidligere Ny matgruppen under Statens næringsmiddeltilsyn påpekte allerede i 2000 en mulig allergirisiko ved mat basert på genmodifiserte planter (GM-planter) der det var satt inn gener fra *Bacillus thuringiensis* (Bt) som uttrykker Cry-proteiner (Bt-toksiner). Slike Cry-proteiner kan tenkes å virke som et immunologisk adjuvans og dermed fremme immunreaksjoner mot andre komponenter (allergener) i maten. VKMs Faggruppe for genmodifiserte organismer (FG3) har siden 2004 sendt innspill til EFSA om eventuelle adjuvanseffekter av Cry-proteiner ved inntak av matvarer som inneholder slike proteiner. I forbindelse med et møte om Cry-innspillene fra FG3 med EFSA's GMO Panel i 2009, ble det uttrykt konsensus om at insekttoksinet Cry1Ac er et adjuvans. Det ble vist til at det var dokumentert adjuvanseffekt av Cry1Ac i dyreforsøk ved at IgM-, IgG- og IgA-responsen ble forsterket mot hepatittvirusantigen og bovint serumalbumin. EFSA påpekte imidlertid at det manglet metoder for å undersøke adjuvanseffekter på rutinemessig basis og anså det ikke som sannsynlig at Cry1Ac og andre Cry-proteiner representerer noen helserisiko for forbrukere som inntar produkter fra Bt mais.

Med bakgrunn i faggruppens risikovurderinger av ulike typer Bt-mais, har Norge fremmet viktigheten av å inkludere mulige adjuvanseffekter ved risikovurdering av proteiner, både på Codex møter og EU SCFCAH-møter. EFSA har imidlertid gjentatte ganger påpekt at det ikke er sannsynliggjort at Cry-proteiner gir adjuvanseffekter som utgjør en helserisiko. VKM og Mattilsynet har derfor sluttet med å gi slike innspill til EU-organer. Imidlertid har EU kommisjonen kommet med utkast til en ny forordning som endrer implementeringsreglene vedrørende søknader om genmodifisert mat og fôr. Her har det kommet med et avsnitt (1.5.3) som pålegger søker å vurdere adjuvanseffekt av det nye proteinet i tilfeller der det kan være grunn til slike mistanker (for eksempel ved strukturlikheter med kjente adjuvanter).

I 2011 initierte FG3 selv en rapport om adjuvans og nedsatte en arbeidsgruppe bestående av Audun H. Nerland, Martinus Løvik, Per Brandtzæg og Arne Mikalsen. I rapporten ble det gått gjennom eksisterende litteratur om mulige Cry adjuvanseffekter. Rapporten påpekte også kunnskapshull, men det ble ikke skrevet noen risikovurdering av spesifikke *cry*-gener og Cry-proteiner.

Den 06.12.2011 sendte Mattilsynet en formell bestilling på en risikovurdering (se kapittel 2. oppdrag fra Mattilsynet). VKM etablerte da en prosjektgruppe som fikk i oppdrag å utarbeide en risikovurdering på grunnlag av rapporten fra arbeidsgruppen.

2 Oppdrag fra mattilsynet

Mattilsynet ber VKM lage en kort vurdering med konklusjoner om sannsynlighet for helseisiko ved tilstedeværelse av gener fra *Bacillus thuringiensis* som uttrykker Cry-proteiner i genmodifiserte planter. I vurderingen må det klart skilles mellom sannsynlighet for sensibilisering mot allergener ved inntak av genmodifisert råvare og inntak av prosesserte genmodifiserte produkter ved bruk av planten som mat og fôr. Videre må det tydelig framkomme om det kan være forskjeller i adjuvanseffekt mellom oral eksponering (slimhinneeksponering) og eksponering via luftveiene av Bt-toksiner.

Det finnes 67 forskjellige grupper av Cry-proteiner. Det er ønskelig, hvis mulig, å få en oversikt over andre Cry-proteiner enn CryAc1 som potensielt kan ha adjuvanseffekt. Det er videre ønskelig at oppsummeringen synliggjør eventuelle kunnskapshull om adjuvanseffekt av Cry-proteiner.

Da Mattilsynet eventuelt vil bruke VKMs risikovurdering i SCFCAH sammenheng, ber vi om at vurderingen lages som en kort oppsummering med tydelige konklusjoner både på norsk og engelsk. Det er ønskelig at vurderingen ikke er lengre enn ca. to sider. Arbeidsgruppens foreliggende rapport om adjuvans kan oversendes som et eget vedlegg til risikovurderingen.

3 Vurdering av risikoen for adjuvanseffekter av Cry-proteiner

3.1 FAREIDENTIFISERING

3.1.1 UHELDIGE IMMUNREAKSJONER MOT MAT

Uheldige, skadelige immunologiske matreaksjoner kan bero på flere av såkalte hypersensitivitetsmekanismer (Gell og Coombs klassifisering I–IV): IgE-mediert straksreaksjon (Type I), antistoff-mediert cytotoxicitet (Type II), immunkompleks-mediert, komplementavhengig reaksjon (Type III) og forsinket celleformidlet hypersensitivitet (Type IV).

Type I (IgE-mediert) reaksjon er den mest vanlige form for allergi. Den kan være svært akutt og i verste fall fatal. Det er den typen som oftest assosieres med matallergi. Men uheldige immunologiske reaksjoner som er forårsaket av de andre tre immunologiske mekanismene kan både være plagsomme og skadelige for personene det gjelder. Ved allergi kan flere av disse immunologiske reaksjonene være involvert på samme tid. For at uheldige reaksjoner på mat skal kunne oppstå, må en predisponert person bli utsatt for matkomponenter på en slik måte at vedkommende blir sensibilisert, noe som i klinisk forstand gjerne påvises ved overproduksjon av IgE-antistoffer. Som en del av denne prosessen vil vedkommende enten ikke utvikle, eller få nedbrutt, sin immunologiske toleranse mot matkomponenten (allergenet).

3.1.2 ADJUVANSERS IMMUNSTIMULERENDE EGENSKAPER

Adjuvans (av latin *adjuvare*, hjelpe) er stoff som øker immunresponsen og er best kjent i forbindelse med vaksiner. Et adjuvans stimulerer immunresponsen mot et antigen/allergen som administreres samtidig ("bystander effect") og kan noen ganger selv være et antigen. Adjuvansvirkningen kan ha ulike uttrykk – immunresponsen kan komme raskere, være lengre, være sterkere (kanskje den viktigste effekten), eller den kan få en bestemt karakter (f.eks. cellulær kontra humoral immunitet, eller Th1- kontra Th2-respons). Et såkalt Th2-adjuvans vil særlig øke Th2-responsen, mens et såkalt Th1-adjuvans særlig vil øke Th1-responsen. I alt vesentlig er det samsvar mellom adjuvansaktiviteten hos menneske og ulike forsøksdyr slik som mus, men noen artsforskjeller er observert (Roberts et al. 2005).

Adjuvanset blir vanligvis blandet med det antigenet det skal immuniseres mot, men det kan ha en viss effekt også om det blir gitt på samme sted kort tid før eller etter antigenet/allergenet. Noen adjuvanser gir kraftig økt effekt etter kjemisk kobling med antigenet. Dette gjelder f.eks. den isolerte koleratoksin B-subenheten (CTB).

Effekten av adjuvans vil i høy grad avhenge av hvordan immuniseringen skjer. Et adjuvans som gir en ønsket virkning ved injeksjon, kan gi liten eller ingen effekt hvis immuniseringen skjer via slimhinner, hvor også permeabilitetsøkningen av epitelet kan være viktig. Det er derfor spesielt adjuvans som virker i forbindelse med slimhinner (mukosal adjuvans) som er relevant når det gjelder indusering av uønskede immunologiske reaksjoner mot mat. Slimhinnebarrieren skal hindre antigene fremmedkomponenter å komme i for nær kontakt med immunsystemet. Det er få PRR ("pattern recognition receptors", dvs. reseptorer som gjenkjenner utviklingsmessig konserverte mikrobielle strukturer) til å binde antigener på den siden av tarmepitelet som vender mot lumen (apikalsiden) fordi disse reseptorene vesentlig er

lokalisert enten intracellulært eller basolateralt på epitelcellene. For å få en immunrespons må derfor antigenet enten bli tatt opp av cellene eller på annen måte penetrere epitellegget.

De biologiske mekanismene for adjuvans-effekten er bare delvis klarlagt og kan skisseres slik:

- (a) Transporteffekt (adjuvanset kan hindre nedbrytning av antigenet og transportere det til en gunstig lokalisasjon for immunstimulering). Dette innbefatter mekanismer som gjør at antigenet kan krysse epitelbarrierer.
- (b) Depoteffekt (adjuvanset kan hindre rask fjerning av antigenet, binde det og sette det langsomt fri for å få stimulert immunsystemet over lengre tid).
- (c) Irritasjons- og stimulerings-effekt (gir økt tilstrømning av immunceller til immuniseringsstedet og aktiverer cellene til respons, både antigen-presenterende celler (APC) og lymfocytter). Slike egenskaper vil gi det nødvendige tilleggssignal ("dager signal") som immunsystemet må ha for å bli stimulert (og ikke nedregulert) mot et antigen/allergen.

To-signalthypotesen bygger på at i tillegg til det antigenspesifikke signalet (Signal 1) gjennom T-cellerreseptoren, er det nødvendig med ko-stimulering (Signal 2) for spesifikt å aktivere naive (lymfocytter som tidligere ikke har møtt "sitt" antigen) T-celler. Slik ko-stimulering skjer f.eks. ved at CD28-molekylet på T-cellene binder molekylene CD80 og CD86 på antigen-presenterende celler (APC). To-signalthypotesen er videreutviklet på to måter. I følge Matzingers "dager theory" (Matzinger 1994) skiller ikke immunsystemet mellom 'selv' og 'ikke-selv', men mellom farlige og ikke-farlige endogene stimulerings-signaler. Janeway introduserte et "Signal 0" fra patogene mikrober som reagerer med f.eks. PRR på APC og setter cellen i alarmtilstand (Janeway 1989). Nå synes begge teoriene å møtes ved at PRR på APC kan reagere både på endogene "dager signal" og "mikrobielt ikke-selv". I adjuvanssammenheng er poenget at virkningen ikke bare behøver å være på APCs eksponering for antigen (hindre nedbrytning, transport, antigen-konsentrering, antigen-fokusering, endret permeabilitet i tarmepitelet), men også ved å generere cellulære tilleggssignaler og ko-stimulering som kan øke eller endre immunresponsen. Det må poengteres at adjuvans-effekter ofte er viktige for å indusere adaptiv (ervert) beskyttende immunitet, og derfor ikke er å betrakte som skadelig *per se*.

