

Die Eigenschaften des Gliadins und der Antikörper gegen Gliadin bei Zöliakie

Von

M. SZABOLCS, S. CSORBA, MÁRIA KÁVAI, I. FRANCIA und B. SZABÓ

Zentrales Forschungsinstitut, Kinderklinik, und Institut für Pathophysiologie der Medizinischen Universität Debrecen

(Eingegangen am 25. Dezember, 1976)

Aus dem wäßrigen Extrakt des Weizenmehls wurden mittels Gel-filtration vier Fraktionen — Fraktion A, B, C und D — isoliert.

Es wurde festgestellt, daß die Fraktion A mit dem Serum der Zöliakie-Kranken als Antigen reagiert. Die Menge der Fraktion A war im aus der Neuernste gemahlten Weizenmehl am höchsten; das Absorptionsmaximum lag bei 278 nm und die Fraktion enthielt eine Verbindung mit 1,5–2,0% igem Phosphorgehalt (Nukleinsäure und Nukleotid). Bei Zelluloseazetat-Membranelektrophorese wandert die Fraktion A eher in Richtung der Anode als bei Polyakrylamid-Gelelektrophorese. Der Glutaminsäure- bzw. Prolin-Gehalt der Fraktion A ist 27,2% bzw. 12,4%. Die mittels Nadoecylsulfat-Gelelektrophorese bestimmten Molekulargewichte von 34 000–36 000 und 56 000–60 000 Dalton und die erwähnte Aminosäure-Zusammensetzung lieferten einen Beweis dafür, daß die Fraktion A in die Gruppe der Gliadine gehört, obwohl sie durch wäßrige Extraktion (pH = 5,5–6,0) isoliert wurde.

Im Gegensatz zu den im unfraktionierten wäßrigen Extrakt des Mehles befindlichen Eiweißen wird durch das im Kaninchen erzeugten Antiserum nur die Fraktion A präzipitiert, obwohl das bei der Immunisierung angewandte Eiweißextrakt auch die Fraktionen B, C und D enthält. Der Antikörper ist vom IgG-Typ.

Die Versuchsergebnisse führten zur Feststellung, daß das Gliadin ein proteolytisch nicht oder kaum verdaubares Eiweiß von besonderer Aminosäuresequenz ist. Demzufolge dürfte zwischen dem Pathomechanismus der Zöliakie und den physiko-chemischen bzw. funktionellen Eigenschaften des Gliadins eine enge Korrelation bestehen.

Die ätiologische Rolle des Weizenproteins Gliadin bei der Zöliakie ist bekannt [5]. Wir haben es früher bewiesen, daß unter den Eiweißen des wäßrigen Mehlextrakts die das höchste Molekulargewicht zeigende Fraktion 2–3, die im Laufe der Polyakrylamid-Gelelektrophorese in der Nähe der Kathode bleibt, mit dem im Serum der Zöliakie-Kranken be-

findlichen Antikörper in eine antigenartige Reaktion tritt [6].

In vorliegender Arbeit wollen wir unsere Untersuchungsergebnisse in bezug auf die Identifizierung der aus dem wäßrigen Mehlextrakt isolierten Fraktionen, vor allem der sich antigenartig verhaltenden Fraktion sowie unsere Hypothese hinsichtlich des Pathomechanismus der Zöliakie erläutern.

METHODIK

Herstellung des Eiweißextrakts

1 g des Weizenmahlprodukts wurde in 20 ml 0,005% NaN_3 -haltigem, ionfreiem Wasser von 2–4°C suspendiert. Nach 24–36 Stunden langer Umrührung im kalten Zimmer wurde die Suspension in einer MSE-25 oder Beckmann L3–50 präparativen Ultrazentrifuge mit 50 000 g 60 Minuten lang zentrifugiert. Das Präzipitat wurde verworfen, das Extrakt (Supernatant) lyophilisiert, und das lyophilisierte kalte Extrakt im Vakuumexsikkator aufbewahrt.

Eiweißfraktionierung auf Sephadex G-75 Säule.

600 mg des kalt, unter Vakuum aufbewahrten, lyophilisierten Extraktes wurden in 4 ml ionfreiem Wasser gelöst und gegenüber 0,005% NaN_3 -haltigem ionfreiem Wasser dialysiert. Zunächst wurden 4 ml des Extrakts (80 mg Eiweiß) zwecks Fraktionierung auf eine Sephadex G-75 Säule (Durchmesser 1,8 cm, Höhe 51 cm, Volumen 130 cm³) aufgetragen und mit 0,005% NaN_3 -haltigem, ionfreiem Wasser bei +4°C eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 20–22 ml/Stunde, das Volumen der eluierten Fraktionen belief sich auf 5 bzw. 2,5 ml. Die Extinktion dieser Fraktionen wurde im Spektrophotometer PM2 DL Opton gemessen.

