

## Entwicklung standardisierter Assays zur Bestimmung der Aktivität von Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATI) in Mehlen und Backwaren



Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle(n):	Leibniz-Institut für Lebensmittel-Systembiologie an der Technischen Universität München, Freising Prof. Dr. Veronika Somoza/Prof. Dr. Katharina Scherf  Universität Mainz Universitätsmedizin Institut für Translationale Immunologie Prof. Dr. Dr. Detlef Schuppan
Industriegruppe(n):	Verband der Getreide-, Mühlen- und Stärkewirtschaft e. V. (VGMS), Berlin Gemeinschaft zur Förderung von Pflanzeninnovation e. V. (GFPI), Bonn Verein der Förderer des Hans-Dieter-Belitz-Instituts für Mehl- und Eiweißforschung e. V. (hdbi), Freising Deutsche Zöliakie Gesellschaft e. V., Stuttgart
Projektkoordinatorin:	Dr. Markus Brandt Ernst Böcker GmbH & Co. KG, Minden
Laufzeit:	2018 - 2021
Zuwendungssumme:	€ 461.030,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### **Ausgangssituation**

Der Konsum von Weizenprodukten führt bei einem Teil der Bevölkerung zu allergischen oder entzündlichen Immunreaktionen. Schätzungsweise 1 % der westlichen Bevölkerung sind von Zöliakie, 0,5 - 2 % von Weizenallergie und möglicherweise bis zu 10 % von Nicht-Zöliakie-Weizensensitivität (NCWS, „Glutensensitivität“) betroffen. Die einzige Therapie für diese Hypersensitivitäten ist eine gluten-(weizen-)freie Diät.

Untersuchungen von Forschungsstelle (FS) 2 zeigten, dass nicht vorrangig Glutenproteine, sondern die Proteinfamilie der Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATI) für die NCWS verantwortlich ist. So führt der Verzehr von ATI zu einer Verschlimmerung von chronisch entzündlichen, auch extraintestinalen, Erkrankungen. Es handelt sich dabei um ein dosisabhängiges Phänomen, d.h. eine Reduktion des ATI-Gehalts auf 10 % des Ausgangswerts verhindert die unerwünschten Krankheitszeichen in präklinischen In-vivo Entzündungsmodellen sowie in der klinischen Ambulanz von FS 2. Mit Hilfe von Zellassays zur Bestimmung des immunaktivierenden Potentials von ATI wurde an FS 2 gezeigt, dass ATI gegen die humanen gastrointestinalen Peptidasen hochresistent sind und ihre Bioaktivität (Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 4, TLR4, auf myeloiden Zellen) durch übliche Backprozesse nur wenig beeinflusst wird.

Mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) lassen sich ATI-Konzentrationen in Weizenmehlen und -produkten quantifizieren. Zudem werden Enzymassays zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegen Amylase und Trypsin in Mehlen eingesetzt; im Moment existieren jedoch kaum Daten zur Korrelation zwischen der ATI-Konzentration und der ATI-Aktivität. Es gibt auch keinerlei Untersuchungen, inwieweit verschiedene Prozessparameter bei der Herstellung von Backwaren die ATI-Konzentration und die ATI-Aktivität beeinflussen. Es wird vermutet, dass bereits die Auswahl der Getreideart (Brotweizen, Dinkel, Hartweizen, Emmer, Einkorn) oder der Getreidesorte, die Vermahlungstechnik, die Verwendung von gekeimtem Getreide und verschiedene Teigführungen zu einer verringerten ATI-Aktivität und somit zu einer verbesserten Verträglichkeit der Backwaren für NCWS- und Reizdarmpatienten führen können.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung von Enzymassays und ELISA für die einfache, standardisierte und reproduzierbare Quantifizierung von ATI in Rohstoffen und Getreideprodukten. Mit Hilfe dieser Assays sollten grundlegende Zusammenhänge zwischen der ATI-Konzentration, deren Inhibitor-Aktivität sowie der Immunaktivität über den Prozess der Backwarenherstellung hinweg aufgeklärt werden. Dadurch können Prozessparameter bei der Herstellung von Backwaren variiert und optimiert werden, um die ATI-Konzentration und die ATI-Aktivität zu minimieren und eine verbesserte Verträglichkeit für NCWS-Betroffene zu erreichen.

### **Forschungsergebnis**

An FS 1 wurden zwei Enzymassays etabliert, mit denen die inhibitorische Aktivität gegen Amylase und Trypsin von Mehlextrakten bestimmbar ist. Beide Assays wurden mit kontinuierlichen Messungen der Absorption bzw. Fluoreszenz durchgeführt, so dass die Kinetik der Enzymreaktionen berücksichtigt wird. Weiterhin wurde die zu Projektbeginn bestehende LC-MS/MS-Methode von fünf bestimmbareren ATI auf 13 ATI erweitert.

