

Über die Antigenität des Gliadins und die Antikörper gegen Gliadin

Von

S. CSORBA, M. SZABOLCS, MÁRIA KÁVAI, JUDIT JEZERNICZKY
und B. SZABÓ

Kinderklinik, Zentrales Forschungsinstitut und Pathophysiologisches Institut
der Medizinischen Universität Debrecen

(Eingegangen am 11. Februar 1975)

Mit verschiedenen Verfahren (Fraktionierung auf Sephadex G-75-Säule, Ultrazentrifugieren, Akrylamid-Gel-Elektrophorese, Immundiffusion, Protease-Inhibitorwirkung) wurden die physikochemischen und immunologischen Eigenschaften des Gliadins untersucht.

Dem Molekulargewicht nach konnte das Gliadin in 4 große Fraktionen A, B, C und D geteilt werden. Durch weitere Analyse dieser Fraktionen konnten 13-14 Komponenten nachgewiesen werden. Die Komponenten 2-4 der Fraktion A - deren Molekulargewicht am höchsten ist - verhielten sich, wie das anhand des Molekulargewichts, der Mobilität und der Reagierung mit dem Serum der Patienten festzustellen war, als Antigene. Die Komponenten 1-9 (deren Molekulargewicht niedrig ist) der Fraktionen B, C und D verfügen über eine Protease-Inhibitorwirkung, die parallel mit der Verringerung der Menge der einen Antigencharakter aufweisenden Fraktion A, im Laufe der Dauerlagerung aufhört.

In bezug auf den anlässlich der semiquantitativen und quantitativen Immundiffusion nachgewiesenen Gliadin-Antikörper wurde festgestellt, daß dieser annehmbar ein Reagin von IgG-Typ ist. Da der Gliadin-Antikörper auch im Serum der meisten Normalpersonen nachzuweisen ist, besitzt nur ein entsprechend hoher, oder ein ansteigender Titer einen diagnostischen Wert.

Die Untersuchung der Weizenproteine blickt auf eine lange Vergangenheit zurück. Auch die human-pathologische Bedeutung von Gliadin, eines der in größten Mengen vorfindbaren Weizenproteine, wurde bereits vor mehr Jahrzehnten entdeckt [7]. Seitdem erschien eine Reihe von Mitteilungen, die sich mit der Eiweißstruktur, dem Antigencharakter, den Eigenschaften des sich gegen das Protein bildenden Antikörpers und den toxischen Wirkungen der Abbaupro-

dukte befaßten [2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31]. Eins haben aber sämtliche diesbezüglichen Arbeiten gemein, nämlich die Tatsache, daß zahlreiche ätiopathogenetische Fragen, die sich bei der Zöliakie in bezug auf die Rolle des Gliadins erheben, noch immer ungeklärt sind. Dies veranlaßte uns zur Untersuchung der physikochemischen und immunologischen Eigenschaften von Gliadin, die - auch ohne einer Prädisposition

des Patienten (Peptidase-Mangel) — eine Erklärung für die Auslösung und Aufrechterhaltung des pathologischen Zustands liefern können.

METHODIK

Weizenmehl wurde je Gramm in 20 ml destilliertem Wasser (2–4 °C) suspendiert und die Suspension 30–36 Stunden lang — 4–6stündlich kräftig durchgeschüttelt — im Kühlschrank aufbewahrt, dann in einer MSE 25 High Speed Zentrifuge bei 2 °C mit 50 000 × g. 30 Minuten lang zentrifugiert. Zu den Experimenten kam nur das Extrakt zur Anwendung, das Präzipitat wurde weggeschüttet.

Der Eiweißgehalt des hergestellten Extrakts schwankte zwischen 1,0–1,2 mg/ml, die Einkonzentrierung erfolgte entweder mit Druckdialyse oder Lyophilisierung.

