



Abschließender Sachstandsbericht  
Leibniz-Wettbewerb

WHEATSCAN – Aufklärung der Ursachen für  
Weizenunverträglichkeiten  
Antragsnummer: K195/2015

---

**Berichtszeitraum:** 01.04.2016 bis 30.09.2019

**Federführendes Leibniz-Institut:** Leibniz-Institut für Lebensmittel-Systembiologie an der Technischen Universität München (LSB)

**Projektleiter/in:**  
Dr. Katharina Scherf

**Inhalt**

1.	Zielerreichung und Umsetzung der Meilensteine.....	3
2.	Aktivitäten und Hindernisse .....	3
3.	Ergebnisse und Erfolge.....	4
4.	Chancengleichheit .....	6
5.	Qualitätssicherung.....	6
6.	Zusätzliche eigene Ressourcen .....	7
7.	Strukturen und Kooperation.....	7
8.	Ausblick .....	7

## 1. Zielerreichung und Umsetzung der Meilensteine

Ziel des Vorhabens war die Korrelation von genetischer Variabilität (Genom), Genexpression (Transkriptom) und Proteinzusammensetzung (Proteom) mit dem immunstimulatorischen Potential von Weizensorten der letzten 100 Jahre als Grundlage für die Entwicklung neuer Weizensorten mit geringem Potential zur Auslösung von Weizen-assoziierten Erkrankungen.

Die im Antrag definierten Meilensteine und Ziele wurden erreicht. Zunächst wurde der Einfluss der Weizenzüchtung auf die Genexpression und Proteinzusammensetzung beurteilt. Allerdings zeigte sich bei der Bestimmung des immunstimulatorischen Potentials der verschiedenen Weizensorten, dass es keinen klaren Trend über die letzten 100 Jahre gab, da sowohl alte als auch neue Sorten ein hohes Potential aufwiesen (Abb. 1C). Diese ausgewählten Sorten wurden hochvermehrt und dienten zur Identifizierung von Protein- und Peptidmarkern für Weizensorten mit geringem immunstimulatorischen Potential.

## 2. Aktivitäten und Hindernisse

Am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) wurden die 60 Weizensorten, jeweils die fünf führenden hexaploiden Sorten pro Dekade von 1891 bis 2010 in Deutschland, in den Jahren 2015-2019 als randomisiertes Block Design (3-fach) angebaut und reife Körner den Partnern zur Verfügung gestellt. Agronomische Merkmale wurden über alle Anbaujahre und Sorten erhoben. Wegen limitierter Ressourcen wurden nur für die Amylase/Trypsin-Inhibitor (ATI)-Genfamilie Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) abgeleitet (in Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum München, HMGU). Die Genexpression des ATIs WMA11 wurde mittels PCR im Korn am 16. Tag nach der Blüte (DAP) in 2016-2018 und am 20. und 25. DAP für 2016 in 24 Sorten bestimmt. Da die Genexpression von WMA11 zu stark von Umwelteinflüssen abhängig war und wegen fehlender Daten zum immunstimulatorischen Potential der Sorten, wurden die Genexpressionsanalysen zunächst nicht weiterverfolgt und dafür am Leibniz-Institut für Lebensmittel-Systembiologie an der Technischen Universität München (LSB) die Proteine quantifiziert. Mehlproben von 2017 und 2019 wurden von der Johannes Gutenberg-Universität (JGU) auf ATI-Bioaktivität untersucht. Hier ergaben sich z. T. erhebliche Unterschiede zwischen Bioaktivität und Menge der ATI (gesamt und einzelne Typen), bestimmt mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS). Erste Daten legen nahe, dass neben der Menge der ATI auch deren Oligomerisierung und partieller Abbau ihre Bioaktivität wesentlich beeinflusst. Hier wurden auch eine Reihe von präklinischen *in vitro* und *in vivo* Studien durchgeführt.

Am HMGU wurden die Mitglieder der ATI-Genfamilie sowie andere Gene mit immunstimulatorischer Wirkung genomweit identifiziert und charakterisiert. Diese Arbeiten wurden ermöglicht durch die enormen Fortschritte in der Erstellung, Annotation und Analyse der Referenz-Genomsequenzen von Brotweizen, Hartweizen, Gerste sowie Einkorn und wildem Emmer. Mithilfe dieser Ressourcen wurde gezielt in den Genomsequenzen nach den Mitgliedern der ATI-Genfamilie gesucht und diese in einer umfassenden phylogenomischen Analyse untereinander sowie zwischen den Sorten verglichen und auf ihre genomischen Eigenschaften hin untersucht. Die Ergebnisse wurden den Projektpartnern zur Verfügung gestellt.

