

dc_308_11

Akadémiai Doktori Értekezés Tézisei

A humorális immunválasz coeliakiában



Dr Korponay-Szabó Ilma Rita

2012

1. Bevezetés

A coeliakia (gluten-senzitív enteropathia, sprue) az egyik leggyakoribb autoimmun betegség az európai népességben, mely a populáció 1%-át érinti. A betegséget a kalászos gabonafélékben lévő gluten fogyasztása provokálja arra genetikailag hajlamos egyéneknél. Az autoimmun reakció fő célpontja a vékonybél, de gyakori egyéb szervek érintettsége is. A kóros immunreakcióban részt vesz mind a celluláris, mind a humorális immunrendszer, gliadin-specifikus T-limfociták és gluten-dependens autoantitestek termelése révén. A glutenfogyasztás megszüntetésével az autoimmun folyamat leállítható, a szövődmények is javulást mutathatnak. A betegek többségénél a betegség tünetszegényen zajlik, de a vékonybélben náluk is súlyos vékonybél boholyatrófia alakul ki illetve szövődmények jelenhetnek meg. A coeliakia genetikailag meghatározott állapot, melyre jellemző a HLA-DQ2 vagy DQ8 hordozás, bár magáért a gluten-intoleranciáért felelős gén jelenleg még nem ismert.

2. Előzmények

A coeliakia felismerésének fő eszköze napjainkban a betegségre jellemző autoantitestek szerológiai kimutatása. A klasszikus coeliakia-antitest az IgA osztályú endomysium ellenanyag (EMA). Nevét onnan nyerte, hogy simaizmot vagy közepes méretű ereket tartalmazó szövetmetszeteken, indirekt immunfluoreszcens eljárással lehet kimutatni, az izomsejtek kontúrához való kötődése alapján. 1993-1995 között végzett kandidátusi munkámban az endomysium ellenanyag optimális detektálásának lehetőségeivel és a pozitív leletek klinikai konzekvenciáival foglalkoztam. Prospektív vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az EMA pozitivitás érzékeny non-invazív indikátora a betegség aktivitásának, jól jelzi a diéta hatásosságát és a diétahibákat is, valamint a vékonybélben a boholykárosodás kialakulását újabb glutenexpozíció során. Ebben az időszakban azonban még nem volt ismert, hogy mi az EMA célmolekulája.

1997-ben Dieterich és munkatársai közölték, hogy a coeliakiás savók a szöveti transzglutamináz nevű enzimmel (TG2, EC. 2.3.2.13) reagálnak. A TG2 kalcium és GTP reciprok szabályozása alatt álló kettős, transzamidáló és GTP-áz működésű enzim és multifunkcionális protein, mely 687 aminosavból áll. 4 szerkezeti domén (I.-IV.) építi fel. A fehérje konformációja az egyes szöveti kompartmentekben illetve különböző működései során nem egységes, az aktív formában a szerkezet kinyílik. Az a feltételezés, hogy a TG2 a coeliakia valódi autoantigénje, kezdetben számos új kérdést vetett fel, hiszen erről az enzimről mindaddig úgy tudták, hogy intracelluláris lokalizációjú - az EMA, reticulín (ARA) és jejunális (JEA) ellenanyagok viszont extracelluláris kötőhelyekhez kapcsolódnak a

szövetmetszeteken. Ezért nem volt világos, hogy egy új ellenanyagról van-e szó, vagy a coeliakiára jellemző addig ismert ellenanyagok irányulnak a TG2 ellen és azt sem lehetett tudni, hogy a szöveti autoantitestekkel kapcsolatban már ismert törvényszerűségek érvényesek lesznek-e a TG2 elleni ellenanyagokra is. Ugyanakkor a TG2 mint autoantigén megtalálása új távlatokkal kecsegtetett a betegség diagnosztikájának korszerűsítésében és egyszerűsítésében valamint a betegség lényegének és immunológiai kezelésének kutatása szempontjából is. Ezért további munkám céljává az autoantitestek és a TG2 enzim kölcsönhatásainak vizsgálatát választottam.

A TG2 autoantitestek keletkezését általában a haptén-carrier mechanizmus alapján magyarázzák, mivel a TG2 a gliadin peptideket szubsztrátként felhasználja és keresztköti vagy deamidálja. Eközben a gliadin és a TG2 között szoros kapcsolat alakul ki, mely lehetővé teszi, hogy a TG2-re specifikus B sejtek közös, TG2-gliadin komplexeket kebelezzenek be és nem-professzionális antigén-prezentáló sejtneként azokat bemutassák a gliadin-specifikus T sejteknek. A HLA-DQ2 és DQ8 molekulák a deamidált gliadin peptideket általában erősebben kötik, mert a glutaminok helyén kialakuló savanyú töltéssel azok jobban illeszkednek az antigénprezentáló részbe. A gliadin peptidek prezentálása deamidált gliadin peptidekre specifikus antitestek termelését is eredményezi, melyek kimutatása diagnosztikusan hasznosítható.

A coeliakia autoantitestek biológiai hatásának pontosabb megértését nagyban segítené azoknak a TG2 epitópoknak az azonosítása, melyek ellen az antitestek termelődnek. A 2000-es évek elején történt kezdeti epitóptérképezési vizsgálatokhoz (Seissler 2001, Sblattero 2002, Nakachi 2004) rekombináns humán TG2 fragmentumokat használtak, melyekhez multiplex kötődést észleltek. Ennek alapján az a nézet terjedt el, hogy számos, egymástól független epitóp van. Más kutatók (Byrne 2004) viszont úgy találták, hogy az enzim aktív centrumát alkotó három aminosav mutáció csökkenti a coeliakiás antitestek kötődését. Ezek az eredmények ellentmondásosak, nem veszik figyelembe a TG2 jelentős konformációs érzékenységet és térszerkezetét. A coeliakiás betegekben előkészített IgA és klónozott antitestek sejt kultúrában biológiai hatásokat fejtenek ki, de *in vivo* szerepük vitatott.

Az antitest vizsgálatok egyre szélesebb körű elterjedése révén a coeliakia számos korai jelensége vált ismertté, melyek a betegség hagyományos definícióját és diagnosztikus kritériumait is megkérdőjelezzik. Ezért időszerű azt is vizsgálni, hogy az antitestek jelenléte szolgálhat-e új diagnosztikus kritériumok alapjául. Az antitest hatások megértéséhez fontos lenne jobban lokalizálni azokat a TG2 epitópokat, ahová a coeliakiás antitestek kötődnek, mert ezek ismerete utat nyithat olyan kompetitorok létrehozásának, melyek segítségével az antitestek hatásai szelektíven vizsgálhatók vagy blokkolhatók. Végeredményben ilyen

vizsgálatok dönthetik el, hogy az antitesteknek van-e tényleges szerepe a betegség tüneteiben és a kötődés gátlása járhat-e valamiféle terápiás eredménnyel, vagy az antitestek jelentősége csupán a diagnózist segítő szerepükre korlátozódik. Végül genetikai tényezők azonosítása adhat magyarázatot a gluten intoleranciára és arra, hogy jelenlétében miért éppen a TG2 ellen termelődnek antitestek.

3. Célkitűzések

Munkám során a coeliakia autoantitestek különleges sajátosságaiból kiindulva a betegségben betöltött szerepüket komplex módon, a transzglutamináz és a sejtes alapkutatótól a klinikai ellátáson keresztül a diagnosztikus követelmények értékeléséig kívántam vizsgálni. Ennek során célom volt

1. Az immunfluoreszcens módszerrel detektálható hagyományos coeliakia autoantitestek (endomysium, reticulín, jejunális antitestek) antigénjének vizsgálata, azonos-e a 2-es típusú transzglutamináz enzimmel, milyen különbségek vannak az egyes antitestek között,
2. A 2-es típusú transzglutamináz szerkezetének és coeliakiában keletkező anti-TG2 antitestek kötődési epitópjainak vizsgálata, összehasonlítás a deamidált gliadin peptid elleni ellenanyagokkal,
3. A coeliakia autoantitestek keletkezési mechanizmusának és patogenetikai szerepének vizsgálata, kötődésük detektálására és biológiai hatásuk mérésére alkalmas vizsgálati eljárások és kísérletes rendszerek kifejlesztése és tesztelése,
4. A coeliakia szerológiai diagnosztikájában alkalmazható ELISA eljárások kifejlesztése és klinikai értékelése,
5. Szelektív IgA hiányban szenvedők értékelésére alkalmas antitest kimutatási eljárások kidolgozása és értékelése,
6. Coeliakia antitestek helyszíni és gyors kimutatására alkalmas tesztek kifejlesztése, értékelése és klinikai alkalmazása,
7. Reprezentatív epidemiológiai felmérés a magyar népességben a coeliakia előfordulásának megállapítására,
8. Coeliakiára hajlamosító genetikai markerek azonosítása, esetleges diagnosztikus alkalmazásuk felmérése,

9. A neminvazív diagnózis lehetőségeinek vizsgálata, az antitest kimutatási módszerek megbízhatóságának értékelése, diagnosztikus score létrehozása.

4. Betegek és vizsgálati módszerek

A tanulmányokban magyar, finn, olasz, svéd és angol betegek vettek részt. Egy multicentrikus vizsgálatban Európa 9 országából vettek részt betegek. A coeliakia diagnózisát minden esetben vékonybél szövettani vizsgálattal, a dermatitis herpetiformis diagnózisát a bőr direkt immunfluoreszcens vizsgálatával állapítottuk meg.

A diagnosztikus vizsgálatok értékelésénél alkalmazott kontrollcsoportok – az IgA hiányos kontrollok egy részét kivéve – vékonybélbiopsia alapján coeliakiának nem tekinthető klinikai betegek voltak, akiknél a vékonybél boholyszerkezete megtartott volt. A szűrővizsgálatoknál IgA hiányos véradókat, rizikócsoportokat, köztük az ismert coeliakiás betegek elsőfokú rokonait vizsgáltuk. A szűrővizsgálatok egy része a normál populáció vizsgálatával történt (6 éves gyermekek Jász-Nagykun-Szolnok megyében).

Az immunológiai eltérések gluten-dependens voltának vizsgálatára egy tanulmányunkban a betegeket randomizáltuk, majd glutenmentes étrendet illetve a glutenbevitel fokozását javasoltuk 6 hónapig. Állapotukat klinikai és vékonybél szövettani vizsgálatokkal ellenőriztük. majd a csoportokat felcserélve a vizsgálatot cross-over módon folytattuk.

A szérum antitesteket indirekt immunfluoreszcens módszerrel mutattuk ki. A metszeteket natív formában illetve TG2 antigént módosító eljárások után (fixálás, kálium-tiocianát vagy klóracetát kezelés) használtuk. IgA, IgG és IgM osztályú humán antitestek kötődését vizsgáltuk. A kötődési mintázat és a TG2 szöveti lokalizációjának összehasonlítására többszínű jelölést alkalmaztunk. A TG2 fehérjét monoklonális ellenanyagokkal jelöltük. A coeliakia autoantitestek kötődését TG2 hiányos és normál egerek szövetein is vizsgáltuk, a TG2 hiányos metszetekhez humán rekombináns TG2-t adtunk.

A TG2 elleni antitesteket ELISA eljárással mértük tengerimalac májból származó, kereskedelembe kapható TG2, humán vörösvérsejtekből preparált TG2 és különböző rekombináns TG2 antigének alkalmazásával. Az antitestek epitópspecifitásának vizsgálatához kompetitív ELISA-t alkalmaztunk és helyspecifikus mutagenézist használtunk. A coeliakia autoantitestek gyors kimutatására immunkromatográfiás módszert fejlesztettünk ki.

Molekuláris biológiai, biokémiai és preparatív kémiai módszereket alkalmaztunk az antitestek tisztítására, koncentrálására, specifitásuk, kötődésük vizsgálatára; a TG2 enzim enzimaktivitásának mérésére és rekombináns TG2 fehérjék előállítására.

A TG2 (PDB code: 1KV3) és a TG3 (PDB code: 1VJJ) ismert kristályszerkezetét felhasználva teljes hosszú TG2 modellt építettünk fel. Az 1KV3 szerkezetből hiányzanak az 1-14, 44-55 és 123-132 aminosavat, ezeket a TG3 hasonló részeiből illesztettük be a Modeller program multiple templát módszerével. A grafikus méréseket Silicon Graphics Fuel és Sybyl és VMD programcsomaggal végeztük (Tripos International, St. Louis, MO, USA).

A HLA-alléleket szekvencia-specifikus primerekkel (Olerup SSP AB, Saltsjöbaden, Sweden), restriktációs fragmenthossz analízissel vagy automatizált rendszerekben (Illumina) SNP tipizálással határoztuk meg. A non-HLA gének SNP variációt TaqMan és On Demand Assay-vel Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com) platformon, Affimetrix 50K chippel illetve Illumina 670-QuadCustom_v1 és Golden Gate automatizált tesztrendszerrel végeztük. Az eredményekkel a feldolgozás előtt quality control teszteket végeztünk a Merlin és Pedcheck programmal (O'Connell és Weeks 1998), értékeltük a Hardy-Weinberg equilibriumot és a mendeli öröklődést. A linkage-t és az allélek transzmisszióját domináns és recesszív modellekkel, transzmissziós disequilibrium tesztel (TDT) és családfa analízissel értékeltük.

Köldökszínór véna endotél sejteket (HUVEC) Palatka és mtsai 2006 szerint preparáltunk és tenyésztettünk. A sejteket az angiogenezis kísérletekhez Matrigelbe kevertük és 24-es lemezen (50.000 cells/vájlut) EGM1 tápfolyadékban 2% fetalis borjúsérummal tenyésztettük. A kísérletekben 1 ug/vájlut MAb885 vagy tisztított coeliakiás és kontroll IgA-t illetve monoklonális egyláncú antitestet adtunk hozzá 4 óra múlva. Az érképződést 24-48 óra után Image J szoftverrel értékeltük sorozatfényképek alapján vagy filmes rendszerrel. A tubulusok hosszát az alapértékek mértani közepének százalékában fejeztük ki.

5. Eredmények és megbeszélésük

5.1. A szöveti antitestek és a transzglutamináz antitestek azonossága (2,5)

A TG2 antitestek és az endomysium (szöveti) antitestek azonosságának vizsgálatára monoklonális TG2 elleni egér ellenanyagokkal jelöltük a TG2 enzimet azokban a szövetmetszetekben, melyeket az endomysium ellenanyag kimutatására használtunk. A monoklonális TG2 antitestek a humán coeliakiás savóhoz hasonló, „endomysium” mintázatban, meglepetésünkre döntően extracellulárisan kötődtek a fixálatlan, fagyasztott nyelőcső és köldökszínór metszetekhez. A monoklonális ellenanyagok a coeliakia diagnosztikában használt egyéb szövetekhez (appendix, máj, vese) is a coeliakiás betegsávkban lévő antitestekhez hasonlóan (ARA, JEA) kötődtek, függetlenül attól, hogy humán, főemlős vagy rágcsáló szöveteket használtunk. Ezek az eredmények azt igazolták, hogy a TG2 a normál szövetekben az endomysium és reticulin rostok mentén, valamint a

vékonybélben a bazálmembrán alatt nagymennyiségben megtalálható és a korábban endomysium, reticulin és jejunális ellenanyagoknak nevezett antitestek valójában a szövetekben ezekre a helyekre lokalizált endogén TG2 antigénhez kötődve adják a diagnosztikus értékű pozitív immunfluoreszcens reakciót. Ha a metszetekből a TG2-t kémiai anyagokkal kivontuk, a betegsávók és a monoklonális antitestek nem tudtak kötődni.