Fraktionierung auf Sephadex G-75-Säule

Das konzentrierte Extrakt wurde nach Dialyse gegen 0,05 M TRIS—HCl und 0,15 M NaCl enthaltende Pufferlösung pH 8,2 auf einer mit demselben Puffer äquilibrierten Sephadex G-75-Säule (Durchmesser: 1,8 cm; Höhe: 25 cm, Volumen: 64 cm³) fraktioniert.

Auf die Säule wurde eine, 5–6 mg Eiweiß entsprechende Extraktmenge aufgetragen. Die Eluierung erfolgte ebenfalls mit der obigen Pufferlösung bei +4 °C. Die Eluierungsgeschwindigkeit betrug 6–7 ml/cm²/St., das Volumen der Fraktionen machte 2,4 ml aus. Die Extinktion der Fraktionen wurde mit einem Spektrophotometer Typ VSU 2 P, bei 280 μm gemessen. Die Säule wurde mit bovin-Serumalbumin und Ribonuklease kalibriert. Die Homogenität des Extrakts wurde gleichzeitig auch in der Ultrazentrifuge MOM—G-120 untersucht.

Protease-Inhibitor-Aktivität

Die Protease-Inhibitor-Aktivität des konzentrierten Vollextrakts und der Fraktionen wurde mit der Methode nach KUNITZ [18] oder anhand der Viskositätsänderung, die bei der in der Anwesenheit der fraglichen Gliadin-Fraktion durchgeführten Trypsinverdauung einer Kaninchen-Aktomyosinlösung zustandekommt, gemessen. Zu diesem Zweck wurden kristallines Trypsin (Calbiochem. Aktivität: 3050 N. F. Einheiten/mg) und Trypsin-inhibitor (Reanal, Budapest) angewandt.

Elektrophorese

Das konzentrierte Vollextrakt und die Fraktionen wurden im 7%igen Polyakrylamid-Gel (Ionstärke: 0,05, pH: 8,3 in TRIS-Glycin-Puffer) elektrophoriert. Das konzentrierte Extrakt wurde mit einem großporigen Gel 1:1 verdünnt, worauf die Eiweißkonzentration 1 mg/ml betrug. Aus dieser Verdünnung wurden 0,15–0,20 mg, d. h. 150–200 μg auf die Säulen gemessen. Die Wanderungszeit belief sich auf 120 Minuten bei 3,5 mA/Rohr und 340 V. Die Färbung erfolgte mit Coomassie brilliant blue (in 12,5%iger TCA-Lösung), die überflüssige Farbstoffmenge wurde mit 6,25%iger TCA-Lösung ausgelöst.

Immunitätsdiffusion

Mit Hilfe des von uns hergestellten Antigens wurden im Serum von rund 200 Normalpersonen und 8 Zöliakie-Kranken Antikörperbestimmungen durchgeführt und auch die Typisierung des nachgewiesenen Antikörpers bestrebt [6].

ERGEBNISSE

Das wässrige Mehlextrakt trennt sich auf der Sephadex G-75-Säule in 4 Fraktionen (Abb. 1), diese nannten wir Fraktion A, B, C und D. Das

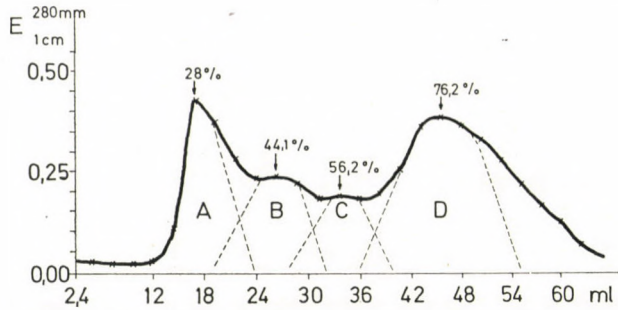


ABB. 1. Eluierungsdiagramm des Mehlextraktes bei Gelfiltration auf Sephadex-G-75-Säule. Auf der Ordinate die bei 280 nm (Küvette: 1 cm) gemessenen Extinktionen der Fraktionen, auf der Abszisse das Volumen (in ml) der von der Säule eluierten Lösung