Am LSB wurde die Proteinzusammensetzung der 60 Weizensorten untersucht. Hierfür wurden die Proteine nach ihrer Löslichkeit in Albumine/Globuline, Gliadine und Glutenine getrennt und die Fraktionen dem Universitätsklinikum Erlangen (UKE) zur Verfügung gestellt. Die Zusammensetzung wurde sowohl qualitativ mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und quantitativ mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) bestimmt. Des Weiteren wurde die bestehende RP-HPLC Integrationsmethode weiterentwickelt, um eine bessere Unterscheidung der Weizensorten zu ermöglichen. Anhand von qualitativen RP-HPLC Profilen wurden 16 Weizensorten mit auffälligen Mustern zur Hochvermehrung ausgesucht. Ausgewählte Zöliakie-aktive Peptide und die ATI wurden mittels LC-MS/MS quantitativ bestimmt.

Zur Bestimmung der ATI-Bioaktivität von quantitativen ATI-Extrakten aus Weizenmehlen wurden HeLa Toll-like-Rezeptor (TLR) 4 Reporterzellen verwendet und ein Luciferase-Dual-

Reporter Assay entwickelt (JGU). Hierbei dient das Verhältnis der biolumineszenten Substrate Renilla/Firefly als Readout, wobei Renilla für die Aktivierung des Zielproteins steht (hier TLR4) und Firefly als Kontrolle für die Zellviabilität. Der lineare Bereich des Assays und die optimale Konzentration an ATI-Extrakt pro Kavität wurden bestimmt. Die ATI-Extrakte wurden zudem mit Polymyxin B behandelt, um eine Kontamination mit Lipopolysacchariden auszuschließen, da diese den TLR4 stark aktivieren. Mit diesem Test wurden bisher mehr als 700 Mehl- und Brotproben auf ihre ATI-Bioaktivität gemessen.

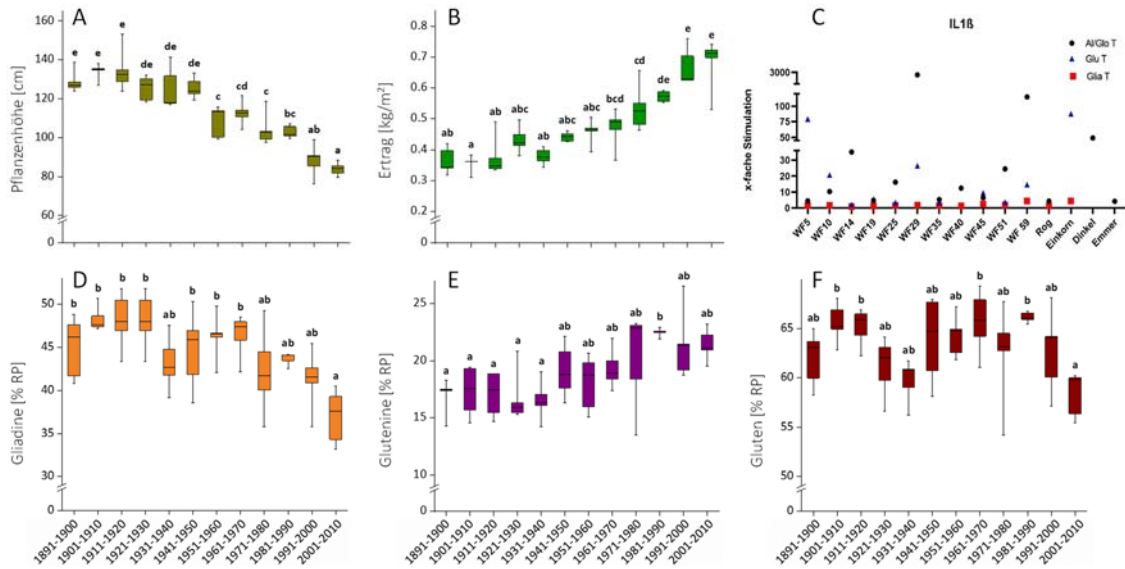
Insgesamt wurden die isolierten Proteinfractionen von elf Weizensorten der letzten 100 Jahre sowie von Roggen, Einkorn, Dinkel und Emmer mit Hilfe der humanen Monozytenzelllinie THP1 und humanen Lymphozyten aus peripherem Blut auf ihr immunstimulatorisches Potential untersucht. Hierdurch konnten Weizensorten mit hohem und geringem immunstimulatorischen Fähigkeiten identifiziert werden. Ferner wurden aus intestinalen Biopsien Stammzellen isoliert und Organoide von gesunden Kontrollen und Patienten mit Glutensensitivität erzeugt. Eine veränderte Genexpression der Organoide durch Inkubation mit Gliadinen konnte allerdings nicht beobachtet werden.