Polyakrylamid-Gelektrophorese

Das Extrakt und die gewonnenen Fraktionen wurden unter Anwendung von 7% iger Polyakrylamidgel-Lösung und einem Trisglyzin-Puffer (Ionenstärke 0,05, pH 8,3) elektroforiert. [6].

Na-Dodecylsulfat-Polyakrylamid-Gelektrophorese bei pH 7

Die 50–100 µg Eiweiß enthaltende Probe wurde im Verhältnis 1:1 oder 2:1 mit einer aus 0,01 M Na-phosphat (pH 7,0), 5% Na-dodecylsulfat, 1% Merkaptoethanol, 0,005% Bromphenolblau und 40% Glycerin

bestehenden Unterschichtlösung versetzt, sodann bei 100°C 5 Minuten lang inkubiert. Hiernach wurden die inkubierten Proben quantitativ, unter einem Elektrodenpuffer auf die Gelsäule aufgetragen. Die Elektrophorese wurde auch mit der Methode von Weber und Osborn [21] durchgeführt, mit dem Unterschied, daß die Gelsäulen nur 5% Akrylamid enthielten. Stromstärke: 7 mA/Rohr, Laufzeit: 5 Stunden. Nach der Elektrophorese wurden die Gelsäulen mit Coomassie-Brillantblau gefärbt und der überflüssige Farbstoff mit einem aus Essigsäure, Methanol und Wasser bestehenden Gemisch ausgelöst. Als Standard-eiweiße (zum Vergleich dienende) wurden Bovin-Serumalbumin (Molekulargewicht: 68 000 Dalton), Gammaglobulin (Molekulargewicht: 50 000 bzw. 23 000 Dalton) und Ovalbumin (Molekulargewicht 42 000 Dalton) angewandt.

Na-Dodecylsulfat-Polyakrylamid-Gelektrophorese bei pH 8,3

Die 50–100 µg Eiweiß enthaltende Probe wurde im Verhältnis 1:1 oder 2:1 mit einer aus 0,06% Tris, 0,29% Glycin, 5% Na-dodecylsulfat, 1% Merkaptoethanol, 0,005% Bromphenolblau und 40% Glycerin bestehenden Unterschichtlösung versetzt und bei 100 °C 5 Minuten lang inkubiert. Hiernach wurde die Probe quantitativ unter einem Elektrodenpuffer auf die Gelsäule aufgetragen. Die Elektrophorese wurde nach Peterson und Strohmman [15] bei 1,5 mA/Rohr mit 2 Stunden Laufzeit durchgeführt, die Säule enthielt jedoch nur 5% Akrylamid. Färbung usw. geschahen wie bei pH 7. Nach Auslösung der überschüssigen Farbe wurde das Gel mit einem, an das Zeiss-Schnellphotometer angeschalteten GIBI Kompensographen densitometriert.

Zelluloseazetat-Membran Elektrophorese

Auf eine vorangehend mit Veronalnatriumazetatpuffer (pH 8,6) durchtränkte, 2,5 × 16 cm große Zelluloseazetat-Membranfolie (Schleicher-Schüll) wurden mit

einer Pipette 10 μ l (70–100 μ g Eiweiß) Untersuchungsmaterial aufgetragen. Zwecks Markierung kam Bromphenolblau zur Anwendung. Zunächst wurde bei 0,4–0,5 mA Stromstärke/cm Streifenbreite 2 Stunden lang elektrophoriert, und danach die Folie gefärbt und gewaschen, getrocknet, mit Paraffinöl transparent gemacht und mit einem, an ein Zeiss-Schnellphotometer angeschalteten GIBI Kompensograph densitometriert.

Herstellung des Immunserums

Das lyophilisierte Weizenextrakt wurde in Wasser gelöst und der reine Supernatant mit soviel NaCl versetzt, daß die Endkonzentration des Kochsalzes 0,9% ausmachte. Mit dieser Eiweißlösung (Eiweißkonzentration 1–1,2%), die mit kompletten Freund-Adjuvant (Difco) im Verhältnis 1:1 vermischt wurde, wurden Kaninchen immunisiert. Sechs Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere entblutet, die Seren bei 56°C 30' lang inaktiviert und bei –18°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

Agardiffusion

In 50–55°C warmem Wasser gelöste 3%ige Agarlösung (Bacto Agar Difco) wurde mit 8- oder 16fach verdünntem Antiserum im Verhältnis 1:1 rasch vermischt und danach 2,3 ml auf Objektträger pipettiert; am nächsten Tag wurden in das Agar Löcher von 4 mm Durchmesser verfertigt, und in die Löcher aus dem Mehlextrakt bzw. den Sephadex Fraktionen je 10 μ l pipettiert. Diese Manipulation wurde nach 24 Stunden wiederholt. In der Zwischenzeit wurden die Objektträger in der Feuchtkammer bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die an der Bildung des Immunpräzipitats nicht beteiligten Eiweiße aus dem Agar mittels physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, die Agarschicht getrocknet, das Eiweiß mit Säurefuchsin gefärbt und differenziert.