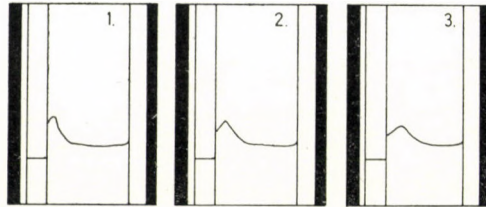


ABB. 2. Sedimentationsdiagramm des Mehlextraktes — Tourenzahl: 46 080/min. Temperatur: 20 °C. Eiweißkonzentration 8 mg/ml. Die erste Aufnahme wurde 20 Minuten, die zweite 30 Minuten und die dritte 55 Minuten nach der Akzeleration gefertigt

Molekulargewicht (66 000) der unter Anwendung der mit Substanzen von verschiedenem Molekulargewicht (Albumin, Ovalbumin, Ribonuklease usw.) kalibrierten Sephadex-G-75-Säule bestimmten Fraktion A liegt im Bereich des Hämoglobins, während das der Fraktion B (13 700) sich nicht viel vom entsprechenden Wert der Ribonuklease unterscheidet. Die Molekulargewichte der beiden anderen Fraktionen sind niedriger, als die der Fraktion B. Die polydisperse Eigenschaft des Eiweißes haben auch die mit der Ultrazentrifuge durchgeführten Homogenitätsuntersuchungen bewiesen (Abb. 2).

Auf Abbildung 3 sind die Zahl und die Verteilung der mit Elektrophorese

erhaltenen Eiweißkomponenten des Mehl-Vollextraktes und der Fraktionen A, B, C und D dargestellt. Wie ersichtlich, erhält das Mehl-Vollextrakt 13 Eiweißkomponenten, deren Mobilität unterschiedlich ist. Wir haben die Eiweißkomponenten vom anodwärts liegenden Ende der Gelsäule her numeriert; in nennenswerten Mengen erschienen die Komponenten 1, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12. In der Fraktion A war die Anreicherung der 1, 7, 11, 12, 13, in der Fraktion B die der 6, 7, 8, in der Fraktion C die der 5, 7 und schließlich in der Fraktion D die der 1, 7 Komponenten zu registrieren.

Wurde die die Eiweißkomponenten des Mehlextraktes enthaltende Gelsäule mit dem unverdünnten und dem

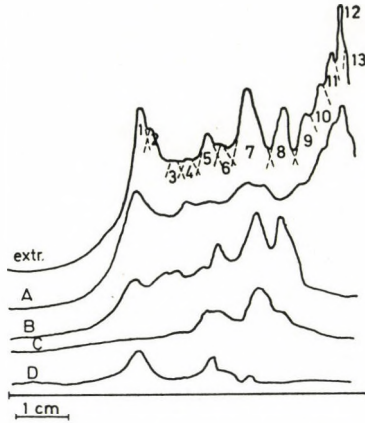


ABB. 3. Durch Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese getrennte Eiweißkomponenten des Mehlextraktes und der Fraktionen A, B, C, D. Die Aufnahmen wurden nach Färbung der Gelsäulen mit dem Kipp-Densitometer gefertigt

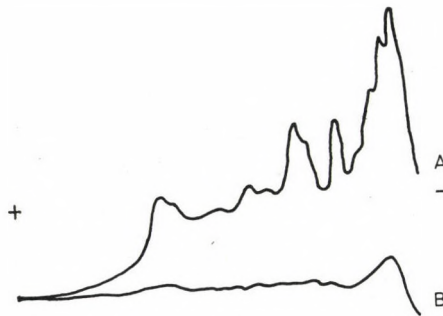


ABB. 4. Antigenität der mit Elektrophorese gewonnenen Eiweißkomponenten des Mehlextraktes anhand der Reaktion mit Seren von Zöliakie-Patienten. A: Densitometrisches Elektrophoretogramm der nach Elektrophorese des Mehlextraktes gefärbten Gelsäule. B: Dasselbe nach der Inkubation mit Zöliakie-Serum und dem Waschen mit phys. Kochsalzlösung

2—4—6fach verdünnten Serum von Zöliakie-Kranken inkubiert, so reagierten nur die in Katodnähe befindlichen 2—4 Komponenten mit dem im Serum vorhandenen Antikörper (Abb. 4). Diese Komponenten waren die zur auf der Sephadex-G-75-Säule gewonnenen Fraktion A gehörenden Proteine mit hohem Molekulargewicht.