### 3. Ergebnisse und Erfolge

Die Ertragszuwächse der 60 Weizensorten über die Zeit und die Anbaujahre waren positiv mit Ähren/Fläche, Ertrag/Ähre, Körner/Ährchen und Korngewicht, aber negativ mit Ährchen/Ähre und Pflanzenhöhe korreliert (*Abb. 1A, B*). Eigenschaften, die den Ertrag erhöhen, waren negativ korreliert zur Kornqualität (Mikroelemente, Proteingehalt) und positiv zum Stärkegehalt. Die Expression des ATI-Gens WMA11 war korreliert mit Sortenjahren oder Anbaujahren. Die immunstimulatorische Aktivität der Mehle von 2019 zeigte ebenfalls keine Korrelation zum Herkunftsjahr der Sorten. Etwa fünf Sorten zeigten allerdings sehr niedrige ATI-Bioaktivität in allen drei Wiederholungen im Anbaujahr 2019. Die Bestimmung der ATI-Bioaktivitäten an Proben aus den Erntejahren 2016 und 2017 zeigte keinen eindeutigen Trend über die letzten 100 Jahre, da einerseits die Bioaktivitäten je nach Erntejahr bei der gleichen Sorte unterschiedlich waren und andererseits sowohl alte als auch moderne Sorten teils hohe (z.B. WF10 und WF40) bzw. niedrige (z. B. WF48) Bioaktivitäten zeigten.

Mit Hilfe einer spezifisch angepassten Software-Pipeline wurden insgesamt 32 Gene im Genom des Brotweizens als Mitglieder der ATI (bzw. „ATI-like“) Genfamilie identifiziert und phylogenetisch beschrieben und untersucht. Des Weiteren wurden 18, 12 bzw. 17 Gene aus der ATI-Genfamilie in den vollständigen Genomen des Hartweizens, der Gerste und des wilden Emmers identifiziert. Im Rahmen einer internationalen Kooperation wurden die Gene der ATI-Genfamilie mit allen anderen Genen (1783 Sequenzen der Prolamin Genfamilie) mit immunstimulatorischer Aktivität im Genom des Brotweizens phylogenomisch verglichen und untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2018 veröffentlicht (*Juhasz et al*).

Die Untersuchung der Proteinzusammensetzung ergab generell, dass der Einfluss des Erntejahres 2015, 2016 oder 2017 größer war, als der genetische Einfluss der einzelnen Sorten. Über die letzten 100 Jahre zeigten sich kaum Veränderungen in den Gehalten des Rohproteins und der Albumine/Globuline. Dagegen nahmen die Gehalte der Gliadine seit den 1970er Jahren ab und die der Glutenine hingegen zu (*Abb. 1D, E*). Dies lässt sich damit erklären, dass ein weiteres Ziel der Weizenzüchtung die Verbesserung der Backeigenschaften ist und die Glutenine mit guten Backeigenschaften assoziiert sind. Der Glutengehalt berechnet sich aus der Summe der Gliadine und Glutenine und zeigte aufgrund der gegenläufigen Trends zwar verhältnismäßig hohe Varianzen innerhalb der fünf Sorten pro Dekade, aber keinen eindeutigen Trend über die 100 Jahre. Die Gehalte der ATI zeigten ebenfalls keine eindeutige Zu- oder Abnahme. Die Gehalte der vier Zöliakie-aktiven Peptide veränderten sich kaum, aber es war interessant zu sehen, dass manche Sorten einzelne Peptide nicht enthielten und dass der relative Gehalt der Peptide bezogen auf den jeweiligen Proteintyp (z.B.  $\alpha$ -Gliadine) vergleichsweise konstant blieb, obwohl der Gehalt des Proteintyps abnahm. Allerdings zeigte sich auch, dass ein Rückschluss anhand der Proteinzusammensetzung auf das zu erwartende immunstimulatorische Potential schwierig ist und nur in Zusammenschau mit Tests in Zelllinien eindeutige Rückschlüsse zulässt, um Sorten mit geringem Potential zu identifizieren.



