

Posttranskriptionale Geninaktivierung der α -Gliadine in Weizen (*Triticum aestivum* L.)

Anne-Christine Folck

Zusammenfassung

Die Zöliakie ist eine häufig bereits im Kleinkindalter manifestierte, chronische Verdauungsinsuffizienz. Die Erkrankung tritt vermutlich infolge einer autoimmunologisch begründeten Unverträglichkeit gegenüber bestimmten Speicherproteinen aus Weizen (Gliadine), Roggen (Secaline) und Gerste (Hordeine) auf. Das Auftreten der Krankheit ist beschränkt auf Menschen europider Abstammung und ist durch die koloniale Expansion der europäischen Völker auf allen Kontinenten verbreitet. Neue epidemiologische Studien belegen eine Inzidenz von bis zu 1% in Europa.

Die Intoleranz führt zur Schädigung der Dünndarmschleimhaut. Es kommt zu einem Funktionsverlust des Darms und damit verbunden zur Malabsorption. Die Patienten leiden unter anderem an Durchfall und Erbrechen. Aufgrund der Mangelversorgung über einen längeren Zeitraum kommt es zu Folgeerkrankungen wie z. B. Anämie, Auszehrung, Knochenschmerzen, Abgeschlagenheit, psychischen Veränderungen sowie Entwicklungsstörungen bei Kindern.

Da die Erkrankung durch die Aufnahme kleinster Mengen von Gliadinen, Hordeinen oder Secalinen mit der Nahrung ausgelöst wird, ist die bis heute einzige Therapie, unter der sich die induzierten Veränderungen der Darmschleimhaut zurückbilden, ein lebenslanger, strikter Verzicht auf entsprechende Nahrungsmittel.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, als Bestandteil des BMB+F Leitprojektes „Zöliakie“ sollte mit Hilfe des RNA Interference (RNAi) versucht werden, die α -Gliadine in Weizen vollständig zu eliminieren. Zu Beginn dieser Arbeit gab es für stabil transformierten Weizen keinen Hinweis auf RNAi induzierte Phänotypen. Die besondere Schwierigkeit der Arbeit bestand darüber hinaus darin, nicht die Expression eines einzelnen Gens, sondern die einer Genfamilie zu inhibieren.

Die Gliadine des Weizens werden in die drei Hauptgruppen, der α/β -, γ - und ω -Gliadine unterteilt und bilden zusammen die Gliadin-Superfamilie. Die Anzahl der Gene liegt beispielsweise für die α -Gliadine je nach Kultivar zwischen 25 und 150, von denen etwa die

Hälfte transkribiert wird. Der Anteil der Gliadine liegt bei etwa 30-35% des Gesamtproteingehalts in der Weizenkaryopse.

In der vorgestellten Untersuchung wurde eine 313 bp lange α -Gliadin-Teilsequenz aus Weizen isoliert und in drei, in ihrem Aufbau unterschiedliche RNAi-Transformationsvektoren kloniert. Die α -Gliadin-Sequenz wurde in sense- und antisense-Orientierung in die Vektoren inseriert. Die Transkription der drei unterschiedlichen Vektoren sollte in allen Fällen zur Bildung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) führen, die als Voraussetzung für eine posttranskriptionale Geninaktivierung durch RNAi angesehen wird.

Die Transformationsvektoren wurden anschließend in Skutellumzellen unreifer Weizen-Embryonen mit der biolistischen Transformationsmethode übertragen. Insgesamt wurden 174 unabhängige transgene Weizenpflanzen selektiert. Die Integration und Transkription der drei RNAi-Konstrukte wurde durch Southern- und Northern Blot bzw. RT-PCR in den primär transgenen Pflanzen und z. T. bis in die T₂-Generation belegt.

Die Analyse der Zusammensetzung der Speicherproteine von transgenen Weizenkaryopsen erfolgte durch RP-HPLC- und SDS-PAGE-Untersuchungen. Für zwei der drei stabil in das Weizengenom integrierten RNAi-Vektoren wurde in den Karyopsen eine deutliche Reduktion der α -Gliadine nachgewiesen. Mit einem der beiden Genkonstrukte konnte bei allen untersuchten transgenen Pflanzen eine Eliminierung der α -Gliadine erzielt werden. Für eine transgene Pflanzenlinie wurde durch eine Proteinansequenzierung der Nachweis erbracht, dass die α -Gliadine vollständig entfernt werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals in hexaploidem Weizen durch stabile Transformation mit dsRNA-exprimierenden Transkriptionsvektoren eine posttranskriptionale Geninaktivierung erreicht. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es mit dieser Methode möglich ist, die Expression einer Genfamilie komplett zu inhibieren.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen ist die Eliminierung der übrigen γ - und ω -Gliadine geplant und damit prinzipiell eine Methode zur Erzeugung eines gliadinfreien Weizens entwickelt.