Annak bizonyítására, hogy az endomysium, reticulin és jejunális ellenanyag reakciókért kizárólag a TG2 elleni antitestek felelősek, TG2 hiányos (knockout) egerek szövetein vizsgáltuk a betegsávók és monoklonális antitestek kötődését, melyekhez specifikus kötődést nem lehetett kimutatni. Biokémiai vizsgálatokból ismert volt, hogy a fibronectinhez jól kötődik a TG2, ezért a TG2 hiányos egerek szövetmetszeteit tisztított természetes eredetű (emberi vörösvérsejtből preparált) vagy rekombináns humán TG2 fehérjével inkubáltuk. Ezt követően mind a monoklonális, mind a coeliakiás TG2 antitestek jól felismerték a szövetekhez endomysialis mintázatban megkötődött exogén TG2-t. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyították, hogy az endomysium, reticulin és jejunális ellenanyagok azonosak a TG2 elleni ellenanyagokkal és egymással, és a TG2 elleni ellenanyagok a coeliakiára jellemző specifikus autoantitestek. A vizsgálatok azt is igazolták, hogy az extracelluláris térben a TG2-t a fibronectin tartja az endomysiumhoz és reticulin rostokhoz lehorgonyozva.

5.2. Transzglutamináz-alapú, diagnosztikus antitest vizsgálatok kifejlesztése és klinikai értékelése

5.2.1. Tengerimalac TG2 antigénnel végzett ELISA (1)

A fenti eredmények alapján elsőként fejlesztettünk kis diagnosztikusan alkalmazható ELISA módszert a betegsávók antitesttartalmának mérésére tengerimalac TG2 antigén alkalmazásával. 136 coeliakiás és 207 kontroll beteget vizsgálva a kezdeti ELISA szenzitivitása 95%, specifitása 92% volt. Egyidejűleg kimutattuk, hogy az IgA osztályú antitestek jól reprodukálható és érzékeny kimutatásához a tengerimalac TG2 fehérjét előzetesen kalciummal aktiválni kell, hogy az antitestek kötődéséhez szükséges konformáció létrejöjjön.

5.2.2. Humán TG2 antigén alkalmazása a diagnosztikus vizsgálatokban (3,4,6,10)

A továbbiakban a méréseket ezért humán TG2 alkalmazásával folytattuk, melyet kezdetben humán vörösvérsejtekből nyertünk, később pedig rekombináns TG2-t használtunk. A humán rekombináns TG2 fehérje alkalmazása lehetővé tette nemcsak az IgA, hanem az IgG osztályú ellenanyagok diagnosztikus kimutatását is, melyet az IgA hiányos betegek felismerésére is megbízhatónak találtunk. Világviszonylatban elsőként végeztünk coeliakia szűrővizsgálatot

IgA hiányos véradók körében és megállapítottuk, hogy a tünetmentes IgA hiányos személyek mintegy 10%-ánál fel nem ismert coeliakiával kell számolni.

Nemzetközi multicentrikus vizsgálatban összehasonlítottuk a rekombináns TG2 antigénnel kapott ELISA eredményeket a központilag értékelt szövettani eredményekkel 271 betegnél. A vizsgálatban 144 coeliakiás és 127 kontroll beteg vett részt. Az antitest eredmények jobban korreláltak a klinikai adatokkal, mint a szövettan és feltűnően magas (10.2%) volt a rosszul orientált vagy más egyéb okból nehezen véleményezhető szövettani minták száma.

5.2.3. A humán transzglutamináz antigén szerkezetének hatása a coeliakiás autoantitestek mérésének hatékonyságára (60)

Vizsgáltuk azt is, hogy milyen TG2 milyen konformációs integritása szükséges a coeliakia autoantitestek specifikus kimutatásához és úgy találtuk, hogy az alkalmazott TG2 molekulák térszerkezete befolyásolja az antitestek kötődését és azok szinte kizárólag konformációs epitópokat ismernek fel. A denaturált fehérjéhez a coeliakiás antitest nem kötődnek. Ezek az eredmények érthetővé teszik, hogy a kereskedelembe kapható, különböző minőségű TG2 antigént tartalmazó ELISA kit-ek miért adnak olykor nem specifikus és a klinikai ellátásban rosszul alkalmazható eredményeket.

5.2.4. A beteg saját TG2 autoantigénjének felhasználása gyors coeliakia antitest kimutatás tervezésére. A gyors tesztek klinikai alkalmazása (4,9,14,18,23,24,29)

Ezeket a megfigyeléseket használtuk fel arra, hogy a TG2 ellenanyagok vérből történő diagnosztikus kimutatására gyors tesztet hozzunk létre. Tekintettel arra, hogy minden vérmintában megtalálható a TG2 az emberi vörösvérsejtekben, a betegek saját természetes TG2-t alkalmaztuk antigénként. A vérminták gyengéd haemolízálásával a vörösvérsejtekből a TG2 felszabadítható, és ha a plazmában TG2-specifikus antitestek vannak jelen (vagyis a beteg aktív coeliakiában szenved), a vörösvérsejt TG2-vel azok komplexeket képeznek. Ezek a komplexek TG2-t megkötő fehérjékkel, pl. fibronectinnel vagy collagénnel valamilyen alkalmas felülethez köthetők és ott egyszerű színreakcióval láthatóvá tehetők. Két ezen az elven működő gyors tesztet próbáltunk ki a gyakorlatban, az egyik a Nunc-Immunostick Maxisorp felületet és peroxidáz/TMB kimutatást, a másik lateral flow immunkromatográfiás módszert és kolloidális színezéssel konjugált anti-IgA-val történő kimutatást alkalmaz. Az első 15 perc alatt, a második 1-5 perc alatt képes a coeliakia autoantitesteket minden laboratóriumi felszerelés nélkül, betegágy mellett vagy rendelői körülmények között detektálni.

A saját TG2-alapú coeliakia gyors teszteseteket új betegek rendelői felismerésére és 263 gondozott coeliakiás betegnél a diéta betartásának rendelői ellenőrzésére használtuk. A gyors teszt szenzitivitása (97.4%) és specificitása (97.6%) megközelítette az endomysium

ellenanyag mikroszkópos kimutatásának biztonságát és jól korrelált a TG2 elleni antitestek humán rekombináns TG2 antigénnel savóból történő ELISA mérésével is. A diéta ellenőrzése során a gondozott betegek mintegy 20%-ánál volt pozitív a reakció mindhárom teszttel, azaz a diéta betartása nem volt megfelelő. A helyszíni teszt pozitivitása esetén mód nyílt arra, hogy a beteget illetve szüleit a nem megfelelő kezelési eredménnyel azonnal szembesítsük és megpróbáljuk meggyőzni őket arról, hogy a diéta pontosabb betartására van szükség. Ezen intervenció után 3-6 hónap múlva a TG2 antitestek szérumszintjének szignifikáns csökkenését regisztráltuk, és a betegek 75%-ában a gyorseszteszt és a laboratóriumi eredmények negatívvá válása is alátámasztotta a compliance javulását. Ezzel szemben egy olyan kontroll coeliakiás csoportban, akiket gyorseszteszttel nem vizsgáltunk és a betegek csak levélben kaptak értesítést a diéta elégtelen voltát jelző kóros laboratóriumi eredményeikről, a követés során a TG2 antitest szintek nem csökkentek és csak a betegek 28%-a vált 3-6 hónap után antitest negatívvá.

A Biocard gyorseszteszt alkalmazásával 2005-ben reprezentatív népességszűrést végeztünk 6 éves gyermekek körében Jász-Nagykun-Szolnok megyében. A védőnők a teljes 6 éves korú populáció 77%-át, 2676 gyermeket szűrték meg a Biocard gyorseszteszttel. A pozitív személyeknél közvetlenül a pozitív gyorseszteszt eredményt követően minden egyéb szerológiai vizsgálat közbeiktatása nélkül megtörtént a vékonybélbiopszia, melynek találati aránya 100% volt. A védőnők laboratóriumi EMA és TG2-antitest ELISA meghatározásra is vettek kapilláris vért, melyből az IgA és IgG EMA antitesteket is meghatároztuk, szimultán, kettős immunfluoreszcens jelöléssel kombinált indirekt immunfluoreszcens vizsgálattal. Az összesített eredmények alapján a védőnők az antitest-pozitív gyermekek 78%-át ismerték fel a helyszínen. A védőnők akkor végeztek életükben először antitestkimutatást. A laboratóriumban végzett Biocard tesztelésnél a védőnők által fel nem ismert betegek többségének vérmintája igen halvány teszt-vonalat mutatott. Ezeknél a plazmából mérhető EMA és anti-TG2 antitestek is alacsony vagy határérték titerben voltak jelen és az alacsony antitest szintű gyermekek felénél nem volt súlyos boholyatrófia. Valószínűleg ezek helyes felismeréséhez több gyakorlás kell. A laboratórium és a védők által végzett szűrés összesítéseképpen a biopsziával alátámasztott coeliakia prevalenciája a 6 éves magyar gyermekek között 1.4%, az antitest pozitivitás előfordulása 1.79% volt. Az adatok a magas részvételi arány miatt reprezentatívnak tekintendők a magyar népességre nézve. A vizsgálat alapján az is megállapítható, hogy a gyorseszteszt megbízható értékeléséhez valamennyi gyakorlat is szükséges. Az nagyobb méretekben végezhető vizsgálatok automatizálására a gyorseszteszt elvén alapuló ELISA eljárást is kifejlesztettünk.

5.3. A coeliakia antitestek in vivo kötődésének és hatásainak vizsgálata (8,11,13,16,20,25,33,42,58)

A TG2 autoantitestek pathomechanikai szerepének vizsgálatára azt tanulmányoztuk, hogy az autoantitestek vajon magukban a betegekben is hozzákötődnek-e a TG2 fehérjéhez. Kettős jelölésű immunfluorescens vizsgálattal és eluciós kísérletekkel igazoltuk, hogy az IgA lerakódás a TG2 vékonybélben való előfordulásának megfelelően subepiteliálisan és a kripták körül történik és hogy ez az autoantitest lerakódás mind a boholyatrófia kialakulását, mind a TG2 autoantitestek vérkeringésben történő megjelenését megelőzi (13). Kimutattuk azt is, hogy coeliakiás betegeknek az a hányada (15%), akiknél a vérben keringő anti-TG2 antitesteket nem lehet kimutatni, szintén pozitív a vékonybélben helyileg lerakódott antitestekre, tehát ők is termelnek a coeliakia aktív szakában anti-TG2 antitesteket. Ez megkülönböztette őket az autoimmun illetve más eredetű boholykárosodásoktól, ahol a vékonybélben nem voltak a TG2 felszínén antitestek (20). Ezért ez az eljárás diagnosztikusan is hasznosítható.

Egy másik vizsgálati sorozatban coeliakiás betegek nyelőcső, gyomor illetve vastagbélbiopsiás mintáit vizsgáltuk. A mintákat az adott lokalizációnak megfelelő kóros tünetek (gastro-oesophagealis reflux, oesophagitis, gastritis illetve colitis) miatt vették. A betegség aktív időszakában a TG2 elleni antitestek lerakódása az emésztőrendszerben ezekben a lokalizációkban is jelen volt. Lehetőségünk volt továbbá a coeliakia aktív szakában más indikáció miatt eltávolított máj-, izom-, nyirokcsomó és vesebiopsiás minták valamint eltávolított appendix tanulmányozására, ahol szintén ki lehetett mutatni az *in vivo* lerakódott IgA (IgA hiányos betegek esetében IgG) autoantitestek jelenlétét a TG2 felszínén. Eluciós és Western blot kísérletek megerősítették, hogy az autoantitestek specifikusan a TG2 enzimhez kötődtek. A TG2-specifikus antitestek továbbá képesek voltak GST-vel jelzett külső TG2-t is megkötni. Anti-TG2 antitesteket aktív coeliakiában szenvedő nők placentájában is találtunk, ahol a placentáris bolyhok csökkent felszínét is igazoltuk. Ezekben az extraintestinalis szervekben a fénymikroszkópos vizsgálattal csak minimális, nem specifikus eltérések voltak. Jelentős ezért az a felismerés, hogy nemspecifikus szervi eltérések esetén érdemes a tünetek mögött coeliakiát is keresni, mely megfelelő immunhisztokémiai vizsgálattal kimutatható lehet.

Egy másik tanulmányban emésztőszervi tünetek miatt kivizsgált olyan betegek vékonybél mintáit vizsgáltuk, akiknél csak emelkedett intraepitheliális lymphocita szám volt, boholyatrófia azonban nem. A betegek random besorolás szerint glutenmentes diétát kezdtek vagy emelték addigi glutenfogyasztásukat, majd 6 hónap múlva újabb kontrollbiopsia történt (11). A vizsgált 41 beteg közül 11-nél lehetett olyan klinikai vagy szövettani változást bizonyítani, amelynek alapján őket gluten-érzékenynek lehet tartani. Ezek közül 10 beteg vékonybélbiopsiás mintájában – a klinikai adatok ismerete nélkül - már a tanulmány kezdetén ki tudtuk mutatni a TG2 autoantitestek lerakódását a vékonybélben,

amikor a bél boholszerkezete még megtartott volt. Az autoantitestek mennyisége az intervenció után párhuzamosan változott a glutenbevitel változásával. A klinikailag glutendependens állapot ellenére a betegek nagy részénél klasszikus boholyatrófia nem alakult ki. Ez az eredmény arra utal, hogy a TG2-re lerakódott autoantitestek megbízhatóbb indikátorai a gluten-enteropathiának, mint a klasszikus szövettani kritériumok.

Az in vivo kötődött TG2 autoantitestek diagnosztikus és pathomechanikai jelentőségét tovább vizsgáltuk egy gluten-ataxiában szenvedő betegcsoportban (16). A gluten-ataxia megjelenhet a coeliakia szövődményeként, de a betegek jelentős részénél nem lehet a vékonybélben boholyatrófiát kimutatni és a vérben sem pozitívak a coeliakia autoantitestek. Ilyen betegek vékonybélbiopsiás mintáit vakon értékelve 11 betegből 10-ben TG2-specifikus autoantitesteket mutattunk ki a bélben, míg 8 más okból ataxiában szenvedő beteg bélmintáiban ilyen antitestek nem voltak. Egy gluten ataxiában elhunyt beteg agyában, elsősorban a klinikailag érintett kisagyi, agytörzsi és gerinvelői kiserekben szintén TG2-ellenes IgA antitesteket találtunk. Ezen eredmények új adatokat szolgáltatnak a gluten ataxia pathomechanizmusát és diagnosztikus lehetőségeit illetően. Korábban úgy vélték, hogy a gliadin-ellenes ellenanyagok Purkinje sejtekkel való keresztreakciója okozza az agyi károsodást. Eredményeink azt igazolják, hogy a gluten-ataxia gluten-enteropathiával párosul és a coeliakia betegségspektrum része. Új megvilágításba helyezi a gluten-ataxia megértését az a felismerés, hogy az ataxia az ereket támadó immunreakcióval párhuzamosan alakul ki, tehát lehetséges, hogy primeren vaszkuláris okokból jön létre.