**Abb. 1.** Pflanzenhöhe (A), Ertrag (B), Expression von IL-1 $\beta$  als Marker für immunstimulatorisches Potential (C), Gehalt an Gliadinen (D), Gluteninen (E) und Gluten (F), jeweils bezogen auf den Rohproteingehalt (RP). Die Daten in (A), (B), (D)-(F) sind als Median (Linie in der Box) von fünf Weizensorten pro Dekade und Mittelwert der Erntejahre 2015, 2016 und 2017 dargestellt. Die Boxen stellen die interquartile Spanne dar, die Whisker die Minima und Maxima und verschiedene kleine Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Dekaden (einfaktorielle Varianzanalyse, Tukey's Test,  $p < 0,05$ ).

Es wurde eine eindeutige krankheitsverstärkende Wirkung der ATI in der Nahrung für inhalative und nutritive Allergien, die nichtalkoholische Steatohepatitis und Leberfibrose, sowie chronisch entzündliche Darmerkrankungen gefunden. Ferner erhöhen ATI die Darmpermeabilität und verstärken damit entzündliche Darmerkrankungen wie die Zöliakie, und verändern direkt das intestinale Mikrobiom im Sinne einer pro-entzündlichen Dysbiose. Ferner wurden mehrere klinische Proof-of-Concept-Studien (30-40 Patienten) begonnen, mit dem Ziel, den Effekt einer Weizen- und ATI-haltigen Standard-Diät vs einer >90% Weizen/ATI-freien Diät auf eine Reihe von Autoimmunerkrankungen (primär sklerosierende Cholangitis, Multiple Sklerose, nicht-alkoholische Steatohepatitis, rheumatoide Arthritis) zu testen.

Die Untersuchungen zur stimulatorischen Potenz der Getreidefraktionen zeigten eine gute Übereinstimmung der Daten, die mit den THP1-Zellen und den Lymphozyten aus peripherem Blut erhalten wurden. Bei den THP1 Zellen wurden die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und CCL2 bestimmt, bei Lymphozyten aus peripherem Blut die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und CSF-2. Es konnten ferner von acht gut charakterisierten NCGS-Patienten und sechs gesunden Kontrollpersonen aus Biopsien des Duodenums die Stammzellen isoliert und *in vitro* zu Organoiden kultiviert werden. Nach Differenzierung wurden die Organoid-Kulturen mit tryptisch verdaulichem Weizengliadin stimuliert. Die Genexpression der Organoiden wurde im RNA-Array bestimmt. Bei Organoiden von Patienten mit NCGS wurde im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen eine reduzierte Expression von Genen der extrazellulären Matrix festgestellt. Eine Inkubation der Organoiden mit enzymatisch verdaulichem Gliadin zeigte jedoch keinen weiteren Effekt. Hier ist eine Kokultur der Organoiden mit autologen Lymphozyten notwendig, um die Interaktion der Epithelzellen mit dem Immunsystem zu berücksichtigen.

#### Publikationen:

1. Juhász A, Belova T, Florides CG, *et al* (2018) *Sci Adv* 4, eaar8602.
2. Scherf KA (2019) *Curr Opin Food Sci* 25, 35-41.
3. Pickert G, Wirtz S, Heck R, *et al* (2020) *Gastroenterology*, in press.
4. Ashfaq-Khan M, Aslam M, Qureshi MA, *et al* (2019) *Sci Rep* 9, 17463.
5. Fritscher-Ravens A, Pflaum T, Möisinger M, *et al* (2019) *Gastroenterology* 157, 109-118.
6. Ziegler K, Neumann J, Liu F, *et al* (2019). *Front Immunol* 9, 3174.
7. Caminero A, McCarville JL, Zevallos VF, *et al* (2019) *Gastroenterology* 56, 2266-2280.

8. Zevallos VF, Raker VK, Maxeiner J, *et al* (2019) *Eur J Nutr* 58, 1507-1514.
9. Neumann J, Ziegler K, Gelleri M, *et al* (2019) *Nanoscale* 11, 9769-9779.
10. Bellinghausen I, Weigmann B, Zevallos V, *et al* (2019) *J Allergy Clin Immunol* 143, 201-12.