Demnach erhob sich die Frage, welche Rolle die übrigen Eiweißkom-

ponenten spielen, wenn für die Proteinantigenität nur einige Komponenten der Fraktion A verantwortlich sind. Um dem Problem näher zu kommen, untersuchten wir die Protease-Inhibitor-Aktivität dieser Fraktionen; die Ergebnisse veranschaulicht Abbildung 5.

Abbildung 6 zeigt ein mit der Verdünnungsreihe eines Patientenserums erhaltenes Immundiffusionsbild (Abb.)

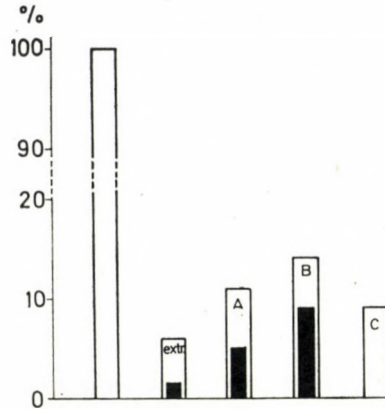


ABB. 5. Relative Protease-Inhibitorenaktivität des Mehlextraktes und der Fraktionen. Der Protease-Inhibitoreffekt (100%) des Trypsininhibitors [Konz.: $10 \mu\text{g/ml}$] wurde mit dem Trypsin-Inhibitoreffekt des Mehlextraktes (Konz.: $70 \mu\text{g/ml}$) bzw. der Fraktionen A, B und C spektrophotometrisch verglichen. Inhibitorwirkung des Mehlextraktes (Konz.: $350 \mu\text{g/ml}$) und der Fraktionen A, B auf die bei Trypsinverdauung von Kaninchenaktomyosin (Konz.: 2 mg/ml) zustandekommenden Viskositätsverminderung

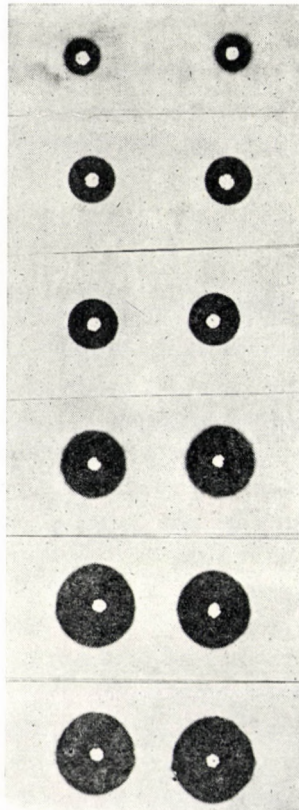


ABB. 6. Mit Serumverdünnungen von 1:2, 1:4, 1:8, usw., eines Zöliakie-Patienten verfertigtes Immundiffusionsbild

Die quantitative Bewertung der Immunpräzipitate erfolgte unter Anwendung eines durch Immunisierung von Kaninchen gewonnenen Standardserums [6].

