



Zöliakie - Ursachen und Perspektiven der Biotechnologie

Projektkoordination

Verband der Deutschen Backmittel- und Backgrundstoffhersteller e.V.
RA Amin Werner
Markt 9, 53111 Bonn

Wissenschaftliche Koordination

BioLinx GmbH; Biotech and Life Science Communications
Frau Dr. G. Sachse, Frau Dr. G. Pohl-Apel
Vogelweidstrasse 19, 60596 Frankfurt

BMB+F Leitprojekt: Ernährung- moderne Verfahren der Lebensmittelerzeugung

Industriepartner: Monsanto Agrar Deutschland GmbH, Uniferm GmbH,
Puratos GmbH, Ernst Böcker GmbH & Co. KG, Hermann Kröner GmbH
& Co. KG, Meister Marker GmbH, etc.



Leitprojekt Zöliakie



Was ist Zöliakie?

Organisation und Eigenschaften von Weizenspeicherproteinen.

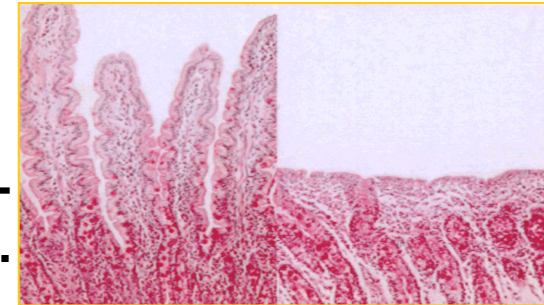
Ziele und Forschungsschwerpunkte des Zöliakie-Projektes.

Stand zweier Forschungsprojekte



Zöliakie: Genetische Prädisposition

- ◆ Zöliakie (Sprue) ist eine Erkrankung des Dünndarms bei Patienten mit entsprechender genetischer Prädisposition.
- ◆ Proteine aus Weizen (Gliadine), Roggen (Secaline) und Gerste (Hordeine) werden dafür verantwortlich gemacht, die Krankheit über eine primäre Immunantwort im Dünndarmbereich auszulösen.
- ◆ Dadurch wird das Dünndarmepithel so verändert (Zottenatrophie), dass wichtige Nahrungsbestandteile nicht ausreichend absorbiert werden können.
- ◆ Die häufigsten Symptome sind Durchfall, Erbrechen, Osteoporose Gedeihstörungen bzw. Gewichtsverlust, Krebs und auch psychische Störungen.
- ◆ Bei Kindern kann sie zu körperlicher Unterentwicklung führen.





Zöliakie

Therapie: Strikte, lebenslange Gluten-freie Diät, alle Nahrungsmittel, die Weizen-, Roggen-, und Gersten-Mehle enthalten dürfen nicht verzehrt werden.

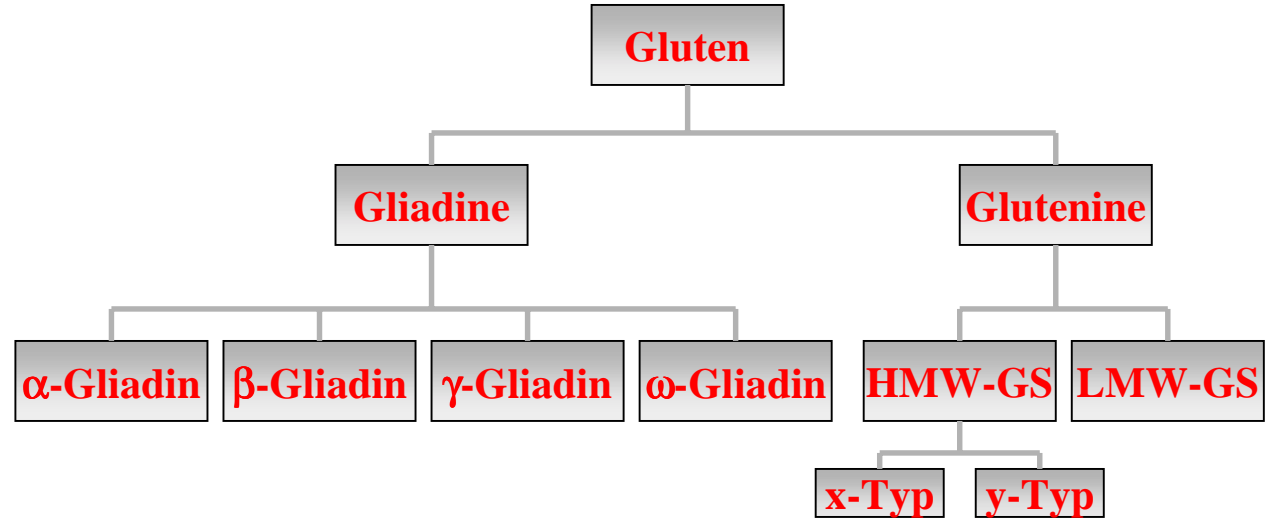
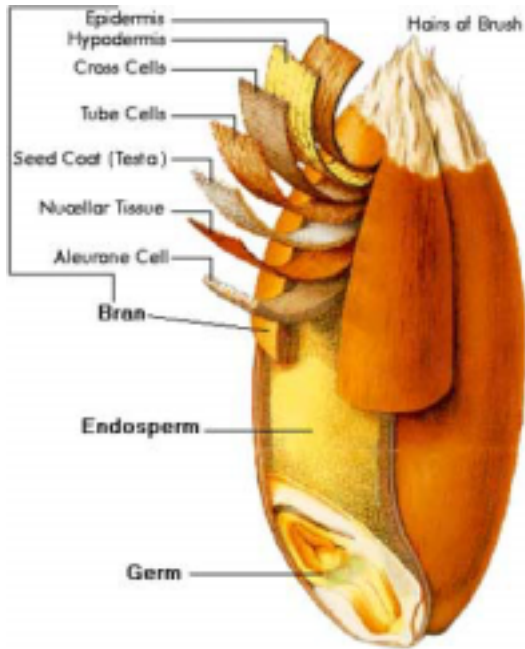
Diagnose: Antikörpertest, *in vitro*-T Zell Stimulation und *in vivo* Test an Zöliakie-Patienten

Häufigkeit: Deutschland: 0,5-1,0%; weltweit sind ca. 120 Mill. Menschen betroffen.





