

Physikochemische und funktionelle Eigenschaften des aus Brot isolierten Gliadins und seiner verschiedenen Fraktionen

Von

M. SZABOLCS¹, S. CSORBA² und M. HAUCK³

Zentrales Forschungslaboratorium, Kinderklinik² und Biochemisches Institut³ der Medizinischen Universität, Debrecen

Eingegangen am 21. September 1980

Aus dem mit 0,01 M Essigsäure gewonnenen Extrakt des Brotes wurde Gliadin isoliert und aus den Gliadinpräparaten mittels Gelfiltration auf Sephadex G-50-Säule, drei Fraktionen — Gliadin I, Gliadin II und Gliadin III — getrennt.

Während das Molekulargewicht der einzelnen Fraktionen unterschiedlich war, ließen sich in bezug auf ihren Aminodikarbonsäure + Aminodikarbonsäureamid (Asp + Glu + Asn + Gln)-Gehalt nahezu identische (46–47%), betreffs ihres Prolingehalts dagegen unterschiedliche (15–23%) Werte verzeichnen. Der Prolingehalt der Fraktionen mit höherem Molekulargewicht war größer als der der Fraktionen mit niedrigem Molekulargewicht. Der Aminodikarbonsäuregehalt (Glu + Asp) der einzelnen Gliadinfraktionen war nahezu identisch (20–21%). Im Vergleich zu den Gliadinfraktionen mit niedrigerem Molekulargewicht war der Phosphatgehalt der Gliadinfraktionen mit höherem Molekulargewicht größer, während der Quotient E_{280}/E_{260} niedriger lag.

Die unter Wirkung von 200 mM NaCl zustandekommende Ausfällung der Gliadinpräparate bzw. Gliadinfraktionen wird durch verschiedene Purinderivate, z.B. durch Adenosin gehemmt. Das Maß der Hemmung zeigte mit den E_{280}/E_{260} -Werten der Präparate eine Korrelation.

Aufgrund der Versuchsergebnisse und der Literaturdaten werden die physiologischen Eigenschaften von Gliadin und seiner Fraktionen bzw. ihre Rolle bei der Zöliakie besprochen.

Im Laufe einer vorangehenden Versuchsserie gelangten wir zu der Feststellung, daß das Molekulargewicht und die Aminosäurezusammensetzung der mit der modifizierten Methode von BECKWITH und Mitarb. [3] aus Brot isolierten Gluteneiweiße Gliadin und Glutenin mit den entsprechenden Parametern der aus Mehl isolierten Verbindungen nahezu identisch ist und daß diese Gluteneiweiße mit dem Serum der Zöliakiekranken antigenartig reagieren [15]. Das aus Brot iso-

lierte Gliadin enthält Komponenten, deren Molekulargewicht 36 000 bzw. 52 000 Dalton beträgt, vereinzelt findet man aber auch Komponenten mit einem Molekulargewicht von 70–80 000 Dalton vor.

Zwecks genauerer Klärung der Charakteristika der einzelnen Komponenten wurde das Gliadin auf Sephadex G-50-Säule fraktioniert und die Eigenschaften der isolierten Fraktionen — Absorptionsspektrum, Homogenität, Molekulargewicht, Aminosäurezusam-

mensetzung, Beeinflußbarkeit der unter Wirkung der Elektrolyte zustandekommenden Ausfällung mit Nukleotiden bzw. Nukleosiden — analysiert.

Des weiteren wollen wir über die Ergebnisse dieser Versuche berichten.

MATERIAL UND METHODIK

Isolierung der Gluteneiweiße aus Brot mit 0,01 M Essigsäure

100 g zerkleinertes Brot wurde mit 1000 ml 0,01 M Essigsäure und 0,8 mM Natriumazid enthaltenden Lösung (Extraktionslösung) vermischt und 120—180 Minuten lang mit einem magnetischen Rührer bei Zimmertemperatur gerührt, sodann 14—16 Stunden lang im Kühlschrank (2—4 °C) aufbewahrt. Zunächst wurde die Suspension durch einen vier-schichtigen Gaselappen filtriert und das Filtrat in einer kühlbaren Zentrifuge (Typ Lh-413, Produkt BVG) bei 4 °C, 90 Minuten lang bei 2000 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Niederschlag (größtenteils Stärke) verschüttet, und aus dem reinen Supernatant wurden bei einer Endkonzentration von 0,2 M NaCl die Gluteneiweiße ausgefällt. Das mittels Zentrifugieren (60 Minuten, 2000 g, 4 °C) gewonnene Präzipitat wurde in kalter Extraktionslösung gelöst, die Lösung bis zu einer Alkoholendkonzentration von 66—68% mit 96%igem Äthylalkohol versetzt und der pH-Wert mit n KOH-Lösung auf 6,5—6,8 eingestellt. In dem auf diese Weise zubereiteten, eine Nacht hindurch in kalter Umgebung gehaltenen Gemisch hat sich das Glutenin ausgefällt, während das Gliadin in Lösung blieb. Nach dem Zentrifugieren (45 Minuten, 2000 g, 4 °C) wurde das Glutenin-Präzipitat in der Extraktionslösung wieder aufgelöst und gegenüber die Extraktionslösung dialysiert; hiernach

kam es zur Untersuchung der Eigenschaften des isolierten Glutenins.