Aminosäureanalyse

1 ml des Untersuchungsmaterials (Extrakt bzw. seine Fraktionen), dessen Eiweißkonzentration 1,5 mg/ml ausmachte + 1 ml 38%ige HCl-Lösung wurden in Ampullen zu 2 ml gemessen. Die Ampullen wurden nach Durchblasen mit N₂ abgelötet, sodann 48 Stunden lang bei 105°C aufbewahrt. Es folgte Entsäuern bei 80°C in der Anwesenheit von KOH und P₂O₅, im Vakuumtrockenschrank. Zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des entsäuerten Hydrolysats diente ein Aminosäureanalysator LYZ 75 (Chinoin).

VERSUCHSERGEBNISSE

Unsere früheren Untersuchungen führten zur Feststellung, daß sich im Laufe der Speicherung des Weizens als Mahlgut die Menge des mit Wasser extrahierbaren, antigenartigen Eiweißes ändert. Demnach richteten sich unsere Untersuchungen vor allem auf die Klärung der Frage, ob sich im auf drei verschiedene Weisen behandelten Weizenmehl – 1. bei Zimmertemperatur 1 Jahr hindurch, in Form von Mahlgut gespeicherten 2. 1 Jahr hindurch in Samenform gespeicherten und nur vor der Extraktion gemahlten und 3. im aus Neuernte gemahlten Weizenmehl – die extrahierbare Gesamteiweißmenge, bzw. die darin befindliche Antigenmenge ferner die bei einer Eiweißkonzentration von 1,0 mg/ml, bei 280 nm, in einer 1 cm Küvette gemessene Extinktion des Extraktes im Laufe der Speicherung ändern (Tab. I).

Aus Tabelle I geht hervor, daß sowohl die mit Wasser extrahierbare

TABELLE I
Wasserextrahierbarer Gesamteiweiß- und Antigengehalt

Lagerungszeit und -form	Extrahiertes Eiweiß mg/-Mehl g	Antigen mg%/-Mehl g	$E_{280}^{0,1\%}$ nm
1 Jahr, gemahlten	11,3	1,1	3,00
1 Jahr, Korn, gemahlen vor Extraktion	15,1	2,25	1,980
Neuernte, gemahlen vor Extraktion	17,2	3,25	1,90

* Mit Gelfiltration gemessene Werte

Eiweißmenge, als auch ihr Antigengehalt im aus Neuernte gemahlten Weizenmehl am höchsten sind. Andererseits sind in diesem Mehl auch die Eiweiße intakter, da ihr $E_{1\text{cm}}^{0,1\%}$ -Wert am niedrigsten ist.

Angesichts dieser Ergebnisse untersuchten wir die Eigenschaften der im Wasserextrakt des aus Neuernte gemahlten Mehls befindlichen Eiweiße.

Die Eiweiße des Wasserextrakts können auf Sephadex G-75 Säule in 4 Komponente separiert werden;

diese Fraktionen bezeichnen wir mit A, B, C und D. Abbildung 1 zeigt das Elutionsdiagramm einer Gelfiltration.

Die im Laufe von je 3 Gelfiltrationen gewonnenen Fraktionen A, B, C und D wurden separat vereinigt und lyophilisiert. Wie wir darüber bereits berichteten, spielt sich zwischen den in der Fraktion A befindlichen Eiweißen und dem im Serum der Zöliakie-Kranken anwesenden Antikörper eine antigenartige Reaktion

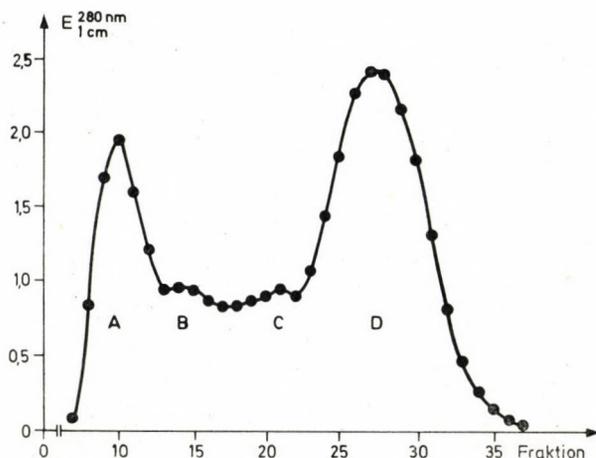


ABB. 1. Elutionsdiagramm der Eiweiße des Mehlextrakts, anlässlich Gelfiltration auf Sephadex G-75 Säule. Das Volumen der Fraktionen beträgt 5 ml.