Weizen-Speicherproteine





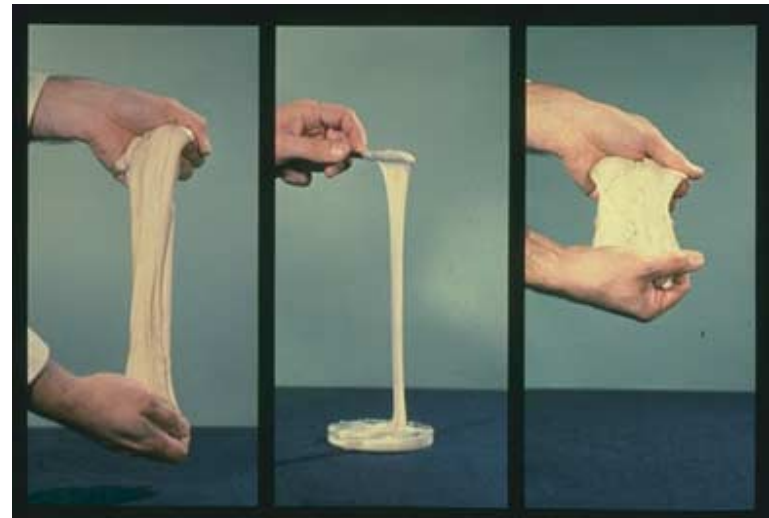
Weizen Glutenproteine: HMW- and LMW-Glutenine

HMW Glutenine

- 65 - 90 kDa
- Wichtig für die Elastizität des Teigs
- 9% - 11% des Glutenproteins
x-Typ: 58% - 76% aller HMWs
y-Typ: 24% - 42% aller HMWs

LMW-Glutenine

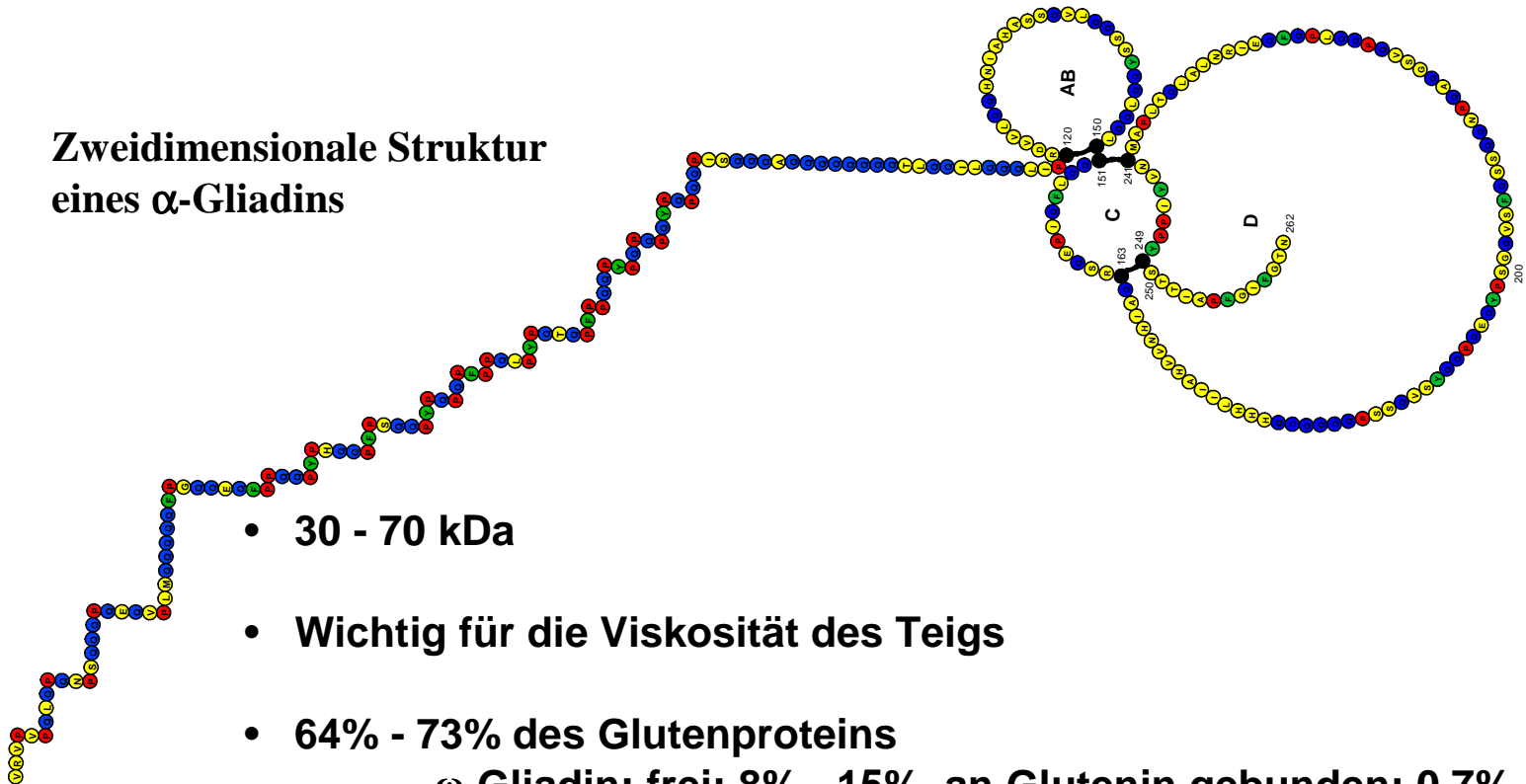
- 50 - 70 kDa
- Wichtig für die Elastizität des Teigs
- 17% - 24% des Glutenproteins