Das zu Isolierung des Gliadins dienende Verfahren war wie folgt: Der Alkoholgehalt des gliadinhaltigen Supernatanten wurde durch Zugabe von kaltem, demineralisiertem Wasser auf 35—37% herabgesetzt, das Gemisch einige Stunden lang bei 0 °C gehalten, währenddessen sich eine feindispersierte, weiße Suspension bildete. Diese Suspension wurde in einer präparativen Ultrazentrifuge (Typ Beckman, L3-50) bei 0 °C (bei einer um 2—3 °C höheren Temperatur klärt sich die Flüssigkeit ab) 50 Minuten lang zentrifugiert, das sedimentierte Gliadin in der Extraktionslösung gelöst, sodann gegen die Extraktionslösung dialysiert. In der Folge wurden die Eigenschaften des auf diese Weise isolierten Gliadins einer Analyse unterworfen. (Die erläuterte Methode ist eine Modifikation des Verfahrens von BECKWITH und Mitarb. [3]).

Fraktionierung des aus Brot isolierten Gliadins auf der Sephadex G-50-Säule

Zwecks Equilibration wurde die Sephadex G-50-Gelsäule (Durchmesser: 2,15 cm; Höhe: 55 cm; Säulenvolumen: 200 cm³; mit Blue-Dextran gemessenes Eliminationsvolumen: 77,5 cm³) mit einer 0,01 M Essigsäure und 0,8 mM Natriumazid enthaltenden Lösung gewaschen, auf die Säulenspitze in 4 ml Volumen 88 mg Gliadineiweiß pipettiert, sodann in einer 0,01 M Essigsäure und 0,8 mM Natriumazid enthaltenden Lösung eluiert. Die Eluationsgeschwindigkeit betrug 30 ml/St, das Volumen der gewonnenen Fraktionen belief sich auf 4 bzw. 2 ml. Die Extinktion der Fraktionen wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm im Spektrophotometer Opton PM 2 DL gemessen.

Polyakrylamid Gelelektrophorese

Die Untersuchung der Homogenität des aus Brot isolierten Gliadins und seiner Fraktionen erfolgte unter Anwendung

eines Tris-Glyzin-Puffers (Polyakrylamid Gelkonzentration: 7%; Ionenstärke: 0,05; pH: 8,3) [7].

Natriumdodezylsulfat-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (pH 7,0)

Zur Untersuchung des Molekulargewichts und der dem Molekulargewicht entsprechenden Homogenität der Polypeptidketten des aus Brot isolierten Gliadins und seiner Fraktionen kam die Methode von WEBER und OSBORN [18] der in unserer vorangehenden Mitteilung beschriebenen Weise gemäß [14] zur Anwendung.

Das Absorptionsspektrum der Eiweiße wurde mit dem Spektrophotometer Opton PM 2 DL bestimmt. Zur Messung des Eiweißgehalts kamen die Biuretmethode und das Verfahren von LOWRY und Mitarb. [9] zur Anwendung. Zur Kalibration wurde als Eiweißstandard Bovin-Serumalbumin (BSA) herangezogen.

Aminosäureanalyse

Die Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung von Gliadin und seiner Fraktionen erfolgte unter Verwendung des Aminosäureanalysators Chinoin Typ LYZ 75 [14].

Bestimmung des Phosphatgehalts der Gluteneiweiße

Die in 0,33 ml Volumen je 1 mg Eiweiß enthaltenden Proben wurden zuerst mit 0,5 ml 70%iger HClO_4 -Lösung 4–5 Stunden lang, sodann in der Gegenwart von 0,5 ml 30%iger H_2O_2 -Lösung weitere 2 Stunden lang zerstört. Demnach wurden die einzelnen Proben mit je 1 ml demineralisiertem Wasser versetzt und 10 Minuten lang gekocht. Schließlich wurden die Proben mit 6 n KOH-Lösung neutralisiert, das ausgefällte KClO_4 -Präzipitat mittels Zentrifugieren entfernt und im mit der Spülflüssigkeit des KClO_4 -Präzipitats vermischten Supernatant der anorganische Phosphatgehalt (P_i) mit der Methode von TAUSSKY und SHORR [16] gemessen.

