



Beate Stach

Breite Str. 4

45891 Gelsenkirchen

Phone: 0209 / 799131

Website: www.glutenfrei-lebenswelt.de

E-Mail: stach@glutenfrei-lebenswelt.de

Glutenfrei-Lebenswelt präsentiert aktuelle Forschungsergebnisse aus der Zöliakieforschung 2005.

**Vorstellung von ausgewählten Ergebnissen des Leitprojekts
Zöliakie:**

**Die Entwicklung von Weizen-, Roggen- und Gerstenproteinen ohne
Zöliakietoxizität* und deren Verwendung zur Herstellung von
Lebensmitteln.**

Wir bedanken uns sehr herzlich an dieser Stelle bei Frau Dr. Pohl-Apel für Ihr Engagement!

Projektbeschreibung:

Innerhalb des Leitprojekts Zöliakie sollte zunächst nachgewiesen werden, welche Bestandteile des Klebers toxisch sind. Die Ausgangshypothese war, nur **Gliadin** ist toxisch (so auch in der Literatur beschrieben)

Sollten auch **Glutenine** toxisch sein, wollten die Gruppen diese entsprechend modifizieren, damit sie keine Toxizität* mehr für die Zöliakiebetreffenden aufweisen.

Einzelne Speicherproteingene wurden hierfür in die Labor-Hefe „*Saccharomyces cerevisiae*“ und in Mais (*Zea mays*) transformiert und in großen Mengen gebildet.



Die so gebildeten Proteine wurden danach isoliert, aufgereinigt, charakterisiert und auf ihre Toxizität hin geprüft.

Definition Toxizität: ...(engl.) toxicity, giftige, u.U. gesundheitsschädigende, grundsätzlich von der Dosis abhängige Eigenschaft und Wirkung von chemischen Substanzen und physikalischen Faktoren, [...] Vgl. De Gruyter: Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. 259. Auflage, 2002, S. 1673

Projektdauer:

Die Laufzeit des Leitprojekts betrug insgesamt 5 Jahre. - (01. 02. 2000 bis 31. 01. 2005) -

Projektförderung/Finanzierungsträger:

Das Forschungsprojekt wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (= **BMBF**) gefördert und von verschiedenen Unternehmen und Verbänden, die sich im „Verein* zur gentechnischen Verbesserung von Getreideprodukten e.V.“ zusammengeschlossen haben, unterstützt.

*U.a. ist die auch die **DZG e.V.** Mitglied dieses Vereins.

Kooperationspartner des Projekts:

In dem vom Bundesforschungsministerium (BMBF) unterstützten Projekt beteiligten sich u.a. universitäre Arbeitsgruppen aus München, Hamburg, Berlin und London.

- Prof. Dr. Knie, Ulmer Spatz Diamalt, Ulm, Deutschland
- Dr. Wieser, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA) Garching, München, Deutschland



- Frau Dr. Gunvor Pohl-Apel, Fa. Biolinx GmbH, Deutschland (Projektkoordination)
- Prof. Lörz, Universität Hamburg, Hamburg, Deutschland
- Prof. Zunft, DIFE Potsdam Rehbrücke, Potsdam, Deutschland
- Dr. Chris Tapsell, Monsanto Deutschland GmbH, Silstedt, Deutschland
- Prof. Dr. Ciclitira, The Rain Institute London, London, Großbritannien

Proteinanteile des Weizenkorns:

Das Kleberprotein **Gluten*** des Weizens besteht aus komplexen Molekülen, den **Gliadinen*** und die **Gluteninen***, die jeweils erneut aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sind. (vgl. **Abbildung 1**: Die Gliadine und Glutenine sowie ihre jeweiligen Untereinheiten werden in **türkis** dargestellt)

Gluten kommt in vielen Getreidearten, wie in Weizen, Roggen, Gerste, u.a. vor. Gluten ist zwar unlöslich in Wasser kann aber circa die zweifache Menge des Eigengewichts an Wasser aufnehmen (=hohes Wasserbindungsvermögen).

Backeigenschaften bzw. Backqualität werden von Menge (Quantität) und durch die jeweilige unterschiedliche Zusammensetzung von Glutenfraktionen in den verschiedenen Getreidearten bestimmt.