BESPRECHUNG

Seit der Feststellung von DICKE [7], laut der in der Auslösung des Zöliakie-Syndroms das Weizenprotein eine Rolle spielt, setzten sich zur Klärung der physikochemischen Eigenarten dieses Eiweißes mehrere Forschungen in Gang. Die mit Elektrophorese, Ultrazentrifugieren und Chromatographie gewonnenen Ergebnisse haben die zu Beginn des Jahrhunderts geäußerte Anschauung von OSBORNE [22] — daß nämlich die im Gluten in identischer Proportion befindlichen Gliadin und Glutamin homogene Eiweiße sind — eindeutig überholt. JONES und Mitarb. [15] vermochten im Glutenextrakt bereits 5 Eiweißfraktionen abzusondern. ELTON und EWART [8] haben mit Stärke-Gel-Elektrophorese 8 Komponenten des Weizen-Gluten-Extrakts nachgewiesen, während WOYCHIK und Mitarb. [13] unter Anwendung derselben Methode jedoch mit ureahaltigem Aluminiumazetatpuffer bereits 9 Komponenten vorfanden. ROSSIPAL [25] registrierte mit Disk-Elektrophorese 12—14 Proteinfractionen, unter denen seines Erachtens den in Anodnähe befindlichen 2—3 Fraktionen eine Antigen-Rolle beizumessen ist.

Die Polydispersität des wässrigen Mehlextrakts vermochten wir im Laufe unserer Untersuchungen mit Ultra-

zentrifugalanalyse, durch Fraktionierung und auch mit Akrylamid-Gel-Elektrophorese zu beweisen. In Kenntnis des Molekulargewichts der einzelnen Fraktionen und anhand der sich aus der schwachen Elektronnegativität ergebenden Mobilität nahmen wir an, daß einige in der Fraktion A befindlichen Komponenten über Antigen-Eigenschaften verfügen. Den Voraussetzungen entsprechend reagierten die in Katodnähe liegenden Komponenten — insofern die Gelsäulen nach der Elektrophorese des Mehlextrakts in unverdünntem bzw. in 2—4—6fach verdünntem Serum bei 25° C 2 Stunden lang inkubiert wurden — tatsächlich mit den im Serum von Zöliakie-Patienten befindlichen Gliadin-Präzipitinen. Diese Komponenten 2—4 entsprachen indessen der auf der Sephadex-Säule gewonnenen, über das größte Molekulargewicht verfügenden Fraktion A.

Angesichts dessen, daß wir in bezug auf den Charakter und die Rolle der übrigen Fraktionen in der zugänglichen Literatur keine Angaben vorfanden, trachteten wir auf die Frage eine Antwort zu erhalten, welche Bedeutung diesen Bestandteilen mit kleinem Molekulargewicht zukommt. Hierbei gingen wir von der Annahme aus, daß falls die Zöliakie eine sich infolge der sich im Darmtrakt abspielenden Antigen-Antikörper-Reaktion entstandene allergische Krankheit ist [1, 3], das Eiweiß unzersetzt zur Resorptionsstelle gelangen muß. Obwohl diese Möglichkeit — wie das aus zahlreichen Arbeiten bekannt ist — durch den Mangel gewisser Peptidasen

herbeigeführt wird und sich die durch die toxische Wirkung des unzureichend abgebauten Gliadins geschädigte Darmwand zur Permeabilität des ungespalteten Proteins eignet, darf man es nicht außer Acht lassen, daß die Komponenten 1—9 der über keine Antigen-Eigenschaft verfügenden Fraktionen B, C und D eine Protease-Inhibitoraktivität aufweisen. Wenn also nur die mit den Eigenarten des Mehlextrakts erklärable Möglichkeit berücksichtigt wird, so ist es auch ohne eine ab ovo niedrige Proteaseaktivität möglich, daß das unzureichend abgebaute Gliadin in den unteren Darmabschnitt gelange, da ja durch die Proteaseinhibitoren das Pankreastrypsin und das Chymotrypsin gehemmt werden. Hierzu sei aber erwähnt, daß während der Lagerung der Fraktionen B, C und D bei 4°C die Protease-Inhibitoraktivität aufhört und sich in den angeführten Fraktionen sogar Proteaseaktivität nachweisen läßt. Damit hängt wahrscheinlich auch unsere Beobachtung zusammen, daß sich die Menge der sich als Antigen verhaltenden Fraktion A während der monatelangen Speicherung des Weizens bzw. Mehls um 40—50% vermindert.