ERGEBNISSE

Im ersten Teil unserer Versuche wurde das aus Brot isolierte Gliadin auf Sephadex G-50 (fine)-Gelsäule fraktioniert. Wie in Abbildung 1 ersichtlich, kann Gliadin in die Fraktionen I, II und III separiert werden.

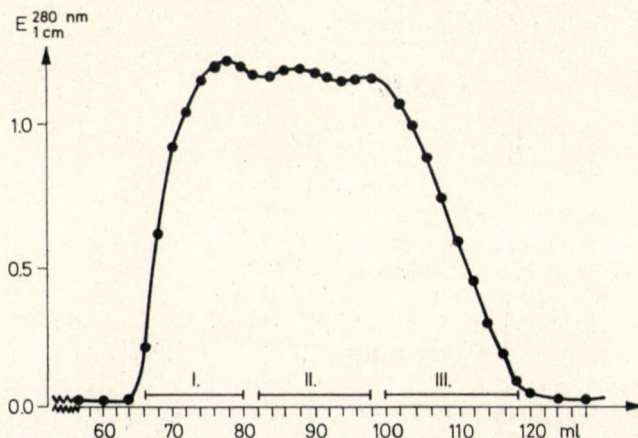


ABB. 1. Fraktionierung des aus Brot isolierten Gliadins auf Sephadex G-50 Gelsäule. Weitere Details im Abschnitt »Material und Methodik«. Zwischen 66 und 80 cm^3 eluiertes Eiweiß: Gliadinfraktion I. Zwischen 82 und 98 cm^3 eluiertes Eiweiß: Gliadinfraktion II. Zwischen 100 und 118 cm^3 eluiertes Eiweiß: Gliadinfraktion III.

Da sich die Fraktion I im Eliminationsvolumen der Gelsäule eluiert, besteht sie wahrscheinlich aus Komponenten mit einem Molekulargewicht von 40 000–50 000 Dalton oder höher.

Dies bestätigen auch die mit der Na-dodecylsulphat-Polyakrylamid-Gelelektrophorese bestimmten Molekulargewichte; dementsprechend besteht die Fraktion I größtenteils aus Komponenten mit einem Molekulargewicht von 68 000 und 57 000 Dalton, während das Molekulargewicht der Komponenten der Fraktion II bzw. III 43 000 und 34 000 bzw. 34 000 Dalton ausmacht (Abb. 2).

Im Interesse der weiteren Charakterisierung der Fraktionen I, II und III, des mittels Gelfiltration isolierten

Gliadins, wurde auch ihre Aminosäurezusammensetzung bestimmt (Tab. I). Wie aus Tabelle I ersichtlich, ist der Glutamin-Glutaminsäure- + Asparagin – Asparaginsäure- (45,98–47,14%) und Prolin- (14,8–22,65%) gehalt in allen drei Fraktionen hoch. Im Vergleich zur Fraktion I ist die Prolinkonzentration in der Fraktion III um 34–35% niedriger. Gleichzeitig waren betreffs der Menge der nicht polaren Aminosäuren (Pro, Gly, Ala, Met, Ile, Leu, Phe) in allen drei Fraktionen nahezu identische Werte vorzufinden, d.h. 42,41% in Fraktion I, 40,62% in Fraktion II und 42,07% in Fraktion III.

Im Laufe der Aminosäureanalyse wurde auch der Ammoniakgehalt der 3 Fraktionen bestimmt und in Kennt-

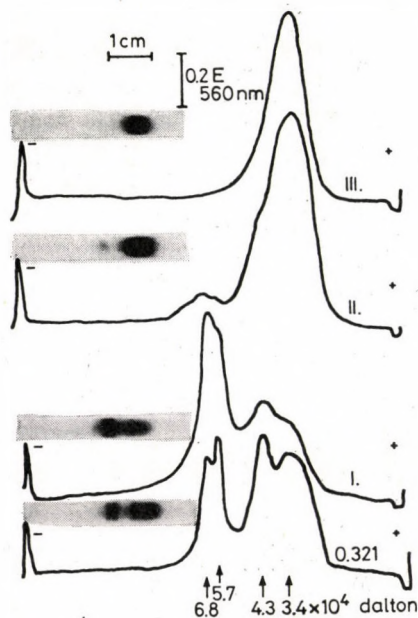


ABB. 2. Densitogramm und mittels Polyakrylamid-Gelelektrophorese sowie Färbung erhaltenes Bild des unfractionierten (0321) Gliadins und der mittels Gelfiltration auf Sephadex G-50 Gelsäule isolierten Gliadinfraktionen I, II und III.