Gluten ist also beim Backvorgang aufgrund seiner viskosen und elastischen Eigenschaften von entscheidender Bedeutung für den Erhalt qualitativ guter, lockerer Backerzeugnisse mit poröser Krume. (=Kombination von **Elastizität** und **Viskosität** des Teigs.)

Definition Gluten: = Klebereiweiß; Getreideproteine, bestehen etwa aus gleichen Anteilen aus **Prolaminen** und **Glutelinen**; bewirken durch ihren

Prolamingehalt die Backfähigkeit des Mehls;[...] vgl. De Gruyter: Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. 259. Auflage, 2002, S. 616

Definition Prolamine: [...] = Bestandteile des Glutens, [...] zu den Prolaminen gehören **Gliadin** (Weizen, Roggen), Hordein (Gerste), [...] vgl. De Gruyter: Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. 259. Auflage, 2002, S. 1359

Definition Glutenin: Glutelin des Weizens vgl. De Gruyter: Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. 259. Auflage, 2002, S. 616

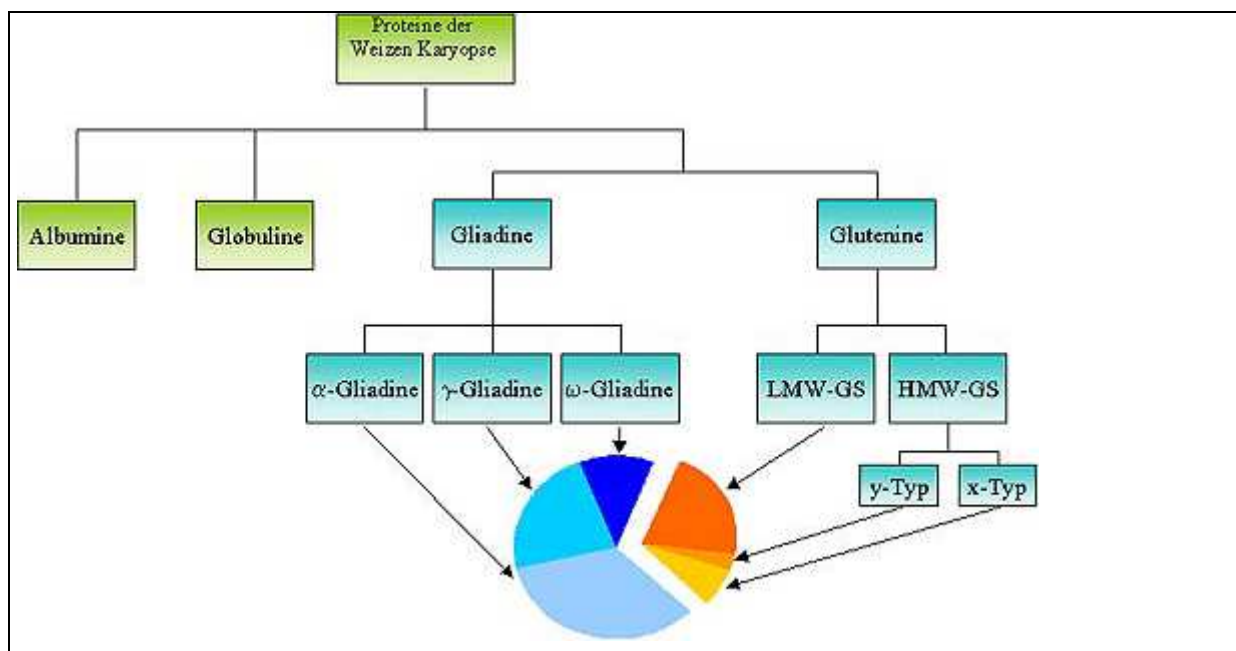


Abbildung1: Proteinanteile im Weizenkorn

Quelle: Foliensatz: Vortrag Brühl 2 / 6 © Pohl-Apel 2005

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass die Gliadinfraktion insgesamt und auch alle darin enthaltenen Gliadintypen (α , γ , ω -Gliadine) für die zöliakietoxische Wirkung von Weizen verantwortlich sind.

Daher ging man innerhalb der Zöliakieforschung bisher von der Annahme aus, dass **ausschließlich die Gliadinfraktionen** die schweren



Veränderungen der Dünndarmschleimhaut bis hin zur vollständigen Zottenatrophie bei Zöliakiebetreffenen hervorrufen würden. (**vgl. Abb. 1**)

Des Weiteren wurde angenommen, **dass die Glutenine nicht zöliakieauslösend sind.**

In **Abbildung 2** werden die molekularen Strukturen des Weizen-Glutens abgebildet.