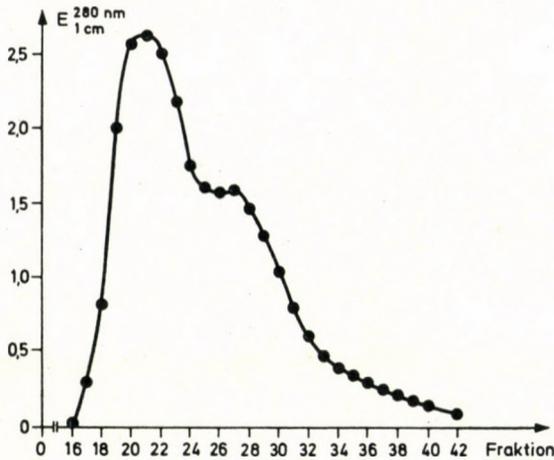


ABB. 2. Elutionsdiagramm der Fraktion A des Mehlextrakts anlässlich wiederholter Gelfiltration. Das Volumen der Fraktionen beträgt 2,5 ml.

ab [6]. Unseres Erachtens bietet die genauere Kenntnis der Eigenschaften der Fraktion A eine Möglichkeit zur weiteren Klärung der Pathogenese der Zöliakie.

Da laut der Polyakrylamid-Gel-Elektrophoretogramme vereinigten Fraktionen A auch die Eiweißkomponenten anderer Eiweißfraktionen enthalten, wurde die Fraktion A auf Sephadex G-75 Säule wieder gelfiltriert (Abb. 2). Wie aus Abbildung 2 ersichtlich, kann die Fraktion A in 2 Komponenten separiert werden. Wie die Polyakrylamid-Gelelektrophorese zeigte, entsprach die zweite Komponente der Fraktion B, d. h. daß sie als Verunreinigung in die Fraktion A gelangte. Da sich die einzelnen Fraktionen bei der Gelfiltration überlappen, haben wir die Fraktionen B, C und D auf Sephadex G-75 Säule wiederholt gelfiltriert. Nach der Gelfiltration kam es zur

Untersuchung des Absorptionsspektrums dieser gereinigten Fraktionen (Abb. 3).

Das Absorptionsmaximum der Fraktionen A, B und C betrug 278 nm, das der Fraktion D lag bei 260 nm. Der Quotient der bei 280 nm und 260 nm gemessenen Extinktionen $E_{280 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}/E_{260 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$ liefert bekanntlich eine Aufklärung darüber, ob die Fraktionen Nukleinsäure oder Nucleotide enthalten. Bei den einzelnen Fraktionen ergab der Wert des $E_{280 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}/E_{260 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$ -Quotienten 1,18 (Fraktion A), 1,19 (Fraktion B), 1,15 (Fraktion C) und 0,73 (Fraktion D). Das bedeutet, daß die Fraktion D eine bedeutende Nucleotidmenge enthält. Einen weiteren Beweis für diese Feststellung lieferte die Bestimmung der anorganischen Phosphatmenge (P_i) in den einzelnen Fraktionen nach Zerstörung mit Perchlorsäure und Wasserstoffperoxyd. Auf 1 mg Eiweiß bezo-

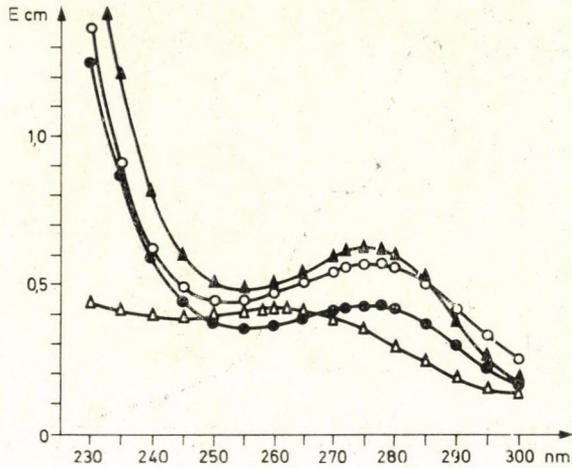


ABB. 3. Absorptionsspektrum der mittels Gelfiltration wiederholt gereinigten Fraktionen A, B, C und D.: ○—○ Fraktion A, 0,35 mg/ml.; ▲—▲ Fraktion B, 0,40 mg/ml.; ●—● Fraktion C, 0,25 mg/ml.; ▷—▷ Fraktion D, 0,10 mg/ml. Lösungsmittel: 0,005%ige wässrige Natriumazidlösung.

gen enthielt die Fraktion A 17 μg P_i , die Fraktion B 16 μg P_i , die Fraktion C 20 μg P_i und die Fraktion D 170 μg P_i . Die Gegenüberstellung der Eigenschaften der gereinigten Fraktionen erfolgte unter Anwendung der Mancinischen-Technik (Abb. 4).