Weizen Glutenproteine: Gliadine

Zweidimensionale Struktur
eines α -Gliadins



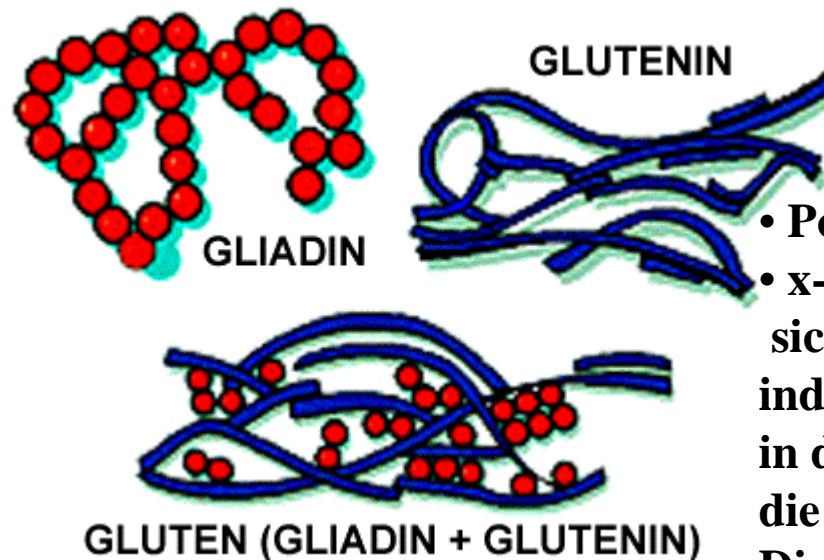
- 30 - 70 kDa
- Wichtig für die Viskosität des Teigs
- 64% - 73% des Glutenproteins
 - ω -Gliadin: frei: 8% - 15%, an Glutenin gebunden: 0,7% - 1,8%
 - α -Gliadin: 30% - 37%
 - γ -Gliadin: 20% - 26%





Molekulare Struktur des Weizen Glutens

- Monomere Struktur
- Intramolekulare Disulfidbrücken



- Polymere Struktur
- x- und y-Typ unterscheiden sich in der Länge der individuellen Domänen und in der Anzahl von Cysteinen, die inter- and intramolekular Disulfidbrücken ausbilden.

Glutenin: bilden Strang-ähnliche Aggregate

Gliadine : dienen als “Gleitmittel” zwischen den aggregierten Glutenine



Ziele des Projektes

Produkt:

- ◆ **Herstellung eines aus Weizenproteinen basierenden Produktes ohne die Proteine, die Zöliakie auslösen.**
- ◆ **Verbesserung der Nahrungsmittelqualität der etwa 120 Mill. Zöliakie Patienten**



Erfolgreicher Abschluß des Projektes soll durch einen oder mehrere Forschungsansätze erzielt werden

1. Expression von Glutenin in Hefe.
 - Überexpression von HMW and LMW Glutenin im “klein”- und “groß”-industriellen Maßstab.
 - Bereitstellung von Proteinen für *in vitro* und *in vivo* Toxizitätstests,
 - gereinigte Proteine sollen zu Mais- und Reismehl zugesetzt werden und die Backeigenschaften untersucht werden
2. Herstellung eines “Backfähigen”-Mais. Mais soll die für die Backfähigkeit des Weizens essentiellen HMW und LMW Glutenine exprimieren.
3. Herstellung eines Weizens ohne Toxizität für Zöliakie-Patienten
Knock-out von Schlüsselgenen die Zöliakie auslösen.
4. Identifizierung von Peptiden die eine Immunomodulation bewirken und Gliadin-sensitive Menschen schützen.



Stabile Transformation von Mais (*Zea mays* L.) mit Weizenspeicherproteingenen ohne Zöliakie-auslösendes Potential zur Verbesserung der Backeigenschaften



AG I

M. Gahrtz, M. Schröder, S. Amati,
Prof. Dr. H. Lörz, Dr. D. Becker

Universität Hamburg
Institut für Allgemeine Botanik und
Botanischer Garten



Institute of General Botany and Botanical Garden
Biocenter Klein Flottbek
Department of Applied Plant Molecular Biology, AMP II





Ziele und Vorhaben des Teilprojekts

Übertragung der Backeigenschaften von Weizen auf Mais



Spezifische Expression von
einer **HMW-Glutenin x-Untereinheit**,
einer **HMW-Glutenin y-Untereinheit**,
einem **LMW-Glutenin**, sowie
einem **modifizierten LMW-Glutenin** mit ähnlichen
Bindungseigenschaften wie Gliadine
im Endosperm von Mais.

Jedes Protein soll **mindestens 2 %** des gesamten
Endospermproteins im reifen Korn ausmachen. Dies soll zu
kleberartigen Eigenschaften im Teig führen.