*Abgeschlossene Qualifizierungsarbeiten:*

- Bachelorarbeit, TUM (Charakterisierung von Weizenproteinfraktionen bezüglich ihrer Immunreaktivität gegenüber NCGS Patientenseren, 09/2019)
- Masterarbeit, TUM (Entwicklung einer schnellen Fraktionierungsmethode zur Differenzierung von Getreideproteinen, 03/2019)

*Wissenschaftliche Veranstaltungen mit projektbezogenen Publikationen/Vorträgen:*

- International Expert Meeting on Non-Celiac Glutensensitivity (12/2016, Lana, IT; 11/2018, Burgstall, IT)
- Digestive Disease Week (DDW), Chicago, USA (05/2017, Chicago, USA; 06/2018, Washington DC, USA; 05/2019, San Diego, USA)
- Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS) (09/2017, Dresden; 09/2018, München; 09/2019, Wiesbaden)
- D-A-CH-Tagung für angewandte Getreidewissenschaften (10/2017, Detmold)
- United European Gastroenterology Week (UEGW) (10/2017, Barcelona; 10/2018, Wien; 10/2019, Barcelona)
- American Chemical Society (ACS) National Meeting & Expo (08/2018, Boston, USA; 08/2019, San Diego, USA)
- International Bakers' Association (IBA), München (09/2018, München)
- Tagung, Berlin-Brandenburgische Gesellschaft für Getreidewissenschaften (01/2019, Berlin)
- Getreide-Tagung (03/2019, Detmold)
- 19th ICC Conference (04/2019, Wien, AT)
- Food Allergy Forum (04/2019, Amsterdam, NL)
- International Celiac Disease Symposium (09/2019, Paris, FR)

*Transfer (Beratung, Technologietransfer, Presse/Öffentlichkeitsarbeit):*

- Arzt-Patienten-Seminar (06/2016, Erlangen)
- Lange Nacht der Wissenschaften, Leibniz-Gemeinschaft (06/2018 und 06/2019, Berlin)
- Tag der offenen Tür am Leibniz-LSB@TUM (10/2018, Freising)
- Verband der Getreide-, Mühlen und Stärkewirtschaft (11/2018, Würzburg)
- TV Beitrag „Weizen im Visier: Lebensmittel oder Krankmacher?“ (BR TV, 11/2018)
- Tagung, Gemeinschaft zur Förderung von Pflanzeninnovation e.V. (05/2019, Freising)

## 4. Chancengleichheit

Die in den Leibniz-Gleichstellungsstandards verankerten Prinzipien zur aktiven Förderung der Gleichstellung der Geschlechter und der Diversität wurden insbesondere bei der Personalgewinnung und Personalentwicklung umgesetzt. Die Personalmittel aus dem Projekt wurden am LSB, IPK, HMGU, JGU und UKE ausschließlich für Mitarbeiterinnen verwendet.

## 5. Qualitätssicherung

Zu Beginn des Projekts wurde von allen Projektbeteiligten eine Kooperationsvereinbarung unterzeichnet, die die Zusammenarbeit regelt. Alle Projektpartner standen per Telefon und E-Mail in regelmäßigem Austausch untereinander, mit einem persönlichen Treffen an den jeweiligen Forschungsstellen im Wechsel (04/2016 in Freising, 02/2017 in Erlangen, 11/2017 in München, 06/2018 in Gatersleben, 04/2019 in Mainz). Die in der Leitlinie gute wissenschaftliche Praxis in der Leibniz-Gemeinschaft beschriebenen Regeln wurden umgesetzt. So wurden insbesondere alle Schritte und Resultate des Projekts auf nachvollziehbare Weise dokumentiert und die Forschungsdaten auf einem speziell dafür eingerichteten Server sicher aufbewahrt. Die am Projekt beteiligten Wissenschaftlerinnen in Qualifizierungsphasen (z.B. Masterarbeit, Promotion) wurden kontinuierlich individuell betreut.

Die aus dem Projekt noch entstehenden und bereits als Entwurf vorliegenden Peer-Reviewed Publikationen werden in Open Access Zeitschriften eingereicht.

## 6. Zusätzliche eigene Ressourcen

Am LSB wurden Personalmittel (wissenschaftliche Mitarbeiterin, 6 Personenmonate, PM) für die Koordination des Vorhabens und Sachmittel (7.500 € für ELISA-Messungen) als *In-kind* Leistungen erbracht. Am IPK waren dies Personalmittel (wissenschaftlicher Mitarbeiter, 5 PM, nicht-wissenschaftliche/r Mitarbeiter/in, 5 PM) und Sachmittel (5.000 €). Am HMGU wurden Personalmittel (wissenschaftlicher Mitarbeiter, 5 PM) eingebracht, sowie am JGU auch Personalmittel (Arzt/Ärztin, 9 PM). Am UKE wurden Personalmittel (Arzt/Ärztin, 9 PM, medizinische Fachangestellte, 9 PM) und Sachmittel (6.500 € für RNA-Analysen) *In-kind* erbracht.