3.1.2.1 *Begrensninger i metode*

Utvikling av matallergi skyldes et komplekst samspill av faktorer som genetisk predisposisjon, alder ved introduksjon av allergenet, amming, sammensetning av ernæring, sammensetning av tarmfloraen og infeksjonsstatus i mage-tarmsystemet (van Wijk & Knippels 2007, Brandtzaeg 2010a). Dette gjør studier av allergi og adjuvans svært komplisert. Det finnes ingen validerte metoder for å måle adjuvans-effekter. Kompleksiteten i immunsystemer fremgår f.eks. i en rottestudie (De Jonge et al. 2007). Dyrene som gikk på streng allergenfri diett i 3 generasjoner ga IgE-respons etter eksponering til allergenet, mens rotter som gikk på allergenfri diett i bare én generasjon ga ingen slik IgE-respons etter indusering.

3.1.2.2 *Kunnskapshull*

Det er modellusikkerhet knyttet til forståelsen av immunsystemet og hvordan samspillet mellom individ og miljø (herunder adjuvans-eksponering) hindrer eller induserer allergiske responser. Adjuvansbegrepet er ikke klart avgrenset når det gjelder mekanismer og hvor

indirekte et stoff kan virke for å øke immunresponsen og likevel kalles et adjuvans. Stoff som virker direkte på cellulære mekanismer vil utvilsomt regnes som adjuvans, men noen stoff kan øke immunresponsen mer indirekte, f.eks. ved å redusere nedbrytningen av et antigen, i tillegg til transport- og depoteffekten som alt er nevnt. Standardiserte metoder for å systematisk undersøke stoff for mulig adjuvanseffekt er pr. i dag ikke tilgjengelige.

3.1.3 CRY- PROTEINER

Cry-proteiner (Bt-toksiner) er krystalliske toksiner som syntetiseres av den Gram-positive sporedannende bakterien *Bacillus thuringiensis* (Bt). Det er til nå identifisert mer enn 500 forskjellige *cry*-gensekvenser som kan klassifiseres i 67 forskjellige grupper av Cry-proteiner. På aminosyrenivå kan disse proteinene være svært forskjellige, men det finnes beslektede aktive domener.

Det krystallinske Cry-proteinet (parasporallegeme) lages under sporulering av bakterien. Disse proteinene virker som toksiner mot insekter. Virkningsmekanismen for Cry-proteinene er at krystallene blir oppløst i midttarmen til insektlarvene, og deretter blir protoksinene kuttet av vertsproduserte proteaser, noe som fører til aktive toksiner. Dette krever et alkalisk miljø. Toksinene binder seg til reseptorer på mikrovilli i midttarmen og lager hull eller porer i cellemembranen. Som en følge av dette blir epitellaget mer permeabelt og bakterier vil kunne infisere insektlarven (Broderich et al. 2006), noe som medfører at insektlarvene dør.

Spesifisiteten til ulike Cry-proteiner for ulike insektarter gjenspeiler trolig variasjoner i bindingevnen til reseptorene på mikrovilli. Hvilke reseptorer som er involvert, og hvordan toksinet binder seg, er bare delvis kartlagt. For toksiner av typen Cry1 har flere mulige reseptorer vært foreslått: "cadherin-like proteins" (Ibrahim et al. 2010), "glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored aminopeptidase-N (APN)", "GPI-anchored alkaline phosphatase (ALP)", og et 250 kDa protein kalt P252. Glykolipider er også blitt beskrevet som bindingsreseptorer. *In vivo*- og *in vitro*- bindingsstudier på intestinalt vev fra gnagere, Rhesusape og menneske indikerer fravær av spesifikke bindingssteder for Cry1Ab-proteinet (Noteborn & Kuiper 1995).

Kun insekter som har reseptorer som binder spesifikke Cry-proteiner er følsomme for disse. Cry-proteiner som i dag er i bruk i GM-planter er undersøkt i en rekke standardiserte (OECD) tester og er ikke funnet å være akutt-toksiske for pattedyr (EHC 217).

Mais MON810 som inneholder Cry-proteinet Cry1Ab er blitt brukt som fôr i norske fôringsstudier på laks (Sanden et al. 2005, 2006; Hemre et al. 2007; Sagstad et al. 2007; Bakke-McKellep et al. 2008; Frøystad-Saugen et al. 2009; Sissener et al. 2010). Det er påvist endringer mellom fôr fra GM-mais og umodifisert mais, men endringene som ble påvist var ikke doserelaterte (Sissener et al. 2011a). Forskjellen mellom GM-mais og umodifisert mais var imidlertid liten (Sissener et al. 2011a). I et forsøk ble det påvist høyere antall granulocytter i blodet til laks føret med GM-mais enn laks føret umodifisert mais. Endringene ble relatert til mild cellulær stressrespons (Frøystad-Saugen et al. 2009). I en nyere studie utført av Sissener et al. (2011b) ble det påvist 90 µg/kg av mykotoksinet dioxynivalenol (DON) i MON810, mens DON ikke ble påvist i den umodifiserte maisen (dvs. lavere enn 2,5 µg/kg). De påviste effektene på laks føret med MON810 synes å være mer relatert til innholdet av DON enn til andre påviste forskjeller for andre metabolitter (Sissener et al. 2011b).

3.1.3.1 *Kunnskapshull*

Det er modellusikkerhet knyttet til den generelle toksiske virkningsmekanismen til Cry-proteinene i insekter. Videre mangler det kunnskap på faktorer som definerer vertsspesifisitet, og hvorvidt aktive toksiner har samme vertsbredde og spesifisitet som protoksiner.

3.1.3.2 *Cry-proteiner i Bt-baserte plantevernmidler*

Cry-proteiner er også til stede i kommersielle *B. thuringiensis*- baserte plantevernmidler for insektkontroll på planter både i økologisk og konvensjonelt landbruk. Disse plantevernmidlene er godkjent i de fleste land i verden og søkt godkjent i Norge. Bt-plantevernmidler har vært på det europeiske markedet siden ca. 1938, da det første europeiske kommersielle produktet (Sporeine) ble markedsført. Først i 1961 ble Bt-plantevernmidler registrert for markedsføring i USA (Sanahuja et al. 2011). Det er i dag svært mange produkter på markedet. Eksempler på Bt- *kurstakii* -baserte produkter er Bobit, Dipel, Delfin, Thurex, Thuricide m.fl. Bt- *aizawai*- produkter er Florbac og Bt- *isrealensis*- produkter er Acrobe, Bacimos m.fl. Antatt mengde som selges pr. år av slike plantevernmidler (biopesticider) er mer enn 3000 tonn (Gupta & Dikshit 2010).

3.1.3.3 *Cry-proteiner i planter.*

På midten av 1980-tallet ble tobakksplanter, tomat og potet modifiserte med gener som uttrykker Bt-toksinproteiner (Sanahuja et al. 2011). I 1986 ble de første feltforsøkene med GM-tobakksplanter som uttrykte Cry1A-toksin utført i USA og Frankrike (James & Krattinger 1996). Plantene viste seg ikke å uttrykke Cry-proteinet i tilstrekkelig store mengder til at tobakksplanter kunne få særlig stor kommersiell betydning i forhold til Bt-sprøytemidler. Det ble også vist for tomat og bomull at motstandskraften mot skadeinsekter var for lav, slik at heller ikke disse kunne få kommersiell betydning (Perlak et al. 1991). For å få tilstrekkelig uttrykk av Bt-toksiner ble det utført endringer i Cry-gensekvensene slik at de ble mer lik plantegensekvenser. Samtidig ble det også satt inn promotere som medførte høyere uttrykk av Cry-proteiner (Perlak et al. 1991). I dag benyttes Bt-toksiner i hovedsak enkeltvis eller som kombinerte tilleggsegenskaper (stacked events, ”stacks”) i transgene mais-, tomat-, potet-, ris- og bomullsplanter for beskyttelse mot ulike insektlarver (Sanahuja et al. 2011).

Tabell 1: Cry-proteiner i mais, bomull og soya på grunnlag av markedsførings-søknader på EFSA Extranet.

«Event»	Cry1 Ab	Cry1A. 105	Cry 1Ac	Cry1 F	Cry2 Ab2	Cry2 Ae	Cry3 Bb1	Cry34 Ab1 + Cry35 Ab1	eCry 3.1 Ab1	mCry 3A
MAIS										
NK603xMON810 (01)	01 ¹									
1507(02)				02						
MON810xMON863 (03)	03									
1507xNK603(05)				05						
MON863xNK603(06)							06			
MON810xMON863xNK603(07)	07						07			
MIR604(11)										11
59122(12)								12		
1507x59122(15)				15				15		
1507xNK603(17)				17						
59122xNK603(20)				20				20		
59122x1507xNK603 (21)				21				21		
MON88017(27)							27			
1507x59122(28)				28				28		
1507x59122xNK603 (30)				30				30		
MON88017xMON810(33)	33						33			
MON89034(37)		37			37					
MON89034xNK603 (38)		38			38					
MON89034xMON88017(39)		39			39		39			
MIR604xGA21(48)										48
Bt11 x GA21 (49)	49									
Bt11xMIR604(50)	50									50
Bt11xGA21xMIR604 (56)	56									56
MON89034x1507xMON88017x59122(62)		62		62	62		62	62		
1507xMON89034xNK603(65)		65		65	65					
Bt11xGA21xMIR162xMIR604(66)	66									66
Bt11xGA21xMIR162 (67)	67									