TABELLE I

Aminosäurezusammensetzung der aus dem Gliadinpräparat
mittels Gelfiltration isolierten Fraktionen I, II und III.
Weitere Details S. Methodik und Material

Aminosäure	Gliadin			Aminosäure	Gliadin		
	Fr. I	Fr. II	Fr. III		Fr. I	Fr. II	Fr. III
	Mol%				Mol%		
Lys	2,06	2,05	3,46	Gly	0,24	0,18	0,33
His	1,76	2,12	4,13	Ala	1,16	1,58	1,598
Arg	2,32	3,37	5,46	Val	1,28	1,61	1,332
Cys	0,27	0,50	1,45	Met	0,69	0,68	3,131
Asp*	2,62	3,30	3,197	Ile	1,16	2,12	2,28
Thr	4,56	6,03	6,39	Leu	1,46	1,76	1,59
Ser	1,10	1,69	2,26	Tyr	4,53	5,31	2,79
Glu**	6,17	3,66	3,19	Phe	45,98	44,46	43,70
Pro					22,65	19,59	14,80

* Asparaginsäure + Asparagin (Asp + Asn)

** Glutaminsäure + Glutamin (Glu + Gln)

TABELLE II

Asparagin-(Asn) + Glutamin-(Gln) bzw. Asparaginsäure-(Asp)
+ Glutaminsäure-(Glu)-gehalt der aus dem Gliadinpräparat
mittels Gelfiltration isolierten Fraktionen I, II und III.
Weitere Details im Text.

Gliadin-Fraktion	Aminosäuren		
	Asp + Asn + Glu + Gln	Asn + Gln	Asp + Glu
	Mol %		
I	47,14	27,10	20,04
II	46,58	25,80	20,78
III	45,98	25,19	20,79

nis dieser Daten der Glutamin + Asparagin (Gln + Asn)- bzw. Glutaminsäure + Asparaginsäuregehalt ausgerechnet (Tab. II).

Der Asparagin-Glutamingehalt schwankte in allen drei Gliadin-Fractionen zwischen 25,2 und 27,1%. Diese prozentualen Werte bedeuten gleichzeitig soviel, daß die 45,98—

47,14% des gesamten Aminosäuregehalts ausmachenden Asp + Glu + Gln Aminosäuren zu 55—57% aus Asparagin(Asn) + Glutamin (Gln) bestehen. All dies korreliert mit den Daten unserer vorangehenden Mitteilung [15], laut deren 53—60% der bei den unfractionierten Gliadinproben vorgefundenen, 45,1% ausmachenden

Konzentration der Aminosäuren Asp + Asn + Glu + Gln zu 53–60% aus Glutamin-Asparagin besteht. Mit der Teilnahme der sich im Glutamin und im Asparagin befindlichen Amidgruppen können sich bekanntlich Wasserstoffbindungen ausbilden [1]. Unter Berücksichtigung der relativ großen Zahl der im Gliadin bzw. in seinen Fraktionen befindlichen Amidgruppen, spielen diese Wasserstoffbindungen — nebst anderen Bindungen (ionisierte, hydrophobe usw.) in der Determinierung der Eiweißstruktur unter Umständen eine wichtige Rolle. Die sich an der Peptidbindung nicht beteiligenden, freien Karboxylgruppen der in allen drei Gliadinfraktionen zu 20–20,8% anwesenden Aminodikarbonsäuren (Asp + Glu) können sich indessen an der Bindung der verschiedenen Kationen beteiligen.

Wir haben auch das Absorptionsspektrum des nichtfraktionierten Gliadinpräparats im 0,01 M Essigsäu-

re + 0,8 mM NaN_3 enthaltenden Medium und in den mittels Gelfiltration auf der Sephadex G-50-Säule isolierten Gliadinfraktionen I, II und III bestimmt (Abb. 3).

Das Absorptionsmaximum lag sowohl was das unfraktionierte Gliadin, als auch was die mittels Gelfiltration isolierten Gliadinfraktionen I, II und III anbelangt, bei 275 nm. Der Wert $E_{1\%}^{280\text{ nm}}$ betrug bei der unfraktionierten Gliadinprobe 5,58, bei der Gliadinfraktion I 5,70, bei der Gliadinfraktion II 6,2 und bei der Gliadinfraktion III 6,51.

Der Phosphatgehalt eines der unfraktionierten Gliadinpräparate, sowie der daraus mit Gelfiltration isolierten Fraktionen I, II und III, ferner den Quotienten der bei Wellenlängen von 280 nm bzw. 260 nm gemessenen Extinktionen veranschaulicht Tabelle III.