Das Gliadin - hier als **rote** Kugeln dargestellt - besteht aus einem einzelnen Strang, der durch Schwefelbrücken zu einem lockeren Netzwerk verbunden ist.

Bei dem Glutenin liegt hingegen eine polymere Struktur vor: Es existieren kürzere Stränge, in **blau** dargestellt, die ebenfalls durch Schwefelbrücken miteinander verbunden sind. Der biochemische Aufbau der **Untereinheiten LMW (=niedermolekular) und HMW (=hochmolekular)** ist sehr unterschiedlich.

Da sich das Gliadin in das Glutenin einlagert, ist es generell schwierig, etwas über die Toxizität* des Glutenins aussagen zu können. Die Gewinnung eines reinen Glutenins durch einen Aufreinigungsprozeß ist problematisch.

Aus diesem Grund wurde im **Leitprojekt Zöliakie** primär ein **gentechnischer Forschungsansatz bzw. entsprechende Methoden** gewählt, um die Gewinnung eines reinen Glutenins, welche als Voraussetzung für die Durchführung weiterer Forschungsschritte wichtig ist, ermöglichen zu können.

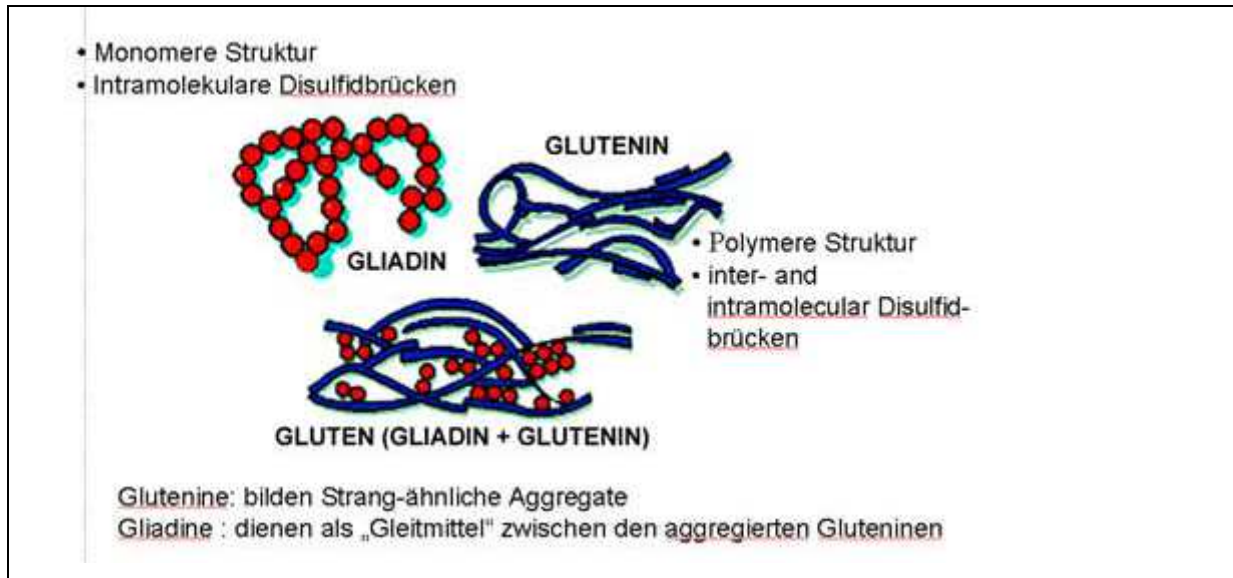


Abbildung 2: Molekulare Struktur des Weizen-Glutens

Quelle: Foliensatz: Vortrag Brühl 2 / 8 © Pohl-Apel 2005

Aufgabenschwerpunkte / Zielsetzungen des Projekts:

Es ergaben sich für dieses Projekt drei primäre Aufgabenschwerpunkte bzw. Zielsetzungen:

- 1.) Die kleintechnische Gewinnung / Produktion von Kleberproteinen aus Hefe bzw. Mais.**
- 2.) Die Überprüfung der Toxizität der Weizenkleberproteine.**
- 3.) Die Herstellung von Mahlprodukten aus genmodifiziertem Weizen bzw. Mais sowie die Verarbeitung von Mahlprodukten aus genmodifiziertem Weizen bzw. Mais zu Zwischen- und Endprodukten.**

Aufgabenschwerpunkt 1:

Die kleintechnische Gewinnung / Produktion von Kleberproteinen aus Hefe bzw. Mais.