«Event»	Cry1 Ab	Cry1A. 105	Cry 1Ac	Cry1 F	Cry2 Ab2	Cry2 Ae	Cry3 Bb1	Cry34 Ab1 + Cry35 Ab1	eCry 3.1 Ab1	mCry 3A
MON88017xMON89034 (71)		71			71		71			
MON89034xNK603 (72)		72		4	72					
Bt11xMIR162x1507xGA21(86)	86			86						
1507x59122xMON810xNK603 (92)	92			92				92		
5307 (95)										95
Bt11x59122xMIR604x1507xGA21(99)	99			99				99		99
Bt11xMIR162xMIR604x1507x5307xGA21 (103)	103			103						103
3272xBt11xMIR604xGA21(105)	105									105
SOYA										
Mon87701xMON89788(73)			73							
MON87701(79)			79							
BOMULL										
MON1445 x MON531 (09)			09							
281-24-236x3006-210-23(16)			16	16						
MON15985xMON88913(42)			42		42					
MON15985 (57)			57		57					
MON1445xMON1585 (58)			58		58					
281-24-236x3006-210-23xMON88913 (68)			68	68						
GHB614xLLcottonxMON15985 (94)			94		94					
GHB119(96)						96				
T304-40(97)	97									

¹ Tallene er dossiernumrene til markedsføringsøknadene på Extranet (for eksempel 01 = EFSA/GMO/UK/2004/01)

På verdensbasis ble det i 2010 dyrket 10,2 millioner hektar Bt-mais. I seks EU-land ble det i 2011 tilsammen dyrket ca. 114000 hektar Bt-mais (Spania, Portugal, Tsjekkia, Polen, Slovakia og Romania). Ca. 85 % av Bt-maisarealet i EU dyrkes i Spania. På verdensbasis ble det dyrket 75,4 millioner hektar GM-soya i 2011 (James No 42 & 43 2011), men

dyringsarealet for Bt-soya er foreløpig langt lavere enn for herbicidtolerant soya. Bomullsproteiner benyttes ikke som mat.

Noen relevante forskjeller mellom Bt-toksinene som benyttes i bakteriepreparater og de i GM-planter er at:

- i) Cry-proteinene er til stede i plantene over lengre tid, ikke bare i etterkant av sprøyting (OECD, 2007);
- ii) Konsentrasjonen av Bt-proteiner på sprøytete druer er langt lavere enn det som er i Bt-planter. Prosjektgruppen har gjort følgende sammenligning: En gjennomsnittlig bakteriecelle har en vekt på ca 1 pg. <http://hypertextbook.com/facts/2003/LouisSiu.shtml>. Dersom innholdet av *B.thuringiensis* på druer etter sprøyting er 10^4 pg/g, så vil innholdet av Cry-proteiner være 0,01 µg/g sammenlignet med innholdet i GM-planter hvor det kan variere mellom 1 og 80 µg/g;
- iii) Cry-proteinene som er til stede i planten representerer det aktive toksinet og krever ikke alkalisk miljø for aktivering, noe som er nødvendig for insektpreparater.;
- iv) De fleste Cry-proteiner som uttrykkes i planter er fremkommet ved endringer av nukleotidsekvenser i *cry*-genene, dvs økt innhold av guanin-cytosin. Gener hos sporogene gram-positive bakterier som *B. thuringiensis* har lavt guanin-cytosin innhold, i motsetning til planter som har høyt innhold av guanin-cytosin i genene. Nukleotid-endingene i bakteriegenene medfører ingen eller svært små endringer på aminosyrenivå i Cry-proteinene. Eventuelle endring på aminosyrenivå fører ikke til endringer av toksisiteten.
- v) flere nyere transgene planter inneholder «stacks» av flere typer (rekombinerte) *Bt*-gener.

3.1.4 ADJUVANSEFFEKTER AV KJENTE TOKSINER

Det er kjent at flere bakterielle toksiner har adjuvanseffekt i tarmkanalen til vertebrater som til dels gir sterk dominans av type 2T-hjelpecelle (Th2)-responser. Dette gjelder for eksempel stafylokokk-enterotoxin B (Liu et al. 2007; Ardern-Jones et al. 2007), pertussis-toksin (Ellertsen et al. 2010; Ryan et al. 1998) og *E. coli* varmelabilt enterotoksin (LT).

Det er stor strukturell og funksjonell likhet mellom koleratoksin (CT) og LT, som det finnes svært mye forskningslitteratur om (f.eks. Nawar et al. 2011; da Hora et al. 2011). CT produseres av bakterien *Vibrio cholerae*. Toksinet består av to subenheter, A og B (CTA og CTB). Den katalytisk aktive A-delen (en heterodimer) er ansvarlig for toksinets toksisitet, mens B-delen (en homo-pentamer) binder seg til gangliosid-reseptoren GM-1 på tarmens epitelceller og gjør at toksinet (og koblet antigen) kan komme inn i cellene (Blanchard et al. 1998).

De to sub-domenene (A1 og A2) i CTA har ulik funksjon. Den enzymatiske aktiviteten hos CTA ligger i A1-domenet, mens A2 forankrer CTA til CTB-pentameren, som så igjen binder seg til gangliosid på cellemembranen. For å oppnå adjuvanseffekt i museforsøk benyttes ofte isolert CTB. Forsøk tyder likevel på at en må ha en viss mengde (non-toksisk dose) CT for å få god effekt – isolert CTB virker (Blanchard et al. 1998) antakelig godt på grunn av litt kontaminasjon med intakt CT, mens rent CTB (rekombinant) ikke har adjuvanseffekt.

CT er klart det mest studerte toksin-baserte adjuvanset med en mengde eksperimentelle data (som nevnt særlig fra mus), men det er også publisert en klinisk studie på barn (Qadri et al. 2006). CT er et immunmodulerende agens med flere virkninger idet det stimulerer både til Th2-respons (Su et al. 2004) og Th17-respons (Lee et al. 2009). Som andre bakterielle toksiner, kan det også indusere immuntoleranse i visse situasjoner (Sun et al. 1994;

Wiedermann et al. 1999). CT er blitt benyttet i eksperimentell behandling av organspesifikk autoimmun sykdom i dyr fordi den opprinnelige Th1-dominerte responsen mot autoantigen etter immunisering med CT-konjugert autoantigen ble vridd over til en mer ufarlig Th2-respons (Sun et al. 1996).

CT og LT blir ansett som klassiske mukosale adjuvaner og ofte brukt som referanse i forskningsstudier. Når disse proteintoksinene binder seg til gangliosid på overflaten av tarmens epitelceller, økes permeabiliteten i tarmveggen og dermed opptak både av konjugerte proteiner og av ko-administrerte proteiner. Matvarer (både konvensjonelle og mat basert på GMO) som inneholder komponenter med CT- eller LT-liknende egenskaper, bør en derfor granske spesielt for uheldige immunologisk reaksjoner.

Et nytt element i kunnskapen om CT er at dette toksinet stimulerer kraftige pro-inflammatoriske Th17-responser, og at Th17-relaterte immunmekanismer synes å være viktige for adjuvanseffekten av CT (Datta et al. 2010; Lee et al. 2009). Th17-adjuvansaktiviteten er rapportert å avhenge av CTB og i liten grad av CTA (Lee et al. 2009).

3.1.4.1 Kunnskapshull

Det pågår aktiv forskning på den biologiske forståelsen av mukosale adjuvaner med hensyn på detaljerte virkningsmekanismer. Det er fremdeles uklart i hvilken grad kunnskap opparbeidet for klassiske mukosale adjuvaner (CT og LT) og modellsystemer kan overføres til forståelsen av mukosale effekter av Cry-proteiner i human tarmkanal.

3.1.5 ADJUVANSEFFEKTER AV KJENTE KOMPONENTER I MAT

Maten vi spiser inneholder en lang rekke stoffer som kan virke som adjuvaner (Berin & Shreffler 2008). Eksempler på disse stoffene er glukaner og lektiner, som er vanlige i alt plantemateriale, og kitin, en hovedbestanddel i celleveggen hos sopp. Adjuvanseffekten av de forskjellige matkomponentene antas i ulik grad å kunne bli ødelagt ved prosessering av maten.

Noen matvarer har et høyt innhold av lektiner, slik som bønner, korn, frø og nøtter. Disse kan være skadelige hvis de spises i for store mengder rå eller ved for liten varmebehandling. Uønskede effekter kan være mangelsykdommer og allergiske reaksjoner (Cordain et al. 2000).

Fruktaner, en annen gruppe av adjuvaner, er polymerer av fruktosemolekyler. Fruktaner med kort kjedelengde blir kalt fruktooligosakkarider, mens lengre kjeder blir kalt inuliner. Fruktaner finnes i en rekke forskjellige matvarer som artisjokker (2-7 %), asparages (1,4 - 4,1 %), hvitløk (17,4 %), løk (1-10 %) og hvete (1-4 %). Inulin finnes i store mengder i skorsonerrot (svartrot, 15 %) og jordskokk (50 %).

Peanøttallergenet Ara H1 er samtidig en Th2 adjuvans (Shreffler et al. 2006) og utgjør 12-15 % av proteinet i peanøtter (Koppelman et al. 2001). Peanøtt inneholder 25 % protein. Spiser vi en neve peanøtter (50 gram) får vi i oss rundt 2 gram Ara H1.

3.1.5.1 Kunnskapshull

Biologiske mekanismer som bidrar til sensibilisering med matallergener er fremdeles lite kjent (Berin & Shreffler 2008, Brandtzaeg 2010a). Det er kunnskapsmangel i forståelsen av hvordan naturlig forekommende substanser i mat kan ha mulige adjuvanseffekter. Mye er

fremdeles ukjent med hensyn på hvordan mat gir immunologiske effekter generelt og hvordan kosten påvirker sammensetningen av tarmens mikrobiota. Derfor er det uklart i hvilken grad mat-komponentene som skissert over bidrar til utvikling av matallergi, kvantitative aspekter ved dette, samt under hvilke betingelser slike effekter eventuelt utløses og hvordan de varierer med individ og miljø.