5.4. A coeliakia autoantitestek kötődési epitópjának azonosítása (31, 35, 60)

A transzamidáló aktív centrumban módosított (cystein 277 pontmutáns) TG2-t a coeliakia antitestek éppúgy felismerik, mint a természetes enzimet, így a coeliakiás epitóp nem az aktív centrumban van. A betegek IgA és IgG antitestjeinek kompetíciós vizsgálata és különböző módon termelt rekombináns TG2 fehérjékkel végzett összehasonlító vizsgálataink arra utalnak, hogy vannak kitüntetett epitópok, azok konformációsak és a betegség kezdetén humán-specifikusak.

Ezekből a kezdeti adatokból kiindulva irányított mutagenesis segítségével egy fő TG2 epitópot azonosítottunk, mely konformációs és 3 domén részvételével alakul ki. Az epitóp fő aminosavai a 19-es arginin, a 153-as és 154-es glutaminsav és a 659-es metionin. Az N-terminális rész vagy a C-terminális rész alternatív módon elegendő a coeliakia antitestek kötődéshez, míg a core domain területén levő aminosavak szerepe obligát. Betegsavóból származó és betegekből készített monoclonális antitestekkel végzett kompetíciós kísérletekkel kimutattuk, hogy a különböző betegek antitestjei ugyanahhoz a fő coeliakiás epitóphoz kötődnek, és hogy ennek dominanciája évtizedeken át tartó aktív betegség során is megmarad. Ez azt jelenti, hogy az anti-TG2 antitestek képződése szabályos, adott felszín

ellen irányul és nem véletlenszerűen a TG2 ellen. A kísérletek során adatokat találtunk arra, hogy az azonosított fő epitópon keresztül valósul meg az anti-TG2 antitestek biológiai hatása is, sejtes rendszerekben és egy materno-foetalis transzmissziós helyzetben. Vizsgálataink során egy olyan nem humán monoklonális anti-TG2-t is találtunk, melynek kötőhelye részleges átfedést mutat a coeliakiás antitestek kötődésével. Ez az antitest feleslegben alkalmazva képes megakadályozni a beteg antitestek káros biológiai hatását, sőt a szövetekről is képes őket leszorítani. Eredményeink alapján lehetségesnek látszik, hogy hasonló tulajdonságú antitestekkel vagy más, az epiópot elfedő molekulákkal terápiás hatás érhető el. Az ilyen anyagok előállítására a Debreceni Egyetem szabadalmi beadványt nyújtott be.

Egy további tanulmányban szerkezeti homológiát találtunk deamidált gliadin peptidek és a TG2 háromdimenziós szerkezete között. Monoklonális anti-TG2 ellenanyagok a peptideket is felismerték. Humán TG2 gátolta a monoklonális antitestek kötődését a deamidált peptidekhez és a peptidek csökkentették a monoklonális antitestek kötődését a TG2 enzimhez. A coeliakiás betegekből többféle epitópspecifitást találtunk, melyeket nem lehetett a fenti módszerekkel teljesen gátolni, de a coeliakiás betegek véréből a deamidált peptidekkel olyan antitest populációt sikerült tisztítani, mely keresztreakált humán rekombináns TG2-vel is. Ezek az adatok molekuláris mimikri jelenségét mutatják.

5.5. A coeliakia autoantitestek biológiai hatásának vizsgálata (15, 34, 36, 38,48,54,61)

A TG2 autoantitestek biológiai szerepének kutatása céljából vizsgáltuk az antitestek hatását a TG2 enzimatisz működéseire. A kereskedelembe kapható monoklonális egér antitestek gátolják a TG2 transzamidáló működését. A coeliakiás betegekből tisztított antitestekkel kapcsolatban korábban más munkacsoportok ellentmondásos, többnyire bizonyos fokú gátlásra utaló adatokat közöltek. Az általunk vizsgált coeliakiás betegek autoantitestjei viszont egyes reakciótipusok esetén kifejezetten gyorsították az enzimreakciót, valószínűleg az enzim stabilitásának fokozásával. A transzamidálást fokozó hatás legkifejezettebb a súlyos klinikai malabszorpcióval jelentkező gyermekek és felnőttek esetében volt. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az aktiváló hatású antitestek klinikailag kedvezőtlenek. A biokémiai eredményeket a szövetmetszeteken végzett TG2 aktivitási vizsgálatok is megerősítették, melyekkel az in vivo szövetekbe lerakódott antitestek mellett is erőteljes transzamidáló működést lehetett igazolni.

Az antitestek gátolták a TG2 GTP-áz működését. A GTP-áz aktivitás a TG2 fő intracelluláris funkciója, ezért további bizonyításra szorul, hogy ennek a hatásnak coeliakiában mekkora relevanciája van. Mivel adatok vannak arra, hogy mind az IgA, mind az IgG antitestek egyes

autoimmun kórképekben bejutnak a sejtekbe, az antitestek ilyen irányú hatásának szintén lehetnek klinikai következményei.

Caco2 hámsejtekkel végzett kísérletekben (54) a coeliakia antitestek fokozták a peptidek áthaladását a hámrétegen. Endotél sejtekkel végzett angiogenesis vizsgálatok a coeliakiás antitestek hatására a képzett tubulusok száma, mérete és a látható elágazások hossza csökken. A hatás inhibitor alkalmazása alapján a TG2 enzimátikus gátlásával függeszthető fel és a rendszerben a coeliakiás antitestek jelenlétében konstans aktiválás észlelhető. Kimutattuk továbbá, hogy a fokozott TG2 enzimműködés mellett a RhoA anyagcsereút is aktiválódik, melyről ismert, hogy a sejtekben proliferációs és motilitási zavarokat okozhat.

Aktív coeliakiában szenvedő anyák újszülöttjeinél az anyai IgG anti-TG2 antitestek passzív átvitelét és a köldökzsinór szöveteiben való lerakódásukat észleltük. Ezeknek a gyermekeknek a születési súlya alacsonyabb volt a normál populációnál és egyeseknél átmeneti klinikai tünetek (hasmenés, májlézió) is előfordultak. Etikai okok miatt azonban invazív vizsgálatokat a bélkárosodás bizonyítására nem lehetett végezni.

5.6. A coeliakiára hajlamosító genetikai eltérések kutatása

5.6.1. HLA-DQ markerek (7,12,17,32,43,59)

A coeliakia hagyományosan a vékonybél szövettani vizsgálatával diagnosztizálható, a szövettani eltérések (gyulladás, a bélbolyhok változó fokú atrophája) azonban nem specifikusak és főként a coeliakiára jellemző anti-TG2 antitestek hiányában gyakori a diagnosztikus bizonytalanság. A tanulmányban vizsgált 70 egymást követően jelentkező beteg esetében a HLA-DQ2 vagy DQ8 hiánya helyesen jelezte egy korábbi coeliakia diagnózis megalapozatlanságát és jól korrelált a prospektíven végrehajtott diagnosztikus gluten terhelés klinikai kimenetelével. Megállapítottuk azt is, hogy a coeliakia autoantitestek (anti-TG2 és EMA, endomysium antitest) csak a HLA-DQ2 vagy DQ8 adottságú személyekben termelődtek és ezek a glutenmentes diéta felfüggesztése, újabb glutenbevitel hatására visszaestek. Ennek megfelelően a HLA-DQ tipizálást a klinikai gyakorlatban nagyobb hangsúllyal és gyakrabban kellene használni, különösen a bizonytalan esetekben és a már diétával előkezelt betegeknél.

További vizsgálataink során a HLA DQ2 és DQ8 megoszlásában összefüggést találtunk a klinikai manifesztációval 100 hosszan követett coeliakiás, 80 diabetesben szenvedő és 47 coeliakiás+diabeteses gyermek HLA tipizálásával (17). Az 1-es típusú diabetes mellitus és coeliakia genetikai háttere HLA és non-HLA gének tekintetében számos átfedést mutat, viszont DQ2 és DQ8 együttes jelenlétében coeliakiás betegeknél gyakrabban manifesztálódik

diabetes. A HLA DQ2 hordozás diabetes esetén viszont predispozíciót jelent coeliakiára is, míg a csak DQ8 hordozás csak diabetesre hajlamosít. A DQ8 önmagában nem emeli a coeliakia kialakulásának kockázatát a normál népességhez képest sem. A tanulmányban a toll-like receptor (TLR) 4 funkcionális polymorphismusa (A+896G), mely a korai immunválasz fokozott beindításában játszhat szerepet, nem mutatott összefüggést a coeliakia predispozícióval. Vizsgáltuk a CD14 molekula C-260T minor alléljének jelenlétét is, mely homozygota TT formában fokozott CD14 expresszióra és potenciálisan kifejezettebb immunreakcióra és gyulladásra hajlamosít. A diabeteses betegeknek a T allél és a TT genotípus a normál népességhez képest ritkábban fordult elő, míg coeliakia esetén nem tért el a normál megoszlástól. Diabeteses betegeknek a TT előfordulása azonban hajlamosított a coeliakia együttes előfordulására.

Tekintettel arra, hogy a HLA-DQ allélek részletes tipizálása a jelenleg általánosan használatos szekvencia-specifikus primerekkel alapuló PCR eljárással viszonylag költséges, nehéz a HLA-DQ meghatározást a klinikai gyakorlatban olyan méretekben végezni, mely a diagnosztikában vagy a populáció szűrésében indokolt lenne. Elvileg a népességben csak azokat kellene coeliakiára szűrni, akik DQ2 vagy DQ haplotípusúak. Szerológiai tipizálás az MHC II típusú alléleknek nem megbízható és ezért nem ajánlott, valamint az egyes HLA-DQ2 altípusok elkülönítésére, melyek közül a HLA DQB1*0201 (DQ2.5 haplotípus) és *0202 (DQ2.2 haplotípus) önmagában különböző kockázati tényezőt jelent, mindenképp genetikai meghatározás indokolt. Ezért azt vizsgáltuk (43), hogy a coeliakia szempontjából fontos allélek meghatározhatók-e a bennük található jellegzetes single nucleotid polimorfizmusok (SNP) tipizálása alapján. Erre elvileg az ad lehetőséget, hogy a DR1, DQA1 és DQB1 helyek linkage disequilibrium miatt határozott haplotípus blokkokban öröklődnek. A vizsgálatokban összesen 1284 ismert, szövettani vizsgálattal bizonyított és 1587 nem coeliakiás (normál populáció vagy családtag) személy vett részt. A vizsgált SNP-k közül egy a DQ2.5 haplotípust (rs2187668), három a DQ2.2 haplotípust (rs2395182, rs4713586, rs7775228) egy-egy pedig a DQ7 (rs4639334) illetve DQ8 () alléleket mutatja ki. A DQ2.5 jelenléte elegendő a gliadin megfelelő prezentációjához, de a DQ2.2. önmagában nem hoz létre gliadint kötő funkcionális heterodimert, csak akkor, ha a másik allél DQ7, melynek A lánc (*0301) kapcsolódik a DQ2.2 B láncával (*0202), ezért van szükség a DQ7 kimutatására is. Technikailag mind a 6 SNP közül 5 jól működött a Hardy-Weinberg szabálynak megfelelő normál eloszlással, az egyik DQ2.2 SNP tipizálása nehézkes volt. A magyar coeliakiás betegek 97.2%-a hordozott DQ2 heterodimert (87.5% DQ2.5, 9.7% DQ2.2/DQ7) és 2.3 % DQ8-t. A finn betegek között a DQ2.5 aránya hasonló, a DQ2.2/DQ7 alacsonyabb, a DQ8 magasabb volt, míg az olasz betegknél a DQ2.5 volt alacsonyabb, de a DQ2.2/DQ7 magasabb, míg a DQ8 hasonló volt a finnekhez. Ez megfelel annak a klinikai körülménynek, hogy a magyar népességben relatíve alacsonyabb a diabetes előfordulása mint Finnországban. A magyaroknál ritkán olyan DQ2.2

allél fordult elő, ami inkonzulív eredményhez (látszólag 3 allél DQ2.2, DQ7 és DQ8) vezetett, ezeknél minden esetben az A és B lánc nem szokványos társulásával, azaz csökkent disequilibriummal találkoztunk. Ezeknél a betegeknek látszólag csak DQ2.2 jelenléte ellenére más vizsgálatok igazolták a teljes heterodimer jelenlétét. Ilyen esetekben tehát továbbra is a hagyományos alléltipizálást kell végezni. Az SNP meghatározáson alapuló HLA-DQ tesztelésnek azonban sok előnye van. Nemcsak olcsóbb, hanem alkalmas high throughput rendszereken történő alkalmazásra is, így nagylétszámú szűrővizsgálatok elvégzésére is.

A vizsgálat megerősítette azon korábbi eredményt is, hogy a DQ2.5 homozigotáság 5.5-szörösre emeli a coeliakia kockázatát a DQ2.5 heterozygotasághoz képest, míg a DQ2.2 jelenléte a DQ2.5 mellett 3.1-szoros rizikót jelent.

5.6.2. Non-HLA gének kutatása (26, 28, 30, 37, 39, 40, 41,44, 45, 47, 59)

Tekintettel arra, hogy a HLA-DQ2 vagy DQ8 jelenléte a normál európai és magyar népesség 25-30%-ában előfordul, jelenlétük szükséges feltétel, de nem elegendő a coeliakia manifesztálódásához és a HLA markerek csak részben, mintegy 40%-ban magyarázzák meg a genetikai fogékonyságot. Ezért a valódi coeliakia gének kutatása sokkal jelentősebb a betegség pontos okának felderítésében. Tekintettel arra, hogy az öröklésmenet nem tisztázott és nagy valószínűséggel multi- vagy legalábbis oligogén és változó penetranciájú, a non-HLA hajlamosító tényezők megközelítésére a komplex genetikai betegségeknél alkalmazott stratégiát követtük. Az első lépésben érintett testvéreknél végzett SNP analízissel igyekeztünk azokat a kromoszóma szakaszokat megtalálni, melyek közösek. A vizsgálati eredményeket később nagy, sok érintett családdal rendelkező családokban validáltuk. A legnagyobb ilyen magyar család 10 érintett beteggel rendelkezett. Ezt követően az érintettnek látrszó kromoszóma szakaszokat sűrűbb SNP analízissel szűkítettünk azt vizsgálva, hogy mely gén(ek)ben van a közös tulajdonság, és ezeket transzmissziós disequilibrium analízisnek (TDT) vetettük alá. Ennek során a betegeket és szüleiket (triotat) vizsgálva megállapítottuk, hogy van-e olyan allél, mely preferenciálisan kerül át a betegbe, azaz van-e valamilyen haplotípussal kapcsolatban betegségi asszociáció, és ha volt, akkor mi lehet ennek a funkcionális mechanizmusa. Végül az azonosított allélek megoszlását vizsgáltuk coeliakiás betegek és egészséges populációs kontrollok között. Az érdekes génszakaszok keresésére automatikus SNP teszteléssel az összes kromoszómán random fellelhető SNP-k meghatározását is lehet alkalmazni (genome-wide screening, GWA).