Zur Bestätigung der o.g. Arbeitshypothese, dass ausschließlich die **Gliadine** und nicht die **Glutenine** das Potential zur Auslösung der Zöliakie besitzen, wurde zunächst mit Hilfe gentechnischer Verfahren hochreines **Glutenin**, bzw. die Untereinheiten **LMW** und **HMW** sowie die Gliadin-Untereinheiten in Hefe in einem speziellen 100-Liter-**Fermenter*** hergestellt. (vgl. **Abb. 3**)



Abbildung 3: Fermenter

Quelle: Foliensatz: Vortrag Brühl 2 / 10 © Pohl-Apel 2005

Aufgabenschwerpunkt 2:

Die Überprüfung der Toxizität der Weizenkleberproteine.

Die Proteine Gliadin und Glutenin wurden anschließend in **in-vitro***- Untersuchungen innerhalb von Zellkulturen sowie **in-vivo***- Untersuchungen an Zöliakiebetreffenden auf ihr zöliakieauslösendes Potential hin erforscht.

Toxizitätstestverfahren in vitro:

Die immunologischen Untersuchungen erfolgten an T-Lymphozyten, die nach Stimulation mit einem



Glutenhydrolysat aus dem Dünndarmgewebe von Zöliakiebetroffenen isoliert worden waren. Die so gewonnenen Zellen wurden danach mittels **Gliadin** zur Bildung von Botenstoffen angeregt. Nur diejenigen Zellen, die bei diesem Test mit der Bildung von Botenstoffen reagierten, konnten für weitere Testschritte genutzt werden.

Im nächsten Schritt wurden die aus Blut gewonnenen Antigen-präsentierenden Zellen mit dem Hydrolysat der **HMW-Untereinheiten des Glutenins** zur Reaktion gebracht.

Dann wurden die eingangs gewonnenen T-Zellen und die vorbehandelten Antigen-präsentierenden Zellen mit radioaktiv markiertem H-Thymidin inkubiert.

Ein Teil des Hydrolysats wurde nach Behandlung mit Gewebetransglutaminase untersucht.

Als Maß für die Stimulationswirkung diente der Anstieg der Radioaktivität in den vermehrten T-Zellen im Vergleich zum Leerversuch. (**Stimulationsindex**=Messgröße, inwieweit das zu untersuchende Peptid in vitro toxisch auf das Dünndarmgewebe der Zöliakiepatienten wirkt.)

Toxizitätstestverfahren in vivo: (Durchführung durch Prof. Dr. Ciclitira)

Als Testpersonen für die in-vivo-Untersuchungen haben sich vier erwachsene Zöliakiepatienten zur Verfügung gestellt, die sich vor Durchführung der Untersuchung strikt glutenfrei ernährt (=glutenfreie Diät) hatten und demnach über eine intakte Dünndarmschleimhaut verfügten.



Das Hydrolysat der HMW-Untereinheiten des Glutenins (circa 400 mg) wurde in Wasser gelöst und in den Dünndarm der Testpersonen **instilliert***.

Zu Beginn der Instillation sowie zwei, vier und sechs Stunden danach wurde mit einer Quinton-Kapsel (=Biopsie) Gewebe entnommen und anschließend mikroskopisch untersucht.

Als Maß für die Toxizität des zu untersuchenden Peptids fungierten hierbei die Veränderungen folgender

Parameter: (vgl. Abb. 4)

- der Enterozytenhöhe,
- des Verhältnisses der Villushöhe zur Kryptentiefe
- sowie der Anzahl intraepithelialer Lymphozyten.

Bei allen Testpersonen war bereits nach zwei Stunden bezüglich aller drei Parameter eine Wirkung zu beobachten, die nach vier bzw. sechs Stunden ein hochsignifikantes Ausmaß erreichte.