Leitprojekt Zöliakie

Ziele und Vorhaben des Teilprojekts

Isolation der Gene einer x- und einer y-Untereinheit der HMW-Glutenine aus Weizen.

Promoteranalyse: Gewebespezifität / Expressionsstärke

Stabile Transformation von Mais mit Weizenspeicherproteingenen



Institute of General Botany and Botanical Garden
Biocenter Klein Flottbek
Department of Applied Plant Molecular Biology, AMP II



www.vvgvg.org



Leitprojekt Zöliakie

Aus *T. aestivum* cv. Cheyenne über PCR isolierte Gene von HMW-Gluteninuntereinheiten

Gen	Unter-einheit	Kommentar
Glu-A1-1	1Ax2*	-
Glu-B1-1b	1Bx7	-
Glu-D1-1b	1Dx5	Klon p57: Proteinsequenz identisch zu Acc. Nr. 21745 (1Dx5 aus <i>T.a.</i> cv.Cheyenne)
Glu-D1-2b	1Dy10	Klon p2-44: Proteinsequenz identisch zu Acc. Nr. CAA31396 (1Dy10 from <i>T.a.</i> cv.Cheyenne)





Ziele und Vorhaben des Teilprojekts

Isolation der Gene einer x- und einer y-Untereinheit der HMW-Gluteneine aus Weizen.

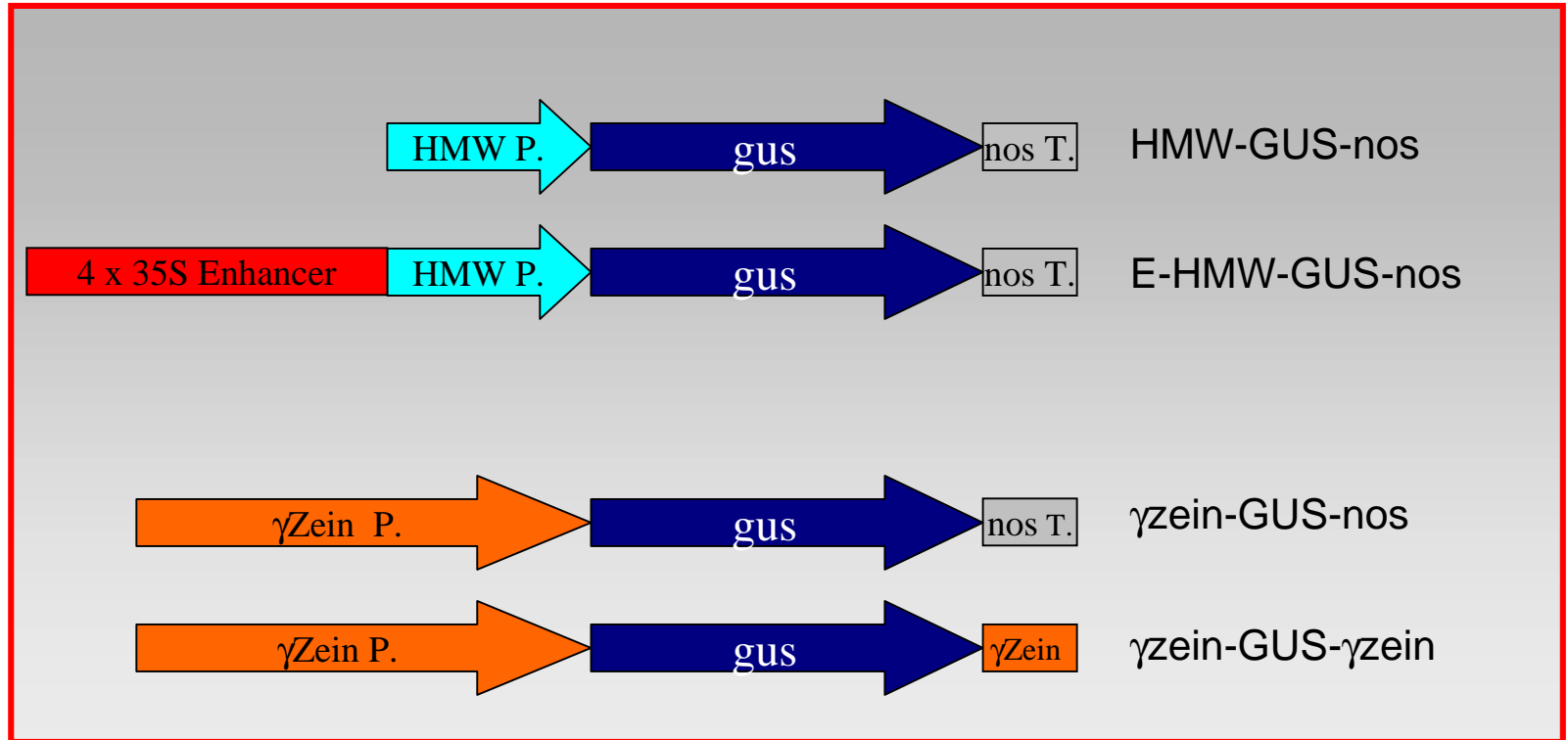
Promoteranalyse: Gewebespezifität / Expressionsstärke

Stabile Transformation von Mais mit Weizenspeicherproteingenen





Promoteranalysen in Mais



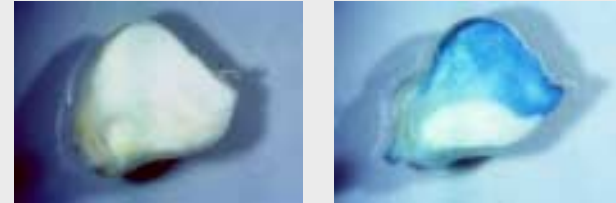


Histochemischer Nachweis von β -Glucuronidaseaktivität im Endosperm transgener Maispflanzen (28 dap)

HMW-GUS-nos



E-HMW-GUS-nos



γ zein-GUS-nos



γ zein-GUS- γ zein





Ziele und Vorhaben des Teilprojekts

Isolation der Gene einer x- und einer y-Untereinheit der HMW-Gluteneine aus Weizen.