A kutatási idő alatt 1540 egységes gyakorlat szerint diagnosztizált coeliakiás betegről gyűjtöttünk mintát, köztük 218 (részben többes) érintett testvérpártól és 232 triótól, így ez a beteganyag jelenleg Európa egyik legnagyobb ilyen típusú mintakészlete. A normál magyar népességet statisztikailag reprezentáló populációs kontrollokat (1067) Dr Ádány Róza (Debreceni Egyetem, Népegészségügyi Iskola) bocsátott rendelkezésünkre a vizsgálatokhoz. A vizsgálatokban a Tamperei Egyetem által gyűjtött finn minták illetve esetenként más

mintakollekciók is szerepeltek. Mivel az esetek egy részében a kapcsolódás (linkage) és az asszociáció gyenge volt, jelentős volt a minél nagyobb esetszám biztosítása a megfelelő vizsgálati power eléréséhez, melyet statisztikailag kalkuláltunk.

A magyar testvérpárokban jelentős egyezést találtunk (LOD score:3.76) a 19 kromoszóma egy korábban már azonosított szakaszán a myosin IXb (MYOIX) gén mellett (30) és annak egyik intronális szakaszán. A gluten-szenzitivitás bőrtünetekkel járó formájában (dermatitis herpetiformisban) nemcsak linkage-t, hanem asszociációt is kimutattunk a minor alléllal, továbbá az AGAA rizikó-haplotípus ezeknél a betegeknél a TDT elemzés szerint preferenciálisan öröklődött. A IX-es myosin egy ritka motoros protein, melynek a transzcelluláris transzportban és a sejtmotilitásban lehet szerepe, valamint feltételezik szerepét a vékonybél barrier funkciójában is. Mivel ez a polimorfizmus nem változtatja meg a fehérjét kódoló szekvenciát, azt vizsgáltuk, hogy lehet-e szerepe az expresszió szabályozásában, de az eredmények ezt nem támogatták. A SNP felbontás finomítása utáni eredmények megerősítik a 19p13 régió szerepét, de inkább arra utalnak, hogy ezért esetleg a myosin IXb közelében lévő másik gén is felelős lehet. Az értékelést nehezíti, hogy az azonos haploblokkban lévő többi gén öröklődése eleve hasonló.

Új asszociációt írtunk le a haptoglobin polimorfizmussal (26,28). 712 biopsiával igazolt coeliakiás beteg és 384 egészséges kontroll vizsgálatával megállapítottuk, hogy a 2-1 geno/fenotípus esetén magasabb a kockázat coeliakia előfordulására (odds ratio 1.54, $p=0.0006$). A haptoglobin polimorfizmus a betegség klinikai megjelenését is befolyásolja, összefüggést mutattunk ki a prezentációs tünetekkel. A haptoglobin elsődleges funkciója a hemoglobin eltakarítása a lebomló vörösvérsejtekből, de emellett jelentős anti-inflammatórikus és immunmoduláló hatással is rendelkezik. A 2-2 gyakoribb egyes más betegségekben, köztük diabetes mellitusban. Coeliakiában a 2-2 genotípus ritkább, mint a normál népességben, de azoknál a coeliakiásoknál, akik 2-2 típusúak, a lefolyás súlyosabb, gyakrabban fordul elő súlyos malabsorptio. A 2-1 heterozygotaság viszont jelentős asszociációt mutat a coeliakia megjelenésével, mely az enyhe tünetekkel és silent formában megjelenő coeliakiában is jellemző. Érdekes, hogy miért jelenthet egy heterozygotaság más kockázatot, mint a két komponensre vonatkozó homozygotaság. A haptoglobin 2 alegység kombinációjából jön létre. A béta lánc azonos, a polimorfizmust az alfa lánc részleges duplikációja okozza. Ennek következtében az alfa2 két kötőhellyel rendelkezik a béta lánc számára. Az 1-1 genotípus esetén létrejövő alfa1beta molekulák kis dimereket képeznek. Mivel az alfa2 két béta láncsal képes kapcsolódni, a 2-2 genotípusú személyeknél különböző méretű gyűrűs komplexek alakulnak ki. Mivel a 2-1 heterozygotáknál alfa1 és alfa2 is termelődik, a komplexek bonyolult elágazódó, de könnyen lineáris szerkezetet vesznek fel. Ezeknek a molekuláknak a biológiai tulajdonságai eltérők. A haptoglobin elősegíti a T-helper

1/2 túlsúlyt, valamint a CD163n keresztül IL-10 képződést indukál, mely gyulladáscsökkentő hatású. Ez a hatás kisebb a 2-2 fenotípus esetén, mely magyarázhatja az ebben csoportban észlelt súlyosabb klinikai coeliakia manifesztációt. A cikk megjelenését követően egy független USA kutatócsoport kimutatta, hogy a vékonybél permeabilitásában kulcsszerepet játszó és coeliakia kezdetén jelentősen fokozódó expressziójú zonulin azonos a pre-haptoglobin 2 molekulával és így a genetikai eredmény coeliakiára vonatkozó relevanciáját alátámasztotta (Tripathi et al, PNAS 2009;106:16799-804.)

Jelentős asszociáció és linkage igazolódott (39) a magyar betegeknél a 2q12 régióban lévő interleukin 18 receptor asszociált protein (IL18RAP) tekintetében is (odds ratio 1.48, $p=0.0012$). Funkcionális vizsgálatok és western blot analízis fehérvérsejtekben a rs917997 helyen AA and AG rizikó alléleket hordozóknál egy rövidebb 37 kDa izoforma fokozott, a teljes hosszú 70kDa körüli protein csökkent expresszióját mutatták. Az IL18RAP a vékonybélben immunhisztokémiailag is kimutatható volt, de az egyes genotípusokkal összefüggő változást nem mutatott. Az eredményeket tovább analizálva és összehasonlítva az egyéb országokban talált eredményekkel, az asszociáció a magyaroknál jelentősebb volt, mint más országok coeliakiás betegei között (kivéve a hollandokat). Az olasz és finn betegcsoportokban önmagukban nem is lehetett az asszociációt igazolni, ami arra hívja fel a figyelmet, egyes országokban a genetikai hajlamosító tényezők eltérést mutathatnak. Másrészt az egyes eltérések kimutathatóságában a mintaszám is szerepet játszhat. Ez a vizsgálat 1638 coeliakiás és 1385 kontroll beteggel történt. Egy későbbi genome-wide screening során (47) ahol 9451 coeliakiás beteget és 16434 kontrollt vizsgáltunk, az IL18RAP locus nagyon szignifikáns asszociációt mutatott (2.98×10^{-28}). Ez megerősíti az IL18RAP jelentőségét, ez feltehetőleg az immunválasz modulálása révén valósul meg. Ebben a vizsgálatban is magas volt a magyar alcsoportban az elemszámmal arányos asszociáció.

A magyar testvérpárok analízise alapján a 19p13 szakasz után a 5q31-33 adta a legmagasabb linkage értékeket (37), ezért ezt a szakaszt részletesebben is megvizsgáltuk 374 magyar és 277 finn családban. Az 5q szakaszokkal korábban olasz, skandináv és ír betegeknél is találtak összefüggést. Sűrűbb eloszlású, 56 microsatellite és SNP marker alkalmazásával az asszociáció továbbra is jelentős maradt és észlelhető volt nemcsak a testvérekben, hanem multiplexen érintett családokban is, de más génekkel kapcsolódott a fiinnekben (FGF1, STK32A, SLC36A2) mint a magyarokban (IL3 és TGFBI). Az 5q 31-33 régió számos immunreakcióval kapcsolatos gént tartalmaz és más tanulmányokban asszociációt mutatott más olyan gyulladásos és immunológiai betegségekkel, mint a Crohn betegség, psoriasis, 1-es típusú diabetes mellitus és asthma, de egyikben sem sikerült ezt egyedi génekhez kötni.

Erre arra hívja fel a figyelmet, hogy a gyulladásos reakcióra való fokozott hajlam mindegyik szempontjából fontos lehet, de az adottság betegenként eltérhet.

További kiegészítő vizsgálatokban (40,44, 45,52) is nagyszámú magyar beteget és érintett családot vizsgáltunk (>400 család), de a 2q33 régióban, ahol további antigénprezentációban immunológiai fontos gének (ICOS, CTLA) voltak a finn populációban, a magyaroknál nem volt semmilyen asszociáció. A 6q21-22 régióban is sokkal szerényebb eltérések mutatkoztak, mint a finneké vagy a hollandoké, akiknél számos új gén-asszociációt mutattunk ki (HACE1, PREP, GJA1, CX43, RWDD1). Az IL23 ugyan összefüggött a coeliakia kialakulásával, de nem a magyar népességben, az Fc γ receptorral pedig egyik vizsgált országban (Svédország, Finnország, Magyarország, Olaszország) sem volt kapcsolat. Vizsgáltuk még a calreticulin gént, de nem volt eltérés.

Mivel feltehető volt, hogy egyes finomabb hajlamosító gének identifikálására a nagy esetszámok ellenére nincs megfelelő statisztikai power az egyes nemzeti mintakollekciókban, újabb coeliakia gének felismeréséhez nemzetközi kollaborációban még egy, a sorrendben harmadik coeliakiára irányuló nagyvolumenű genome-wide screeningre (GWA) is sor került (47); ebben először vettek részt magyar betegek is. A vizsgálatban összesen 25885 személy mintája (9451 igazolt coeliakiás beteg, köztük 965 magyar és 16464 kontroll, köztük 1067 magyar) szerepelt. Illumina 670-QuadCustom_v1 és Golden Gate nagykapacitású automatizált tesztrendszerrel előbb 292.387, majd újabb 231.362 random SNP markert vizsgáltak az autoszomális kromoszómákon és az X kromoszómán, a betegek mintegy felében. A legmagasabb találati arányt jelző 113 megfelelően működő SNP-t tesztelték tovább a többi betegen mint verifikációs csoportokban. A magyarokat a verifikációs csoportban használták fel. A 3. GWA eredménye megerősítette a HLA-DQ szerepét és 13 korábban már leírt locus/géncsoport jelentőségét (RGS1, REL/AHS, IL18RAP, ITGA4, CTLA/ICOS, CCR3/CCR1,2,5,9, IL12A, LPP, IL2/IL21, TNFAIP3, TAGAP, SH2B3, PTPN2). Mindezek mellett 13 új, jelentősen szignifikáns génasszociációt találtunk az alábbi génekben: TNFRSF14/MME1, RUNX3, PLEK, CCR4, CD80, KTELC1, BACH2/MAP3K7, PTPRK, THEMIS, ZMIZ1, ICOSLG, ETS1, CIITA/SOCS1/CLEC16A. Ezen közül a magyaroknál a BACH2 locus adta a legmagasabb asszociációs értéket. Az újonnan felismert hajlamosító gének jelentős része az immunrendszer működését illetve a T lymphocyták érési folyamatait befolyásolja. Ezek közül kiemelkedően fontosnak látszik a coeliakia szempontjából a THEMIS és a RUNX. Más polymorphismusok a vírus DNS-ek felismerését végző toll-like receptorok működését (TLR7 és TLR8), a T- és B lymphocyták kooperációját (TNFRSF14, CD80, ICOSLG) illetve citokineket (CCR4) érintik.

5.6.3. A coeliakia szuszceptibilitás modellje

Az eredmények alapján a coeliakia genetikai háttere a következőkben összegezhető: A genetikai háttér nagy valószínűséggel poligén. A populációban jelentős számú variáció fordul elő az immunrendszer működését kódoló és a bélrendszert permeabilitását szabályozó génekben. Ezek hajlamosító alléljeinek együttes jelenléte esetén nagyobb az esély arra, hogy a gliadin behatolása (MYOIXb) illetve feldolgozása (THEMIS, RUNX) kóros, vagy a szokásosnál nagyobb immunreakcióval jár (IL2/IL21, IL18RAP, CCR, TNF és haptoglobin variációk). Amennyiben az ilyen egyedek HLA-DQ2-t vagy DQ8-t is hordoznak, lehetőség van a gliadin kóros felismerésére és az autoimmun reakció megindulására, melyben vírusok (TLR aktiválódás), vagy más környezeti tényezők is szerepet játszhatnak. A nagyszámú polymorphismus magyarázhatja a coeliakiát kísérő klinikai tünetek sokszínűségét, melyek az életveszélyes malabsorptiótól a tünetmentes állapotig terjedhetnek, és előfordulhat számos különböző egyéb szervrendszer érintettsége is. A genetikai markerek korrelációját a klinikai kimenetellel a 2007-ban indult coeliakia prevenció vizsgálatban születéstől követett 1344 európai (186 magyar) gyermekben is vizsgáltuk, ahol hasonló eredményt kaptunk. A közlés később várható a PREVENTCD EU projektben.

5.7. A coeliakia új diagnosztikus kritériumainak vizsgálata (50, 53,55, 57)

Mivel a genetikai vizsgálatok a coeliakiáért közvetlenül felelős gének helyett inkább populációs variációkat mutattak, vizsgáltuk, hogy a magas szérumszintű anti-TG2 antitest értékek milyen valószínűséggel jelzik a vékonybélben fennálló károsodást és hasznosíthatók-e mint egy diagnosztikus kritériumrendszer részei. 304 gluten-érzékeny és 131 kontroll beteg szérumszintű anti-IgA és IgG szintjét kvantitatíven elemezve azt találtuk, hogy a normál felső határát 10x meghaladó IgA és 5x meghaladó IgG anti-TG2 együttes jelenléte esetén 99%-ban megjelölhető a coeliakia fennállása. Ezek az eredmények a felnőtteknél tapasztalt hasonló eredményekkel összhangban vannak. Metaanalízissel értékeltük a különféle antitest kimutatási eljárásokat és az adódott, hogy még napjainkban is az EMA kimutatási reakció a legmegbízhatóbb (specifitás 98.2%). A magas anti-TG2 szintek jó prediktív értékűek, de alacsony anti-TG2 más betegségekben is előfordulhat. Az Európai Gyermekgastroenterológiai, Hepatológiai és Táplálkozástudományi Társaság (ESPGHAN) 2011 végén új diagnosztikus kritériumokat javasolt. A coeliakiát ezzel egyidejűleg a hagyományos enteropátia helyett úgy definiálta, hogy az a gluten hatására immunológiai fogékony egyéneknél autoimmun jelleggel létrejövő kórállapot, mely a gluten-dependens klinikai tünetek, anti-TG2 antitestek, jellemző HLA-DQ allélek és enteropátia kombinációja. Ez lehetővé teszi, hogy enyhébb eltérések esetén is kimondható legyen a coeliakia diagnózisa, ha a betegségre jellemző eltérésekből több más is jelen van. Ezt a megközelítést kihasználva egy pontrendszert fejlesztettünk ki (SAGE=Symptom-Antibody-Genetics-Endoscopy/histology score) az alapvető eltérések súlyozott pontozásával. A SAGE score 4 vagy afölötti értéke retrospektív és prospektív vizsgálatokban is jól egyezett a szövettani

eredményekre épített hagyományos coeliakia diagnózissal (specifititás 99.9% 3782 coeliakiás és 1062 nem coeliakiás beteg adatai alapján). Az új ESPGHAN javaslat magas anti-TG2 szinteknél, ha azok EMA vizsgálattal is megerősíthetők és jelen van a HLA-DQ2 vagy DQ8 és coeliakiára utaló klinikai tünetek is, engedélyezi a coeliakia diagnózisának véglegesítését vékonybél szövettani vizsgálat nélkül is. A magas antitest szintek megállapítására összehasonlítottuk a NEQAS minőségbiztosítási rendszerben klinikai laboratóriumokban keletkező adatokat. Bár a tesztek különbözősége miatt az eredmények heterogének voltak, a magas (>10xULN feletti eredmények) biztonságosan magas értéknek látszanak.