Auf den Objektträger wurde des gegen das Wasserextrakt des Mehles erzeugte, mit Ager vermischte, 16fach verdünnte Antiserum aufgetragen; in

die Löcher wurden unterschiedlich verdünnte Fraktionen gemessen. Man sieht in Abbildung 4, daß einen Präzipitationsring nur das wäßrige, unfraktionierte Mehlextrakt und die Fraktion A ergaben, bei den Fraktionen B, C und D (diese letzterwähnte ist in Abbildung 4 nicht dargestellt) diese Erscheinung dagegen nicht zu beobachten war. Insofern auf den Objektträger mit Agar vermisches, von Zöliakie-Kranken



ABB. 4. Immunreaktion des Mehlextrakts und der Fraktionen A, B, C und D, gegenüber das gegen das Mehlextrakt produzierte Antiserum. Eiweißkonzentration der drei A Fraktionen (1, 2, 3): 1,75, 3,50 bzw. 7 mg/ml. Eiweißkonzentrationen der Extrakte 4, 5, 6: 3,3, 6,6 bzw. 9,9 mg/ml. Die Eiweißkonzentration der drei B Fraktionen (7, 8, 9) betragen in allen Löchern 6 mg/ml, während die Eiweißkonzentrationen der zwei C Fraktionen (10, 11) in allen Löchern 5 mg/ml ausmachten.

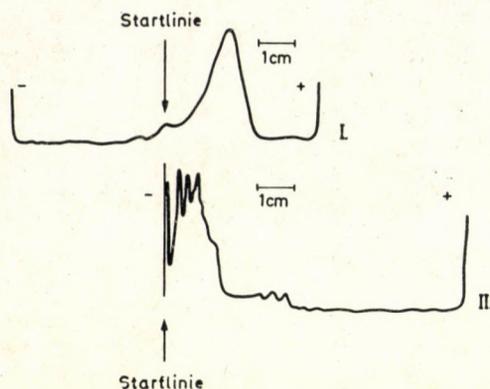


ABB. 5. Densitogramm der gereinigten Fraktion A nach Zelluloseazetat-Membran-elektrophorese (I) bzw. Polyakrylamid-Gelelektrophorese (II).

entnommenes Serum aufgetragen wurde, gestalteten sich die Ergebnisse ähnlich. Aus dem Gesagten folgt, daß bei Zöliakie nur die gereinigte Fraktion A ein antigenartiges Verhalten aufweist. Die Wanderung dieser Fraktion in Richtung der Anode

war bei der Zelluloseazetat-Membran-elektrophorese ausgeprägt, bei der Polyakrylamid-Gelelektrophorese dagegen unbedeutend (Abb. 5).

Diese Ergebnisse sind scheinbar widerspruchsvoll. Aus dem Ergebnis der Zelluloseazetat-Membran-

TABELLE II

Aminosäurezusammensetzung der Fraktion A und des Gliadins

Aminosäure	Fraktion A	Gliadin*	Aminosäure	Fraktion A	Gliadin*
Mol%					
Lys	4,40	1,50	Gly	5,90	3,00
His	1,90	1,70	Ala	6,90	3,40
Arg	3,50	1,80	Val	5,50	4,80
Asp	6,10	2,90	Met	1,10	1,10
Thr	3,70	2,10	Ile	4,20	4,20
Ser	4,40	5,40	Leu	7,30	7,70
Glu	27,20	37,50	Tyr	1,20	2,70
Pro	12,40	16,00	Phe	4,30	4,20

* Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung der Fraktion III gerechnete Werte (Beckwith und Mitarb. [2])

elektrophorese könnte auf eine starke Elektronennegativität der gereinigten Fraktion A gefolgert werden, während die Ergebnisse der Polyakrylamid-Gelelektrophorese für eine schwache Elektronennegativität sprechen. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß sich das Akrylamidgel wie ein Molekularfilter verhält. Im Falle einer Substanz mit hohem Molekulargewicht wird die Bewegung der Molekeln im elektrischen Kraftfeld nicht nur durch die Ladung des Molekels sondern auch durch seine Masse beeinflusst.

Laut der mittels Ultrazentrifuge durchgeführten Analyse ist die gereinigte Fraktion A etwas polydispers, ihr Sedimentationskoeffizient beträgt $S_{20,v} = 4,0$ Svedberg-Einheiten. Die Ergebnisse der Aminosäure-Analyse haben wir in Tabelle II zusammengefaßt, in der vergleichshalber auch die in der Literatur für Gliadin angegebenen Ergebnisse der Aminosäure-Analyse ersichtlich sind [2]. Aus den Angaben der Tabelle

II geht hervor, daß sowohl die gereinigte Fraktion A, als auch das Gliadin große Glutaminsäure- und Prolinmengen enthalten. Der hohe Glutaminsäuregehalt darf als ein Beweis dafür angesehen werden, daß sich die Fraktion A bei der Zelluloseazetat-Membranelektrophorese elektronen-negativ verhält.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Polypeptidkette der in der Ultrazentrifuge etwas polydispersen Fraktion A diente die mit Natriumdodecylsulfat durchgeführte Polyakrylamid-Gelelektrophorese (Abb. 6).