Promoteranalyse: Gewebespezifität / Expressionsstärke

Stabile Transformation von Mais mit Weizenspeicherproteingenen





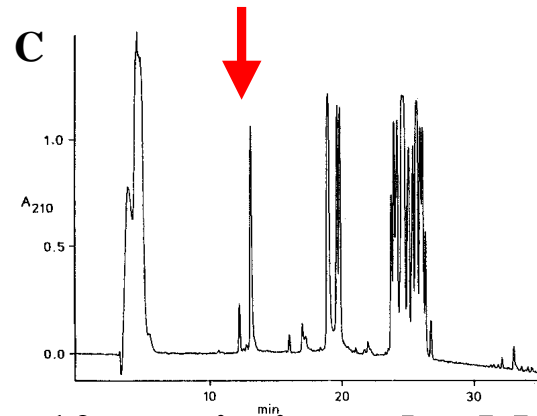
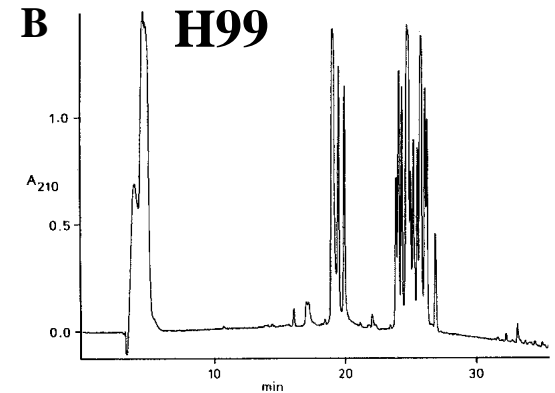
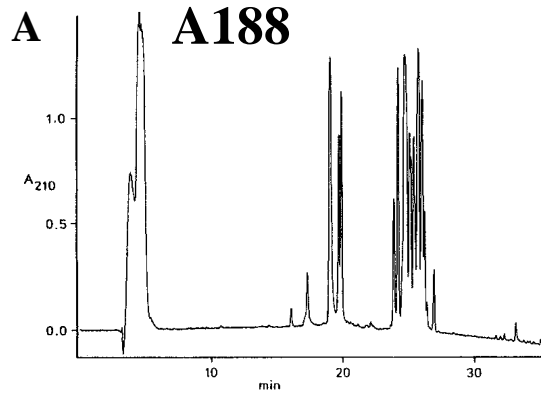
Zusammenfassung der Mais-Transformationsexperimente

Plasmid	BASTA resistente Pflanzen	Anzahl Pflanzen mit Volllänge-integration getestet/positiv	Anzahl exprimierender Pflanzen getestet/positiv
pHMW-Dx5z	12	10/2	1/0
pHMW-Dy10z	54	54/27	6/5
pHMW-a3z	11	-	-
pHMW-a3Δ2Cz	21	19/3	-





Weizen HMW-Dy10 Expression in Mais



Dy10 exprimierender Mais





Status quo und zukünftige Ziele des Maisprojektes

- Klonierung von HMW Glutenin x- und y-Untereinheiten und Promotoranalysen sind abgeschlossen. ✓
- Stabile Transformation von Mais mit Weizenspeicherproteinen steht vor dem Abschluß. Erste exprimierende Linien wurden identifiziert. (✓)
- Kombinationszüchtung von transgenen Maislinien mit unterschiedlichen Weizenspeicherproteingenen. (Monsanto)
- Untersuchung der Backeigenschaften und Toxizitätstests
(H. Wieser, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching);
(P. Ciclitira, St. Thomas' Hospital, London)]