Die Untersuchung eines Probensortiments aus je acht Sorten Weichweizen, Dinkel, Hartweizen, Emmer und Einkorn angebaut an drei Standorten in Deutschland zeigte, dass Einkorn keine inhibitorische Aktivität gegen Amylase jedoch eine sehr hohe Aktivität gegen Trypsin aufwies. Emmer dagegen hatte die niedrigste inhibitorische Aktivität gegen beide Enzyme und Weichweizen die höchste gegen Amylase.

In Einkorn wurden auch keine ATI oder nur sehr geringe Mengen mittels LC-MS/MS detektiert und Weichweizen, Dinkel und Emmer hatten hohe ATI-Gehalte. Die Korrelationsanalyse zwischen der inhibitorischen Aktivität gegen Trypsin und Amylase zeigte, dass keine Korrelation und daher kein Zusammenhang zwischen diesen Parametern bestand.

Die an FS 2 bestimmte Bioaktivität war in allen Proben des Probensortiments relativ ausgeglichen und alle Proben hatten hohe Bioaktivitäten. Daher wurde auch keine Korrelation zwischen der ATI-Konzentration, der inhibitorischen Aktivität und der Bioaktivität festgestellt. Dies zeigt die Notwendigkeit aller drei Methoden und die Werte sind nicht durch eine jeweils andere Methode vorhersagbar.

An FS 2 wurden die primären ATI CM3 und 0.19 kloniert und rekombinant über Bacmide in Insektenzellkulturen in hoher Reinheit nativ und partiell glykosyliert, wie natürlich vorkommend, exprimiert und mittels Affinitäts- und Molekularsiebchromatographie hochgereinigt. Parallel dazu wurden beide ATI in eukaryotischen HEK293-Zellen über kodierende Plasmide erfolgreich exprimiert. Identität und Reinheit wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, LC-MS/MS und Western-Blot mit eigens hergestellten, hochspezifischen und aviden polyklonalen Peptid-Antikörpern gegen CM3 und 0.19 gegen CM2 und CM16 verifiziert. Mit jeweils zwei dieser hochspezifischen Peptid-Antikörper gegen verschiedene Sequenzen aus CM3 und 0.19 sowie einem polyklonalen ATI-Antikörper wurden zunächst Sandwich-ELISAs für die Bestimmung von CM3 und 0.19 etabliert. Die Sensitivität war jedoch noch relativ gering. Anschließend wurden monoklonale Antikörper mit hohem Titer für das nicht-kovalent assoziierte 0.19 Dimer und mit geringem Titer für das hochstabile, nicht-kovalente assoziierte CM3-Tetramer erhalten. Die Subklonierung ergab jedoch auch zwei höher affine CM3-Antikörper. Ein stabiler und sensitiver ELISA wurde für 0.19 etabliert. Der ELISA für CM3 ist weiterhin in Entwicklung.

Für die Bioaktivitätsmessung (TLR4-Aktivierung auf myeloiden Immunzellen) wurde mit doppelt-transfizierten HEK 293-Zellen ein neues zelluläres Indikatorsystem etabliert und validiert (NFkB-responsive Expression von Firefly-Luciferase sowie Renilla-Luciferase als Viabilitätsmarker).

Die neu etablierten Methoden wurden auf eine große Anzahl an Proben angewandt. Es zeigte sich, dass der Ausmahlungsgrad, die Verwendung von alten und neuen Weizensorten sowie von gekeimten Körnern nicht zu einer Reduzierung der ATI-Gehalte, der inhibitorischen Aktivität und Bioaktivität führte. Dagegen ist die Sauerteigfermentation eine aussichtsreiche Möglichkeit, um die ATI-Bioaktivität von Teigen zu senken.

### **Wirtschaftliche Bedeutung**

Populärwissenschaftliche Bücher, die den Weizenverzehr für eine Vielzahl von Krankheiten verantwortlich machen, haben in den vergangenen Jahren zu einer großen Verunsicherung bei Verbrauchern geführt. Aufgrund dessen meiden immer mehr Menschen Weizenprodukte, weil sie glauben, dass diese ungesund wären und laufen unter Umständen Gefahr, sich falsch zu ernähren. Durch die Entwicklung eines kommerziell erhältlichen ELISA können kleine und mittelständische Unternehmen (KMU) der Backwarenbranche entweder in eigenen Laboren oder als Auftragsanalytik schnell und kostengünstig die ATI-Konzentration in ihren Produkten bestimmen. Auf dieser Basis können KMU sensorisch und technofunktionell hochwertige Weizenprodukte mit einem verbesserten Gesundheitsaspekt herstellen und hierdurch Wettbewerbsvorteile auf den nationalen und internationalen Märkten erzielen.