3.1.6 ADJUVANSEFFEKTER AV CRY-PROTEIN

Kun Cry1Ab og Cry1Ac har vært eksperimentelt studert med hensyn på adjuvanseffekt. Det er i dyrestudier av Cry1Ac-proteinet vist at det binder seg til musetarmoverflaten og induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og mot proteiner som ble gitt samtidig (Vázquez et al. 1999 a, b; Vázquez-Padrón et al. 2000 a, b; Moreno-Fierros et al. 2003; Rojas-Hernandez et al. 2004). Immunologisk kartlegging av systemisk og mukosal immunrespons på Cry1Ac har videre vist at mus lager både systemisk IgM, IgG og sekretorisk IgA etter intraperitoneal og intragastrisk immunisering (Vázquez-Padrón et al. 1999 a; Vázquez-Padrón et al. 2000 a, b).

Domenene II fra Cry1Ab og Cry1Ac genererer ulik immunologisk respons i kanin (Vazquez-Padron et al. 1998). I en annen studie med mus er det vist at Cry1Ac hadde utpreget mukosal adjuvanseffekt ved å øke IgM-, IgG- og IgA-responsen mot hepatittvirusantigen og bovint serumalbumin som ble gitt med sondeføring samtidig med Cry1Ac (Vazquez-Padron et al., 1999a). Produksjonen av IgE-antistoff ble ikke målt i denne studien.

Også i tidligere studier er det påvist adjuvanseffekt av krystallprotein fra *B. thuringiensis* (Prasad & Shethna 1975). Adjuvanseffekten av Cry1Ac er bekreftet i to senere publikasjoner med henholdsvis pneumokokk-antigen (Moreno-Fierros et al. 2003) og amøbe-lysate (Rojas-Hernandez et al. 2004). Adjuvanseffekten av Cry1Ac ble i én studie funnet å være like sterk som adjuvanseffekten av CT (Vazquez et al. 1999a).

I en senere studie (Guimaraes et al. 2008) ble adjuvanseffekten av Cry1Ab undersøkt i forbindelse med allergisk sensibilisering mot peanøttekstrakt. CT som Th2-adjuvans ble benyttet til sammenlikning. I disse forsøkene ble det ikke induert IgE ved bruk av Cry1Ab som adjuvans ved forsøk på oral sensibilisering, mens derimot CT ga effektiv stimulering til IgE-respons. Imidlertid hadde Cry1Ab en signifikant effekt på produksjon/frigivelse av leukotrienene E4 og C4, samt influks av eosinofile granulocytter, noe som tydet på at en immunreaksjon var utløst.

I et nylig forsøk ble ikke anti-Cry1Ab IgG1- eller IgG2a-antistoffer påvist etter å ha gitt 100 ug Cry1Ab protein intragastrisk til mus (Adel-Patient et al. 2011). Tatt i betraktning den store sekvenslikheten mellom Cry1Ab og Cry1Ac, antyder forfatterne at tidligere immunrespons funnet hos Vázquez-Padrón et al. (2000 a, b) kan skyldes at disse hadde kontaminering av bakterielt endotoksin i Cry1Ac preparatene sine.

Etter det vi kjenner til, foreligger det ikke publiserte eksperimentelle studier av mulige immunologiske effekter eller adjuvanseffekter forårsaket av Cry1F, Cry2ab2, Cry3A, Cry3Bb1, Cry34Ab1, og Cry35Ab1.

Det foreligger begrensede antall publiserte studier som tyder på immunologiske effekter. Selv om mange av de andre Bt-toksinene har lav sekvenshomologi til Cry1Ac- proteinet, så deler de alle den samme effektormekanismen ved at de binder seg til epitelceller i insektarmen og gjør epitellaget mer permeabelt. Denne funksjonelle likheten mellom Cry proteinene gjør at faggruppen stiller spørsmål om også andre Cry- proteiner enn Cry1Ac kan ha adjuvanseffekt i mammalske systemer, selv om virkningsmekanismen her er ukjent.

Til tross for at musemodeller har likheter med humane immunologiske mekanismer, må resultater fra dyremodeller tolkes med forsiktighet. Dyremodeller vurderes generelt ikke å ha blitt tilstrekkelig validert til å kunne nøyaktig predikere potensielle allergene og immunologiske effekter hos mennesker etter intragastrisk eksponering av proteiner (Goodman et al. 2008, Thomas et al. 2009, Codex 2009)

3.1.6.1 *Kunnskapshull*

Det er utført få studier på mulige immunologiske effekter av Cry- proteiner i mammalske systemer. Kunnskap om mulige adjuvanseffekter av Cry- proteiner er basert på et begrenset antall studier av Cry1Ac- protein og Cry1Ab -protein i dyremodeller. Det foreligger ikke eksperimentelle studier av eventuelle effekter av kombinasjoner av ulike Cry- proteiner (stacks). Det mangler også eksperimentelle studier som ser på kvantitative aspekter ved immunstimuleringen.

3.1.7 **”BYSTANDER”-SENSIBILISERING VED ØKT PERMEABILITET I TARMEPITELET**

«Bystander»-sensibilisering kan oppstå når et adjuvans i maten, eller en immunreaksjon mot et matantigen, har evne til å øke tarmepitelets permeabilitet for andre komponenter i maten. Vázquez et al (1999a) konkluderer med at Cry1Ac har adjuvanseffekt i mus som er minst like stor som den CT gir når det gjelder å stimulere enkelte typer av immunresponser både ved intraperitoneal og mukosal applikasjon av antigen. Én forskjell synes likevel å fremkomme ved slike forsøk, nemlig at Cry-proteinet (Cry1Ac) driver immunresponsen mer mot et proinflammatorisk IgG-svar enn CT som fremmer en anti-inflammatorisk IgA-respons når det gis sammen med antigen som oral vaksine (Vázquez et al 1999).

Når de administreres sammen med løselige proteiner som alene er dårlige immunogener, vil både Cry-proteinene og CT kunne fremme en sterk kryss-stimulering samtidig som de stimulerer en kraftig immunrespons mot seg selv.

Disse eksperimentelle observasjonene tyder på at Cry-proteiner, slik som CT, vil kunne hemme en normal utvikling av immunologisk toleranse mot matproteiner (”oral toleranse”). Denne problemstillingen er testbar i relevant musemodell med standardisert foringsforsøk.

Tidligere ble det antatt at epitelcellene i tarmen var permanent ”limt sammen” av de såkalte ”tight junctions”. Nå vet vi at disse komplekse proteinstrukturene er dynamiske og vil åpnes opp av forskjellige stimuli. I 2005 ble det dokumentert i en musestudie at det transgene proteinet α -amylaseinhibitor i kosten kan åpne opp barrieren i tarmslimhinnen slik at det lekket inn bystander-protein (ovalbumin) som induserte IgG-respons og tegn på hypersensivitet i luftveiene (Prescott et al. 2005). Induksjon av IgG-antistoffer mot de aktuelle matproteinene, og eventuell kryss-sensibilisering mot et samtidig nærværende matantigen, vil kunne medføre uønskede biologiske effekter. Eksperimenter som er utført både *in vitro* og *in vivo* har vist at når en IgG-respons (som medfører komplementaktivering) ikke blir balansert av en IgA-respons, så vil epitelbarrieren åpnes opp (Brandtzaeg & Tolo 1977; Lim & Rowley 1982) og uvedkommende proteiner vil da kunne trenge inn i kroppen (”bystander”-penetrasjon) og føre til immunologisk sensibilisering.

Det finnes altså flere teoretiske muligheter for at Cry-proteiner kan fremme sensibilisering mot matproteiner som er kjent for å kunne gi allergi, uten at Cry-proteinene selv er allergener eller inneholder IgE-epitoper.

3.2 FAREKARAKTERISERING

3.2.1 MULIG ADJUVANSEFFEKT AV CRY- PROTEINER I MAT

Cry1Ac proteinet er vist i musemodellforsøk å virke som mukosal adjuvans ved å kunne stimulere IgM-, IgG- og IgA- produksjon. Faggruppen stiller derfor spørsmål om denne adjuvanseffekten kan føre til økt forekomst av allergi mot andre proteiner ("bystander"-effekt) ved inntak av mat fra genmodifiserte planter som inneholder Cry-proteiner.

Induksjon av IgE er ikke vist for Cry-proteinene, men det er få publikasjoner der dette er målt. Det finnes begrenset litteratur på området omkring betydning av adjuvanseffekt for induksjon av IgE-mediert allergisk respons i forbindelse med matallergi. I en musemodell for allergiutvikling mot lupin ga bruk av CT økt immunrespons for andre klasser av immunglobuliner, men ingen IgE respons. Forfatterne antyder at en IgE-respons er mer avhengig av indre egenskaper ved allergenene, og ikke relatert til CT-adjuvans (Foss et al. 2006). Det er uklart om/hvordan Cry-proteiner binder seg til mammalsk tarmepitel. Vázquez-Padrón et al. (2000b) viste spesifikk binding til seks isolerte proteiner fra børstesømmen i musetyntarm, mens Noteborn & Kuiper (1995) ikke kunne finne spesifikk binding til mammalsk tarmepitel. Bindingsstudier av Cry-proteiner til tarmepitelceller har vist at denne bindingen er ikke-spesifikk (Noteborn & Kuiper 1995). Det har vært uttrykt bekymring for at Cry- proteiner pga. sin adjuvanseffekt kan bidra til økt forekomst av allergi. Adjuvanseffekt er ikke å betrakte som en skadelig effekt *per se*. En immunrespons er *per se* heller ikke en indikasjon på allergen adjuvanseffekt. Det er ikke tilstedeværelsen av en immunrespons mot matantigener som gir grunnlag for matallergi, men typen av immunrespons (Berin & Shreffler 2008).

3.2.1.1 Begrensinger i metode

Forsøkene med immunisering med Cry-proteiner som adjuvans er utført med rene eller delvis rensede preparater av Cry-protein og allergen. Forholdene kan forventes annerledes når Cry-proteinene utgjør 0,01 % av tilstedeværende protein enn når det gis alene kun sammen med et rensert valgt allergen.