6. Új megállapítások

1. Munkatársaimmal igazoltuk, hogy a coeliakiában észlelhető endomysium, reticulin és jejunalis antitestek kizárólagos antigénje és közös antigénje a 2-es típusú transzglutamináz enzim.
2. Igazoltuk, hogy a gluten ataxia immunológiailag a coeliakia formakörbe tartozó betegség, közös autoantitest jellemzőik alapján.
3. Elsőként írtuk le, hogy a coeliakia emésztőrendszeren kívüli tünetei esetén az érintett szervekben gluten-dependens autoantitest lerakódás található, elsőként észleltünk coeliakia antitesteket a szívizomban.
4. Elsőként igazoltuk, hogy a coeliakia antitestek lerakódása megelőzi látens betegekben a boholykárosodás kialakulását.
5. Azonosítottuk a coeliakiás transzglutamináz-ellenes antitestek jellemző kötődési epitópját.
6. Kimutattuk, hogy a coeliakia antitestek szöveti kötődése és in vitro angiogenezist gátló hatása ezen fő epitóp közvetítésével valósul meg.
7. Kimutattuk, hogy a coeliakiában illetve egyéb betegségekben szenvedők transzglutamináz-ellenes antitestjei különböző epitópokhoz kötődnek.
8. Elsőként találtunk specifikus kompetitor antitestet, mely a coeliakiás antitestek szöveti kötődését és hatásait gátolja.
9. Elsőként ismertük fel a gliadin peptidek és a 2-es típusú transzglutamináz felszínének hasonlóságát és igazoltuk kísérletes antitest reakciókkal.
10. Elsőként alkalmaztam a beteg saját transzglutamináz antigénjét az antitestek diagnosztikus kimutatására.
11. A coeliakia antitestek kimutatására alkalmas gyorsesztest fejlesztettem ki, mely szabadalmaztatásra és kereskedelmi forgalmazásra került.
12. Munkatársaimmal elsőként végeztünk coeliakia szűrést IgA hiányos véradókban és 10%-os előfordulást találtunk.
13. Elsőként végeztünk coeliakia népegészsűrést helyszíni gyorsesztest alkalmazásával.

14. Elsőként végeztünk coeliakia népességszűrést Magyarországon és megállapítottuk, hogy 6 éves korban az előfordulás 1.4%.
15. Elsőként végeztünk coeliakia népességszűrést laikus értékelőkkel (védőnők).
16. Az antitest meghatározások technikai javításával hozzájárultunk az új európai, noninvazív coeliakia diagnózist lehetővé tevő irányelvek kialakításához.
17. Kimutattuk, hogy a coeliakiás antitestek kötődésekor a transzglutamináz aktivitás fokozódik.
18. Kimutattuk, hogy a sejtkultúrában a coeliakiás antitestek hatására a RhoA anyagcsere útvonal aktiválódik.
19. Elsőként írtunk le klinikai és immunológiai jelenségeket anyából az őjszülöttbe kerülő passzív antitest transzfer kapcsán.
20. Elsőként mutattuk ki a placentába lerakódott anyai antitesteket coeliakiában.
21. Új, coeliakiára hajlamosító genetikai eltéréseket írtunk le és új, a betegséggel összefüggő géneket ismertünk fel (haptoglobin, THEMIS, RUNX3, TNFRSF14, MMEL1, PLEK, CCR4, CD80, KTELCl, BACH2, MAP3K7, PTPRK, ZMIZ1, ETS1, CIITA, SOCS1, CLEC16A, ICOSLG).
22. Kifejlesztettük az első coeliakia diagnosztikus pontrendszert (SAGE).

7. Az eredmények gyakorlati hasznosítása

6.1. A transzglutamináz antitestek kimutatása és összehasonlítása

A coeliakia a hagyományos tankönyvekben enteropátiaként szerepel, a szövettani eltérések azonban nem specifikusak, olyan gyulladásos vagy infektív kórképekben, mint vírusfertőzések, nutritív allergia, autoimmun folyamatok is előfordulnak. A coeliakia megkülönböztető jegye egy szabályos, lényegében mindig társuló humorális immunválasz a TG2 fehérje ellen. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az endomysium, reticulín, jejunalis és transzglutamináz antitest elnevezések ugyanazt az egy gluten-dependens, biológiailag aktív antitestet jelölik, melyet különbözőképpen is kimutathatunk. Mindegyik kimutatásnak vannak előnyei: az EMA, ARA, JEA vizsgálati rendszerek a természetes TG2 enzim antigént tartalmaznak a szöveti környezetben, így humán szövet esetén nagyon specifikusak és tulajdonképpen olyan antigént ajánlanak fel, mint amilyen a *in vivo* találkozik. A tisztított rekombináns TG2 enzim viszont könnyebben kezelhető, egyszerűbb technikai feltételekkel is megvalósítható a mérés, és lehetőség van automatizálásra is. A problémát a mesterségesen termelt TG2 fehérjék térszerkezeti és stabilitási problémái okozhatják, mivel a specifikus és szenzitív kötődés csak megfelelő háromdimenziós konformációnál jön létre. Az antitestkötődési tulajdonságokat javítani tudtuk, ha nem közvetlenül, hanem egy másik fehérje vagy antitest segítségével, egy megfelelően orientált helyzetben, valamely természetes kötőhelyénél fogva rögzítettük a TG2 antigént a lemezre.

A TG2-alapú diagnosztikus ELISA eljárások továbbfejlesztése jelentős számú új beteg felismerését tette lehetővé, mivel a coeliakia szerodiagnosztikája a korábbiaknál nagyobb méretekben, szélesebb körben, kisebb laboratóriumokban is elérhetővé vált. A kit-ek sokfélesége az antitestek diagnosztikus kritériumként való alkalmazását megnehezíti, és ezért az ESPGHAN irányelvekben a genetikai vizsgálatoknak és az EMA alkalmazásának jelentős szerepe marad, sőt az alacsony anti-TG2 szintek esetén továbbra is szükséges a szövettani vizsgálat elvégzése is. A cél a szokványos anti-TG2 ELISA eljárások specificitásának fokozása és az antigén minőségének mérése lenne. Ennek jó eszköze lehet a coeliakiás TG2 epitópra specifikus MAb885, mely lehetőséget adna a különböző klinikai kit-ek standardizálására is. Másrészt az általunk alkalmazott gyors antitest kimutatás a beteg saját TG2 antigénjének használatával igyekszik az EMA előnyeit az anti-TG2 mérések egyszerűségével ötvözni. A beteg ujjbegy mintájából származó, friss, jó konformációjú természetes vörösvérsejt TG2 antigénnel az antitest folyadékfázisban reagál és a komplexet egy természetes szövetkörnyezethez hasonló kötőszöveti fehérjekomplex (gelatin) köti a teszt felszínéhez, mely az EMA eljárásra hasonlít. Az antitestet bárki láthatja, és ezt az információt azonnal felhasználhatja. Mivel magában a kit-ben nincsenek hőre vagy tárolási körülményekre érzékeny komponensek, a betegből származó TG2 antigénnel trópusi körülmények között vagy specializált laboratóriumoktól távol is fel lehet ismerni az antitesteket. A gyors teszt hasznosnak bizonyult a klinikai esetfelismerésben és a szűrővizsgálatok gyors kivitelezésében, mely a kiszűrt betegek további vizsgálatainak hatékonyságát fokozza. A coeliakia gyors teszt segítségével az eredmények nemcsak gyorsabban állnak a vizsgáló orvos rendelkezésére, hanem a szűrő jellegű első vizsgálat nem orvos egészségügyi személyzet vagy maga a beteg által otthon is elvégezhető. Az ujjbegyből végezhető teszt kisebb megterheléssel alkalmazható kisgyermekeknél, mint a hagyományos, vénából történő vérvétel a savóvizsgálatokra. A gyors teszttel végzett ellenőrzés, és a kóros eredmény alapján végzett intervenció és diétás tanácsadás javítja a diétás fegyelmet és betegek kezeltségi állapotát. Fontos hangsúlyozni, hogy a gyors teszt önmagában nem ad végleges diagnózist, tájékoztató jellegű a további klinikai döntésekhez.

Az IgA hiányos személyeknél az IgG TG2 antitestek hasonlóan viselkedtek, mint normál IgA szint esetén az IgA TG2 antitestek, és klinikai jelentőségük is azonos volt, ezért alkalmazásukkal a diagnosztikus folyamatnak sem kell különböznie. Az IgG anti-TG2 antitest mérése első vonalbeli neminvazív vizsgálatként alkalmazható, és negativitása esetén nem kell rutinszerűen vékonybélbiopsziát végezni IgA hiányos betegeknek sem. A deamidált peptidok elleni antitesteknél viszont normál szérumban IgA szint esetén is az IgG anti-DGP eredmények érzékenyebbek és specifikusabbak.

A szérumból történő antitestvizsgálatokat kiegészítik a vékonybélből vagy más szervekből végezhető antitestvizsgálatok, melyek közvetlenül a szövetekhez kötött antitesteket mutatják ki. Főként akkor adhatnak további információt, ha a szérum antitestek negatívak, de van boholyatrófia a vékonybélben, vagy a beteg szeropozitív, de a vékonybél szerkezetben nincs boholykárosodás. A vékonybél kívüli szervek érintettségének igazolására és ismeretlen eredetű szervi léziók kivizsgálásában is hasznosnak bizonyult ez az eljárás.

6.2. A transzglutamináz coeliakia epitópja

Molekuláris modellezéssel és helyspecifikus mutagenesis segítségével azonosítottunk egy coeliakia-specifikus kötőhelyet, mely konformációs és 3 domén részvételével alakul ki. Kompetíciós kísérletekkel kimutattuk, hogy a különböző betegek antitestjei ugyanahhoz a fő coeliakiás epitóphoz kötődnek, és hogy ennek dominanciája évtizedeken át tartó aktív betegség során is megmarad. Ez azt jelenti, hogy az anti-TG2 antitestek képződése szabályos, adott felszín ellen irányul. Kísérleteinkkel továbbá igazolni tudtuk, hogy a korai látens fázisban lévő betegek antitestjeinek epitópja is ugyanaz, viszont más autoimmun betegségekben termelődő anti-TG2 antitesteknél ez a jellegzetes epitópkötődési mintázat nincs meg. Ezeknek az eredményeknek diagnosztikus jelentősége van. Vad TG2 fehérjével és a releváns mutánsokkal végzett ELISA alapján ugyanis elkülöníthetők a valódi coeliakiával kapcsolatos antitestreakciók az egyéb, nem specifikus antitestektől. Főként felnőtteknél és májbetegségek esetén gyakoriak a nem coeliakia eredetű anti-TG2 antitestek, melyek diagnosztikus nehézséget okozhatnak. Ezeknél a betegeknél nincs társuló boholyatrófia és általában az EMA vizsgálati eredmény sem pozitív. Az jellegzetes epitópspecifitás kimutatásának az a konzekvenciája, hogy a jellegzetes mintázat esetén más autoimmun betegségek jelenléte ellenére is további kivizsgálás, szövettani vizsgálat indokolt.

6.3. A coeliakiás antitestek keletkezése és biológiai hatásai

A monoklonális nem coeliakia eredetű anti-TG2 antitestek és a deamidált gliadin peptidok közötti, többféle kompetíciós vizsgálatral és coeliakiás tisztított páciens antitestekkel is alátámasztható felszíni hasonlóság elgondolkasztató, a betegség patomechanizmusában molekuláris mimikri szerepét jelzi. Ha a B-sejt specifikusa megfelel a coeliakia epitópnak, akkor az annak mimotópjaként ható gliadin peptid a B-sejt felszíni immunglobulinjába közvetlenül is belekötődhet és nem csak a haptén (TG2) részen keresztül kerül felvételre. Emiatt a bekebelezési és prezentálási folyamat effektivitása megnőhet és az ilyen B-sejt preferenciális T-helper szignálokat kaphat a gliadinra specifikus T-sejtektől.

A coeliakiás vékonybélben az anti-TG2 antitestek az érstruktúrák extracelluláris felszínén lévő TG2 fehérjéhez kötődnek, így mind a bélbolyhok vérellátását, mind boholyvázat

merevítő működését zavarhatják. Ennek további vizsgálata adatokat szolgáltat a boholykárosodás kialakulásának pontos mechanizmusáról. Vizsgálataink szerint az antitestek hatására a TG2 aktivitás és a Rho A aktivitás és fokozódik. A genetikai vizsgálatok során feltárt polimorfizmusok is segíthetnek azokat a fehérjéket megtalálni, melyek az antitestek hatására a normáltól eltérően viselkedhetnek. Az integrin alfa-4 (ITGA4) és lipoma-preferred partner (Lpp) protein a sejtek adhéziójában és motilitásában játszanak szerepet, a myosin IX pedig egy motoros fehérje mely a sejten belül egyes molekulák és vezikulák transzportjában vesz részt, melyet többet között a Rho fehérjék is befolyásolnak. A sejtes kísérletekben a motilitási és adhéziós funkcióknak a változását észleltük a coeliakiás antitestek jelenlétében, így ezeknek az anyagcserefolyamatoknak a további vizsgálatát tervezzük a családi rizikóval született gyermekek köldökzsinórjából preparált sejteken. Az anyai coeliakiás antitestek passzív átjutásakor az újszülöttekben észlelt tünetek és jelenségek felhívják a figyelmet arra, hogy ezekre a gyermekekre a szülés körüli időben több gondot kell fordítani.