Über den Nachweis des gegen Gliadin produzierten Antikörpers mittels Immundiffusion und über die quantitative Bewertung wollen wir in einer anderen Mitteilung berichten. An dieser Stelle sei nur auf folgendes hingewiesen:

a) Nach unserer vorläufigen Bewertung entspricht der Antikörper gegen Gliadin einem Reagin vom

IgG-Typ, welcher beim Menschen bisher nur ausnahmsweise zu beobachten war [23]. Gegen den IgE-Charakter des Antikörpers sprechen die Tatsachen, daß die Verbindung gegenüber eine 30minütige Wärmebehandlung bei 56°C resistent ist und ferner, daß falls das mütterliche Serum Antikörper gegen Gliadin enthält, diese in derselben Konzentration auch im Serum des Neugeborenen nachzuweisen sind. Jedoch nur das IgG kann die Plazenta passieren.

b) Die Gliadin-Präzipitine können auch im unverdünnten oder im 1 : 2 verdünnten Serum der meisten Normalpersonen nachgewiesen werden, d. h. daß ein dementsprechender Antikörpertiter nicht von diagnostischem Wert sein kann.

c) In der akuten Phase der echten gliadinempfindlichen Zöliakie erhält man im Agar-Gel auch mit starken Serumverdünnungen eine Immunpräzipitation und der in mg ausgedrückte Titerwert beträgt das Vielfache der bei den Normalpersonen oder der bei den sich in der latenten Phase der Krankheit befindlichen Patienten registrierbaren Menge.

LITERATUR

1. BERGER, E.: Zur allergischen Pathogenese der Coeliakie. *Ann. Paediat. Suppl.* (Basel) **67**, (1958).
2. BERGER, E., FREUDENBERG, E.: Bemerkungen über die antigenen Eigenschaften von Abbaustufen des Gliadins. *Ann. Paediat.* (Basel) **196**, 238 (1961).
3. BERGER, E., FREUDENBERG, E.: Ist die Coeliakie durch Allergie gegen Gliadin bedingt? *Schweiz. med. Wschr.* **93**, 549 (1963).
4. BERGER, E., BÜRGIN-WOLFF, A., FREUDENBERG, E.: Diagnostische Bewertung des Nachweises von Gliadin-