## 7. Strukturen und Kooperation

Durch die führende Rolle des LSB als koordinierendes Institut ergaben sich enge Kooperationen zu allen anderen Partnern, sowohl im wissenschaftlichen als auch im administrativen Bereich. Im Projekt waren keine Veränderungen der Governance nötig. Das LSB hat vom IPK Kornressourcen erhalten, vermahlen und für die Proteom-Analysen verwendet. Zudem hat das LSB verschiedene Mehlfraktionen isoliert und diese den Partnern JGU und UKE zur Verfügung gestellt. Die am LSB erhobenen Proteom-Daten stehen für alle Partner für Korrelationen zu ihren eigenen Ergebnissen bereit. Die Ergebnisse ergaben keine Hinweise, dass sich das immunstimulatorische Potential im Verlauf der Weizenzüchtung der letzten 100 Jahre verändert hätte. Die Kooperation mit JGU zeigte allerdings sehr niedrige immunstimulatorische Aktivitäten einzelner Sorten (5/60). Die Gründe dafür sollen weiter analysiert werden (mit JGU, LSB). HMGU hat im Rahmen des Projekts eng mit IPK im Hinblick auf die Auswahl geeigneter Kandidaten für die experimentelle Analyse aus der ATI Genfamilie in Weizen und anderen Getreidesorten kooperiert. Im Rahmen der phylogenetischen Analyse ergab sich die Möglichkeit zur Zusammenarbeit mit zusätzlichen internationalen Partnern (Australien und Norwegen) und der gemeinsamen Publikation der Ergebnisse. JGU hat von LSB und IPK Kornressourcen zur Bestimmung der ATI-Bioaktivität erhalten und stellt die Daten für gemeinsame Publikationen zur Verfügung. UKE hat von LSB die isolierten Mehlfraktionen erhalten und umgekehrt Blutseren von NCGS-Patienten zur Verfügung gestellt. Alle Projektpartner/innen arbeiten derzeit an der Ausgestaltung gemeinsamer Publikationen.

## 8. Ausblick

Die Proteom-Analysen zeigen, dass sich die Proteinzusammensetzung der Weizensorten über die letzten 100 Jahre verändert hat. Die Gehalte der Gliadine nahmen ab, während die der Glutenine zunahmen. Die Quantifizierung ausgewählter immunstimulierender Peptide zeigte, dass die Gehalte der Peptide nicht notwendigerweise mit denen der entsprechenden Gliadin- oder Gluteninfraktionen korreliert sind. Daher ist die Entwicklung einer umfassenden Methode zur Quantifizierung dieser immunstimulierenden Peptide bereits in Arbeit. Falls es sich bestätigt, dass einzelne Sorten sehr niedrige immunstimulatorische Aktivität zeigen, sollen die Gründe dafür analysiert werden, etwa auf genetischer oder proteinchemischer Ebene. Die enormen Fortschritte im Bereich der Genomsequenzierung und Analyse auch hochkomplexer Getreidegenome wird in naher Zukunft neue Wege bei der funktionellen Analyse (u.a. Genregulation) der an Weizenunverträglichkeiten beteiligten Gene und Genfamilien eröffnen. In Anschlussprojekten werden Getreidefraktionen mit hohem und geringem immunstimulatorischen Potential in Kokulturen aus Organoiden und autologen Lymphozyten getestet. Auch nach Projektende stehen alle beteiligten Arbeitsgruppen weiter in regem Austausch und es bestehen teilweise schon weitere bi-/multilaterale Kooperationen oder diese sind geplant. Die Untersuchungen zu den ATI zeigten z.T. erhebliche Unterschiede zwischen ATI-Bioaktivität und ATI-Konzentrationen. Weitere Untersuchungen sollen klären, inwieweit neben der Menge der ATI auch deren Oligomerisierung und partieller Abbau ihre Bioaktivität beeinflusst. Ferner werden sich hieraus Strategien ergeben, mit welchen Verfahren sich die pro-entzündliche ATI-Aktivität, z.B. durch Sortenauswahl, Anbaumethode des Weizens und Prozessierung der Lebensmittel (Teigführung) oder Zusatz bestimmter Proteasen, deutlich reduzieren lässt.