Aus Tabelle III geht hervor, daß dort, wo die Quotienten E_{280}/E_{260}

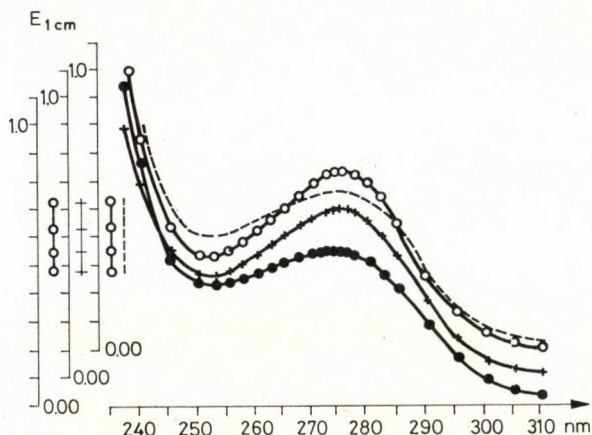


ABB. 3. Absorptionsspektrum des unfraktionierten Gliadins — — — —, und seiner im Laufe der Fraktionierung auf Sephadex G-50-Gelsäule isolierten Gliadinfraktionen: Gliadinfraktion I. ● — — — — ●; Gliadinfraktion II. × — — — — × und Gliadinfraktion III. ○ — — — — ○

TABELLE III

Phosphatgehalt sowie die bei den Wellenlängen 280 nm und 260 nm gemessenen Extinktionen des Gliadinpräparats und der daraus mittels Gelfiltration isolierten Fraktionen I, II und III. Weitere Details S. »Methodik und Material«

Muster	$\frac{\mu\text{gP}_i}{\text{mg Eiweiß}}$	$\frac{E_{280\text{ nm}}^{1\text{ cm}}}{E_{260\text{ nm}}^{1\text{ cm}}}$
Gliadin (0603)	3,22	0,95
Gliadin (0321)	1,40	1,20
Gliadin Fraktion I	0,94	1,08
Gliadin Fraktion II	0,40	1,28
Gliadin Fraktion III	0,31	1,40

höher, die Phosphatkonzentrationen niedriger sind. Ein anschauliches Beispiel dafür ist Fraktion III, bei der der Phosphatgehalt am niedrigsten und der Quotient E_{280}/E_{260} am höchsten war. Diese Beobachtung spricht dafür, daß in diesem Präparat der niedrigste Nukleinsäure- oder Nukleotidgehalt zu verzeichnen war.

Laut Literaturdaten wird durch die aus dem Pepsin und Trypsin enthaltenden Verdauungsgemisch der Gluteneiweiße stammende, autoklavierte, ultrafiltrierte Fraktion die Peristaltik des isolierten Meerschweinchendarms gehemmt [8]. ROBINSON und Mitarb. [12], die den Inhibitor aus dem Glutenextrakt mittels Chromatographie und Elektrophorese isolierten, stellten fest, daß für die, die Darmperistaltik herabsetzende Wirkung das in der Verbindung anwesende Adenosin verantwortlich ist.

Unter Berücksichtigung der angeführten Daten untersuchten wir den die physikochemischen Eigenschaften der Gluteneiweiße (Glutenin, Gliadin und ihrer Fraktionen) betreffenden

Effekt der Nukleinsäuren, der Nukleotide, der Purinnukleoside und des Purinderivates Koffein.

Aus der Literatur ist bekannt, daß durch Koffein bei 18°C die Dimerisation gewisser Eiweiße, so z.B. der Tetramerform von Phosphorylase (Molekulargewicht: 370 000) verursacht [6] oder aus dem sarkoplasmatischen Retikulum des Muskels — dadurch, daß Koffein mit den Ca^{2+} -Bindeeiproteinen in Wechselwirkung tritt — Ca^{2+} mobilisiert wird [4, 5, 13].

Tabelle IV veranschaulicht, welchen Einfluß Koffein, 5'-Adenylsäure (AMP), Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosin auf die nebst verschiedenen Endkonzentrationen der NaCl-, Na-Phosphat- bzw. KCl-Lösungen zustandekommende Präzipitation des Glutenins, Gliadins und seiner Fraktionen ausüben.

Die Gluteneiweiße enthaltende 0,01 M Essigsäurelösung wurde zuerst bis zur in Tabelle IV angeführten mM Endkonzentration mit der wässrigen Lösung des Purinderivates, sodann

TABELLE IV

Wirkung der verschiedenen Purinderivate auf die sich in Anwesenheit eines Phosphatpuffers bzw. einer NaCl- sowie KCl-Lösung abspielenden Präzipitation des Glutenins, des unfractionierten Gliadins und der daraus mittels Gelfiltration isolierten Fraktionen I, II und III. Weitere Details im Text