Falls die Bestimmung nach WEBER und OSBORN [21] bei pH 7,0 durchgeführt wird, enthält die Fraktion A zwei Polypeptidketten mit unterschiedlichem — 61 000 und 36 000 Dalton — Molekulargewicht. Die nach PETERSON und STROHMAN [15] mit geringer Modifikation bei pH 8,3 vorgenommene Bestimmung ergab ebenfalls zwei Polypeptidketten mit unterschiedlichem Molekulargewicht: 56 000 und 34 000 Dalton.

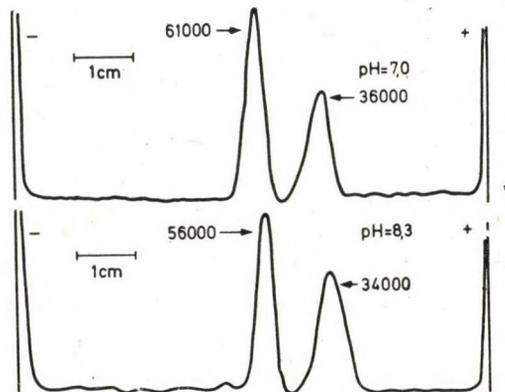


ABB. 6. Densitogramm der gereinigten Fraktion A nach mit Natriumdodecylsulfat durchgeführter Polyakrylamid-Gelelektrophorese.

BESPRECHUNG

Seitdem es nachgewiesen wurde, daß bei der Zöliakie die Eiweiße der Getreidesorten eine Rolle spielen, steht diese Frage nicht nur in der Lebensmittelindustrie und Ernährungswissenschaft, sondern auch auf dem Gebiet der Immunologie im Mittelpunkt des Interesses. Mit den sich in dem letzten anderthalb Jahrzehnt verbreiteten zeitgemäßen Untersuchungsverfahren (Ultrazentrifuge, Gelfiltration, Ionenaustausch-Chromatographie, Stärke-Akrylamid-Gelelektrophorese) fand zwecks Klärung bzw. Identifizierung der physikochemischen Eigenschaften der in Wasser bzw. Salzlösungen löslichen bzw. unlöslichen Weizenweiße eine Reihe erfolgreicher Untersuchungen statt [2, 9, 10, 12, 13, 22, 23].

Die Gliadine und die Glutenine des Weizens sind in Wasser oder neutraler Salzlösung bekanntlich unlöslich, während sie sich in 50–70%iger Alkohollösung, dünner Säure oder Lauge einwandfrei lösen. ROSIPAL und PALM [16] haben im wäßrigen Extrakt des Weizenmehls mit Akrylamid-Gelelektrophorese 12–14 Eiweißfraktionen nachgewiesen, unter denen die in der Nähe der Kathode liegenden 2–3 Fraktionen mit dem Serum der Zöliakie-Kranken eine Präzipitation ergaben. Wir vermochten diese 2–3 Eiweißfraktionen in unserer Fraktion A zu finden [6]; ihre Menge war im aus Neuernte gemahlten Weizenmehl am größten (Tab. I). Das Absorptionsmaximum (Abb. 3) der mit wiederholter Gel-

filtration gereinigten (Abb. 2) Fraktion A — die zu etwa 1,5–2,0% phosphorhaltige Verbindungen (Nucleinsäure und Nucleotid) enthält — liegt bei 278 nm. Die anhand der Zelluloseazetat-Membranelektrophorese (Abb. 5), der Aminosäurezusammensetzung (Tab. II) und der SDS Polyakrylamid-Gelelektrophorese bestimmten Molekulargewichte von 34 000–36 000 und 56 000–61 000 Dalton verwahrscheinlichen es, daß die Fraktion A Gluteneiweiße, vor allem Gliadin enthält. Die von zahlreichen Verfassern [1, 2, 7, 17, 22] in essigsäure- und ureahaltigen Lösungen mit Gelfiltration und Ionenaustausch-Chromatographie hergestellten verschiedenen Gliadinfraktionen (anhand der bei freier Elektrophorese gezeigten Beweglichkeit Fraktionen α , β , γ , ω bzw. ihre Subfraktionen, z. B. γ_1 , γ_2 , γ_3) sind hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung, besonders aber ihres Molekulargewichtes der von uns Fraktion A genannten ähnlich. All dies spricht dafür, daß im Laufe der Extraktion der Mehleiweiße mit ionenfreiem Wasser im pH-Bereich 5,7–6 nebst anderen Eiweißen auch die Gliadine in Lösung gelangen.

Durch das gegen die Mehleiweiße im Kaninchen produzierte Antiserum wird nur die Fraktion A präzipitiert (Abb. 4), die übrigen Fraktionen B, C und D, aber nicht, obwohl das bei der Immunisierung angewandte Eiweißextrakt auch diese Fraktionen enthielt. In bezug auf die gegen Gliadin erzeugten Antikörper wurde früher bereits festgestellt, daß

diese IgG-, IgA- und IgE-Typen sind [14]. Laut unseren Versuchen ist der zirkulierende Antikörper gegen Gliadin vom IgG-Typ [11]. Im Zöliakie-Serum kann kein spezifisches IgE nachgewiesen werden, angesichts der hochgradigen Zytophilie des IgE kann aber die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß dieses Immunglobulin in zellgebundener Form auch im Serum der Zöliakie-Kranken vorkommen kann.