3.2.2 GENERELL KARAKTERISERING AV FARE

Faren ved immunologisk sensibilisering mot fødemidler er utvikling av matallergi. Dette er et alvorlig helseproblem i industrialiserte land og kan berøre opptil 2 % av den voksne befolkningen og 6-8 % av barna i Europa (Sicherer et al. 2003; Wuthrich 2000). Matallergi arter seg på mange forskjellige måter så diagnosen er ikke alltid entydig og det kan være vanskelig å identifisere årsakssammenhengen. Akutt og alvorlig allergisk reaksjon er IgE-mediert og det kan være nødvendig at pasienten bærer med seg en "adrenalinpenn" for injeksjon mot anafylaktisk sjokk. Matvareallergi mot melk og egg viser seg ofte i ung alder, og ca. 40 % av kumelkallergien synes ikke å være mediert av IgE. Andre typer allergi mot mat viser seg først i voksen alder, slik som IgE-mediert reaksjon på nøtter og fisk. Den allergiske reaksjonen er svært følsom og noen får alvorlige symptomer bare ved lukt av fisk eller støv fra nøtter eller mel. IgE-mediert allergi mot fisk og nøtter må i hovedsak regnes som et varig problem, mens kumelkallergi er noe barn gjerne vokser seg ut av. En alvorlig komplikasjon er at om lag 15 prosent av de IgE-medierte matallergiene går over i en såkalt "allergisk marsj" – dvs. at pasientene utvikler luftveisallergi og kan ende opp som astmatikere.

3.2.2.1 *Kunnskapshull*

Kun Cry1Ab og Cry1Ac har vært studert med hensyn på adjuvanseffekt. Selv om mange av de andre Bt-toksinene har liten sekvenshomologi med Cry1Ac, så har de alle samme effektormekanismen ved at de binder seg til epitelceller hos insektene og gjør epitellaget mer permeabelt. Det er ukjent om andre Cry- proteiner har liknende adjuvanseffekt som Cry1Ac og Cry1Ab.

Begrensninger i kunnskap omkring adjuvans gir stor usikkerhet i risikokarakteriseringen og dette gjelder spesielt de Cry-proteinene som ikke er studert for slik effekt.

3.3 EKSPONERINGSVURDERING

3.3.1 FOREKOMST AV CRY-PROTEINER I MAT

3.3.1.1 *Cry-protein i GM-planter*

Mais er her brukt som et eksempel siden dette er den mest aktuelle planten og mais er også den viktigste humane eksponeringskilden til Cry-proteiner.

Tabell 2. Gjennomsnittlig maisinntak i Europa, fra GEMS/Food European Country Cluster Diets.

Cluster	Countries Included	Maize consumption ¹
B	Cyprus, Greece, Israel, Italy, Lebanon, Portugal, Spain, Turkey, United Arab Emirates	148.4
D	Albania, Armenia, Azerbaijan, Belarus, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Georgia, Iran (Islamic Rep of), Kazakhstan, Kyrgyzstan, Moldova (Republic of), Romania, Russian Federation, Serbia and Montenegro, Tajikistan, The former Yugoslav Republic of Macedonia, Turkmenistan, Ukraine, Uzbekistan	31.8
E	Austria, Belgium, Croatia, Czech Republic, Denmark, France, Germany, Hungary, Ireland Luxembourg, Malta, Netherlands, Poland, Slovakia, Slovenia, Switzerland, United Kingdom	33.3
F	Estonia, Finland, Iceland, Latvia, Lithuania, Norway, Sweden	7.5

¹ Total maize consumption (CODEX code GC 645) expressed in g per person per day.

Kilde: Pioneer Hi-Bred Int, EFSA-søknad mais 1507x59122xMON810xNK603 (EFSA/GMO/NL/2011/92).

Det er gjort inntaksberegninger for gjennomsnittlige maisinntak i Europa (se tabell 2). I henhold til tabellen varierer det estimerte inntaket fra 7,5 -til 148,4 g/dag. Mengden Cry protein i maiskorn varierer mye og ligger i størrelsesorden 1 til 80 µg/g våtvekt avhengig av hvilke Cry-protein som uttrykkes. Uttrykk av Cry-proteiner i maiskorn fra fôrmais er dokumentert i markedsførings søknader som ligger på EFSA's Extranett.

Teoretiske beregninger viser at dersom inntaket av mais i Europa kommer fra en GMO mais med fire forskjellige Cry-proteiner, og som inneholder totalt ca. 37 µg Cry-protein/g tørrvekt vil dette kunne medføre et inntak for en person på 61,8 kg på ca. 90 µg Cry-protein/kg kroppsvekt/dag (se tabell 3). Den totale inntaksmengden av Cry protein for et voksent individ

som veier 61,8 kg vil bli ca. 5550 µg/dag. Dersom en legger forsøket på gris (Chowdhury et al. 2003) til grunn for fordøyelse av Cry-proteiner, vil en kunne hos en voksen person gjenfinne ca. 400 µg/g avføring. For de estimerte inntaksmengdene av Cry-proteiner som er presentert her er det ikke tatt hensyn til eventuelle nedbrytning av proteinene ved prosessering.

Tabell 3. Teoretisk daglig inntak av Cry-proteiner.

Protein	Concentration in grain [ng/mg DW]	TMDI of protein ¹ [mg/kg bw/day]
CRY1F	3.9	0.0094
CRY34Ab1	32	0.0769
CRY35Ab1	1.20	0.0029
PAT	0.099	0.0002
CRY1Ab	0.23	0.0006
CP4 EPSPS	13	0.0312

¹ Based on a maize consumption of 148.4 g/person/day and a mean body weight of 61.8 kg

Tabellen viser teoretisk inntak av Cry-proteiner. Tabellen er hentet fra Pioneer Hi-Bred sin EFSA-markedsførings søknad av mais 1507x59122xMON810xNK603.

De mengder Cry1Ac som ga mucosal adjuvanseffekt ved sondefôring av mus var fra 10 µg til 100 µg/mus (Vazquez et al. 1999). De mengdene av Cry- protein en vil få i seg ved å spise rå GM- mais ligger i samme størrelsesorden som de mengdene som ble benyttet ved immunisering i museforsøkene. I mais vil Cry proteinet utgjøre mindre enn 0,01 % av proteinet i maten. I museforsøkene var adjuvanset blandet med peanøttekstrakt. I et mais-måltid vil Cry- proteinene være blandet med de andre ikke-allergene proteinene fra mais samt eventuelle potensielt allergene matvarer som inngår i måltidet. Den lave konsentrasjonen i human tarm gjør at man må være forsiktig med å trekke slutninger om adjuvanseffekter hos mennesker ut fra de beskrevne museforsøkene.

I en eksponeringsbetraktning bør en skille mellom grønnsaker og frukt som ikke er bearbeidet og bearbeidede eller prosesserte matvarer. Eksponeringen for Cry-protein vil være størst for rå frukt og grønnsaker. All mais blir imidlertid kokt eller prosessert før den blir brukt som mat.

3.3.1.2 Forekomst i prosesserte/bearbeidede varer:

Maiskolber fra sukkermais spises direkte av mennesker og egner seg godt til grilling, koking eller steking, salater og som snacks, men spises ikke rå. I søknadene på Extranet er det ingen eller lite dokumentasjon om innholdet Cry-proteiner i sukkermais. USAs tekniske komite for pesticidkontroll (BPC) har i forbindelse med Monsanto registrering av sukkermais for dyrking i USA, dokumentert innholdet av Cry-proteiner i maisfrø. I sukkermaisene MON 89034 og MON 89034 x MON 88017 var Cry1A.105 proteinmengdene henholdsvis 5,9 og 5,6 µg/g tørrvekt, og Cry2Ab2 henholdsvis 1,3 og 1,3 µg/g tørrvekt. Mengde Cry1Ab i Bt 11 sukkermais ble oppgitt til 1,4 µg/g våtvekt i frø (Hicks et al. 2008).

For prosesserte matvarer fra mais vil et realistisk inntak av Cry-protein være vesentlig lavere enn de mengdene som er angitt i kap. 3.3.1.1. Mais er en bulkvare hvor flere typer mais fra mange åkre samles i felles siloer før videre prosessering. Det vil således neppe spises 100 % av én type mais. Både mais og soya blir prosessert før de blir spist. Under prosesseringen blir proteinene i mais og soya utsatt for ekstreme betingelser som leder til denaturering. Disse

betingelsene inkluderer varmebehandling, pH forandringer, reduksjonsmidler og mekanisk spalting. Disse behandlingene leder for en stor del til minst 2 log reduksjon av funksjonell aktivitet til under deteksjonsgrensen hos proteinene (Hammond & Jez 2011).

Vi spiser stort sett prosessert mais hvor proteinene i mange tilfeller er helt eller delvis degradert eller er fjernet. Eksempelvis vil Cry1Ab-proteinet ved behandling med basisk løsning (nixtamalisering) og oppvarming til 100 °C i 5 minutter føre til 40 % tap, mens ved tillaging av maisgrøt var Cry1Ab-proteinet stabilt opptil 75 °C. Oppvarming ved denne temperaturen (75 °C) i 3 min førte til ca. 90 % tap av proteinet. Oppvarming av tortilla til 190 °C i 10 sekunder førte til fullstendig tap av Cry1Ab- proteinet (de Luis et al. 2009).

Sukkermais blir i stor grad hermetisert ved ca. 100 °C i 3-4 minutter, og sterilisert ved 125-320 °C i 7-9 minutter, mens sukkermaisbolber kokes i 3-7 minutter.

Varmestabilitetsstudier av Cry34Ab1 og Cry35Ab1 viser at disse proteinene mister sin biologiske aktivitet ved oppvarming i 10 mM fosfatbuffer (pH=7,5) i 30 minutter ved henholdsvis 90 °C, 75 °C og 60 °C (Herman 2000). Cry1C oppvarmet i karbonatbuffer med pH 9,5 viste at proteinet brytes delvis ned ved 75 °C og fullstendig ned ved 100 °C (Metahelix Life Sciences Private Limited 2009). Cry1F- protein mister sin biologiske aktivitet ved oppvarming i 10 mM fosfatbuffer (pH=7,5) i 30 minutter ved henholdsvis 90 °C og 75 °C. Ved 60 °C var dødeligheten av toksinet for insekter 25 % (Herman 2000).

Cry3Bb1 er oppgitt som ikke varmestabilt. Oppvarming av maismel som inneholder Cry3Bb1 til 204 °C i 30 minutter ødela både immunreaktivitet og insektsbioaktivitet til Cry3Bb1 (EPA 2007).