Definition Fermenter: [...] meist geschlossener Behälter unterschiedlicher Größe zur Durchführung biochemischer Reaktionen, besonders für die Massenproduktion von Mikroorganismen in Forschung und Industrie. vgl. Baer; Wermke: Duden. das große Fremdwörterbuch. 2. Auflage, S. 449

Definition in vitro: (lat.) im (Reagenz-)Glas, d.h. außerhalb des lebenden Organismus; vgl. in vivo vgl. De Gruyter: Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. 259. Auflage, 2002, S. 810

Definition in vivo: (lat.) am Lebendigen: in einem lebenden Organismus; vgl. in vitro vgl. De Gruyter: Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. 259. Auflage, 2002, S. 810

Definition instillieren: (aus lat. instillare "darauf träufeln, einflößen"): Flüssigkeiten in den Organismus einträufeln (Med.) vgl. Baer; Wermke: Duden. das große Fremdwörterbuch. 2. Auflage, S. 625

Testergebnisse:

Innerhalb beider o.g. Toxizitätstests konnten Nachweise für die zöliakiespezifische Toxizität von HMW- und LMW-Untereinheiten von Gluteninen erbracht werden.

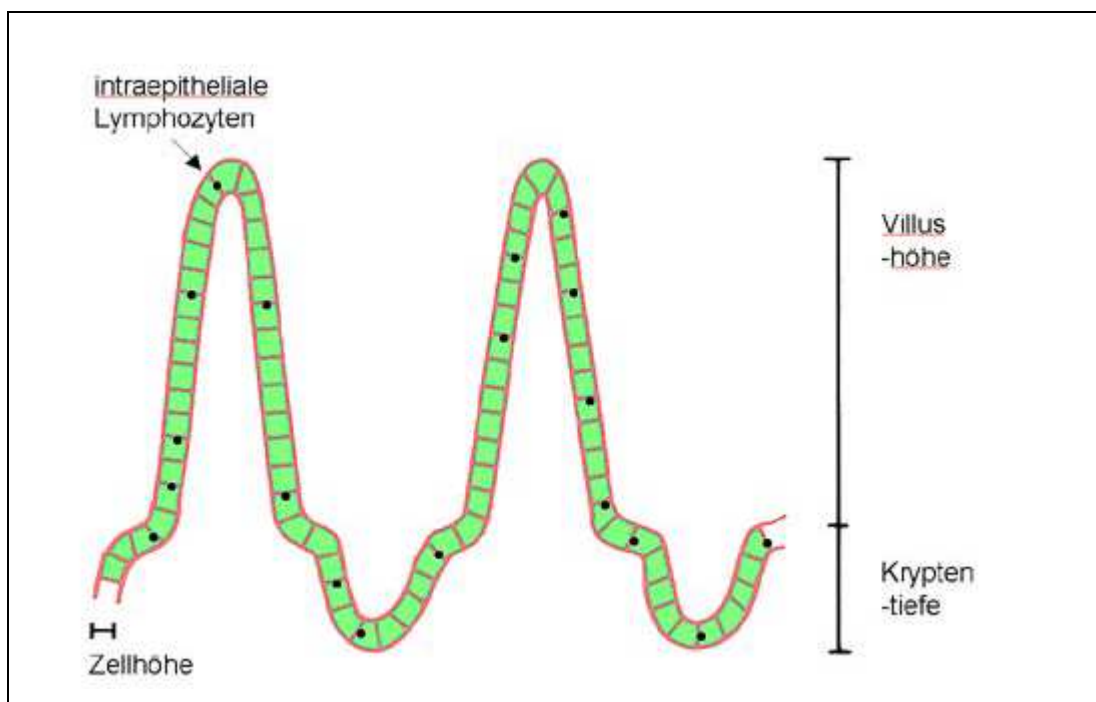


Abbildung 4: Parameter des Toxizitätstests in vivo

Dünndarmschleimhaut (vereinfachte, schematische Darstellung)

Quelle: Foliensatz: Vortrag Brühl 2 / 14 © Pohl-Apel 2005

Aufgabenschwerpunkt 3:



Die Herstellung von Mahlprodukten aus genmodifiziertem Weizen bzw. Mais sowie die Verarbeitung von Mahlprodukten aus genmodifiziertem Weizen bzw. Mais zu Zwischen- und Endprodukten.

3.1) Die Herstellung eines backfähigen Mais ohne Zöliakie-Toxizität.

Hierbei war eine Übertragung von Weizen-Gluteninen in Mais vorgesehen. Dadurch sollte die Backqualität des Mais deutlich verbessert werden und somit ein neuartiger Rohstoff für die Bereitung verschiedenster Lebensmittel für Zöliakiepatienten zur Verfügung gestellt werden.