6.4. Az antitestvizsgálatok szerepe a coeliakia új diagnosztikus kritériumainak alkalmazásában

Az antitest vizsgálati eredmények felhasználhatók a coeliakia diagnosztika egyszerűsítésére, mivel a magas IgA és IgG anti-TG2 szintek esetén igen nagy annak az esélye, hogy a vékonybélben boholyatrófia már kialakult. A boholyszerkezet egy darabig megtartott lehet, ha a szérum antitest szintek nem magasak, de ezekben az esetekben is célszerű a mintát tovább metszeni, esetleg orientációján javítani, mely az ilyen esetek 22%-ában a patológiai vizsgálat kiterjesztése vagy a minta reorientálás utáni újrametszése olyan kóros területeket tárt fel, melyek a kezelés megkezdését indokolták. A nehezen véleményezhető betegek és a családtagok vizsgálatánál célszerű figyelembe venni a vékonybélben megkötődött antitestek pozitivitását is, mivel pozitív megítélését a nem kedvező metszési sík nem zavarja.

Az egyes diagnosztikus kategó magyar coeliakiás betegek adatainak értékelésével összeállított Symptom-Antibody-Genetics-Endoscopy/histology (SAGE) score összeg 4 vagy afeletti értéke jó egyezést adott mind retrospektív, mind prospektíven értékelt betegcsoporton. A pontrendszer azoknál is többségében elérte a 4 pontot, akiknek kezdetben nem volt boholyatrófiája, de az a követés korán kialakult. Ilyen pontrendszerek használata megkönnyítheti az új diagnosztikus kritériumok gyakorlati alkalmazását. A pontrendszer kialakításában szereplő tételek közül hiányzik még a HLA-DQ meghatározásnál nagyobb pozitív prediktív értékű genetikai eredmény. A kutatások azonban a későbbiekben találhatnak ilyen eltéréseket vagy hajlamosító tényezőket, melyek a pontrendszerbe később beilleszthetők.

7.1. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT SAJÁT *IN EXTENSO* KÖZLEMÉNYEK

(a kandidátusi fokozat megszerzését követően)

Impakt faktor (IF), független (F) és összes hivatkozás (H) feltüntetésével	IF	F	H
1. Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho KL, Korponay-Szabó IR , Sarnesto A, Savilahti E, Collin P, Mäki M. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. <i>Gastroenterology</i> . 1998 Dec;115(6):1322-8.	10,33	382	454
2. Korponay-Szabó IR , Sulkanen S, Halttunen T, Maurano F, Rossi M, Mazzarella G, Laurila K, Troncone R, Mäki M. Tissue transglutaminase is the target in both rodent and primate tissues for celiac disease-specific autoantibodies. <i>J Pediatr Gastroenterol Nutr</i> . 2000 Nov;31(5):520-7.	1,58	19	30
3. Korponay-Szabó IR , Halttunen T, Lőrincz M, Szalai Zs, B Kovács J, Maki M. Transglutaminase-alapú coeliakia diagnosztikus vizsgálatok hazai eredményei. <i>Gyermekgyógyászat</i> 2001;52:254-259.			
4. Korponay-Szabó IR , Mäki M. USA States Patent Number 7,361,480 - USA, Methods and Means for Detecting Gluten-Induced Diseases, Patent Granted 22.4.2008. European Patent No. 1390753. European Patent Office 22.10.2008.			
5. Korponay-Szabó IR , Laurila K, Szondy Z, Halttunen T, Szalai Z, Dahlbom I, Rantala I, Kovács JB, Fésüs L, Mäki M. Missing endomysial and reticulin binding of coeliac antibodies in transglutaminase 2 knockout tissues. <i>Gut</i> . 2003 Feb;52(2):199-204.	5,883	27	45
6. Korponay-Szabó IR , Dahlbom I, Laurila K, Koskinen S, Woolley N, Partanen J, Kovács JB, Mäki M, Hansson T. Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency. <i>Gut</i> . 2003 Nov;52(11):1567-71.	5,883	68	83
7. Kapitány A, Korponay-Szabó IR , Tóth L, Tumpek J, Csípő I, Woolley N, Partanen J, Szegedi Gy, Sipka S. HLA-DQ allélek diagnosztikus jelentősége szuboptimális módon felállított coeliakia diagnózis esetén. <i>Gyermekgyógyászat</i> 2004;55: pp. 443-448.			
8. Korponay-Szabó IR , Halttunen T, Szalai Z, Laurila K, Király R, Kovács JB, Fésüs L, Mäki M. In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. <i>Gut</i> . 2004 May;53(5):641-8.	6,601	79	116
9. Korponay-Szabó IR , Raivio T, Laurila K, Opre J, Király R, Kovács JB, Kaukinen K, Fésüs L, Mäki M. Coeliac disease case finding and diet onitoring by point-of-care testing. <i>Aliment Pharmacol Ther</i> . 2005 Oct 15;22(8):729-37.	3,343	25	30
10. Collin P, Kaukinen K, Vogelsang H, Korponay-Szabó IR , Sommer R, Schreier E, Volta U, Granito A, Veronesi L, Mascart F, Ocmant A, Ivarsson A, Lagerqvist C, Bürgin-Wolff A, Hadziselimovic F, Furlano RI, Sidler MA, Mulder CJ, Goerres MS, Mearin ML, Ninaber MK, Gudmand-Høyer E, Fabiani E, Catassi C, Tidlund H, Alaintalo L, Mäki M. Antiendomysial and antihuman recombinant tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis of coeliac disease: a biopsy-proven European multicentre study. <i>Eur J Gastroenterol Hepatol</i> . 2005 Jan;17(1):85-91.	1,69	82	103
11. Kaukinen K, Peräaho M, Collin P, Partanen J, Woolley N, Kaartinen T, Nuutinen T, Halttunen T, Mäki M, Korponay-Szabó IR . Small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in coeliac disease without villous atrophy: a prospective and randomized clinical study. <i>Scand J Gastroenterol</i> . 2005 May;40(5):564-72.	1,79	29	51
12. Kapitány A, Tóth L, Tumpek J, Csípő I, Sipos E, Woolley N, Partanen J, Szegedi G, Oláh E, Sipka S, Korponay-Szabó IR . Diagnostic significance of HLA-DQ typing in patients with previous coeliac disease diagnosis based on histology alone. <i>Aliment Pharmacol Ther</i> . 2006 Nov 1;24(9):1395-402.	3,287	10	12
13. Salmi TT, Collin P, Järvinen O, Haimila K, Partanen J, Laurila K, Korponay-Szabó IR , Huhtala H, Reunala T, Mäki M, Kaukinen K. Immunoglobulin A autoantibodies against transglutaminase 2 in the small intestinal mucosa predict forthcoming coeliac disease. <i>Aliment Pharmacol Ther</i> . 2006 Aug 1;24(3):541-52.	3,287	38	61

14. Raivio T, Kaukinen K, Nemes E, Laurila K, Collin P, Kovács JB, Mäki M, Korponay-Szabó IR . Self transglutaminase-based rapid coeliac disease antibody detection by a lateral flow method. <i>Aliment Pharmacol Ther</i> . 2006 Jul 1;24(1):147-54.	3,287	17	22
15. Király R, Vecsei Z, Deményi T, Korponay-Szabó IR , Fésüs L. Coeliac autoantibodies can enhance transamidating and inhibit GTPase activity of tissue transglutaminase: dependence on reaction environment and enzyme fitness. <i>J Autoimmun</i> . 2006 Jun;26(4):278-87.	2,154	12	17
16. Hadjivassiliou M, Mäki M, Sanders DS, Williamson CA, Grünewald RA, Woodroffe NM, Korponay-Szabó IR . Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia. <i>Neurology</i> . 2006 Feb 14;66(3):373-7.	5,69	46	67
17. Dezsőfi A, Krikovszky D, Kapitány A, Szebeni B, Veres G, Sipka S, Körner A, Madácsy L, Korponay-Szabó IR , Arató A. Az egyes HLA-DQ allelok gyakorisága 1-es típusú diabetesben és coeliakiában szenvedő gyermekekben. <i>Gyermekegyógyászat</i> 2006;57:287-291.			
18. Korponay-Szabó IR , Raivio T, Nemes É, Kovács J, Laurila K, Kaukinen K, Mäki M. Coeliakia autoantitestek helyszíni kimutatása Biocard gyorseszttel. <i>Gyermekegyógyászat</i> 2006;57:351-357.			
19. Nemes É, Kapitány A, Lefler É, Opre J, Tumpek J, Sipka S, Korponay-Szabó IR . Hepatitis B immunizációra adott immunválasz coeliakiában. <i>Gyermekegyógyászat</i> 2006; 57: 338-344.			
20. Salmi TT, Collin P, Korponay-Szabó IR , Laurila K, Partanen J, Huhtala H, Király R, Lorand L, Reunala T, Mäki M, Kaukinen K. Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. <i>Gut</i> . 2006 Dec;55(12):1746-53. Epub 2006 Mar 29.	9,002	42	71
21. Garcia-Horsman JA, Venäläinen JI, Lohi O, Auriola IS, Korponay-Szabó IR , Kaukinen K, Mäki M, Männistö PT. Deficient activity of mammalian prolyl oligopeptidase on the immunoactive peptide digestion in coeliac disease. <i>Scand J Gastroenterol</i> . 2007 May;42(5):562-71.	1,758	5	7
22. Szebeni B, Veres G, Dezsőfi A, Rusai K, Vannay A, Bokodi G, Vásárhelyi B, Korponay-Szabó IR , Tulassay T, Arató A. Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in coeliac disease. <i>J Pediatr Gastroenterol Nutr</i> . 2007 Aug;45(2):187-93.	2,102	16	19
23. Raivio T, Korponay-Szabó IR , Collin P, Laurila K, Huhtala H, Kaartinen T, Partanen J, Mäki M, Kaukinen K. Performance of a new rapid whole blood coeliac test in adult patients with low prevalence of endomysial antibodies. <i>Dig Liver Dis</i> . 2007 Dec;39(12):1057-63. Epub 2007 Nov 5.	1,982	11	13
24. Korponay-Szabó IR , Szabados K, Pusztai J, Uhrin K, Ludmány E, Nemes E, Kaukinen K, Kapitány A, Koskinen L, Sipka S, Imre A, Mäki M. Population screening for coeliac disease in primary care by district nurses using a rapid antibody test: diagnostic accuracy and feasibility study. <i>BMJ</i> . 2007 Dec 15;335(7632):1244-7. Epub 2007 Dec 6.	9,723	33	37
25. Koskinen O, Collin P, Korponay-Szabó IR , Salmi T, Iltanen S, Haimila K, Partanen J, Mäki M, Kaukinen K. Gluten-dependent small bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in overt and mild enteropathy coeliac disease. <i>J Pediatr Gastroenterol Nutr</i> . 2008 Oct;47(4):436-42.	2,132	8	13
26. Papp M, Nemes E, Foldi I, Udvardy M, Harsfalvi J, Altörjay I, Mate I, Dinya T, Varvolgyi C, Barta Z, Veres G, Lakatos PL, Tumpek J, Toth L, Szathmari E, Kapitány A, Gyetvai A, Korponay-Szabó IR . Haptoglobin polymorfizmus, új genetikai kockázati tényező a coeliakia kialakulásában. <i>Gyermekegyógyászat</i> 2008; 59: 9-16.			
27. Nemes É, Lefler E, Szegedi L, Kapitány A, Kovács JB, Balogh M, Szabados K, Tumpek J, Sipka S, Korponay-Szabó IR . Gluten intake interferes with the humoral immune response to recombinant hepatitis B vaccine in patients with celiac disease. <i>Pediatrics</i> . 2008 Jun;121(6):e1570-6.	4,789	20	20
28. Papp M, Foldi I, Nemes E, Udvardy M, Harsfalvi J, Altörjay I, Mate I, Dinya T, Varvolgyi C, Barta Z, Veres G, Lakatos PL, Tumpek J, Toth L, Szathmari E, Kapitány A, Gyetvai A, Korponay-Szabó IR . Haptoglobin polymorphism: a novel genetic risk factor for celiac disease development and its clinical manifestations. <i>Clin Chem</i> . 2008 Apr;54(4):697-704. Epub 2008 Feb 7.	5,579	4	5
29. Raivio T, Korponay-Szabó IR , Paajanen T, Ashorn M, Iltanen S, Collin P, Laurila K, Nemes E, Kovács JB, Carrard G, Saramäki M, Mäki M, Kaukinen K. Comparison of a novel whole blood transglutaminase-based ELISA with a whole blood rapid antibody test and established conventional serological celiac	2,132	3	6

disease assays. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Nov;47(5):562-7.