3.3.2 NEDBRYTING AV CRY-PROTEIN I TARM

Flere fôringsforsøk har vært utført for å se på nedbrytning av Cry proteiner i ulike forsøksdyr. Foring av gris med Bt11-mais som uttrykker Cry1Ab-proteinet, viste ved bruk av ELISA-metodikk at Cry1Ab gjenfinnes i mage, duodenum, ileum, cecum og rektum. Mengde Cry1Ab i fôret var 600 ng/g, og mengde Cry1Ab-protein i rektal-innholdet var 300 ± 140 ng/g. Dette forsøket viser at i gris blir 50 % av Cry-proteinet fordøyd (Chowdhury et al. 2003). Nativt Cry1Ab er i noen forsøk med simulert magesaft ved pH 2,0 vist å være mer stabilt mot nedbrytning enn tidligere antatt (Guimaraes et al. 2010). Ved fôringsforsøk med gris fôret med Bt11-mais som inneholder Cry1Ab finner en allikevel at nivået av Cry1Ab i tarmen er lavt (<3-300 ppb) (Walsh et al. 2011, Chowdhury et al. 2003).

Stabiliteten til rensede Cry-proteiner er også testet i simulert magesaft ved pH 1,2. Forsøket viste at proteinene ble brutt ned i løpet av meget kort tid, ca. 30 sekunder (Betz et al. 2000). Det antas derfor at proteinene også brytes raskt ned i menneskets mage når pH er lavere enn 2,0.

Cry- proteiner av klasse Cry1, Cry2 og Cry3 brytes lett ned *in vitro* i simulert magesaft ved pH 1,2 (Betz et al. 2000, Noteborn & Kuiper 1995). Proteinene brytes generelt ned til fragmenter som er mindre enn 2 kD. Cry-proteiner er imidlertid stabile i simulert tarmsaft ved pH 7,5. Nedbrytningstester av Cry-proteiner ved bruk av simulert magesaft ved pH 1,2 og simulert tarmsaft ved pH 7,5 utføres som en del av dokumentasjonen rundt markedsførings-søknadene.

Nedbrytningshastigheten av Cry1Ab øker dramatisk både i simulert magesaft og simulert tarmsaft når proteinet på forhånd er varmedenaturert (Okunuki et al 2002). Nedbrytningen var meget rask både når det ble benyttet rensed protein og proteinekstrakt fra mais.

Medisinske syrenøytraliserende midler øker den allergiske responsen mot matallergener dels ved å øke pH og derved blokkere enzymatisk proteinnedbrytning i magesekken, dels ved innhold av alum (et kaliumaluminiumsulfat salt) som på en pH-uavhengig måte virker som et Th2-adjuvans på slimhinnene (Brunner et al. 2009).

3.3.2.1 *Kunnskapshull*

Det er usikkerhet og manglende kunnskap om hvilken dose-effektberegninger som er mest relevant for Cry-proteiner og adjuvanseffekter i tarmen. Cry-proteiner i maten vil etter all sannsynlighet ikke være likt fordelt over hele tarmen og lokal dose vil være den viktigste.

Det er også kunnskapshull i forståelsen av faktiske doser som blir eksponert til epitelceller hos ulike individer (variasjon i stabilitet av Cry proteiner i ulike maisprodukter , samt pH-variasjon i magesyre).

Videre er det er også ukjent om eksponering i munnhulen og svelg kan ha betydning.

3.3.3 SAMLET KONKLUSJON PÅ RESTVERDIER I PROSESSERTERTE VARER

Det er all grunn til å anta at eksponering for Cry-proteiner etter inntak av prosesserte matvarer er lavere enn for råvaren. Det er flere dokumenterte foredlingsprosesser som gir en reduksjon av Cry-proteiner. Cry- proteinene er generelt ikke varmestabile proteiner. Imidlertid varierer denatureringstemperaturen mellom forskjellige Cry- proteiner. Det kan ikke utelukkes at noen Cry- proteinvarianter tåler høye temperaturer. Denaturerte Cry- proteiner antas ikke å være biologisk aktive.

3.3.4 ANDRE KILDER TIL EKSPONERING FOR CRY- PROTEINER

I en eksponeringsvurdering er det også viktig å ta hensyn til at det kan være et visst bakgrunnsnivå av Cry-protein i matvarer. I Danmark er det foretatt restmålinger av *B. thuringiensis* på diverse grønnsaker og frukt og det er funnet høye verdier ($>10^4$ CFU g^{-1}) i mange av disse matvarene (Fredriksen et al. 2006). I følge Bae et al. (2004) vil konsentrasjonen av *B. thuringiensis* på druer være i størrelsesorden ca. 10^4 cfu/g (våttvekt) på høstingstidspunktet ved bruk av Bt-sprøytemiddel, og Bt- konsentrasjonen i druesaft vil være 10^1 - 10^3 cfu/ml. Dersom en gjennomsnittlig bakteriecelle veier ca. 1 pikogram, vil en konsentrasjon på 10^4 cfu/g matvare tilsvare ca. 0.01 μ g bakteriemasse/g (Cry-proteinet utgjør ca. 20-30 % av bakteriesporemassen).

Det kan se ut som om de høyeste verdiene finnes i tomater og agurker fra Danmark ($1,1 \cdot 10^4$ og $1,2 \cdot 10^4$ CFU g^{-1}), men også i europeisk importert frukt kan det være høye verdier (grapefrukt fra Italia 9400 CFU g^{-1}). I mer lang-transportert frukt som for eksempel grapefrukt fra Chile er det funnet lave verdier (10 CFU g^{-1}). Det kan altså synes som om bakteriene dør eller forsvinner under transporten. Det er i undersøkelsen ikke opplyst noe om forekomst av døde bakterier på de samme matvarene. I andre danske undersøkelser er det også funnet rester av bakterien på en lang rekke matvarer (Damgaard et al. 1996; Rosenquist et al. 2005; Valero et al.2002; Martin & Travers 1989; Phillips & Griffiths 1986; Hendriksen & Munk Hansen 2008). Nivået av Cry-protein i disse studiene er som regel i samme størrelsesorden, ofte 10^4 cfu/g *B. thuringiensis* (Bae et al. 2004). Det er ikke rapportert om skadelige effekter av denne eksponeringen. Miljøstyrelsen i Danmark vurderer, at det ut fra undersøkelser ikke er noen grunn til å anta, at bruken av mikro-biologiske plantebeskyttelsesmidler basert på *B. thuringiensis* har medført gastroenteritis hos dansker (Hendriksen & Munk Hansen 2008).

Siden *B. thuringiensis* som plantevernmiddel ikke er godkjent i Norge vil ikke disse restverdiene forekomme på norske matvarer, men verdiene er relevante for importerte varer.

3.3.4.1 *Kunnskapshull*

Det er biologiske forskjeller og kunnskapshull knyttet til en sammenligning av naturlige eksponeringskilder til Bt-proteiner og Cry-proteinene som er til stede i transgene plantene. Planteversjonene er til stede i planten over lengre tid, ikke bare etterkant av sprøyting og gir vesentlig høyere eksponering. Proteinene i planteversjonene representerer det aktive toksinet og krever ikke alkalisk miljø for aktivering. Flere av Cry-proteinene uttrykt i planter er rekombinering av ulike naturlig forekommende Cry-proteiner, og flere nyere transgene planter inneholder stacks av flere typer (rekombinerte) *cry*-gener.

Det er også uklart i hvilken grad de ulike *cry*-genene, med ulike biologiske karakteristika, kan sammenlignes med Bt-sprøytemidler som også har ulik sammensetning og bruksområder.

3.3.5 EKSPONERING TIL CRY-PROTEINER I LUFTVEIENE OG HUDEN

Det er utført undersøkelser omkring eksponering via luftveiene i forbindelse med bruk av *B. thuringiensis* som sprøytemiddel i drivhus (Madsen 2011). Resultater fra noen av undersøkelsene viser indusering av IgE rettet mot bakterie-ekstrakter, men utfra metoden som er brukt kan det ikke konkluderes med at IgE er rettet mot Bt-proteinet. Undersøkelsene konkluderte imidlertid med at eksponeringen ikke var assosiert med respiratoriske symptomer. Konsentrasjonen av Bt-proteinet er ikke angitt, men i følge Madsen (2011) vil luftkonsentrasjonen være mindre enn 1000 cfu/m³. Dette antas å tilsvare en eksponering hos drivhusarbeidere på ca. 6-7000 cfu per dagsverk. Helseundersøkelse av en liten gruppe gårdsarbeidere (48 arbeidere) som brukte Bt-plantevernmidler viste ved hudtesting statistisk signifikant reaksjon mot Bt-sporeekstrakter i forhold til lav- og medium Bt-eksponeringsgrupper (Bernstein et al. 1999). Lav- og medium-eksponeringsgruppene var ikke i direkte kontakt med Bt-plantevernmidler. Positiv hudtest mot Bt pro- δ -endotoksiner ble også påvist hos to arbeidere i gruppen som brukt Bt-plantevernmidler. Undersøkelsene konkluderte med at denne eksponeringsveien ikke var assosiert med respiratoriske symptomer, men at den kunne gi hudreaksjoner (Bernstein et al. 1999).

Matallergi kan induseres ved eksponering til allergenholdig husstøv både i luftveiene og huden, men en eventuell adjuvanseffekt av Cry-proteiner i denne sammenheng er ikke blitt undersøkt.

3.4 RISIKOVURDERING

Risiko er definert som sannsynligheten for at en hendelse skal inntreffe multiplisert med konsekvensen av hendelsen hvis den inntreffer.

Det foreligger få studier som har undersøkt mulige adjuvanseffekter av de 2 Cry-proteinene som er undersøkt. Sannsynligheten for at mat basert på GM-planter som inneholder Cry-proteiner, vil medføre sensibilisering av en person og videre utvikling av matallergi er liten fordi innholdet av Cry-proteiner i maten vil være lavt i mennesketarmen. Cry-proteinene generelt vil være ustabile på grunn av varmebehandling, prosessering og lav pH (pH<2.0) i magesekken. Det er derfor vanskelig å kvantifisere risikoen. Konsekvensen, det vil si sykdommen matallergi, vet vi derimot kan være alvorlig for individet som eventuelt rammes.