- Antikörpern bei Coeliakie. *Klin. Wschr.* **42**, 788 (1964).
5. BERGER, E.: Klinische Bedeutung freier Antikörper gegen Gliadin, Kuhmilch, Eiereiweiß und andere oral zugeführte Proteine. *Dtsch. med. Wschr.* **90**, 2121 (1965).
 6. CSORBA, S., JEZERNICZKY, J., KÁVAI, M., SZABOLCS, M., SZABÓ, B.: Immundiffusos módszer gliadin-ellenes antitest kimutatására. *Gyermekgyógyászat* **26**, 445 (1975).
 7. DICKE, W. K.: Coeliakie. Dissertation, Utrecht 1950.
 8. ELTON, G. A. H., EWART, J. A. D.: Starch gel electrophoresis of wheat proteins. *Nature (Lond.)* **187**, 600 (1960).
 9. EMONS, D., BOHM, E. R., ROTHAUWE, H. W.: Ergebnisse einer Nachuntersuchung von Coeliakie-Patienten. *Dtsch. med. Wschr.* **99**, 1847 (1974).
 10. FRAZER, A. C.: The present state of knowledge on the celiac syndrome. *J. Pediat.* **57**, 262 (1960).
 11. FREUDENBERG, E., BÜRGIN-WOLFF, A.: Kritische Bemerkungen zur Technik der Bestimmung von Antikörpern gegen Gliadin. *Z. Kinderheilk.* **93**, 46 (1965).
 12. GRÜTTNER, R.: Die Coeliakie. *Mshr. Kinderheilk.* **114**, 485 (1966).
 13. GRÜTTNER, R., LÜCKING, TH.: Moderne Aspekte in der Diagnostik der Coeliakie. *Mshr. Kinderheilk.* **119**, 41 (1971).
 14. IMMONEN, P.: Precipitins to cow's milk and wheat proteins in gastrointestinal disorders. *Acta paediat. (Uppsala)*. Suppl. **104**, 159 (1965).
 15. JONES, R. W., TAYLOR, N. W., SENTI, F. R.: Electrophoresis and fractionation of wheat gluten. *Arch. Biochem.* **84**, 363 (1959).
 16. KRAINICK, H. G., DEPATIN, F.: Der schädliche Mehleffekt bei der kindlichen Coeliakie. *Mshr. Kinderheilk.* **102**, 407 (1954).
 17. KRAINICK, H. G., GAUTIER, E., TOBLER, R., VALASCON, J. A.: Weitere Untersuchungen über den schädlichen Weizenmehleffekt bei der Coeliakie. I. Die akute Gliadinreaktion (Gliadinschock). *Helv. paediat. Acta* **18**, 432 (1958).
 18. LASKOWSKI, M.: Trypsinogen and Trypsin. In: COLOWICK, S. P., KAPLAN, N. O. (Herausg.): *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York 1955, Bd. II, S. 33.
 19. MIETENS, C.: Untersuchungen über die Antikörperbildung gegen Gliadin und Milchproteine. I. Die Bildung komplexbindender Antikörper bei Patienten mit Coeliakie und anderen intestinalen Erkrankungen sowie bei gesunden Kontrollkindern. *Z. Kinderheilk.* **98**, 254 (1967).
 20. MIETENS, C.: Untersuchungen über die Antikörperbildung gegen Gliadin und Milchproteine. II. Der Nachweis von Gamma-M durch Ultrazentrifugation und Behandlung mit Mercaptoäthanol. *Z. Kinderheilk.* **99**, 130 (1967).
 21. MIETENS, C.: Immunologische Aspekte der Coeliakie. *Pädiat. Pädol.* **8**, 68 (1973).
 22. OSBORNE, T. B.: Eiweiß-Stoffe. Darstellung der Proteine der Pflanzenwelt. In: ABDERHALDEN, E. (Herausg.): *Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden*. Urban und Schwarzenberg, Berlin—Wien 1910. Bd. II, S. 270.
 23. PARISH, W. E.: Short-term anaphylactic IgG antibodies in human sera. *Lancet* **2**, 591 (1970).
 24. POKORNA, M., SOUREK, J., SVEJCAR, J.: Die Bedeutung der Präzipitine gegenüber Gliadin im Serum von Kindern mit Coeliakie. *Helv. paediat. Acta* **18**, 393 (1963).
 25. ROSSIPAL, E., PALM, W.: Untersuchungen über die antigene Wirkung von Kleberproteinen bei Cöliakie. *Z. Kinderheilk.* **110**, 85 (1971).
 26. ROSSIPAL, E.: Bestimmung präzipitierender Antikörper gegen Kleberproteine zur Kontrolle der Einhaltung einer glutenfreien Diät bei Cöliakie. *Arch. Kinderheilk.* **183**, 270 (1971).
 27. SHMERLING, D. H.: Die Coeliakie (Eine Übersicht). *Internist* **6**, 46 (1965).
 28. TAYLOR, K. B., THOMSON, D. L., TRUELOVE, S. C., WRIGHT, R.: An immunological study of coeliac disease and idiopathic steatorrhea: serological reactions to gluten and milk proteins. *Brit. med. J.* **2**, 1727 (1961).
 29. TOWNLEY, R. R. W., ANDERSON, C. M.: Coeliac disease. *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.* **26**, 1 (1967).
 30. WOYCHIK, J. H., DIMLER, R. J., SENTI, F. R.: Chromatographic fractionation of wheat gluten on carboxymethylcellulose columns. *Arch. Biochem.* **91**, 235 (1960).
 31. WOYCHIK, J. H., BOUNDY, J. A., DIMLER, R. J.: Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem.* **94**, 477 (1961).

Dr. S. CSORBA

Gyermekklinika

H-4012 Debrecen, Ungarn