Gluteneiweiß	Gluteneiweiß präzipitierende Verbindung			Purinderivate bei Präzipitation der Glutenweisse				Absorption bei 360 nm nach Präzipitation	Präzipitiertes Gluteneiweiß mg
	NaCl	KCl	Phosphat-Puffer	Koffein	5'-AMP	ATP	Adenosin		
	Endkonzentration mM								
Gliadin $E_{280}/E_{260} = 1,2$	37,5	—	—	—	—	—	—	0,570 (100,0%)	
	37,5	—	—	10,0	—	—	—	0,510 (89%)	
	—	200,0	—	—	—	—	—	0,842 (100,0%)	
	—	200,0	—	15,0	—	—	—	0,736 (87,4%)	
	—	—	16,0	—	—	—	—	1,324 (100,0%)	
	—	—	16,0	15,0	—	—	—	1,164 (87,9%)	
	—	—	16,0	—	15,0	—	—	1,160 (87,6%)	
	200,0	—	—	—	—	—	—		
200,0	—	—	—	—	—	15,0		0,763 (100,0%)	
								0,674 (88,3%)	
Gliadin Fraktion III $E_{280}/E_{260} = 1,4$	—	200,0	—	—	—	—	—		1,03 (100,0%)
	—	200,0	—	—	—	15	—		0,93 (90,0%)
Gliadin Fraktion I $E_{280}/E_{260} = 1,08$	—	200,0	—	—	—	—	—		1,30 (100,0%)
	—	200,0	—	15,0	—	—	—		1,10 (84,6%)
Glutenin $E_{280}/E_{260} = 0,95$	—	—	16,0	—	—	—	—	0,169 (100,0%)	
	—	—	16,0	15,0	—	—	—	0,139 (82,2%)	
	—	—	16,0	—	15,0	—	—	0,136 (80,0%)	

mit den in der Tabelle angegebenen Präzipitationslösungen (NaCl, KCl usw.) versetzt. Nach dem Zusammenschütteln wurden entweder die Transparenzänderungen der Proben bei 360 nm gemessen oder nach Zentrifugieren (2000 g, 0°C, 45 Minuten) der Eiweißgehalt der Präzipitate mit dem Biuretverfahren oder nach LOWRY und Mitarb. [9] bestimmt. In Tabelle IV sind somit die bei 360 nm gemessenen Absorptionswerte oder die im Laufe der Eiweißbestimmungen ermittelten, in mg Eiweiß ausgedrückten Werte dargestellt.

Wie aus Tabelle IV ersichtlich, ist die bei den verschiedenen Gluteneiweißen bei 360 nm gemessene Absorption bzw. die im Präzipitat gemessene Eiweißmenge im Falle der Anwendung verschiedener Purinderivate um 10–20% niedriger als die Kontrollwerte. All dies spricht dafür, daß sich in der Gegenwart der Purinderi-

vate die Ausfällbarkeit der Gluteneiweiße verringert, d.h., daß ihre Lösbarkeit ansteigt. Die Daten der Tabelle IV weisen auch darauf hin, daß die Präzipitation jener Gluteneiweißproben, in denen der Wert des E_{280}/E_{260} -Quotienten niedriger liegt, von geringerem Ausmaß ist. Bei dieser Versuchsserie betrug die Endkonzentration der Purinderivate 10–15 mM, das μmol Purinderivat : mg Gluteneiweiß = 25–30 : 1. Des weiteren untersuchten wir unter Berücksichtigung der angeführten Daten, auf welche Weise sich bei unterschiedlichen μmol Adenosin/mg Eiweiß-Propportionen die Ausfällbarkeit der mit unterschiedlichen E_{280}/E_{260} Proportionen charakterisierbaren Gliadin- bzw. Gliadinfraktionsproben bei einer Endkonzentration von 200 mM NaCl ändert. Zu diesen Versuchen verwendeten wir das im Zusammenhang mit Tabelle IV erläuterte Zentrifugierverfahren, d.h., daß die Gli-

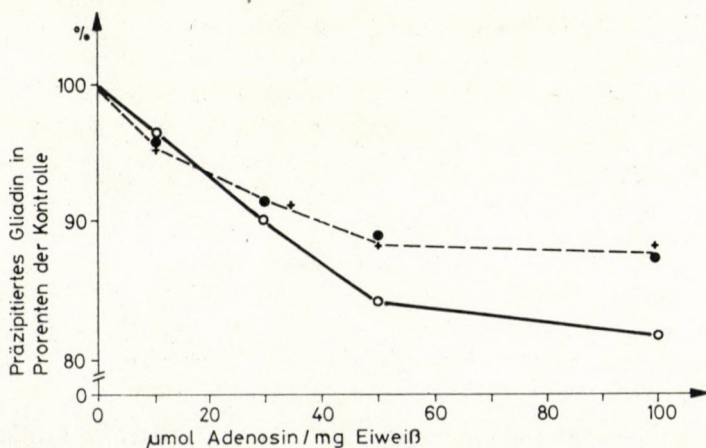


ABB. 4. Änderungen der Ausfällbarkeit des unfraktionierten Gliadins ● — — — — ● und der daraus isolierten Fraktion I. ○ — — — — ○ bzw. Fraktion III + — — — — + im Falle unterschiedlicher μmol Adenosin/mg Eiweißproportionen. Die Präzipitation der Eiweiße erfolgte bei einer 200 mM NaCl-Endkonzentration. Weitere Details im Text

din, Adenosin und NaCl enthaltenden Proben zentrifugiert und der Eiweißgehalt des Präzipitats bestimmt wurden.