3.2) Die Herstellung eines Weizens ohne Zöliakie-Toxizität.

Im Weizen sollten die Gliadin-Gene gentechnologisch sowie über konventionelle Züchtungsmethoden ausgeschaltet werden.

Ergebnispräsentation:

Die Annahme, dass ausschließlich die Gliadinfraktionen, nicht die Glutenin-Untereinheiten des Glutens toxisch für Zöliakiebetreffene sind, wurde widerlegt.

Sowohl die Ergebnisse der in-vitro- als auch der in-vivo-Toxizitätstests ergaben:

Die untersuchten HMW- und LMW-Glutenin-Untereinheiten sind toxisch für Zöliakiebetreffene!

Konsequenzen für das Leitprojekt Zöliakie:



- 1) Aufgrund der o.g. Ergebnisse wurde die Forschung zur Herstellung eines **backfähigen Mais** ohne Zöliakie-Toxizität eingestellt.
- 2) Da es nicht sinnvoll ist, einen Weizen ganz ohne Kleberproteine herzustellen, wurde die Forschung zur **Herstellung eines Weizens ohne Zöliakie-Toxizität** ebenfalls eingestellt.
- 3) Die Methode, die bei dem Leitprojekt Zöliakie bezüglich des Weizens entwickelt wurde, könnte eventuell zukünftig bei der Untersuchung von anderen allergieauslösenden Proteinen Anwendung finden.
- 4) Weiterführung der Immunmodulation*

Ein Antrag auf Verlängerung des Projekts wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (=BMBF) aus politischen Gründen abgelehnt.

Es besteht die Hoffnung, zusätzlich Gelder für das Leitprojekt Zöliakie zu erhalten, um eine systematische Untersuchung aller Glutenin-Untereinheiten auf eine mögliche Toxizität hin, zukünftig weiterhin finanzieren zu können. (vgl. zukünftige Forschungserfordernisse)

Definition Immunmodulation: [...] (engl.) immunomodulation; Veränderung der Immunantwort durch verschiedene Substanzen im Sinne einer positiven Unterstützung (Immunstimulation) oder negativen Beeinflussung (Immunsuppression) [...] vgl. De Gruyter: Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. 259. Auflage, 2002, S. 781

Zukünftige Forschungserfordernisse:



In Zukunft sind laut Aussage von Frau Dr. Pohl-Apel u.a. folgende Schwerpunkte bezüglich Zöliakieforschung relevant:

- 1) Die Durchführung systematischer Untersuchungen zur Toxizität definierter Abschnitte der Glutenin-Untereinheiten. Es besteht diesbezüglich die Annahme, dass nicht das gesamte Peptid toxisch ist. (=Grundlagenforschung)
- 2) Die Untersuchung der Glutenin-Untereinheiten in anderen Weizensorten. (älterer Weizensorten)

Forschungsfrage: Sind die Glutenin-Untereinheiten z.B. bei älteren Weizensorten ähnlich oder anders strukturiert als bei den aktuell kultivierten Sorten?

- 3) Die immunologische Grundlagenforschung sollte zudem vom Gliadin auf das Glutenin erweitert werden.



Weitere Informationen zum Leitprojekt Zöliakie "Die Entwicklung von Weizen-, Roggen- und Gerstenproteinen ohne Zöliakietoxizität* und deren Verwendung zur Herstellung von Lebensmitteln" finden Sie auf der Website:

<http://vvgvg.org/>

* Die Ergebnispräsentation über das Leitprojekt Zöliakie wurde von **Beate Stach** im August/September 2005 angefertigt.

Sie basiert auf dem Vortrag / Foliensatz © 2005 von Frau Dr. Gunvor Pohl-Apel sowie auf einer Internetrecherche

Titel:

"Die Bedeutung der Zöliakie in Wissenschaft und Forschung"

Referentin:

Frau Dr. Gunvor Pohl-Apel (BioAlliance, Frankfurt) /
Projektkoordination)

Veranstaltung / Veranstaltungsort:

Erlebnistag 2005 der DZG e.V. in Brühl

Termin:

04. 06. 2005

Wir bedanken uns an dieser Stelle sehr herzlich bei Frau Dr. Pohl-Apel für Ihr Engagement!