### **Publikationen (Auswahl)**

1. FEI-Schlussbericht 2020.
2. Sielaff, M., Curella, V., Neerukonda, M., Afzal, M., El Hassouni, K., Distler, U., Schuppan D., Longin, C.F.H. & Tenzer, S.: Hybrid QconCAT-Based Targeted Absolute and Data-Independent Acquisition-Based Label-Free Quantification Enables In-Depth Proteomic Characterization of Wheat Amylase/Trypsin Inhibitor Extracts. *J. Prot. Res.* 20 (3),1544-1557 doi: 10.1021/acs.jprote-ome.0c00752 (2021).
3. Afzal, M., Sielaff, M., Curella, V., Neerukonda, M., El Hassouni, K., Schuppan, D., Tenzer, S. & Longin, C.F.H.: Characterization of 150 Wheat Cultivars by LC-MS-Based Label-Free Quantitative Proteomics Unravels Possibilities to Design Wheat Better for Baking Quality and Human Health. *Plants* 10 (3), 424. doi: 10.3390/plants10030424 (2021).
4. Jahn, N., Geißlitz, S. & Scherf K.: Zusammenhang zwischen Aktivität und Gehalt von Amylase/Trypsin-Inhibitoren in verschiedenen Weizenarten. *Lebensmittelchem.* 75 (S1), S1-012-S1-012. doi: 10.1002/lemi.202157011 (2021).
5. Geißlitz, S., Longin, F., Koehler, P. & Scherf K.: Comparative Quantitative LC-MS/MS Analysis of 13 Amylase/Trypsin Inhibitors in Ancient and Modern Triticum Species. *Sci. Rep.* 10 (1), 14570 doi: 10.1038/s41598-020-71413-z (2020).
6. Huang, X., Gänzle, M., Loponen, J. & Schuppan, D.: Sourdough Fermentation Degrades Wheat Alpha-Amylase/Trypsin Inhibitor (ATI) and Reduces Pro-Inflammatory Activity (Reply). *Foods* 9 (10),1405. doi: 10.3390/foods9070943 (2020).
7. Huang, X., Schuppan, D., Rojas Tovar, L.E., Zevallos, V.F., Loponen, J. & Gänzle, M.: Sourdough Fermentation Degrades Wheat Alpha-Amylase/Trypsin Inhibitor (ATI) and Reduces Pro-Inflammatory Activity. *Foods* 9 (7), 943. doi:10.3390/foods9070943 (2020).
8. Dos Santos Guilherme, M., Zevallos, V.F., Pesi, A., Stoye, N.M., Nguyen, V.T.T., Radyushkin, K., Schwiertz, A., Schmitt, U., Schuppan, D. & Endres, K.: Dietary Wheat Amylase Trypsin Inhibitors Impact Alzheimer's Disease Pathology in 5xFAD Model Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (17), 6288 (2020). doi: 10.3390/ijms21176288.
9. Pickert, G., Wirtz, S., Matzner, J., Ashfaq-Khan, M., Heck, R., Rosigkeit, S., Thies, D., Surabattula, R., Ehmann, D., Wehkamp, J., Aslam, M., He, G., Weigert, A., Foerster, F., Klotz, L., Frick, J.S., Becker, C., Bockamp, E. & Schuppan, D.: 2020. Wheat Consumption Aggravates Colitis in Mice via Amylase Trypsin Inhibitor-mediated Dysbiosis. *Gastroent.* 159 (1), 257-272.e17 doi: 10.1053/j.gastro.2020.03.064 (2020).
10. Geißlitz, S, Ludwig, C, Scherf, K. & Koehler, P.: Targeted LC-MS/MS Reveals Similar Contents of  $\alpha$ -Amylase/Trypsin-Inhibitors as Putative Triggers of Nonceliac Gluten Sensitivity in All Wheat Species except Einkorn. *J. Agric. Food Chem.* 66 (46), 12395-12403. doi: 10.1021/acs.jafc.8b04411 (2018).

### Weiteres Informationsmaterial

Leibniz-Institut für Lebensmittel-Systembiologie  
an Technischen Universität München  
Lise-Meitner-Straße 34, 85354 Freising  
Tel.: +49 8161 71-2927  
Fax: +49 8161 71-2970  
E-Mail: k.scherf.leibniz-lsb@tum.de

Universität Mainz  
Universitätsmedizin  
Institut für Translationale Immunologie  
Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz  
Tel.: +49 6131 17-7356  
Fax: +49 6131 17-7357  
E-Mail: detlef.schuppan@unimedizin-mainz.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn  
Tel.: +49 228 3079699-0  
Fax: +49 228 3079699-9  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

### Förderhinweis

## ... ein Projekt der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)

Gefördert durch:



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Bildnachweis - Seite 1: © Maksim Shebeko – stock.adobe.com #235604159

Stand: 5. Januar 2022