Wie aus Abbildung 4 hervorgeht, waren zwischen den einzelnen Gliadin- bzw. Gliadinfraktionsproben mit unterschiedlichen E_{280}/E_{260} -Quotienten betreffs der bei einer 200 mM NaCl-Endkonzentration präzipitierten Eiweißmenge bis zu einer Eiweißproportion von 30 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ keine Unterschiede vorzufinden. Bei einer größeren — 50–100 μmol Adenosin/mg Eiweiß — Proportion ließen sich zwischen den einzelnen Gliadin- bzw. Gliadinfraktionsproben mit unterschiedlichen E_{280}/E_{260} -Quotienten in Hinblick auf ihre Ausfällbarkeit bereits wesentliche Unterschiede erkennen. In Fällen somit, in denen der Wert des E_{280}/E_{260} -Quotienten höher, zwischen 1,2–1,4 liegt, ist der unter Wirkung der Adenosin-NaCl-Lösung eintreffende, Gliadinpräzipitation hemmende Effekt schwächer — und auch umgekehrt: Bei einem niedrigeren E_{280}/E_{260} -Quotientenwert — zwischen 0,94 und 1,08 — ist die oben erwähnte Inhibitorwirkung des Adenosins intensiver.

BESPRECHUNG

Durch Fraktionierung der aus Brot mit der modifizierten Methode von BECKWITH und Mitarb. [3] isolierten Gliadinpräparate auf Sephadex G-50-Gelsäule können 3 Fraktionen separiert werden (Abb. 1). Das Molekulargewicht dieser Fraktionen ist unterschiedlich (Abb. 2), ihr Aminodi-

karbonsäure- + Aminodikarbonsäureamid- (Asp + Glu + Asn + Gln)-Gehalt nahezu identisch, ihr Prolingehalt dagegen unterschiedlich (Tab. I.) Namentlich ist der Prolingehalt der Fraktionen mit größerem Molekulargewicht höher, als der jener mit niedrigerem Molekulargewicht. Betreffs des Aminodikarbonsäuregehalts (Glu + Asp) besteht zwischen den verschiedenen Gliadinfraktionen kein Unterschied (Tab. II).

Die sich an der Peptidbindung nicht beteiligenden freien Karboxylgruppen der Glutaminsäure + Asparaginsäure — deren Anteil in allen drei von uns isolierten Gliadinfraktionen 20–20,8% des Gesamtaminosäuregehaltes ausmacht — können in der Bindung der verschiedenen Kationen eine wesentliche Rolle spielen.

Anhand der in Tabelle III angeführten, sich auf die E_{280}/E_{260} -Quotienten von Gliadin und seiner Fraktionen beziehenden Daten, gelangten wir zur Folgerung, daß die Präparate in unterschiedlichen Mengen Nukleinsäure und Nukleotid enthalten. Die in Tabelle IV und Abbildung 4 dargestellten Ergebnisse sprechen dagegen dafür, daß sich in der Gegenwart der verschiedenen Purinderivate die Ausfällbarkeit von Gliadin und seiner Fraktionen verringert, d.h., daß ihre Lösbarkeit ansteigt.

Diese Tatsachen lenken die Aufmerksamkeit auf zwei Gesichtspunkte.

1. Der niedrigen Lösbarkeit der Gluteneiweiße zufolge, ist in den Samen der Getreidearten — insofern Ionstärke und pH-Werte den *in vivo*

Verhältnissen entsprechen — in der Lösung der Plastide die Gluteneiweißkonzentration sehr niedrig [2]. Bei einer diese niedrige Proteinkonzentration übertreffenden Gluteneiweißkonzentration werden die Gluteneiweiße ausgefällt und in ausgefallter Form in den Plastiden gespeichert. Aufgrund unserer Daten scheint es wahrscheinlich, daß durch die in den Plastiden in vivo anwesenden Nukleinsäuren und Nukleotide — die miteinander in Wechselwirkung treten und sich den Gluteneiweißen anbinden — die Lösbarkeit gesteigert wird. Dieser sich in den Samen der Getreidearten abspielende Prozeß hat es zur Folge, daß die isolierten Gluteneiweiße — im Einklang mit den Literaturdaten [12] und der in Tabelle III angeführten Daten — Nukleotid und Nukleozid enthalten.

2. Das sich an die Gluteneiweiße unter den oben beschriebenen Bedingungen bindende Adenosin kann von den Gluteneiweißen chromatographisch bzw. elektrophoretisch separiert werden [12]. Durch dieses Adenosin werden die Peristaltik des Dünndarms und die Azetylcholinproduktion gehemmt [8]. Aus den purinergen Endkörpern wird im Bereich des gastrointestinalen Traktes bekanntlich Adeninnukleotid (Adenylsäure, Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat) freigesetzt — eine Verbindung, durch die die Cholinergtransmission gehemmt wird [17]. Daraus und aus anderen Literaturdaten [10, 11] folgt, daß das Freiwerden von Azetylcholin physiologisch unter ständiger purinerg Kontrolle steht.