4 Konklusjon

Omsetning og bruk av genmodifiserte mat- og fôrvarer i Norge krever godkjenning. Faggruppen har vurdert helserisiko knyttet til næringsmidler og fôr som har fått satt inn gener som koder for Cry-proteiner i sitt arvestoff på generelt grunnlag.

Risikovurderingen omfatter ikke genmodifiserte råvarer med Cry-proteiner, siden de plantene som har Cry-proteiner i seg, mais og soya er bearbeidet før konsum. Faggruppen har ikke funnet det nødvendig å vurdere risikoen knyttet til inntak av rå grønnsaker, siden ingen er aktuelle for det norske markedet i dag. Vurderingen omfatter derfor kun bearbeidede matvarer og fôr fra planter med Cry-proteiner.

Selv med eksisterende usikkerhet, vil Faggruppen ut fra foreliggende kunnskap konkludere med at det er meget lite trolig at Cry-proteiner i maten utgjør noen økt helserisiko i de mengder en vil kunne få i seg ved å spise prosessert genmodifisert mais eller soya, i forhold til å spise mat basert på tilsvarende isogen ikke-modifiserte planter.

For dyr vil det være rimelig å forvente at en eventuell adjuvanseffekt neppe vil påvirke dyrets helse. Det er også svært lite trolig at inntak av mat fra dyr som har spist fôrvarer som inneholder Cry-proteiner, skal ha noen skadelig innvirkning på mennesker.

Faggruppen har ikke funnet dokumentasjon på en eventuell effekt av eksponering via luftveiene eller huden for Cry-proteiner fra genmodifisert materiale og heller ikke for mulige adjuvanseffekter etter slik eksponering.

Kunnskapshull

Det er mange kunnskapshull knyttet til vurderinger av adjuvans. Det meste av immunologiske adjuvansforsøk er utført med Cry1Ac. Det er uvisst om de andre Cry-proteinene har tilsvarende adjuvansegenskaper.

Mengden Cry-proteiner i genmodifisert mais og soya er marginal i forhold til mengden av andre adjuvanser som foreligger som naturlige komponenter i mat. Det er imidlertid for en stor del uvisst i hvilken grad disse naturlig forekommende adjuvansene og Cry-proteinene bidrar til utvikling av allergi. Bestemmelse av en slik betydning vanskeliggjøres av at det ikke finnes validerte metoder for å måle adjuvanseffekt.

Muligheten for at Cry-proteiner kan øke permeabiliteten til tarmepitelet og derved føre til ”bystander”-sensibilisering hos arvelig disponerte individer mot sterke allergener i kosten, kan ikke helt utelukkes. En slik mulighet kan utforskes i en relevant dyremodell.

Et usikkerhetsmoment i eksponeringsvurderingen er manglende data vedrørende eksponering via luftveiene og huden, og også kvantitativ forståelse av sammenhengen mellom eksponeringsgrad til adjuvans og en eventuell effekt i form av utvikling av allergi.

Referanser

- Adel-Patient K, Guimaraes VD, Paris A, Drumare M-F et al. (2011) Immunological and Metabolomic Impacts of Administration of Cry1Ab Protein and MON 810 Maize in Mouse. Plos one, 6, e16346.
- Ardern-Jones MR, Black AP, Bateman EA, Ogg GS (2007) Bacterial superantigen facilitates epithelial presentation of allergen to T helper 2 cells. Proc Natl Acad Sci USA 104: 5557-5562.
- Bae S, Fleet GH, Heard GM (2004) Occurrence and significance of *Bacillus thuringiensis* on wine grapes. Int. J. Food Microbiol 94: 301-312.
- Bakke-McKellep A, Koppang EO, Gunnes G, Sanden M, Hemre G, Landsverk T, Krogdahl A. (2007). Histological, digestive, metabolic, hormonal and some immune factor responses in atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed genetically modified soybeans. Journal of Fish Diseases, 30(2): 65-79. doi:10.1111/j.1365-2761.2007.00782.x
- Berin CM, Shreffler WG (2008). T(H)2 adjuvants: Implications for food allergy. J. Allergy Clin Immunol. 121: 1311-1320.
- Bernstein IL, Bernstein JA, Miller M, Bernstein DI et al. (1999) Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. Environ. Health Perspect. 107: 575-582.
- Betz FS, Hammond BG, Fuchs RL (2000). Safety and advantage of *B.thuringiensis* protected plants to control insect pests. Regul. Toxicol. Pharmacol. 32: 156-173.
- Blanchard TG, Lycke N, Czinn SJ, Nedrud JG (1998) Recombinant cholera toxin B subunit is not an effective mucosal adjuvant for oral immunization of mice against *Helicobacter felis*. Immunology 94: 22-27
- Brandtzaeg P, Tolo K (1977) Mucosal penetrability enhanced by serum-derived antibodies. Nature 266: 262-263.
- Brandtzaeg P (2010a). Food allergy: separating the science from the mythology. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 7: 380-400.
- Brandtzaeg P (2010 b). The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. J Pediatr. 156: S8-15.
- Broderick N, Raffa KF, Handelsman JL, (2006). Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. PNAS 103 (41): 15196-15199.
- Brunner R, Wallmann J, Szalai K, Karagiannis P, Altmeppen H, Riemer AB, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I (2009) Aluminium per se and in the anti-acid drug sucralfate promotes sensitization via the oral route. Allergy: 64: 890-7.
- Chowdhury EH, Kuribara H, Hino A, Sultana P, Mikami O, Shimada N, Guruge KS, Saito M, Nakajima Y (2003) Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. J. Anim. Sci. 81:2546–2551.
- Codex 2009: WHO/FAO. Foods derived from modern biotechnology, 2nd edn. Rome

Cordain L, Toohey L, Smith MJ, Hickey MS (2000) Modulation of immune function by dietary lectins in rheumatoid arthritis. *Br. J. Nutr.* 83: 207-217.

Damgaard PH, Larsen HD, Hansen BW, Bresciani J, Jorgensen K (1996) Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Letters in Applied Microbiology* 23: 146-150.

da Hora VP, Conceição FR, Dellagostin OA, Doolan DL (2011) Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. *Vaccine* 29: 1538-1544.

Datta SK, Sabet M, Nguyen KP, Valdez PA, Gonzalez-Navajas JM, Islam S, Mihajlov I, Fierer J, Insel PA, Webster NJ, Guiney DG, Raz E (2010) Mucosal adjuvant activity of cholera toxin requires Th17 cells and protects against inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 10638-10643.

de Jonge, JD, Knippels LMJ, Ezendam J, Odink J, Penninks AH, van Loveren H (2007) The importance of dietary control in the development of a peanut allergy model in Brown Norway rats. *Methods*.41: 99-111

de Luis R, Lavilla M, Sanchez L, Calvo M, Perez MD (2009) Immunochemical detection of Cry1A(b) protein in model processed foods made with transgenic maize. *European Food Research Technology* DOI 10.1007/s00217-009-1021-4.

Ellertsen LK, Nygaard UC, Melkild I, Løvik M (2010) Maternal allergen immunisation to prevent sensitisation in offspring: Th2-polarising adjuvants are more efficient than a Th1-polarising adjuvant in mice. *BMC Immunol.* 11: 8.

Environmental Health Criteria (EHC) 217 (1999) Microbial Pest Control Agent *Bacillus thuringiensis*. World Health Organisation. ISBN 92 4 157217 5.

EPA (2007) Cry3Bb1 Corn Biopesticide Registration Action Document.

http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/tech_docs/brad_006484.htm

Foss N, Duranti M, Magni C, Frokiaer H (2006) Assessment of lupin allergenicity in the cholera toxin model: Induction of IgE response depends on the intrinsic properties of the conglutins and matrix effects. *International Archives Allergy Immunology* 141: 141-150.

Frederiksen K, Rosenquist H, Jorgensen K, Wilcks A (2006) Occurrence of natural *Bacillus thuringiensis* contaminants and residues of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides on fresh fruits and vegetables. *Applied Environmental Microbiology* 72:3435-3440.

Frøystad-Saugen MK, Lilleeng E, Bakke-McKellep AM et al. (2009) Distal intestinal gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed genetically modified maize. *Aquacult. Nutr.* 15(1): 104–115. doi:10.1111/j.1365-2095.2008.00572.x.

Goodman RE, Vieths S, Sampson HA, Hill D, Ebisawa M, Taylor SL, van Ree R (2008) Allergenicity assessment of genetically modified crops--what makes sense? *Nat Biotechnol.* 26(1): 73-81.

Guimaraes VD, Drumare MF, Ah-Leung S, Lereclus D, Bernard H, Creminon C, Wal JM, Adel-Patient K (2008) Comparative study of the adjuvanticity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein and cholera toxin on allergic sensitisation and elicitation to peanut. *Food Agricultural Immunology* 19: DOI 10.1080/09540100802495651|PII 906477739.

Gupta S, Dikshite AK (2010) Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. *J. Biopest.* 3(1 Special Issue): 186-188.

Hammond BG, Jez JM (2011) Impact of food processing on the safety assessment for proteins introduced into biotechnology-derived soybean and corn crops. *Food Chem Tox* 49: 711-721.

Hemre GI, Sagstad A, Bakke-Mckellep AM (2007) Nutritional, physiological, and histological responses in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. fed diets with genetically modified maize. *Aquacult. Nutr.* 13(3): 186–199. doi:10.1111/j.1365-2095.2007.00465.x.

Hendriksen NB, Munk Hansen B (2008). *Bacillus thuringiensis* og fødevareforgiftninger Miljøprosjekt Nr. 1217 2008. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet, Miljøministeriet: 1-33.

Herman, RA (2000) Thermolability of PS149B1 binary delta-endotoxin. Dow AgroSciences LLC, Study ID:001041. Ref: EFSA/GMO/NL/2005/12.

Herrmann JE, Chen SC, Jones DH, Tinsley-Bown A, Fynan EF, Greenberg HB, Farrar GH (1999) Immune responses and protection obtained by oral immunization with rotavirus VP4 and VP7 DNA vaccines encapsulated in microparticles. *Virology* 259: 148-153.

Hicks L (2008) Bt Sweet Corn Technical Committee report to the Board of Pesticides Control. December 8.

<http://hypertextbook.com/facts/2003/LouisSiu.shtml>

Ibrahim MA, Griko N, Junker M, Bulla LA (2010) *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs* 1: 31-50.