Laut BEYREISS und Mitarb. [3] sind Zöliakie und Sprue mit Darmzottenatrophie einhergehende Resorptionskrankheiten, die annehmbar durch eine hereditäre Empfindlichkeit gegenüber Kleberproteinen herbeigeführt werden. Wenn also die Gluteneiweiße, vor allem das Gliadin durch Trypsin und Chymotrypsin nicht oder nur teilweise abgebaut werden, können die erwähnten Eiweiße oder ihre größeren Fragmente durch die verletzten Darmzotten leicht in den Kreislauf gelangen, und dieser Prozeß muß zur Antikörperproduktion führen. Nach unseren Ergebnissen läßt sich der Antikörper gegen Gliadin – zwar in geringerem Titer als im Serum der Zöliakie-Kranken – auch bei gesunden Personen nachweisen. In diesen Fällen kann das nicht oder nur teilweise abgebaute Gliadin durch den, wegen irgendeiner anderen Ursache geschädigten Dünndarm in den Kreislauf gelangen. BEYREISS und Mitarb. [3] haben darauf hingewiesen, daß einige Medikamente, besonders die Antibiotika und Zytostatika auf den Dünndarm unter Umständen toxisch

einwirken. Die Anwesenheit des Gliadins im Kreislauf und die darauffolgende Antikörperproduktion könnten somit erklärt werden. Eine Frage bleibt aber weiterhin offen, namentlich die Ursache dessen, daß das Gliadin nicht oder nur teilweise abgebaut wird. Die möglichen Ursachen sind: 1. Enzymmangel, 2. verringerte Proteaseaktivität, und 3. ein besonderer struktureller Aufbau dieser Eiweiße, der den Abbau durch Protease entweder nicht, oder nur zum Teil ermöglicht [19].

ad 1. Bei gesunden Personen kommt annehmbar kein Enzymmangel vor, Antikörper können aber in niedrigem Titer auch bei Gesunden gemessen werden.

ad 2. Früher haben wir im Wasserextrakt des Mehles bzw. in seinen Fraktionen eine Proteaseinhibitor-Aktivität nachgewiesen. Durch den mit der Nahrung in den Darm gelangenden Trypsininhibitor könnte die Eiweißverdauung gehemmt werden [6].

ad 3. Mais- und Reisfütterung führen zur raschen Regeneration der Dünndarmschleimhaut, obwohl das Maiskorn auf das Gewicht des getrockneten Korns bezogen mehr Pro-lamin (5 % Zein) enthält als das Weizenkorn (4,2 % Gliadin) [4]. Sowohl das Zein, als auch das Gliadin gehören zwar in die Gruppe der Pro-lamine, der sich in ihrer Wirkung manifestierende Unterschied hängt annehmbar mit ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. Aminosäurereihenfolge zusammen. Wie aus Tabelle II ersichtlich, verfügt die

von uns isolierte Fraktion A über einen hohen Glutaminsäure- und Prolingehalt. Bekanntlich werden dagegen durch Trypsin die in der Nachbarschaft der basischen Aminosäuren liegenden Peptidbindungen d. h. die den Lysin- und Arginin-Kettengliedern entlang befindlichen Peptidverbindungen hydrolysiert. Die Lysin-Prolin- und Arginin-Prolin-Peptide sind der Hydrolyse gegenüber resistent; Lysin-Glutaminsäure und Arginin-Glutaminsäure mit Peptidbindung zeigen eine partielle Resistenz. Durch Chymotrypsin werden die aromatische Aminosäuren enthaltenden Eiweiße oder Peptide der Karboxylgruppe der aromatischen Aminosäuren entlang gespalten. Die Tyrosin-Prolin- bzw. Phenylalanin-Prolin-Peptidbindungen sind ebenfalls resistent.

Unsere Hypothese wird durch die Angaben von FRAZER [8] unterstützt, laut deren die Gluteneiweiße – und so auch die Gliadine gegenüber Pepsin und Trypsin resistent sind. Die Gluteneiweiße weisen aber nicht nur gegen die Proteasen, sondern auch gegenüber Wärme eine Resistenz auf. Wir konnten es nämlich nachweisen, daß die Gluteneiweiße durch Wasser- oder Essigsäureextraktion – nebst Beibehaltung ihres Antigencharakters – sogar aus dem Brot isoliert werden können. [20].

Laut SINGH und KAY [18] spielen die Gluteneiweiße auch bei der Schizophrenie eine Rolle. Der Zöliakie ähnlich ist der Wirkungsmechanismus auch in diesem Fall ungeklärt, nur soviel liegt fest, daß der genetischen

Prädisposition eine Bedeutung beizumessen ist.