Durch die an die Gluteneiweiße gebundenen und von dort freiwerdenden Verbindungen — Adenosin und Adeninnukleotid — werden in der Gegenwart der auch physiologisch funktionierenden purinergeren Regelung die Azetylcholinproduktion und demzufolge auch die Peristaltik noch weiter herabgesetzt.

Anhand der sich auf die Gluteneiweiße beziehenden Literaturdaten und unserer eigenen Ergebnissen gelangten wir zur Ansicht, daß wir uns in der Zukunft in erster Linie mit der Bindenfähigkeit der Kation- und Purinderivate der Gluteneiweiße und ihrer Fragmente befassen müssen, weil diese ersterwähnten Prozesse dem Anschein nach eng mit der pharmakologischen Aktivität der Gluteneiweiße zusammenhängen.

Frau Dr. E. KOROM und Frä. M. DEBRECZENI wollen wir für ihre wertvolle Hilfe auch an dieser Stelle unseren aufrichtigen Dank zukommen lassen.

LITERATUR

1. BECKWITH, A. C., WALL, J. S., DIMLER, R. J.: Amide groups as interactions sites in wheat gluten proteins: Effects of amide-ester conversion. *Arch. Biochem.* **103**, 319 (1963).
2. BECKWITH, A. C., WALL, J. S., JORDAN, R. W.: Reversible reduction and reoxidation of the disulfide bonds in wheat gliadin. *Arch. Biochem.* **112**, 16 (1965).
3. BECKWITH, A. C., NIELSEN, H. C., WALL, J. S., HUEBNER, F. R.: Isolation and characterization of a high molecular weight protein from wheat gliadin. *Cereal Chem.* **43**, 14 (1966).
4. BIANCHI, C. P.: Kinetics of radiocaffeine uptake and release in frog sartorius. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **138**, 41 (1962).
5. BIANCHI, C. P.: Pharmacological actions on excitation-contraction coup-

- ling in striated muscle. *Fed. Proc.* **27**, 126. (1968).
6. BOT, G., KOVÁCS, E., GERGELY, P.: Role of tetramer dimer equilibrium in the dephosphorylation and activity of phosphorylase a. *Acta biochim. Acad. Sci. hung.* **12**, 335 (1977).
 7. 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).
 8. FRAZER, A. C.: The present state of knowledge on the celiac syndrome. *J. Pediat.* **57**, 262 (1960).
 9. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. R., RANDALL, R. J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
 10. PHILLIS, J. W., KOSTOPOULOS, G. K.: Adenosine as a putative transmitter in the cerebral cortex. Studies with potentiators and antagonists. *Life Sci.* **17**, 1085 (1974).
 11. PHILLIS, J. W., EDSTROM, J. P.: Effect of adenosine analogs on rat cerebral cortical neurons. *Life Sci.* **19**, 1041 (1976).
 12. ROBINSON, G. B., SCHNEIDER, R., FRAZER, A. C.: A substance from wheat gluten, which inhibits the intestinal peristaltic reflex. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **93**, 143 (1964).
 13. SZABOLCS, M., KÖVÉR, A., KOVÁCS, L.: On the mechanism of Ca transport in the sarcoplasmic reticular fraction. *Acta biochim. biophys. Acad. Sci. hung.* **2**, 395 (1967).
 14. SZABOLCS, M., CSORBA, S., KÁVAI, M., FRANCIA, I., SZABÓ, B.: Eigenschaften des Gliadins und der Antikörper gegen Gliadin bei Zöliakie. *Acta paediat. Acad. Sci. hung.* **18**, 155 (1977).
 15. SZABOLCS, M., CSORBA, S., HAUCK, M.: Eigenschaften und Antigenität der aus Brot isolierten Gluteneiweiße. *Acta paediat. Acad. Sci. hung.* **19**, 125 (1978).
 16. TAUSKY, H. H., SHORR, E.: A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. biol. Chem.* **202**, 675 (1953).
 17. VIZI, E. S., KNOLL, J.: The inhibitory effect of adenosine and related nucleotides on the release of acetylcholine. *Neuroscience* **1**, 391 (1976).
 18. WEBER, K., OSBORN, M.: The reliability of molecular-weight determinations by dodecyl sulfate acrylamide gel electrophoresis. *J. biol. Chem.* **244**, 4406 (1969).

DR. M. SZABOLCS

Zentrales Forschungslaboratorium

Medizinische Universität,

H-4012 Debrecen, Ungarn