Gentechnische Erzeugung von Weizen ohne Zöliakietoxizität

AG I

**A. Folck, P. Knies, S. Amati,
Prof. Dr. H. Lörz, Dr. D. Becker**

**Universität Hamburg
Institut für Allgemeine Botanik und
Botanischer Garten**

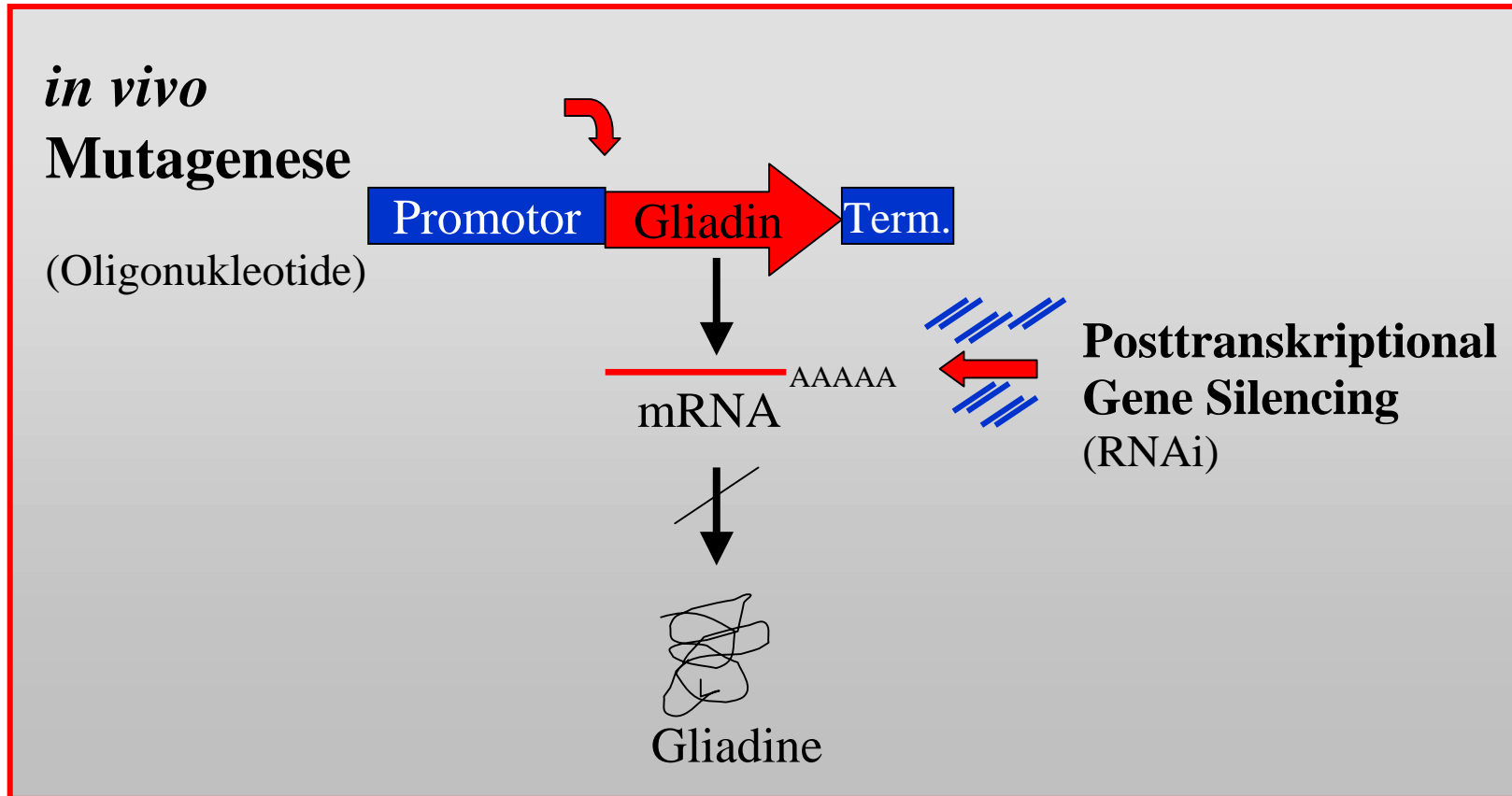


**Institute of General Botany and Botanical Garden
Biocenter Klein Flottbek
Department of Applied Plant Molecular Biology, AMP II**





Inhibierung der Genexpression





Sequenzhomologien im 5' Bereich der Gliadinegene

Translationsstart

α -/ β -Gliadine

5' -GGTCAATACAAATCCACC**ATG**AAACCTTTCTCATCCTTGCCCTCCTTGCTATCG-3' class A-I mRNA
5' -GCTCAATACAAATCCACC**ATG**AAGACCTTTCCATCCTTGCCCTCCTTGCTAT**TG**-3' class A-II mRNA
5' -GGTCAATA**AAA**ATCCACC**ATG**AAGACCTTTCTCATCCTAGCCCTCCTTGCTATCG-3' class A-III mRNA
5' -GGTCAATACAAATCCA**TC****ATG**AAGACCTTTCTCATCCTTGCCCTCCTTGCTATCG-3' class A-V mRNA
5' -GCTCAATACAAATCCACC**ATG**AAGACCTTTCTCATCCTTGCCCTC**GTG**CTAT**TG**-3' class A-IV mRNA

γ -Gliadine

5' -AGTTAACGCAAATCT**TACC****ATG**AAGACC--TTACTCATCCTGACAATCCTTGCGATGGCAA-3' M13713
5' -AGTTAACGCAAATCCACC**ATG**AAGACC--TTACTCATCCT**AACA**ATCCTTGCGATGGCAA-3' M36999
5' -AGTTAACGCAAATCCACC**ATG**AAGACC--TTACTCATCCTGACAATCCTTGCGATGGCAA-3' M16064