James C (2010) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops (2010). ISAAA Brief No. 42. ISAAA, Ithaca, NY, USA

James C (2011) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. (2011). ISAAA Brief No.43. ISAAA, Ithaca, NY, USA

Janeway C (1989) Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0. *Immunol. Today* 10 (9): 283–6.

James C, Krattiger AF (1996) Global Review of the Field Testing and Commercialization of Transgenic Plants, 1986 to 1995: The First Decade of Crop Biotechnology. ISAAA Briefs No. 1. ISAAA: Ithaca, NY. pp. 31.

Koppelman SJ, Vooswijk RAA, Knol EF ,et al. (2001) Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world. *J. Allergy Clin. Immun.* 107: 459.

Lee JB, Jang JE, Song MK, Chang J (2009) Intranasal delivery of cholera toxin induces Th17-dominated T-cell response to bystander antigens. *PLoS One*: 4:e5190.

Liu T, He SH, Zheng PY, Zhang TY, Wang BQ, Yang PC (2007) Staphylococcal enterotoxin B increases TIM4 expression in human dendritic cells that drives naïve CD4 T cells to differentiate into Th2 cells. *Mol. Immunol.* 44: 3580-3587.

Lim PL, Rowley D (1982) The effect of antibody on the intestinal absorption of macromolecules and on the intestinal permeability in adult mice. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 68: 41-46.

Madsen AM (2011) Occupational exposure to microorganisms used as biocontrol agents in plant production. *Frontiers in Bioscience S*: 606-620 [DOI No:10.2741/s174

Martin PAW, Travers RS (1989) Worldwide Abundance and Distribution of *BacillusThuringiensis* Isolates. *Appl. Environm. Microbiol.* 55: 2437-2442.

Matzinger P (1994) Tolerance, Danger and the extended Family. *Ann. Rev. Immunol.* 12: 991-1045.

Metahelix Life Sciences Private Limited (2009) Bio-Safety Evaluation of Cry1C Protein expressed in Bt cotton carrying cry1C gene event MLS9124. Submitted to Review Committee on Genetic Modifications Department of Biotechnology, MST, GOI New Delhi 110003. No.3, KIADB IV Phase, Bommasandra, Bangalore 560099.

Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, Lopez-Revilla R, Pina-Cruz S (2003) Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand. J. Immunol.* 57: 45-55.

Nawar HF, Greene CJ, Lee CH, Mandell LM, Hajishengallis G, Connell TD (2011) LT-IIc, a new member of the type II heat-labile enterotoxin family, exhibits potent immunomodulatory properties that are different from those induced by LT-IIa or LT-IIb. *Vaccine* 29: 721-727.

Noteborn HPJM, Kuiper HA (1995) Safety evaluation of transgenic tomatoes expressing Bt endotoxin. WHO/FNU/FOS/95.1

OECD (2007) Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* – derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14.

Okunuki H, Teshima R, Shigeta T et al. (2002) Increased digestibility of two products in genetically modified food (CP4-EPSPS and Cry1Ab) after preheating. *J. Food Hygienic Soc. Japan* 43: 68-73.

Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3324-3328.

Phillips JD, Griffiths MW (1986) Factors Contributing to the Seasonal-Variation of *Bacillus* Spp in Pasteurized Dairy-Products. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 275-285.

Prescott VE, Campbell PM, Moore A et al. (2005) Transgenic Expression of Bean α -Amylase Inhibitor in Peas Results in Altered Structure and Immunogenicity. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9023-9030

Prasad S, Shethna YI (1975) Enhancement of Immune-Response by Proteinaceous Crystal of *Bacillus-Thuringiensis* Var *Thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62: 517-523.

Qadri F, Ahmed T, Ahmed F, Begum YA, Sack DA, Svennerholm AM (2006) PTE Study Group. Reduced doses of oral killed enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine is safe and immunogenic in Bangladeshi infants 6-17 months of age: dosing studies in different age groups. *Vaccine* 24: 1726-33.

Roberts TL, Sweet MJ, Hume DA, Stacey KJ (2005) Cutting edge: species-specific TLR9-mediated recognition of CpG and non-CpG phosphorothioate-modified oligonucleotides. *J Immunol.* 174(2): 605-8.

Rojas-Hernandez S, Rodriguez-Monroy MA, Lopez-Revilla R, Resendiz-Albor AA, Moreno-Fierros L (2004) Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect. Immunity* 72: 4368-4375.

Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L et al. (2011) Immunogenicity of nuclear-encoded LTb:ST fusion protein from *Escherichia coli* expressed in tobacco plants. *Plant Cell Rep* 30: 1145-1152.

- Rosales-Mendoza S, Alpuche-Solís AG, Soria-Guerra RE et al. (2009) Expression of an *Escherichia coli* antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants. *Plant J.* 57: 45-54.
- Rosenquist H, Smidt L, Andersen SR, Jensen GB, Wilcks A (2005) Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *Fems Microbiol. Letters* 250: 129-136.
- Ryan M, McCarthy L, Rappuoli R, Mahon BP, Mills KH (1998) Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int Immunol.* 10: 651-662.
- Sagstad A, Sanden M, Haugland Ø. et al (2007) Evaluation of stress- and immune-response biomarkers in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different levels of genetically modified maize (Bt maize), compared with its near-isogenic parental line and a commercial suprex maize. *J. Fish Dis.* 30: 201-212.
- Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P (2011) *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechn. J.* 9: 283-300.
- Sanden M, Berntssen MHG, Krogdahl Å. et al. (2005) An examination of the intestinal tract of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr fed different varieties of soy and maize. *J. Fish Dis.* 28(6): 317–330. doi:10.1111/j.1365-2761.2005.00618.x.
- Sanden M, Krogdahl Å, Bakke-Mckellep AM. et al. (2006) Growth performance and organ development in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. parr fed genetically modified (GM) soybean and maize. *Aquacult. Nutr.* 12(1): 1–14. doi:10.1111/j.1365-2095.2006.00367.
- Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Murphy R, Wood RA, Sampson HA (2003) Symposium: Pediatric food allergy. *Pediatrics* 111: 1591-1594.
- Sissener NH, Martin SAM, Cash P, Hevrøy EM, Sanden M, Hemre G-I (2010) Proteomic Profiling of liver from Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fed Genetically Modified Soy Compared to the Near-isogenic non-GM Line. *Mar.Biotechnol.* 12: 273-281. doi:10.1007/s.10126-009-9214-1.
- Sissener NH, Johannessen LE, Hevrøy EM. et al. (2011a) Genetically modified plants as fish feed ingredients. *Br. J. Nutr.* 103: 3–15. doi:10.1017/S0007114509991401.
- Sissener NH, Hemre GI, Lall SP. et al. (2011b) Are apparent negative effects of feeding GM MON810 maize to Atlantic salmon, *Salmo salar*, caused by confounding factors? *Br. J. Nutr.* 106: 42–56.
- Shreffler WG, Russell R., Castro Z et al. (2006) The Major Glycoprotein Allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, Is a Ligand of Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Nonintegrin and Acts as a Th2 Adjuvant In Vitro. *J. Immunol.* 177: 3677–3685.
- Su L, Creusot RJ, Gallo EM, Chan SM, Utz PJ, Fathman CG, Ermann J (2004) Murine CD4+CD25+regulatory T cells fail to undergo chromatin remodeling across the proximal promoter region of the IL-2 gene. *J. Immunol.* 173(8): 4994-5001.
- Sun X, Ma D, Sheldon M, Yeung K, Reinberg D (1994) Reconstitution of human TFIIA activity from recombinant polypeptides: a role in TFIID-mediated transcription. *Genes Dev.* 8: 2336-2348.

- Sun L, Liu A, Georgopoulos K (1996) Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J.* 15: 5358-5369.
- Sun HX, Xie Y, Ye YP (2009) Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* 13: 27:1787-1796.
- Thomas K, MacIntosh S, Bannon G et al. (2009) Scientific advancement of novel protein allergenicity evaluation: An overview of work from the HESI Protein Allergenicity Technical Committee (2000-2008). *Food Chem. Toxicol.* 47(6): 1041-1050 DOI: 10.1016/j.fct.2009.02.001 Published: JUN 2009
- Valero M., Hernandez-Herrero LA, Fernandez PS, Salmeron MC (2002) Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Food Microbiol.* 19: 491-499.
- Van Wijk F, Knippels L (2007) Initiating mechanism of food allergy: Oral tolerance versus allergenic sensitization. *Biomed. Pharmacol.* 61(1): 8-20.
- Vázquez-Padrón RI, Martínez-Gil AF, Ayra-Pardo C, González-Cabrera J, Prieto-Samsonov DL, de la Riva GA (1998) Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *Biochem. Mol. Biol. International* 45: 1011-1020.
- Vázquez RI, Moreno-Fierro L, Neri-Bazan L, de la Riva GA, Lopez-Revilla R (1999a) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* 49: 578-584.
- Vázquez-Padrón RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, de-la-Riva GA, Lopez-Revilla R (1999b) Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sciences* 64(21): 1897-1912.
- Vázquez-Padrón RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, Martínez-Gil AF, de-la-Riva GA, Lopez-Revilla R (2000a) Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 33:147-155.
- Vázquez-Padrón RI, González-Cabrera J, García-Tovar C, Neri-Bazan L, López-Revilla R, Hernández M, Moreno-Fierro L, de la Riva GA (2000b) Cry1Ac Protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 Binds to Surface Proteins in the Mouse Small Intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271:54-58.
- VKM (2006) Response concerning further justification and clarification on Specific Comments by EFSA. <http://www.vkm.no/dav/4af53b9c47.pdf>
- Walsh MC, Buzoianu SG, Gardiner GE et al. (2011) Fate of transgenic DNA from orally administered Bt MON810 maize and effects on immune response and growth in pigs. *PLoS ONE* 2011, 6. <http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0027177>
- Wiedermann U, Jahn-Schmid B, Lindblad M et al. (1999) Suppressive versus stimulatory effects of allergen/cholera toxoid (CTB) conjugates depending on the nature of the allergen in a murine model of type 1 allergy. *Int. Immun.* 11: 1717-1724.
- Wuthrich B (2000) Lethal or life-threatening allergic reactions to food. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 10: 59-65.