Anhand der angeführten Argumente vertreten wir die Ansicht, daß die Untersuchung der Struktur, der physikochemischen und funktionellen Eigenschaften der Gluteneiweiße einen weiteren Schritt zur Klärung des Pathomechanismus der Zöliakie, der Sprue und vielleicht auch der Schizophrenie bedeuten wird.

Unser herzlicher Dank gebührt Herrn Dr. M. Hauck für die Aminosäureanalyse und Frau I. Korom, sowie Fr. M. Debreceni für die technische Hilfe.

LITERATUR

1. ALTSCHUL, A. M., YATSU, L. Y., ORY, H. L., ENGELMAN, M.: Seed proteins. In: *Ann. Rev. Plant Physiol.* **17**, 113 (1966)
2. BECKWITH, A. C., NIELSEN, H. C., WALL, J. S., HUEBNER, F. R.: Isolation and characterization of a high molecular-weight protein fraction from wheat gliadin. *Cereal Chem.* **43**, 14 (1966)
3. BEYREISS, K., MÜLLER, F., DETTMER, D.: Verdauung und Resorption von Nährstoffen: eine hochspezialisierte Funktion biologischer Membranen. *Wiss. u. Fortschr.* **24**, 550 (1974)
4. BONNER, J.: *Plant Biochemistry*. Academic Press, New York 1950. p. 253.
5. DICKE, W. K.: *Coeliakie*. Dissertation. Utrecht 1950
6. CSORBA, S., SZABOLCS, M., KÁVAI, M., JEZERNICZKY, J., SZABÓ, B.: Über die Antigenität des Gliadins und die Antikörper gegen Gliadin. *Acta paediat. Acad. Sci. hung.* **16**, 249 (1975)
7. EWART, J. A. D.: Sodium dodecyl sulphate electrophoresis of wheat gliadins. *J. Sci. Fd Agric.* **24**, 685 (1973)
8. FRAZER, A. C.: The present state of knowledge on the celiac syndrome. *J. Pediat.* **57**, 262 (1960)
9. JONES, R. W., BABCOCK, G. E., TAYLOR, N. W., DIMLER, R. J.: Fractionation of wheat gluten by gel filtration. *Cereal Chem.* **40**, 409 (1963)

10. JONES, R. W., BABCOCK, G. E., DIMLER, R. J.: Molecular weight of the gamma-gliadin component of wheat gluten. *Cereal Chem.* **42**, 210 (1965)
11. KÁVAI, M., SZABOLCS, M., CSORBA, S., JEZERNICZKY, FÉSÜS, L.: Circulating antibodies in coeliac disease. *Acta paediat. Acad. Sci. hung.* (in press)
12. MEREDITH, O. B., WREN, J. J.: Determination of molecular-weight distribution in wheatflour proteins by extraction and gel filtration in dissociating medium. *Cereal Chem.* **43**, 169 (1966)
13. MEREDITH, P.: On the solubility of gliadinlike proteins. IV. Characterization of some gamma-gliadins. *Cereal Chem.* **44**, 436 (1967)
14. MIETENS, C.: Immunologische Aspekte der Coeliakie. *Pädiat. u. Pädol.* **8**, 68 (1973)
15. PETERSON, B., STROHMAN, R.: Myosin structure as revealed by simultaneous electrophoresis of heavy and light subunits. *Biochemistry* **9**, 4094 (1971)
16. ROSSIPAL, E., PALM, W.: Untersuchungen über die antigene Wirkung von Kleberproteinen bei Cöliakie. *Z. Kinderheilk.* **110**, 85 (1971)
17. SEXSON, K. R., WU, Y. V.: Molecular weights of wheat gamma₁ and gamma₃ gliadins in various solvents. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **263**, 651 (1972)
18. SINGH, M. M., KAY, S. R.: Wheat gluten as a pathogenic factor in schizophrasia. *Science* **191**, 401 (1976)
19. SZABOLCS, M., CSORBA, S., KÁVAI, M., FRANCIA, I.: Unveröffentlichte Resultate
20. SZABOLCS, M., CSORBA, S., KÁVAI, M.: Unveröffentlichte Resultate
21. WEBER, K., OSBORN, M.: The reliability of molecular-weight determinations by dodecyl sulfate acrylamide gel electrophoresis. *J. biol. Chem.* **244**, 4406 (1969)
22. WOYCHIK, J. H.: Structural investigation of wheat gliadin and glutenin. *Proc. Seed Protein Conference. New Orleans, La.* 1963.
23. WOYCHIK, J. H., HUEBNER, F. R.: Isolation and partial characterization of wheat gamma gliadin. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **127**, 88 (1966)

Dr. M. SZABOLCS

Zentrales Forschungsinstitut Pf. 3.

H-4012 Debrecen, Ungarn