Transformationskonstrukte

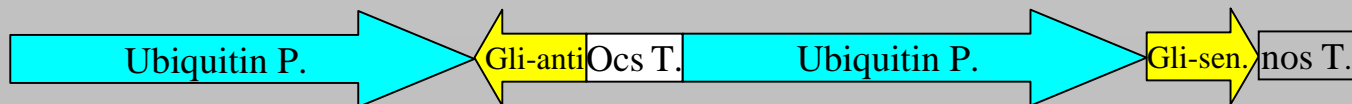
A) pGliadinRNAi



B) pGliadinIntron



C) pGliadinSense/Antisense



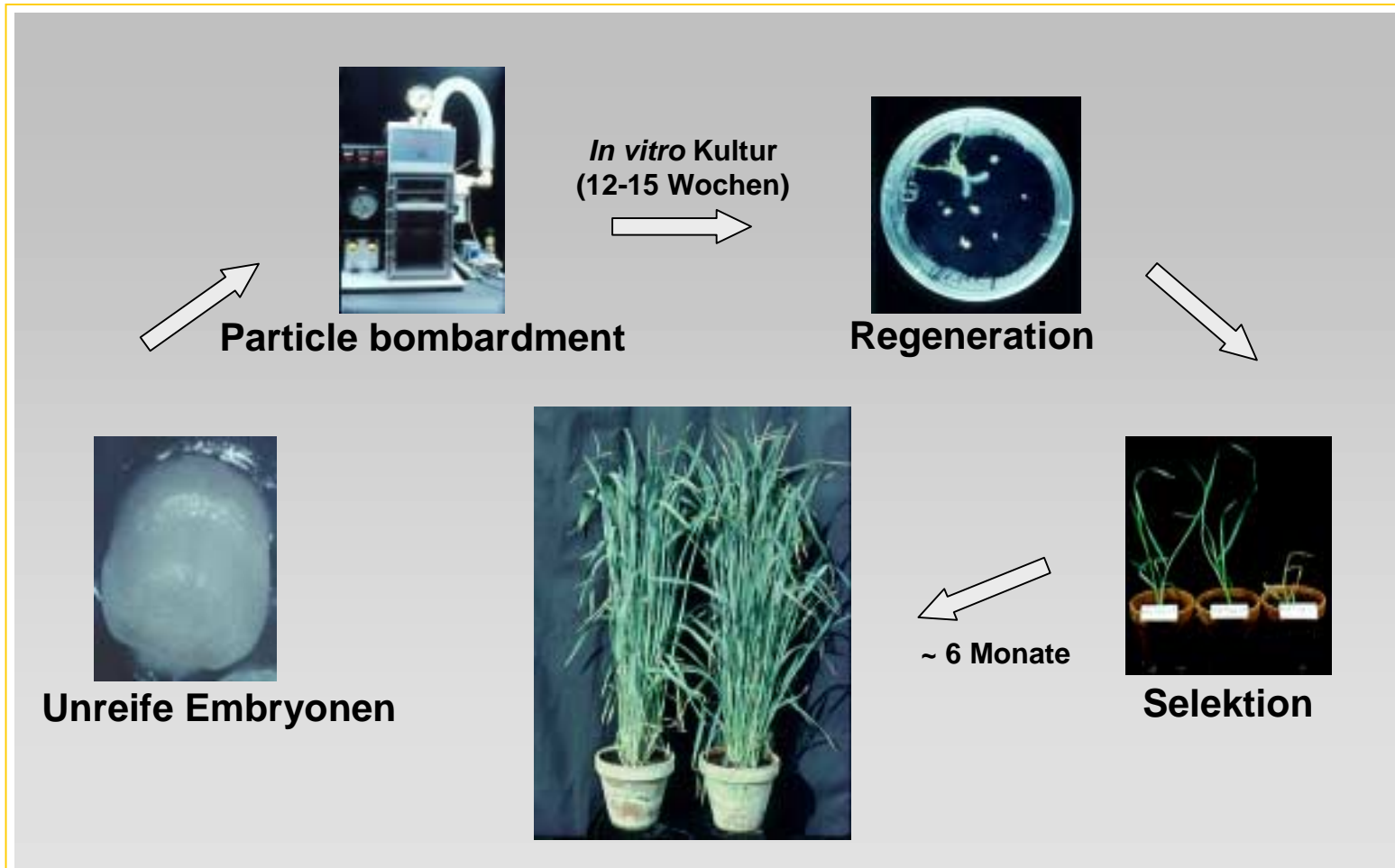
Institute of General Botany and Botanical Garden
Biocenter Klein Flottbek
Department of Applied Plant Molecular Biology, AMP II





Leitprojekt Zöliakie

Weizen: *In vitro* Kultur und Transformation



Institute of General Botany and Botanical Garden
Biocenter Klein Flottbek
Department of Applied Plant Molecular Biology, AMP II



www.vvgvg.org



Inhibierung der Gliadin Expression durch RNAi

- Klonierung der pGliadinRNAi-Konstrukte
- Stabile Weizen Transformation
- Analyse der transgenen Weizenpflanzen (✓)

Bisher

180

**unabhängige
transgene
T₀-Pflanzen
in der Analyse**

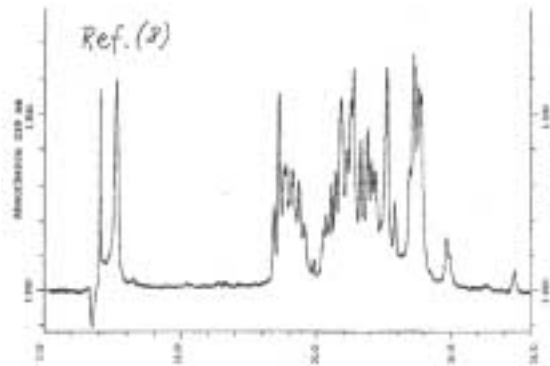




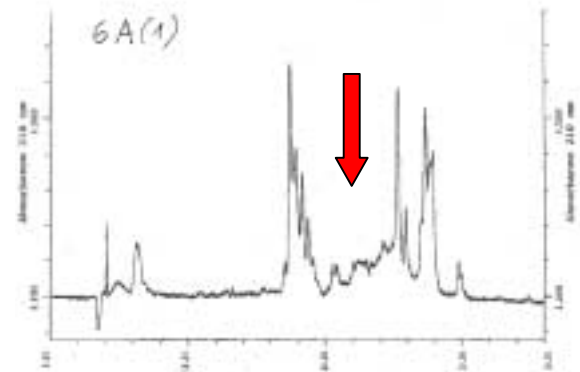
Leitprojekt Zöliakie

Eliminierung der α -Gliadine in Weizen (HPLC)