30. Koskinen LL, **Korponay-Szabo IR**, Viiri K, Juuti-Uusitalo K, Kaukinen K, Lindfors K, Mustalahti K, Kurppa K, Adány R, Pocsai Z, Széles G, Einarsdottir E, Wijmenga C, Mäki M, Partanen J, Kere J, Saavalainen P. Myosin IXB gene region and gluten intolerance: linkage to coeliac disease and a putative dermatitis herpetiformis association. *J Med Genet.* 2008 Apr;45(4):222-7. 5,713 7 13
31. **Korponay-Szabó IR**, Vecsei Z, Király R, Dahlbom I, Chirido F, Nemes E, Fésüs L, Mäki M. Deamidated gliadin peptides form epitopes that transglutaminase antibodies recognize. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Mar;46(3):253-61. 2,132 17 21
32. Dezsöfi A, Szebeni B, Hermann CS, Kapitány A, Veres G, Sipka S, Körner A, Madácsy L, **Korponay-Szabó I**, Rajczy K, Arató A. Frequencies of genetic polymorphisms of TLR4 and CD14 and of HLA-DQ genotypes in children with celiac disease, type 1 diabetes mellitus, or both. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Sep;47(3):283-7. 2,132 5 7
33. Stenman SM, Lindfors K, **Korponay-Szabó IR**, Lohi O, Saavalainen P, Partanen J, Haimila K, Wieser H, Mäki M, Kaukinen K. Secretion of celiac disease autoantibodies after in vitro gliadin challenge is dependent on small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits. *BMC Immunol.* 2008 Feb 29;9:6. 2,661 8 10
34. Myrsky E, Kaukinen K, Syrjänen M, **Korponay-Szabó IR**, Mäki M, Lindfors K. Coeliac disease-specific autoantibodies targeted against transglutaminase 2 disturb angiogenesis. *Clin Exp Immunol.* 2008 Apr;152(1):111-9. 2,853 13 24
35. Király R, Csoos E, Kurtán T, Antus S, Szigeti K, Simon-Vecsei Z, **Korponay-Szabó IR**, Keresztessy Z, Fésüs L. Functional significance of five noncanonical Ca²⁺-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. *FEBS J.* 2009 Dec;276(23):7083-96. Epub 2009 Oct 29. 3,042 5 6
36. Myrsky E, Syrjänen M, **Korponay-Szabó IR**, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Altered small-bowel mucosal vascular network in untreated coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(2):162-7. 2,084 1 8
37. Koskinen LL, Einarsdottir E, **Korponay-Szabó IR**, Kurppa K, Kaukinen K, Sistonen P, Pocsai Z, Széles G, Adány R, Mäki M, Kere J, Saavalainen P. Fine mapping of the CELIAC2 locus on chromosome 5q31-q33 in the Finnish and Hungarian populations. *Tissue Antigens.* 2009 Nov;74(5):408-16. 2,33
38. Myrsky E, Caja S, Simon-Vecsei Z, **Korponay-Szabó IR**, Nadalutti C, Collighan R, Mongeot A, Griffin M, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Celiac disease IgA modulates vascular permeability in vitro through the activity of transglutaminase 2 and RhoA. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Oct;66(20):3375-85. Epub 2009 Aug 13. 6,09 2 9
39. Koskinen LL, Einarsdottir E, Dukes E, Heap GA, Dubois P, **Korponay-Szabó IR**, Kaukinen K, Kurppa K, Zibera F, Vatta S, Not T, Ventura A, Sistonen P, Adány R, Pocsai Z, Széles G, Mäki M, Kere J, Wijmenga C, van Heel DA, Saavalainen P. Association study of the IL18RAP locus in three European populations with coeliac disease. *Hum Mol Genet.* 2009 Mar 15;18(6):1148-55. Epub 2008 Dec 22. 7,386 6 9
40. Haimila K, Einarsdottir E, de Kauwe A, Koskinen LL, Pan-Hammarström Q, Kaartinen T, Kurppa K, Zibera F, Not T, Vatta S, Ventura A, **Korponay-Szabó IR**, Adány R, Pocsai Z, Széles G, Dukes E, Kaukinen K, Mäki M, Koskinen S, Partanen J, Hammarström L, Saavalainen P. The shared CTLA4-ICOS risk locus in celiac disease, IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Genes Immun.* 2009; 10:151-161. 4,222 10 11
41. Papp M, Foldi I, Altorjay I, Palyu E, Udvardy M, Tumpek J, Sipka S, **Korponay-Szabó IR**, Nemes E, Veres G, Dinya T, Tordai A, Andrikovics H, Norman GL, Lakatos PL. Anti-microbial antibodies in celiac disease: trick or treat? *World J Gastroenterol.* 2009 Aug 21;15(31):3891-900. 2,092 3 9
42. Koskinen O, Villanen M, **Korponay-Szabó I**, Lindfors K, Mäki M, Kaukinen K. Oats do not induce systemic or mucosal autoantibody response in children with coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009 May;48(5):559-65. 2,183 5 8
43. Koskinen L, Romanos J, Kaukinen K, Mustalahti K, **Korponay-Szabó I**, Barisani D, Bardella MT, Zibera F, Vatta S, Széles G, Pocsai Z, Karell K, Haimila K, Adány R, Not T, Ventura A, Mäki M, Partanen J, Wijmenga C, Saavalainen P. Cost-effective HLA typing with tagging SNPs predicts celiac disease risk haplotypes in the Finnish, Hungarian, and Italian populations. *Immunogenetics.* 2009 Apr;61(4):247-56. 2,988 10 13

44. Sareneva I, Koskinen LL, Korponay-Szabó IR , Kaukinen K, Kurppa K, Zibera F, Vatta S, Not T, Ventura A, Adány R, Pocsa Z, Széles G, Mäki M, Saavalainen P, Einarsdottir E. Linkage and association study of FcγR polymorphisms in celiac disease. <i>Tissue Antigens</i> . 2009 Jan;73(1):54-8.	2,33	1	1
45. Einarsdottir E, Koskinen LL, Dukes E, Kainu K, Suomela S, Lappalainen M, Zibera F, Korponay-Szabó IR , Kurppa K, Kaukinen K, Adány R, Pocsa Z, Széles G, Färkkilä M, Turunen U, Halme L, Paavola-Sakki P, Not T, Vatta S, Ventura A, Löfberg R, Torkvist L, Bresso F, Halfvarson J, Mäki M, Kontula K, Saarialho-Kere U, Kere J, D'Amato M, Saavalainen P. IL23R in the Swedish, Finnish, Hungarian and Italian populations: association with IBD and psoriasis, and linkage to celiac disease. <i>BMC Med Genet</i> . 2009 Jan 28;10:8.	2,84	19	21
46. Korponay-Szabó IR , Fésüs L, Bagossi P, Csősz É, Király R, Simon-Vecsei Z, Mäki M. Diagnosis and treatment of gluten-induced autoimmune diseases. PCT WO 2010/116196 A2			
47. Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, Zernakova A, Heap GA, Adány R, Aromaa A, Bardella MT, van den Berg LH, Bockett NA, de la Concha EG, Demia B, Fehrmann RS, Fernández-Arquero M, Fiala S, Grandone E, Green PM, Groen HJ, Gwilliam R, Houwen RH, Hunt SE, Kaukinen K, Kelleher D, Korponay-Szabó IR , Kurppa K, MacMathuna P, Mäki M, Mazzilli MC, McCann OT, Mearin ML, Mein CA, Mirza MM, Mistry V, Mora B, Morley KI, Mulder CJ, Murray JA, Núñez C, Oosterom E, Ophoff RA, Polanco I, Peltonen L, Platteel M, Rybak A, Salomaa V, Schweizer JJ, Sperandio MP, Tack GJ, Turner G, Veldink JH, Verbeek WH, Weersma RK, Wolters VM, Urcelay E, Cukrowska B, Greco L, Neuhausen SL, McManus R, Barisani D, Deloukas P, Barrett JC, Saavalainen P, Wijmenga C, van Heel DA. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. <i>Nat Genet</i> . 2010 Apr;42(4):295-302. Epub 2010 Feb 28.	36,377	56	90
48. Caja S, Myrsky E, Korponay-Szabó IR , Nadalutti C, Sulic AM, Lavric M, Sblattero D, Marzari R, Collighan R, Mongeot A, Griffin M, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Inhibition of transglutaminase 2 enzymatic activity ameliorates the anti-angiogenic effects of coeliac disease autoantibodies. <i>Scand J Gastroenterol</i> . 2010 Apr;45(4):421-7.	1,966	0	3
49. Korponay-Szabó IR , Fésüs L, Bagossi P, Csősz É, Király R, Simon-Vecsei Z, Mäki M. Diagnosis of gluten-induced autoimmune diseases. PCT WO 2010/113025 A2			
50. Dahlbom I, Korponay-Szabó IR , Kovács JB, Szalai Z, Mäki M, Hansson T. Prediction of clinical and mucosal severity of coeliac disease and dermatitis herpetiformis by quantification of IgA/IgG serum antibodies to tissue transglutaminase. <i>J Pediatr Gastroenterol Nutr</i> . 2010 Feb;50(2):140-6.	2,18	10	10
51. Hodrea J, Demény MA, Majai G, Sarang Z, Korponay-Szabó IR , Fésüs L. Transglutaminase 2 is expressed and active on the surface of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. <i>Immunol Lett</i> . 2010 May 4;130(1-2):74-81.	2,511	3	3
52. Einarsdottir E, Bevoja MR, Zernakova A, Monsuur A, Koskinen LL, Slot RV, Mulder C, Mearin ML, Korponay-Szabó IR , Kaukinen K, Kurppa K, Kere J, Mäki M, Wijmenga C, Saavalainen P. Multiple independent variants in 6q21-22 associated with susceptibility to celiac disease in the Dutch, Finnish and Hungarian populations. <i>Eur J Hum Genet</i> . 2011;19:682-6. 2011 Feb 16. [Epub ahead of print]	4,38		
53. Giersiepen K, Lelgemann M, Stuhldreher N, Ronfani L, Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR . Accuracy of Diagnostic Antibody-Tests for Coeliac Disease in Children: Summary from an Evidence Report. <i>J Pediatr Gastroenterol Nutr</i> 2012; 54:229-241.	2,18		
54. Rauhavirta T, Qiao SW, Jiang Z, Myrsky E, Lojonen J, Korponay-Szabó IR , Salovaara H, Garcia-Horsman JA, Venäläinen J, Männistö PT, Collighan R, Mongeot A, Griffin M, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K. Epithelial transport and deamidation of gliadin peptides: a role for coeliac disease patient immunoglobulin A. <i>Clin Exp Immunol</i> . 164:127-136.	3,134		
55. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR , Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelgeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP for the ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis. <i>J Pediatr Gastroenterol Nutr</i> 2012;54:136-160.	2,18		
56. Szondy Z, Korponay-Szabó IR , Király R, Fésüs L. Transglutaminase 2 dysfunctions in the development of autoimmune disorders: celiac disease and tg2-/- mouse. <i>Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol</i> . 2011;78:295-346. Joh Wiley & Sons, Inc., Hoboken New Jersey, 2011.			
57. Ribes-Koninckx C, Mearin M, Korponay-Szabó IR , Shamir R, Husby S, Ventura A, Branski D, Catassi C, Koletzko S, Mäki M, Troncone R, Zimmer K; The ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease	2,18		

Diagnosis. Coeliac disease diagnosis: espghan 1990 Criteria or need for a change? Results of a questionnaire. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2012;54:15-9.

58. Veres G, **Korponay-Szabó IR**, Maka E, Glasz T, Mamula P, Papp M, Dezsöfi A, Arató A. Duodenal ulceration in a celiac patient with plasminogen I deficiency: coincidence or cofactors? Pediatrics 2011, e1302-6. 5,391
59. Einarsdottir E, Koskinen L, de Kauwe A, Dukes E, Mustalahti K, Balogh M, **Korponay-Szabó IR**, Kaukinen K, Kurppa K, Ádány R, Pocsa Z, Széles G, Mäki M, Kere J, Saavalainen P. Genome-wide analysis of extended pedigrees confirms IL2-IL21 linkage and reveals additional regions of interest potentially influencing coeliac disease risk. Tissue Antigens 2011;78:428-37. 3,024
60. Simon-Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Dahlbom I, Caja S, Csősz E, Lindfors K, Sblattero D, Nemes É, Mák M, Fésüs L, **Korponay-Szabó IR**. A single conformational transglutaminase 2 epitope contributed by three domains is critical for celiac antibody binding and effects. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109:431-436. Epub 2011 Dec 22. 9,771
61. Martucciello S, Lavric M, Boglarka T, **Korponay-Szabó IR**, Nadalutti C, Myrsky E, Rauhvirta T, Esposito C, Sulic AM, Sblattero D, Marzari R, Mäki M, Kaukinen K, Lindfors K, Caja S. RhoB is associated with the anti-angiogenic effects of celiac patient transglutaminase 2-targeted autoantibodies. J Mol Med. 2012 Jan 6.[Epub ahead of print] 5,192

7.2. EGYÉB SAJÁT *IN EXTENSO* KÖZLEMÉNYEK

Impakt faktor (IF), független (F) és összes hivatkozás (H) feltüntetésével

IF / F / H

62. **Korponay-Szabó IR**, Kovács JB, Lőrincz M, Sashegyi J. Endomysium-ellenanyag coeliakiás gyermekekben: a gluten-szenzitivitas okozta vékonybél- boholyatrophia specifikus serologiai markere Orvosi Hetilap 1991 Apr 30;132(17):929-31.
63. **Korponay-Szabó IR**, Kovács J, Lőrincz M, Körmendy M, Sashegyi J. Anti-endomysium ellenanyag vizsgálattal felderített új coeliakia esetek gluten sensitiv betegek családjában és nem specifikus gastrointestinalis panaszok miatt vizsgált gyermekekben. Orvosi Hetilap 1993;134(1):15-20.
64. **Korponay-Szabó IR**, B Kovács J, Lőrincz M, Sashegyi J. Antiendomysium ellenanyag-pozitivitás predictiv értéke permanens glutenintoleranciára gyermekek prospectiv glutenterhelése alapján. Gyermekgyógyászat 1993; 44:517-524.
65. **Korponay-Szabó IR**, Kovács J, Lőrincz M, Körmendy M, Sashegyi J. Anti-endomysium ellenanyag vizsgálattal felderített új coeliakia esetek gluten sensitiv betegek családjában és nem specifikus gastrointestinalis panaszok miatt vizsgált gyermekekben Orvosi Hetilap 1993 Jan 3;134(1):15-20. 1 2
66. **Korponay-Szabó IR**, Kovács JB, Lőrincz M, Körmendy M, Sashegyi J. Gluténszenzitív enteropathia: technikai megfontolások az antiendomysium ellenanyag vizsgálatához. Lege Artis Medicinae 1994;4(2):132-145.
67. **Korponay-Szabó IR**. Az antiendomysium ellenanyag diagnosztikai és prognosztikai szerepe. Pediáter 1995;4:85 -93.
68. **Korponay-Szabó IR**, Kovács JB, Lőrincz M, Gorács G, Szabados K, Balogh M. Prospective significance of antiendomysium antibody positivity in subsequently verified celiac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1997 Jul;25(1):56-63. 1,294 14 23
69. **Korponay-Szabó IR**, Kovács JB, Lőrincz M, Török E, Gorács G, Csitary F. The human appendix: a composite substrate for anti-endomysium, anti-reticulin and anti-bowel antibody testing in coeliac disease. Medical Science Monitor 1997;285-289. 1
70. **Korponay-Szabó IR**, B Kovács J, Czinner A, Vámos A, Gorács Gy, Szabó T. Milyen gyakori a coeliakia előfordulása a magyar népességben? Gyermekgyógyászat 1997;48:236-241.
71. **Korponay-Szabó IR**, Kovács J, Lőrincz M, Török E, Gorács G. Families with multiple cases of gluten-sensitive enteropathy. Z Gastroenterol. 1998 Jul;36(7):553-8. 0,89 28 29
72. **Korponay-Szabó IR**, Kovács JB, Czinner A, Gorács G, Vámos A, Szabó T. High prevalence of silent celiac disease in preschool children screened with IgA/IgG antiendomysium antibodies. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1999 Jan;28(1):26-30. 1,486 86 90
73. **Korponay-Szabó IR** Maki M. A coeliakia-kutatás új iránya: a szöveti transzglutamináz. Gyermekgyógyászat 1999;50(3):183-191.
74. **Korponay-Szabó IR**. Laboratóriumi, szerológiai diagnosztika. In: Banai J (ed.) Coeliakia, a provokált autoimmun betegség modellje. Budapest:2002. pp. 37-48.
75. **Korponay-Szabó IR**. Nem emésztőszervi tünetekkel jelentkező coeliakia. Kórház 2002;4:(4)
76. Karel K, **Korponay-Szabó IR**, Szalai Z, Holopainen P, Mustalahti K, Collin P, Mäki M, Partanen J. Genetic dissection between coeliac disease and dermatitis herpetiformis in sib pairs. Ann Hum Genet. 2002 Nov;66(Pt 5-6):387-92. 2,283 11 12
77. **Korponay-Szabó IR**. Glutén-szenzitív enteropátia (coeliakia). Gyermekorvos Továbbképzés 2003;2:146-152.
78. Opre J, Nemes É, **Korponay-Szabó IR**, Woolley N, Oláh É. Homozigóta DR3;DQ2 coeliakiás család. Gyermekgyógyászat 2004;55:449-452.