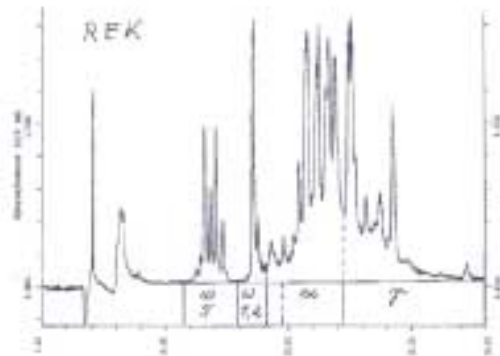
T. aestivum cv. Florida



T. aestivum cv. Florida # 6, transgen



T. aestivum cv. Rektor



Institute of General Botany and Botanical Garden
Biocenter Klein Flottbek
Department of Applied Plant Molecular Biology, AMP II

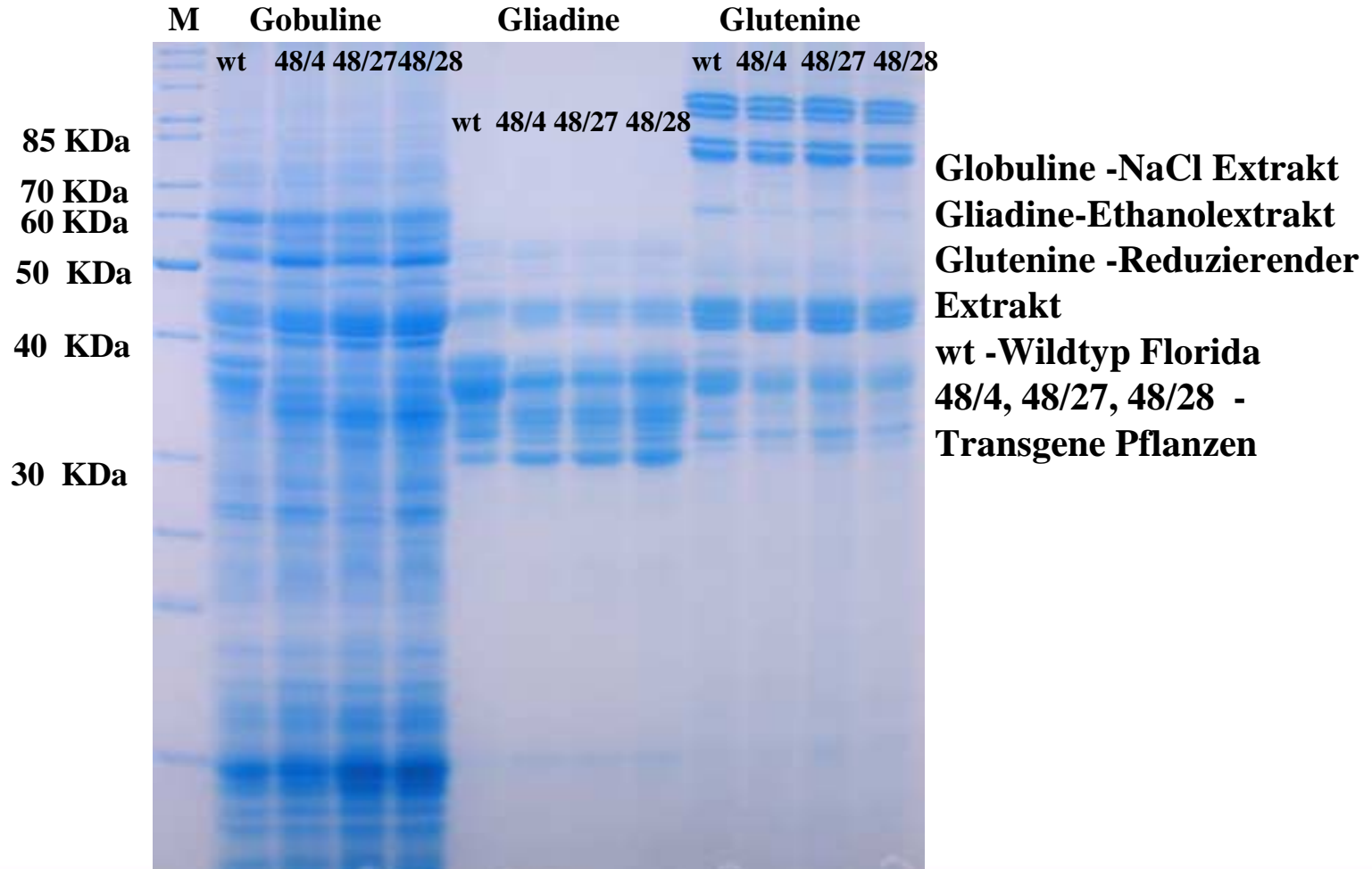


www.vvgv.org



Globulin-Gliadin-Glutenin Extrakte

12,5 % SDS-PAGE, Coomassie-Färbung





Status quo und zukünftige Pläne des Weizenprojektes

- Klonierung und Transformation von RNAi Konstrukten zur Eliminierung der α -Gliadine. ✓
- Die molekulare Analyse der transgene Pflanzen und deren Nachkommen zeigte in vielen Linien eine vollständige Reduktion der α -Gliadine. ✓
- Klonierung und Transformation neuer RNAi Konstrukte zur Eliminierung der γ - und ω -Gliadine. (✓)
- Kreuzungen von Gliadin „Null“ Linien.
- Untersuchungen der Backeigenschaften transgener Linien
(H.Wieser, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching);
und toxikologische Tests (P. Ciclitira, St. Thomas' Hospital, London).