79. Tumpek J, **Korponay-Szabó IR**, Király R, Csipő I, Fésüs L, Sipka S. A coeliakiás ellenanyagok epitóspecifitásának jelentősége a transzglutamináz autoantitestek diagnosztikus kimutatásában. *Gyermekegyógyászat* 2004;55: 453-459.
80. **Korponay-Szabó IR**. Coeliac disease diagnosis in IgA deficient patients. *ELIA Journal* 2004; 2:11) 8-11.
81. **Korponay-Szabó IR**, Opre J, Oláh É. Tehéntejfehérje-allergia vizsgálata kettős vak, placebo-kontrollált terheléssel. *Gyermekegyógyászat* 2004;55:473-478.
82. **Korponay-Szabó IR**. Szteroidok alkalmazása az IBD kezelésében. *Gyermekegyógyászat* 2004;55:401-403.
83. **Korponay-Szabó IR**, Polgár Marianne. Coeliakia. In: Oláh É (ed.) *Gyermekegyógyászati Kézikönyv*. Budapest: Medicina Könyvkiadó, 2004. pp. 847-852.
84. **Korponay-Szabó IR**. A coeliakia patogenezise és a gyermekkori manifesztáció. *Magyar Immunológia* 2005;4(2):47-48.
85. Sander P, Alfalah M, Keiser M, **Korponay-Szabó IR**, Kovács JB, Leeb T, Naim HY. Novel mutations in the human sucrase-isomaltase gene (SI) that cause congenital carbohydrate malabsorption. *Hum Mutat.* 2006 Jan;27(1):119. 6,473 2 5
86. **Korponay-Szabó IR**. Coeliakia. In: Tulassay Tivadar, Arató András (ed.) *Gyermekegyógyászati útmutató: Diagnosztikus és terápiás ajánlások gyermekgyógyászati kórképekhez és tünetekhez*. Budapest: Medition Kiadó, 2006. pp. 73-84.
87. Molnár K, Torma K, Siklós K, Csanády K, **Korponay-Szabó IR**, Szalai Z. Juvenile dermatomyositis and celiac disease. A rare association. *European Journal of Pediatric Dermatology* 2006;16 (3):153-157.
88. Derekas B, Nemes É, **Korponay-Szabó IR**. Beépített testhelyzet-érzékelő szerepe a 24 órás nyelőcső pH monitorizálás kiértékelésében. *Gyermekegyógyászat* 2007;58(5): 377-380.
89. Szabó A, B Kovács J, Lőrincz M, Nagy Anikó, **Korponay-Szabó IR**, Szalai Zs, Asbóth D, Péter G. Coeliakia szokatlan megjelenési formája. *Gyermekegyógyászat* 2007;58(5): 359-361.
90. Mäki M, **Korponay-Szabó IR**. The rapid test for coeliac disease in the experience of its inventors.: Il test rapido nell'esperienza di chi l'ha inventato. *Medico e Bambino* 2008;27: 363-365.
91. Tumpek J, Németh J, Miklós K, **Korponay-Szabó IR**, Sipka S. A coeliakia (gluténszenzitív enteropathia) laboratóriumi diagnosztikája. *KLINIKAI ÉS KÍSÉRLETES LABORATÓRIUMI MEDICINA* 2008;33(1): 22-25.
92. Sziksz E, Veres G, Vannay A, Prókai A, Gál K, Onody A, **Korponay-Szabó IR**, Reusz G, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. Increased heat shock protein 72 expression in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010 Nov;51(5):573-8. 2,18
93. Szebeni B, Vannay A, Sziksz E, Prókai A, Cseh A, Veres G, Dezsofi A, Györffy H, **Korponay-Szabó IR**, Arató A. Increased expression of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 in the duodenal mucosa of children with coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010 Feb;50(2):147-53. 2,183
94. Vannay A, Sziksz E, Prókai A, Veres G, Molnár K, Szakál DN, Onódy A, **Korponay-Szabó IR**, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. Increased expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in coeliac disease. *Pediatr Res.* 2010 Aug;68(2):118-22. 2,803 1 1

Idézhető absztraktok:

- A1 **Korponay-Szabó IR**, Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Maurano M, Rossi M, Troncone R, Mäki M. Complete overlapping of tissue staining patterns of anti-transglutaminase antibodies and coeliac disease-specific IgA antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;26,553. 31th Annual Meeting of the ESPGHAN, Toulouse, 1998

- A2 Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho K-L, Korponay-Szabó IR, Sarnesto A, Savilahti E, Collin P, Mäki M. Tissue transglutaminase enzyme-linked immunosorbent assay for coeliac disease autoantibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;26:566. 31th Annual Meeting of the ESPGHAN, Toulouse, **1998**
- A3 Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho K-L, Korponay-Szabó IR, Sarnesto A, Savilahti E, Collin P, Mäki M. Tissue transglutaminase as antigen in enzyme-linked immunosorbent assay for coeliac disease autoantibodies. *Gastroenterology* 1998, 114 (4):G1714 Suppl.A420. DDW, New Orleans, **1998**.
- A4 Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Sulkanen S, Szalai Zs, Laurila K, Török É, B.Kovács J, Mäki M. Coeliac disease-specific and coeliac disease non-specific transglutaminase autoantibodies. 7th United European Gastroenterology Week, Rome, 1999. *Gut* **1999**; Suppl V.A27
- A5 Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Laurila K, Sulkanen S, Szalai Zs, Dahlbom I, B.Kovács J, Mäki M. Calreticulin-bound tissue transglutaminase is less antigenic for celiac autoantibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31:Suppl2, S10. World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Boston, **2000**.
- A6 Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Laurila K, Sulkanen S, Lörincz M, B.Kovács J, Mäki M. Transglutaminase ELISA for IgA-deficient subjects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31:Suppl3,S9. 9th International Symposium on Celiac Disease, Baltimore, **2000**.
- A7 IR Korponay-Szabó; T Halttunen, K Laurila; S Sulkanen; Zs Szalai; I Dahlbom; J B.Kovacs and M Maki. Calreticulin-bound tissue transglutaminase is less antigenic for celiac autoantibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31:Suppl3, S9. 9th International Symposium on Celiac Disease, Baltimore, **2000**.
- A8 Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Laurila K, Szalai Zs, B. Kovács J, Collin P, Mäki M. Threshold of human transglutaminase autoantibody positivity in known coeliacs. 8th United European Gastroenterology Week, Brussels, 2000. *Gut* **2000**;47, Suppl III, 198.
- A9 Korponay-Szabó IR, Szondy Zs, Laurila K, Halttunen T, Sarang Zs, Dahlbom I, B. Kovács J, Fésüs L, Mäki M. Coeliac autoantibody testing on tissue transglutaminase knockout mouse tissues. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:361. 34th Annual Meeting of the ESPGHAN, Geneva, **2001**.
- A10 Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Laurila K, Szalai Zs, B.Kovács J, Mäki M. Capillary blood test for coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:361. 34th Annual Meeting of the ESPGHAN, Geneva, **2001**.
- A11 Korponay-Szabó IR, Szondy Zs, Laurila K, Halttunen T, Sarang Zs, Dahlbom I, B. Kovács J, Fésüs L, Mäki M. Coeliac autoantibodies do not bind to transglutaminase 2 knockout mouse tissues. *Gut* 2001;49:Suppl III, 2332. 9th United European Gastroenterology Week, Amsterdam, **2001**
- A12 Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Dahlbom, Laurila K, B.Kovács J, Fésüs L, Mäki M. Transglutaminase dependency and epitope spreading of endomysial autoantibodies during developing coeliac disease. *Gut* 2002;51,Suppl1:A101 10th United European Gastroenterology Week, Geneva, **2002**.
- A13 Korponay-Szabó IR, T.Halttunen T, Szalai Zs, B.Kovács J, Mäki M. In vivo targeting of jejunal and extrajejunal tissue transglutaminase by coeliac IgA autoantibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:449. 35th Annual Meeting of the ESPGHAN, Taormina, **2002**.
- A14 Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Szalai Zs, Laurila K, Király R, B.Kovács J, Fésüs L, Mäki M. In vivo targeting of jejunal and extrajejunal transglutaminase 2. *Minerva Biotechnol* 2002;14:226. 7th International Symposium on Transglutaminases and Protein Cross-Linking, Ferrara, **2002**
- A15 Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Dahlbom, Laurila K, B.Kovács J, Fésüs L, Mäki M. Is

- endomysial antibody (EMA) positivity in patients without villous atrophy due to antibodies against transglutaminase (TG2)? *Minerva Biotechnol* 2002;14:226. 7th International Symposium on Transglutaminases and Protein Cross-Linking, Ferrara, **2002**
- A16 Király R, Deményi T, Korponay-Szabó I, Fésüs L. Effect of coeliac autoantibodies on the enzymatic activity of tissue transglutaminase. *Minerva Biotechnol* 2002;14:193. 7th International Symposium on Transglutaminases and Protein Cross-Linking, Ferrara, **2002**
- A17 Korponay-Szabo IR, Dahlbom I, Laurila K, Koskinen S, Karell K, Partanen J, Kovacs JB, Maki M, Hansson T. Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:536. 36th Annual Meeting of the ESPGHAN, Prague, **2003**.
- A18 Korponay-Szabo I, B.Kovács J, Opre J, Maki M. Point-of-care test for coeliac disease. *Gut* 2003;52, Suppl VI:A66. 11th United European Gastroenterology Week, Madrid, **2003**.
- A19 Korponay-Szabo I, Dahlbom I, B.Kovács J, Hansson T. IgG class anti-tissue transglutaminase antibodies and the clinical presentation type of coeliac disease. *Gut* 2003, ;52, Suppl VI:A66. 11th United European Gastroenterology Week, Madrid, **2003**.
- A20 Korponay-Szabo IR, Raivio TM, Kaukinen K, B.Kovács J, Collin P, Laurila K, Partanen J, Mäki M. Self transglutaminase-based rapid coeliac antibody detection by lateral flow method. *Gut* 2004, 53, Suppl VI:A196.:Suppl.CD 12th United European Gastroenterology Week, Prague, **2004**.
- A21 Korponay-Szabo IR, Halttunen T, B.Kovács J, Mäki M. IgM and IgG targeting of jejunal transglutaminase in IgA deficient coeliac patients. *Gut* 2004, 53, Suppl. VI:A195. 12th United European Gastroenterology Week, Prague, **2004**.
- A22 Korponay-Szabo I, Hadjivassiliou M, Williamson CA, Laurila K, Haimila K, Woodrofe N, Sanders DS, Maki M. Gluten ataxia: Intestinal and brain targeting by tissue transglutaminase autoantibodies. 38th Annual Meeting of the ESPGHAN, 2005. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2005**;40:616.
- A23 Korponay-Szabó IR, Raivio T, Laurila K, B.Kovács J, Nemes É, Kaukinen K, Mäki M. Rapid detection of coeliac autoantibodies in the office. 38th Annual Meeting of the ESPGHAN, 2005. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. **2005**;40:619.
- A24 Korponay-Szabo IR, Kapitány A, B.Kovács J, Lőrincz M, Opre J, Nemes É, Tumpek J, Sipka S. Is coeliac disease a dominantly inherited disorder? 38th Annual Meeting of the ESPGHAN, 2005. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. **2005**;40:638.
- A25 Kaukinen K, Holm K, Villanen M, Korponay-Szabo IR, Mäki M. Small bowel mucosal transglutaminase autoantibodies during oats and gluten challenge in coeliac disease. 38th Annual Meeting of the ESPGHAN, 2005. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. **2005**;40:618.
- A26 Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Laurila K, Dahlbom I, B.Kovács J, Mäki M. Calreticulin-bound transglutaminase 2 is poorly accessible to coeliac autoantibodies. 30th FEBS Congress, Budapest, 2005. *FEBS Journal* 2005;272(suppl1):411.
- A27 Király R, Vecsei Z, Deményi T, Korponay-Szabo IR, Fésüs L. Coeliac autoantibodies can enhance transamidating and inhibit GTPase activity of tissue transglutaminase. 30th FEBS Congress, Budapest, 2005. *FEBS Journal* 2005;272(suppl1):411.
- A28 Korponay-Szabo IR, Szabados K, Pusztai J, Ludmany E, Uhrin K, Kaukinen K, Imre A, Maki M. Finding coeliac disease in the community by decentralised rapid antibody testing on site. 14th United European Gastroenterology Week (UEGW), Berlin, 2006. *Gut* 2006;55:Suppl:A55

Közlemény típusok	Szám		Hivatkozások	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk	85	---	---	---
teljes cikk, nemzetközi folyóiratban	---	61	1220	1616
teljes cikk, hazai idegen nyelvű folyóiratban	---	0	0	0
teljes cikk, hazai magyar nyelvű folyóiratban	---	23	1	2
cikk, tudományos levélként	---	0	0	0
II. Könyvek	0	---	---	---
a) Szakkönyv	0	---	---	---
Szakkönyv, kézikönyv, idegen nyelvű	---	0	0	0
Szakkönyv, kézikönyv, magyar nyelvű	---	0	0	0
Tankönyv	---	0	0	0
b) Szerkesztett könyv	0	---	---	---
Szerkesztett könyv, idegen nyelvű	---	0	---	---
Szerkesztett könyv, magyar nyelvű	---	0	---	---
Szerkesztett tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvfejezet	3	---	---	---
Könyvfejezet, idegen nyelvű	---	0	0	0
Könyvfejezet, magyar nyelvű	---	2	0	0
Tankönyvekbe írt fejezetek	---	1	0	0
IV. Proceedings⁺	0	---	0	0
V. Multicentrikus vizsgálat	0	---	---	---
a) Szerző	---	1	82	103
b) Szereplő	---	0	---	---
Oktatási közlemények összesen (II-III)	---	1	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-V.)	88	---	1303	1721

VI. Egyéb tudományos	8	---	---	---
Egyéb tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	8	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
VII. Absztrakt	77	---	1	3

Összesített impakt faktor	239,86	---	---	---
Idézettség száma	---	---	1304	1724
Hirsch index	20	---	---	---

dc_308_11

Speciális tudománymetriai adatok	
	Adat
Első szerzős folyóiratcikkek száma (az összes %-ban)	29 (34%)
Utolsó szerzős tudományos cikkek száma (az összes %-ban)	12 (14,12%)
Első és utolsó szerzőségű folyóiratcikkek impakt faktorai	85,03
Az utolsó tudományos fokozat (Kandidátus) elnyerése utáni (1998 -) tudományos folyóiratcikkek összegzett impakt faktora és száma (zárójelben)	238,56 (77)
Magyar nyelven megjelent tudományos teljes folyóiratcikkek száma	23
Az utolsó 10 év (2002-2012) tudományos teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	71
összesített impakt faktora	224,28
hivatkozások száma	1092
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	454 (26,33%)
Folyóiratcikkek,15-nél több szerzővel (nem multicentrikus)	11

Megjegyzések:

Az MTMT nem tudja szolgáltatni a kérelmezőnek kizárólag külföldi intézményből publikált folyóiratcikkeinek számát, összesített impakt faktorát és független hivatkozásainak számát, valamint az ilyen közlemények első és utolsó szerzőre vonatkozó impaktfaktor összeget. Ezeket az adatokat a pályázónak kell összegyűjtenie és feltöltenie a Doktori Tanács elektronikus rendszerébe.